



การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเจลคานามัยซินและคุณสมบัติทางชีวภาพ



โดย
นางสาวทิพรัตน์ เสมสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเจลดานามัยซินและคุณสมบัติทางชีวภาพ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

SYNTHESIS OF GELDANAMYCIN DERIVATIVES AND THEIR BIOLOGICAL
ACTIVITIES



By
MISS Tipparat SAMSAWAT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (MICROBIOLOGY)

Department of MICROBIOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2022

Copyright of Silpakorn University

620720049 : จุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : Streptomyces zerumbet, อนุพันธ์ของเจลคานามัยซิน, ทดสอบความเป็นพิษ, ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง, กิจกรรมต้านไวรัส

นางสาว ทิพพรรัตน์ เสมอศักดิ์: การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเจลคานามัยซินและคุณสมบัติทางชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. ชงชัย เดโชวิศาล

เจลคานามัยซิน (GDM 1) เป็นยาปฏิชีวนะที่แยกได้จาก *Streptomyces zerumbet* W14 ได้ จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร International *Streptomyces* Project 2 (ISP-2) ทำการสกัดด้วย ethyl acetate และแยกสารด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีจะได้สารเจลคานามัยซินที่บริสุทธิ์ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดใหม่ 8 ชนิด ได้แก่ สังเคราะห์อนุพันธ์ของกลุ่มโคปาลามิน 23-27 ได้แก่ การสังเคราะห์ (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-dihydroxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-ylcarbamate(23), (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-dimethoxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-ylcarbamate (24) , (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-dibutoxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (25) , (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-bis(benzyloxy)phenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (26) , และ (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy)phenethyl) amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (27) , กลุ่มอะมิโนแอลกอฮอล์ ได้แก่ การสังเคราะห์ (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-13-hydroxy-19-(((S)-1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (28) , (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-13-hydroxy-19-(((S)-1-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (29) , (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-13-hydroxy-19-(((S)-1-hydroxy-3-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (30) อนุพันธ์ของเจลคานามัยซินชนิดใหม่มีค่าละลายน้ำได้ดีกว่าเจลคานามัยซิน

อนุพันธ์ของเจลคานามัยซินชนิดใหม่เหล่านี้ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สารทุกชนิด (ยกเว้น compound 24 และ 25) มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza virus A/free-grazing duck/Nakhon Pathom/1/2017(H5N2)) และผลการศึกษพบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์มีฤทธิ์ปานกลางใน Hela HepG2 และ MDA มี IC₅₀ 19-71 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติต่ำ

620720049 : Major (MICROBIOLOGY)

Keyword : Streptomyces zerumbet Geldanamycin derivatives cytotoxicity activity anticancer activity antiviral activity

MISS TIPPARAT SAMSAWAT : SYNTHESIS OF GELDANAMYCIN DERIVATIVES AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR THONGCHAI TAECHOWISAN, Ph.D.

Geldanamycin (GDM, 1) is an antibiotic that was isolated from *Streptomyces zerumbet* W14 After cultivation on International *Streptomyces* Project 2 (ISP-2) medium, ethyl acetate extraction and silica gel column chromatography, the purified geldanamycin was obtained. Eight new geldanamycin derivatives were synthesized by nucleophilic substitution of geldanamycin with dopamine 23-27 derivative synthesis; (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-dihydroxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate(23) , (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-dimethoxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate(24) , (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-dibutoxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (25) , (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-bis(benzyloxy)phenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (26) , (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy)phenethyl) amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (27) , amino alcohol group, including synthesis (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-13-hydroxy-19-(((S)-1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (28), (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-13-hydroxy-19-(((S)-1-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (29), (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-13-hydroxy-19-(((S)-1-hydroxy-3-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (30), All geldanamycin derivatives showed the water solubility higher than that of geldanamycin.

These geldanamycin derivatives (except compound 24 and 25) exhibited antiviral activity against influenza virus A/free-grazing duck/Nakhon Pathom/1/2017(H5N2)) The results showed that cytotoxicity was moderately active in Hela, HepG2 and MDA cell lines with IC_{50} 19-71 μ g/mL and low cytotoxicity in normal cell

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.ชงชัย เตโชวิศาล อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ พร้อมทั้งช่วยให้คำปรึกษาปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างงานวิจัย ขอขอบพระคุณคณะกรรมการ ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ สนับสนุนและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาพร ชื่นอ้อม และท่านกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาพร รุ่งเรือง สำหรับเวลา ข้อคิดเห็น และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วยา พุทธรังษี ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และ ดร.จันจิรา จรามรรบูรพวงศ์ ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนความรู้ทางด้านเคมีที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณกรพรหม เสวตสุวรรณกุล นักวิทยาศาสตร์ของภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ และให้ความรู้ในบางส่วนที่เกี่ยวกับวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณนงนุช กำลิ่งแพทย์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่มอบเซลล์มะเร็งมาทำการทดลองในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือเป็นกำลังใจ การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากมหาวิทยาลัยศิลปากร ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนครอบครัวที่เลี้ยงดูสั่งสอนอบรมและเป็นกำลังใจสำคัญในการเรียนและการสนับสนุนมาโดยตลอด

นางสาว ทิพรัตน์ เสมสวัสดิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูป	ฉุ
บทที่ 1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
Endophytic actinomycetes.....	3
Cell culture	10
HepG2 cell line	10
Hela cell line	11
MDA-MB-231 cell line.....	12
LLC-MK2 cell line.....	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	16
3.1 การผลิตและการสกัดสารเจลคานามัยซิน จาก <i>Streptomyces zerumbet</i> W14	16
3.2 การทำให้บริสุทธิ์ของสารเจลคานามัยซิน.....	16
3.3 การสังเคราะห์สาร synthesis.....	17
การสังเคราะห์ dopamine derivative.....	17
การสังเคราะห์ ฮอร์โมนแอลกอฮอล์.....	24
การสังเคราะห์ อนุพันธ์ของ 17-demethoxy geldanamycin	27

3.4 การทดสอบความสามารถในการละลายน้ำของ geldanamycin และอนุพันธ์.....	37
3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ.....	37
3.5.1 Anticancer activity	37
MTT assay for cell viability.....	38
3.5.2 Antiviral	39
3.6 การศึกษาการจำลองการจับกันของ โมเลกุล (Molecular docking)	41
3.7 การทำนายคุณสมบัติ ADMET ของ เจลดานามัยซินและอนุพันธ์	42
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	43
4.1 การผลิตและการสกัดสารเจลดานามัยซิน จาก <i>Streptomyces zerumbet</i> W14	43
4.2 การทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดเจลดานามัยซิน	44
4.3 การสังเคราะห์สาร synthesis.....	46
4.4 การทดสอบคุณสมบัติการละลายน้ำ.....	50
4.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ.....	51
4.5.1 Anticancer activity	51
4.5.2 Antiviral.....	54
4.6 การวิเคราะห์การจับกันของสารด้วยวิธีการทำ molecular docking	57
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	76
บทที่ 6 บทสรุป.....	80
รายการอ้างอิง	82
ภาคผนวก ก.....	90
ภาคผนวก ข.....	94
ภาคผนวก ค.....	96
ภาคผนวก ง	101
ประวัติผู้เขียน	153

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ความสามารถในการละลายน้ำของเจลคานามัยซินและอนุพันธ์ชนิดใหม่.....	50
ตารางที่ 2 การทดสอบกิจกรรมความเป็นพิษต่อเซลล์ cancer cell lines (Hela, HepG2 และ MDA) และ normal cell (Vero และ LLC-MK2).....	52
ตารางที่ 3 ค่า Therapeutic index on vero ของเจลคานามัยซิน (1) และอนุพันธ์ชนิดใหม่ต่อ normal cell (Vero cell)	53
ตารางที่ 4 ค่า Therapeutic index on LLC-MK2 ของเจลคานามัยซิน (1) และอนุพันธ์ชนิดใหม่ต่อ normal cell (LLC-MK2 cell).....	54
ตารางที่ 5 ค่าการทดสอบการต้านไวรัส.....	56
ตารางที่ 6 ค่า binding energy, hydrogen bonding และ docking site ของ Hsp90 (IOSF) กับสารทดสอบต่างๆ	60
ตารางที่ 7 ค่า ADMET ของเจลคานามัยซิน (1) และอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ (23 - 30).....	73



สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเจลดานามัยซิน	8
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของเจลดานามัยซิน และอนุพันธ์ของ เจลดานามัยซิน ทั้ง 2 อนุพันธ์	9
รูปที่ 3 ลักษณะของ HepG2 cell line	10
รูปที่ 4 ลักษณะของ Hela cell line	11
รูปที่ 5 ลักษณะของ MDA-MB-231 cell line.....	12
รูปที่ 6 ลักษณะของ LLC-MK2 cell line	13
รูปที่ 7 ลักษณะของ Vero cell line.....	14
รูปที่ 8 ลักษณะของสารสกัดหยาบ	43
รูปที่ 9 ลักษณะของสารเจลดานามัยซินที่ได้มาจาก Streptomyces zerumbet W14 สกัดมาจากสารสกัดหยาบ.....	44
รูปที่ 10 ลักษณะ โครงสร้างทางเคมีของเจลดานามัยซิน	45
รูปที่ 11 โครงสร้างอนุพันธ์ของเจลดานามัยซินทั้ง 8 ชนิด.....	49
รูปที่ 12 การทดสอบการต้านไวรัส การตกของเม็ดเลือดแดงของไก่.....	55
รูปที่ 13 ปฏิสัมพันธ์ของสารทดสอบกับ Hsp90 แสดงด้วยโปรแกรม Ligplot v.4.5.3 โดยพันธะไฮโดรเจนแสดงด้วยเส้นปะสีเขียว และ hydrophobic interaction แสดงด้วยเส้นโค้งสีแดงที่มีเส้นขน (a) 17-DMAG, (b) Compound 1, (c) Compound 23, (d) Compound 24, (e) Compound 26, (f) Compound 27, (g) Compound 29 และ (h) Compound 30, ตามลำดับ	65
รูปที่ 14 ปฏิสัมพันธ์ของสารทดสอบกับ Hsp90 ด้วยโปรแกรม BIOVIA Discovery studio v.3.5 แสดง Hydrogen bond donor สีชมพู และ Hydrogen bond acceptor สีเขียวของพื้นผิวของ โมเลกุล Hsp90 (a)17-DMAG, (b) Geldanamycin 1, (c) Compound 23, (d) Compound 24, (e) Compound 25, (f) Compound 26, (g) Compound 27, (h) Compound 28, (i) Compound 29 และ (j) Compound 30 ตามลำดับ.....	67
รูปที่ 15 ผลประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ human cervical cancer cells (HeLa).	96

รูปที่ 16 ผลประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ human hepatocellular carcinoma cells (HepG2).97

รูปที่ 17 ผลประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ human breast cancer cells (MDA-MB-231).....98

รูปที่ 18 ผลประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ monkey kidney cells (LLC-MK2).....99

รูปที่ 19 ผลประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ African green monkey kidney cells (Vero).100



บทที่ 1

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลกและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับสองในสหรัฐอเมริกา ในแต่ละปี American Cancer Society จะประมาณการจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่และการเสียชีวิตที่จะเกิดขึ้นในสหรัฐอเมริกาและรวบรวมข้อมูลล่าสุดเกี่ยวกับการเกิดมะเร็งตามประชากร ข้อมูลอุบัติการณ์ จนถึงปี 2559 ถูกรวบรวมโดยโครงการเฝ้าระวังระบาดวิทยาและผลลัพธ์สุดท้าย โครงการจดทะเบียนมะเร็งแห่งชาติ และสมาคมทะเบียนมะเร็งกลางแห่งอเมริกาเหนือ ข้อมูลการเสียชีวิต จนถึงปี 2560 ถูกรวบรวมโดยศูนย์สถิติสุขภาพแห่งชาติ ในปี 2020 ประมาณการว่าจะมีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ 1,806,590 ราย และผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 606,520 ราย ในสหรัฐอเมริกา (Siegel et al., 2020)

Streptomyces เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมบวกที่เติบโตในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ โดยมีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายกับเชื้อรา ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของ *Streptomyces* เกี่ยวข้องกับการก่อตัวของชั้นของเส้นใยที่สามารถแยกความแตกต่างในห่วงโซ่ของสปอร์ กระบวนการนี้มีลักษณะเฉพาะในกลุ่ม Gram-positives คุณสมบัติที่น่าสนใจที่สุดของ *Streptomyces* คือความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยาต้านเชื้อรา, ยาต้านไวรัส, ยาต้านมะเร็งและส่วนใหญ่เป็นยาปฏิชีวนะและภูมิคุ้มกัน ลักษณะเฉพาะอีกประการหนึ่งคือการพัฒนาหลายเซลล์ที่ซับซ้อนซึ่งสปอร์ที่งอกเหล่านี้จะก่อตัวเป็นเส้นใยที่มี mycelium ทางอากาศหลายซึ่งก่อตัวเป็น septa ในช่วงเวลาปกติจะมีการสร้างของสปอร์ที่ไม่นิวเคลียส (de Lima Procópio et al., 2012)

จากการศึกษาต่อพบว่า มีสารเจลดานามัยซินเป็นยาปฏิชีวนะเบนโซควิโนนที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces hygroscopicus* ซึ่งเจลดานามัยซินสามารถจับและยับยั้งการทำงานของ cytosolic chaperone ของโปรตีน ซึ่งมีหน้าที่รักษาเสถียรภาพและรูปร่างการทำงานของโปรตีนและส่งสัญญาณที่ก่อให้เกิดมะเร็งหลายชนิด

Hsp90 เป็นหนึ่งในโปรตีน chaperone ที่มีอยู่มากที่สุดใน cytosol ของเซลล์ยูคาริโอต มีหน้าที่ช่วยให้โปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่เสถียรและเกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของเซลล์ Hsp90 เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการพื้นฐานต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น การส่งสัญญาณฮอร์โมนการควบคุม

วัฏจักรของเซลล์ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ การแสดงออกของ Hsp90 มีมากในเนื้องอกและสูงกว่าในเนื้อเยื่อปกติ Hsp90 จึงอาจมีบทบาทสำคัญในการเติบโตของเซลล์เนื้องอกและการอยู่รอด แม้ว่า Hsp90 จะมีความจำเป็นต่อทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง แต่เซลล์มะเร็งก็มีความไวต่อการยับยั้งการทำงานของ chaperon โปรตีนหลายชนิดเช่น Raf-1, erbB2 และ p53 (Park et al., 2003a)

เนื่องจากเจลคานามัยซินมีความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำและความเป็นพิษที่สูง จึงมีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเจลคานามัยซินใหม่ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีขึ้น เช่น DHQ3 และ 17-demethoxy-reblastatin (17-DR) ซึ่งเป็นแอนะล็อกของเจลคานามัยซิน ได้มาจากการดัดแปลงเป็นโครงสร้าง phenolic ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับโครงสร้างเบนโซควิโนนเดิม (Zhang et al., 2016)

ต่อมาได้มีการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเจลคานามัยซิน ที่แยกได้จาก *Streptomyces zerumbet* W14 และใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เจลคานามัยซินใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ 17-(tryptamine) -17-demethoxygeldanamycin และ 17-(5'-methoxytryptamine) - 17-demethoxygeldanamycin (Taechowisan et al., 2020)

งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะปรับเปลี่ยนดัดแปลงโครงสร้างของสารเจลคานามัยซิน โดยวิธีการสังเคราะห์ semi-synthesis ขึ้น สารที่นำมาเป็นตัวตั้งต้นคือ สารทุติยภูมิที่ผลิตจาก endophytic actinomycetes ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย, ต้านเชื้อรา, ต้านไวรัส, ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง สิ่งที่สำคัญคือ ความสามารถในการเข้าจับกับ Hsp90 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในการก่อให้เกิดมะเร็ง เนื่องจากเจลคานามัยซิน มีความเป็นพิษต่อตับและคุณสมบัติในการละลายน้ำไม่ดี ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีอนุพันธ์ของเจลคานามัยซินใหม่ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีขึ้น

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Endophytic actinomycetes

จากการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า endophytic actinomycetes ที่อุดมสมบูรณ์มีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิที่น่าสนใจซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ยาปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็งและสารต้านการติดเชื้อและยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช endophytic actinomycetes ยังมีการใช้ประโยชน์ในด้านเภสัชกรรมการเกษตรและอุตสาหกรรมอีกด้วย จากข้อมูลของการค้นพบยาสุนัขชนิดใหม่ สายพันธุ์แอคติโนแบคทีเรียที่แปลกใหม่มีความน่าสนใจเนื่องจากมีแนวโน้มที่จะสามารถผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นสูงชนิดใหม่ ๆ สารปฏิชีวนะจะถูกผลิตขึ้นโดยขบวนการ secondary metabolite และจะถูกผลิตขึ้นมาในขบวนการต่าง ๆ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ บางชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ ดังนั้นโอกาสในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางเภสัชกรรมใหม่จาก endophytic actinomycetes จึงมีมากขึ้น (de Lima Procópio et al., 2012) งานวิจัยก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นถึงสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติซึ่งเป็นสาร secondary metabolite หรือสารทุติยภูมิ ประกอบด้วยสารประกอบ 2 ชนิด 5, 7-dimethoxy-4-phenylcoumarin และ 5, 7-dimethoxy-4- p-methoxyphenylcoumarin แยกได้จาก endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 และพบว่ามีสารต้านเชื้อรา และฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Taechowisan et al., 2005) ปัจจุบันได้มีการนำยาปฏิชีวนะหลายชนิดมาใช้รักษาและป้องกันโรคติดเชื้อ แม้กระทั่งในโรคมะเร็ง จึงจำเป็นต้องค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่หรือปรับปรุงดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพให้มีฤทธิ์ที่ดียิ่งขึ้นหรือลดความเป็นพิษเพื่อที่จะได้นำมาใช้เป็นยาและทดสอบทางคลินิกต่อไป

Endophytic actinomycetes เป็นแบคทีเรียที่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชซึ่งมีความน่าสนใจอย่างมากเนื่องจากมีศักยภาพในการใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและการอยู่รอดของพืชโดยการผลิตสารที่ใช้ในการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาศัยอยู่ในพืชชนิดเดียวกัน (Aamir et al., 2020) endophytic actinomycetes เหล่านี้จึงถือได้ว่าเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่และยังมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมาก จากความหลากหลายทางชีวภาพของ endophytic actinomycetes แสดงให้เห็นถึง endophytic actinomycetes ที่ได้รับการแยกจากพืชหลายชนิดตั้งแต่พืชผล เช่น มันฝรั่ง แครอท มะเขือเทศและส้ม (Araújo et al., 2002), (Sessitsch et al.,

2004; Surette et al., 2003) การแยกจากเฟิร์นและมอส (Janso and Carter, 2010) จากพืชสมุนไพร 36 ชนิดของไทย (Taechowisan et al., 2003) จากบทความทางวิชาการจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ endophytic actinomycetes จำนวนมาก โดยเฉพาะจากพืชสมุนไพรที่มีความสามารถในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ รวมไปถึงการค้นพบความสามารถในด้านเภสัชวิทยาซึ่งมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการเป็นยาปฏิชีวนะของ endophytic actinomycetes ปัจจุบันยาปฏิชีวนะใหม่ ๆ ที่แยกได้จาก endophytic actinomycetes มีจำนวนมากขึ้น เช่น celastramycins AB (Pullen et al., 2002) munumbicins AD (Castillo et al., 2002) และ kakadumycins (Castillo et al., 2003) นอกจากนี้ ยังพบว่า สารสองชนิด คือ cedarmycins A และ B ถูกแยกจาก *Streptomyces* sp. TP-A0456 ซึ่งแยกได้จากกิ่งของต้นซีดาร์ Cedarmycins A แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการต่อ *Candida glabrata* อีกด้วย (Igarashi, 2004) ต่อมา มีการแยก saadamycin ซึ่งเป็นสารประกอบ antimycotic ใหม่จาก endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48 และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญต่อผิวหนังและเชื้อราทางคลินิกอื่น ๆ (El-Gendy and EL-Bondkly, 2010) จากการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า endophytic actinomycetes นอกจากที่จะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นสารปฏิชีวนะแล้ว พบว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มอื่น ๆ ที่สำคัญที่มีความสนใจในการค้นพบ คือ สารต้านมะเร็งและสารต้านการอักเสบจาก endophytic actinomycetes ตัวอย่างการรายงานการผลิตสาร Taxol จาก endophytic actinomycetes อีกตัวอย่างหนึ่งคือ maytansinoids (macrocyclic lactams 19 ซึ่งเกี่ยวข้องกับยาปฏิชีวนะ ansamycin) ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งที่มีศักยภาพมากซึ่งเดิมแยกได้จากพืชตระกูล *Celastraceae*, *Rhamnaceae* และ *Euphorbiaceae* (Kupchan et al., 1972) นอกจากนี้ยังพบว่า *Kitasatospora* sp. ผลิต paclitaxel แยกได้จาก *Taxus baccata* ในอิตาลี (Caruso et al., 2000) และมอสบางชนิด (Suwanborirux et al., 1990) *Actinosynnema Pretiosum* (Higashide et al., 1977) และนอกจากนี้ยังค้นพบสาร ansamycin ชนิดใหม่คือ naphthomycin K ที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. ซึ่งเป็น endophytic ใน *Maytenus hookeri* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ผลิตสาร maytansinoids พบว่า สารนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 และ A-549 ที่ IC_{50} 0.07 และ 3.17 μ M ตามลำดับ (Lu and Shen, 2007) และยังคงพบ 24-demethyl-bafilomycin C1 ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่มของ bafilomycin และอนุพันธ์ของ bafilomycin ใหม่อีก 2 ชนิดถูกแยกออกจาก *Streptomyces* sp. (Lu and Shen, 2003) และในงานวิจัยด้านการยับยั้งมะเร็งยังพบสารใหม่รวมทั้ง macrolides 16 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ bafilomycin ที่ถูกแยกจาก *Streptomyces* sp. CS พบว่าเป็น

endophyte ใน *M. hookeri* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ MDA-MB-435 (Li et al., 2010) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดที่แยกได้จาก endophytic actinomycetes ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้อีกด้วยตัวอย่างเช่น Coronamycin เป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ que สร้างจาก *Streptomyces verticillate* sp. แยกได้จากต้นเถาวัลย์ *Monstera* sp. มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา pythiaceae และเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ *Cryptococcus neoformans* และยังพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* อีกด้วย (Ezra et al., 2004) เนื่องจากเกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่พัฒนาขึ้นในแบคทีเรียก่อโรคและการเพิ่มจำนวนของโรคและเชื้อโรคใหม่ ๆ ในปัจจุบัน เช่น กลุ่มอาการภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงและไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 ทำให้เกิดความสนใจในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ สำหรับยาจาก endophytic actinomycetes (Bérdy, 2005) จะเห็นได้ว่าจากงานวิจัยถึงประโยชน์ที่ได้จาก endophytic actinomycetes ที่เกิดขึ้นทั้งทางด้านอุตสาหกรรมและการเกษตร ดังนั้นการวิจัยที่เน้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก endophyte จึงเป็นการค้นหาและพัฒนาาใหม่ และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ที่จะนำมาใช้ประโยชน์และทดแทนและแก้ไขปัญหาความต้านทานยาของจุลินทรีย์ก่อโรคได้

เจลดานามัยซินถือได้ว่าเป็นสารทุติยภูมิชนิดหนึ่งที่แยกได้จาก endophytic actinomycetes ซึ่งพบว่าเป็นยาปฏิชีวนะเบนโซควิโนนที่ผลิตจาก *Streptomyces hygroscopicus* เจลดานามัยซินจับและยับยั้งการทำงานของ cytosolic chaperone ของโปรตีน Hsp90 โปรตีน Hsp90 ทำหน้าที่รักษาความเสถียรและรูปร่างการทำงานของโปรตีนส่งสัญญาณที่ก่อให้เกิดมะเร็งหลายชนิด การยับยั้ง Hsp90 ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายของโปรตีนไอโซมของโปรตีนส่งสัญญาณมะเร็งที่อาจแสดงออกมากเกินไปหรือทำมากเกินไปในเซลล์เนื้องอก จากบทความทางวิชาการที่ศึกษาเกี่ยวกับ เจลดานามัยซิน ตัวอย่างเช่น สารต้านมะเร็ง เจลดานามัยซินได้แสดงผลของสารออกฤทธิ์ที่มีศักยภาพโดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 50% (GI 50) เมื่อเทียบกับเซลล์เนื้องอกทั้งหมด 60 สายพันธุ์ (Stebbins et al., 1997b) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบว่า เจลดานามัยซินยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเนื้องอกของหนูเม้าส์อีกด้วย (Sasaki et al., 1979) จากการศึกษาต่อมาพบว่า การต่อต้านมะเร็งของ เจลดานามัยซินน่าจะเป็นผลมาจากความสามารถในการทำลายเซลล์ของโปรตีนการส่งสัญญาณที่ควบคุมการเจริญเติบโตสองประเภท ได้แก่ โปรตีนไคนเนส และ erbB2 (Miller et al., 1994) จากการศึกษาที่ผ่านมา กลับพบว่า เจลดานามัยซินมีความสามารถในการเข้าไปจับที่ Hsp90 ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของโปรตีน Hsp90 ตัวอย่างงานวิจัย เช่น เจลดานามัยซินซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะเบนโซควิโนนแอนตามัยซินที่เข้าไปจับกับโดเมน N-terminal ADP / ATP ของโปรตีน Hsp90 ซึ่งนำไปสู่การ

ย่อยสลายของโปรตีนที่ชักนำไปสู่การเป็นมะเร็ง (Li et al., 2019) และยังพบว่า เจลดานามัยซินซึ่งเป็นสารยับยั้งเฉพาะของ Hsp90 แสดงฤทธิ์ในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์หลายชนิด (Park et al., 2003b) ต่อมามีการค้นพบว่า เจลดานามัยซิน มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและต้านมะเร็ง เนื่องจากการจับกับ Hsp90 ยับยั้งปฏิกิริยา การรีโฟลด์และส่งผลให้ผิวของ โปรตีน Hsp90 ถูกการย่อยสลาย (Stebbins et al., 1997a)

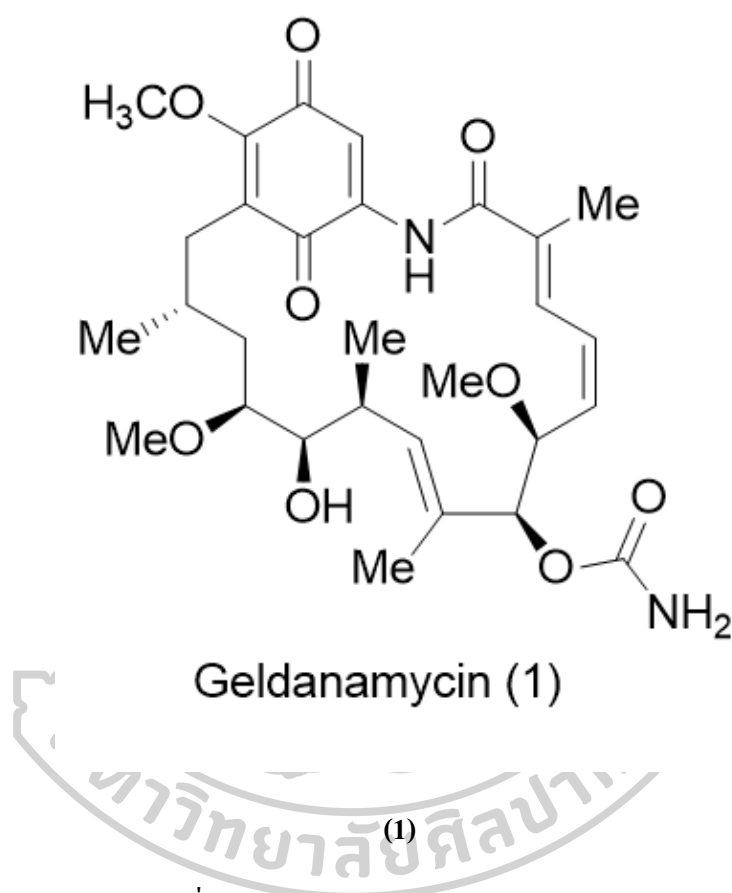
จากบทความทางวิชาการที่มีการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าโปรตีน Hsp90 เป็นที่น่าสนใจคือ เซลล์เนื้องอกนั้นขึ้นอยู่กับ Hsp90 มากกว่าเซลล์ปกติสำหรับการแพร่กระจายและการอยู่รอด (Chatterjee and Burns, 2017) เป้าหมายหลักในการเข้าไปจับของ เจลดานามัยซิน ในการออกฤทธิ์ในการยับยั้งของเซลล์มะเร็ง การพัฒนายาต้านมะเร็งในปัจจุบันเป้าหมายระดับโมเลกุลใหม่ซึ่งมีความสำคัญคือ Molecular chaperone heat shock protein (Hsp) 90 เนื่องจากมีความสำคัญในการรักษารูปแบบความเสถียรและการทำงานของโปรตีนไคลเอนต์ที่ก่อให้เกิดมะเร็งที่สำคัญ (Maloney and Workman, 2002) งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เจลดานามัยซินและ radicicol มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยการยับยั้งการทำงานของ ATPase ภายในของ Hsp90 ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีนไคลเอนต์ Hsp90 (Maloney and Workman, 2002) จากตัวอย่างบทความที่ยกตัวอย่างมานั้น แสดงให้เห็นว่าเป้าหมายในการยับยั้งเซลล์มะเร็งคือ โปรตีน Hsp90 และเป็นที่น่าสนใจเนื่องจาก เจลดานามัยซินสามารถเข้าไปจับที่ตำแหน่งที่สำคัญของการเกิดมะเร็ง

ถึงแม้ว่าจะมีความก้าวหน้าอย่างมากในการพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา แต่โรคมะเร็งก็ยังถือว่าเป็นโรคที่มีผู้เสียชีวิตมากที่สุดจากการรวบรวมข้อมูลพบว่า สาเหตุที่พบบ่อยที่สุดของการเสียชีวิตจากมะเร็ง ได้แก่ มะเร็งปอด, มะเร็งตับ, และมะเร็งกระเพาะอาหาร (Ferlay et al., 2015) ตัวอย่างบทความทางวิชาการ เกี่ยวกับการศึกษาสารออกฤทธิ์ของสารทุติยภูมิ endophytic actinomycetes รวมไปถึงอนุพันธ์ของสารทุติยภูมิจาก endophytic actinomycetes ที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งช่องปากสายพันธุ์ YD-10B และ YD-38 ถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญด้วย เจลดานามัยซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ 17-AAG เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Lee, 2018) ต่อมาได้ค้นพบว่าเจลดานามัยซิน กระตุ้นมะเร็งรังไข่บางส่วนได้ไวต่อยา paclitaxel โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเนื้องอกที่มีความต้านทานเกิดจากการปิดใช้งานของ p38 / H2AX (Mo et al., 2016) นอกจากนี้ยังค้นพบว่าอนุพันธ์ของ เจลดานามัยซิน 17-AAG ที่ทดสอบกับเซลล์มะเร็งกระเพาะแสดงผลช่วยลดการแสดงออกของ VEGF, TSP-1,

ES และ MMP-9 และในปัจจุบันอนุพันธ์ของ geldanamycin 17-AAG กำลังอยู่ในการทดลองทางคลินิกระยะที่ 2 และอาจเป็นยาในการรักษามะเร็งกระเพาะอาหารในอนาคต (Gürpınar et al., 2020) การศึกษาต่อมาได้ค้นพบว่า 17-AAG ช่วยลดการสร้างเส้นเลือดและการด้านการแพร่กระจายของมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งทวารหนัก (Zeynali-Moghaddam et al., 2019) การศึกษาต่อมาคือ การออกฤทธิ์ต้านมะเร็งและเคมีบำบัดของอนุพันธ์ geldanamycin 17AAGA ยังยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด (Nguyen et al., 2000) ต่อมาได้ศึกษาสาร เบนโซควิโนน ansamycin geldanamycin พบว่ามีปฏิกริยาในการกระตุ้นทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ (Pataer et al., 2007) ถึงแม้ว่า geldanamycin จะมีความน่าสนใจในการทดลองในหลอดทดลอง แต่ก็ยังแสดงให้เห็นถึงความพิษต่อตัวอย่างรุนแรงในระยะพรีคลินิก และเนื่องจากอาจเป็นเพราะ โครงสร้างที่เป็นหมู่เบนโซควิโนน ที่ทำให้เกิดการละลายที่ไม่ดี (Sharp et al., 2014) ดังนั้นจึงมีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ geldanamycin ขึ้นเพื่อลดความเป็นพิษต่อตับ และการละลายน้ำที่ดียิ่งขึ้น

การสังเคราะห์ของ geldanamycin เป็นการสังเคราะห์แบบ semi-synthesis เป็นการเปลี่ยนหมู่หรือเลียนแบบสารทางธรรมชาติเพื่อที่เข้ามาจับในตำแหน่งของ geldanamycin เพื่อที่จะทำให้ลดการเป็นพิษต่อตับและค่าการละลายน้ำดีขึ้น ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น geldanamycin ที่มีหมู่เบนโซควิโนน ยังไม่ได้เป็นที่ยอมรับในการเป็นยาด้านมะเร็ง เนื่องจากแสดงผลข้างเคียงที่เป็นพิษต่อตับส่วนหนึ่งเป็นเพราะคุณสมบัติของ Michael-acceptor ที่มีต่อ thiol (Hermane et al., 2019) การวิจัยก่อนหน้านี้ได้ค้นพบ Reblastatin 4 ซึ่งเป็น analogue phenolic ของ geldanamycin แสดงฤทธิ์ยับยั้ง Hsp90 และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Rascher et al., 2005) ดังที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้การสังเคราะห์อนุพันธ์ประสบความสำเร็จในการเข้าจับตำแหน่ง C-17 ของ geldanamycin (Kim et al., 2009) นอกจากนี้ อนุพันธ์ของ geldanamycin คือ 17-DR แสดงฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ Hsp90 ATPase ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ geldanamycin ที่ยังไม่ได้รับการเปลี่ยนโครงสร้าง และมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์อีกด้วย (Wu et al., 2012) เป็นที่ทราบกันดีว่า geldanamycin และ analogue ของ geldanamycin คือ 17-allylamino-demethoxy geldanamycin (17-AAG) ยับยั้งการทำงานของ Hsp90 (Wu et al., 2010) การค้นพบต่อมาคือ การเพิ่มความอยู่รอดของสัตว์อย่างมีนัยสำคัญ และการลดการตายที่สูงซึ่งเกี่ยวข้องกับภาวะไตวาย ด้วยอนุพันธ์ของ geldanamycin 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) (Zhang et al., 2012)

Taechowisan et al. (2019a) มีการแยก endophytic actinomycetes จาก *Zingiber zerumbet* (L.) ซึ่งได้สายพันธุ์ใหม่ของ *Streptomyces* คือ *Streptomyces zerumbet* W14 โดยจัดเป็น metabolites ทุกติยภูมิ สารประกอบบริสุทธิ์ที่ได้รับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเกี่ยวกับคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการอักเสบ จากข้อมูลสเปกตรัมพบว่า สารประกอบที่ได้คือ เจลดานามัยซิน

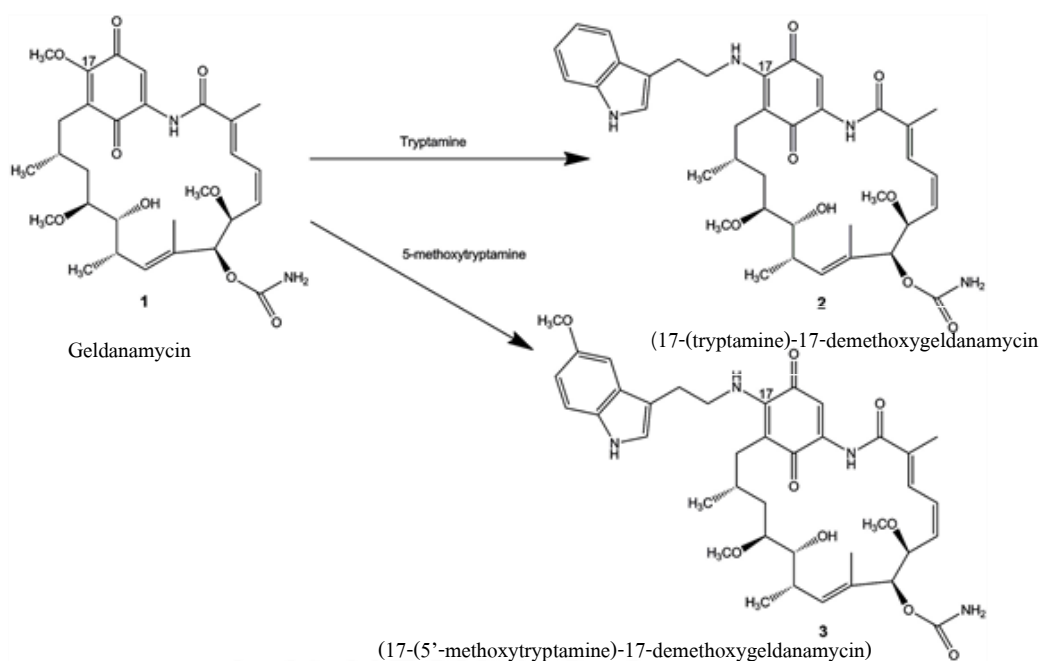


รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเจลดานามัยซิน
ที่มา (Taechowisan et al., 2019a)

นอกจากนี้ยังพบว่า Tryptamine เป็น monoamine alkaloid ที่มีโครงสร้างวงแหวนอินโดล ได้มาจากการสลายตัวของ amino acid tryptophan มีศักยภาพที่สำคัญในการเป็นสารสื่อประสาท, สารต้านเชื้อแบคทีเรีย, เชื้อรา และสารต้านอนุมูลอิสระ (Kousar et al., 2017)

งานวิจัยต่อมาแสดงให้เห็นว่า tryptamine hybrid เจลดานามัยซิน สามารถยับยั้งการตอบสนองต่อการอักเสบและโรคอักเสบจากภูมิคุ้มกันต่ำเนื้อเยื่อ และมีความเป็นพิษน้อยลง โดย

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ geldanamycin คือ (17-(tryptamine)-17-demethoxygeldanamycin และ (17-(5'-methoxytryptamine)-17-demethoxygeldanamycin) (Taechowisan et al., 2019b)

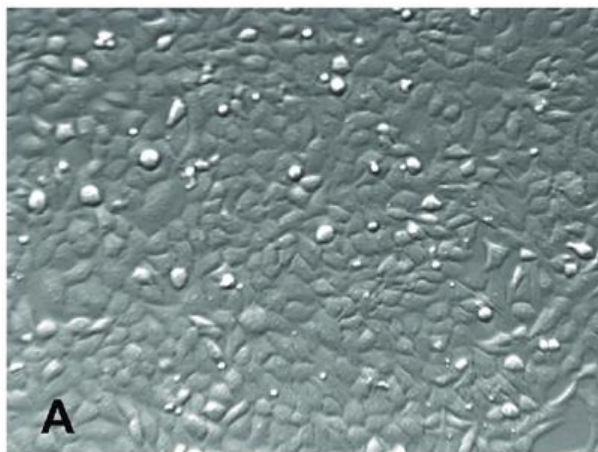


รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ geldanamycin และอนุพันธ์ของ geldanamycin ทั้ง 2 อนุพันธ์ ที่มา (Taechowisan et al., 2019b)

เนื่องจากเกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่พัฒนาขึ้นในแบคทีเรียก่อโรคและการเพิ่มจำนวนของโรคและเชื้อโรคใหม่ๆ ในปัจจุบัน เช่น กลุ่มอาการภูมิคุ้มกันบกพร่องโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงและไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 (Bérdy, 2005) ตัวอย่างบทความทางวิชาการ เช่น geldanamycin สามารถยับยั้งการเปลี่ยนจาก Ring เป็น trophozoite การเปลี่ยนจาก trophozoite ไปเป็น schizonts ของเชื้อมาลาเลีย *Plasmodium falciparum* (PfHsp90) (Banumathy et al., 2003) นอกจากนี้มีการค้นพบ การยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Plasmodium yoelii* สายพันธุ์ 17XL ในหลอดทดลอง ของอนุพันธ์ของ geldanamycin ได้แก่ 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17 AAG) และ 17-N-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy) ethoxy) propyl) pent-4-ynamide-17-demethoxygeldanamycin (17-PEG-Alkyn-GA) (Mout et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการยับยั้งต่อเชื้อไวรัส H1N1 ด้วย geldanamycin พบว่า geldanamycin ช่วยลดการบาดเจ็บที่ปอดและการอักเสบในปอดได้อย่างมากเมื่อเทียบกับหนูตัวอื่น ๆ (Wang et al., 2017)

Cell culture

HepG2 cell line

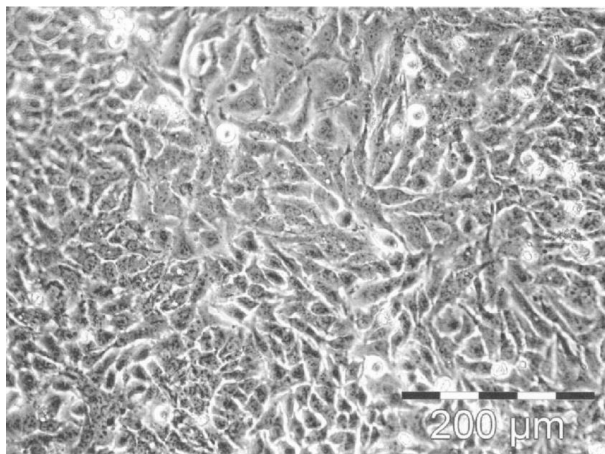


รูปที่ 3 ลักษณะของ HepG2 cell line

ที่มา (Darby et al., 2014)

เซลล์ตับของมนุษย์ สายพันธุ์ HepG2 เป็นเซลล์ที่มีศึกษากันมากที่สุด เนื่องจากมีข้อดี คือ ความพร้อมในการใช้งานและมีการหลั่งโปรตีนของมนุษย์ ซึ่งเป็น subclone ของ HepG2 ที่ใช้ใน Extracorporeal Liver Assist Device (ELAD) (Baquerizo et al., 2015) และเพื่อแก้ปัญหาที่เซลล์ตับของมนุษย์ในหลอดทดลองสูญเสียการทำงานได้ง่าย จึงได้รับการพัฒนาโดยการถ่ายโอนยีน ทำให้เซลล์เหล่านี้มีข้อได้เปรียบคือการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและความพร้อมใช้งานอย่างไม่จำกัด (Pan and Li, 2012)

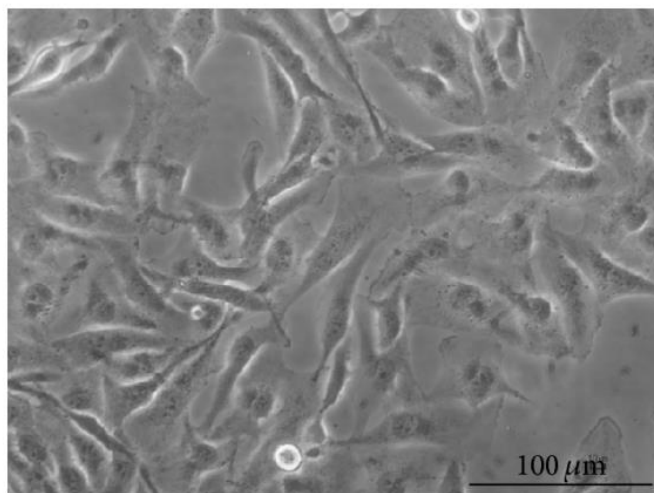
Hela cell line



รูปที่ 4 ลักษณะของ HeLa cell line
ที่มา (Rabe et al., 2004)

เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ สายพันธุ์ HeLa เป็นเซลล์มะเร็งสายพันธุ์แรกที่นิยมใช้ในการวิจัย ตั้งแต่มีการแยกจากหญิงสาวที่พบว่าเป็นมะเร็งปากมดลูก (Masters, 2002) การศึกษาพบว่า HeLa เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่มีโปรตีนมากกว่า 10,000 ชนิด (Nagaraj et al., 2011) ลักษณะพื้นฐานวิทยาของ HeLa เป็นเซลล์ชั้นเดียวที่มีองค์ประกอบย่อยของเซลล์ ประกอบด้วยพื้นผิวของเซลล์ขอบเขตเซลล์และโครมาตินนิวเคลียร์ควบแน่น สภาพการเลี้ยงของเซลล์ HeLa เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ ใน Dulbecco modified Eagle medium และ (FBS) fetal bovine serum 5% (Gey, 1952)

MDA-MB-231 cell line

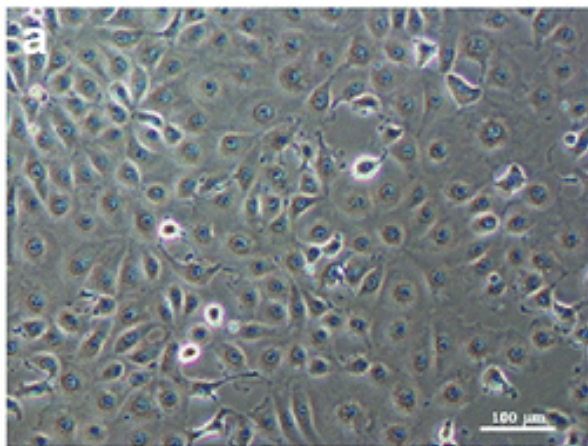


รูปที่ 5 ลักษณะของ MDA-MB-231 cell line

ที่มา (Masiello et al., 2014)

เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์สายพันธุ์ MDA-MB-231 เป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการหลังโปรตีน 3 ปัจจัยคือ ER, PR และ E-cadherin เป็นสายลบ และ p53 ที่กลายพันธุ์ ในการทำ microarray กลุ่มจีโนมของเซลล์ MDA-MB-231 ที่เป็นพื้นฐานของมะเร็งเต้านม และเนื่องจากเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์สายพันธุ์ MDA-MB-231 ยังขาดตัวรับปัจจัยในการเจริญเติบโต HER2 จึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ในห้องทดลอง (Welsh, 2013) ในปี ค.ศ 2014 มีการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจาก *M. indica* L ในเซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิด คือ MCF-7 และ MDA-MB- 231 แสดงให้เห็นได้ว่าสารสกัดดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมอย่างมีนัยสำคัญ (Derese et al., 2017)

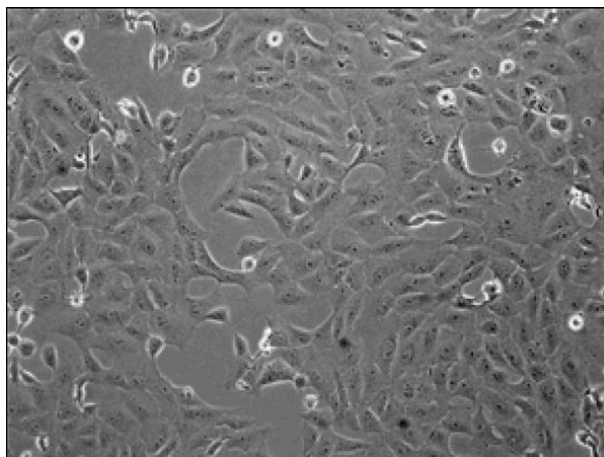
LLC-MK2 cell line



รูปที่ 6 ลักษณะของ LLC-MK2 cell line
ที่มา (Chompoosri et al., 2016)

เซลล์ LLC-MK2 แยกมาจาก *Macaca mulatta*, monkey, rhesus ได้มาจากเซลล์ของไตลิง เป็นเซลล์เยื่อบุผิว และเป็นเซลล์ประเภทชนิดเกาะ ซึ่งมียีนที่แสดงออกคือ ตัวกระตุ้น plasminogen (Hull et al., 1962) มีการนำเซลล์ปกติ LLC-MK2 มาใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ ยกตัวอย่าง เช่น การนำเซลล์ LLC-MK2 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเมลานินิล ผลแสดงให้เห็นว่า การรักษาด้วยเมลานินิล ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญใด ๆ ในเซลล์ LLC-MK2 ตรวจพบแนวโน้มความมีชีวิตที่ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของเมลานินิลสูงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 6 วัน (Machado et al., 2020)

Vero cell line



รูปที่ 7 ลักษณะของ Vero cell line
ที่มา (Ammerman et al., 2008)

เซลล์ Vero ถูกแยกออกจากไตของลิงเขียวแอฟริกัน (*Cercopithecus aethiops*) ระยะตัวเต็มหรือไม่เป็นโรค เมื่อวันที่ 27 มีนาคม พ.ศ. 2505 (Yasumura and Kawakita, 1963) หลังจากนั้นเซลล์ได้ถูกนำไปเก็บที่สถาบันโรคมุมิแพ้และโรคติดเชื้อที่สถาบันสุขภาพแห่งชาติในสหรัฐอเมริกา (ATCC) ในปี 1966 (Yasumura and Kawakita, 1963) (Simizu, 1988) และนอกจากนี้เซลล์ Vero ยังได้รับการศึกษาสำหรับการผลิตวัคซีนไวรัสทั้งที่มีชีวิต (โรตาไวรัส) และวัคซีนไวรัสที่ไม่มีชีวิต (โปลิโอไวรัส) เซลล์ Vero ยังถูกนำไปใช้ในการผลิตไวรัสอื่น ๆ จำนวนมาก รวมถึง ไวรัสพิษสุนัขบ้าและไวรัสไข้สมองอักเสบญี่ปุ่นอีกด้วย (Ammerman et al., 2008)

กลไกการตายของเซลล์

มะเร็งเป็นหนึ่งในตัวอย่างที่เมื่อมีการตายของเซลล์น้อยเกินไปส่งผลให้เซลล์มะเร็งไม่ตาย กลไกการตายของเซลล์มีความซับซ้อนและเกี่ยวเนื่องกันในหลาย pathway ลักษณะเด่นทางสัณฐานวิทยาของการตายของเซลล์ในนิวเคลียสคือการควบแน่นของโครมาตินและการแตกตัวของนิวเคลียสซึ่งทำให้เกิดการลดปริมาตรของ (pyknosis) และการหดตัวของ pseudopods (Kroemer et al., 2005) การตายของเซลล์เกิดจากการควบแน่นของโครมาตินเริ่มต้นที่รอบนอกของเมมเบรนนิวเคลียสโดยมีโครงสร้างเป็นรูปเสี้ยวหรือวงแหวน โครมาตินจะควบแน่นต่อไปจนกว่าจะแตกออกภายในเซลล์ (Manjo and Joris, 1995) และในขั้นตอนต่อมาของการตายของเซลล์บางส่วน ได้แก่ blebbing เมมเบรนดัดแปลงนิวเคลียสและการสูญเสียความสมบูรณ์ของเมมเบรน (Kroemer

et al., 2005) โดยทั่วไปแล้วการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีสามารถสังเกตได้จากการตายของเซลล์ คือ การกระตุ้นของแคสเปส, การสลายดีเอ็นเอและโปรตีน และการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์และการรับรู้โดยเซลล์ฟาโกไซติก (Kumar et al., 2014) จากข้อมูลพบว่า caspases เป็นศูนย์กลางของกลไกการตายของเซลล์ และมี 3 pathway ในการเปิดใช้งานของ caspases pathway แรกคือเกิดขึ้นภายใน mitochondrial และภายนอก mitochondrial นั่นก็คือการกระตุ้นให้เกิด apoptosis และ pathway สุดท้ายคือ การถูกกระตุ้นที่เรติคูลัมเอนโดพลาสมิกภายในเซลล์ (O'Brien and Kirby, 2008)

การถูกกระตุ้นโดย apoptosis เกี่ยวข้องกับการเปิดใช้งาน caspases หลายชุด caspase ที่สำคัญใน pathway นี้คือ caspases 9 และ pathway ภายนอกคือ caspase 8 และ pathway ทั้ง 2 มารวมกันเป็น pathway caspase 3 จากนั้น Caspase 3 (Ghobrial et al., 2005) กลุ่มโปรตีน Bcl-2 ประกอบด้วย pro-apoptosis และโปรตีนต่อต้านการตายของเซลล์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตายของเซลล์ (Gross et al., 1999) ตัวอย่างเช่น การแสดงออกที่มากเกินไปของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่ป้องกัน Bcl-2 จากการตายของเซลล์ (Raffo et al., 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกที่มากเกินไปของ Bcl-2 นำไปสู่การยับยั้งการตายของเซลล์ที่เกิดจาก TRAIL ใน neuroblastoma, glioblastoma และเซลล์มะเร็งเต้านม (Minn et al., 1995)

การกำหนดเป้าหมาย Caspases ตัวอย่างเช่น Apoptin เป็นสารกระตุ้นให้เกิด Caspase ซึ่งเริ่มแรกมาจากไวรัสโรคโลหิตจางในไก่และมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็ง ออกแบบมาเพื่อกระตุ้นการทำงานของ Caspases (Rohn and Noteborn, 2004) เปปไทด์ที่มีแม่ลายอาร์จินิน - โกลซีน - แอสปาร์เตต ซึ่งเป็นยาอีกประเภทหนึ่งซึ่งเป็นตัวกระตุ้นของ Caspases (Philchenkov et al., 2004) การศึกษาด้วยยีนบำบัดแบบ caspase ตัวอย่างเช่น การรักษาด้วย etoposide ในเนื้องอกในตับ AH130 และพบว่าทำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างกว้างขวางและลดปริมาณของเนื้องอก โดยการใช้ยีนบำบัดของมนุษย์ caspase-3 (Yamabe et al., 1999)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การผลิตและการสกัดสารเจลดานามัยซิน จาก *Streptomyces zerumbet* W14

สายพันธุ์ของ actinomycetes คือสายพันธุ์ W14 ที่แยกได้จากรากของต้นกระเทียม (Zingiber zerumbet (L.) Roscor ex. Sm) โดย คุณวิญญู ภักดี (Taechowisan et al., 2019a) ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารต้านเชื้อแบคทีเรีย เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ

- 1) โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP-2 และทำการสกัด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 ให้เต็ม plate ประมาณ 200-300 plate บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน หรือจนสังเกตเห็นเชื้อแอคติโนมัยซีสมีการสร้างสปอร์
- 2) ตัดชิ้นวุ้นในจานอาหาร ISP-2 ให้มีขนาดประมาณ 1×1 ตารางเซนติเมตร ให้ทั่วทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใส่ชิ้นวุ้นลงใน flask ขนาด 3000 ml
- 3) เติมน้ำละลาย EtOAc (ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการละลายสารอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อแอคติโนมัยซีสออกจากชิ้นวุ้น) ให้ท่วมชิ้นวุ้น แล้วปิดปาก flask ด้วยการอุดสำลีและปิดด้วยกระดาษพรอยด์ นำไปบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 4) นำสารละลายมากรองโดยให้ผ่านสำลี จากนั้นเทใส่ลงใน round bottom flask (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) และระเหยภายใต้สูญญากาศในเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้เหลือแต่สารสกัดหยابที่ต้องการ ซึ่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดหยابที่ได้

3.2 การทำให้บริสุทธิ์ของสารเจลดานามัยซิน

โดยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

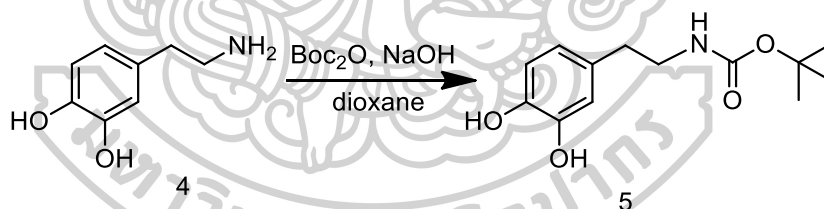
- 1) นำ capillary tube จุ่มสารละลายสารสกัดหยاب แล้วหยดลงบนแผ่น TLC โดยให้ห่างจากขอบด้านล่าง 1.5 เซนติเมตร เป่าให้แห้ง
- 2) จากนั้นนำแผ่น TLC จุ่มในภาชนะที่มีตัวชะเป็นตัวทำละลายที่สภาวะต่าง ๆ

- 3) รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ ห่างจากขอบด้านบน ประมาณ 1.5 เซนติเมตร
- 4) จากนั้นนำแผ่น TLC ที่จุ่มเรียบร้อยแล้ว มาผึ่งให้แห้ง ทำการวัด (detection) ด้วยการฉายด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เลือกสถานะที่เหมาะสมของตัวทำละลาย แยกสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)
 - 1) นำสารสกัดหยาบมาแยกด้วยวิธี Column Chromatography ใช้ silica gel เป็นเฟสหยุดนิ่ง และตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเฟสเคลื่อนที่
 - 2) แยกเก็บ fraction นำ fraction ที่เก็บได้ทั้งหมดระเหยกับสารละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator
 - 3) นำ fraction ที่มี geldanamycin บริสุทธิ์ ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

3.3 การสังเคราะห์สาร synthesis

การสังเคราะห์ dopamine derivative

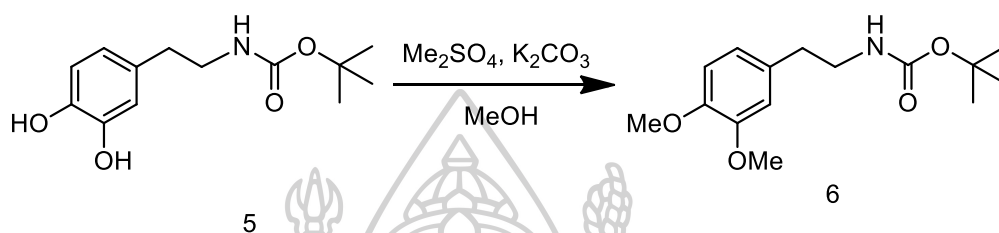
การสังเคราะห์ *N-tert-butyl 3,4-dihydroxyphenethylcarbamate* (5)



นำ dopamine hydrochloride (4) (0.48 กรัม, 2.54 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย dioxane (5 มิลลิลิตร) และ H_2O (2.50 มิลลิลิตร) เติม 2N NaOH (1.27 มิลลิลิตร, 2.54 มิลลิโมล) ทำการกวนเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย *tert*-butyl dicarbonate (0.60 มิลลิลิตร, 2.54 มิลลิโมล) ใน dioxane (4 มิลลิลิตร) ลงในสารผสม กวนต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศ Ar จากนั้นทำสารผสมให้เย็นแล้วเติม EtOAc และปรับให้เป็นกรดด้วย 1N HCl ให้มีค่า pH ประมาณ 3 แล้วทำการสกัดด้วย EtOAc นำชั้น EtOAc มาสกัดด้วยน้ำ และกำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย $\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยใช้ hexane:EtOAc 3:1 เป็นสารชะ จะได้ผลิตภัณฑ์ *N-tert-butyl 3,4-dihydroxyphenethylcarbamate* (5) เป็นของแข็งสี

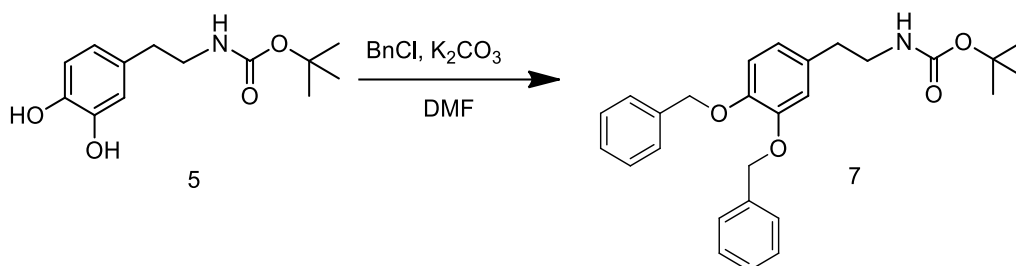
น้ำตาล 0.47 g (73% yield) จุดหลอมเหลว 134-135 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 8.72 (1H, br), 8.64 (1H, br), 6.78 (1H, br), 6.63 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.56 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.42 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz), 3.04 (2H, m), 2.47-2.52 (2H, m), 1.38 (9H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ 155.5, 145.0, 143.4, 130.2, 119.1, 115.9, 115.4, 77.4, 41.9, 35.0, 28.3.

การสังเคราะห์ *N-tert-butyl 3,4-dimethoxyphenethylcarbamate* (**6**)



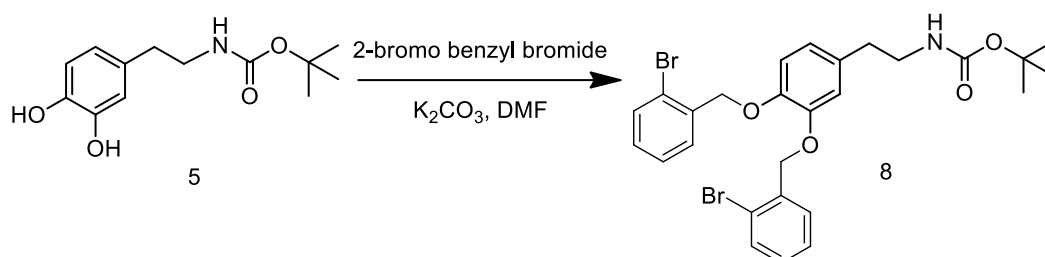
นำ *N-tert-butyl 3,4-dihydroxyphenethylcarbamate* (**5**) (0.39 กรัม, 1.56 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย anhyd. MeOH (10 มิลลิลิตร) เติม K_2CO_3 (0.95 กรัม, 6.87 มิลลิโมล) และ Me_2SO_4 (0.33 มิลลิลิตร, 3.44 มิลลิโมล) ทำการให้ความร้อนโดยวิธี reflux เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศ Ar จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรองของแข็งออกโดยล้างด้วย MeOH นำของเหลวที่กรองได้มาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี flash column chromatography โดยใช้ hexane:EtOAc 2:1 เป็นสารชะ จะได้ผลิตภัณฑ์ *N-tert-butyl 3,4-dimethoxyphenethylcarbamate* (**6a**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 0.31 g (76% yield) จุดหลอมเหลว 52-54 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 6.78 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.69-6.72 (2H, m), 4.56 (1H, br), 3.85 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.32 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.71 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.41 (9H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 156.0, 149.0, 147.7, 131.6, 120.8, 112.1, 111.4, 79.3, 56.0, 55.9, 42.1, 35.9, 28.5.

การสังเคราะห์ *N-tert-butyl 3,4-bis(benzyloxy)phenethylcarbamate* (7)



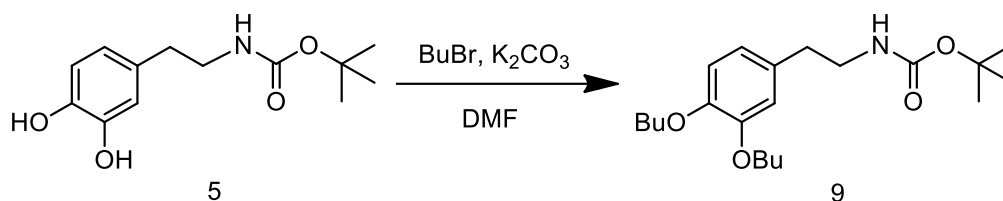
นำ *N-tert-butyl 3,4-dihydroxyphenethylcarbamate* (5) (0.04 กรัม, 0.17 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย anhyd. DMF (2 มิลลิลิตร) เติม K_2CO_3 (0.14 กรัม, 1.02 มิลลิโมล) และ BnCl (0.04 มิลลิลิตร, 0.37 มิลลิโมล) ทำการกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศ Ar จากนั้นทำการกรองผ่าน celite และล้างด้วย EtOAc นำของเหลวที่กรองได้มาสกัดด้วยน้ำ และน้ำเกลือ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยใช้ hexane:EtOAc 2:1 เป็นสารชะ จะได้ผลิตภัณฑ์ *N-tert-butyl 3,4-bis(benzyloxy)phenethylcarbamate* (6b) เป็นของแข็งสีขาว 0.065 g (88% yield) จุดหลอมเหลว 111-113 °C; ^1H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.30-7.47 (10H, m), 6.88 (1H, d, $J = 8.1$), 6.80 (1H, s), 6.71 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz), 5.15 (2H, s), 5.14 (2H, s), 4.52 (1H, br), 3.32 (2H, q, $J = 5.9$ Hz), 2.69 (2H, t, $J = 6.9$ Hz), 1.45 (9H, s); $^{13}C-NMR$ ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 156.0, 149.2, 147.8, 137.6, 137.4, 132.6, 128.6, 127.9, 127.9, 127.6, 127.4, 121.8, 116.0, 115.6, 79.4, 71.6, 71.5, 41.9, 35.8, 28.6.

การสังเคราะห์ *N-tert-butyl 3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy)phenethylcarbamate (8)*



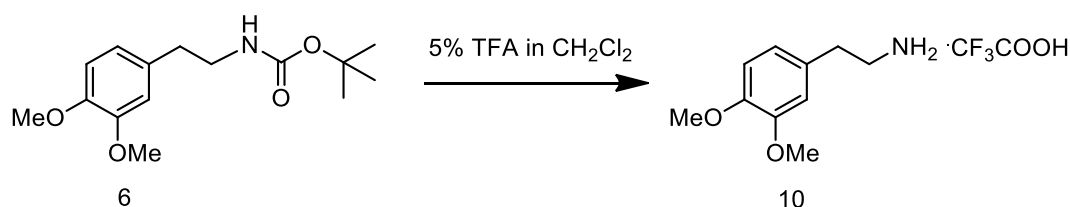
นำ *N-tert-butyl 3,4-dihydroxyphenethylcarbamate (5)* (0.06 กรัม, 0.24 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย anhyd. DMF (2 มิลลิลิตร) เติม K_2CO_3 (0.27 กรัม, 1.42 มิลลิโมล) และ 2-bromobenzyl bromide (0.06 มิลลิลิตร, 0.46 มิลลิโมล) ทำการกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศ Ar จากนั้นกรองผ่าน celite และล้างด้วย EtOAc นำของเหลวที่กรองได้มาสกัดด้วยน้ำ และน้ำเกลือ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยใช้ hexane:EtOAc 4:1 เป็นสารชะ จะได้ผลิตภัณฑ์ *N-tert-butyl 3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy)phenethyl carbamate (6c)* เป็นของแข็งสีขาว 0.10 g (72% yield) จุดหลอมเหลว 82-84 °C; 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.61-7.65 (2H, td, $J = 1.3, 7.2$ Hz), 7.53-7.57 (2H, dd, $J = 2.3, 7.9$ Hz), 7.26-7.32 (2H, td, $J = 2.6, 7.5$ Hz), 7.12-7.18 (2H, tt, $J = 2.0, 7.6$ Hz), 6.89 (1H, d, $J = 8.2$), 6.81 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 6.72 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz), 5.19 (2H, s), 5.18 (2H, s), 4.55 (1H, br), 3.31 (2H, brs), 2.71 (2H, t, $J = 6.9$ Hz), 1.43 (9H, s); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 155.9, 148.7, 147.3, 136.7, 136.6, 132.8, 132.6, 132.5, 129.2, 129.1, 129.0, 128.8, 127.5, 122.2, 122.0, 115.7, 115.2, 79.3, 70.8, 70.7, 41.9, 35.7, 28.5.

การสังเคราะห์ *N-tert-butyl 3,4-dibutoxyphenethylcarbamate* (9)



นำ *N-tert-butyl 3,4-dihydroxyphenethylcarbamate* (5) (0.12 กรัม, 0.47 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย anhyd. DMF (4 มิลลิลิตร) เติม K_2CO_3 (0.39 กรัม, 2.84 มิลลิโมล) และ butyl bromide (0.10 มิลลิลิตร, 0.95 มิลลิโมล) ทำการกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศ Ar จากนั้นกรองผ่าน celite และล้างด้วย EtOAc นำของเหลวที่กรองได้มาสกัดด้วยน้ำ และน้ำเกลือ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ hexane:EtOAc 4:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ *N-tert-butyl 3,4-dibutoxyphenethylcarbamate* (6d) เป็นของหนืดใสไม่มีสี 0.02 g (12% yield); ^1H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 6.81 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 6.68-6.71 (2H, m), 4.53 (1H, br), 3.98 (4H, dt, $J=2.4, 6.6$ Hz), 3.33 (2H, q, $J=6.2$ Hz), 2.71 (2H, t, $J=7.0$ Hz), 1.74-1.82 (4H, m), 1.46-1.54 (4H, m), 1.44 (9H, s), 0.95-1.00 (6H, dt, $J=1.9, 7.4$ Hz); $^{13}C-NMR$ ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 155.9, 149.2, 147.8, 131.7, 120.9, 114.7, 114.2, 79.2, 69.1, 69.0, 41.9, 35.7, 31.4, 28.4, 19.2, 13.8,

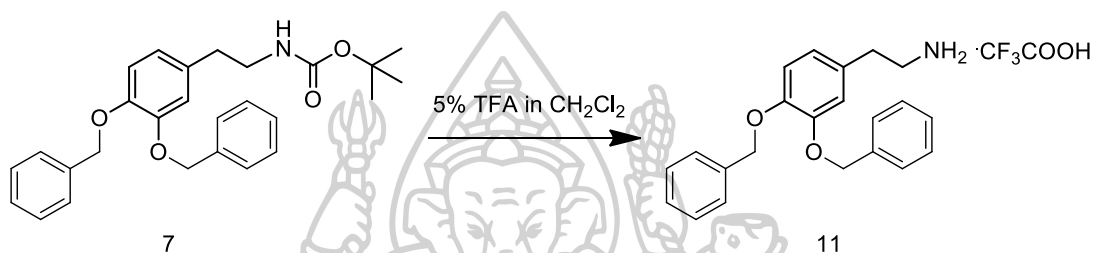
การสังเคราะห์ 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanamine (10)



นำ *N-tert-butyl 3,4-dimethoxyphenethylcarbamate* (6) (0.31 กรัม, 1.11 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม 5% TFA ใน CH_2Cl_2 (24 มิลลิลิตร, 15.54 มิลลิโมล) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ 15% MeOH ใน CH_2Cl_2 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์

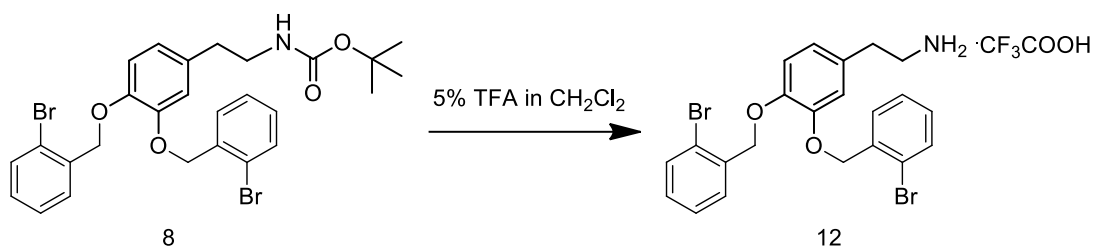
2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanamine (**7a**) เป็นของหนี่ดสีเหลือง 0.15 g (47% yield); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 6.65-6.84 (3H, m), 4.47 (2H, br), 3.82 (3H, s), 3.81 (3H, s), 2.99 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.75 (2H, t, $J = 7.1$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 149.1, 147.9, 130.7, 120.8, 112.1, 111.5, 56.0, 55.9, 42.5, 36.7.

การสังเคราะห์ 2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)ethanamine (**11**)



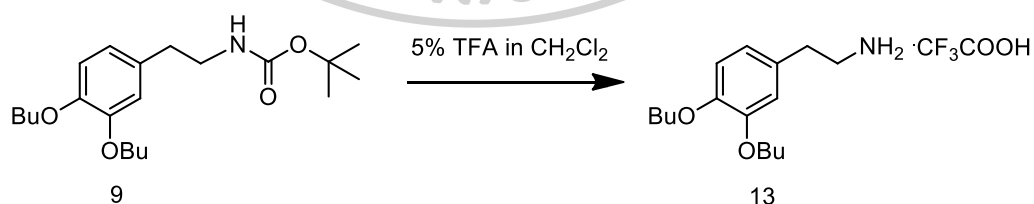
นำ *N-tert-butyl* 3,4-bis(benzyloxy)phenethylcarbamate (**7**) (0.40 กรัม, 0.92 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม 5% TFA ใน CH_2Cl_2 (20 มิลลิลิตร, 13.10 มิลลิโมล) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ 15% MeOH ใน CH_2Cl_2 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ 2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)ethanamine (**7b**) เป็นของหนี่ดสีเหลือง 0.30 g (72% yield); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.27-7.38 (10H, m), 6.83 (1H, d, $J = 8.1$), 6.76 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.65 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz), 5.10 (2H, s), 5.07 (2H, s), 3.94 (2H, br), 2.86 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 2.64 (2H, t, $J = 7.0$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 149.0, 147.8, 137.4, 137.3, 131.9, 128.6, 128.0, 127.9, 127.6, 127.4, 121.8, 116.0, 115.5, 71.5, 71.4, 42.5, 37.1.

การสังเคราะห์ 2-(3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy)phenyl)ethanamine (12)



นำ *N-tert-butyl* 3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy)phenethylcarbamate (**8**) (0.25 กรัม, 0.42 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม 5% TFA ใน CH_2Cl_2 (9.20 มิลลิลิตร, 6.00 มิลลิโมล) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ระบายตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ 15% MeOH ใน CH_2Cl_2 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ 2-(3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy)phenyl)ethanamine (**7c**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 0.19 g (76% yield) จุดหลอมเหลว 68-69 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.60-7.62 (2H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.55 (2H, dd, $J = 0.7, 7.9$ Hz), 7.25-7.31 (2H, m), 7.27-7.38 (2H, td, $J = 1.4, 7.7$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 8.2$), 6.80 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 6.73 (1H, dd, $J = 1.6, 8.2$ Hz), 5.19 (2H, s), 5.17 (2H, s), 3.02 (2H, br), 2.93 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 2.69 (2H, t, $J = 6.8$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 148.7, 147.4, 136.7, 136.6, 132.8, 132.7, 132.6, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 127.7, 122.3, 122.2, 115.9, 115.2, 70.9, 70.8, 43.0, 38.1.

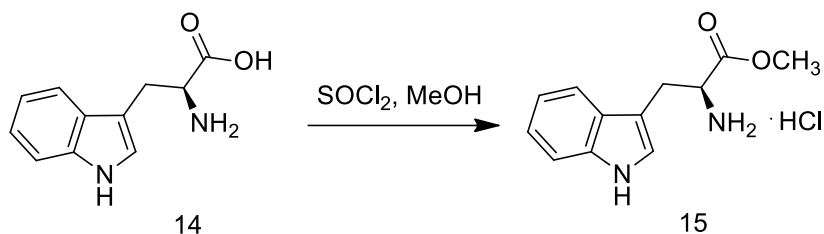
การสังเคราะห์ 2-(3,4-dibutoxyphenyl)ethanamine (13)



นำ *N-tert-butyl* 3,4-dibutoxyphenethylcarbamate (**9**) (0.02 กรัม, 0.06 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม 5% TFA ใน CH_2Cl_2 (1.2 มิลลิลิตร, 0.81 มิลลิโมล) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ระบายตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ นำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์

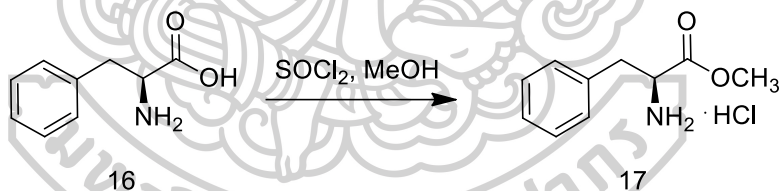
การสังเคราะห์ห่อมิโนแอลกอฮอล์

การสังเคราะห์ (S)-methyl 2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propanoate hydrochloride (15)



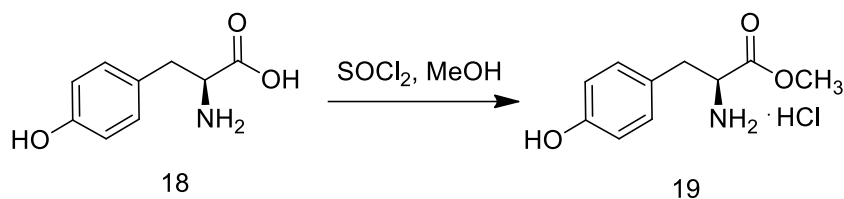
นำ tryptophan (**14**) (1.01 กรัม, 4.99 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย dry MeOH (10 มิลลิลิตร) กวนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันภายใต้บรรยากาศอาร์กอน จากนั้นค่อยๆ เติม SOCl_2 (0.40 มิลลิลิตร, 5.50 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทำการให้ความร้อนโดยวิธี reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ นำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์

การสังเคราะห์ (S)-methyl 2-amino-3-phenylpropanoate hydrochloride (17)



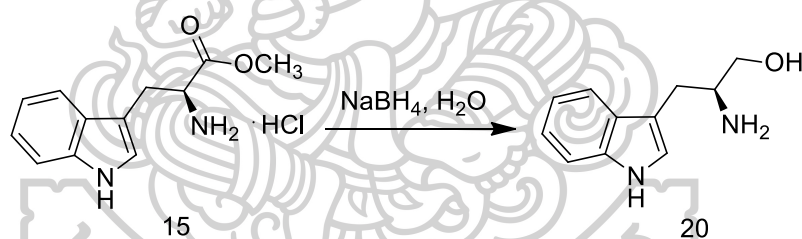
นำ phenylalanine (**16**) (0.83 กรัม, 5.00 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย dry MeOH (10 มิลลิลิตร) กวนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันภายใต้บรรยากาศ Ar จากนั้นค่อยๆ เติม SOCl_2 (0.40 มิลลิลิตร, 5.50 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทำการให้ความร้อนโดยวิธีฟลักซ์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ นำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์

การสังเคราะห์ (*S*)-methyl 2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoate hydrochloride (**19**)



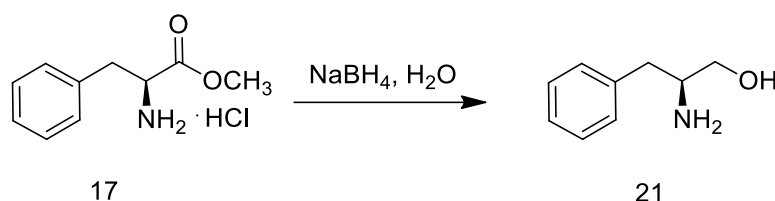
นำ tyrosine (**18**) (0.91 กรัม, 5.00 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย dry MeOH (10 มิลลิลิตร) กวนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันภายใต้บรรยากาศ Ar จากนั้นค่อยๆ เติม SOCl_2 (0.40 มิลลิลิตร, 5.50 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทำการให้ความร้อนโดยวิธี reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ระบายตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ นำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์

การสังเคราะห์ (*S*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propan-1-ol (**20**)



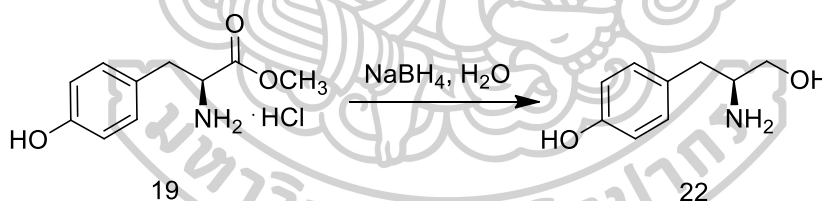
นำ (*S*)-methyl 2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propanoate hydrochloride (**15**) (0.78 กรัม, 3.60 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย THE: H_2O (10:1) (5.50 มิลลิลิตร) เติมลงในสารผสม NaBH_4 (0.55 กรัม, 14.38 มิลลิโมล) ใน H_2O (20 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้เป็นกรดด้วย 2 N HCl และสกัดด้วย Et_2O นำชั้นน้ำมาปรับให้เป็นเบสด้วย 2 N NaOH และสกัดด้วย EtOAc นำ EtOAc ที่สกัดได้มาล้างด้วยน้ำ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรอง และระบายตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ นำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์

การสังเคราะห์ (S)-2-amino-3-phenylpropan-1-ol (21)



นำ (S)-methyl 2-amino-3-phenylpropanoate hydrochloride (**17**) (1.31 กรัม, 6.10 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย THF: H₂O (10:1) (11 มิลลิลิตร) เติมลงในสารผสม NaBH₄ (0.93 กรัม, 24.40 มิลลิโมล) ใน H₂O (25 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้เป็นกรดด้วย 2 N HCl และสกัดด้วย Et₂O นำชั้นน้ำมาปรับให้เป็นเบสด้วย 2 N NaOH และสกัดด้วย EtOAc นำ EtOAc ที่สกัดได้มาล้างด้วยน้ำ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ นำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์

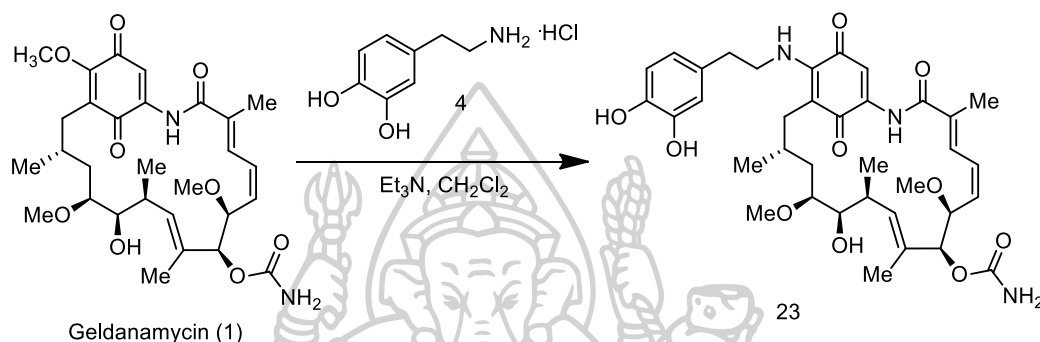
การสังเคราะห์ (S)-4-(2-amino-3-hydroxypropyl)phenol (22)



นำ (S)-methyl 2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoate hydrochloride (**19**) (1.15 กรัม, 5 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายด้วย THF: H₂O (10:1) (11 มิลลิลิตร) เติมลงในสารผสม NaBH₄ (0.76 กรัม, 20 มิลลิโมล) ใน H₂O (25 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้เป็นกรดด้วย 2 N HCl และสกัดด้วย Et₂O นำชั้นน้ำมาปรับให้เป็นเบสด้วย 2 N NaOH และสกัดด้วย EtOAc นำ EtOAc ที่สกัดได้มาล้างด้วยน้ำ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ นำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 17-demethoxy geldanamycin

การสังเคราะห์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-19-((3,4-dihydroxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (23)

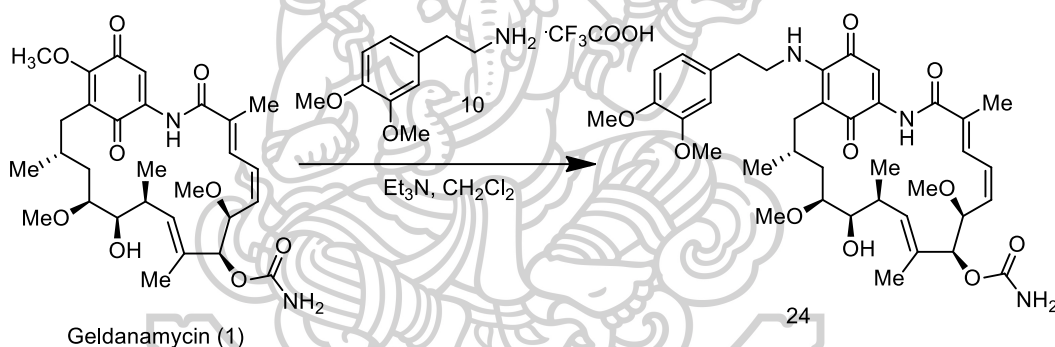


นำ dopamine hydrochloride (4) (0.04 กรัม, 0.20 มิลลิโมล) ละลายใน CH_2Cl_2 (2 มิลลิลิตร) เติม Et_3N (0.03 มิลลิลิตร, 0.23 มิลลิโมล) กวนเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมลงในสารละลาย geldanamycin (1) (0.06 กรัม, 0.10 มิลลิโมล) ใน CH_2Cl_2 10 (มิลลิลิตร) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บให้แห้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ละลายด้วย EtOAc แล้วทำการสกัดด้วย 1 N HCl น้ำ และน้ำเกลือ ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย $\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ Hexane: EtOAc 1:2 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*, 10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-19-((3,4-dihydroxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (a) เป็นของแข็งสีม่วง 0.0167 g (21% yield using 1:2 Hexane: EtOAc as a mobile phase) จุดหลอมเหลว 114-116 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9.18 (1H, br), 7.21 (1H, s), 6.94 (1H, d, $J = 11.5$ Hz), 6.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.73 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.54-6.61 (2H, m), 6.41 (1H, br), 5.83-5.90 (2H, m), 5.18 (1H, s), 4.97 (2H, br), 4.33 (1H, d, $J = 9.7$ Hz), 3.59-3.73 (3H, m), 3.46 (1H, m), 3.36 (3H, s), 3.27 (3H, s), 2.62-2.83 (4H,

m), 2.35-2.43 (1H, m), 2.01 (3H, s), 1.80 (3H, s), 1.60-1.78 (3H, m), 1.00 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.93 (3H, d, $J = 6.2$ Hz);

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 183.9, 180.4, 168.5, 156.3, 144.9, 144.3, 143.1, 141.3, 134.9, 133.6, 132.8, 129.6, 127.0, 126.6, 120.8, 115.7, 115.6, 108.7, 108.5, 81.9, 81.4, 81.1, 72.8, 57.1, 56.7, 47.0, 35.2, 35.0, 34.3, 32.3, 29.7, 28.6, 22.8, 12.8, 12.6, 12.5.

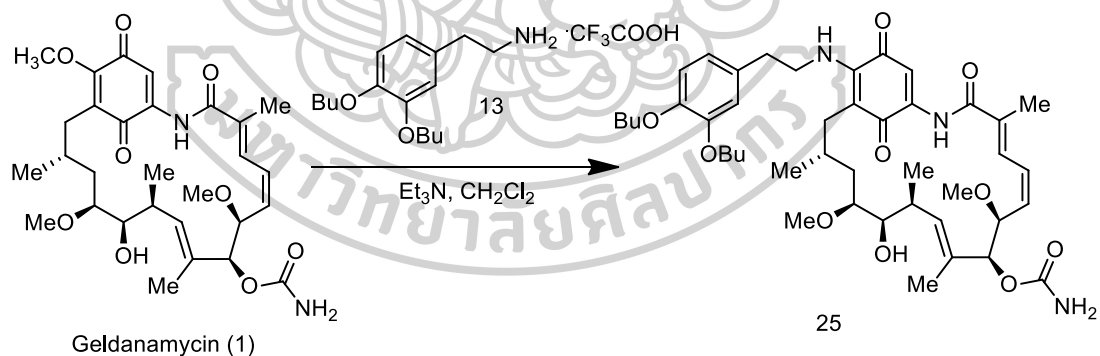
การสังเคราะห์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-19-((3,4-dimethoxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (24)



นำ 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanamine (10) (0.05 กรัม, 0.30 มิลลิโมล) ละลายใน CH_2Cl_2 (5 มิลลิลิตร) เติม Et_3N (0.05 มิลลิลิตร, 0.33 มิลลิโมล) กวนเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมลงในสารละลาย geldanamycin (1) (0.08 กรัม, 0.14 มิลลิโมล) ใน CH_2Cl_2 (10 มิลลิลิตร) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บให้แห้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ละลายด้วย EtOAc แล้วทำการสกัดด้วย 1 N HCl น้ำ และน้ำเกลือ ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย $\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ Hexane: EtOAc 1:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-19-((3,4-dimethoxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-

2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (**b**) เป็นของแข็งสีม่วง 0.0508 g (50% yield using 1:1 Hexane:EtOAc as a mobile phase) จุดหลอมเหลว 127-129 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9.17 (1H, br), 7.26 (1H, s), 6.95 (1H, d, $J = 11.4$ Hz), 6.71-6.91 (3H, m), 6.58 (1H, t, $J = 11.5$ Hz), 6.38 (1H, br), 5.83-5.92 (2H, m), 5.19 (1H, s), 4.86 (2H, br), 4.31 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.62-3.85 (1H, m), 3.57 (1H, dd, $J = 1.8, 9.0$ Hz), 3.45 (1H, m), 3.36 (3H, s), 3.27 (3H, s), 2.67-2.93 (4H, m), 2.39-2.46 (1H, m), 2.02 (3H, s), 1.80 (3H, s), 1.62-1.78 (3H, m), 1.00 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.95 (3H, d, $J = 6.4$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 183.8, 180.7, 168.4, 156.0, 149.3, 148.2, 144.7, 141.3, 135.8, 134.9, 133.7, 132.7, 129.6, 126.9, 126.5, 120.7, 111.7, 111.6, 108.7, 108.6, 81.6, 81.4, 81.2, 72.65, 57.1, 56.7, 55.9, 47.1, 35.5, 35.1, 34.4, 32.3, 28.5, 22.9, 12.8, 12.6, 12.3.

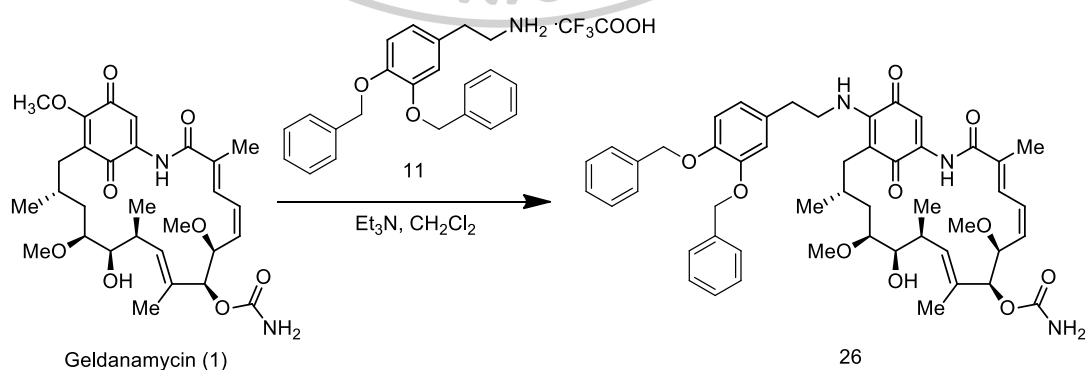
การสังเคราะห์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-19-((3,4-dibutoxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (**25**)



นำผลิตภัณฑ์ดิบ 2-(3,4-dibutoxyphenyl)ethanamine (**13**) (0.03 กรัม, 0.09 มิลลิโมล) ละลายใน CH_2Cl_2 (2.5 มิลลิลิตร) เติม Et_3N (0.02 มิลลิลิตร, 0.11 มิลลิโมล) กวนเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมลงในสารละลาย geldanamycin (**1**) (0.03 กรัม, 0.05 มิลลิโมล) ใน CH_2Cl_2 (5 มิลลิลิตร) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บให้แห้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ ความดันต่ำ ละลายด้วย EtOAc แล้วทำการสกัดด้วย 1 N HCl น้ำ และน้ำเกลือ ตามลำดับ นำขึ้น

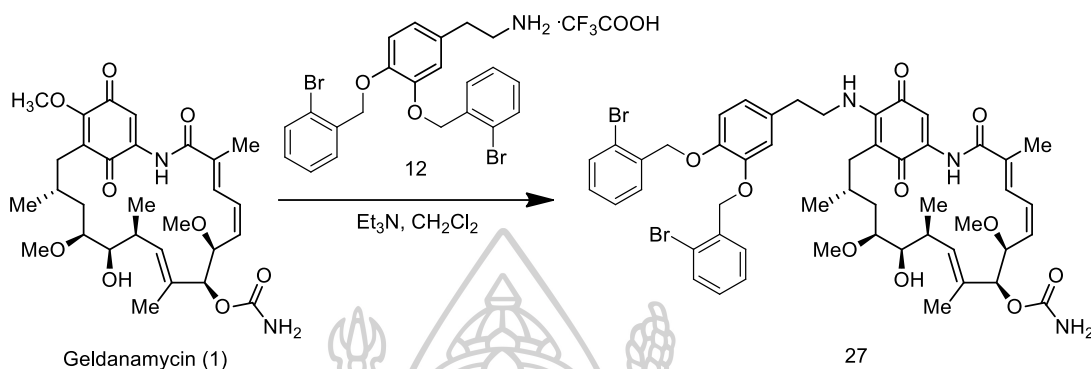
EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOAc}$ 10:7 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-19-((3,4-dibutoxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (**e**) เป็นของแข็งสีม่วง 0.0097 g (25% yield using 10:7 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOAc}$ as a mobile phase) จุดหลอมเหลว 178-181 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9.17 (1H, br), 7.26 (1H, s), 6.95 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 6.85 (1H, d, $J = 8.67$ Hz), 6.72-6.75 (2H, m), 6.58 (1H, t, $J = 11.6$ Hz), 6.37 (1H, br), 5.83-5.92 (m, 2H), 5.19 (1H, s), 4.84 (2H, br), 4.31 (1H, d, $J = 9.9$ Hz), 3.99 (4H, td, $J = 3.9, 6.6$ Hz), 3.62-3.87 (2H, m), 3.57 (1H, dd, $J = 1.8, 8.9$ Hz), 3.45 (1H, m), 3.36 (3H, s), 3.27 (3H, s), 2.88 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 2.65-2.80 (2H, m), 2.38-2.46 (1H, m), 2.02 (3H, s), 1.61-1.89 (10H, m), 1.41-1.60 (4H, m), 0.98-1.01 (12H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 183.7, 180.6, 168.4, 156.0, 149.5, 148.4, 144.8, 141.3, 135.8, 135.0, 133.8, 132.7, 129.7, 126.9, 126.5, 120.9, 114.4, 114.3, 108.7, 108.6, 81.7, 81.5, 81.2, 72.6, 69.1, 57.1, 56.7, 47.1, 35.5, 35.1, 34.4, 32.3, 31.3, 28.5, 22.9, 19.2, 13.8, 12.7, 12.6, 12.3.

การสังเคราะห์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-19-((3,4-bis(benzyloxy)phenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (**26**)



นำ 2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)ethanamine (**11**) (0.13 กรัม, 0.40 มิลลิโมล) ละลายใน CH_2Cl_2 (5 มิลลิลิตร) เติม Et_3N (0.06 มิลลิลิตร, 0.46 มิลลิโมล) กวนเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมลงในสารละลาย geldanamycin (**1**) (0.11 กรัม, 0.20 มิลลิโมล) ใน CH_2Cl_2 (15 มิลลิลิตร) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บให้แห้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ละลายด้วย EtOAc แล้วทำการสกัดด้วย 1 N HCl น้ำ และน้ำเกลือ ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ CH_2Cl_2 :EtOAc 5:2 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-19-((3,4-bis(benzyloxy)phenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (**c**) เป็นของแข็งสีม่วง 0.0501 g (14% yield using 5:2 CH_2Cl_2 :EtOAc as a mobile phase) จุดหลอมเหลว 92-94 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9.17 (1H, br), 7.40-7.55 (4H, m), 7.29-7.40 (6H, m), 7.26 (1H, s), 6.95 (1H, d, $J = 10.8$ Hz), 6.91 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.79 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.73 (1H, dd, $J = 2.0, 8.1$ Hz), 6.58 (1H, t, $J = 11.5$ Hz), 6.32 (1H, br), 5.82-5.91 (2H, m), 5.18 (1H, s), 5.16 (2H, s), 5.14 (2H, s), 4.96 (2H, br), 4.31 (1H, d, $J = 9.9$ Hz), 3.62-3.82 (2H, m), 3.58 (1H, dd, $J = 1.7, 8.9$ Hz), 3.43-3.46 (1H, m), 3.36 (3H, s), 3.26 (3H, s), 2.84 (2H, t, $J = 6.9$ Hz), 2.64-2.77 (1H, m), 2.34-2.42 (1H, m), 2.02 (3H, s), 1.79 (3H, s), 1.62-1.78 (3H, m), 1.00 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.93 (3H, d, $J = 6.4$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 183.7, 180.6, 168.3, 156.1, 149.3, 148.2, 144.7, 141.3, 137.2, 137.1, 135.8, 134.9, 133.7, 132.7, 130.4, 128.5, 127.8, 127.3, 126.9, 126.5, 121.6, 115.6, 115.4, 108.7, 108.6, 81.6, 81.4, 81.2, 72.6, 71.5, 71.4, 57.1, 56.7, 46.9, 35.4, 35.0, 34.4, 32.3, 28.5, 22.9, 12.7, 12.6, 12.3.

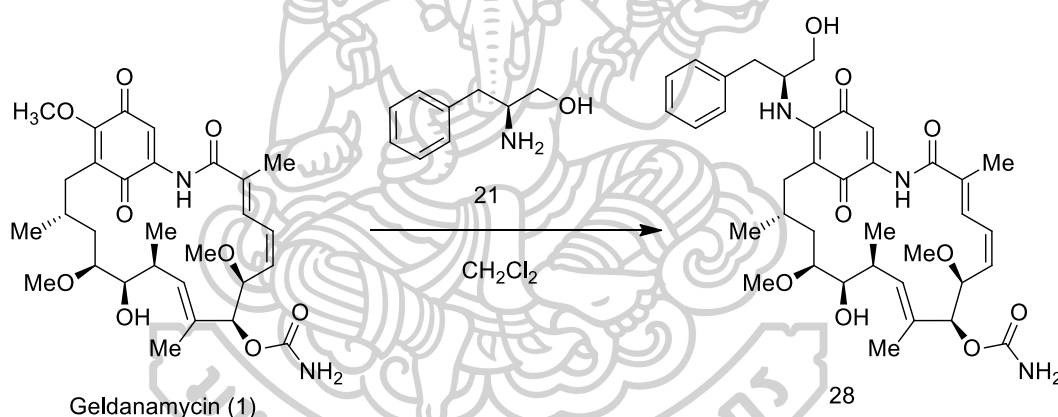
การสังเคราะห์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-19-((3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy)phenethyl) amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]do-cosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (27)



นำ 2-(3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy) phenyl)ethanamine (12) (0.15 กรัม, 0.29 มิลลิโมล) ละลายใน CH₂Cl₂ (5 มิลลิลิตร) เติม Et₃N (0.05 มิลลิลิตร, 0.32 มิลลิโมล) กวนเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมลงในสารละลาย geldanamycin (1) (0.08 กรัม, 0.14 มิลลิโมล) ใน CH₂Cl₂ (10 มิลลิลิตร) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บให้แห้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ ความดันต่ำ ละลายด้วย EtOAc แล้วทำการสกัดด้วย 1 N HCl น้ำ และน้ำเกลือ ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ CH₂Cl₂:EtOAc 2:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-19-((3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy)phenethyl) amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1] docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (d) เป็นของแข็งสีม่วง 0.0757 g (53% yield using 2:1 CH₂Cl₂:EtOAc as a mobile phase) จุดหลอมเหลว 174-176 °C; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.17 (1H, br) 7.61 (2H, ddd, *J* = 1.8, 2.3, 7.7 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.31 (2H, td, *J* = 0.6, 7.5 Hz), 7.26 (1H, s) 7.17 (2H, td, *J* = 0.5, 7.4 Hz), 6.95 (1H, d, *J* = 11.6 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.77-6.86 (2H, m), 6.58 (1H, t, *J* = 11.6 Hz), 6.33 (1H, br), 5.82-5.91 (2H, m), 5.22 (2H, s), 5.20 (2H, s), 5.18 (1H, s), 5.06 (2H, br), 4.31 (1H, d, *J* = 9.9 Hz), 3.60-3.85 (2H, m), 3.57 (1H, dd, *J* = 1.4, 8.6 Hz), 3.43-3.46 (1H, m), 3.36 (3H, s), 3.26 (3H, s), 2.88 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 2.65-2.80 (1H, m), 2.36-2.44 (1H, m), 2.02 (3H, s), 1.80

(3H, s), 1.62-1.79 (3H, m), 1.00 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.94 (3H, d, $J = 6.4$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 183.6, 180.6, 168.3, 156.2, 148.9, 148.8, 147.8, 147.7, 144.7, 141.2, 136.4, 136.3, 135.8, 134.9, 133.6, 132.8, 132.4, 130.8, 130.7, 129.2, 129.1, 128.9, 128.8, 127.6, 127.5, 126.9, 126.5, 122.1, 122.0, 121.9, 115.2, 115.1, 108.7, 108.6, 81.5, 81.4, 81.2, 72.5, 70.6, 57.0, 56.7, 46.8, 35.3, 35.0, 34.4, 32.3, 28.4, 22.9, 12.7, 12.5, 12.3.

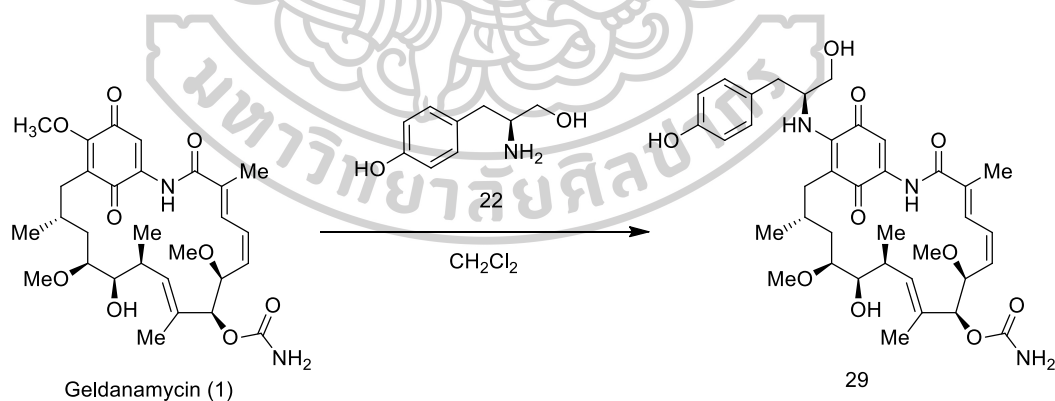
การสังเคราะห์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-13-hydroxy-19-(((*S*)-1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (28)



นำผลิตภัณฑ์ดิบ (*S*)-2-amino-3-phenylpropan-1-ol (**21**) (0.04 กรัม, 0.28 มิลลิโมล) ละลายใน MeOH (2 มิลลิลิตร) เติมลงในสารละลาย geldanamycin (**1**) (0.08 กรัม, 0.14 มิลลิโมล) ใน CH_2Cl_2 (10 มิลลิลิตร) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บให้แห้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ละลายด้วย EtOAc แล้วทำการสกัดด้วย 1 N HCl น้ำ และน้ำเกลือตามลำดับ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ CH_2Cl_2 :EtOAc 2:3 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-13-hydroxy-19-(((*S*)-1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-

tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate
(3a) 16 mg (40% yield) จุดหลอมเหลว 129.131 °C; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.10 (1H, br), 7.28 (m, 5H), 7.22 (1H, s), 6.92 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 6.57 (1H, t, *J* = 11.6 Hz), 6.37 (1H, d, *J* = 9.1 Hz), 5.86 (2H, m), 5.16 (1H, s), 4.95 (2H, br), 4.40 (1H, m), 4.29 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 3.64 (2H, d, *J* = 3.8 Hz), 3.55 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.8 Hz), 3.42 (1H, m), 3.35 (3H, s), 3.26 (3H, s), 3.08 (1H, dd, *J* = 6.6, 13.6 Hz), 2.93 (1H, dd, *J* = 6.8, 13.6 Hz), 2.73 (1H, m), 2.63 (1H, d, *J* = 13.1 Hz), 2.21 (1H, m), 2.02 (3H, s), 1.78 (3H, s), 1.75 (4H, m), 0.98 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.84 (3H, d, *J* = 6.4 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 184.1, 180.4, 168.3, 156.2, 144.9, 140.9, 136.7, 135.8, 134.9, 133.6, 132.8, 129.4, 128.7, 126.9, 126.5, 109.3, 109.0, 81.7, 81.3, 81.1, 72.6, 63.0, 57.1, 56.7, 56.5, 38.2, 35.0, 34.5, 32.2, 28.7, 23.0, 12.8, 12.5, 12.4.

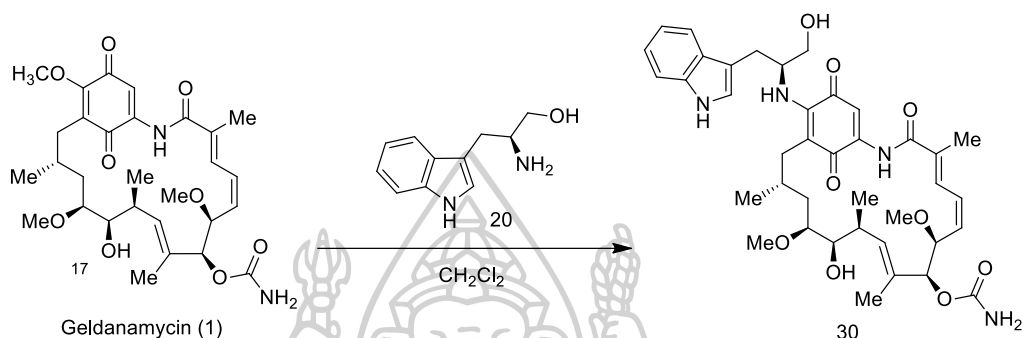
การสังเคราะห์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-13-hydroxy-19-(((*S*)-1-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (**29**)



นำผลิตภัณฑ์ดิบ (*S*)-4-(2-amino-3-hydroxypropyl)phenol (**22**) (0.05 กรัม, 0.28 มิลลิโมล) ละลายใน MeOH (2 มิลลิลิตร) เติมลงในสารละลาย geldanamycin (**1**) (0.80 กรัม, 0.14 มิลลิโมล) ใน CH₂Cl₂ (10 มิลลิลิตร) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บให้แห้งจากนั้นระเหย

ตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ละลายด้วย EtOAc แล้วทำการสกัดด้วย 1 N HCl น้ำ และ น้ำเกลือ ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ CH₂Cl₂:EtOAc 2:3 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-13-hydroxy-19-(((*S*)-1-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (**4a**) 28 mg (29.2% yield) จุดหลอมเหลว 125-127 °C; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.11 (1H, br), 7.24 (1H, s), 7.11 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 11.6 Hz), 6.81 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.58 (1H, t, *J* = 11.3 Hz), 6.37 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 5.86 (2H, dd, *J* = 10.6, 10.8 Hz), 5.54, (1H, br), 5.17 (1H, s), 4.79 (2H, br), 4.38 (2H, m), 4.30 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 3.59 (3H, m), 3.45 (1H, m), 3.36 (3H, s), 3.27 (3H, s), 2.94 (2H, d, *J* = 5.0 Hz), 2.75 (1H, m), 2.65 (1H, d, *J* = 13.4 Hz), 2.14 (2H, m), 2.02 (3H, s), 1.80 (3H, s), 1.78 (2H, m), 1.01 (3H, d, *J* = 6.2 Hz), 0.89 (3H, d, *J* = 6.2 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 184.2, 180.5, 168.5, 156.4, 155.2, 141.0, 135.9, 135.1, 133.6, 133.0, 130.8, 128.0, 127.0, 126.8, 115.8, 109.3, 109.1, 82.0, 81.4, 81.3, 72.8, 62.7, 57.3, 56.8, 56.4, 37.1, 35.1, 34.5, 32.4, 32.0, 28.8, 23.1, 12.9, 12.7, 12.5.

การสังเคราะห์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-13-hydroxy-19-(((*S*)-1-hydroxy-3-(1*H*-indol-3-yl)propan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo [16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (**30**)



นำผลิตภัณฑ์ดิบ (*S*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propan-1-ol (**20**) (0.06 กรัม, 0.28 มิลลิโมล) ละลายใน MeOH (2 มิลลิลิตร) เติมลงในสารละลาย geldanamycin (**1**) (0.80 กรัม, 0.14 มิลลิโมล) ใน CH₂Cl₂ (10 มิลลิลิตร) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บให้แห้งจากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ละลายด้วย EtOAc แล้วทำการสกัดด้วย 1 N HCl น้ำ และน้ำเกลือ ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative chromatography โดยใช้ CH₂Cl₂:EtOAc 2:3 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-13-hydroxy-19-(((*S*)-1-hydroxy-3-(1*H*-indol-3-yl)propan-2-yl)amino)-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (**2a**) 32 mg (32% yield) จุดหลอมเหลว 144-146 °C; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.08 (1H, br), 8.52 (1H, br), 7.66 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.37 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.17 (4H, m), 6.88 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 6.49 (2H, m), 5.85 (2H, m), 5.15 (1H, s), 4.93 (2H, br), 4.52 (1H, m), 4.28 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 3.64 (2H, d, *J* = 4.4 Hz), 3.56 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 3.42 (1H, m), 3.33 (4H, m), 3.25 (3H, s), 3.16, (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 2.73 (1H, m), 2.60 (1H, d, *J* = 13.9 Hz), 2.24 (1H, m), 1.97 (3H, s), 1.79 (3H, s), 1.74 (4H, m), 0.97 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.86 (3H, d, *J* = 6.3 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 184.2, 180.2, 168.3, 156.2, 145.3, 140.8,

136.3, 135.7, 135.0, 133.7, 132.8, 127.6, 126.8, 126.6, 123.5, 122.3, 119.9, 119.7, 118.6, 111.3, 110.2, 109.0, 81.8, 81.3, 81.2, 72.6, 63.1, 57.1, 56.7, 55.4, 34.9, 34.5, 32.2, 28.6, 27.3, 22.8, 12.7, 12.5, 12.3.

3.4 การทดสอบความสามารถในการละลายน้ำของ geldanamycin และอนุพันธ์

นำมาทดสอบ ความสามารถในการละลายน้ำ โดยชั่งสาร 1 มิลลิกรัม ใน microcentrifuge tube แล้วเติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ทำให้ละลายโดยการกวนไปมา นาน 1 นาที และใน rotator 5 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที คูด สารละลายเก็บไว้ ส่วนตะกอนสารนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Speed Vacuum Concentrator แล้วอบให้แห้ง ที่ 70 °C ในตู้บ่ม นำตะกอนที่เหลือไปชั่งน้ำหนัก หาน้ำหนักที่หายไปคำนวณน้ำหนักสารที่ละลายในน้ำในหน่วย มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ มิลลิโมล แล้วหาค่า relative solubility ของอนุพันธ์ ที่สังเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับ เจลดานามัยซินทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน

3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ

3.5.1 Anticancer activity

เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์สายพันธุ์ Hela ได้มาจาก คุณกรพรรณ เสวตสุวรรณกุล คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์สายพันธุ์ HepG2 เซลล์ปกติ (rhesus monkey kidney epithelial cell lines) สายพันธุ์ LLC-MK2 และ เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์สายพันธุ์ MDA-MB-231 เซลล์ทั้งสามชนิด นี้ได้มาจากคุณนงนุช กำลังแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (African green monkey kidney cell) สายพันธุ์ Vero ได้มาจาก โรงพยาบาลศิริราช เซลล์เหล่านี้ถูกเลี้ยงในอาหาร DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium , 10% Fetal bovine serum (FBS), และใส่ antibiotic penicillin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ streptomycin sulfate (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂

MTT assay for cell viability

- 1) เลี้ยงเซลล์ที่จะทดสอบในอาหาร Dulbecco is modified eagle medium (DMEM, Gibco) ที่เติม 10% fetal bovine serum ,penicillin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ streptomycin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เลี้ยงจนให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ ประมาณ 80-90% confluent
- 2) จากนั้นทำการ trypsinization cell ด้วย trypsin แล้วถ่ายเซลล์ลง 96 well plate ให้มีความหนาแน่น 5×10^4 เซลล์/หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 2 วัน
- 3) นำสารที่จะทดสอบมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 512,256,128,64,32,16,8,4,2,1 และ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเจือจางในอาหาร Dulbecco is modified eagle medium (DMEM) ที่ไม่มี serum และมี antibiotic penicillin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ streptomycin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยทำ control ของเซลล์มะเร็ง negative control คือ อาหารที่ใช้เจือจางและเซลล์มะเร็ง positive control คือ 20% DMSO และ 5% DMSO และอาหารที่ใช้เจือจาง และ control ของเซลล์ปกติ negative control คือ 20% DMSO และ 5% DMSO และ positive control คือ อาหารที่ใช้เจือจางและเซลล์ปกติ
- 4) เมื่อครบเวลาที่กำหนด ดูดอาหารเก่าออก แล้วล้างด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารที่ต้องการทดสอบลงไปหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำ 2 ซ้ำ ตามความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เจือจาง แถวที่ 12 เป็นหลุม control ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 5) จากนั้น ดูดอาหารที่ประกอบด้วยสารที่ทดสอบออกให้หมด และเติม 5 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร PBS) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- 6) จากนั้นดูด MTT ออกให้หมด แล้วเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทุกหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Taechowisan T . *et al.*,2007:1104-1113) การวิเคราะห์ MTT หากเซลล์ยังมีชีวิต MTT สีเหลืองจะถูกเปลี่ยนเป็นผลึกสีม่วง formazan หลังจากบ่มบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเซลล์มาเติม

DMSO 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม เพื่อละลายผลึก formazan ซึ่งจะได้สารละลายสีม่วง
นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540

นาโนเมตร สีม่วงที่ละลายผลึก formazan จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต
ค่าการดูดกลืนแสงสามารถนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - [(Abs \text{ sample} - Abs \text{ blank}) / (Abs \text{ control} - Abs \text{ blank})] * 100$$

โดยที่ Abs sample คือการดูดกลืนของสารทดสอบและ Abs control คือการดูดกลืนของ
ปฏิกิริยาควบคุม เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะถูกนำมาสร้างกราฟ เพื่อคำนวณหาค่า IC50

3.5.2 Antiviral

คุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัส ของสารที่ทำการ synthesis ขึ้นมาใหม่ จะนำมาทดสอบ
ประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสโดยแสดงผลค่า การวัดปริมาณไวรัสโดยวิธี hemagglutination assay
เชื้อไวรัสที่ทดสอบเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ (A/Free-Grazing duck/Nakhon
Pathom/Thailand/1/07(H5N2)

ไข่ไก่ฟักที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

เมื่อส่องไฟแล้วจะเห็นเป็นสีส้ม เห็นเส้นเลือดชัดเจน

ไข่ที่ส่องแล้ว เห็นเป็นสีดำ น้ำตาล หรือสีเขียว เป็นไข่ที่มีการปนเปื้อน ควรคัดทิ้ง

เปลือกไข่ต้องไม่มีรอยแตกร้าว หรือรอยเจาะ

ข้อควรระวัง

- ตำแหน่งที่จะฉีดไม่ควรอยู่ใกล้เส้นเลือดใหญ่
- ตำแหน่งที่จะฉีดควรอยู่ตรงข้ามกับตัวอ่อน
- ตำแหน่งที่จะฉีดแบบ CAS ควรอยู่สูงกว่า air sac 0.5 เซนติเมตร

การฉีดไวรัสเข้าไข่ไก่ฟักแบบ CAS

- 1) สวมถุงมือ ทำความสะอาดตู้ safety cabinet ด้วย 70% alcohol
- 2) ทำความสะอาดเปลือกไข่ด้วย 70% alcohol
- 3) ทำความสะอาดบริเวณที่จะฉีดด้วย betadine อีกครั้ง

- 4) ใช้เข็มที่ปราศจากเชื้อเจาะรูเปลือกไข่บริเวณที่จะฉีด ให้อยู่เหนือ air sac 0.5 เซนติเมตร
- 5) ทำการไครุทสารอนุพันธ์ของเจลดานามัยซินกับไวรัส แล้วฉีดปริมาณไวรัส 0.1 มิลลิลิตร (อาจจะเจือจางไวรัสใน 0.85% NaCl หรือสารทดสอบฤทธิ์การต้านไวรัส) โดยตั้งเข็ม 45 องศา ลึก 1.2 เซนติเมตร (ถ้าใช้ tuberculin syringe จะฉีดสุดปลายเข็ม)
- 6) ปิดรูที่ฉีดไวรัสด้วย paraffin wax
- 7) บ่มไข่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 62% โดยมีการไหลเวียนของอากาศเป็นเวลา 3 วัน

การตรวจเช็คหลังจากฉีดไวรัสเข้าไปในไข่ไก่ฟัก

หลังจากฉีด 16-24 ชั่วโมง ควรส่องไข่เพื่อตรวจเช็คในตัวอ่อนตายเนื่องจากได้รับบาดเจ็บจากการฉีดหรือไม่ หรือการฉีดมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียหรือไม่ โดยการส่องไฟ หากมีการนิกขาดของเส้นเลือด จะเห็นเป็นสีน้ำตาลหรือมีการปนเปื้อนจะเห็นเป็นสีเขียว ไข่ที่ดีจะเห็นเป็นสีส้ม เห็นเส้นเลือดชัดเจน

การเก็บไวรัสที่เพิ่มจำนวนในไข่ไก่ฟัก

- 1) หลังจากบ่มไข่ 3 วัน จะเก็บไข่ไก่ไว้ใน cool room ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้ตัวอ่อนตายและให้เส้นเลือดหดตัว
- 2) นำไข่ไก่มาวางใน safety cabinet แล้วทำความสะอาดโดยการเช็ดด้วย 70% alcohol
- 3) ใช้กรรไกรตัดเปลือกไข่บริเวณเหนือ air sac เล็กน้อยใช้ forcep ดึง shell membrane ออก
- 4) ใช้ forcep เจาะ chorioallantoic membrane แล้วดึงออกมา
- 5) ใช้ pasture pipette ดูด allantoic fluid ใส่ในหลอดฝาเกลียว
- 6) เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส แล้วนำไปใช้งานต่อไป

การวัดปริมาณไวรัสด้วยวิธี hemagglutination assay

- 1) นำเลือดไก่มาปั่นล้างด้วย PBS หรือ normal saline 3 ครั้ง ที่ 1500 rpm 5 นาที
- 2) ทำการเจือจางให้เป็น 10% โดยดูดเลือดไก่มา 1 มิลลิลิตร เติม PBS 9 มิลลิลิตร

- 3) จากนั้น dilute เลือดไก่มาเป็น 5% โดยการดูดเลือดไก่มา 5 มิลลิลิตร ใส่ PBS 5 มิลลิลิตร
- 4) เติม PBS ลงในหลุมทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ไวรัสที่ทำการดูดออกมาจาก allantoic fluid ลงใน หลุมแรก 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการ two four dilution ตามลำดับ control คือ เลือดไก่ และ ไวรัส
- 5) ดูดเลือดไก่ใส่ในแต่ละหลุมของ 96 well plate (ก้นกลม) หลุมละ 100 ไมโครลิตร
- 6) บ่มไวรัที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การอ่านผล end point

Titer: ระดับความเจือจางสูงสุด ที่ยังคงเห็นปฏิกิริยา agglutination

The end point: ความเข้มข้นต่ำสุดของหลุมสุดท้าย ที่เกิดปฏิกิริยา agglutination

3.6 การศึกษาการจำลองการจับกันของโมเลกุล (Molecular docking)

เนื่องจาก เจลดานามัยซินมี Hsp90 เป็นเป้าหมาย ดังนั้น อนุพันธ์ของ เจลดานามัยซินที่สังเคราะห์ขึ้นเหล่านี้จึงจำเป็นต้องนำมาศึกษาการจำลอง การจับกันของโมเลกุลกับ Hsp90 ด้วย ซึ่ง Hsp90 ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ มีความแตกต่างกัน ในฐานข้อมูล NCBI database ดังนั้นต้องนำ Hsp90 ตัวอย่าง เหล่านี้มาทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ N-terminal domain ซึ่งเป็น active site ในการจับกับ ATP และเจลดานามัยซิน

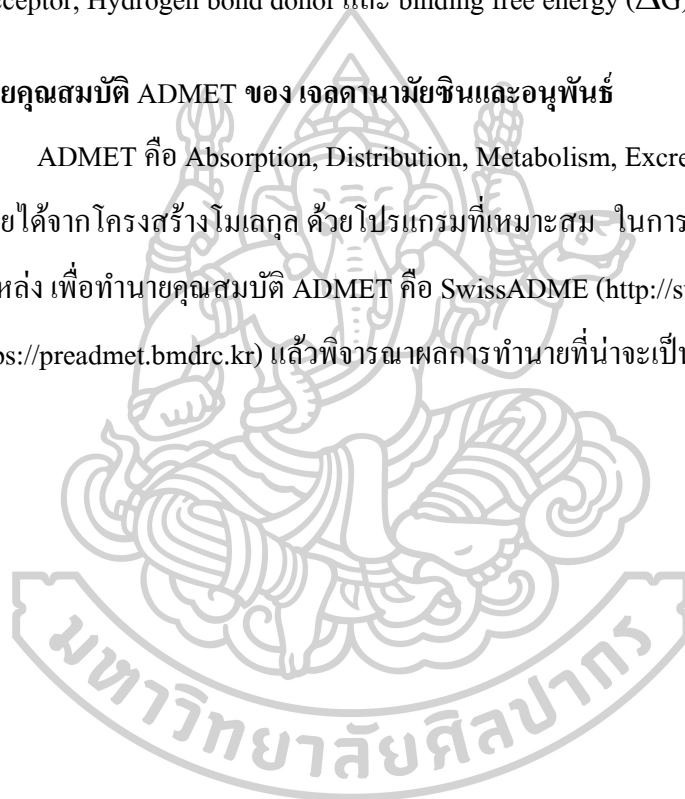
ในการศึกษา Molecular docking ทำได้ดังนี้

1. เปลี่ยนโครงสร้าง 2 มิติของเจลดานามัยซินและอนุพันธ์ที่เขียนด้วยโปรแกรม ChemDraw ให้เป็น SMILES strings โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ SMILES Translator and Structure File Generator (<https://cactus.nci.nih.gov/translate/>)
2. สร้างโครงสร้าง 3 มิติของ เจลดานามัยซินและอนุพันธ์ และปรับโครงสร้างให้มีพลังงานต่ำที่สุด (minimized energy) แล้วบันทึกไฟล์ให้เป็นนามสกุล Protein Data Bank (PDB) โดยใช้โปรแกรม UCSF Chimera v.1.14
3. เลือกโครงสร้าง 3 มิติของ Hsp90 ในฐานข้อมูล Protein databank โดยเลือก PDB ID: 1OSF เป็นตัวแทน Hsp90

4. Docking โครงสร้าง 3 มิติของ IOSF กับ เจลดานามัยซินและอนุพันธ์ ด้วยโปรแกรม Auto Dock Vina โดยใช้ 17-dimethylamino ethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) เป็น positive control
5. บันทึกผลการ docking เป็นไฟล์นามสกุล PBD แล้วนำไปเปิดในโปรแกรม Ligplot v.4.5.3 เพื่อดู H-bond interaction และ hydrophobic interaction และเปิดในโปรแกรม BIOVIA Discovery Studio เพื่อดู Hydrogen bond acceptor, Hydrogen bond donor และ binding free energy (ΔG)

3.7 การทำนายคุณสมบัติ ADMET ของ เจลดานามัยซินและอนุพันธ์

ADMET คือ Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion และ Toxicity ซึ่งสามารถทำนายได้จากโครงสร้างโมเลกุล ด้วยโปรแกรมที่เหมาะสม ในการศึกษาจะใช้โปรแกรมออนไลน์ 2 แห่ง เพื่อทำนายคุณสมบัติ ADMET คือ SwissADME (<http://swissadme.ch>) และ Pre-ADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr>) แล้วพิจารณาผลการทำนายที่น่าจะเป็นไปได้มากที่สุด



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การผลิตและการสกัดสารเจลดานามัยซิน จาก *Streptomyces zerumbet* W14

นำเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมสายพันธุ์ W14 มาเลี้ยงบนอาหาร ISP-2 เพื่อเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 14 วันหรือจนกว่าเชื้อจะมีการสร้างสปอร์ ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้คือ EtOAc แช่ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมากรอง และทำการระเหยตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมสายพันธุ์ W14 มีลักษณะคล้ายขี้ผึ้งสีน้ำตาลเข้ม จำนวน 4.20 กรัม

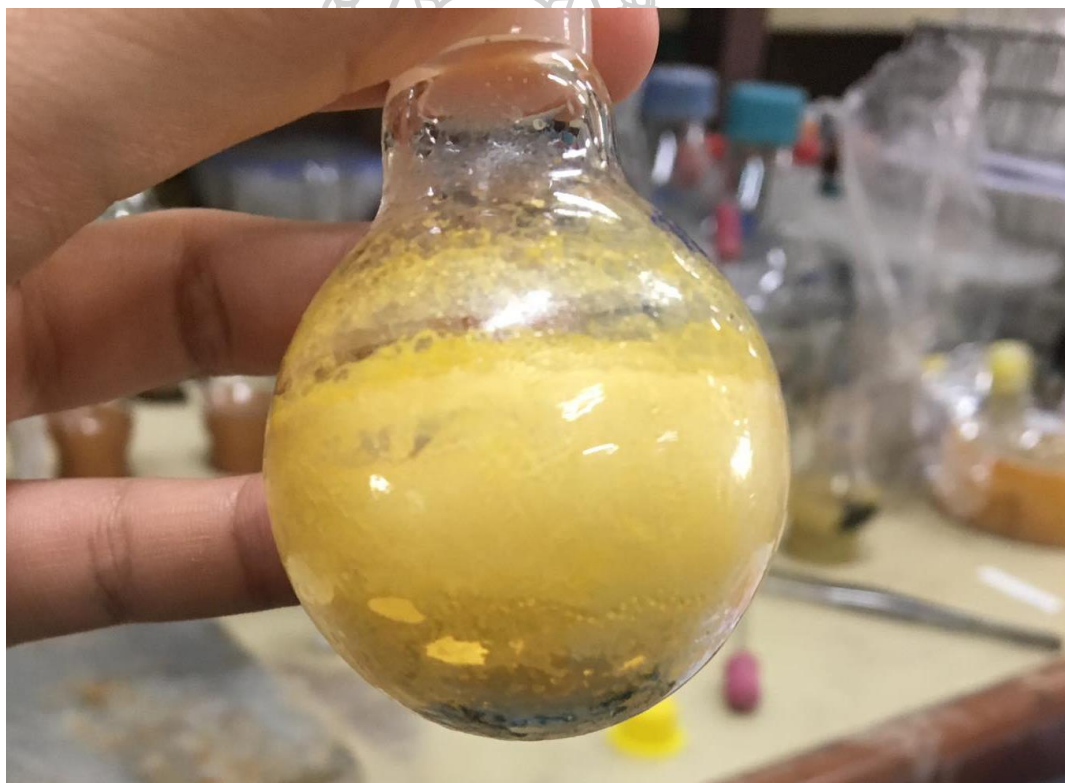


รูปที่ 8 ลักษณะของสารสกัดหยาบ

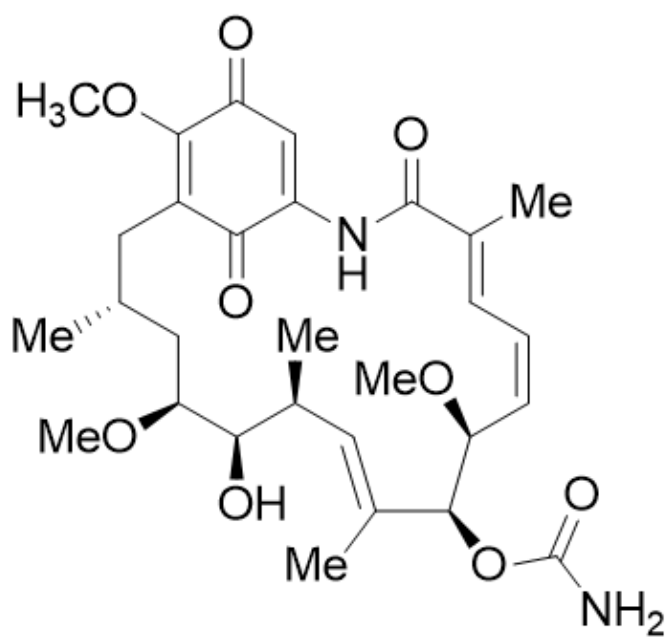
4.2 การทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดเจลคานามัยซิน

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Streptomyces zerumbet* W14 ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสหยุดนิ่ง (stationary phase) และใช้ตัวทำละลาย hexane:EtOAc อัตราส่วน 1:3 เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

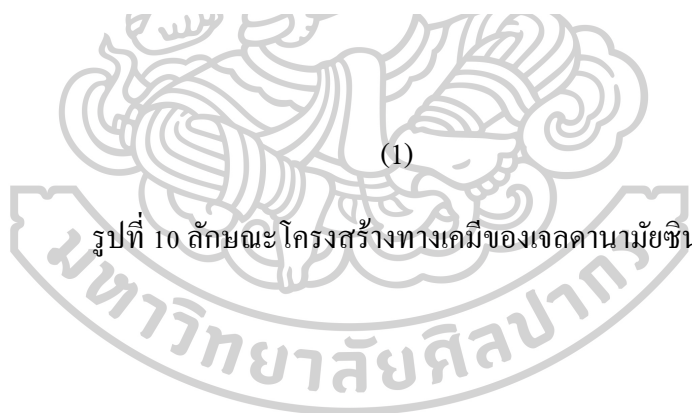
การสกัดการทำให้บริสุทธิ์ของเจลคานามัยซิน (Geldanamycin) ได้สารบริสุทธิ์เจลคานามัยซินในรูปของของแข็งสีเหลืองใน 1.15 กรัม. จาก 4.20 กรัม. ของสารสกัดหยาบ EtOAc คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 27.38% จากนั้นนำสารบริสุทธิ์เจลคานามัยซินมาวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR และ Mass spectrometry (MS) เปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้า (Qin & Panek, 2008) และใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเจลคานามัยซิน



รูปที่ 9 ลักษณะของสารเจลคานามัยซินที่ได้มาจาก *Streptomyces zerumbet* W14 สกัดมาจากสารสกัดหยาบ

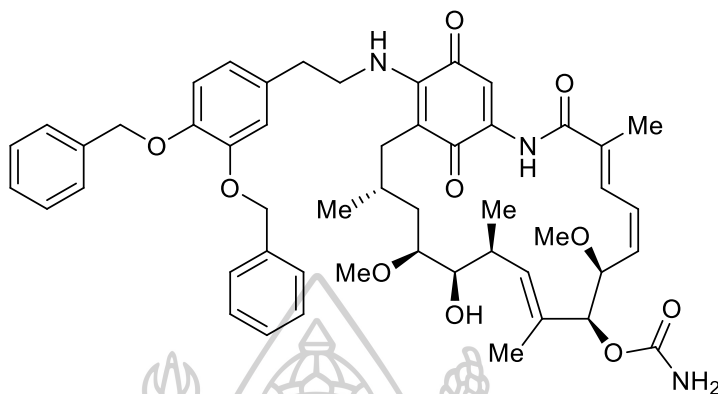


Geldanamycin (1)

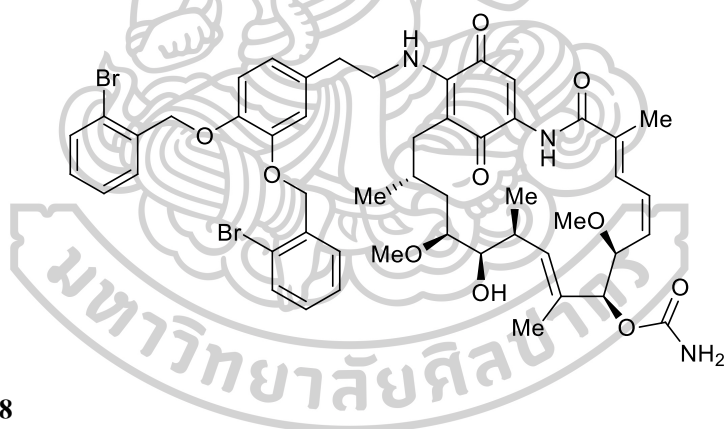


Compound 26

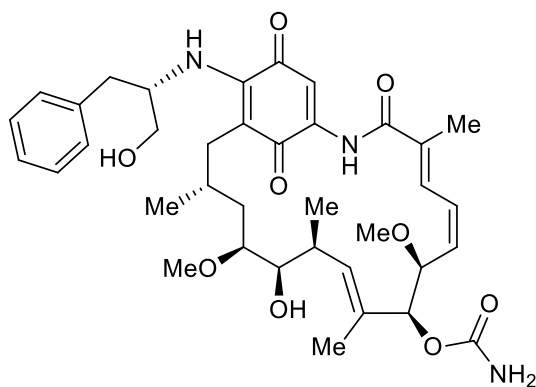
17G-Dop-3,4-OBn

**Compound 27**

17G-Dop-3,4-O2BrBn

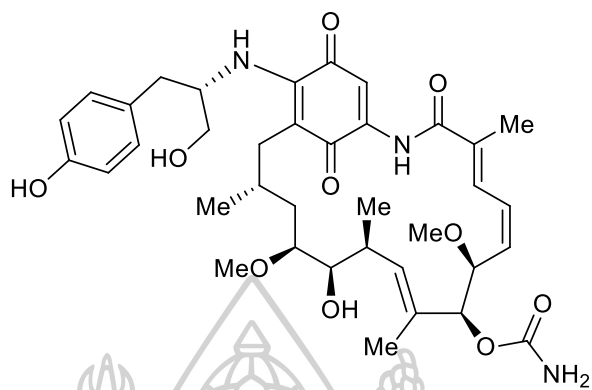
**Compound 28**

17G-Phe-OH

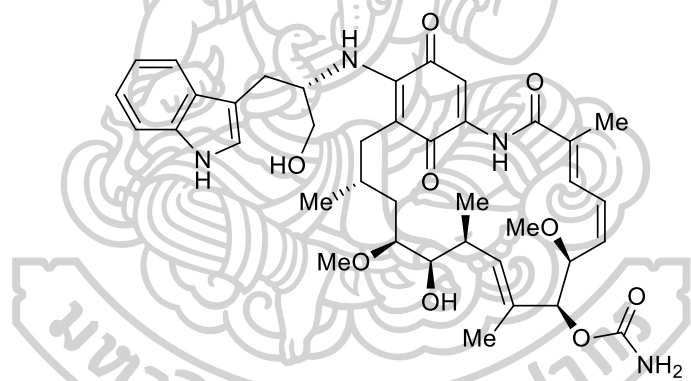


Compound 29

17G-Tyr-OH

**Compound 30**

17G-Trp-OH



รูปที่ 11 โครงสร้างอนุพันธ์ของเจลดานามัยซินทั้ง 8 ชนิด

4.4 การทดสอบคุณสมบัติการละลายน้ำ

เจลดานามัชชีและอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติการละลายน้ำ พบว่าอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่าเจลดานามัชชี ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความสามารถในการละลายน้ำของเจลดานามัชชีและอนุพันธ์ชนิดใหม่

Compounds	MW	Water solubility	Water solubility	Relative solubility
		(mg/ml) ^a	(mM) ^a	
1	560	0.085 ± 0.004	0.152 ± 0.002	1.00
23	681	3.333 ± 1.154	4.894 ± 1.695f	32.19
24	709	0.666 ± 0.577	0.940 ± 0.814d	6.18
25	793	4.333 ± 0.577	5.464 ± 0.728f	35.94
26	862	0.333 ± 0.577	0.386 ± 0.669c	2.53
27	1019	1.333 ± 0.577	1.308 ± 0.566e	8.60
28	679	1.333 ± 0.577	1.963 ± 0.850b	12.91
29	695	1.333 ± 0.577	1.918 ± 0.830b	12.62
30	718	4.000 ± 0.000	5.571 ± 0.000f	36.65

^a; The results of measurements (mean ± SD)) three experiments. ^{b, c, d, e, f}; Significant differences

($P < 0.05$).

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่มีการแทนที่เอมีนชนิดต่าง ๆ ที่ตำแหน่ง C-17 methoxy group จะเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง compounds 23, 25 และ 30 มีความสามารถในการละลายสูงกว่าเจลดานามัยซินเดิมถึง 32.19 เท่า, 35.94 เท่า และ 36.65 เท่า ตามลำดับ

4.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ

4.5.1 Anticancer activity

กิจกรรมความเป็นพิษต่อเซลล์

เจลดานามัยซิน(1)และอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยทดสอบกับเซลล์ปกติ (normal cell lines) 2 ชนิด ได้แก่ Vero cells (African green monkey kidney cell line) และ LLC-MK2 cells (Rhesus monkey kidney cell line) และทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ได้แก่ MDA-MB-231cells (human breast carcinoma cell line), Hela cells (human cervical carcinoma cell line) และ HepG2 cells (human hepatocellular carcinoma cell line) โดยวิธี MTT assay ใช้ Doxorubicin เป็น positive control และคำนวณหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% และคำนวณหาค่า Therapeutic Index (TI) ซึ่งเป็นค่าบ่งบอกดัชนีการรักษา โดยวิธีการของ Taechowisan *et al.*, (2020) ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบกิจกรรมความเป็นพิษต่อเซลล์ cancer cell lines (Hela, HepG2 และ MDA) และ normal cell (Vero และ LLC-MK2)

Compounds	IC ₅₀ (µg/mL)				
	Hela	HepG2	MDA	LLC-MK2	Vero
17G-Dop (23)	62.17	238.64	41.88	341.19	104.52
17G-Dop-3,4-OMe (24)	45.05	932.88	263.07	432.42	181.00
17G-Dop-3,4-OBu (25)	53.44	175.66	70.93	408.50	369.44
17G-Dop-3,4-OBn (26)	150.29	637.76	271.84	648.70	376.70
17G-Dop-3,4O2BrBn (27)	172.03	649.40	52.12	860.11	364.31
17G-Phe-OH (28)	45.66	616.77	96.54	339.98	94.21
17G-Tyr-OH (29)	19.36	250.81	112.96	330.58	225.46
17G-Trp-OH (30)	22.02	24.62	95.87	97.30	73.49
Geldanamycin (1)	111.59	677.49	68.98	45.61	263.42
Crude extracts	15.73	20.61	ND ^a	19.46	12.63
Doxorubicin	1.95	92.16	3.16 ^b	98.92	99.48

^a not determined.

^b IC₅₀ values of cytotoxicity against MDA-231 of Doxorubicin. (Wen, Su, Liou, Lin, & Lee, 2018)

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ต่าง ๆ พบว่าgeldanamycin (1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cells และ LLC-MK2 cells) สูง แต่เมื่อนำมาทำการสร้างเป็นอนุพันธ์ชนิดใหม่แล้วกลับมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติลดลง โดยมีพิษต่อเซลล์ปรกติดต่อเซลล์ LLC-MK2 cell น้อยลง แต่ใน Vero cell มีเพียง compound ที่ 25-27 ที่มีผลต่อเซลล์ปรกติดดีกว่าgeldanamycin(1) อย่างไรก็ตามอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นบางอนุพันธ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดีกว่าgeldanamycin

ซิน(1) เช่น ในHela cell มีความเป็นพิษเซลล์มะเร็งดีกว่าเจลคานามัยซิน(1) ยกเว้น compound ที่ 26 และ 27 ใน HepG2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดีกว่าเจลคานามัยซิน(1) ยกเว้น compound ที่ 24 และใน MDA-MB-231 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งไม่ค่อนักเมื่อเทียบกับเจลคานามัยซิน(1) ยกเว้น compound ที่ 23 และ 27 ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดีกว่าเจลคานามัยซิน(1)

นอกจากนี้ยังพบว่า อนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นบางอนุพันธ์ให้ค่า Therapeutic index (TI) ต่อเซลล์มะเร็งบางชนิดเมื่อเทียบกับ Vero cells และ LLC-MK2 cell ที่สูงกว่าเจลคานามัยซิน (1) ซึ่งหมายความว่า การนำอนุพันธ์ชนิดใหม่มาใช้ต้านเซลล์มะเร็งบางชนิดมีความปลอดภัยสูงกว่าเจลคานามัยซิน(1) อย่างไรก็ตามอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่เหล่านี้ก็ยังมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 cells และ Hela cells ไม่ดีนักเมื่อเปรียบเทียบกับ Doxorubicin แต่มี compounds 25 27 และ 30 ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง HepG2 cells ได้ และให้ผลดีกว่า Doxorubicin ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4

Therapeutic index

ตารางที่ 3 ค่า Therapeutic index on vero ของเจลคานามัยซิน (1) และอนุพันธ์ชนิดใหม่ต่อ normal cell (Vero cell)

Compound	Therapeutic index on vero		
	Hela	HepG2	MDA-MB-231
23	1.68	0.44	2.49
24	4.02	0.19	0.68
25	6.91	2.07	5.20
26	2.50	0.59	1.38
27	2.11	0.56	6.98
28	2.06	0.15	0.97
29	11.64	0.89	1.99
30	3.33	2.98	0.76
1	2.36	0.38	3.81
Doxorubicin	51.01	1.07	31.48

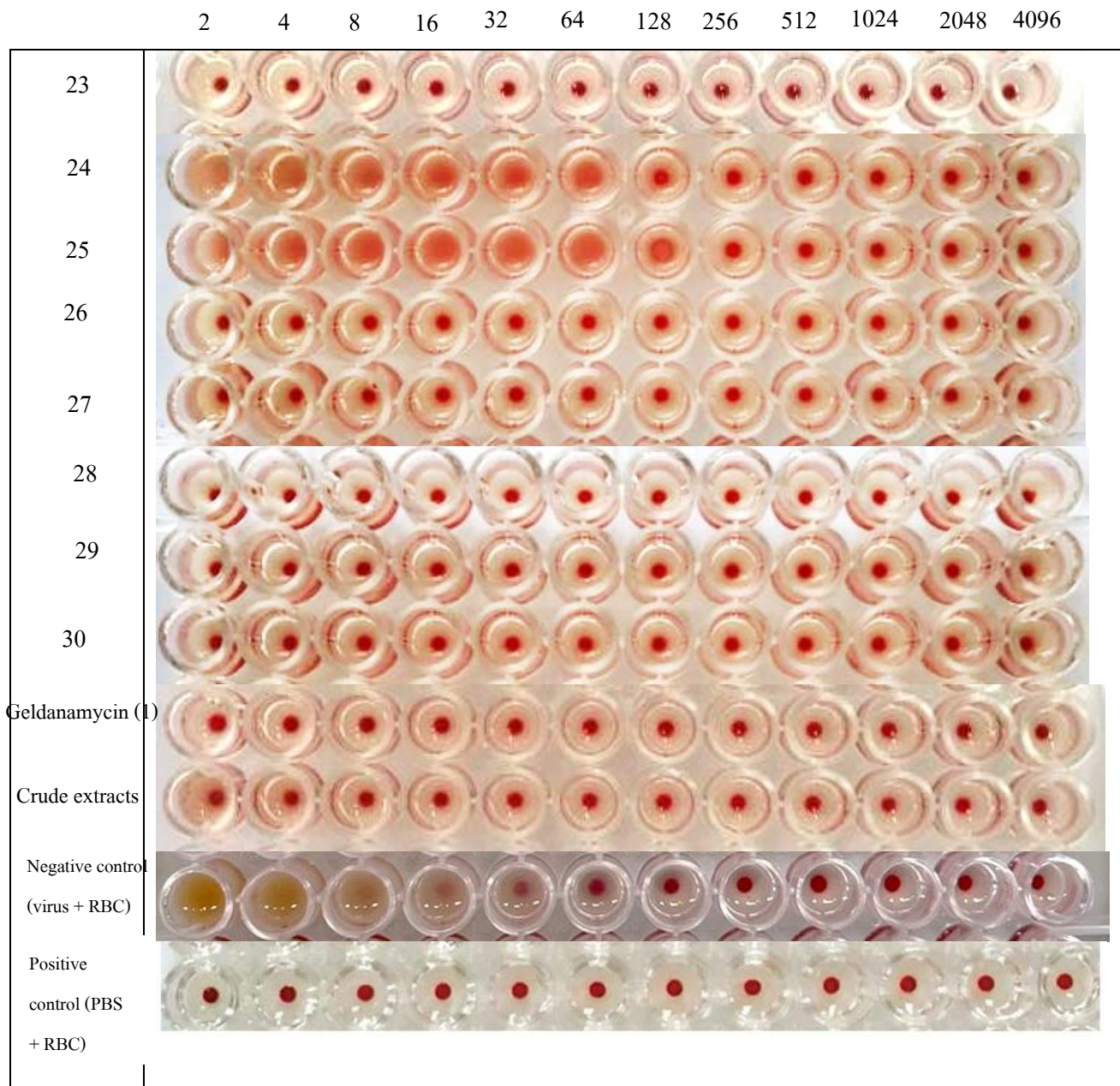
ตารางที่ 4 ค่า Therapeutic index on LLC-MK2 ของเจลดานามัยซิน (1) และอนุพันธ์ชนิดใหม่ต่อ normal cell (LLC-MK2 cell)

Compound	Therapeutic index on LLC-MK2		
	Hela	HepG2	MDA-MB-231
23	5.48	1.42	8.14
24	9.59	0.46	1.64
25	7.64	2.32	5.75
26	4.31	1.01	2.38
27	4.99	1.32	16.50
28	7.44	0.55	3.52
29	17.07	0.13	2.92
30	4.41	3.95	1.01
1	0.40	0.06	0.66
Doxorubicin	50.72	1.07	31.30

4.5.2 Antiviral

การทดสอบคุณสมบัติต้านการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส

เจลดานามัยซินและอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้ เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติต้านการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส โดยใช้เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza virus: A/free-grazing duck/Nakhon Pathom/1/2017 (H5N2) เป็นเชื้อไวรัสทดสอบ และเลือกวิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟัก และทดสอบปริมาณเชื้อไวรัสที่เพิ่มโดยวิธี Hemagglutination assay พบว่า เจลดานามัยซินและอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้ ยกเว้น compound 24 และ 25 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน influenza virus ในไข่ไก่ฟักได้ ในขณะที่การเพิ่มปริมาณไวรัสยังเกิดขึ้นตามปกติในไข่ไก่ฟักที่ไม่มีเจลดานามัยซินหรืออนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งสังเกตได้จากปฏิกิริยา Hemagglutination ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 การทดสอบการต้านไวรัส การตกของเม็ดเลือดแดงของไก่

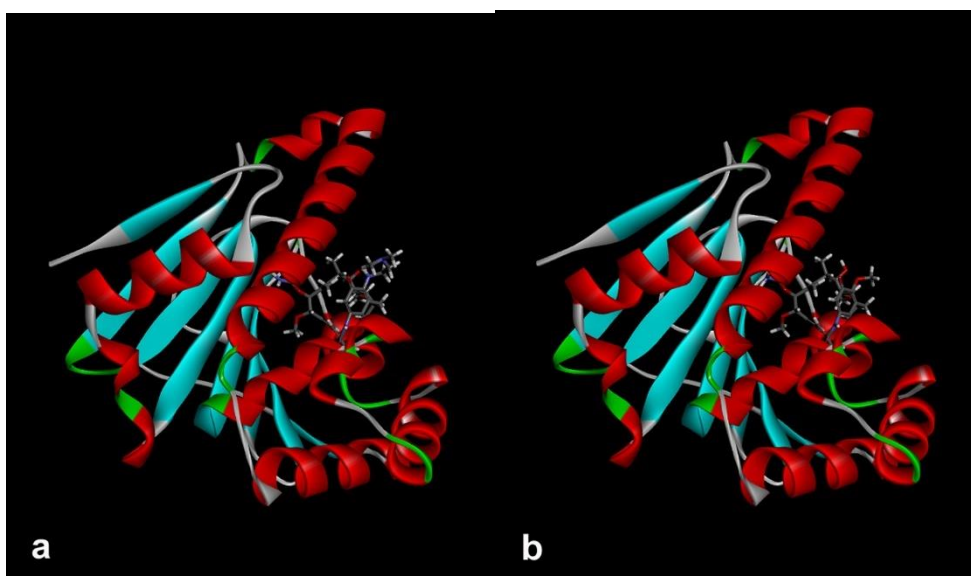
การทดสอบ Hemagglutination inhibition เป็นการทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งการเกาะติดของไวรัสกับเม็ดเลือดแดงของไก่ ซึ่งหากสารที่ทดสอบสามารถยับยั้งการเกาะติดของไวรัสได้ แสดงว่าสารทดสอบนั้นสามารถป้องกันไม่ให้ไวรัสเกาะกับ receptor เพื่อเข้าสู่เซลล์ได้นั่นเอง ในการทดสอบนี้พบว่า อนุพันธ์ชนิดใหม่ของเจลดานามัยซินที่สังเคราะห์ได้ 2 ชนิด คือ compounds 24 และ 25 ที่ระดับความเข้มข้น 1: 64 HA titre เกิดการเพิ่มจำนวนของไวรัสขึ้น

ตารางที่ 5 ค่าการทดสอบการต้านไวรัส

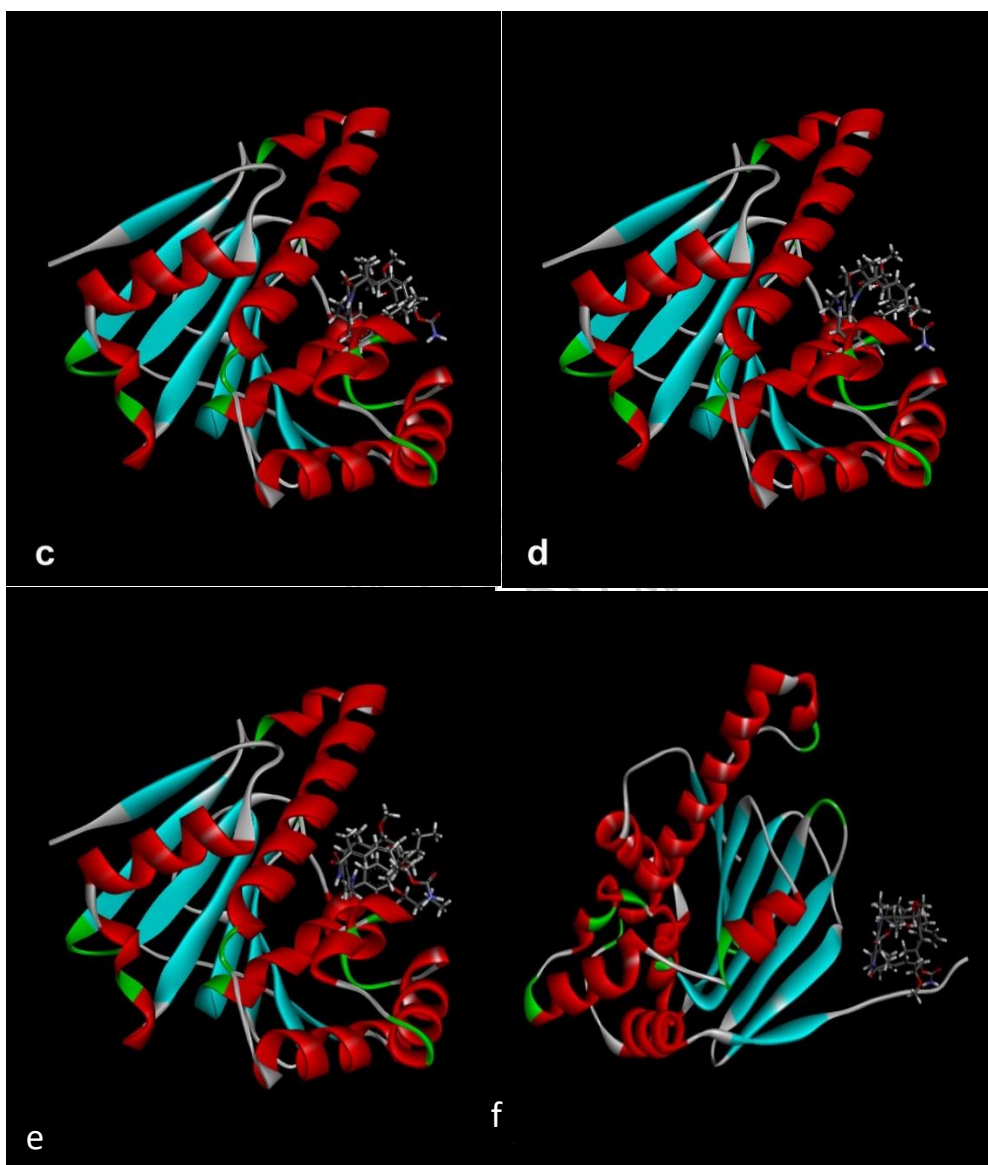
Compound	HA Titer	ความเข้มข้นของอนุภาคไวรัส (particles /ml)
17G-Dop (23)	-	-
17G-Dop-3,4-OMe (24)	64	2.56×10^{10} virus particles /ml
17G-Dop-3,4-OBu (25)	64	2.56×10^{10} virus particles /ml
17G-Dop-3,4-OBn (26)	-	-
17G-Dop-3,4-O ₂ BrBn (27)	-	-
17G-Phe-OH (28)	-	-
17G-Tyr-OH (29)	-	-
17G-Trp-OH (30)	-	-
Geldanamycin (1)	-	-
Crude extracts	-	-
Negative control (virus + RBC)	16	6.4×10^9 virus particles /ml
Positive control (PBS + RBC)	-	-

4.6 การวิเคราะห์การจับกันของสารด้วยวิธีการทำ molecular docking

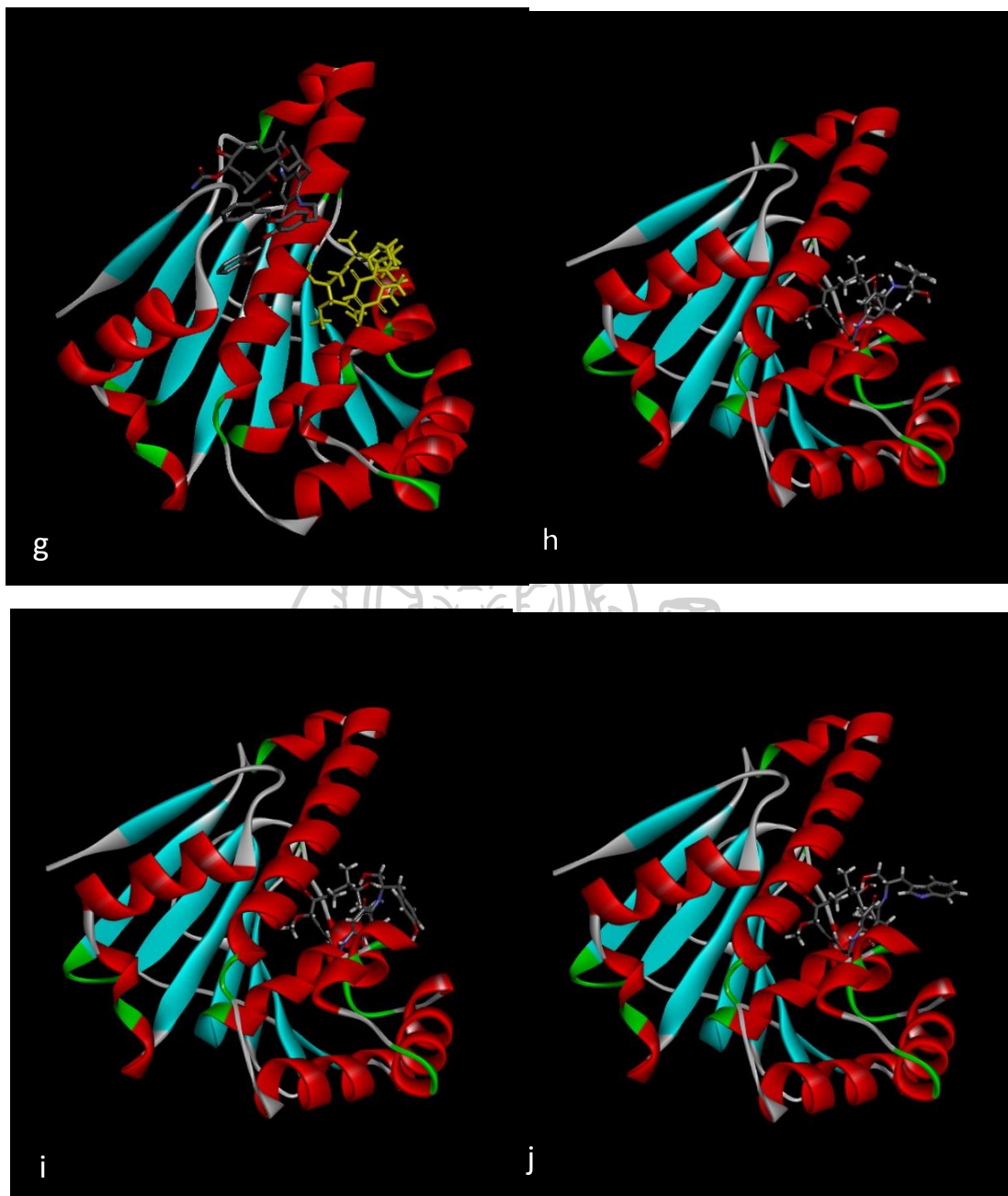
ในการศึกษา molecular docking จะใช้ Hsp90; PDB ID: 1OSF เป็นตัวแทนของ Hsp90 เพื่อทำ molecular docking กับอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับ geldanamycin และ 17-dimethylamino ethylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-DMAG) โดยใช้โปรแกรม Auto Dock Vina และ โปรแกรม UCSF Chimera v.1.14 ซึ่งได้ผลการ docking ดังรูปที่ 13 และตารางที่ 6



รูปที่ 13 ผลการทำ molecular docking ของ Hsp90 (1OSF) กับ สารทดสอบต่าง ๆ (a) 17-DMAG, (b) Geldanamycin 1, (c) compound 23, (d) compound 24, (e) compound 25, (f) compound 26, (g) compound 27 โมเลกุลสีน้ำตาลแทน geldanamycin, (h) compound 28, (i) compound 29, และ (j) compound 30, ตามลำดับ (ต่อ)



รูปที่ 13 ผลการทำ molecular docking ของ Hsp90 (1OSF) กับ สารทดสอบต่าง ๆ (a) 17-DMAG, (b) Geldanamycin 1, (c) compound 23, (d) compound 24, (e) compound 25, (f) compound 26, (g) compound 27 โมเลกุลสีน้ำตาลแทนเจลดานามัยซิน, (h) compound 28, (i) compound 29, และ (j) compound 30, ตามลำดับ (ต่อ)



รูปที่ 13 ผลการทำ molecular docking ของ Hsp90 (1OSF) กับ สารทดสอบต่าง ๆ (a) 17-DMAG, (b) Geldanamycin 1, (c) compound 23, (d) compound 24, (e) compound 25, (f) compound 26, (g) compound 27 โมเลกุลสีน้ำตาลแทนgeldanamycin, (h) compound 28, (i) compound 29, และ (j) compound 30, ตามลำดับ (ต่อ)

ตารางที่ 6 ค่า binding energy, hydrogen bonding และ docking site ของ Hsp90 (IOSF) กับสารทดสอบต่างๆ

Compounds	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal mol ⁻¹)	Conventional hydrogen bond		Docking site
		H-donors	H-acceptors	
17-DMAG ^a	-145.307	17-DMAG: H38	IOSF:ASP93:OD2	in active site
		IOSF: LYS58:HZ2	17-DMAG: O5	
		17-DMAG: H11	IOSF: ASP54:OD2	
		IOSF:ASN106:HD21	17-DMAG: O6	
		IOSF: LYS112:HZ1	17-DMAG: O9	
		IOSF: PHE138:HN	17-DMAG: O1	
		Compound 1: H38	IOSF: ASP93:OD2	
1	-141.296	IOSF: LYS58:HZ2	Compound 1: O5	in active site
		IOSF:ASN106:HD21	Compound 1: O6	
		IOSF: LYS112:HZ1	Compound 1: O9	
		IOSF: PHE138:HN	Compound 1: O1	

^a17-DMAG; 17-dimethylamino ethylamino-17-demethoxygeldanamycin.

ตารางที่ 6 ค่า binding energy, hydrogen bonding และ docking site ของ Hsp90 (1OSF) กับสารทดสอบต่างๆ

Compounds	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal mol ⁻¹)	Conventional hydrogen bond		Docking site
23	-101.67	1OSF:ASN106:HD21	Compound 2: O2	partly bound in active site
		1OSF: GLY137:HN	Compound 2: O4	
24	-102.36	1OSF: LYS58:HZ1	Compound 3: O3	partly bound in active site
		1OSF: LYS58:HZ1	Compound 3: O9	
		Compound 3: HN2	1OSF: GLY132:O	
		1OSF: GLY137:HN	Compound 3: O4	
25	-100.50	Compound 6: H40	1OSF: GLU47:OE1	partly bound in active site
		1OSF:GLY137:HN	Compound 6: O4	
26	-114.28	Compound 4: HN3	1OSF: MET12:O	outside active site
		1OSF: GLU14:HN	Compound 4: O7	

^a17-DMAG; 17-dimethylamino ethylamino-17-demethoxygeldanamycin.

ตารางที่ 6 ค่า binding energy, hydrogen bonding และ docking site ของ Hsp90 (1OSF) กับสารทดสอบต่างๆ

Compounds	$\Delta G_{\text{binding}}$	Conventional hydrogen bond		Docking site
	(kcal mol ⁻¹)			
27	-100.71	-	-	did not bind to the active site
28	-122.41	1OSF: LYS58:HZ2	Compound 8: O9	in active pocket site
		Compound 8: O1	1OSF: ASP54:OD2	
		1OSF: ASN106:HD21	Compound 8: O3	
		1OSF: LYS112:HZ2	Compound 8: O10	
		1OSF: PHE138:HN	Compound 8: O5	
		Compound 8: H38	1OSF: ASP93:OD2	

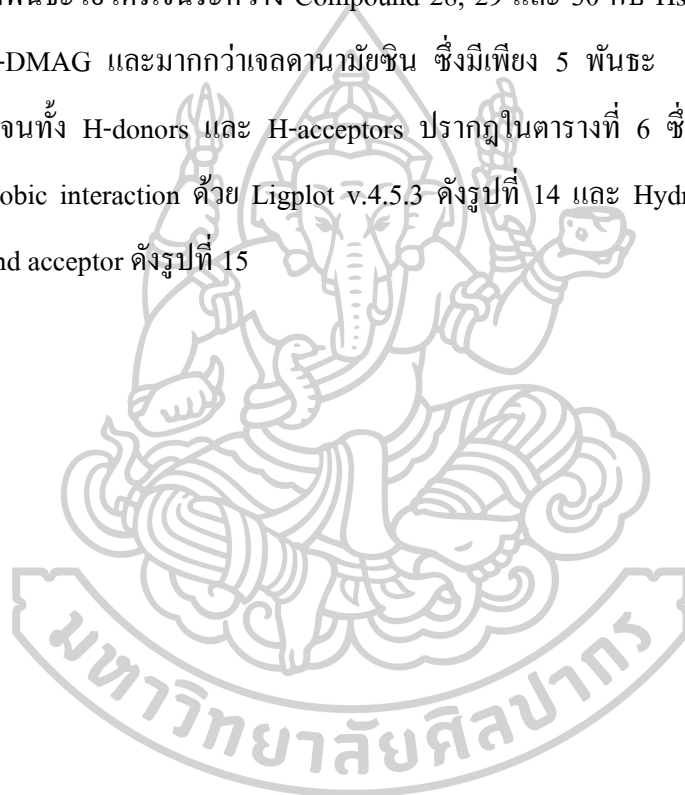
.^a17-DMAG; 17-dimethylamino ethylamino-17-demethoxygeldanamycin.

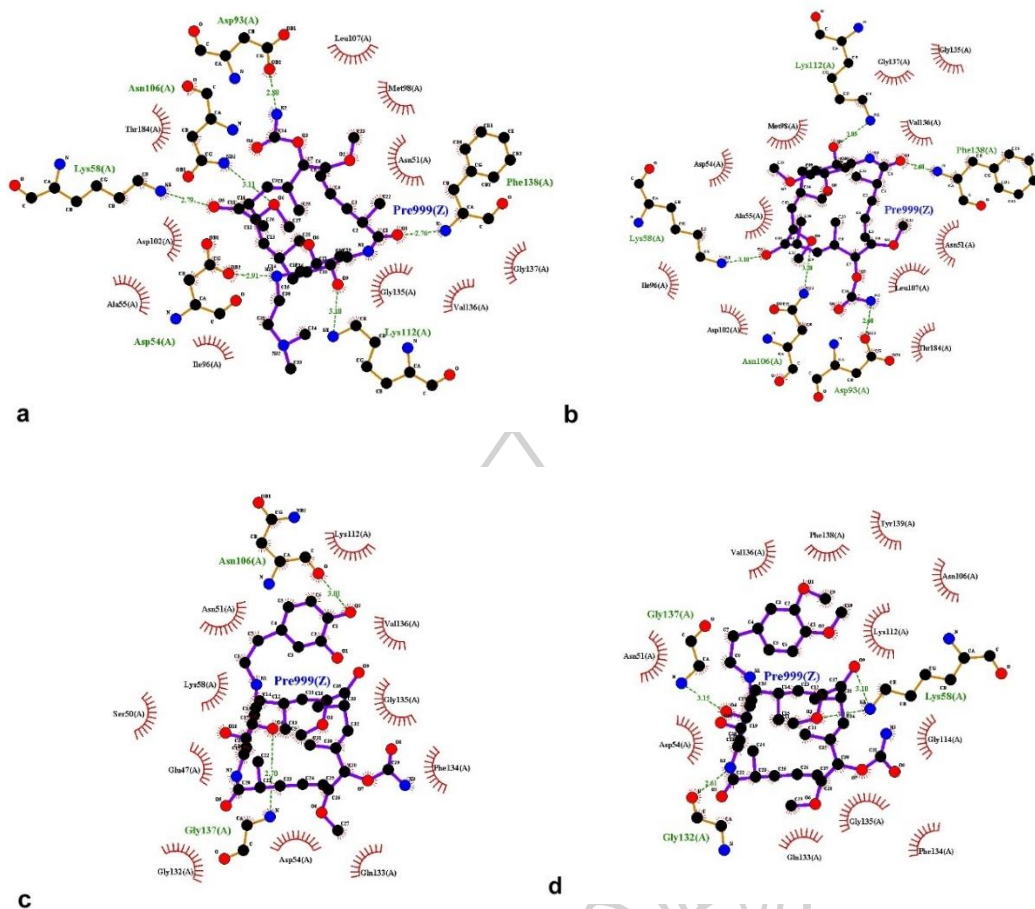
ตารางที่ 6 ค่า binding energy, hydrogen bonding และ docking site ของ Hsp90 (1OSF) กับสารทดสอบต่างๆ

$\Delta G_{\text{binding}}$		
Compounds	Conventional hydrogen bond	Docking site
(kcal mol ⁻¹)		
29	1OSF: LYS58:HZ2	Compound 9: O9
	Compound 9: O1	1OSF: ASP54:OD2
	1OSF: ASN106:HD21	Compound 9: O3
	1OSF: LYS112:HZ2	Compound 9: O10
	Compound 9: H39	1OSF: ASP93:OD2
	1OSF: GLY137:HN	Compound 9: O4
	-115.29	
30	1OSF: LYS58:HZ2	Compound 7: O9
	Compound 7: O1	1OSF: ASP54:OD2
	Compound 7: H38	1OSF: ASP93:OD2
	1OSF: ASN106:HD21	Compound 7: O2
	1OSF: LYS112:HZ2	Compound 7: O9
	1OSF: PHE138:HN	Compound 7: O4
	-98.33	

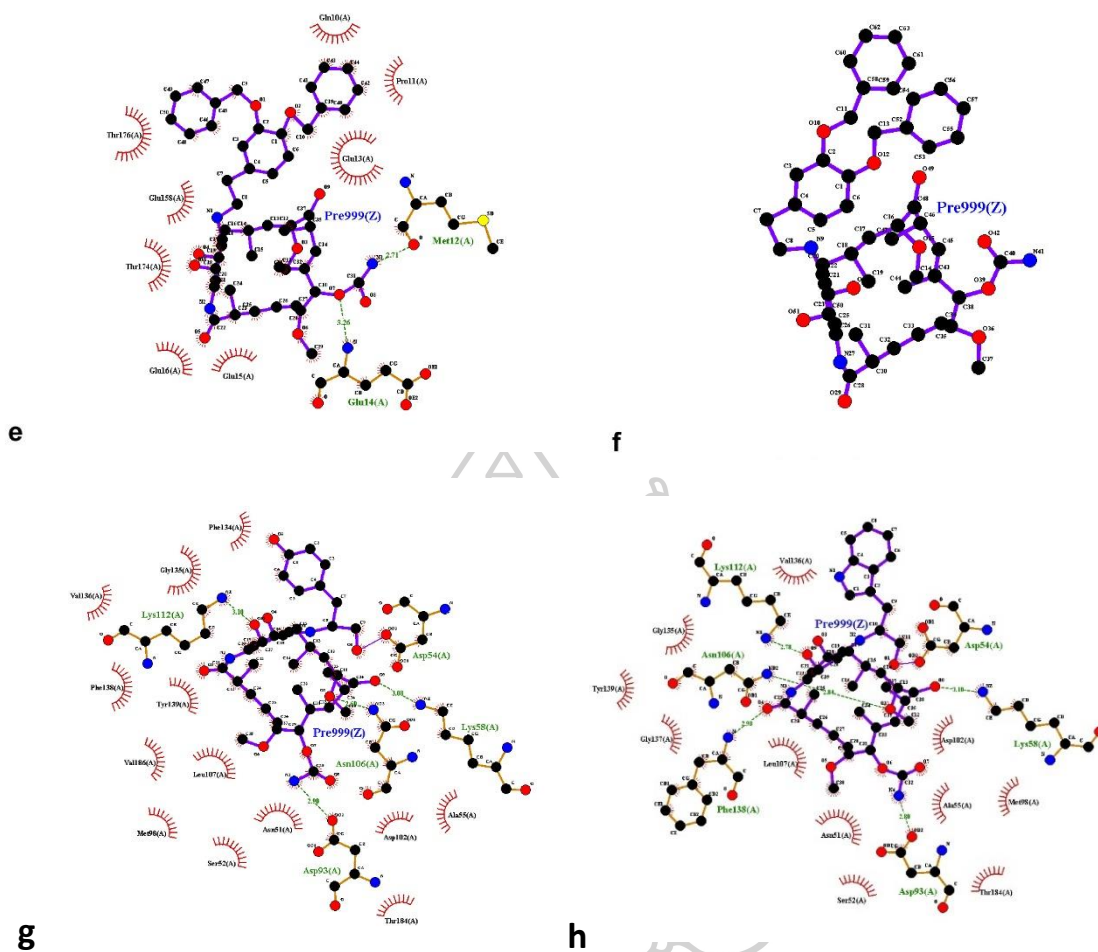
^a17-DMAG; 17-dimethylamino ethylamino-17-demethoxygeldanamycin.

จากรูปที่ 13 และ ตารางที่ 6 ผลการ docking ของเจลคานามัยซินและ 17-DMAG กับ 10SF สารทั้งสองเกิดปฏิสัมพันธ์ใน active pocket site ซึ่งเป็นบริเวณ ATP binding site ของ Hsp90 ขณะที่ Compound 23, 24 และ 25 มีปฏิสัมพันธ์เป็นบางส่วนกับ active pocket site ส่วน Compound 26 มีปฏิสัมพันธ์ด้านนอกของ active pocket site และ Compound 27 มี mechanism อื่น ๆ ที่สามารถไป interaction กับ Hsp90 ได้ ขณะที่ Compound 28, 29 และ 30 เกิดปฏิสัมพันธ์ใน active pocket site คล้ายกับเจลคานามัยซินและ 17-DMAG แต่มีค่า binding free energy (ΔG) ที่สูงกว่า อย่างไรก็ตาม การสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Compound 28, 29 และ 30 กับ Hsp90 มีจำนวน 6 พันธะ ซึ่งเท่ากับ 17-DMAG และมากกว่าเจลคานามัยซิน ซึ่งมีเพียง 5 พันธะ ซึ่งรายละเอียดการสร้างพันธะไฮโดรเจนทั้ง H-donors และ H-acceptors ปรากฏในตารางที่ 6 ซึ่งแสดงพันธะไฮโดรเจน และ hydrophobic interaction ด้วย Ligplot v.4.5.3 ดังรูปที่ 14 และ Hydrogen bond donor และ Hydrogen bond acceptor ดังรูปที่ 15

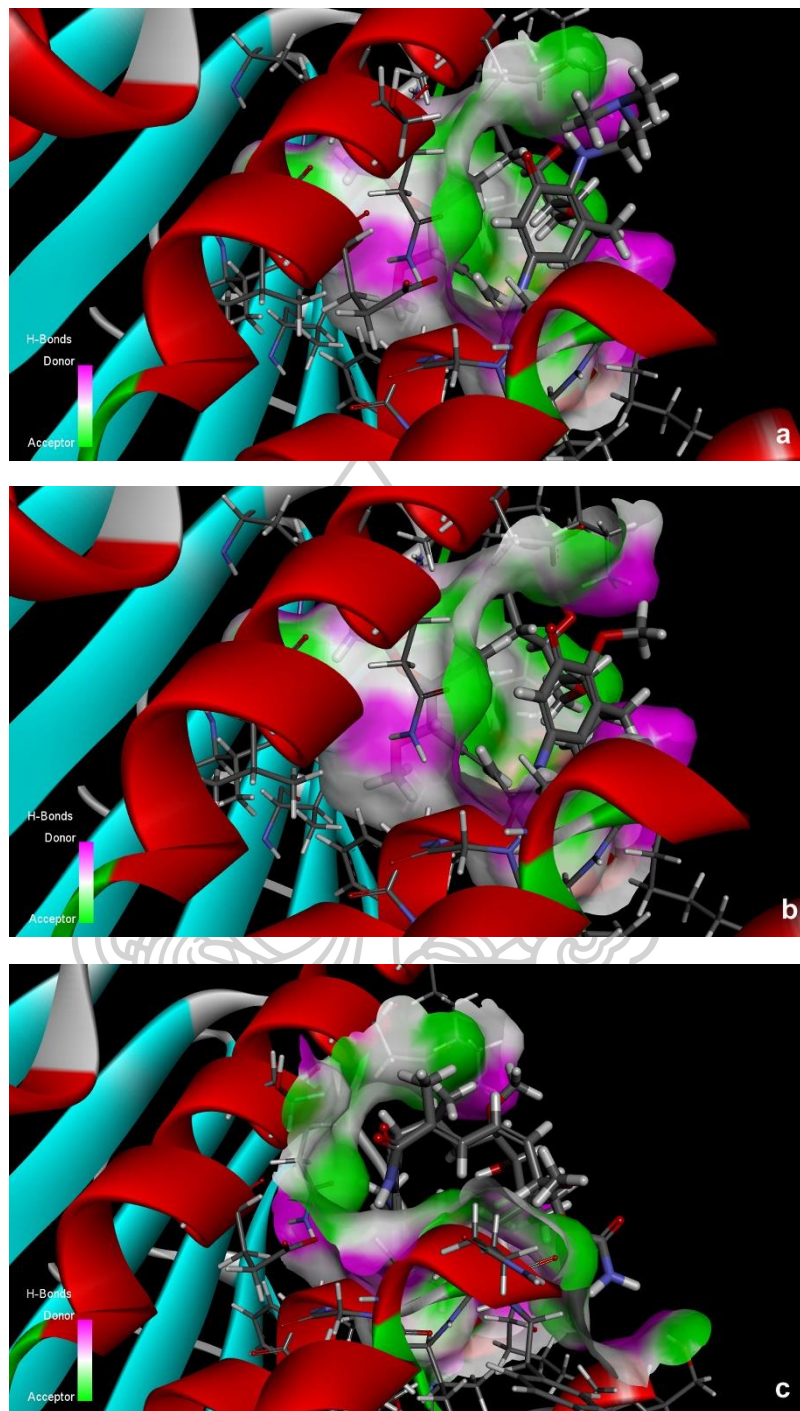




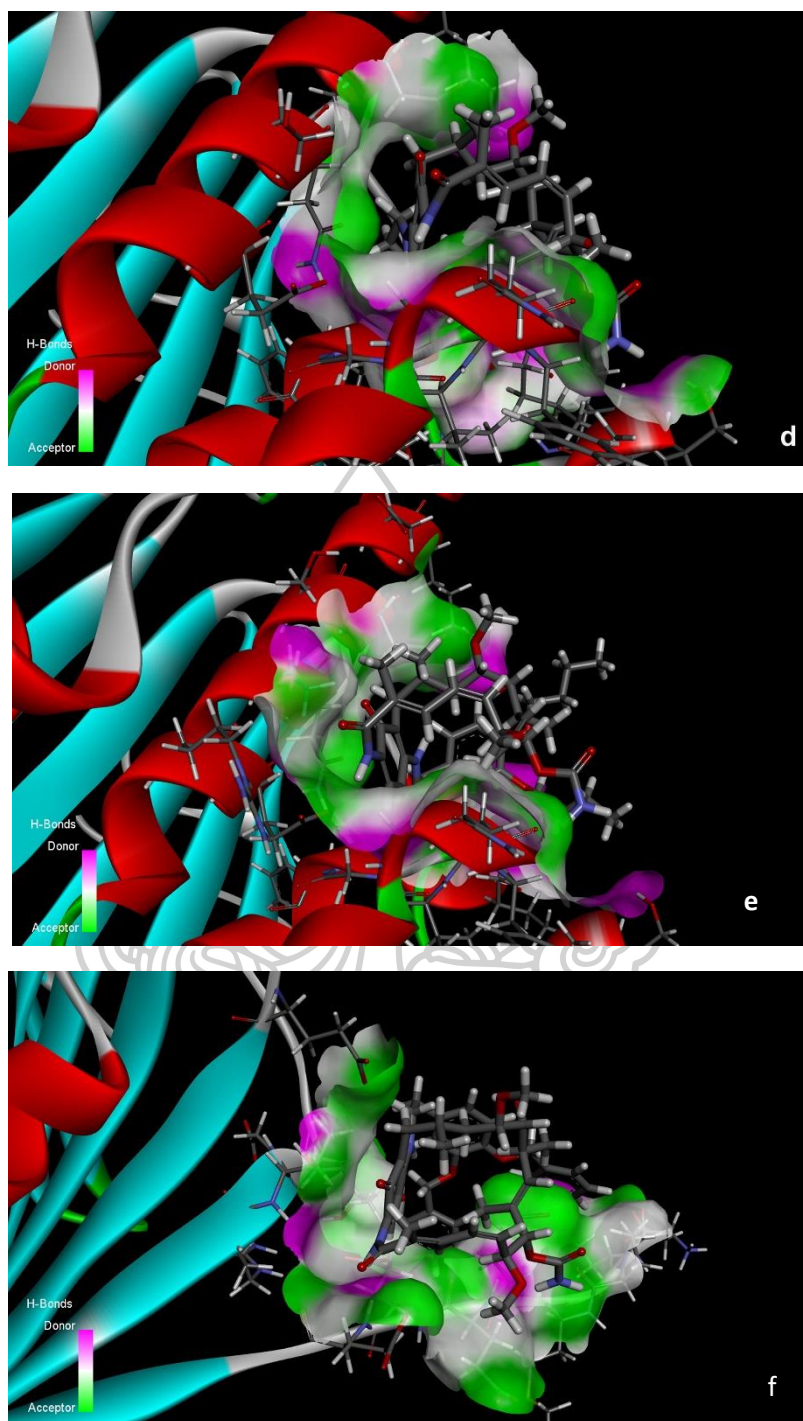
รูปที่ 13 ปฏิสัมพันธ์ของสารทดสอบกับ Hsp90 แสดงด้วยโปรแกรม Ligplot v.4.5.3 โดยพันธะไฮโดรเจนแสดงด้วยเส้นปะสีเขียว และ hydrophobic interaction แสดงด้วยเส้นโค้งสีแดงที่มีเส้นขน (a) 17-DMAG, (b) Compound 1, (c) Compound 23, (d) Compound 24, (e) Compound 26, (f) Compound 27, (g) Compound 29 และ (h) Compound 30, ตามลำดับ



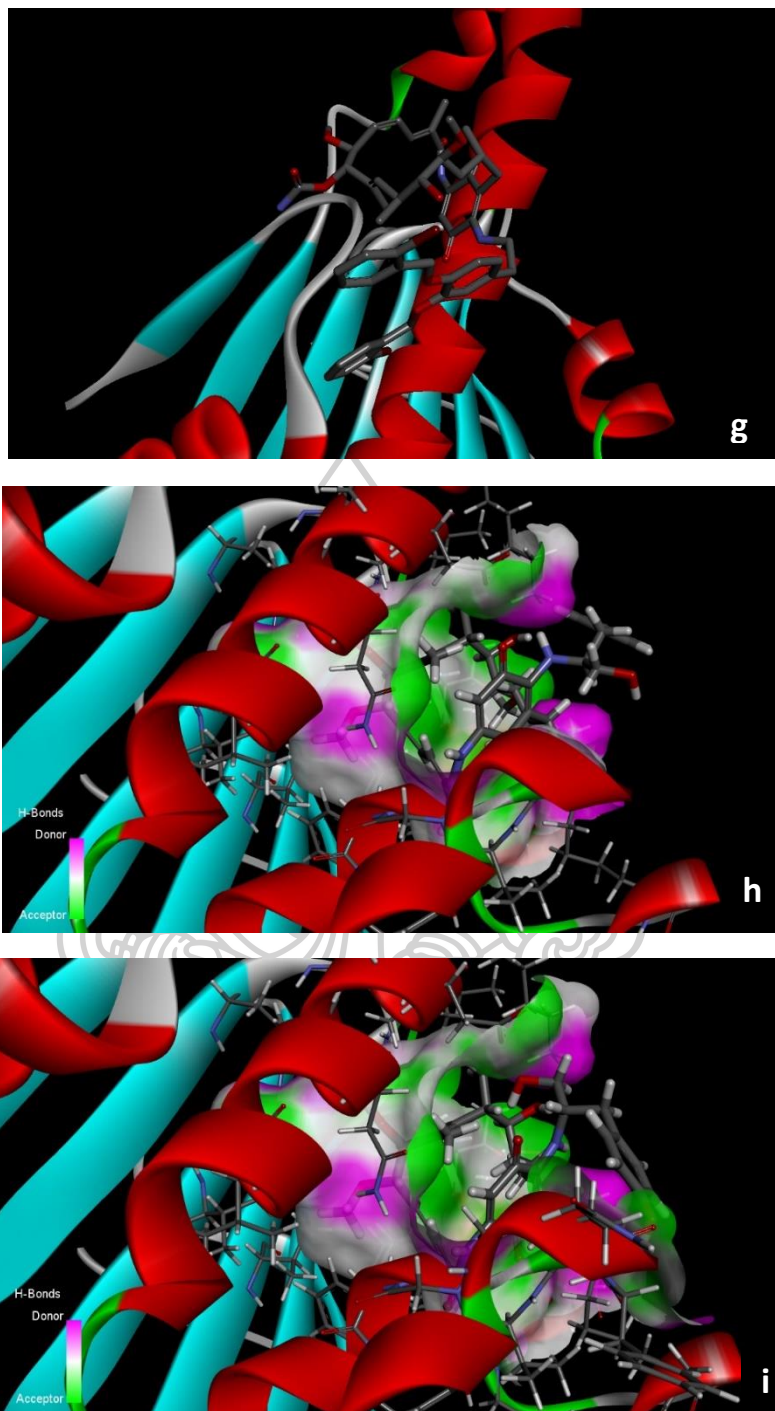
รูปที่ 14 ปฏิสัมพันธ์ของสารทดสอบกับ Hsp90 แสดงด้วยโปรแกรม Ligplot v.4.5.3 โดยพันธะไฮโดรเจนแสดงด้วยเส้นปะสีเขียว และ hydrophobic interaction แสดงด้วยเส้นโค้งสีแดงที่มีเส้นขน (a) 17-DMAG, (b) Compound 1, (c) Compound 23, (d) Compound 24, (e) Compound 26, (f) Compound 27, (g) Compound 29 และ (h) Compound 30, ตามลำดับ (ต่อ)



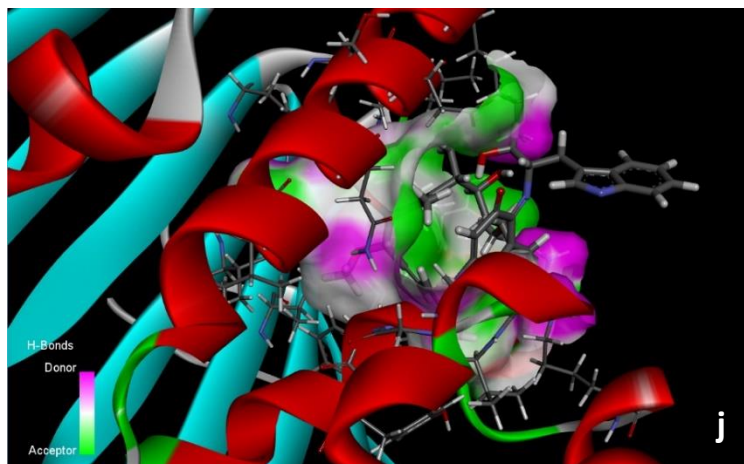
รูปที่ 14 ปฏิสัมพันธ์ของสารทดสอบกับ Hsp90 ด้วยโปรแกรม BIOVIA Discovery studio v.3.5 แสดง Hydrogen bond donor สีชมพู และ Hydrogen bond acceptor สีเขียวของพื้นผิวของ โมเลกุล Hsp90 (a)17-DMAG, (b) Geldanamycin 1, (c) Compound 23, (d) Compound 24, (e) Compound 25, (f) Compound 26, (g) Compound 27, (h) Compound 28, (i) Compound 29 และ (j) Compound 30 ตามลำดับ



รูปที่ 15 ปฏิสัมพันธ์ของสารทดสอบกับ Hsp90 ด้วยโปรแกรม BIOVIA Discovery studio v.3.5 แสดง Hydrogen bond donor สีชมพู และ Hydrogen bond acceptor สีเขียวของพื้นผิวของ โมเลกุล Hsp90 (a)17-DMAG, (b) Geldanamycin 1, (c) Compound 23, (d) Compound 24, (e) Compound 25, (f) Compound 26, (g) Compound 27, (h) Compound 28, (i) Compound 29 และ (j) Compound 30 ตามลำดับ (ต่อ)



รูปที่ 15 ปฏิสัมพันธ์ของสารทดสอบกับ Hsp90 ด้วยโปรแกรม BIOVIA Discovery studio v.3.5 แสดง Hydrogen bond donor สีชมพู และ Hydrogen bond acceptor สีเขียวของพื้นผิวของ โมเลกุล Hsp90 (a)17-DMAG, (b) Geldanamycin 1, (c) Compound 23, (d) Compound 24, (e) Compound 25, (f) Compound 26, (g) Compound 27, (h) Compound 28, (i) Compound 29 และ (j) Compound 30 ตามลำดับ (ต่อ)



รูปที่ 15 ปฏิสัมพันธ์ของสารทดสอบกับ Hsp90 ด้วยโปรแกรม BIOVIA Discovery studio v.3.5 แสดง Hydrogen bond donor สีชมพู และ Hydrogen bond acceptor สีเขียวของพื้นผิวของ โมเลกุล Hsp90 (a)17-DMAG, (b) Geldanamycin 1, (c) Compound 23, (d) Compound 24, (e) Compound 25, (f) Compound 26, (g) Compound 27, (h) Compound 28, (i) Compound 29 และ (j) Compound 30 ตามลำดับ (ต่อ)

จากรูปที่ 14 ผลการ docking ระหว่าง 17-DMAG กับ Hsp90 พบว่าเกิดพันธะไฮโดรเจน 6 พันธะกับกรดอะมิโน Asp54, Lys58, Asp93, Asn106, Lys112 และ Phe138 บริเวณ N-terminal domain pocket ของ 1OSF โดยมีค่า binding energy -145.307 kcal/mol ขณะที่geldanamycin เกิดพันธะไฮโดรเจน 5 พันธะกับกรดอะมิโน Lys58, Asp93, Asn106, Lys112 และ Phe138 บริเวณ N-terminal domain pocket ของ 1OSF โดยมีค่า binding energy -141.296 kcal/mol ส่วน compound 23 เกิดพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะกับกรดอะมิโน Asn106 และ Gly137 บริเวณบางส่วนของ N-terminal domain pocket ของ 1OSF โดยมีค่า binding energy -101.67 kcal/mol ส่วน compound 24 เกิดพันธะไฮโดรเจน 4 พันธะกับกรดอะมิโน Lys58 (2 ตำแหน่ง), Gly132 และ Gly137 บริเวณบางส่วนของ N-terminal domain pocket ของ 1OSF โดยมีค่า binding energy -102.36 kcal/mol ส่วน compound 25 เกิดพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะกับกรดอะมิโน Glu47 และ Gly137 บริเวณบางส่วนของ N-terminal domain pocket ของ 1OSF โดยมีค่า binding energy -100.50 kcal/mol ส่วน compound 26 เกิดพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะกับกรดอะมิโน Met12 และ Glu14 บริเวณ N-terminal ซึ่งไม่อยู่ในส่วนของ N-terminal domain pocket ของ 1OSF โดยมีค่า binding energy -114.28

kcal/mol ส่วน compound 27 ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจนใด ๆ กับโมเลกุลของ 1OSF ส่วน compound 28 เกิดพันธะไฮโดรเจน 6 พันธะกับกรดอะมิโน Asp54, Lys58, Asp93, Asn106, Lys112 และ Phe138 บริเวณ N-terminal domain pocket ของ 1OSF โดยมีค่า binding energy -122.41 kcal/mol ส่วน compound 29 เกิดพันธะไฮโดรเจน 6 พันธะกับกรดอะมิโน Asp54, Lys58, Asp93, Asn106, Lys112 และ Gly137 บริเวณ N-terminal domain pocket ของ 1OSF โดยมีค่า binding energy -115.29 kcal/mol compound 30 เกิดพันธะไฮโดรเจน 6 พันธะกับกรดอะมิโน Asp54, Lys58, Asp93, Asn106, Lys112 และ Phe138 บริเวณ N-terminal domain pocket ของ 1OSF โดยมีค่า binding energy -98.33 kcal/mol

ผลการ docking นอกจากจะเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนแล้ว ยังเกิด hydrophobic interaction กับกรดอะมิโนอื่น ๆ ของ Hsp90 อีกด้วย ซึ่ง hydrophobic interaction จะมีลักษณะที่คล้ายกัน ในบริเวณที่ใกล้เคียงกัน และจำนวนกรดอะมิโนที่เกิด hydrophobic interaction มีประมาณ 10-13 กรดอะมิโน ยกเว้น compound 26 ที่เกิดการ docking นอกบริเวณ N-terminal domain pocket (แต่อยู่บริเวณ N-terminal) ของ 1OSF ที่มี hydrophobic interaction ที่แตกต่างออกไป

จากรูปที่ 14 แสดง surface interaction ระหว่างสารที่ทดสอบกับ Hsp90 โดยบริเวณสีเขียว หมายถึง hydrogen bond acceptor และบริเวณสีชมพู หมายถึง hydrogen bond donor พบว่า surface interaction ของ 1OSF ที่ docking กับ สารทดสอบ (ยกเว้น compound 26) มีทั้ง hydrogen bond acceptor และ hydrogen bond donor ขณะที่ surface interaction ของ 1OSF ที่ docking กับ compound 26 ส่วนใหญ่เป็นแบบ hydrogen bond acceptor

4.7 การทำนายคุณสมบัติ ADMET ของ geldanamycin และอนุพันธ์

ADMET คือ Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion และ Toxicity ซึ่งสามารถทำนายได้จากโครงสร้างโมเลกุล ในการศึกษาที่ใช้โปรแกรม SwissADME (<http://swissadme.ch>) และ Pre-ADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr>) เพื่อทำนายคุณสมบัติ ADMET ของสารทดสอบ ได้ผลดังตารางที่ 6 ซึ่งพบว่า ค่า topological polar surface area (TPSA) ของgeldanamycin และอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นมีค่ามากกว่า 140 แสดงว่าสารเหล่านี้มีความเป็นขั้วสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Compounds 23 และ 30 ซึ่งมีค่า TPSA 206.74 และ 202.30 ตามลำดับ ค่าการทำนาย lipophilicity พบว่าสารส่วนใหญ่ (ยกเว้น Compounds 26 และ 27 มีค่า $\text{Log } P_{o/w} \leq 5$ หมายความว่า สารเหล่านี้ถูกดูดซึมได้เป็นอย่างดี) ซึ่งค่า $\text{Log } P_{o/w}$ สอดคล้องกับ Caco-2 permeability, human intestinal absorption (HIA), skin permeability, P-glycoprotein substrate และ P-glycoprotein inhibitor ซึ่งใช้พิจารณาความสามารถในการถูกดูดซึมของสาร ถ้าค่าการทำนายของ Caco-2 permeability ≥ 0.90 หมายความว่า สารนั้นสามารถดูดซึมเข้าสู่ Caucasian colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) ได้ง่าย ซึ่งจากการทำนายพบว่าสารทุกตัวสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ Caco-2 ได้ดี ค่าการทำนาย Human intestinal absorption (HIA) หากน้อยกว่า 30% หมายความว่า สารนั้นถูกดูดซึมไม่ดี ซึ่งจากการทำนายพบว่า ค่า HIA ของสารทุกตัวมีค่าสูงกว่า 30% นั่นคือ สารทุกตัวถูกดูดซึมได้ดี ค่าการทำนาย skin permeability ซึ่งหากค่า $\text{log } Kp > -2.5$ หมายความว่า สารนั้นสามารถดูดซึมผ่านชั้นผิวหนังได้ดี

Properties ^a	Compounds									
	1	23	24	25	26	27	28	29	30	
CYP1A2 inhibitor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP2C19 inhibitor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP2C9 inhibitor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP2D6 inhibitor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP3A4 inhibitor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Excretion										
Renal OCT2 substrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toxicity										
AMES toxicity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hERG inhibitor	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+
Hepatotoxicity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Skin sensitization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a: ADMET, absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity; AMES, *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay; Caco2, Caucasian colon adenocarcinoma cell line; BBB, blood-brain barrier; BB, blood-brain; hERG, human ether-a-go-go related gene; Kp, skin permeability constant; OCT2, organic cation transporter 2; TPSA, topological polar surface area.

ค่า $\log K_p$ ของสารทุกตัวมีค่าสูงกว่า -2.5 นั่นคือ สารทุกตัวถูกดูดซึมผ่านชั้นผิวหนังได้ดี จากการทำนาย พบว่าสารทุกตัวสามารถถูกขับออกนอกเซลล์ได้ด้วย P-glycoprotein อย่างไรก็ตาม สารส่วนใหญ่ไม่ยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ยกเว้น Compounds 25, 26 และ 27 ส่วนค่า blood-brain barrier membrane permeability ($\log BB$) การกระจายของสารจากเลือดผ่านตัวกั้นเข้าสู่สมอง ซึ่งหากค่า $\log BB > 0.3$ หมายความว่า สารนั้นสามารถผ่านตัวกั้นเข้าสู่สมองได้ง่าย หากค่า $\log BB < -1$ หมายความว่า สารนั้นสามารถผ่านตัวกั้นเข้าสู่สมองได้ยาก จากการทำนายพบว่า สาร

ส่วนใหญ่สามารถผ่านตัวกั้นเข้าสู่สมองได้ปานกลาง ขณะที่ Compounds 25 และ 27 สามารถผ่านตัวกั้นเข้าสู่สมองได้ง่าย จึงอาจเป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxicity) การทำนายค่า Cytochrome P450s ซึ่ง Cytochrome P450s เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ drug metabolism ในตัว Cytochrome P450s แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ CYP2D6 และ CYP3A4 จากการทำนายพบว่าสารทุกตัวเป็น substrate ของ CYP3A4 แต่ไม่เป็น substrate ของ CYP2D6 นอกจากนี้สารทุกตัวยังถูกทำว่าเป็น CYP3A4 inhibitor อีกด้วย หมายความว่าสารทุกตัวถูก metabolism ในตัว ดังนั้นสารเหล่านี้จึงอาจเป็นพิษต่อตับ (Hepatotoxicity ให้ผลลบ) ไม่ถูกขับออกทางปัสสาวะ (ค่า Renal OCT2 substrate ให้ผลลบ) และไม่ทำให้เกิดอาการภูมิแพ้ที่ผิวหนัง (Skin sensitization ให้ผลลบ) การทำนาย AMES test ของสารพบว่า สารทุกตัวไม่เป็นสารที่ทำให้เกิดการผ่าเหล่า (non-mutagen) โดยวิธี *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay นอกจากนี้ ยังพบว่าสารเหล่านี้ ยังสามารถยับยั้ง การแสดงออกของ human ether-a-go-go related gene (hERG inhibitor) จึงอาจเป็นพิษต่อหัวใจ (cardiotoxicity)

ดังนั้น ค่าการทำนายคุณสมบัติทาง ADMET ของเจลดานามัยซินและอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยการอาศัยโครงสร้างเคมี พบว่า สารเหล่านี้เป็น cytochrome substrate, cytochrome inhibitor และ hERG inhibitor สารเหล่านี้จึงอาจทำให้เกิด hepatotoxicity และ cardiotoxicity ได้ตามลำดับ นอกจากนี้ สารบางตัว เช่น Compounds 25 และ 27 ยังสามารถผ่าน blood-brain barrier ได้ ซึ่งอาจทำให้เกิด neurotoxicity อีกด้วย

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการนำเชื้อนำเชื้อแอกติโนมัยสียสายพันธุ์ W14 มาเลี้ยงบนอาหาร ISP-2 เพื่อเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 14 วันหรือจนกว่าเชื้อจะมีการสร้างสปอร์ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1 * 1 cm แล้วนำมาแช่ด้วยเอทิลอะซิเตต แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน มีลักษณะเป็นของแข็งหนืดสีน้ำตาลเข้ม น้ำหนัก 4.20 กรัม ซึ่งได้รับเชื้อแอกติโนมัยสียมาจาก Taechowisan et al. (2019a) มีการแยก endophytic actinomycetes จาก *Zingiber zerumbet* (L.) ซึ่งได้สายพันธุ์ใหม่ คือ *Streptomyces zerumbet* W14 สารประกอบบริสุทธิ์ได้รับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเกี่ยวกับคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการอักเสบ จากข้อมูลสเปกตรัมพบว่า สารประกอบที่ได้คือ เจลดานามัยซินการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ของเจลดานามัยซิน (Geldanamycin) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ของแข็งสีเหลืองปริมาณ 1.15 กรัม (27%) จากสารสกัดเอทิลอะซิเตต ของแข็งสีเหลืองถูกนำมาวิเคราะห์โดย NMR ซึ่งถูกระบุว่าเป็นเจลดานามัยซิน (Geldanamycin)

ถึงแม้ว่าเจลดานามัยซินจะมีฤทธิ์ที่น่าสนใจในการต้านมะเร็ง ด้านเชื้อแบคทีเรียแต่เนื่องจาก เจลดานามัยซินมีความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำและความเป็นพิษที่สูง จึงมีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ เจลดานามัยซินใหม่ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีขึ้น เช่น DHQ3 และ 17-demethoxy-reblastatin (17-DR) ซึ่งเป็นแอนะล็อกของ เจลดานามัยซิน ได้มาจากการดัดแปลงเป็นโครงสร้าง phenolic ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับโครงสร้างเบนโซควิโนนเดิม (Zhang et al., 2016) (Taechowisan et al., 2020) ได้มีการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเจลดานามัยซิน ที่แยกได้จาก *Streptomyces zerumbet* W14 และใช้เป็นสารตั้งต้น ในการสังเคราะห์เจลดานามัยซิน ใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ 17-(tryptamine) -17-demethoxygeldanamycin และ 17-(5'-methoxytryptamine) - 17-demethoxygeldanamycin เป้าหมายที่สำคัญในการเปลี่ยนหมู่ คือ ตำแหน่ง C -17 ของเจลดานามัยซิน จากการศึกษาพบว่า หมู่เมทอกซี (-OMe) ในตำแหน่งที่ 17 ของโครงสร้างเจลดานามัยซิน ถูกแทนที่ด้วยเอมีน 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอะมิโนแอลกอฮอล์ (20,21 และ 22) และกลุ่มโคปามีน (4) และอนุพันธ์ (10-13) สารประกอบทริปโตเฟนอล (20) ฟินิลอะลานีนอล (21) และไทโรซีนอล (22) ถูกสังเคราะห์จากทริปโตเฟน (14) ฟินิลอะลานีน (16) และไทโรซีน (18) ตามลำดับ กรดอะมิโนเหล่านี้ถูกแปลงเป็น เมทิลเอสเทอร์ตามด้วยการรีดิวิชั่นหมู่เอสเทอร์ให้เป็นแอลกอฮอล์จึงได้อะมิโนแอลกอฮอล์ 20-

22 และส่วนการสังเคราะห์อนุพันธ์โคปามีน 4 และ 10-13 ถูกสังเคราะห์ขึ้นผ่านการป้องกันอะตอมไนโตรเจนของเอมีนปฐมภูมิด้วย Boc₂O ตามด้วยปฏิกิริยา O-alkylation ด้วยหมู่เมทิล, บิวทิล, เบนซิล, และ 2-โบโรโมเบนซิล และกำจัดหมู่ป้องกัน Boc ออก จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับเจลดานามัยซิน (1) หมู่เมทิลที่ตำแหน่ง C-17 ถูกแทนที่ด้วยเอมีนทั้ง 2 กลุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเจลดานามัยซิน คือ 17G-Dop (23), 17G-Dop-3,4-OMe(24) ,17G-Dop-3,4-OBu(25) ,17G-Dop-3,4-OBn(26) ,17G-Dop-3,4O2BrBn(27) ,17G-Phe-OH(28), 17G-Tyr-OH(29), และ 17G-Trp-OH(30) ซึ่งเป็นของแข็งสีม่วง

จากการศึกษาของ(Hermene et al., 2019) การสังเคราะห์ของ เจลดานามัยซินเป็นการสังเคราะห์แบบ semi-synthesis เป็นการเปลี่ยนหมู่ หรือเลียนแบบสารทางธรรมชาติเพื่อที่เข้ามาจับในตำแหน่งของ เจลดานามัยซิน เพื่อที่จะทำให้ลดการเป็นพิษต่อตับและค่าการละลายน้ำดีขึ้น ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น เจลดานามัยซิน ที่มีหมู่เบนโซควิโนน ยังไม่ได้เป็นที่ยอมรับในการเป็นยาต้านมะเร็ง เนื่องจากแสดงผลข้างเคียงที่เป็นพิษต่อตับส่วนหนึ่งเป็นเพราะคุณสมบัติของ Michael-acceptor ที่มีต่อ thiol จากการศึกษาพบว่าอนุพันธ์ของเจลดานามัยซินชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่าเจลดานามัยซิน 2.53 – 36.65 เท่า

เนื่องจากเกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่พัฒนาขึ้นในแบคทีเรียก่อโรคและการเพิ่มจำนวนของโรคและเชื้อโรคใหม่ ๆ ในปัจจุบัน เช่น กลุ่มอาการภูมิคุ้มกันบกพร่องโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงและไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 (Bérdy, 2005) จากการศึกษาการประเมินทดสอบการต้านไวรัสของอนุพันธ์เจลดานามัยซิน compound ที่ 23-30 พบว่าสารประกอบที่ 24 เกิด end point hemagglutination ที่ 1:64 มี virus 2.56×10^{10} hemagglutination virus particles per ml. และ สารประกอบที่ 25 เกิด end point hemagglutination ที่ 1:64 มี virus 2.56×10^{10} hemagglutination virus particles per ml.

เจลดานามัยซิน ถือได้ว่าเป็น สารทุติยภูมิชนิดหนึ่งที่แยกได้จาก endophytic actionomycetes ซึ่งพบว่าเป็นยาปฏิชีวนะเบนโซควิโนนที่ผลิตจาก *Streptomyces hygroscopicus* Geldanamycin จับและยับยั้งการทำงานของ cytosolic chaperone ของโปรตีน Hsp90 โปรตีน Hsp90 ทำหน้าที่รักษาความเสถียรและรูปร่างการทำงานของโปรตีนส่งสัญญาณที่ก่อให้เกิดมะเร็งหลายชนิด การยับยั้ง Hsp90 ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายของโปรตีนไอโซมของโปรตีนสัญญาณมะเร็งที่อาจแสดงออกมากเกินไปหรือทำมากเกินไปในเซลล์เนื้องอก จากการศึกษาอนุพันธ์ของเจลดานามัยซิน

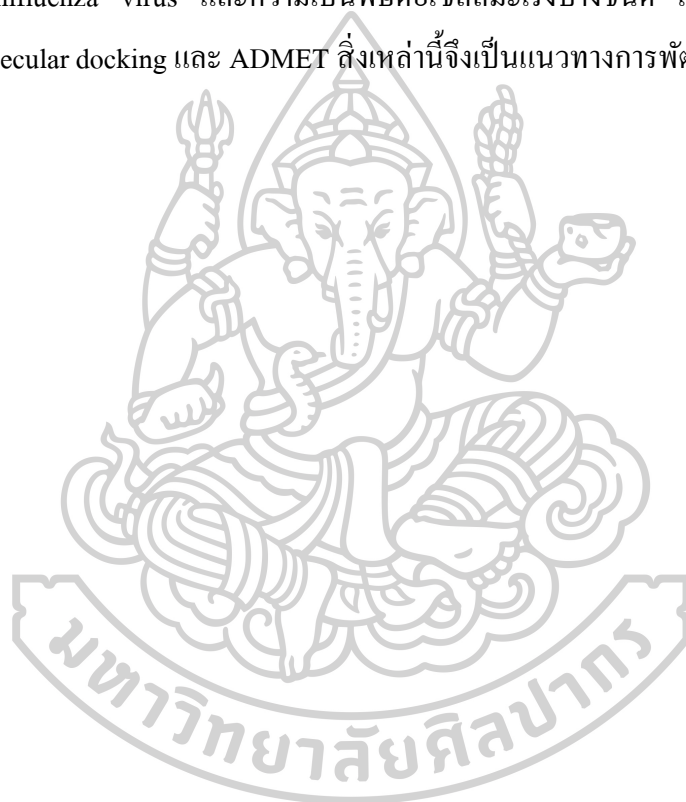
ทั้ง 8 ชนิดนี้ได้รับการประเมินกิจกรรมทางชีวภาพ โดยการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ อนุพันธ์เจลดานามัยซิน 23-30 สารประกอบ (23-25) และ (28-30) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela) อยู่ในช่วง 19-62 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรซึ่งออกฤทธิ์ได้ดีกว่าเจลดานามัยซิน (1) และ สารประกอบ 26-27 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela) ปานกลางอยู่ในช่วง 150.29-172.03 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารประกอบ 28 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) สูง ที่ 24.62 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารประกอบ 25 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ในระดับปานกลาง นอกจากนี้สารประกอบ 23, 25 และ 27 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-Mb-231) ที่ 41.88, 70.93 และ 52.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ สารประกอบ 26-30 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) ปานกลาง การถูกกระตุ้นโดย apoptosis เกี่ยวข้องกับการเปิดใช้งาน caspases หลายชุด caspase ที่สำคัญใน pathway นี้คือ caspases9 และ pathway ภายนอกคือ caspase 8 และ pathway ทั้ง 2 มารวมกันเป็น pathway caspase 3 จากนั้น Caspase 3 (Ghobrial et al., 2005) กลุ่มโปรตีน Bcl-2 ประกอบด้วย pro-apoptosis และโปรตีนต่อต้านการตายของเซลล์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตายของเซลล์ (Gross et al., 1999) Miller et al., 1994 ศึกษาต่อมาพบว่า การต่อต้านมะเร็งของ เจลดานามัยซิน น่าจะเป็นผลมาจากความสามารถในการทำลายเซลล์ของโปรตีนการส่งสัญญาณที่ควบคุมการเจริญเติบโตสองประเภท ได้แก่ โปรตีนไคนาส และ erbB2 จากการศึกษาที่ผ่านมากลับพบว่า เจลดานามัยซินมีความสามารถในการเข้าไปจับที่ Hsp90 ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของโปรตีน Hsp90 ตัวอย่างงานวิจัย เช่น เจลดานามัยซิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะเบนโซควิโนนแอนไซม์ซินที่เข้าไปจับกับโดเมน N-terminal ADP / ATP ของโปรตีน Hsp90 ซึ่งนำไปสู่การย่อยสลายของโปรตีนที่ชักนำไปสู่การเป็นมะเร็ง (Li et al., 2019)

จากการศึกษา Molecular docking ระหว่างเจลดานามัยซินและอนุพันธ์ของเจลดานามัยซิน ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นกับ Hsp90 พบว่า Compounds 28, 29 และ 30 จับกับ Hsp90 ที่ active pocket site ขณะที่ Compounds 23, 24 และ 25 จับกับ Hsp90 ที่ active pocket site บางส่วน Compound 26 จับกับ Hsp90 ที่ด้านนอกของ active pocket site ส่วน Compound 27 เกิด mechanism อื่น ๆ ที่ไป interaction กับ Hsp90

จากการทำนายคุณสมบัติ ADMET ของเจลดานามัยซินและอนุพันธ์ของเจลดานามัยซิน ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่ามีความคล้ายกัน คือ สารเหล่านี้เป็น cytochrome substrate,

cytochrome inhibitor และ hERG inhibitor สารเหล่านี้จึงอาจทำให้เกิด hepatotoxicity และ cardiotoxicity ได้ ตามลำดับ สารบางตัว เช่น Compounds 25 และ 27 ยังสามารถผ่าน blood-brain barrier ได้ ซึ่งอาจทำให้เกิด neurotoxicity อีกด้วย และอนุพันธ์ของเจลคานามัยซินชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น มีความเป็นขั้วสูงและสามารถดูดซึมได้ง่ายกว่าเจลคานามัยซิน

จากการพัฒนาโครงสร้างเจลคานามัยซิน เพื่อให้ได้อนุพันธ์ชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติที่ดีกว่าเจลคานามัยซินเดิม เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติการละลายที่ดีขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวน influenza virus และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งบางชนิด และนำโครงสร้างสารมาวิเคราะห์ Molecular docking และ ADMET สิ่งเหล่านี้จึงเป็นแนวทางการพัฒนาในอนาคตต่อไป



บทที่ 6

บทสรุป

1. การสกัดเจลดานามัยซินจากเชื้อ *Streptomyces zerumbet* W14 ได้สารสกัดหยาบมีลักษณะเป็นของแข็งหนืดสีน้ำตาลเข้ม น้ำหนัก 4.20 กรัม
2. การทำให้บริสุทธิ์ของเจลดานามัยซิน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ของแข็งสีเหลือง ปริมาณ 1.15 กรัม (27%)
3. เจลดานามัยซิน ถูกนำมาใช้เป็นโครงสร้างหลัก ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดใหม่ โดยปฏิกิริยา nucleophilic substitution ที่ตำแหน่ง C17 ได้อนุพันธ์ชนิดใหม่ 8 ตัว คือ
 - (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-dihydroxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (2),
 - (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-dimethoxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (3),
 - (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-bis(benzyloxy)phenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (4),
 - (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-bis((2-bromobenzyl)oxy)phenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (5),
 - (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-((3,4-dibutoxyphenethyl)amino)-13-hydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate (6),
 - 17-((S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propan-1-ol)-17-demethoxygeldanamycin (7),
 - 17-((S)-2-amino-3-phenylpropan-1-ol)-17-demethoxygeldanamycin (8) และ
 - 17-((S)-4-(2-amino-3-hydroxypropyl)phenol)-17-demethoxygeldanamycin (9)

4. อนุพันธ์ของเจลคานามัยซินชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่าเจลคานามัยซิน 2.53 – 36.65 เท่า
5. การประเมินทดสอบการต้านไวรัสของอนุพันธ์เจลคานามัยซิน compound ที่ 24 และ 25 มี HA titer ที่ 64
6. อนุพันธ์ของเจลคานามัยซินชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นบางตัว มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งบางชนิด เช่น Compounds 23 - 25 และ 28 – 30 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ดีกว่าเจลคานามัยซิน มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ ได้ดีกว่าเจลคานามัยซิน ยกเว้น compound ที่ 24 ในเซลล์มะเร็งเต้านมมีผลที่ไม่ค่อยดีนักเมื่อเทียบกับเจลคานามัยซิน
7. จากการศึกษา Molecular docking ระหว่างเจลคานามัยซินและอนุพันธ์ของเจลคานามัยซินชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นกับ Hsp90 พบว่า Compounds 28, 29 และ 30 จับกับ Hsp90 ที่ active pocket site ขณะที่ Compounds 23, 24 และ 25 จับกับ Hsp90 ที่ active pocket site บางส่วน Compound 26 จับกับ Hsp90 ที่ด้านนอกของ active pocket site ส่วน Compound 27 มี mechanism อื่น ๆ ที่สามารถไป interaction กับบริเวณของ Hsp90 และผลจากการจับกับ Hsp90 นี้ สอดคล้องกับคุณสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งบางชนิดด้วย
8. จากการทำนายคุณสมบัติ ADMET ของเจลคานามัยซินและอนุพันธ์ของเจลคานามัยซินชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่ามีความคล้ายกัน คือ สารเหล่านี้เป็น cytochrome substrate, cytochrome inhibitor และ hERG inhibitor สารเหล่านี้จึงอาจทำให้เกิด hepatotoxicity และ cardiotoxicity ได้ ตามลำดับ สารบางตัว เช่น Compounds 25 และ 27 ยังสามารถผ่าน blood-brain barrier ได้ ซึ่งอาจทำให้เกิด neurotoxicity อีกด้วยและอนุพันธ์ของเจลคานามัยซินชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น มีความเป็นขั้วสูงและสามารถดูดซึมได้ง่ายกว่าเจลคานามัยซิน

รายการอ้างอิง

- Aamir, M., Rai, K.K., Zehra, A., Dubey, M.K., Samal, S., Yadav, M., Upadhyay, R.S., 2020. 9 - Endophytic actinomycetes in bioactive compounds production and plant defense system, in: Kumar, A., Singh, V.K. (Eds.), *Microbial Endophytes*. Woodhead Publishing, pp. 189-229.
- Ammerman, N.C., Beier-Sexton, M., Azad, A.F., 2008. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol Appendix 4*, Appendix-4E.
- Araújo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W., van Elsas, J.D., van Vuurde, J.W.L., Azevedo, J.L., 2002. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4906-4914.
- Banumathy, G., Singh, V., Pavithra, S.R., Tatu, U., 2003. Heat shock protein 90 function is essential for *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 278, 18336-18345.
- Baquerizo, A., Bañares, R., Saliba, F., 2015. Chapter 107 - Current Clinical Status of the Extracorporeal Liver Support Devices, in: Busuttill, R.W., Klintmalm, G.B.G. (Eds.), *Transplantation of the Liver (Third Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1463-1487.
- Bérdy, J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics* 58, 1-26.
- Caruso, M., Colombo, A., Crespi-Perellino, N., Fedeli, L., Malyszko, J., Pavesi, A., Quaroni, S., Saracchi, M., Ventrella, G., 2000. Studies on a strain of *Kitasatospora* sp. paclitaxel producer. *Annals of Microbiology* 50, 89-102.
- Castillo, U., Harper, J.K., Strobel, G.A., Sears, J., Alesi, K., Ford, E., Lin, J., Hunter, M., Maranta, M., Ge, H., 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiology Letters* 224, 183-190.
- Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Albert, H., Robison, R., Condrón, M.A., Teplow, D.B., 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscansaa* The GenBank accession number for the sequence determined in this work is AY127079. *Microbiology* 148, 2675-2685.
- Chatterjee, S., Burns, T.F., 2017. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1978.
- Chomposri, J., Thavara, U., Tawatsin, A., Boonserm, R., Phumee, A., Sangkitporn, S.,

- Siriyasatien, P., 2016. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasites & Vectors* 9.
- Darby, A., Lertpiriyapong, K., Sarkar, U., Seneviratne, U., Park, D., Gamazon, E., Batchelder, C., Cheung, C., Buckley, E., Taylor, N., Shen, Z., Tannenbaum, S., Wishnok, J., Fox, J., 2014. Cytotoxic and pathogenic properties of *Klebsiella oxytoca* Isolated from laboratory Animals. *PloS one* 9, e100542.
- de Lima Procópio, R.E., da Silva, I.R., Martins, M.K., de Azevedo, J.L., de Araújo, J.M., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16, 466-471.
- Derese, S., Guantai, E.M., Souaibou, Y., Kuete, V., 2017. Chapter 21 - *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae), in: Kuete, V. (Ed.), *Medicinal spices and vegetables from Africa*. Academic Press, pp. 451-483.
- El-Gendy, M.M., EL-Bondkly, A.M., 2010. Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37, 831-841.
- Ezra, D., Castillo, U.F., Strobel, G.A., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Condrón, M.A., Teplov, D.B., Sears, J., Maranta, M., 2004. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp.(MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology* 150, 785-793.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136, E359-386.
- Gey, G., 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* 12, 264-265.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A., 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55, 178-194.
- Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 13, 1899-1911.
- Gürpınar, T., Kosova, F., Kurt, F.O., Cambaz, S.U., Yücel, A.T., Umur, N., Tuğlu, M.I., 2020.

- Effect of geldanamycin on the expression of the matrix molecules and angiogenic factors in a gastric cancer cell line. *Biotechnic & Histochemistry* 96(2), 111-116.
- Hermans, J., Eichner, S., Mancuso, L., Schröder, B., Sasse, F., Zeilinger, C., Kirschning, A., 2019. New geldanamycin derivatives with anti Hsp properties by mutasynthesis. *Organic & Biomolecular Chemistry* 17, 5269-5278.
- Higashide, E., Asai, M., Ootsu, K., Tanida, S., Kozai, Y., Hasegawa, T., Kishi, T., Sugino, Y., Yoneda, M., 1977. Ansamitocin, a group of novel maytansinoid antibiotics with antitumour properties from *Nocardia*. *Nature* 270, 721-722.
- Hull, R.N., Cherry, W.R., Tritch, O.J., 1962. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2(NCTC-3196) and their utility in virus research. *Journal of Experimental Medicine* 115, 903-918.
- Igarashi, Y., 2004. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. *Actinomycetologica* 18, 63-66.
- Janso, J.E., Carter, G.T., 2010. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4377-4386.
- Kim, W., Lee, D., Hong, S.S., Na, Z., Shin, J.C., Roh, S.H., Wu, C.Z., Choi, O., Lee, K., Shen, Y.M., Paik, S.G., Lee, J.J., Hong, Y.S., 2009. Rational biosynthetic engineering for optimization of geldanamycin analogues. *Chembiochem* 10, 1243-1251.
- Kousar, S., Anjuma, S., Jaleel, F., Khana, J., Naseema, S., 2017. Biomedical Significance of Tryptamine: A Review. *Journal of Pharmacovigilance* 5, e1000239
- Kroemer, G., El-Deiry, W., Golstein, P., Peter, M., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovskiy, B., Blagosklonny, M., Malorni, W., Knight, R., 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation* 12, 1463-1467.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C., 2014. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book. Elsevier health sciences.
- Kupchan, S.M., Komoda, Y., Court, W., Thomas, G., Smith, R., Karim, A., Gilmore, C., Haltiwanger, R., Bryan, R., 1972. Tumor inhibitors. LXXIII. Maytansine, a novel antileukemic ansa macrolide from *Maytenus ovatus*. *Journal of the American Chemical Society* 94, 1354-1356.

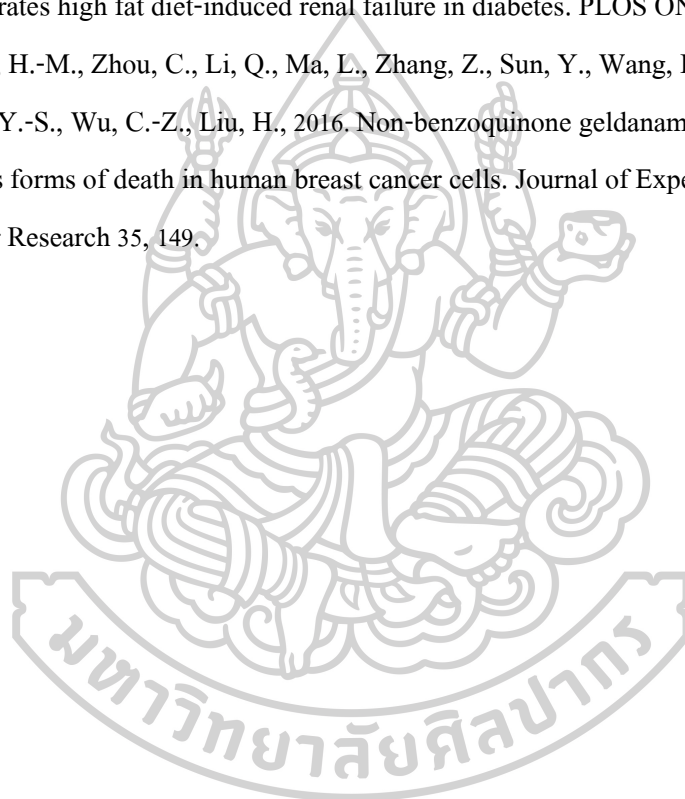
- Lee, E., 2018. Cancer chemoprevention effects of geldanamycin and 17-AAG in human oral squamous cell carcinoma. *The Korean Journal of Clinical Laboratory Science* 50, 462-469.
- Li, J., Lu, C., Shen, Y., 2010. Macrolides of the bafilomycin family produced by *Streptomyces* sp. CS. *The Journal of Antibiotics* 63, 595-599.
- Li, Z., Jia, L., Tang, H., Shen, Y., Shen, C., 2019. Synthesis and biological evaluation of geldanamycin–ferulic acid conjugate as a potent Hsp90 inhibitor. *RSC Advances* 9, 42509-42515.
- Lu, C., Shen, Y., 2003. A new macrolide antibiotic with antitumor activity produced by *Streptomyces* sp. CS, a commensal microbe of *Maytenus hookeri*. *The Journal of Antibiotics* 56, 415-418.
- Lu, C., Shen, Y., 2007. A novel ansamycin, naphthomycin K from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics* 60, 649-653.
- Machado, N.I., dos Santos, T.A.T., de Souza, W., DaMatta, R.A., Seabra, S.H., 2020. Treatment with melatonin induces a reduction of *Toxoplasma gondii* development in LLC-MK2 cells. *Parasitology Research* 119, 2703-2711.
- Maloney, A., Workman, P., 2002. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: The story unfolds. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2, 3-24.
- Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 146(1), 3–15.
- Masiello, M.G., Cucina, A., Proietti, S., Palombo, A., Coluccia, P., D'Anselmi, F., Dinicola, S., Pasqualato, A., Morini, V., Bizzarri, M., 2014. Phenotypic switch Induced by simulated microgravity on MDA-MB-231 breast cancer cells. *BioMed Research International* 2014, 652434.
- Masters, J.R., 2002. HeLa cells 50 years on: The good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer* 2, 315-319.
- Miller, P., DiOrio, C., Moyer, M., Schnur, R.C., Bruskin, A., Cullen, W., Moyer, J.D., 1994. Depletion of the erbB-2 gene product p185 by benzoquinoid ansamycins. *Cancer Research* 54, 2724-2730.
- Minn, A.J., Rudin, C.M., Boise, L.H., Thompson, C.B., 1995. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood*, 86(5), 1903–1910.
- Mo, Q., Zhang, Y., Jin, X., Gao, Y., Wu, Y., Hao, X., Gao, Q., Chen, P., 2016. Geldanamycin, an

- inhibitor of Hsp90, increases paclitaxel-mediated toxicity in ovarian cancer cells through sustained activation of the p38/H2AX axis. *Tumor Biology* 37, 14745-14755.
- Mout, R., Xu, Z.-D., Wolf, A.K.H., Jo Davisson, V., Jarori, G.K., 2012. Anti-malarial activity of geldanamycin derivatives in mice infected with *Plasmodium yoelii*. *Malaria Journal* 11, 54.
- Nagaraj, N., Wisniewski, J.R., Geiger, T., Cox, J., Kircher, M., Kelso, J., Pääbo, S., Mann, M., 2011. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Molecular Systems Biology* 7, 548.
- Nguyen, D.M., Desai, S., Chen, A., Weiser, T.S., Schrupp, D.S., 2000. Modulation of metastasis phenotypes of non-small cell lung cancer cells by 17-allylamino 17-demethoxy geldanamycin. *The Annals of Thoracic Surgery* 70, 1853-1860.
- O'Brien, M.A., Kirby, R., 2008. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 18, 572-585.
- Pan, X.-P., Li, L.-J., 2012. Advances in cell sources of hepatocytes for bioartificial liver. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 11, 594-605.
- Park, J.-W., Yeh, M.W., Wong, M.G., Lobo, M., Hyun, W.C., Duh, Q.-Y., Clark, O.H., 2003a. The heat shock protein 90-binding geldanamycin inhibits cancer cell proliferation, down-regulates oncoproteins, and inhibits epidermal growth factor-induced invasion in thyroid cancer cell lines. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 3346-3353.
- Pataer, A., Bocangel, D., Chada, S., Roth, J.A., Hunt, K.K., Swisher, S.G., 2007. Enhancement of adenoviral MDA-7-mediated cell killing in human lung cancer cells by geldanamycin and its 17-allyl- amino-17-demethoxy analogue. *Cancer Gene Therapy* 14, 12-18.
- Philchenkov, A., Zavelevich, M., Krocak, T.J., Los, M.J., 2004. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Experimental Oncology* 26, 82-97.
- Pullen, C., Schmitz, P., Meurer, K., Bamberg, D.D.v., Lohmann, S., Franca, S.D.C., Groth, I., Schlegel, B., Möllmann, U., Gollmick, F., 2002. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. *Planta* 216, 162-167.
- Rabe, S., Krings, U., Berger, R., 2004. *In vitro* study of the influence of physiological parameters on dynamic in-mouth flavour release from liquids. *Chemical senses* 29, 153-162.
- Raffo, A.J., Perlman, H., Chen, M.-W., Day, M.L., Streitman, J.S., Buttyan, R., 1995. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers

- resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Research* 55, 4438-4445.
- Rascher, A., Hu, Z., Buchanan, G.O., Reid, R., Hutchinson, C.R., 2005. Insights into the biosynthesis of the benzoquinone ansamycins geldanamycin and herbimycin, obtained by gene sequencing and disruption. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4862-4871.
- Rohn, J., Noteborn, M., 2004. The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific processes. *Apoptosis* 9, 315-322.
- Sasaki, K., Yasuda, H., Onodera, K., 1979. Growth inhibition of virus transformed cells in vitro and antitumor activity in vivo of geldanamycin and its derivatives. *The Japanese Journal of Antibiotics* 32, 849-851.
- Sessitsch, A., Reiter, B., Berg, G., 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology* 50, 239-249.
- Sharp, S., Jones, K., Workman, P., 2014. Chapter 9 - Exploiting Cancer Dependence on Molecular Chaperones: HSP90 Inhibitors Past, Present, and Future, in: Neidle, S. (Ed.), *Cancer Drug Design and Discovery (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 239-274.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2020. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 70, 7-30.
- Simizu, B., 1988. Vero Cells: Origin, Properties and Biomedical Applications: the Twenty-fifth Anniversary of the Establishment. Department of Microbiology, School of Medicine, Chiba University.
- Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U., Pavletich, N.P., 1997a. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 239-250.
- Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U., Pavletich, N.P., 1997b. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 239-250.
- Surette, M.A., Sturz, A.V., Lada, R.R., Nowak, J., 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and soil* 253, 381-390.
- Suwanborirux, K., Chang, C.-J., Spjut, R., Cassady, J., 1990. Ansamitocin P-3, a maytansinoid,

- from *Claopodium crispifolium* and *Anomodon attenuatus* or associated actinomycetes. *Experientia* 46, 117-120.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y., Lumyong, S., 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology* 151, 1691-1695.
- Taechowisan, T., Peberdy, J.F., Lumyong, S., 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 381-385.
- Taechowisan, T., Puckdee, W., Phutdhawong, W.S., 2019a. *Streptomyces zerumbet*, a novel Species from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith and Isolation of Its Bioactive Compounds. *Ai Magazine* 09, 194-219.
- Taechowisan, T., Puckdee, W., Waratchareeyakul, W., Phutdhawong, W., 2019b. Anti-Inflammatory activity of geldanamycin and its derivatives in LPS-Induced RAW 264.7 cells. *Advances in Microbiology* 09, 398-421.
- Taechowisan, T., Samsawat, T., Puckdee, W., Phutdhawong, W.S., 2020. Cytotoxicity activity of geldanamycin derivatives against various cancer cell lines. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 10, 012-021.
- Wang, C., Liu, P., Luo, J., Ding, H., Gao, Y., Sun, L., Luo, F., Liu, X., He, H., 2017. Geldanamycin reduces acute respiratory distress syndrome and promotes the survival of mice infected with the highly virulent H5N1 influenza virus. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 267.
- Welsh, J., 2013. Chapter 40 - Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer, in: Conn, P.M. (Ed.), *Animal models for the study of human disease*. Academic Press, Boston, pp. 997-1018.
- Wu, C.-Z., Jang, J., Ahn, J., Hong, Y.-S., 2012. Analogs from *Streptomyces hygroscopicus*.
- Wu, W.C., Wu, M.H., Chang, Y.C., Hsieh, M.C., Wu, H.J., Cheng, K.C., Lai, Y.H., Kao, Y.H., 2010. Geldanamycin and its analog induce cytotoxicity in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research* 91, 211-219.
- Yamabe, K., Shimizu, S., Ito, T., Yoshioka, Y., Nomura, M., Narita, M., Saito, I., Kanegae, Y., Matsuda, H., 1999. Cancer gene therapy using a pro-apoptotic gene, caspase-3. *Gene Therapy* 6, 1952-1959.

- Yasumura, Y., Kawakita, Y., 1963. Studies on SV40 in tissue culture-preliminary step for cancer research in vitro. *Nihon rinsho* 21, 1201-1215.
- Zeynali-Moghaddam, S., Mohammadian, M., Kheradmand, F., Fathi-Azarbayjani, A., Rasmi, Y., Esna-Ashari, O., Malekinejad, H., 2019. A molecular basis for the synergy between 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin with capecitabine and irinotecan in human colorectal cancer cells through VEGF and MMP-9 gene expression. *Gene* 684, 30-38.
- Zhang, H.-m., Dang, H., Kamat, A., Yeh, C.-K., Zhang, B.-X., 2012. Geldanamycin derivative ameliorates high fat diet-induced renal failure in diabetes. *PLOS ONE* 7.
- Zhang, Z., Li, H.-M., Zhou, C., Li, Q., Ma, L., Zhang, Z., Sun, Y., Wang, L., Zhang, X., Zhu, B., Hong, Y.-S., Wu, C.-Z., Liu, H., 2016. Non-benzoquinone geldanamycin analogs trigger various forms of death in human breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 35, 149.



ภาคผนวก ก

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

11.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตและการสกัดสารสกัดหยาบ (Crude Extract)

- 1) ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Lamina Airflow) รุ่น HVE-25/50 ยี่ห้อ HIRAYAMA)
- 2) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3) เครื่องชั่งสาร (Sartorius Scientific Promotion co., LTD)
- 4) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave รุ่น HVE-25/50 ยี่ห้อ HIRAYAMA)
- 5) เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator)
- 6) จานเพาะเชื้อ
- 7) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask ขนาด 1000, 500, 250 ml)
- 8) Round bottom 250 ml (Pyrex, USA)
- 9) หัวงเขี่ยเชื้อ (Aluminium loop)
- 10) กระบอกตวง (Cylinder)
- 11) แผ่นเปลวอะลูมิเนียม (Aluminium foil)
- 12) สำลี
- 13) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 14) กรวยกรอง
- 15) มีดตัดวุ้น

11.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ของสารต้านเชื้อแบคทีเรียจาก endophytic actinomycetes

- 1) capillary tube

2) แผ่นเซลล์โลส

3) Spectrophotometer

4) UV handheld light

5) Column chromatography

11.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการอธิบายโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

1) Gas chromatography

2) NMR spectrometer

11.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร synthesis

11.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การจับกันของสารด้วยวิธีการทำ molecular docking

1) Program Discovery Studio 2020

2) Program Ligpolt

3) Program ChemDraw Ultra 12.0

11.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

1) CO₂ Incubator (New Brunswick Scientific,USA)

2) Centrifuge tube (Extragenr,USA)

3) Duran bottle 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml

4) Eppendorf

5) Cryotube (Nunc,Denmark)

6) Microscope (Nikon,Japan)

7) Tips 1000 ml, 200 ml

8) ที่วางหลอดทดลอง

9) Syringe 10 ml

10) Acrodisc syringe filter 0.22

- 11) ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Lamina Airflow)
- 12) ตู้เย็น 4°C (Refrigerator)
- 13) Micropipette 1000 ml, 100 ml, 20 ml, 10 ml
- 14) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter; 827 pH lab)
- 15) Cell culture flask T25
- 16) 96 well plate

11.7 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบไข่ไก่ฟัก

- 1) เข็มฉีดยาเบอร์ 27, เข็มเจาะเบอร์ 23
- 2) ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Lamina Airflow)
- 3) โคมไฟ และ กล้องกระด้าง
- 4) Parafin wax
- 5) Syringe
- 6) คีมเปิดเปลือกไข่
- 7) Betadine
- 8) กรรไกร
- 9) ขวดฝาเกลียว
- 10) Micropipette 1000 ml, 100 ml, 20 ml, 10 ml
- 11) Tips 1000 ml, 200 ml
- 12) Centrifuge tube (Extragenr,USA)
- 13) Centrifuge (Hettich Zentrifugen Micro 22R, Germany)
- 14) 96 well plate ก้นกลม

11.8 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบ (Crude Extract)

- 1) Ethyl acetate (Fisher Scientific, UK)
- 2) Ethanol (Merck KgaA, Germany)

11.9 สารเคมีที่ใช้ในการให้บริสุทธิ์ของสาร

- 1) Methanol (Merck, USA)

2) Silica gel 60

11.10 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

- 1) Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)
- 2) Fetal bovine serum (FBS, Gibco)
- 3) Streptomycin และ Penicillin
- 4) Sodium bicarbonate (NaHCO_3 ; Merck, Germany)
- 5) Copper (III) sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Alpha, India)
- 6) Sodium chloride (NaCl ; ChemeX, USA)
- 7) Potassium chloride (KCl ; Renkem, india)
- 8) Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 ; Univar, Australia)
- 9) Sodium phosphate dibasic dodecahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; Univar, Australia)
- 10) Dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Germany)
- 11) MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma, Germany)
- 12) Enzyme Trypsin

11.12 สารเคมี

- 1) Agar
- 2) Glucose (Glucose; Univar, AjixFinechem, Australia)
- 3) Malt extract (Himedia, Laboratories Put. LTD, India)
- 4) Yeast extract (Scharlau, Ahemies.A. Barcelona, Spain)

ภาคผนวก ข
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) International Streptomyces Project medium 2 (ISP-2)

Yeast	4.0	g
Malt extract	10.0	g
Glucose	4.0	g
Agar	15.0	g
pH	7.0	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2) อาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง

DMEM(Gibco)	10.0	g/L
10% Fetal bovine serum	10.0	ml/100ml
Penicillin	100.0	μl/ml
Streptomycin	100.0	μl/ml

ปรับ pH ใช้ NaHCO_3

Stock อาหาร DMEM ผสมอาหาร DMEM ชนิดผงกับน้ำประมาณ 90% เขย่าให้ละลาย จากนั้นเติมสารที่เหลือลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 1000 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

อาหาร DMEM complete

เติม 10% Fetal bovine serum, Penicillin + Streptomycin 100 μl ในอาหาร 100 ml และปรับ pH ขึ้นตอนสุดท้าย pH ประมาณ 7.2-7.5 โดยเติม NaHCO_3 ประมาณ 1 ml ต่อปริมาตรอาหาร 200 ml

3) Phosphat Buffer Saline (PBS)(10x)

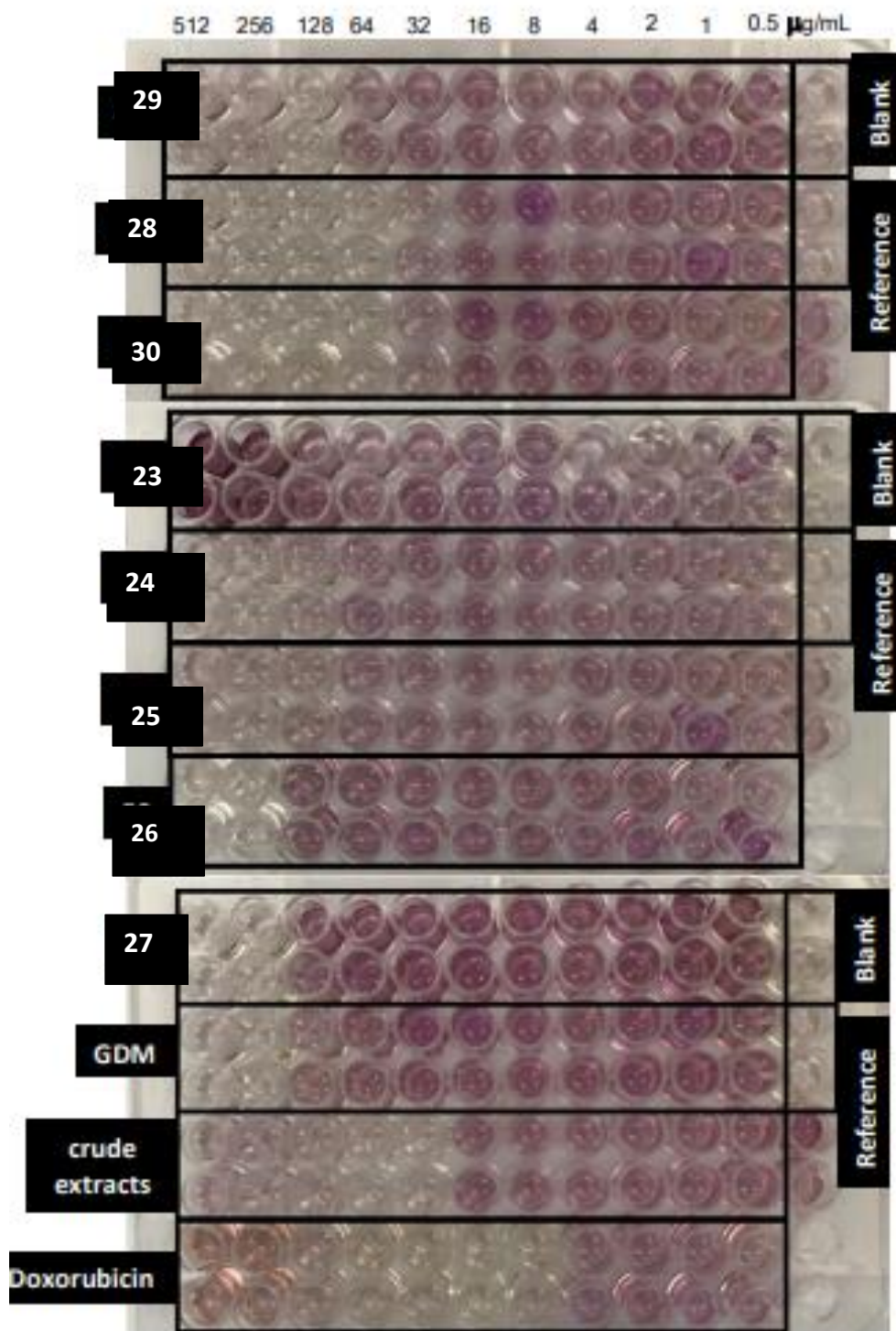
NaCl	80.0	g
KCl	2.0	g
Na ₂ HPO ₄	11.45	g
KH ₂ PO ₄	2.4	g

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

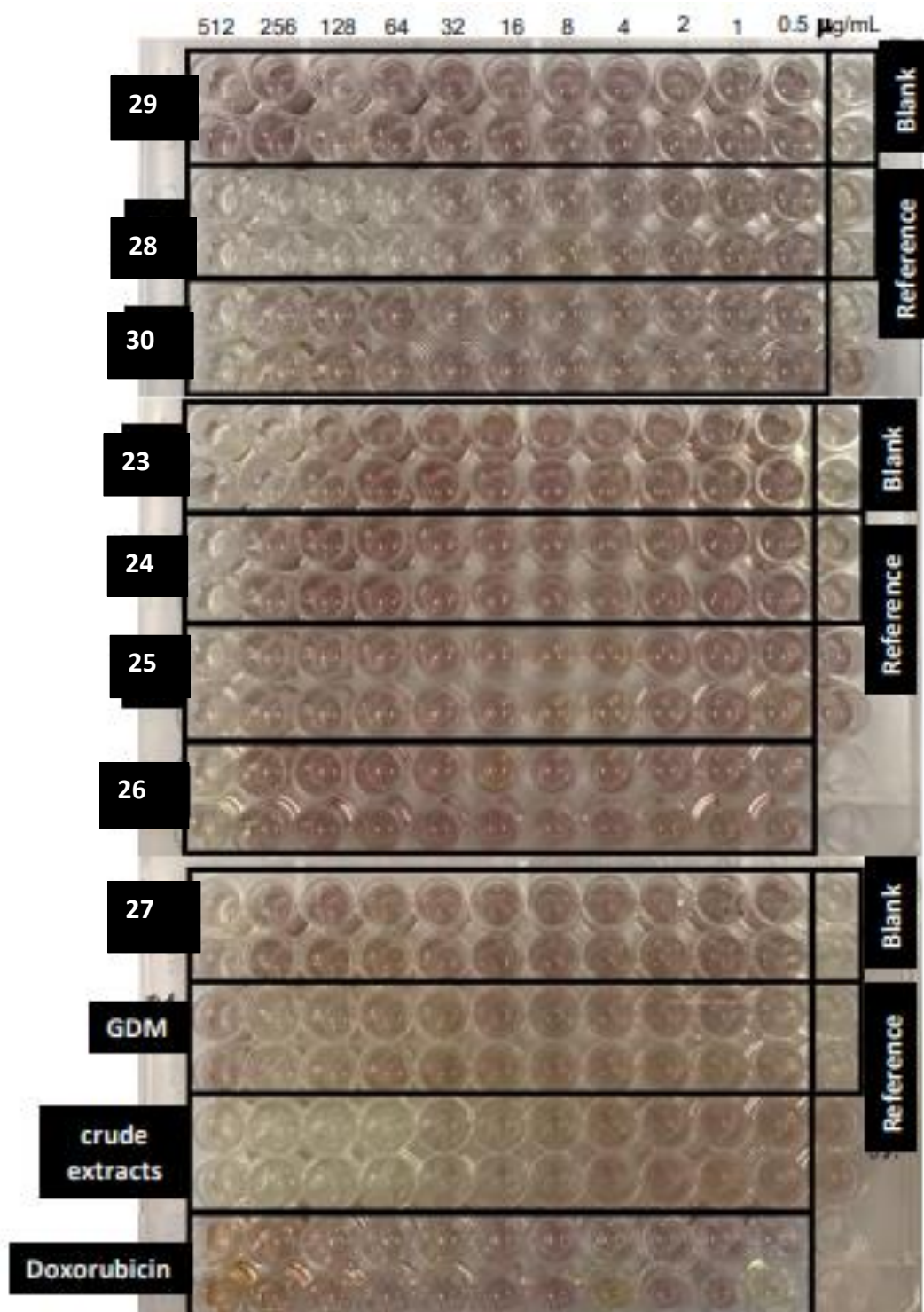


ภาคผนวก ค

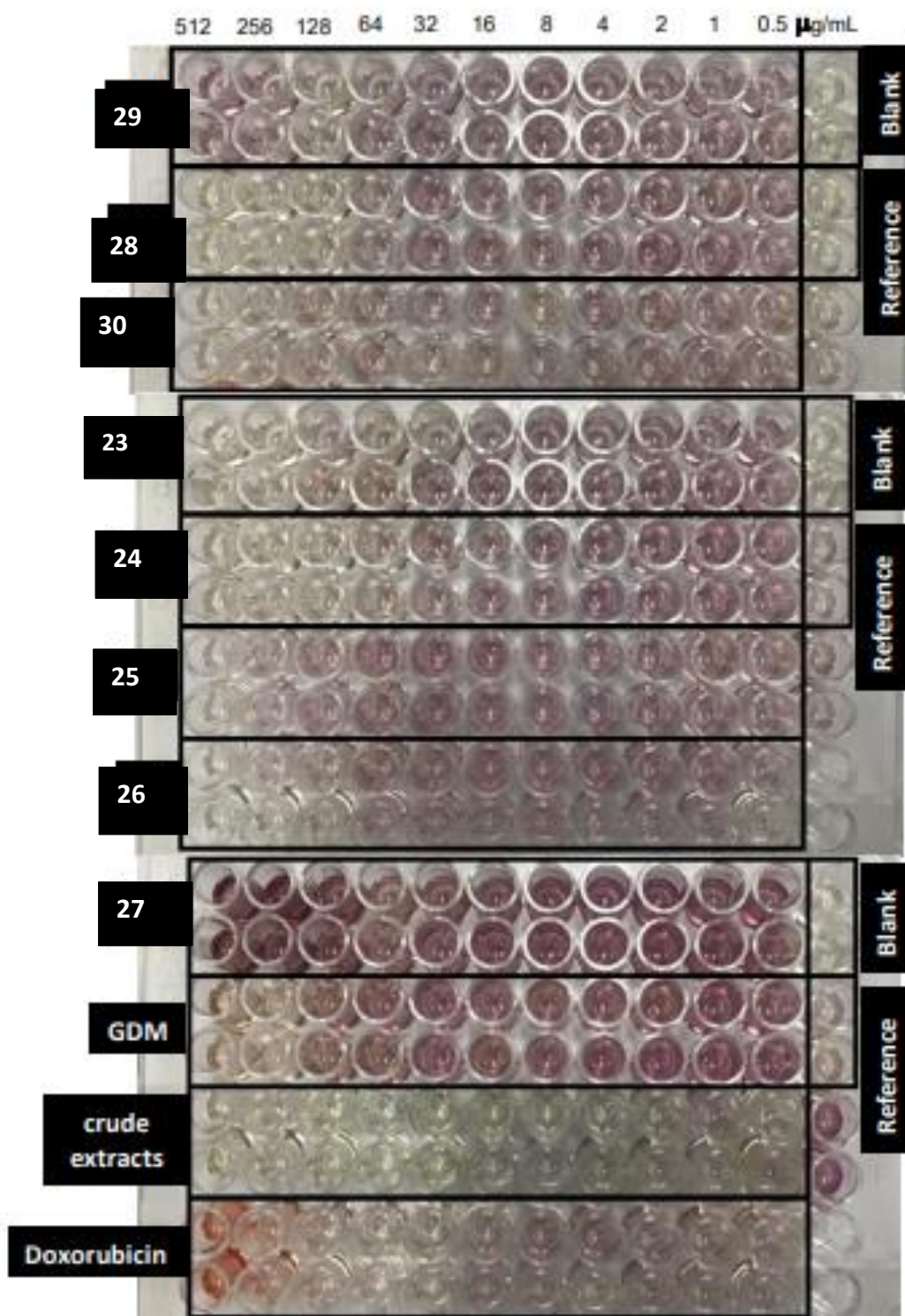
กิจกรรมความเป็นพิษต่อเซลล์ MTT assay



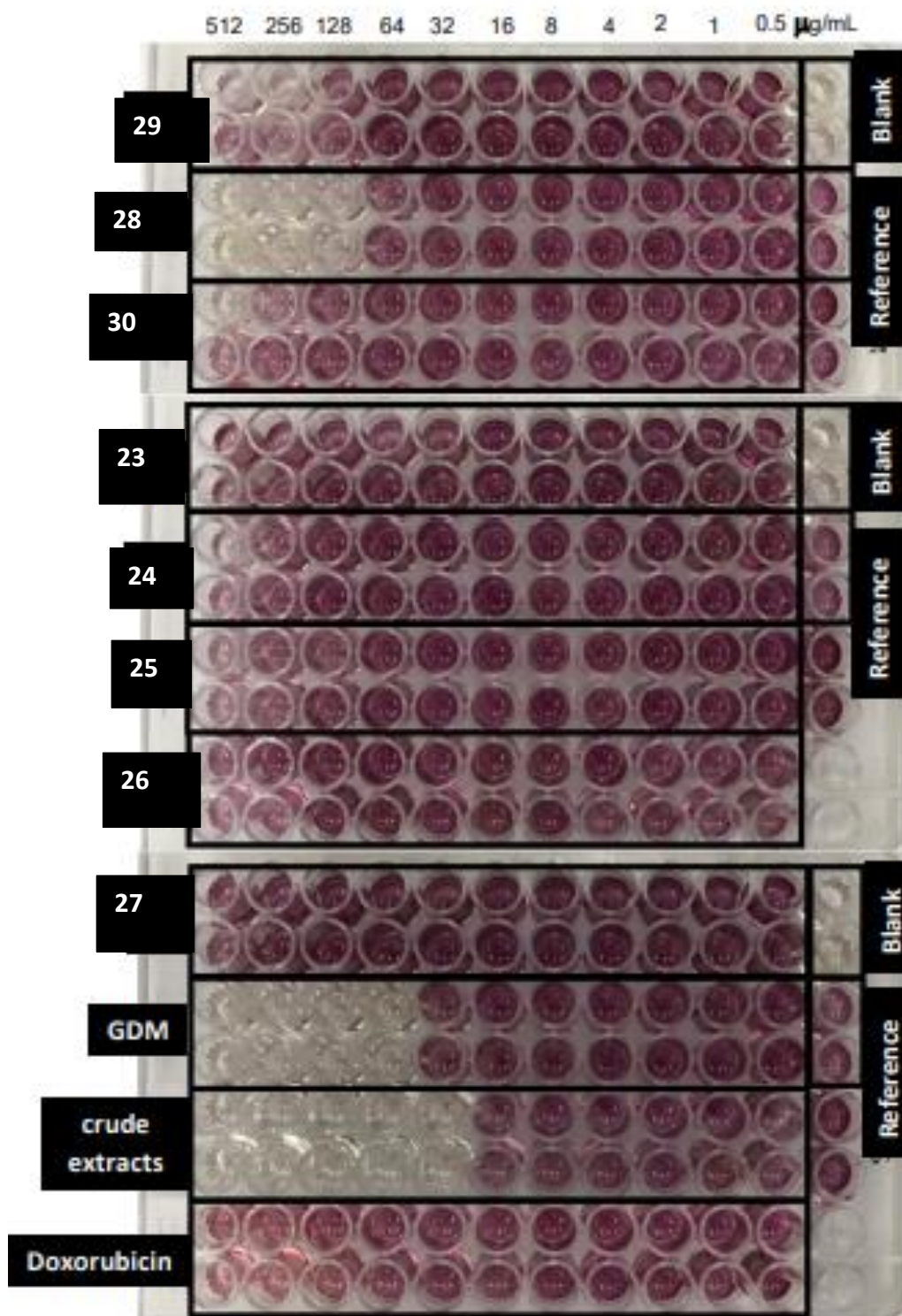
รูปที่ 15 ผลประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ human cervical cancer cells (HeLa).



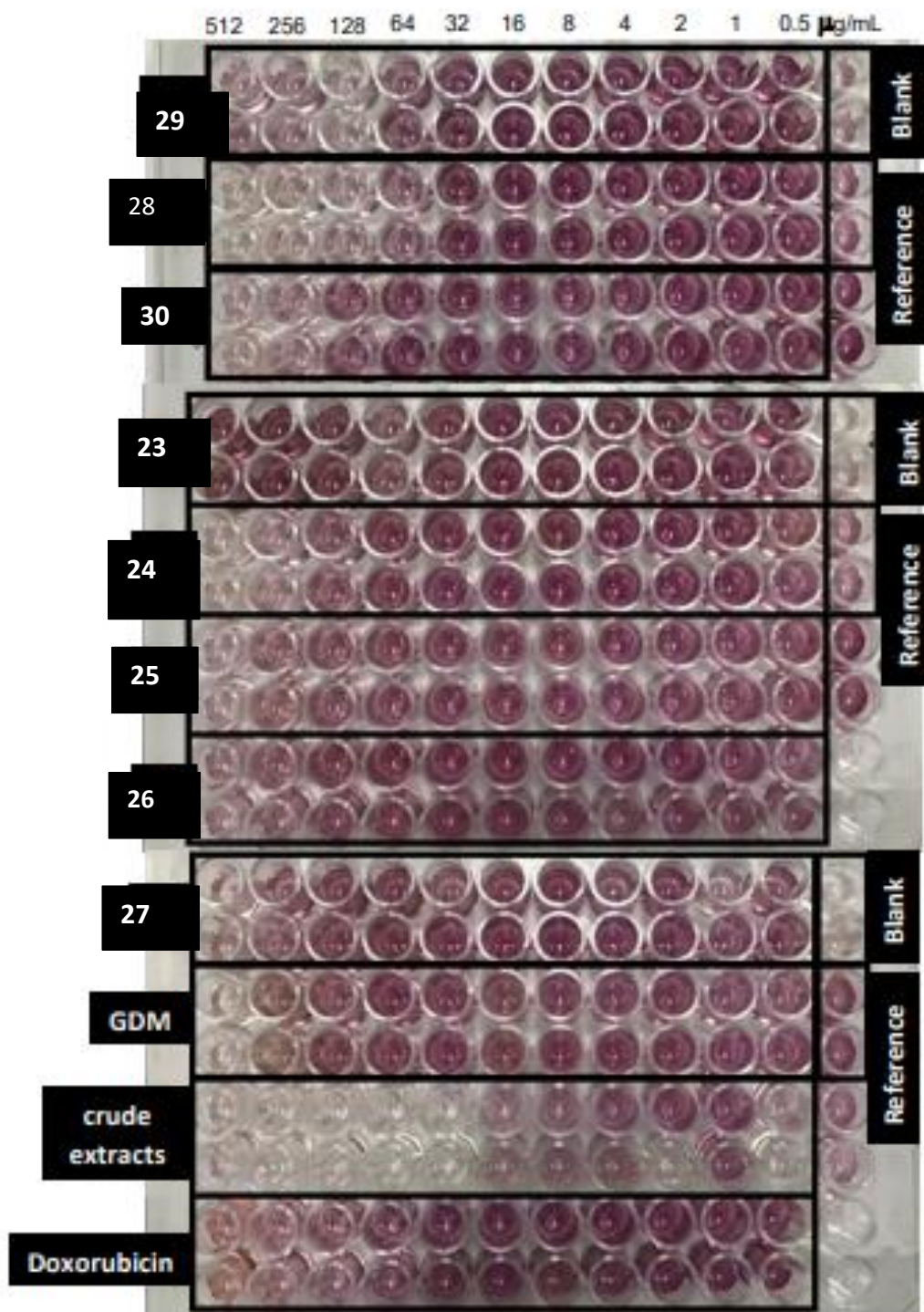
รูปที่ 16 ผลประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ human hepatocellular carcinoma cells (HepG2).



รูปที่ 17 ผลประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ human breast carcinoma cells (MDA-MB-231)



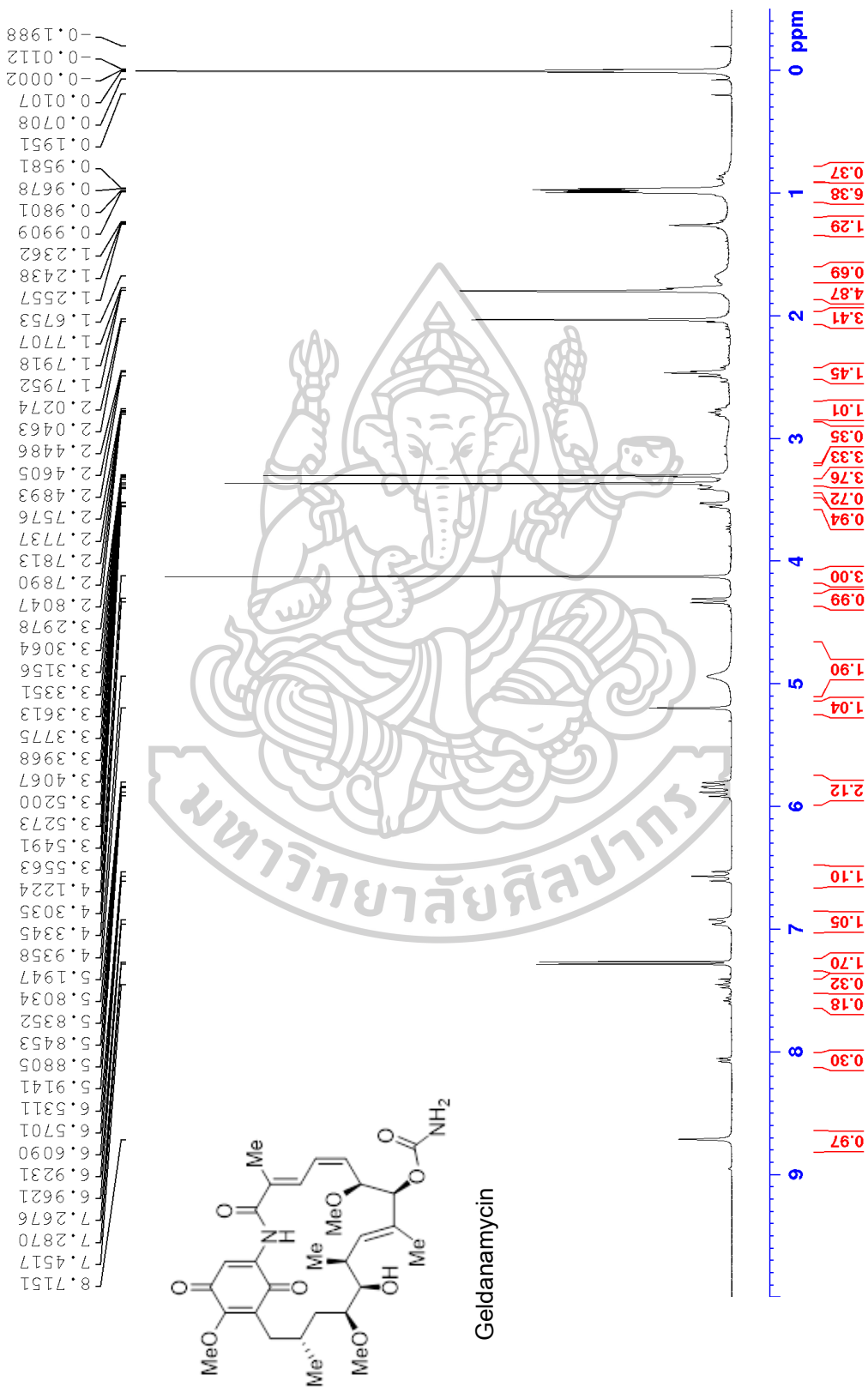
รูปที่ 18 ผลประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ monkey kidney cells (LLC-MK2).

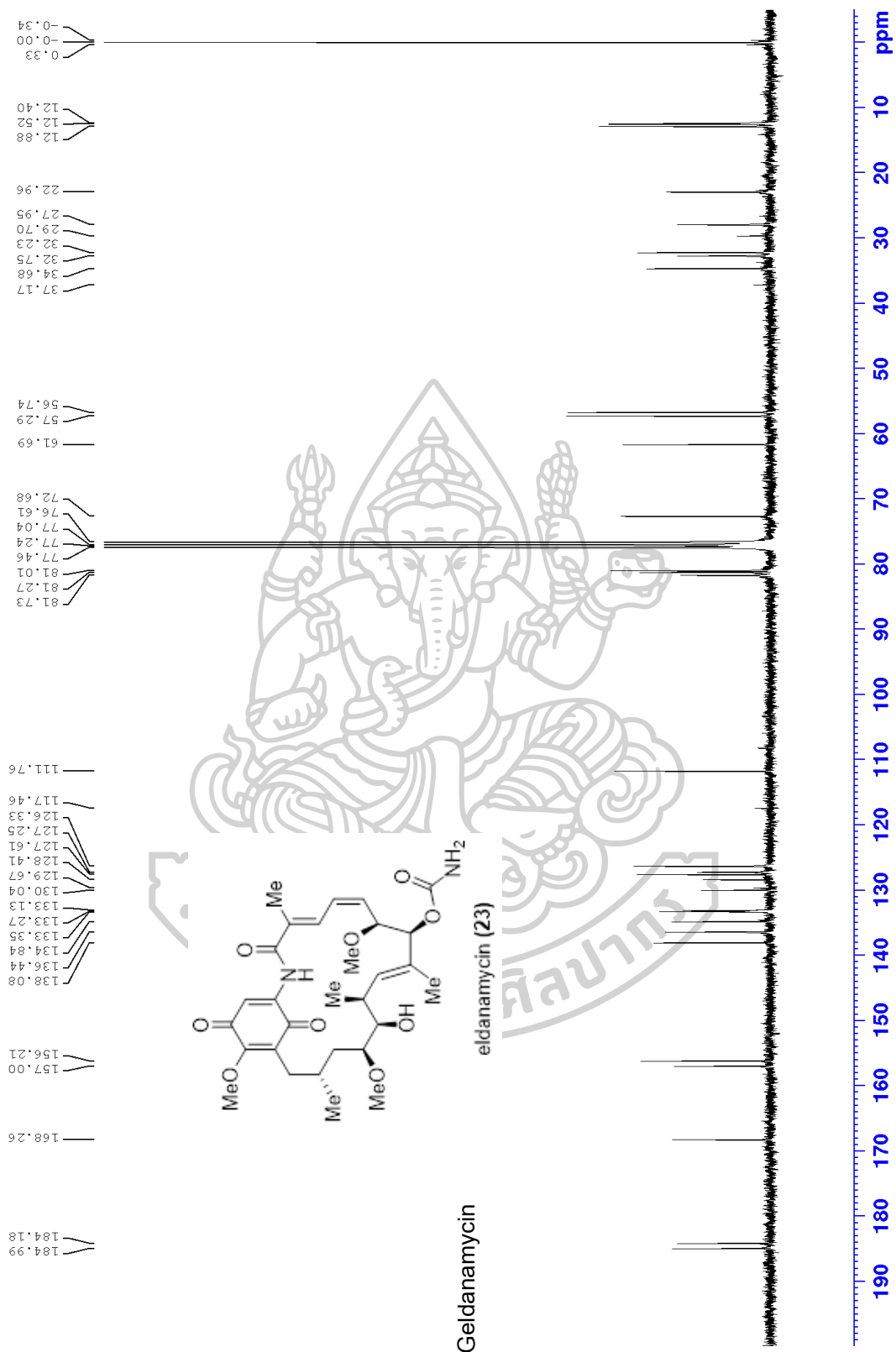


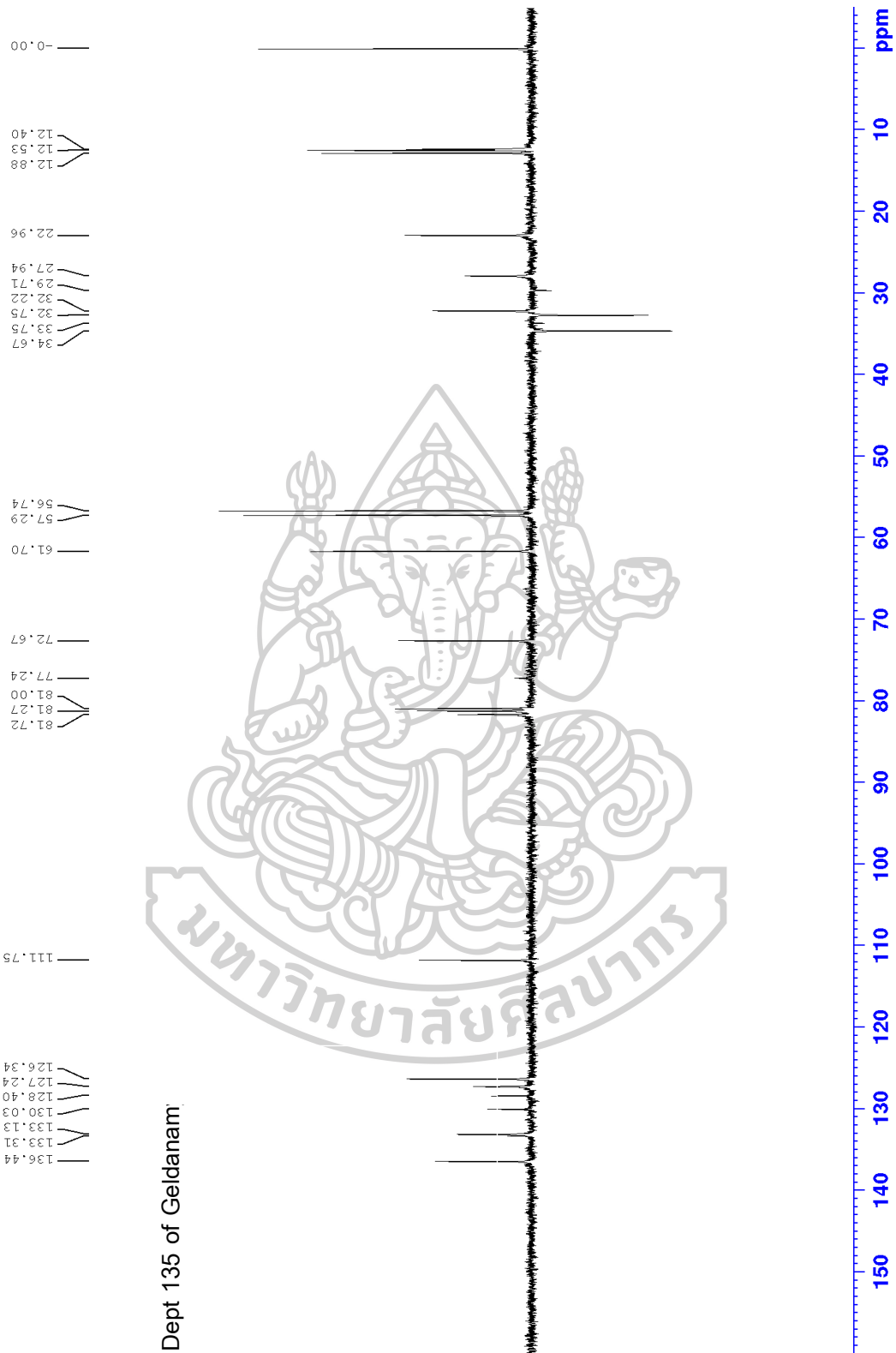
รูปที่ 19 ผลประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ African green monkey kidney cells (Vero).

ภาคผนวก ง

NMR spectrum

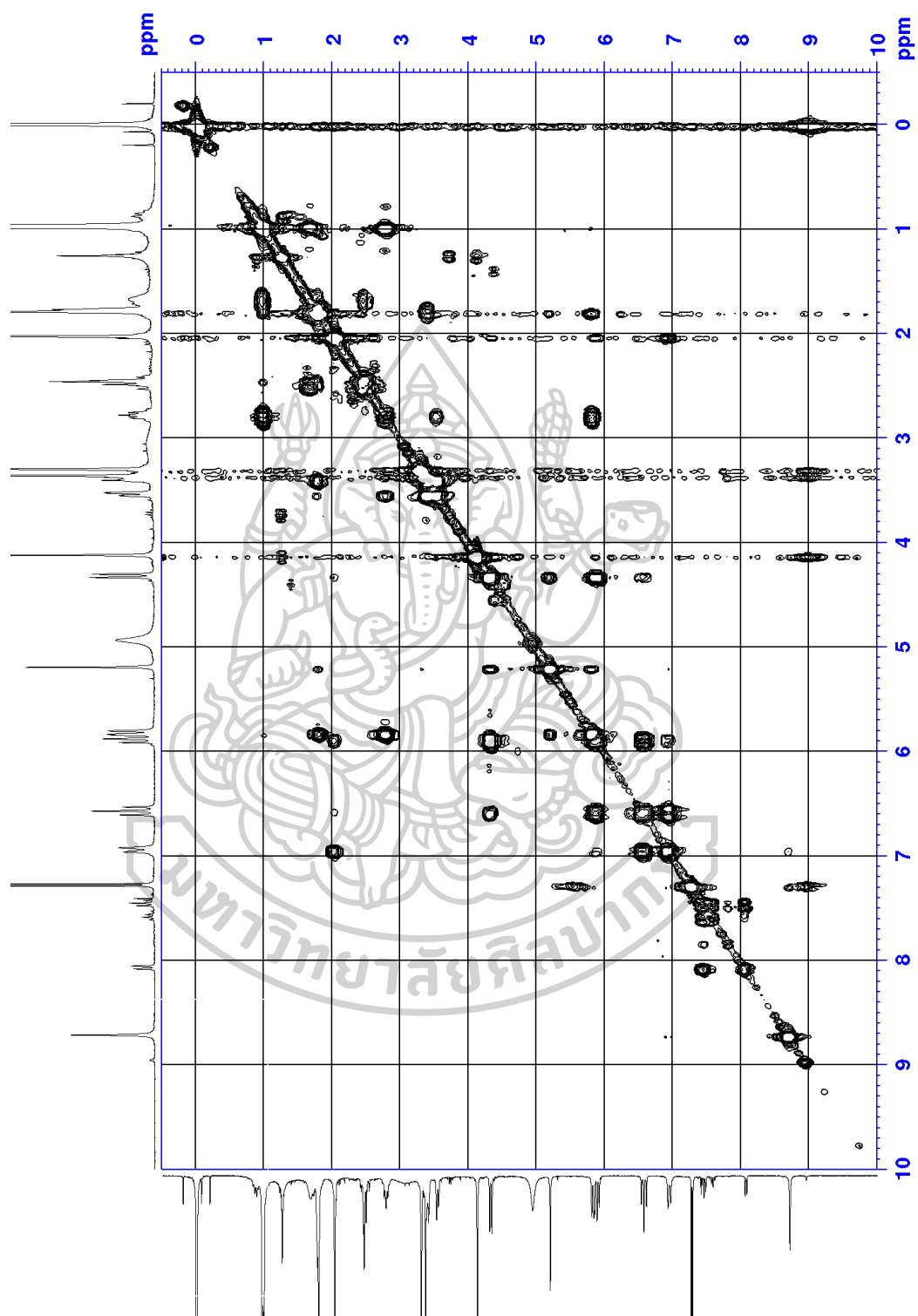


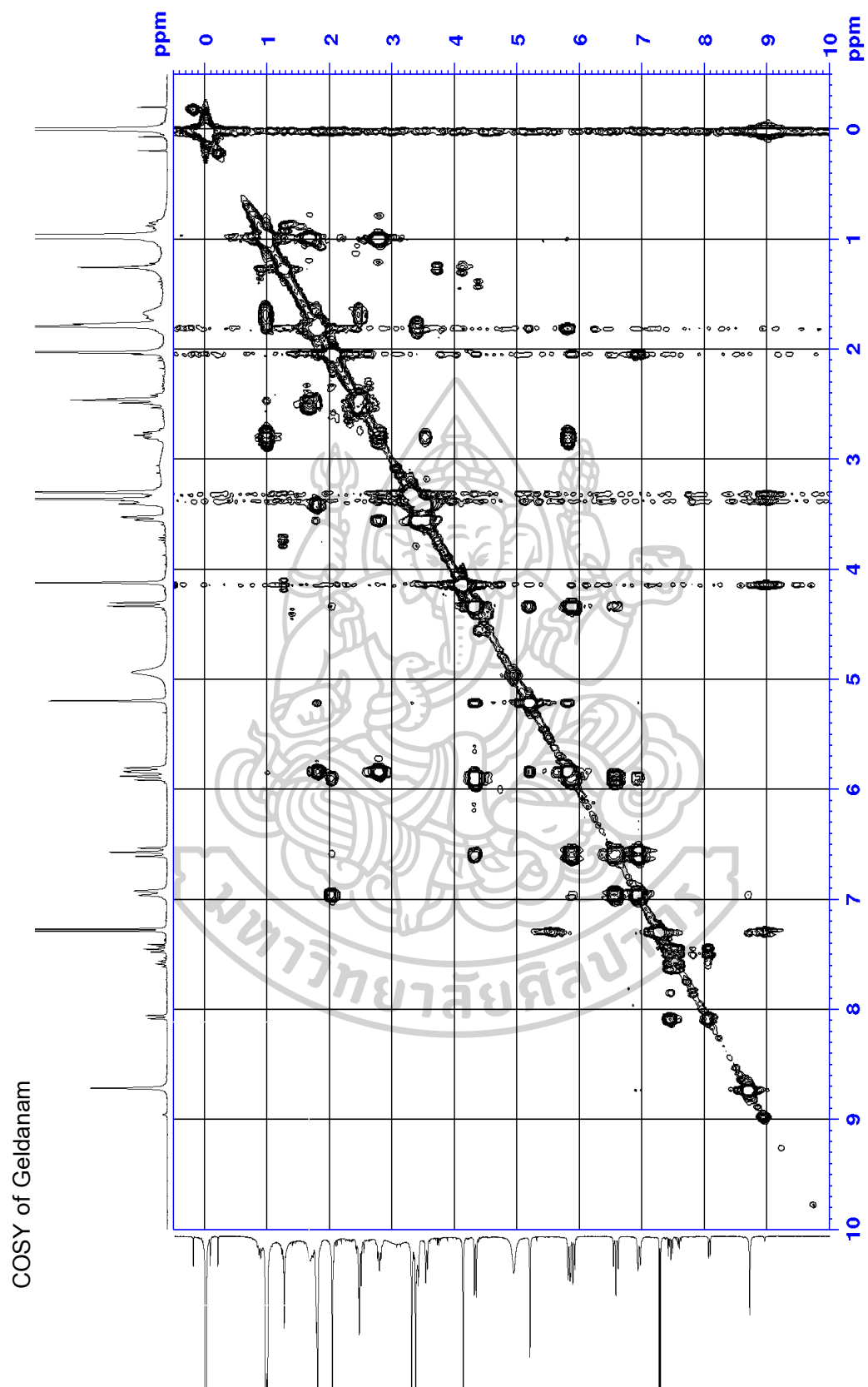


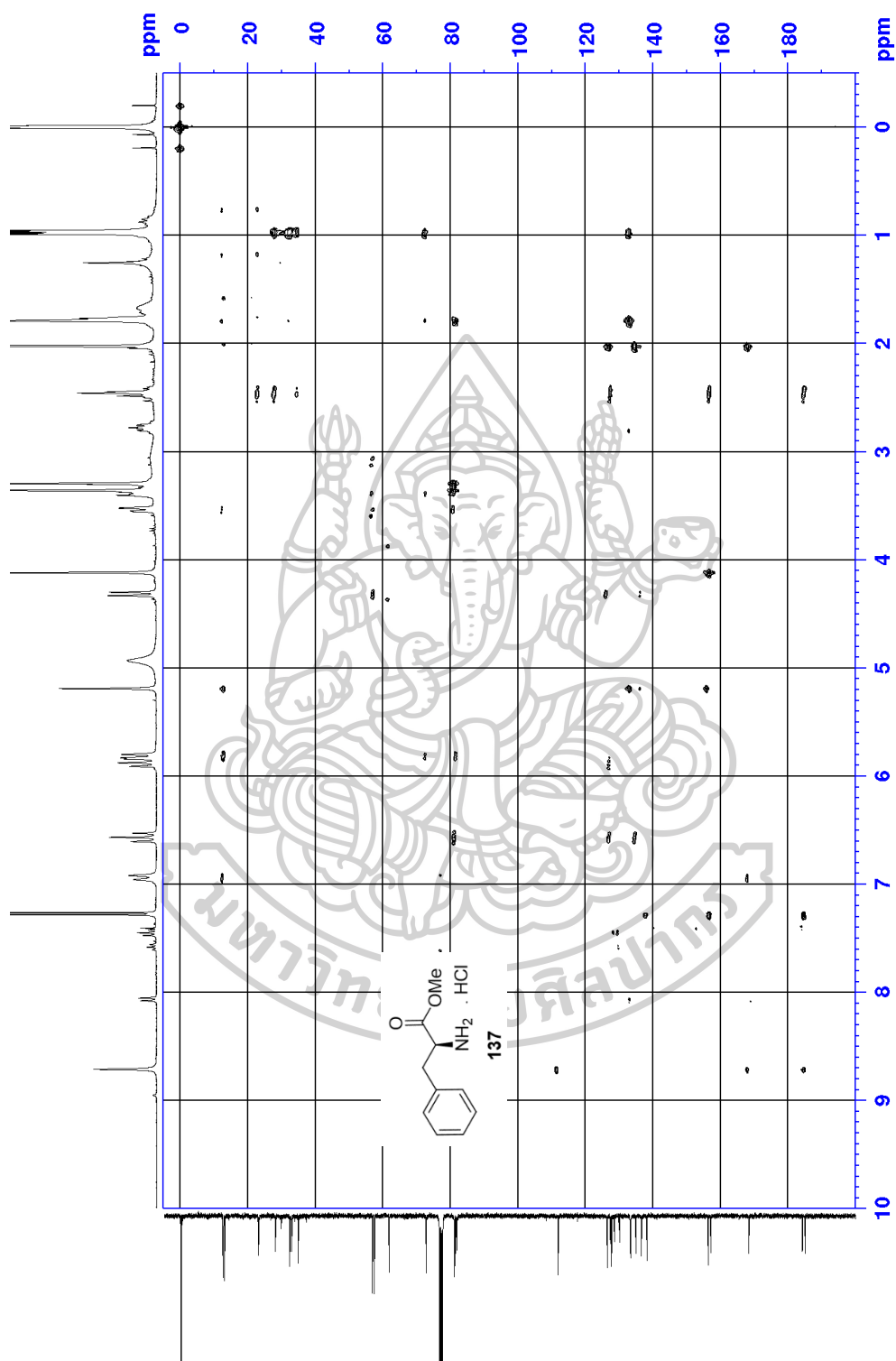


Dept 135 of Geldanamir

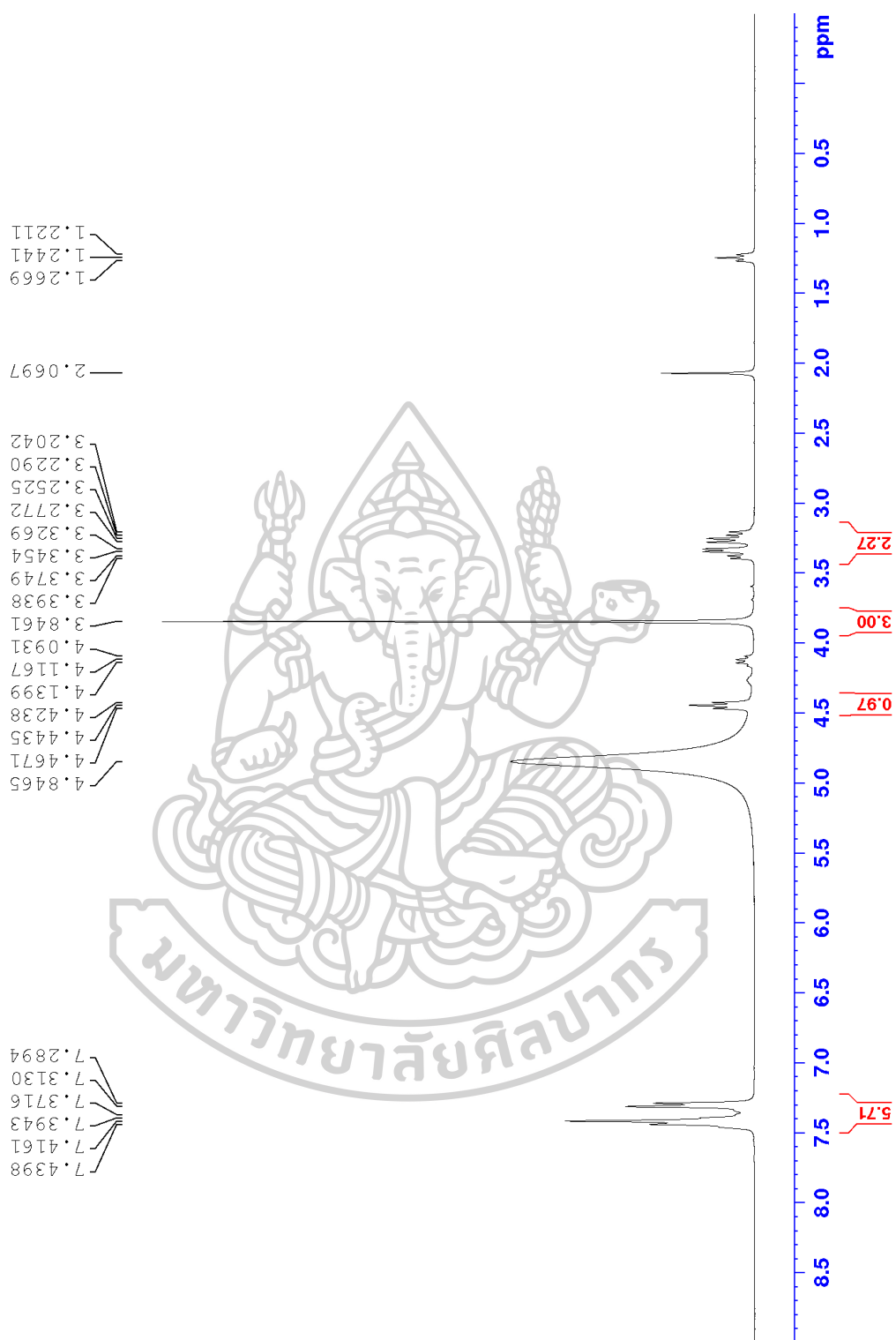
COSY of Geldanam

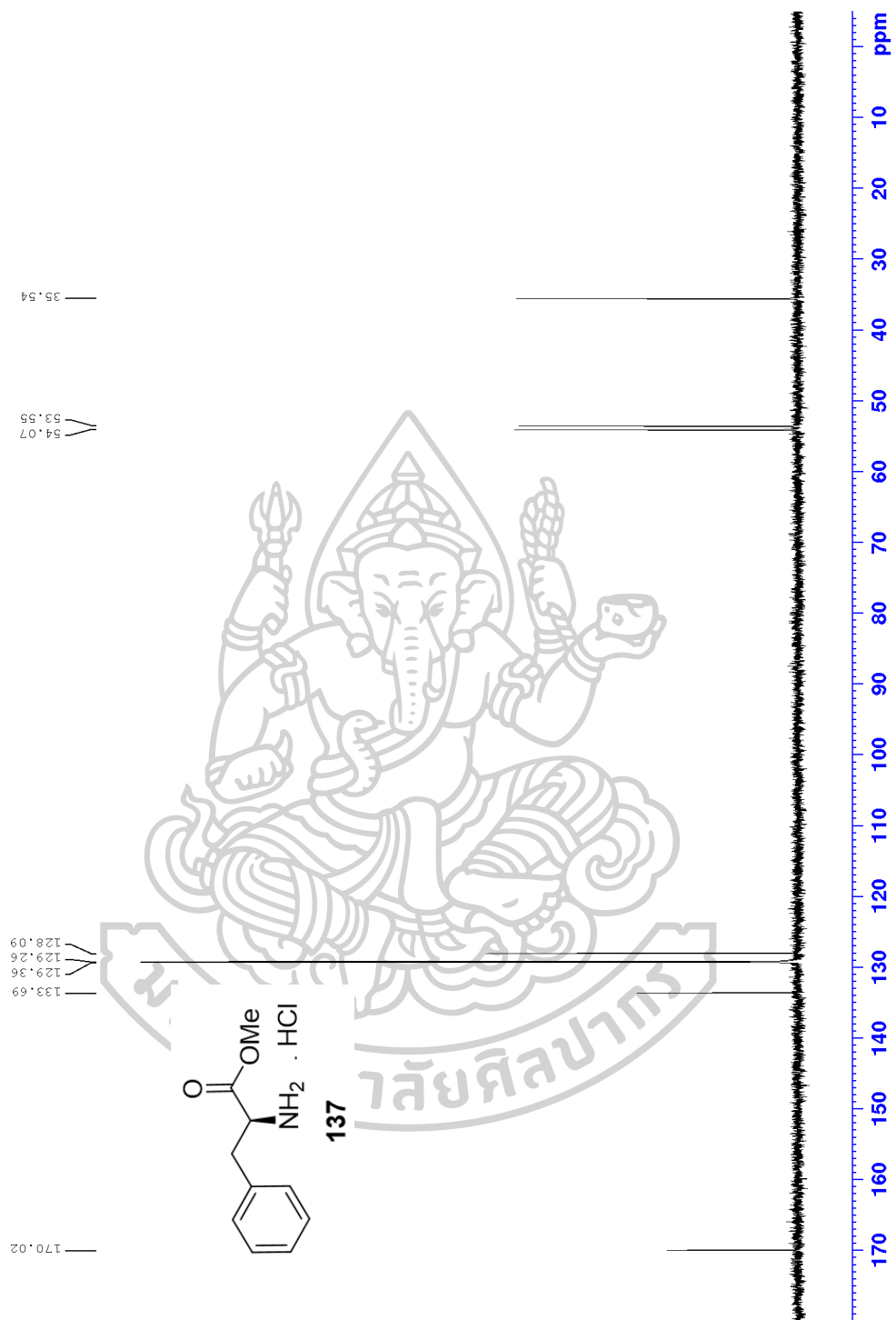


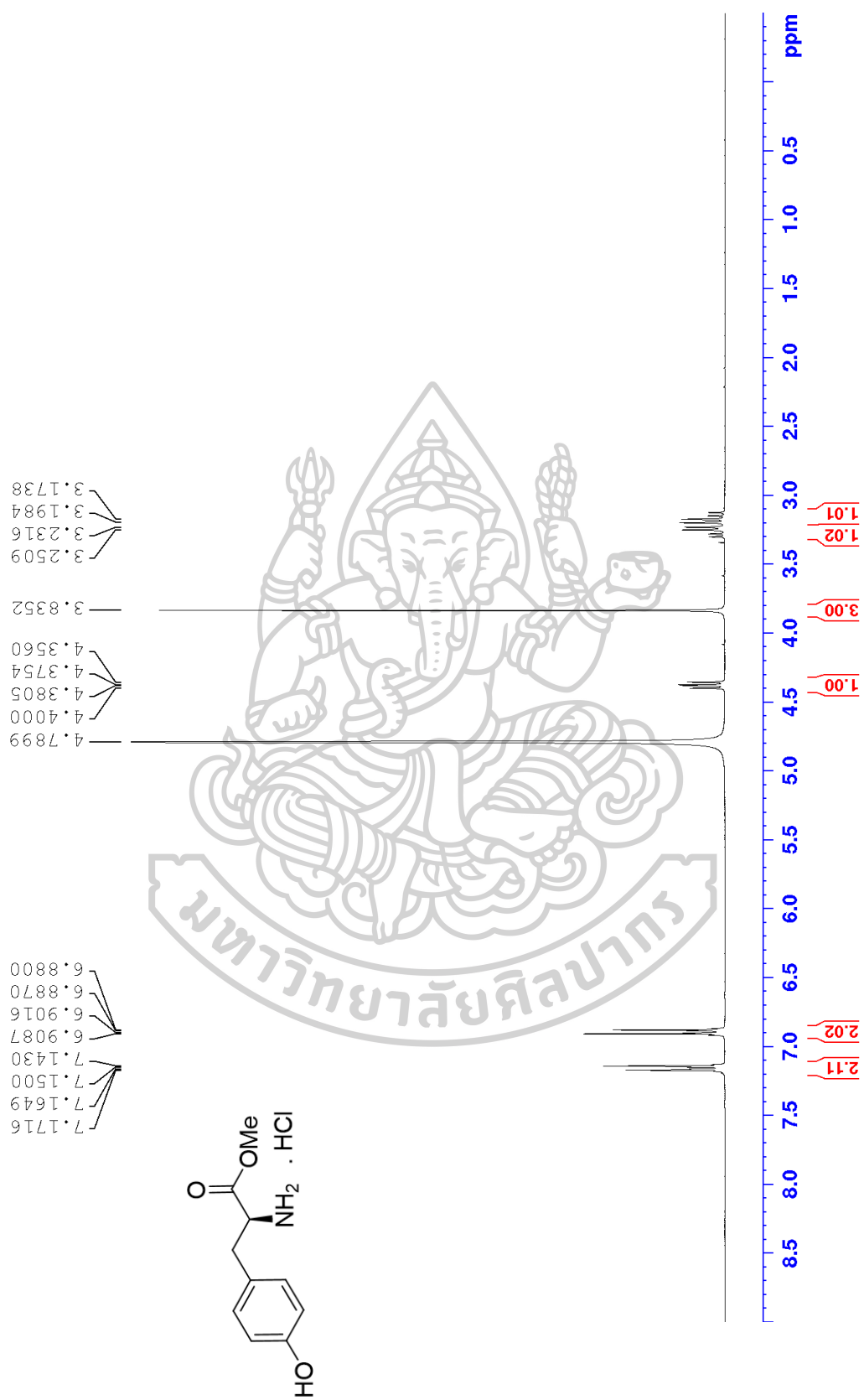


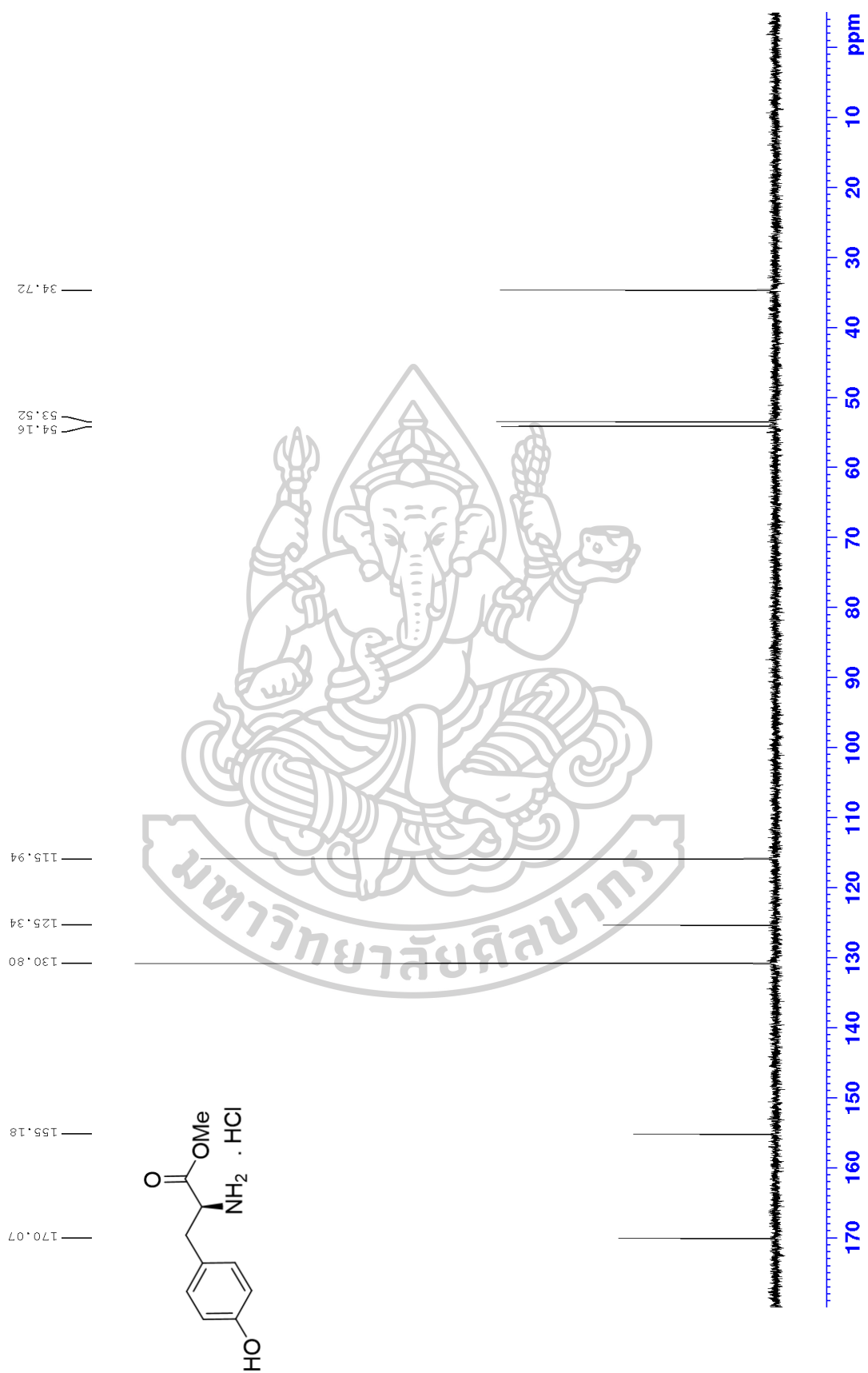


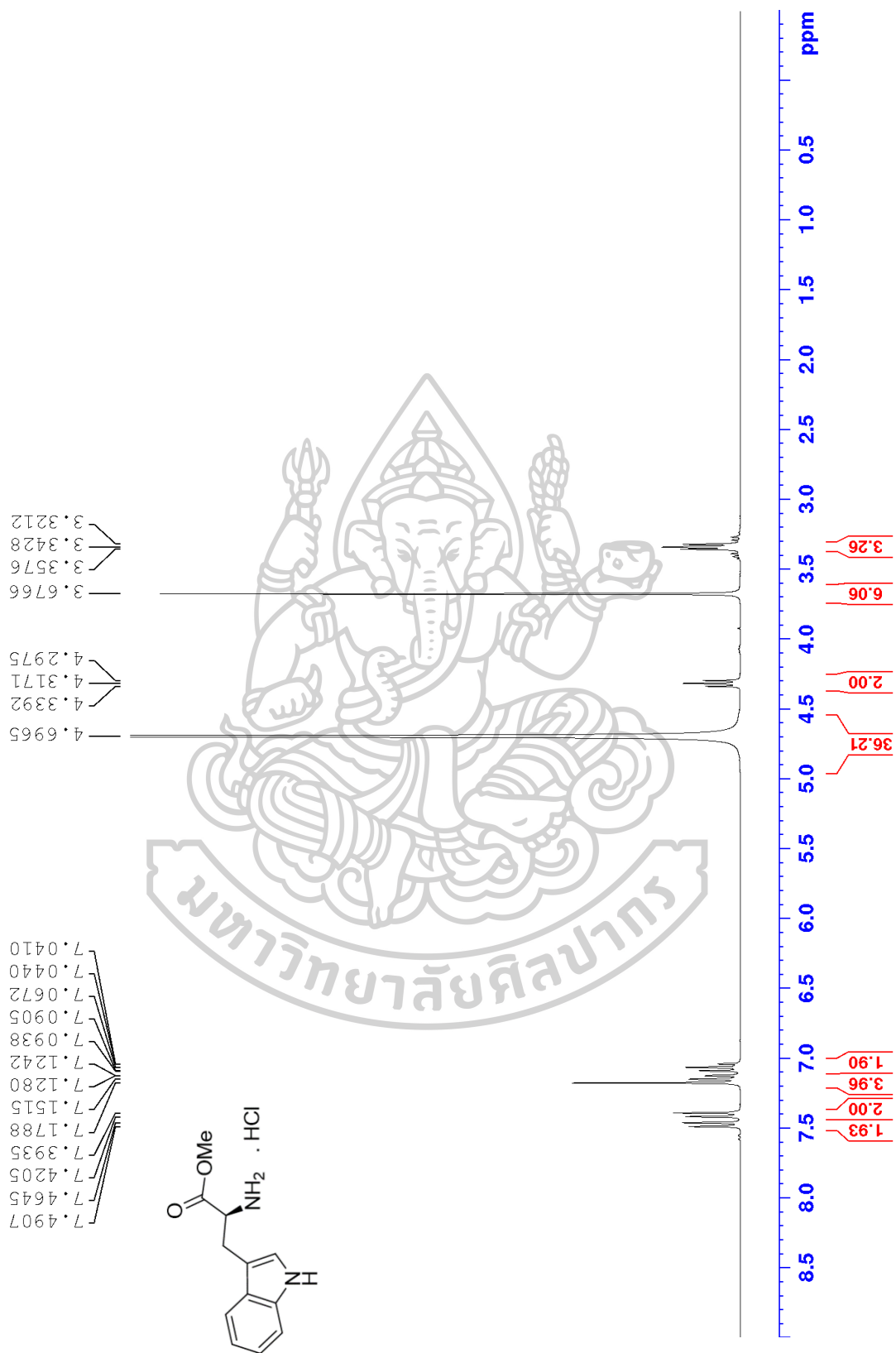
Geldanamycin

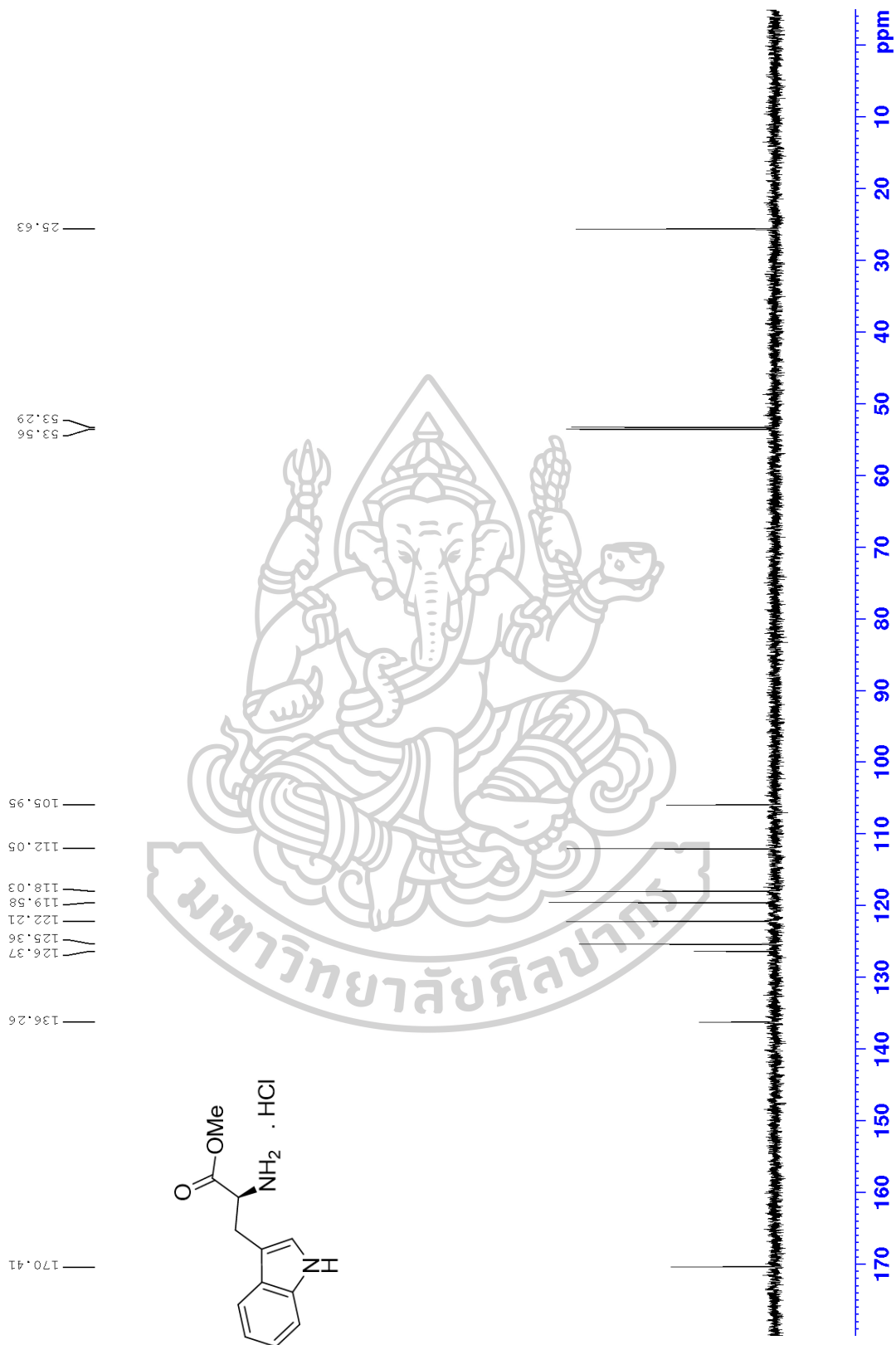


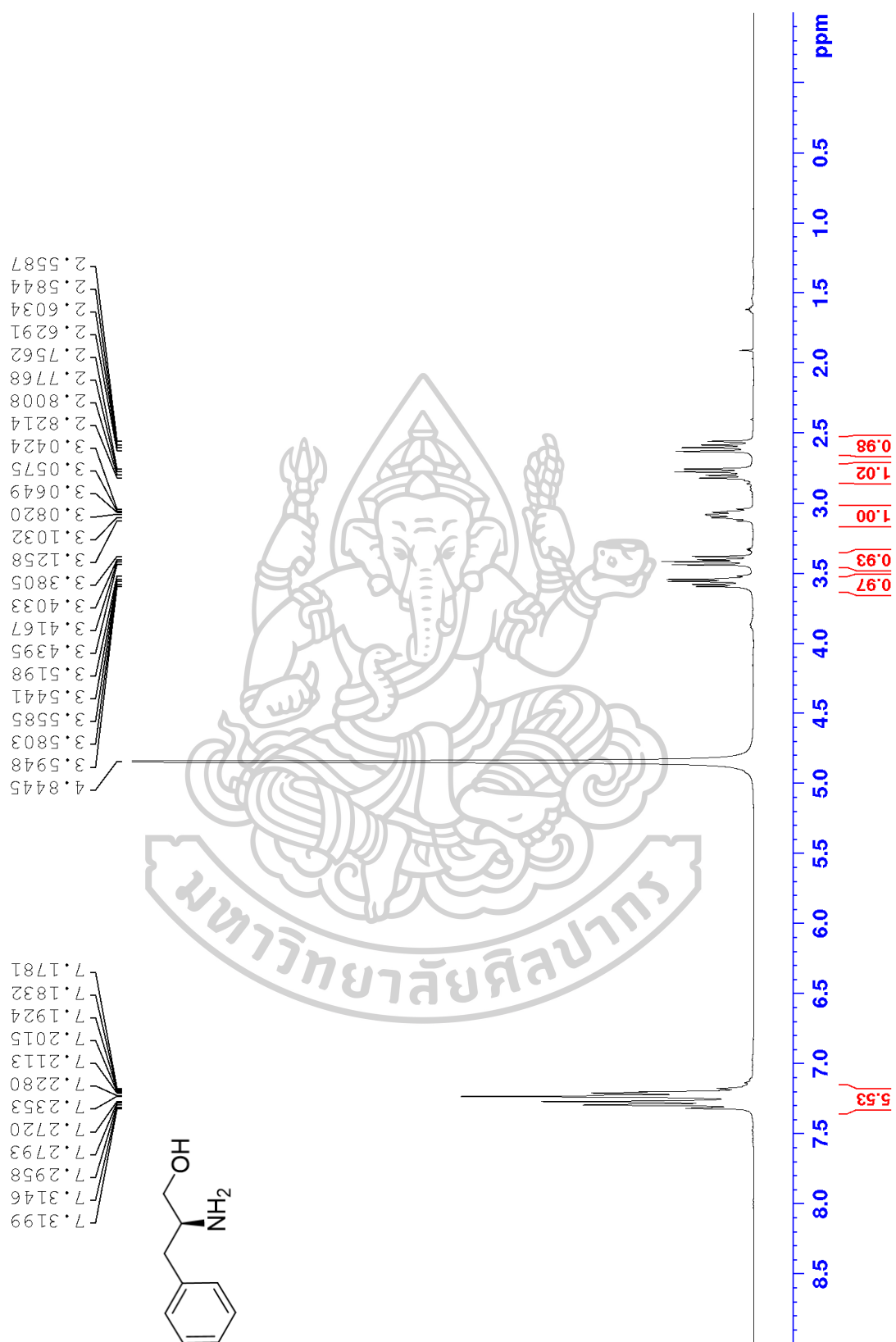


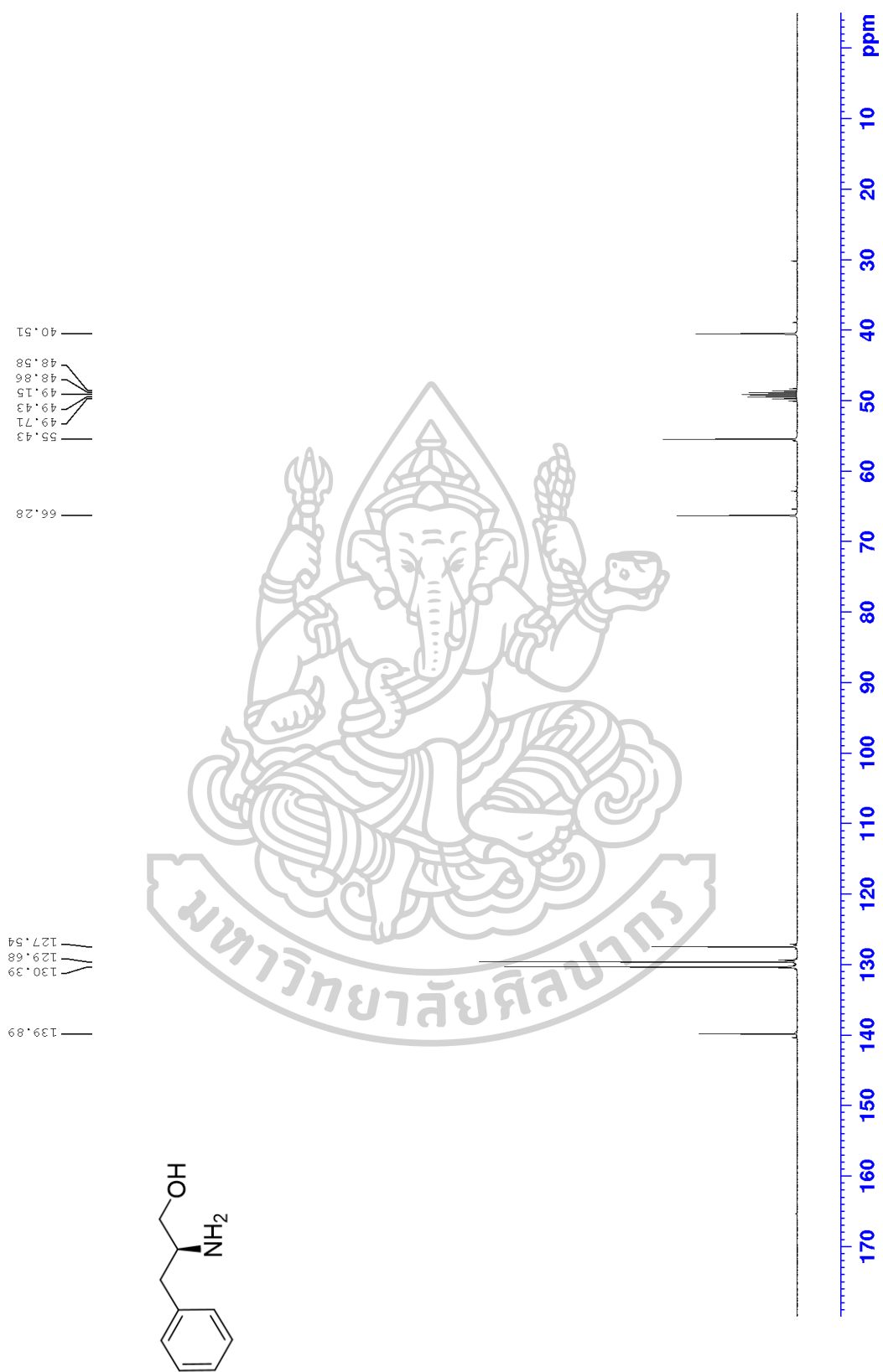


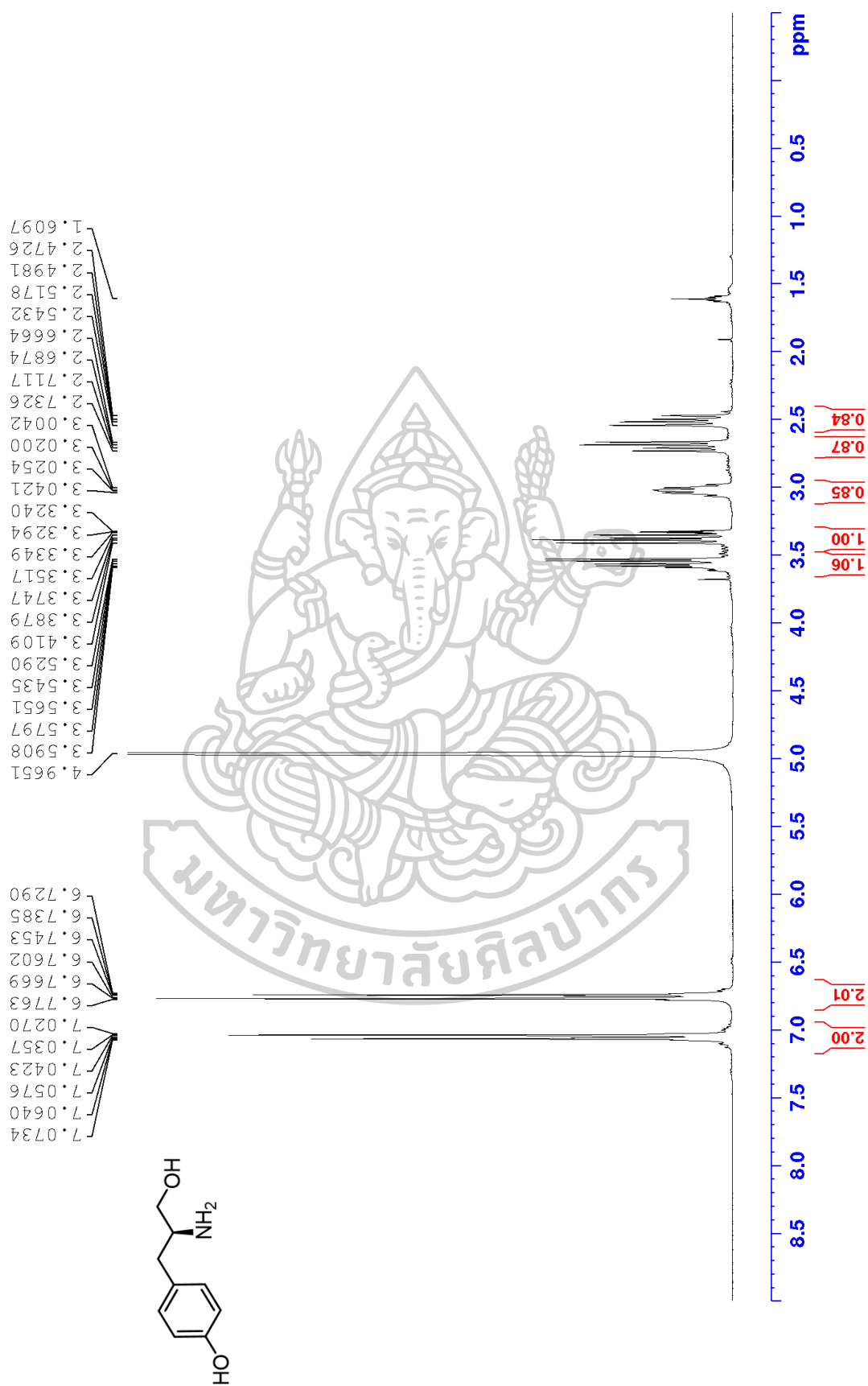


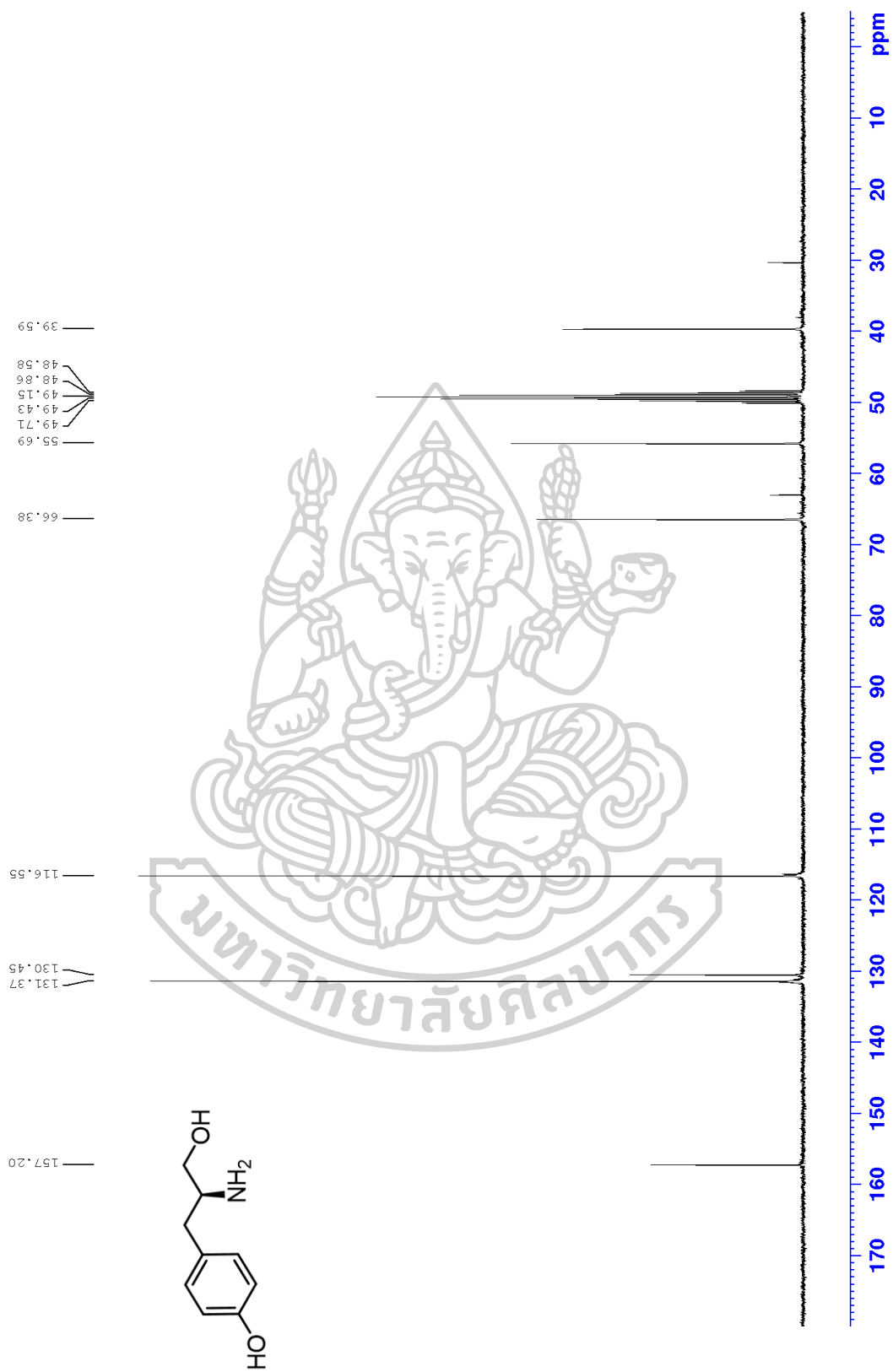


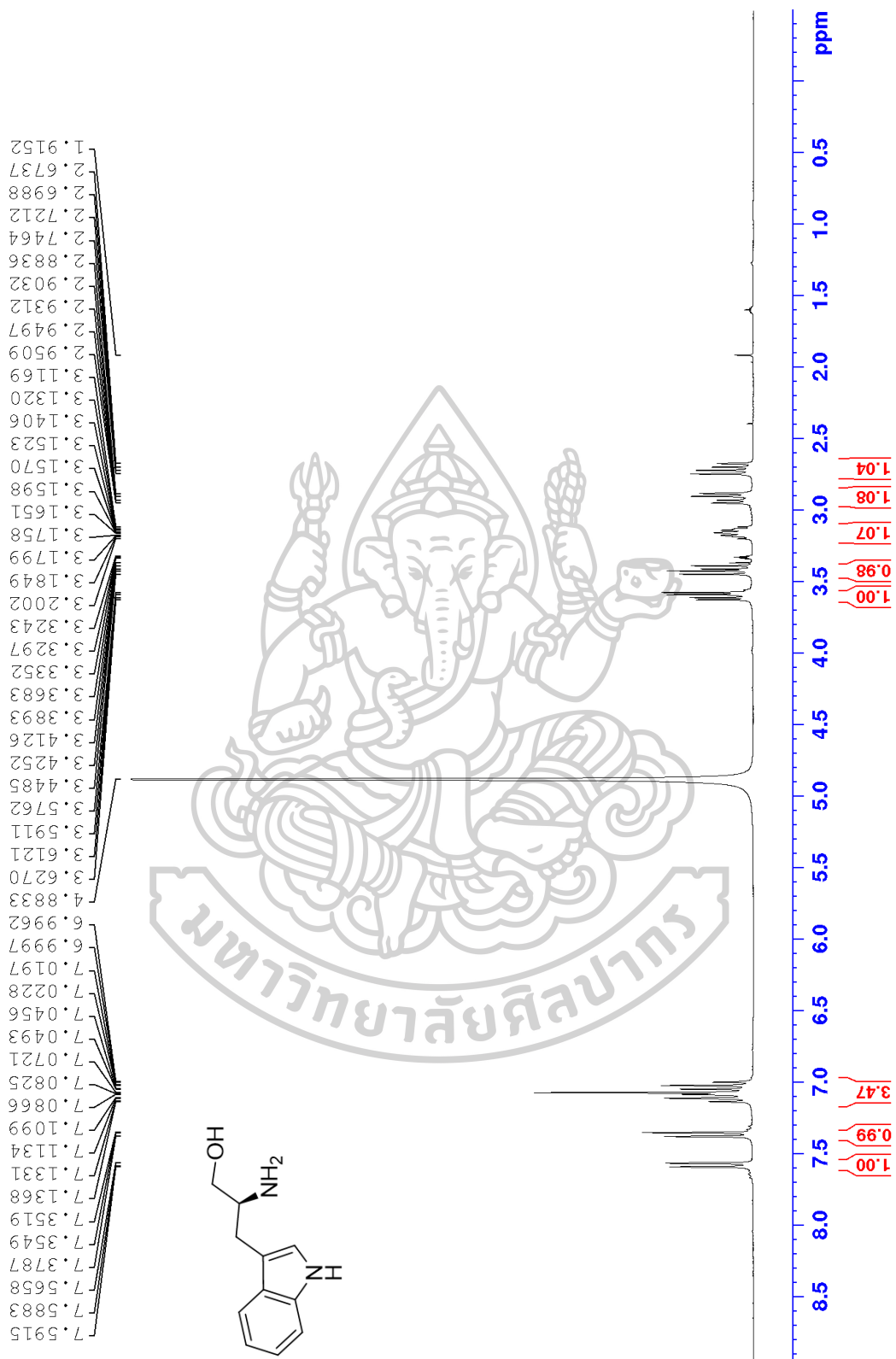


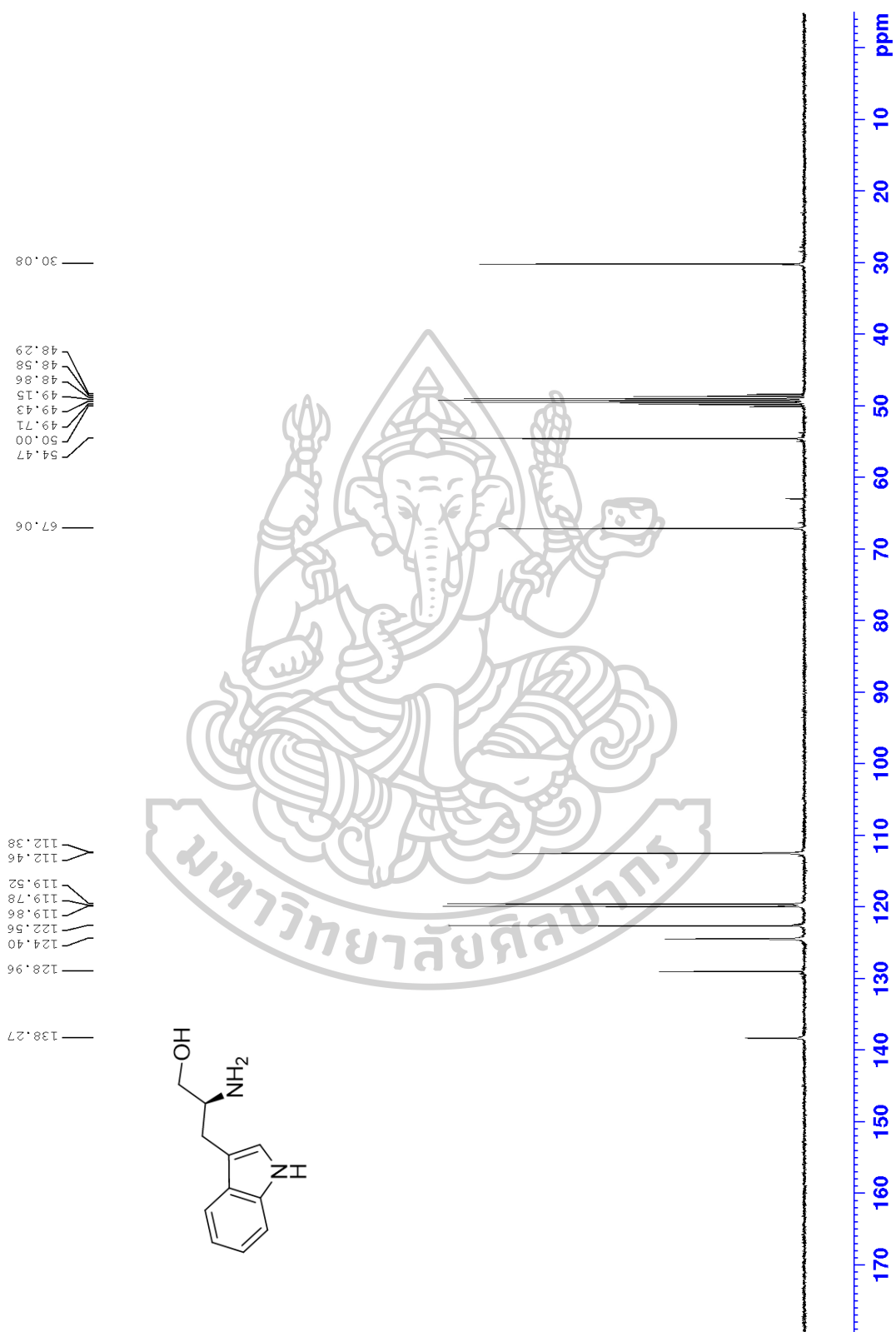


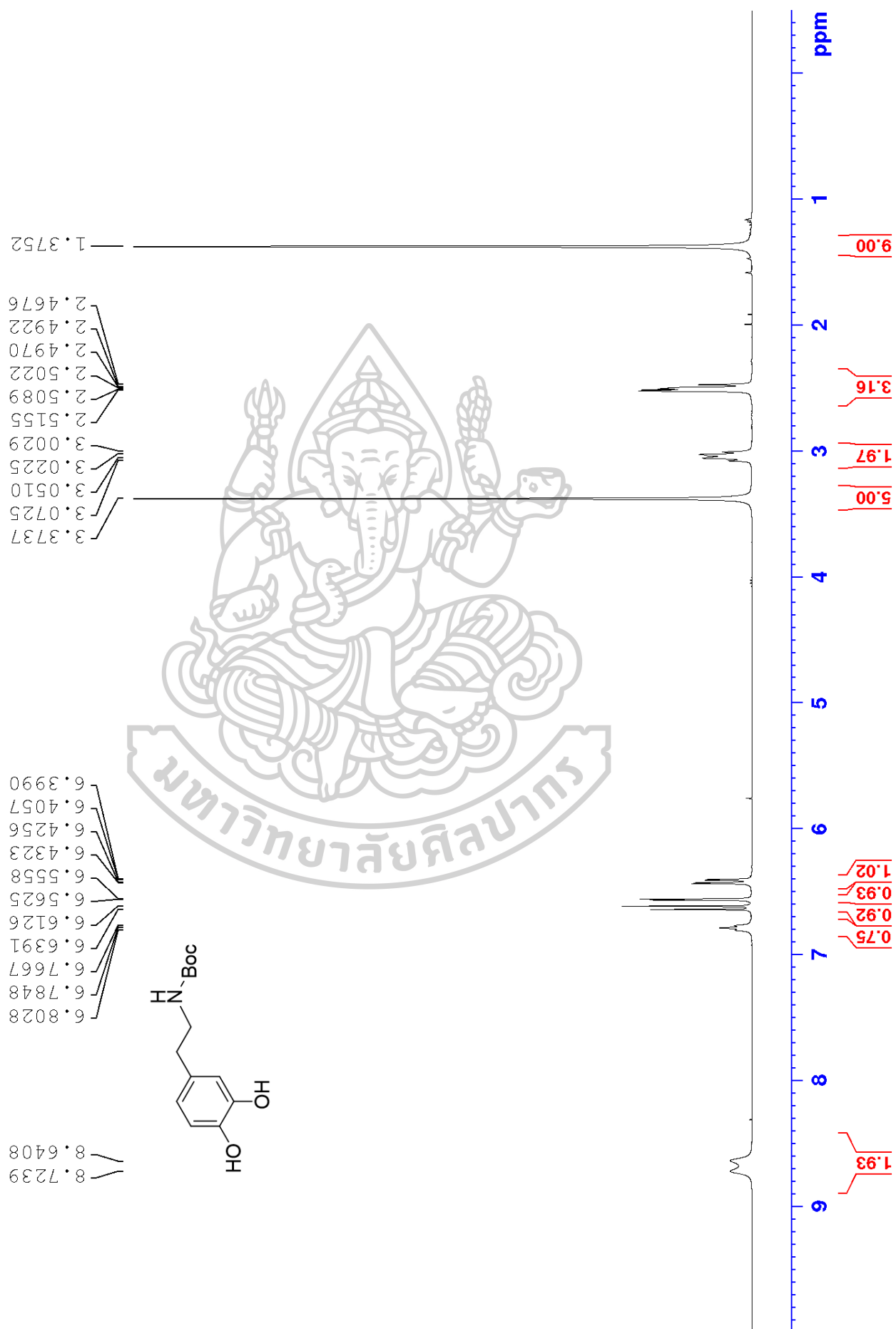


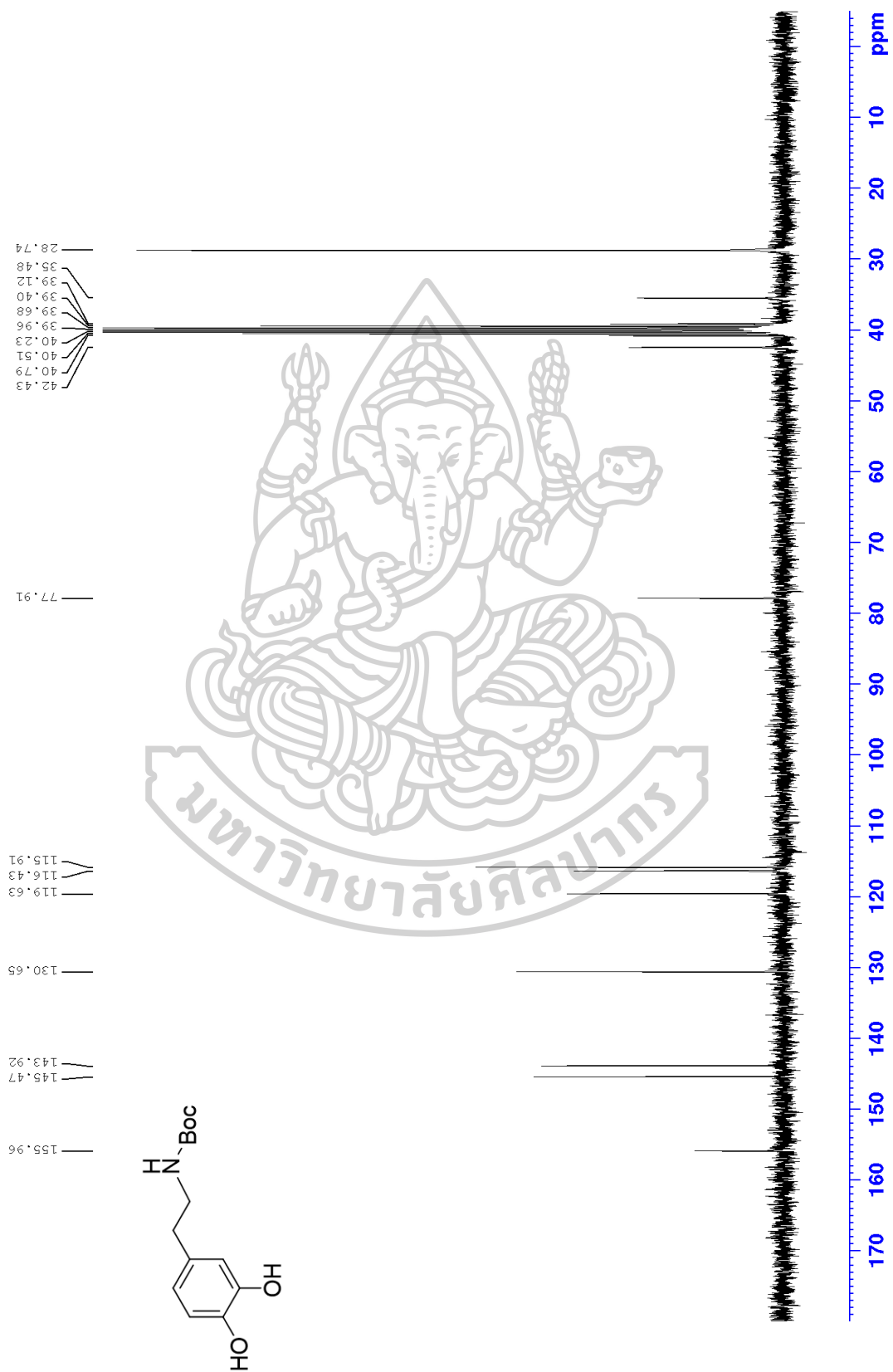


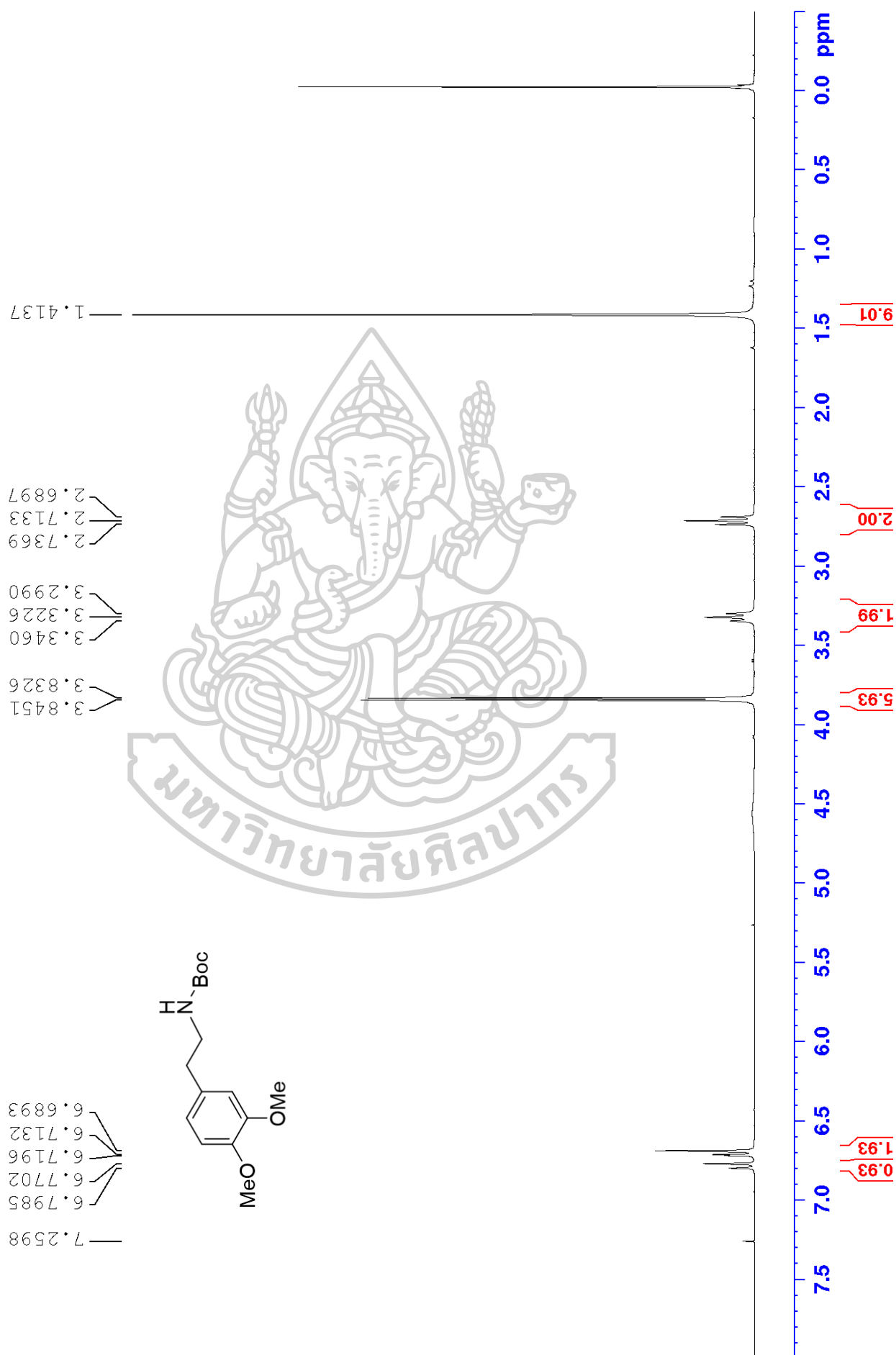


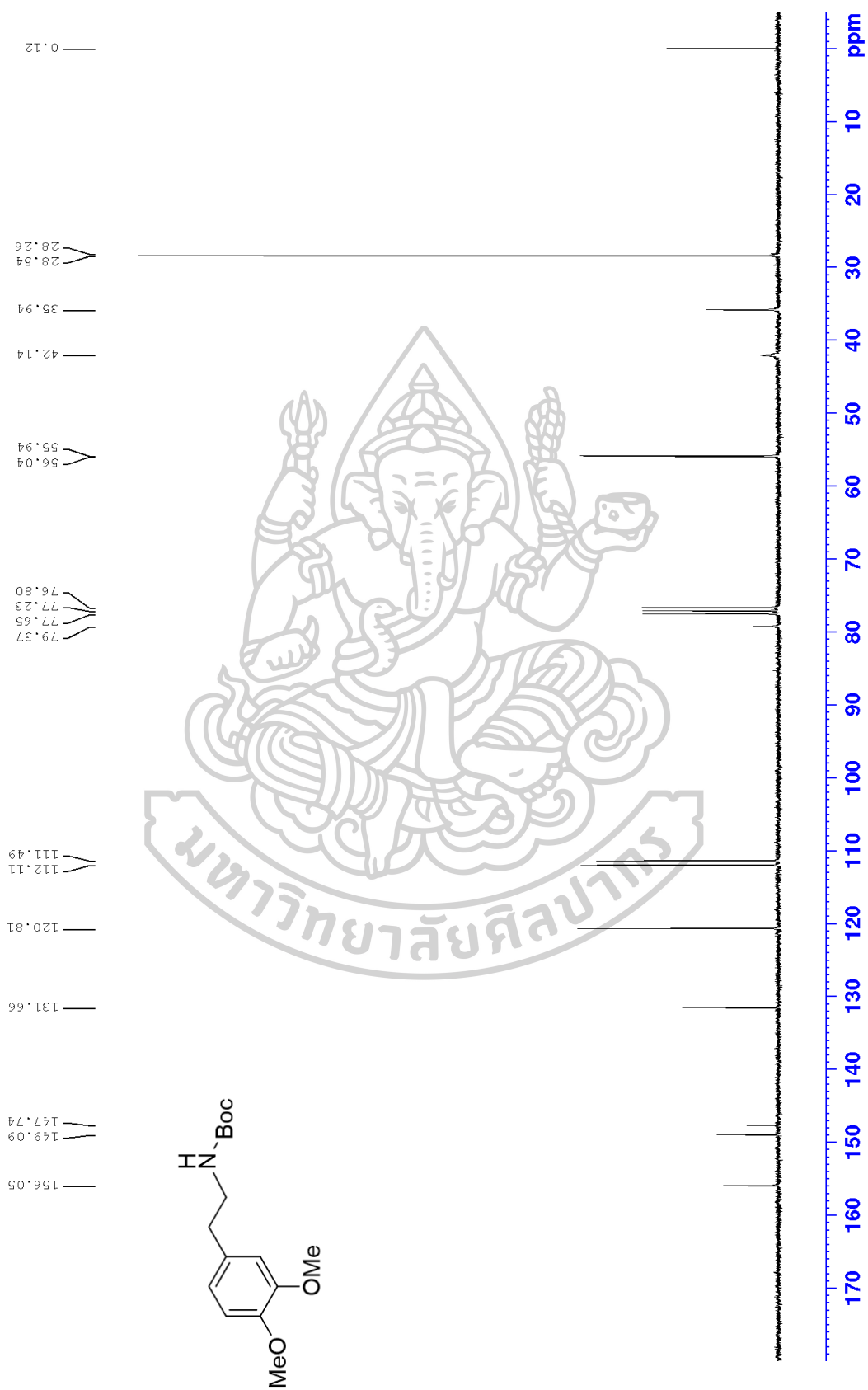


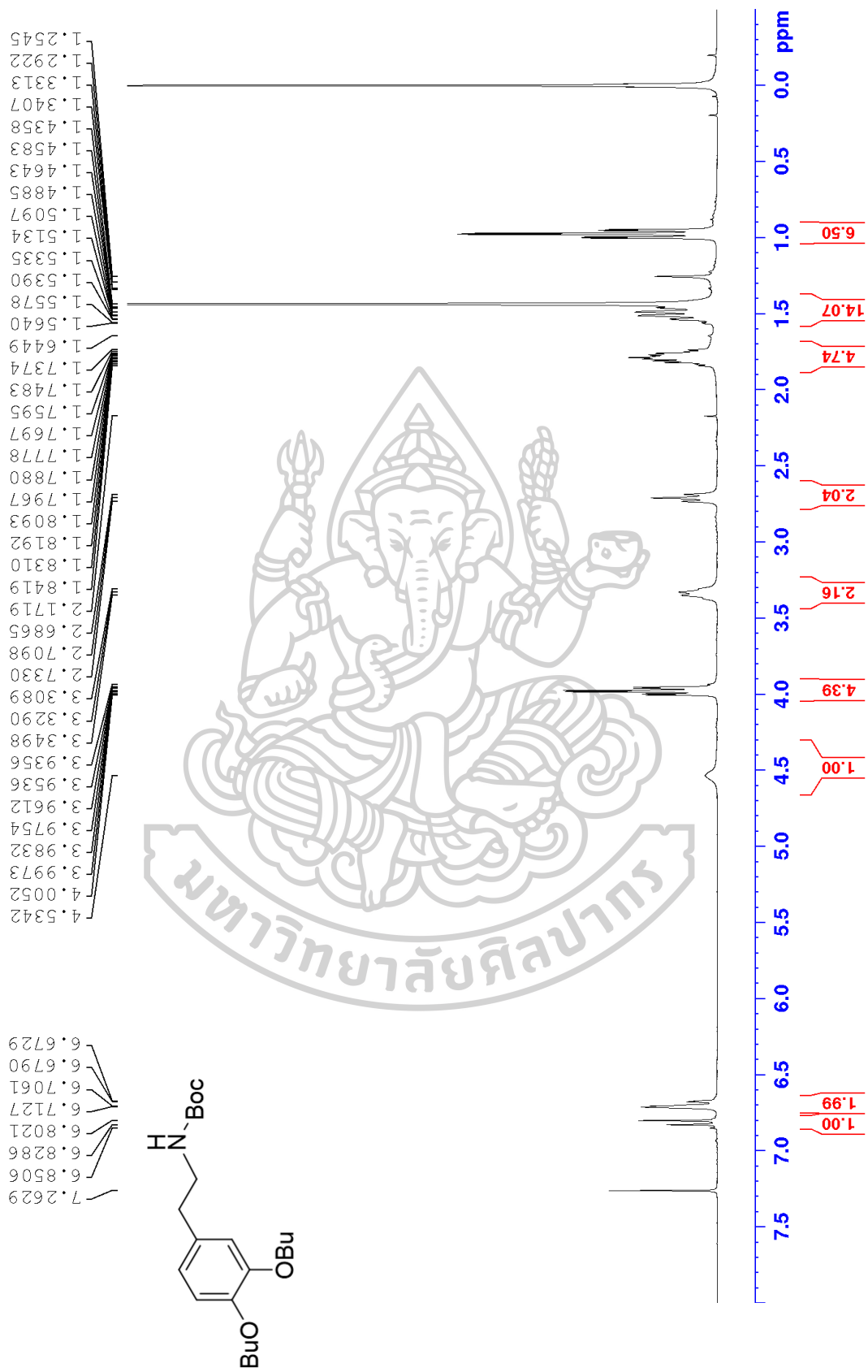


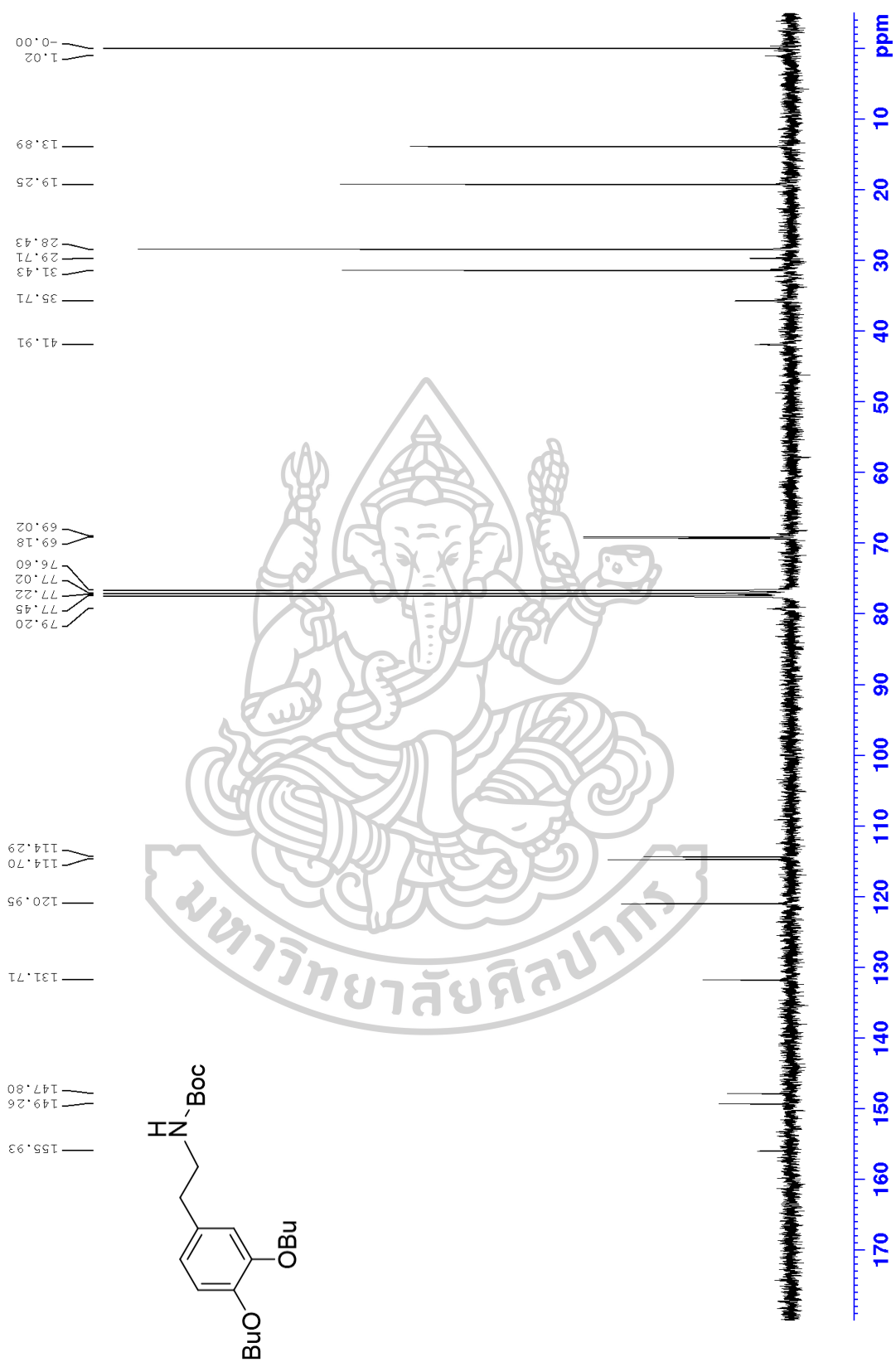


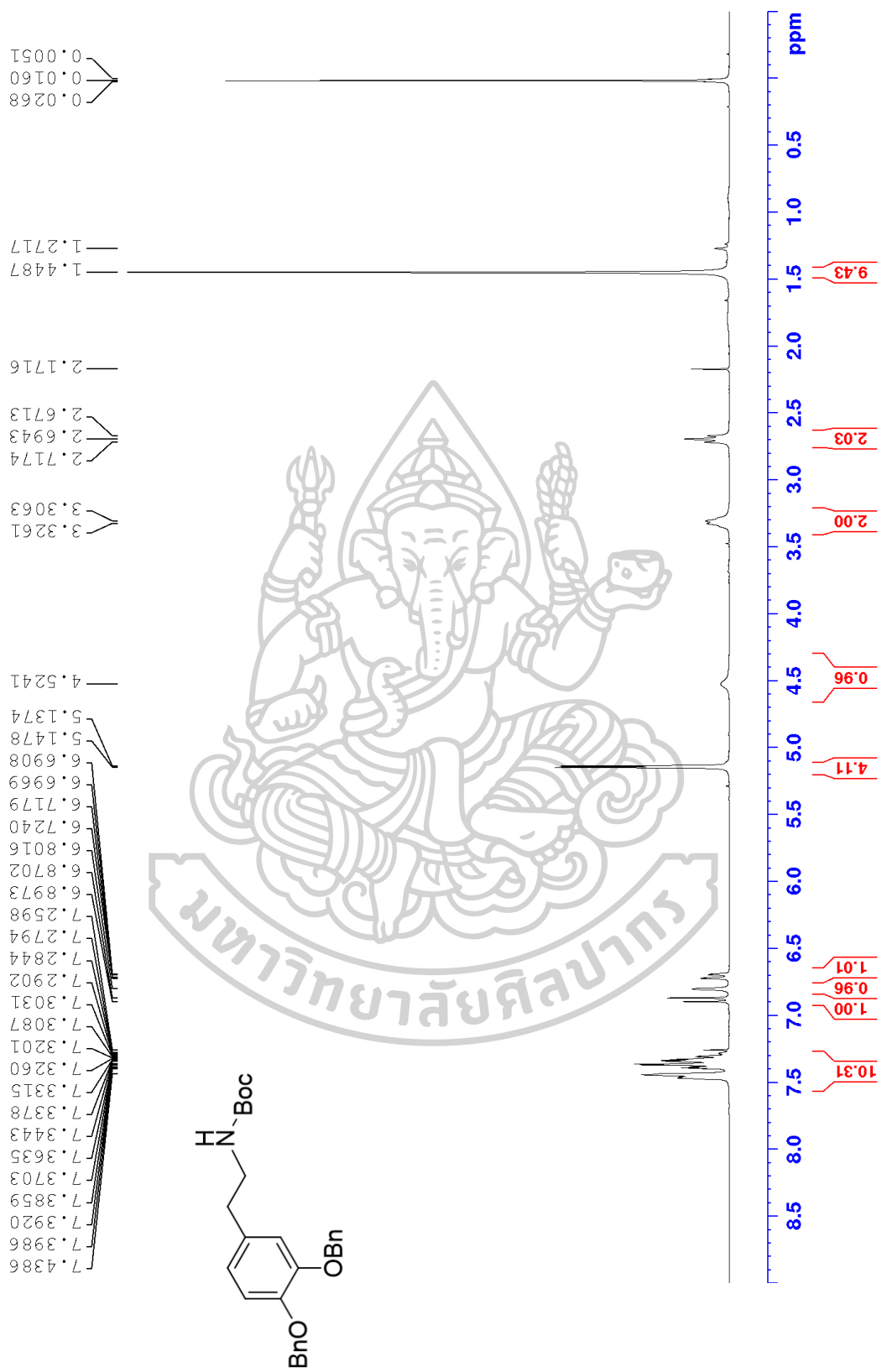


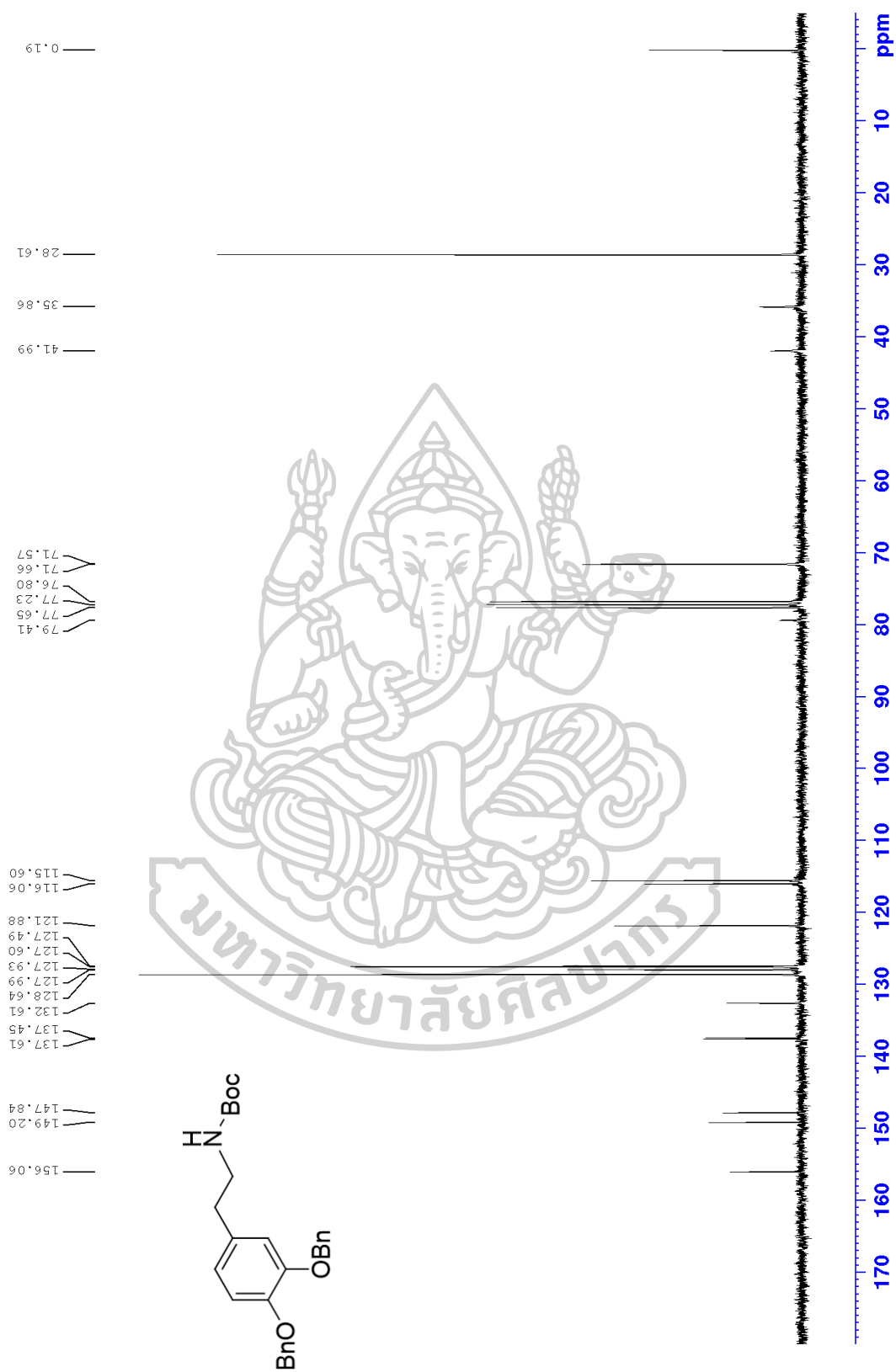


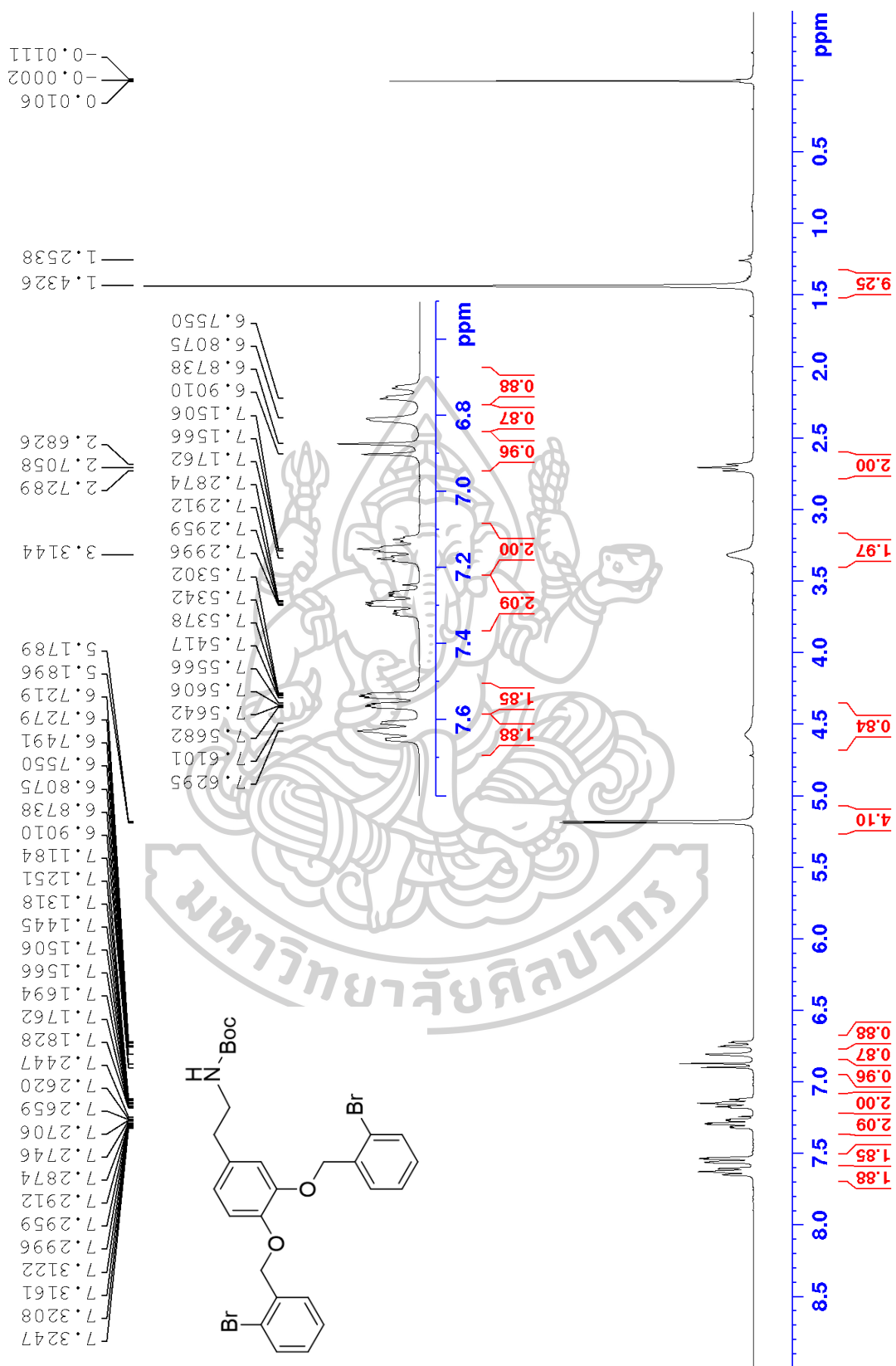


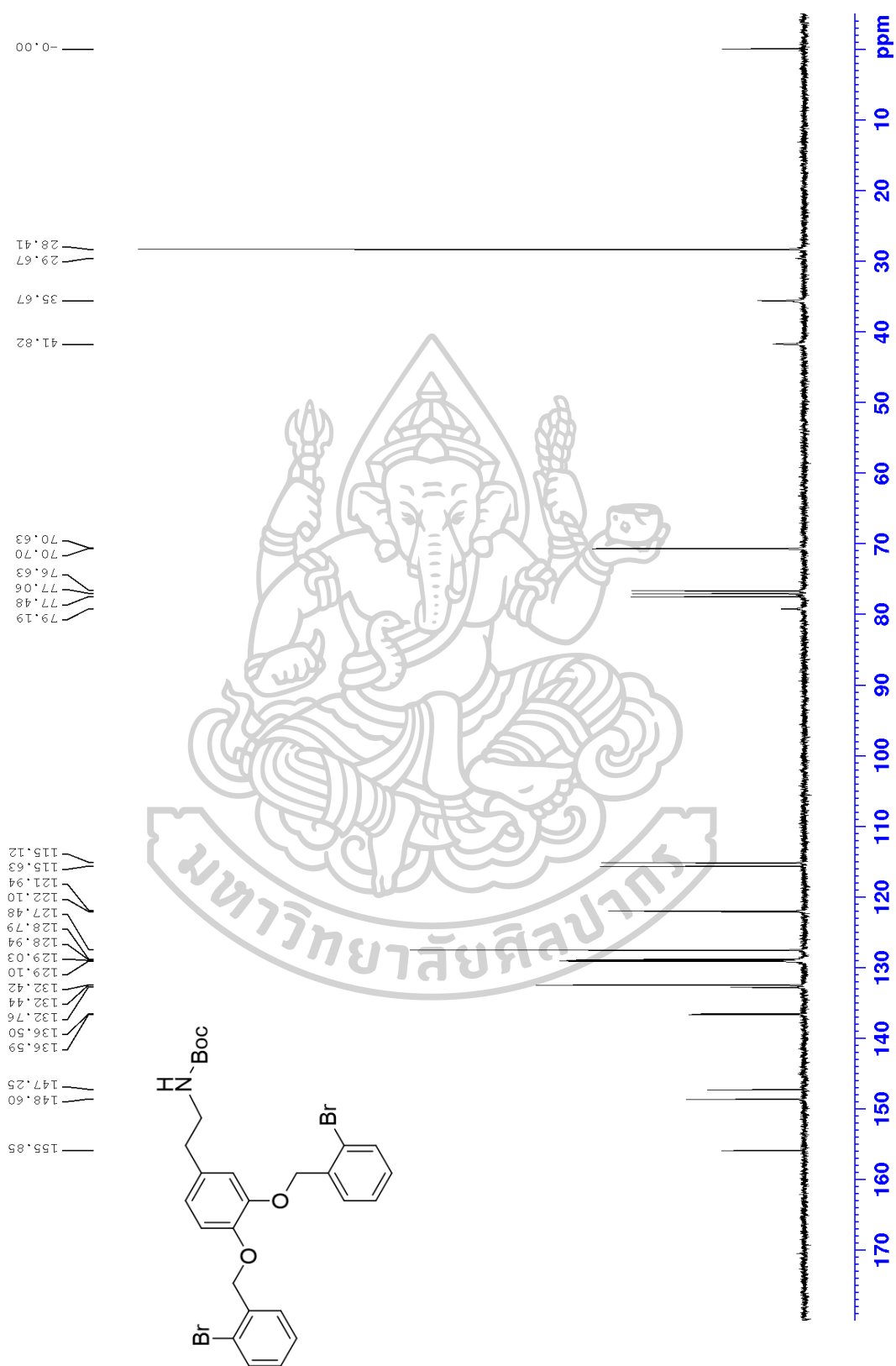


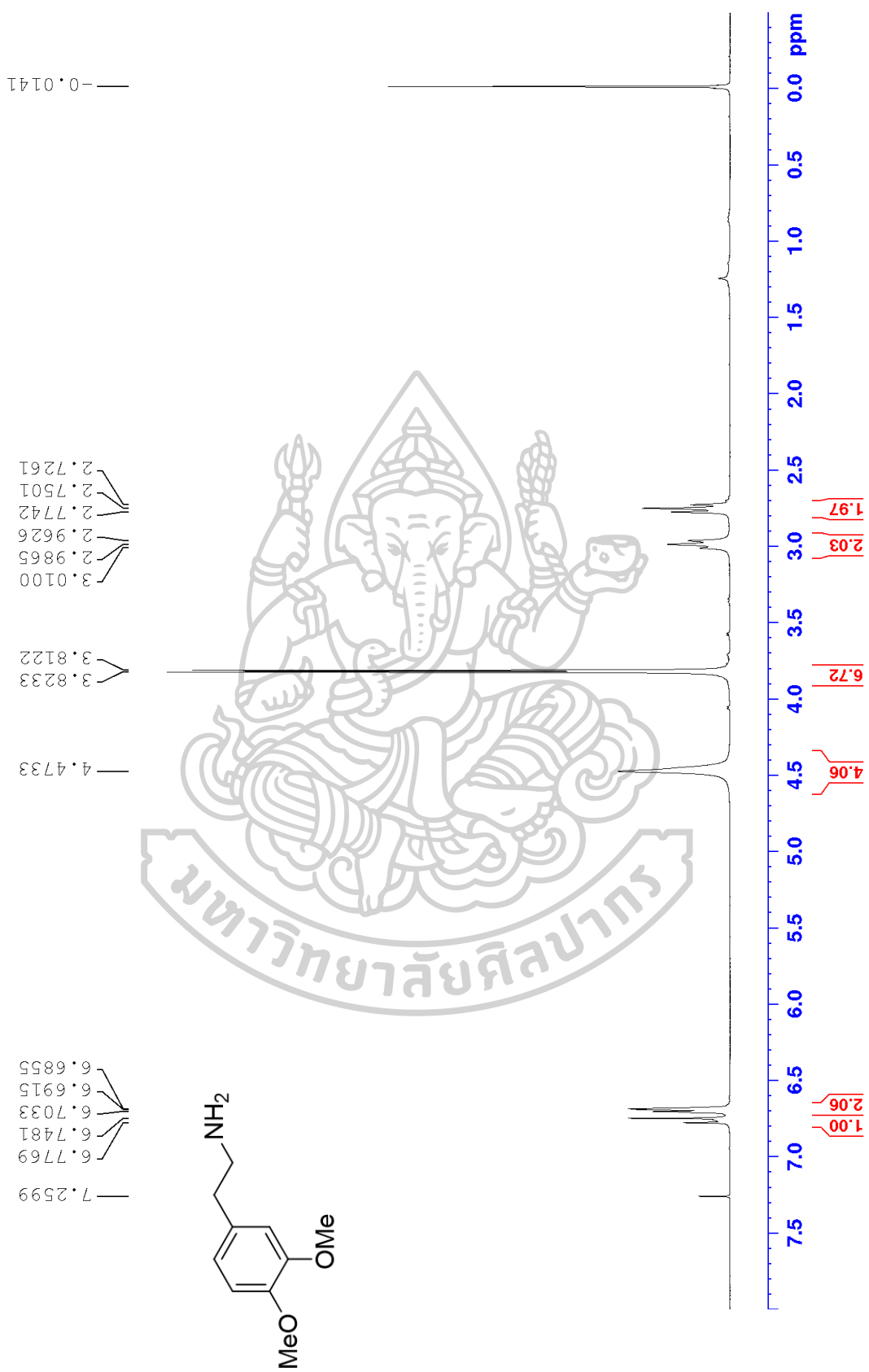


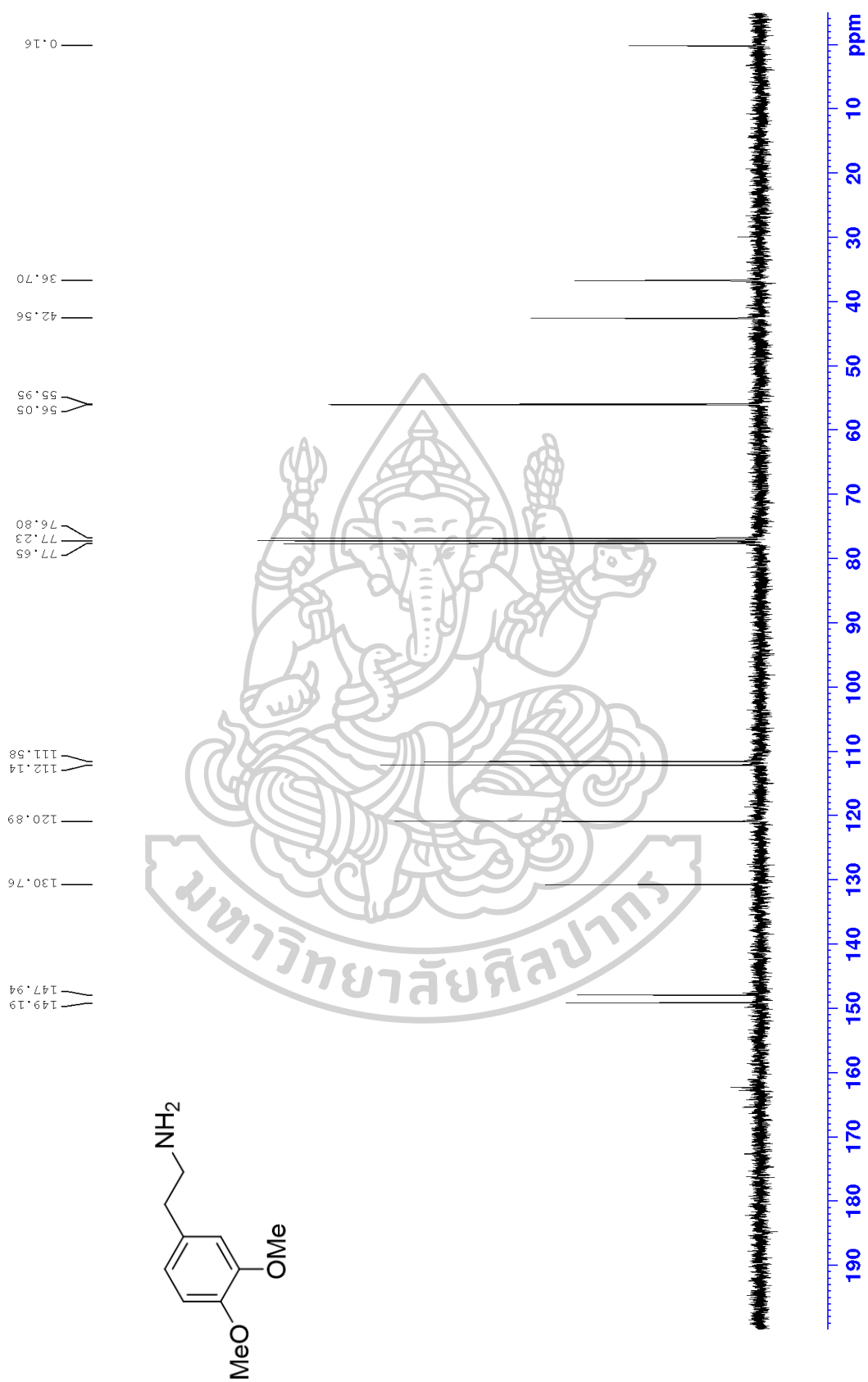


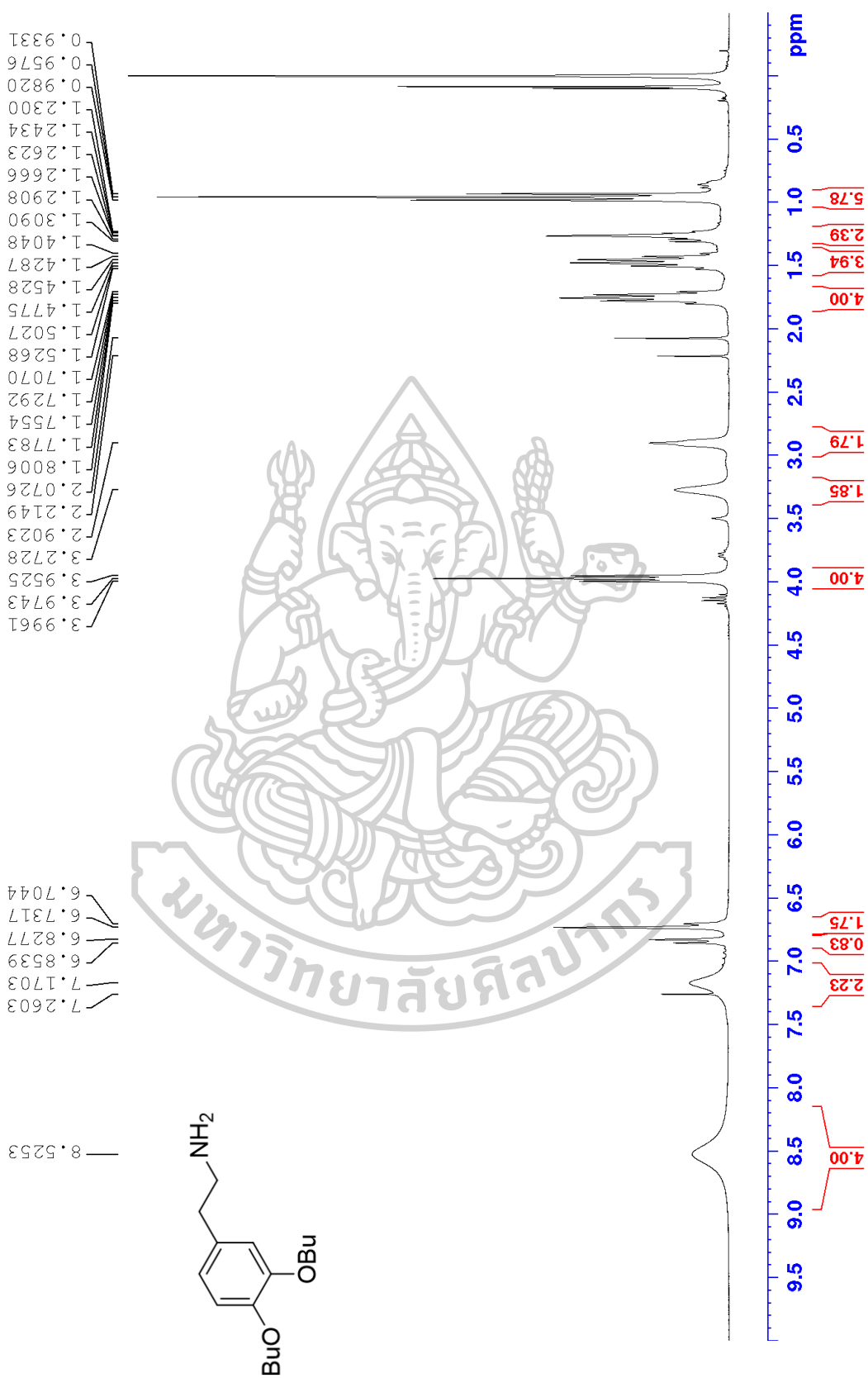


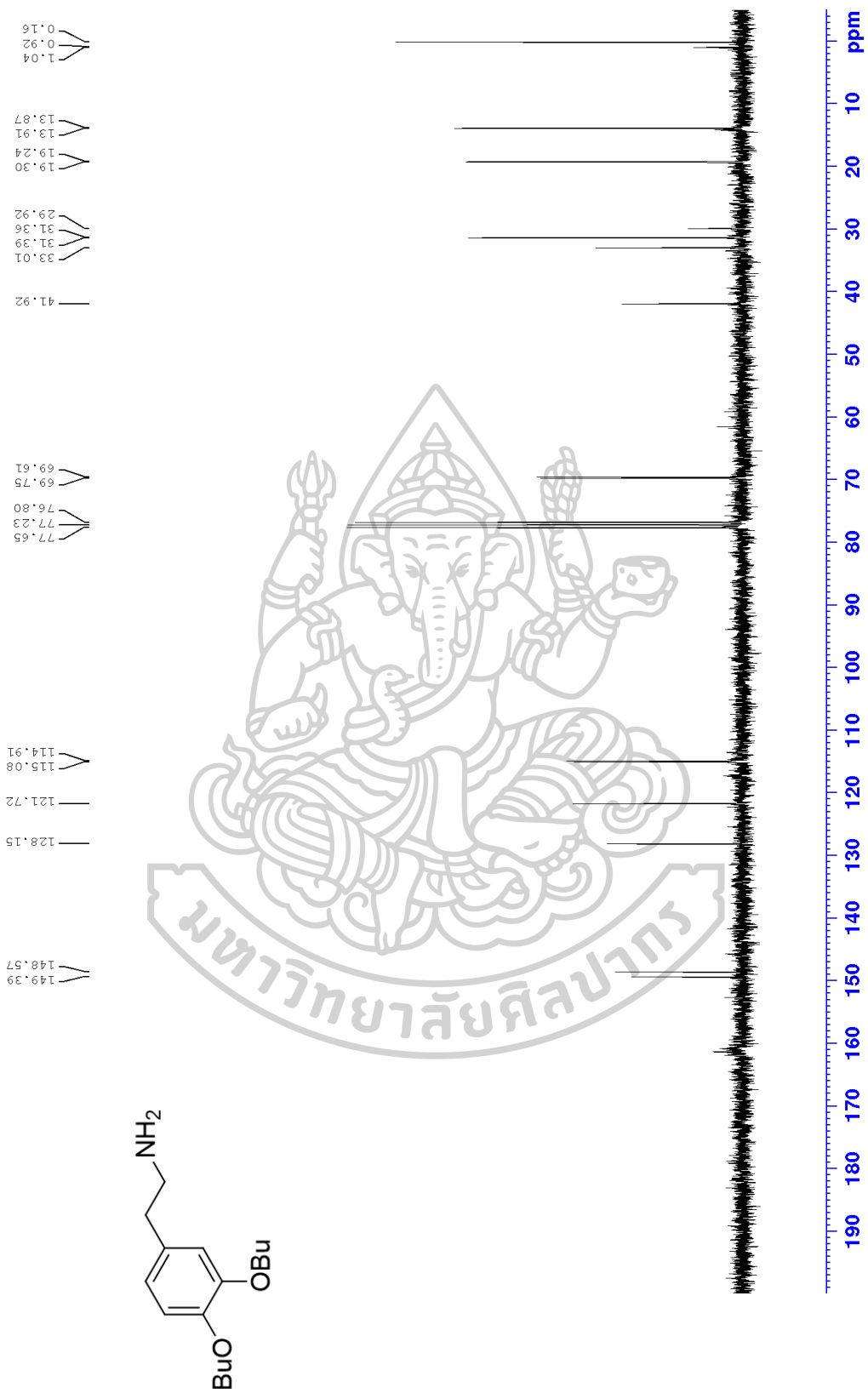


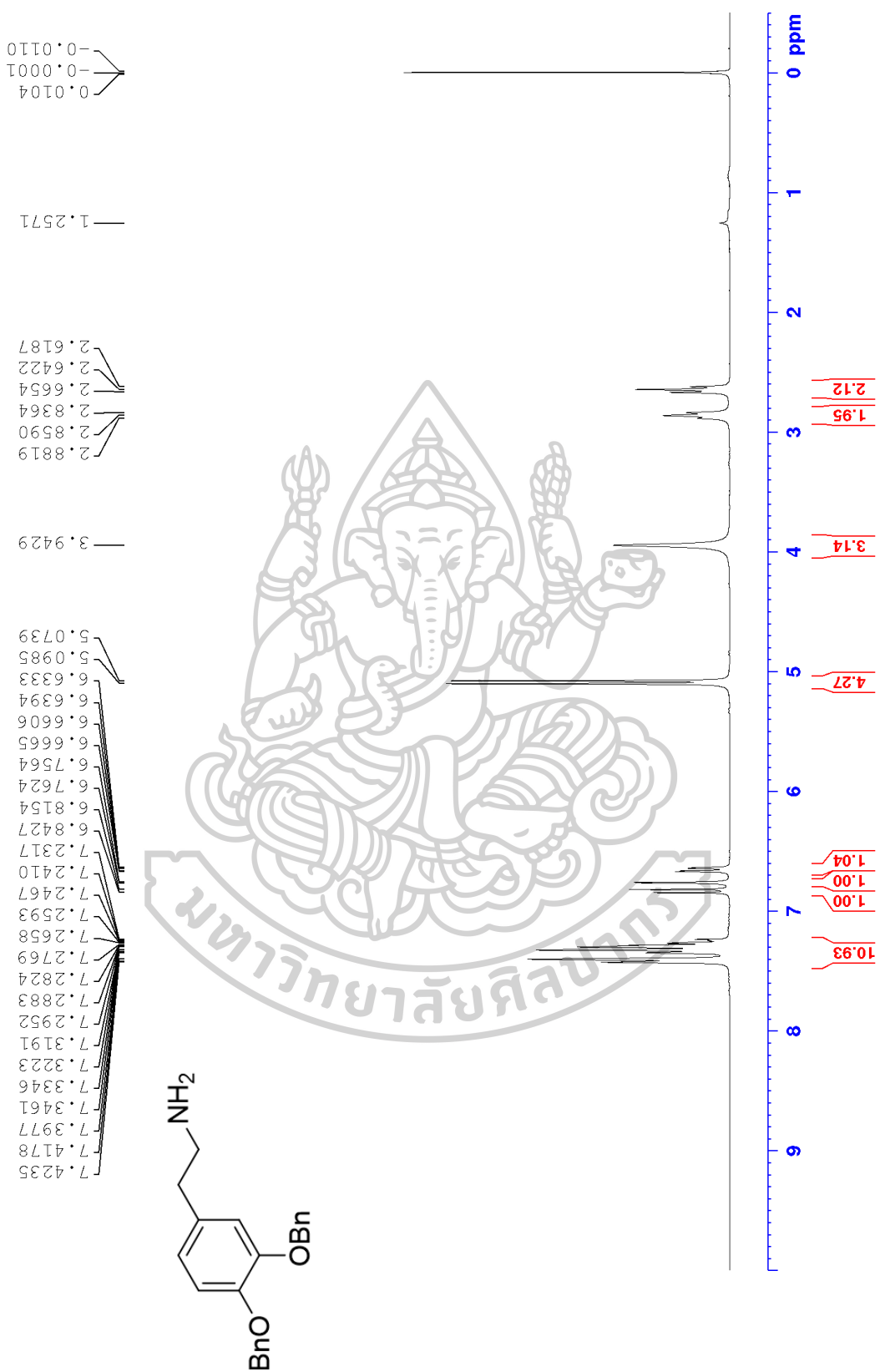


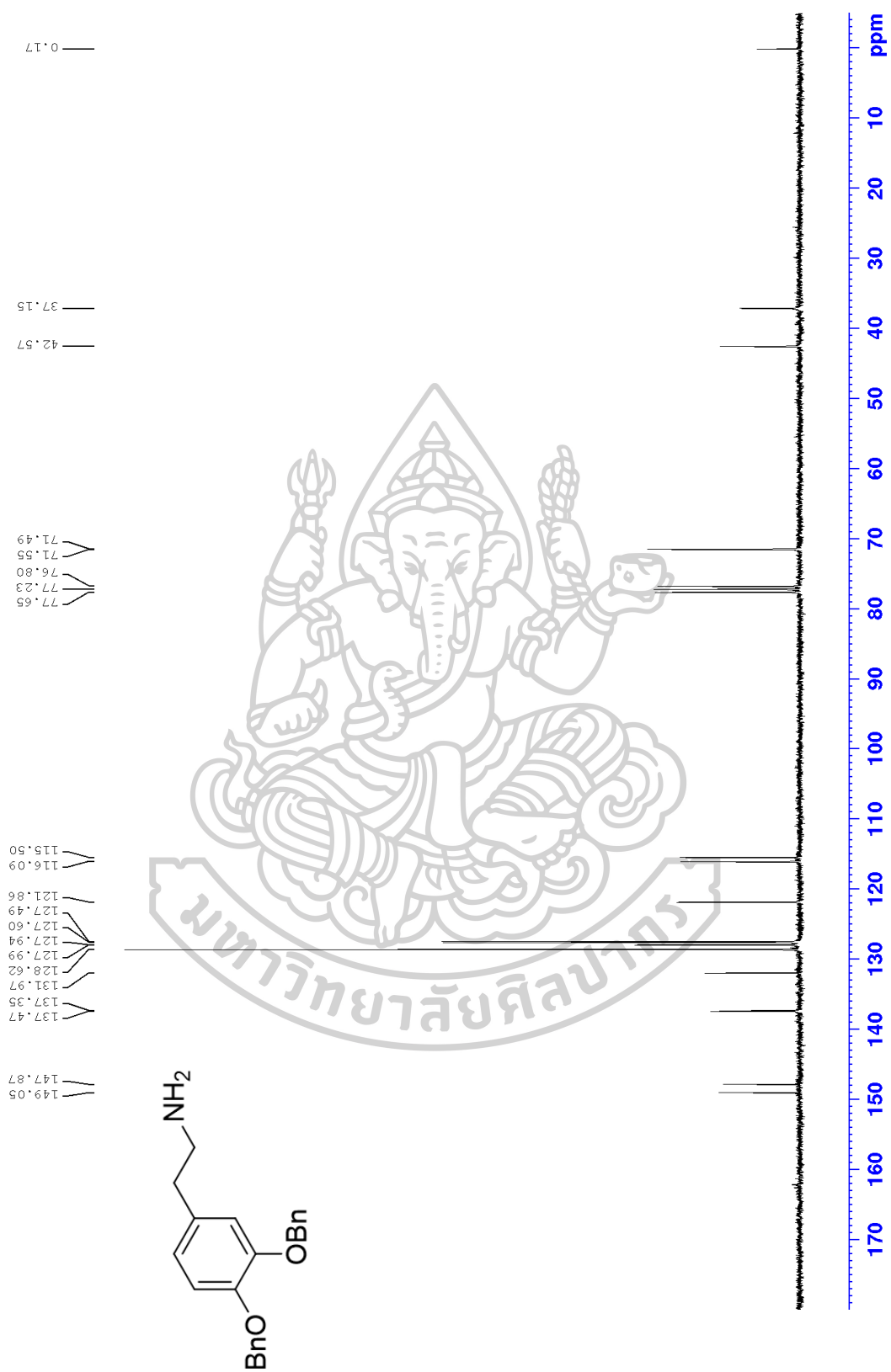


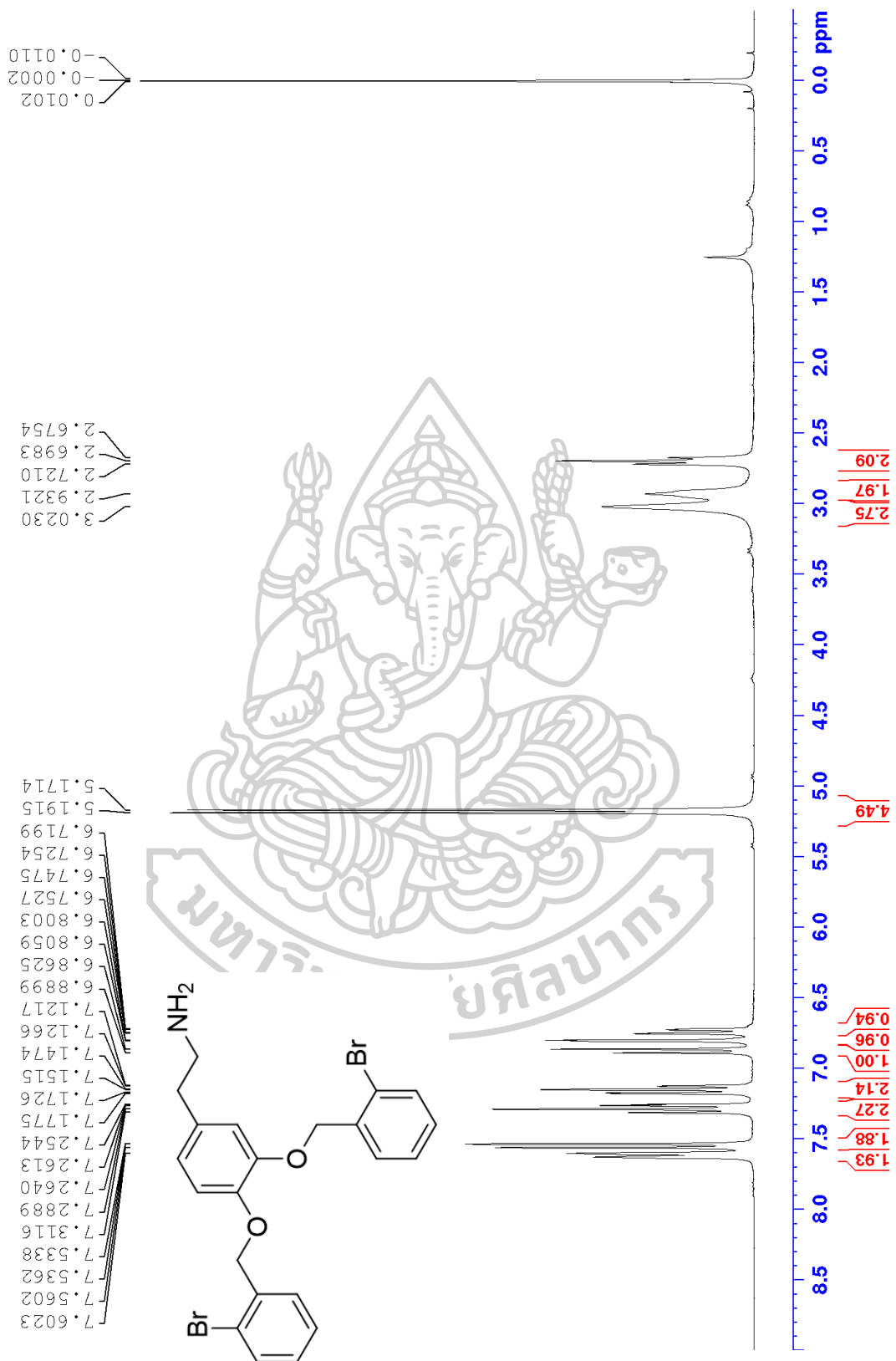


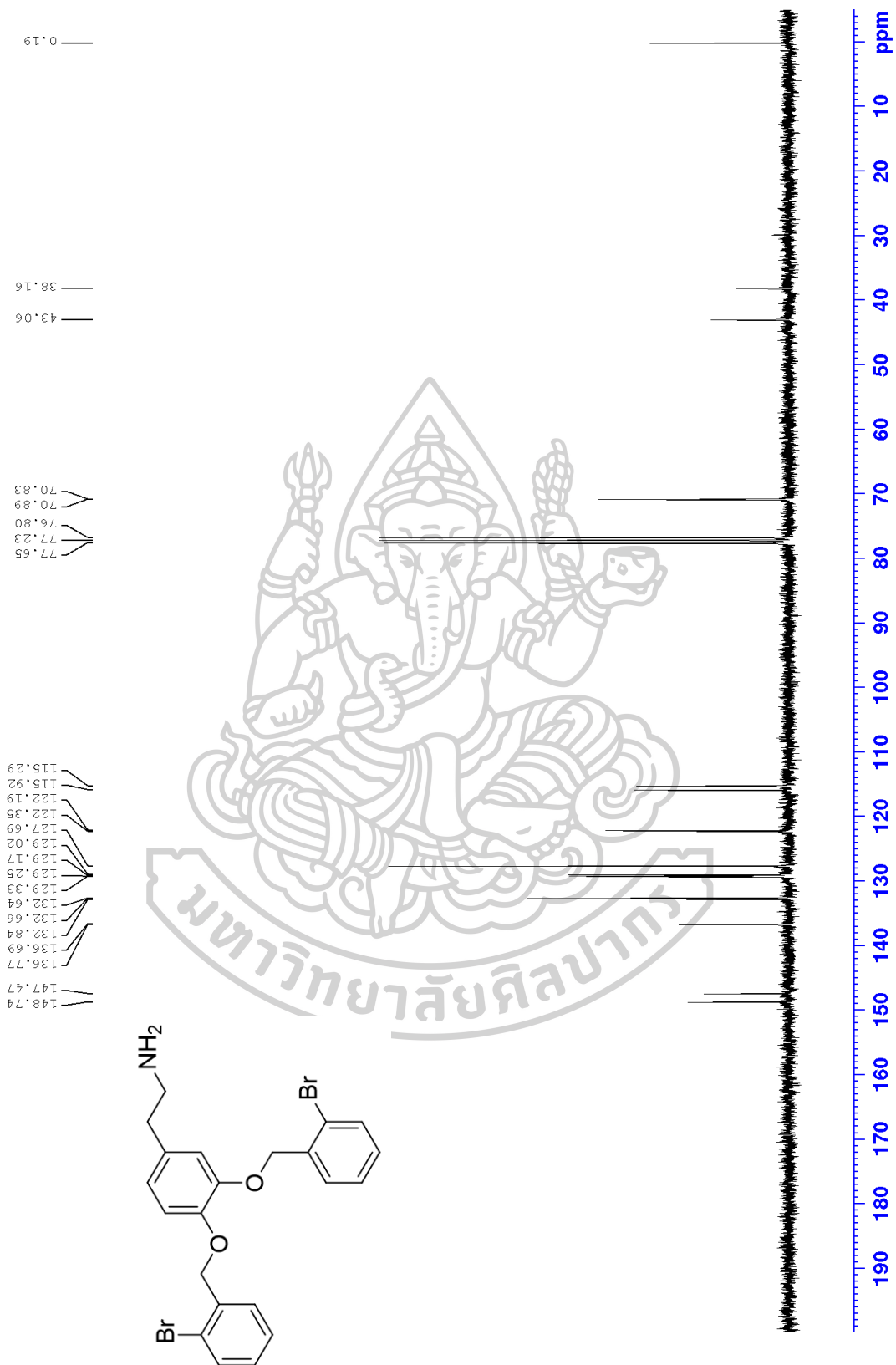


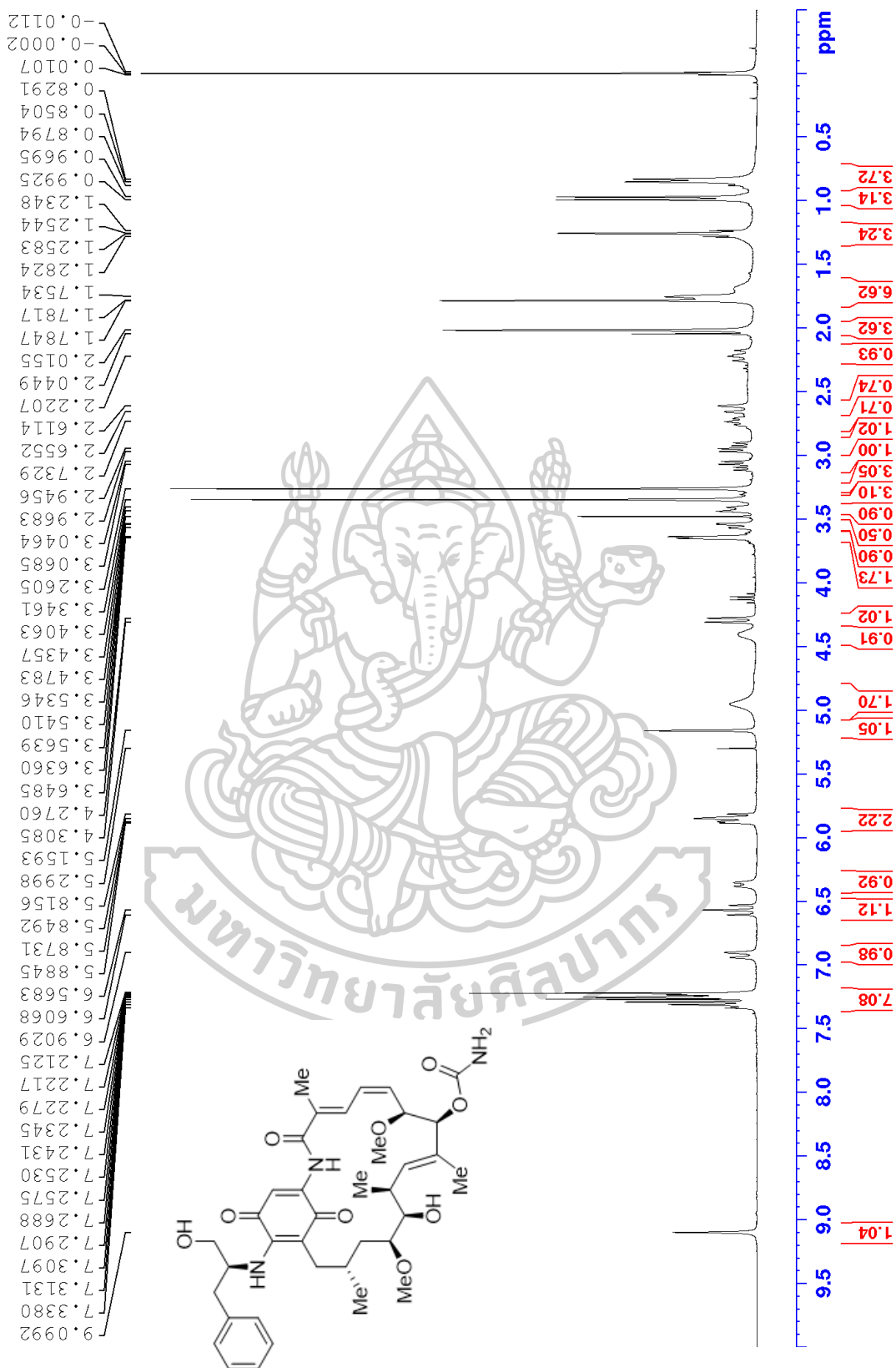


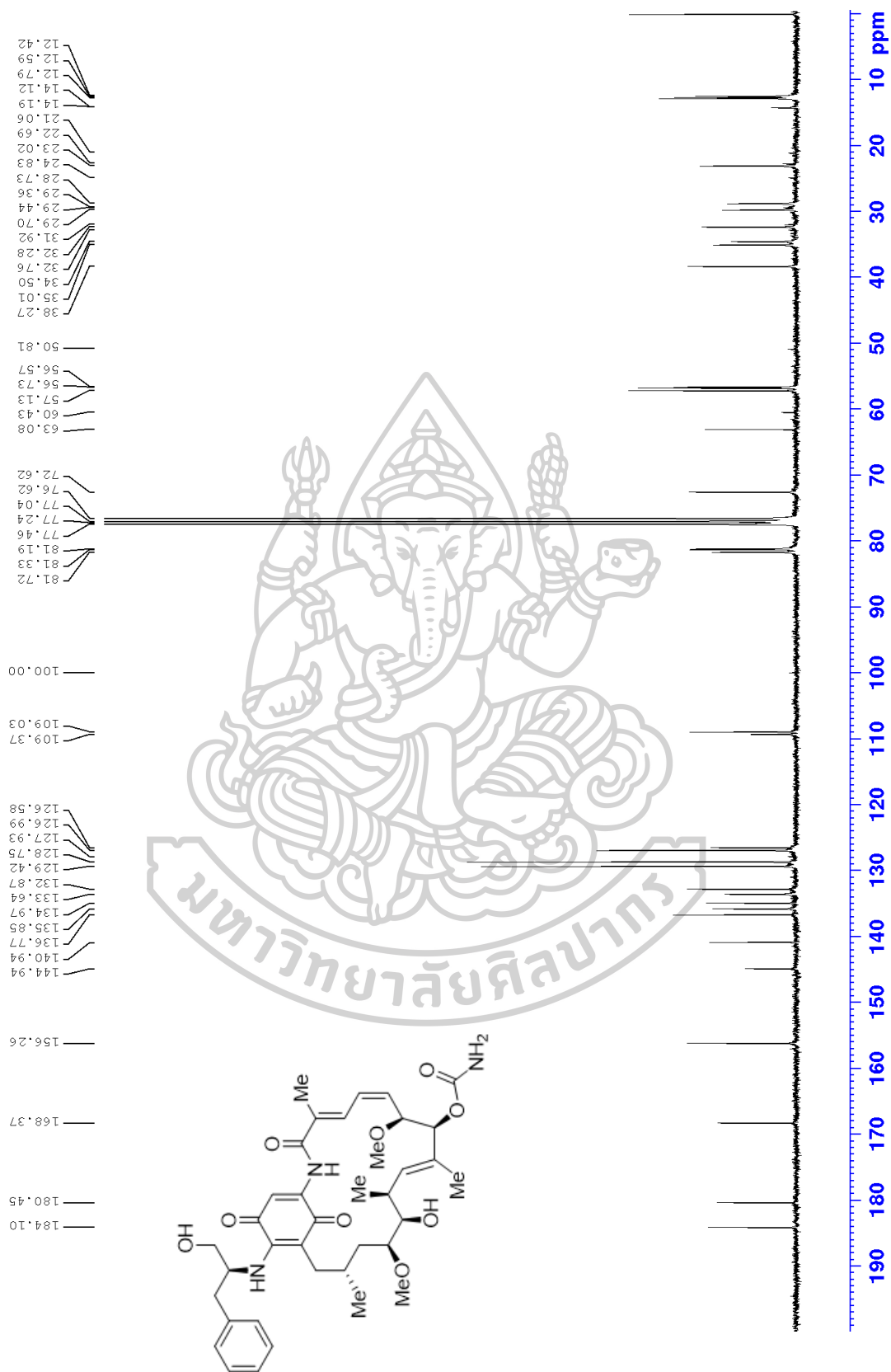


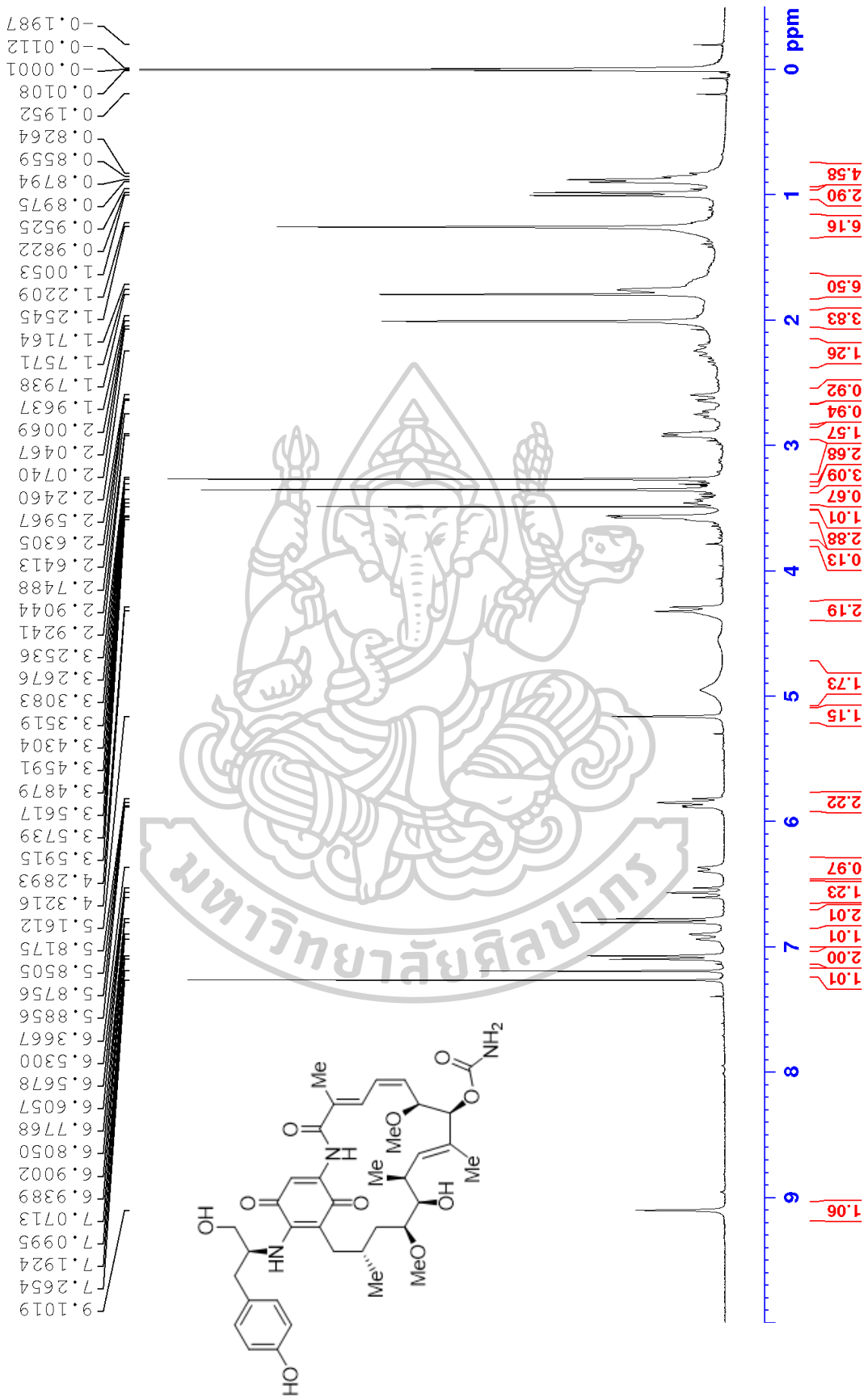


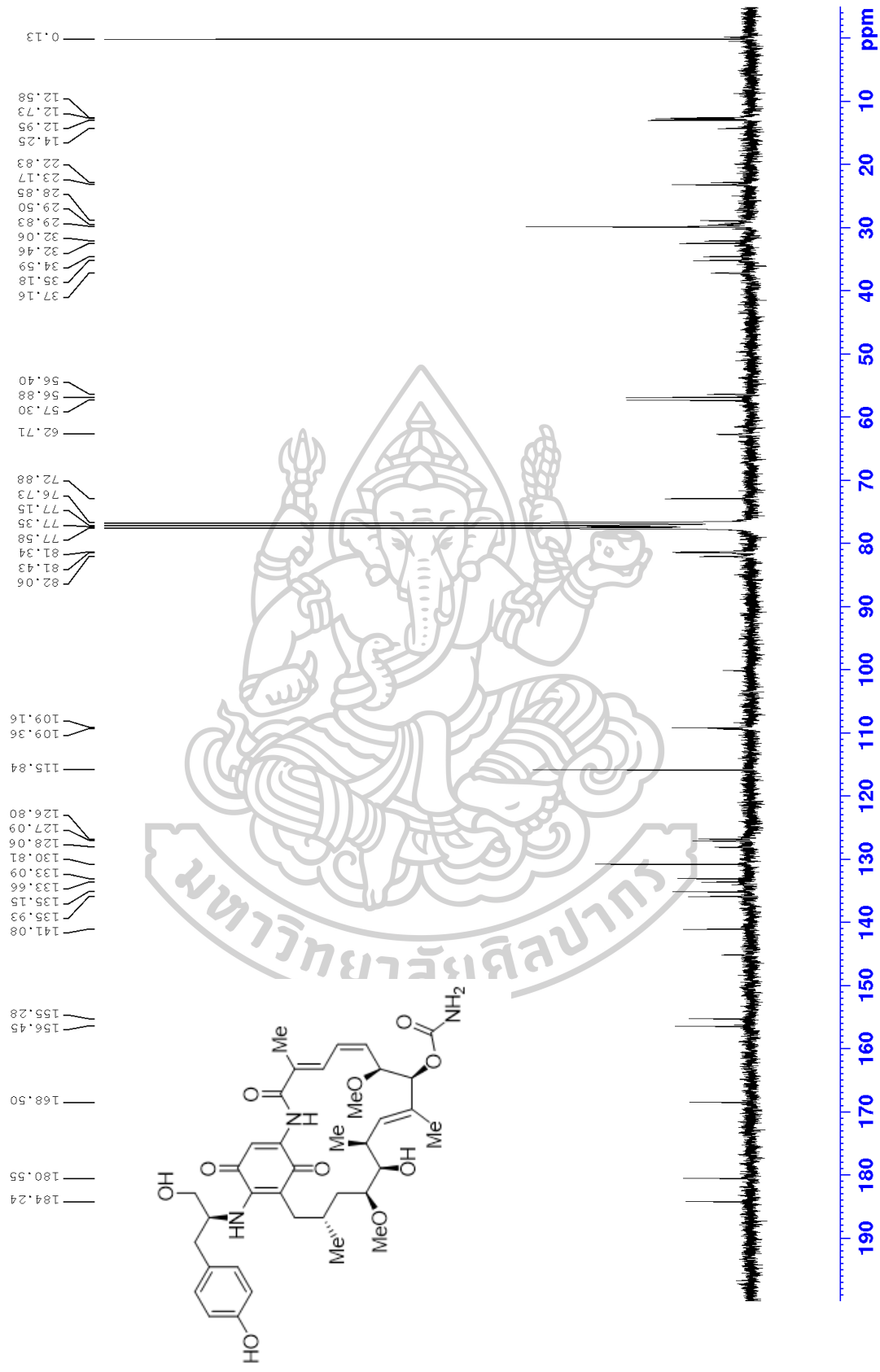


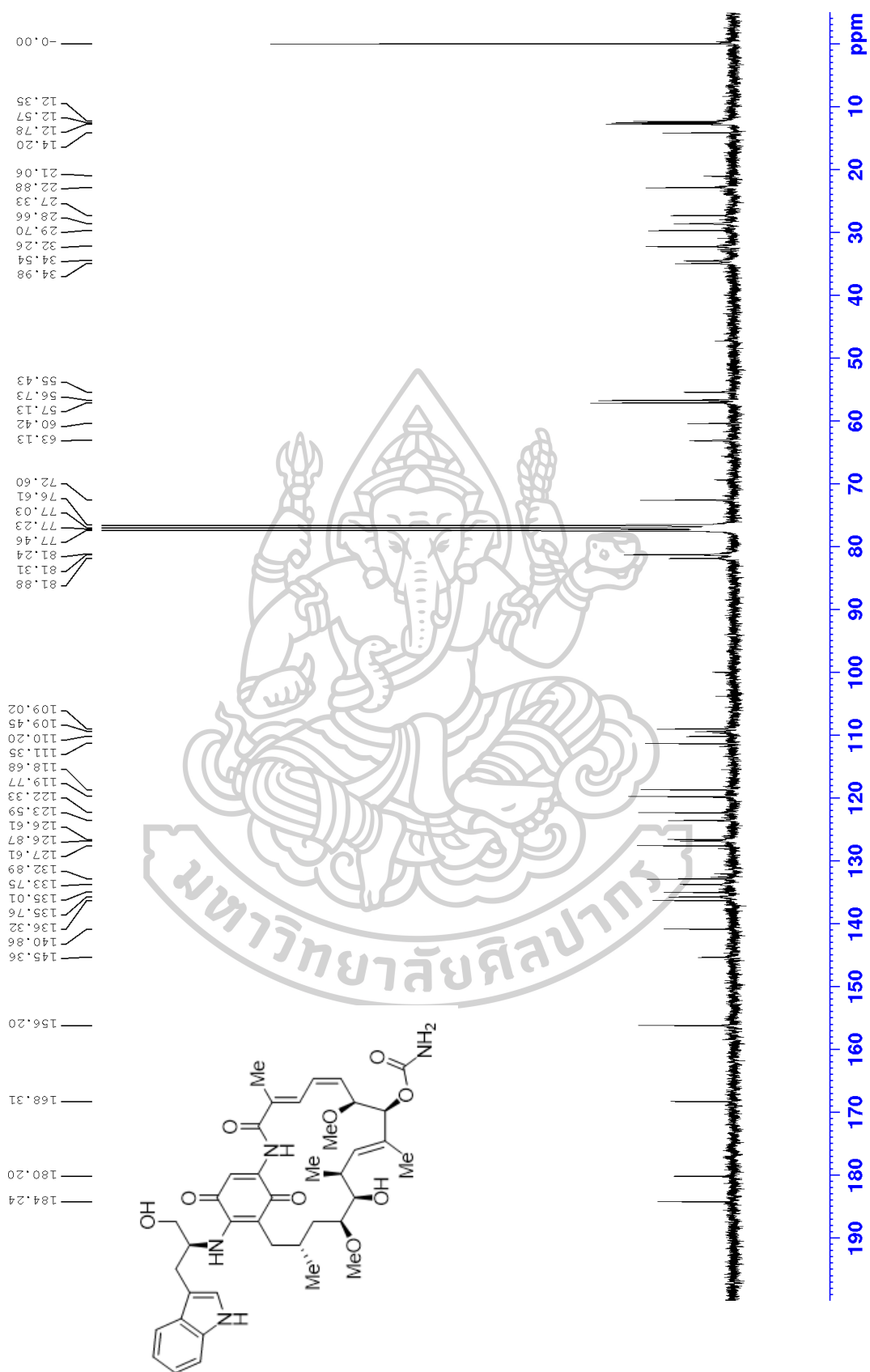


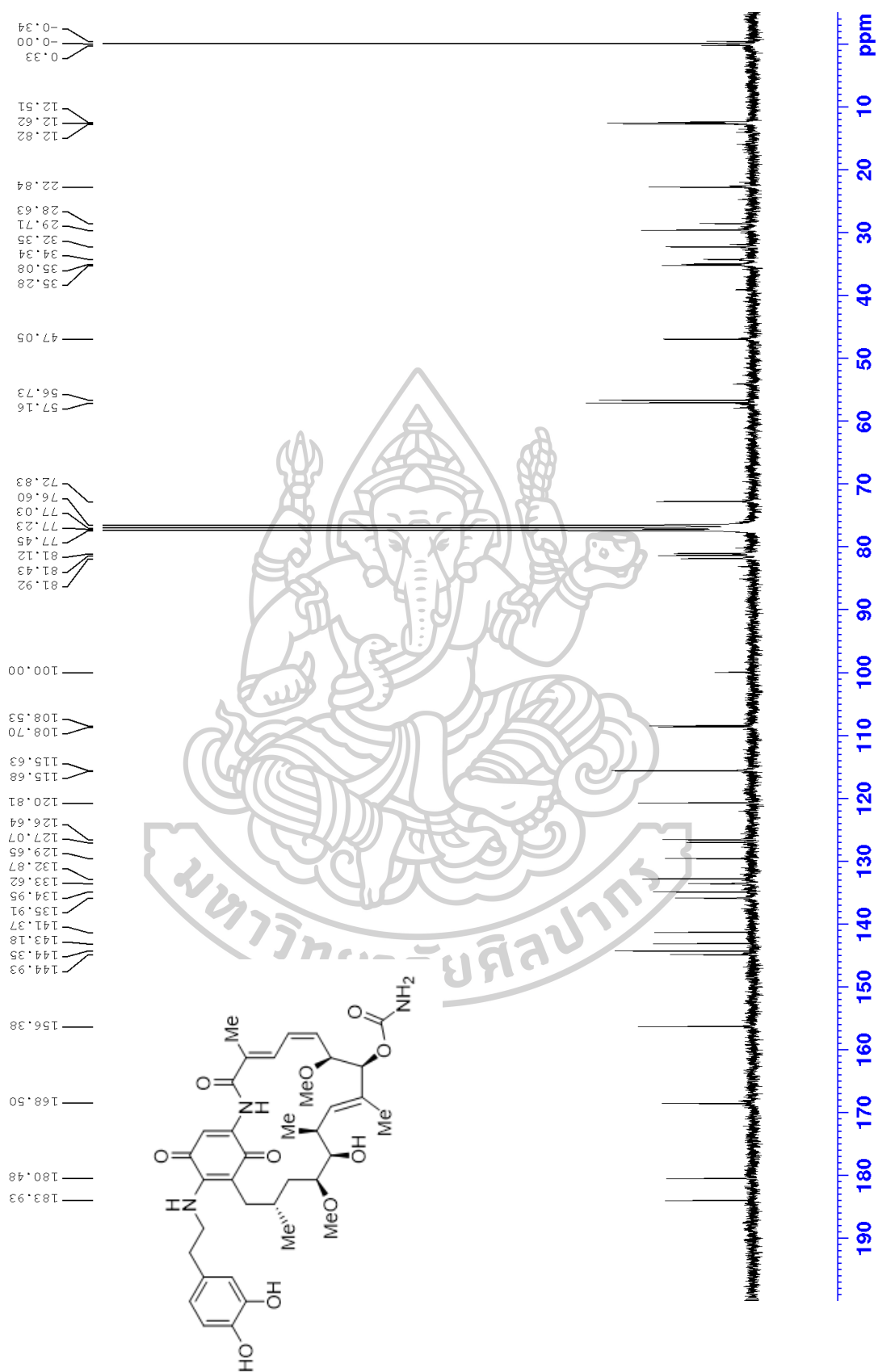


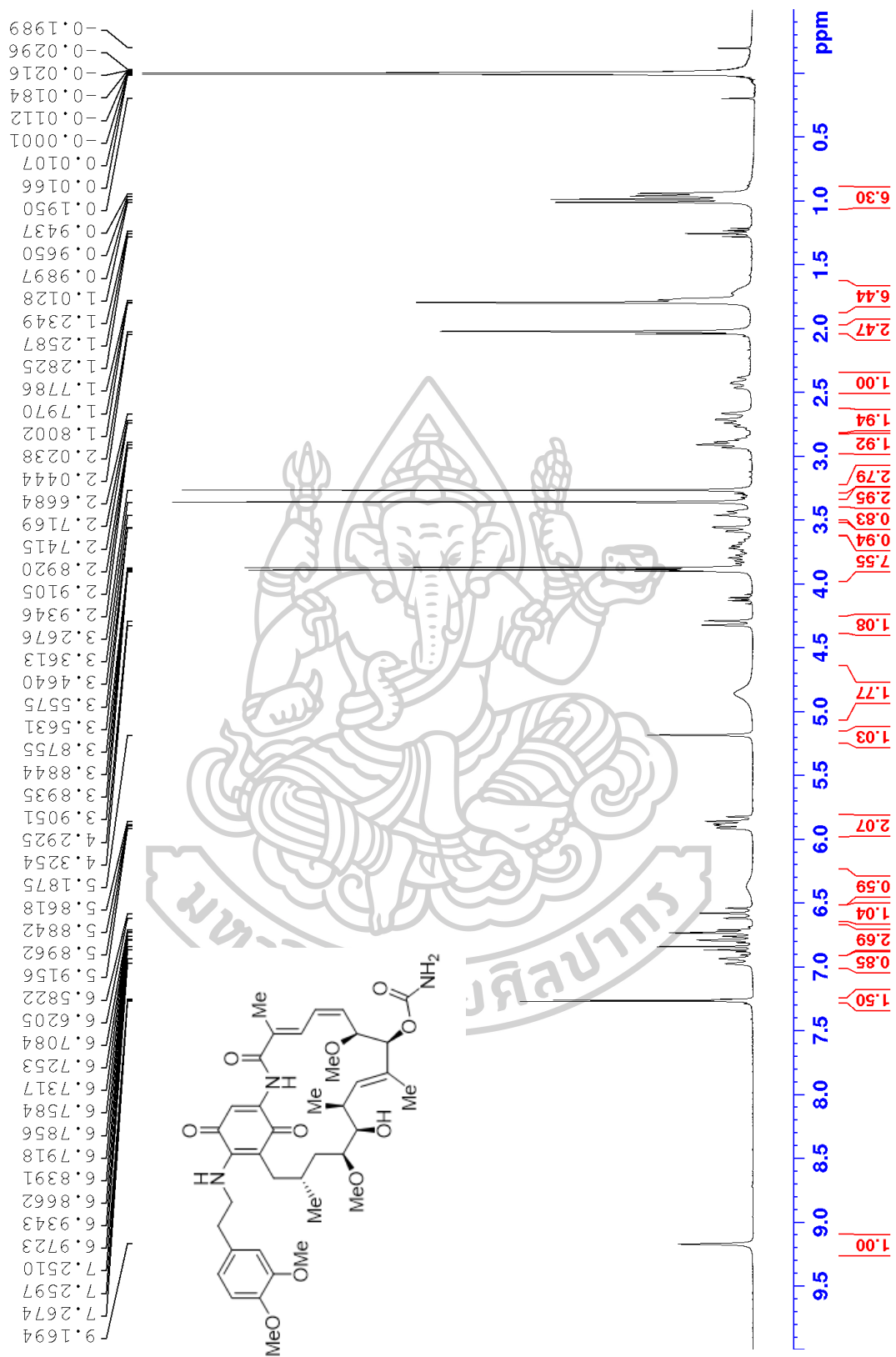


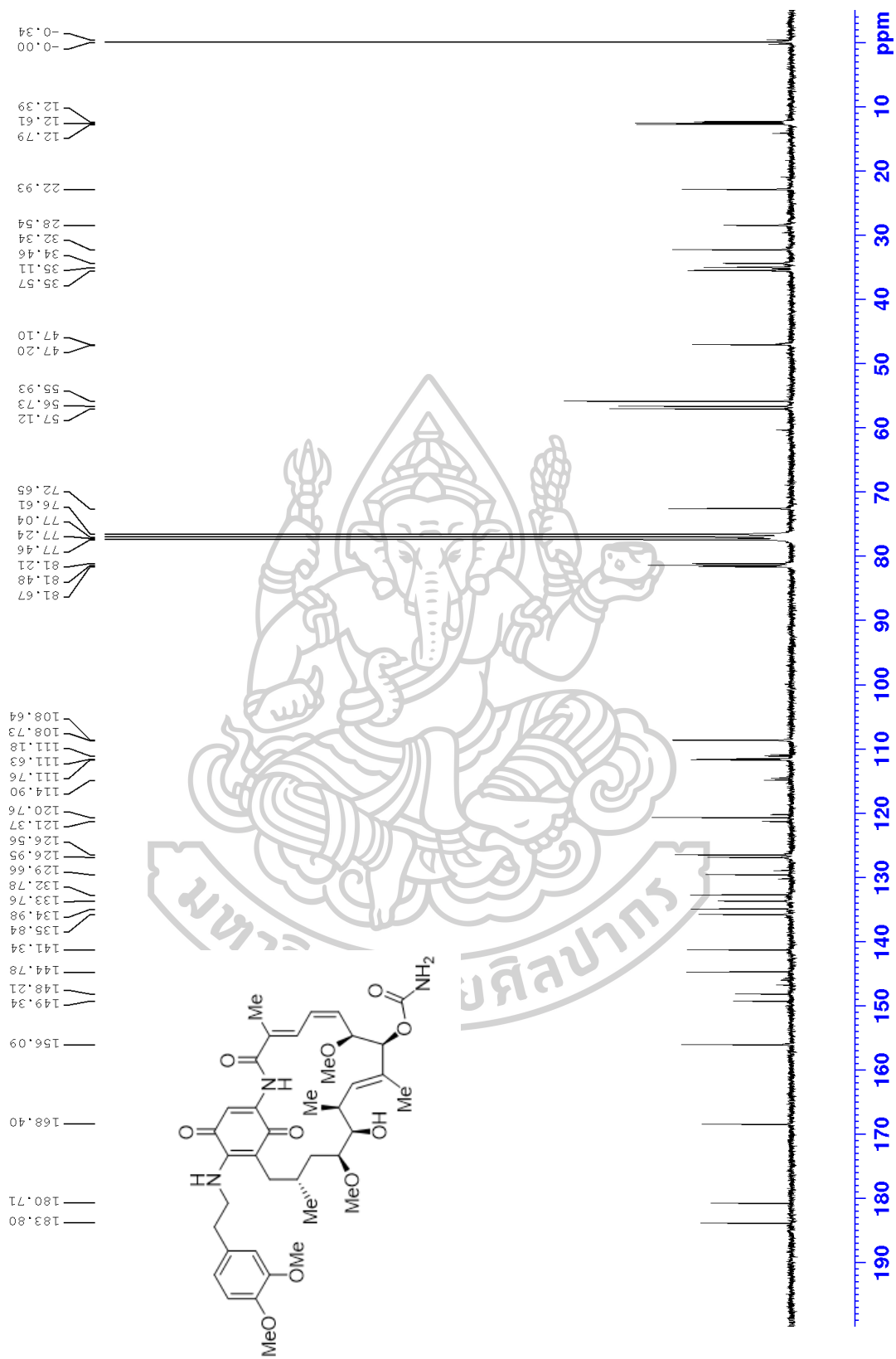


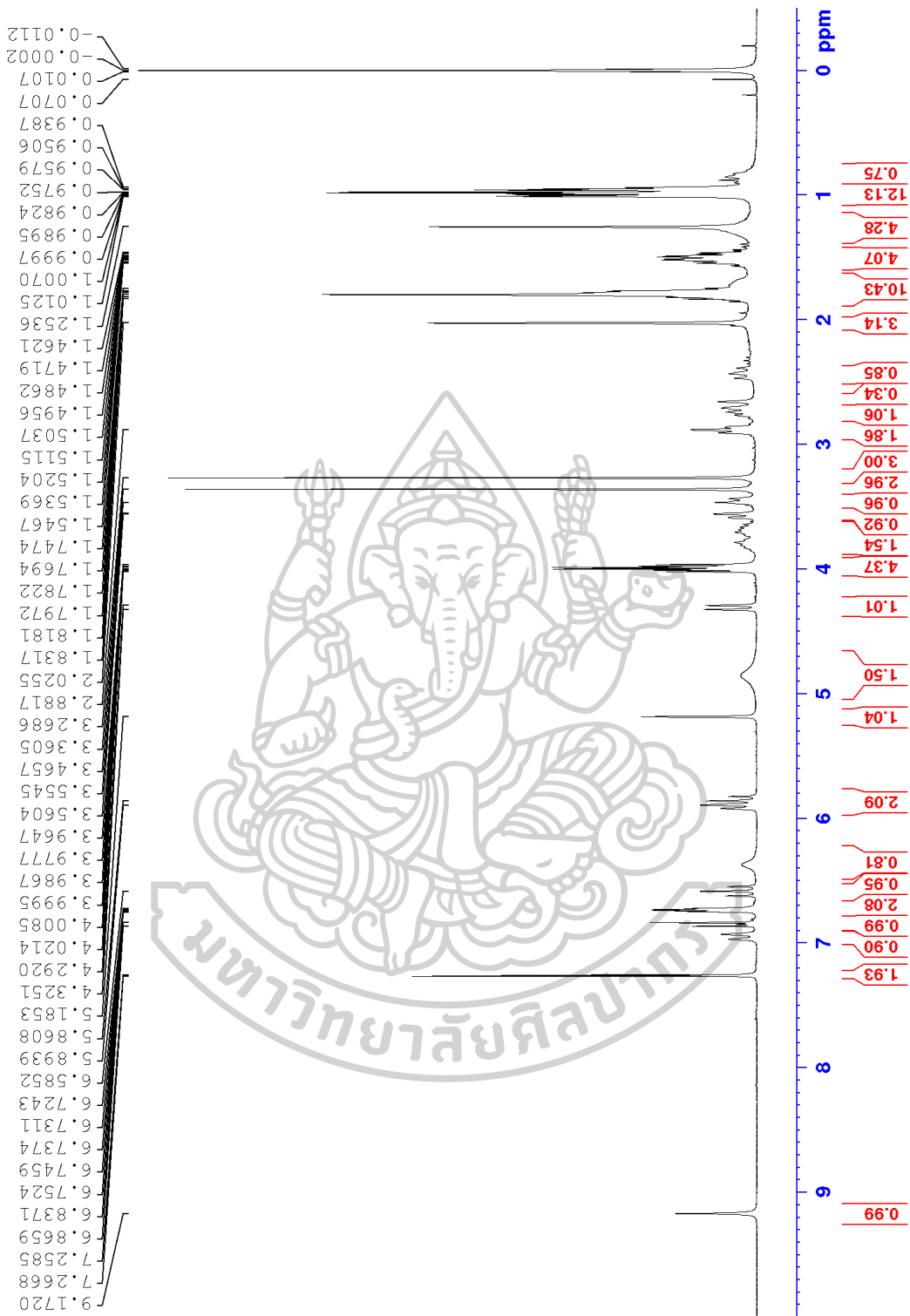


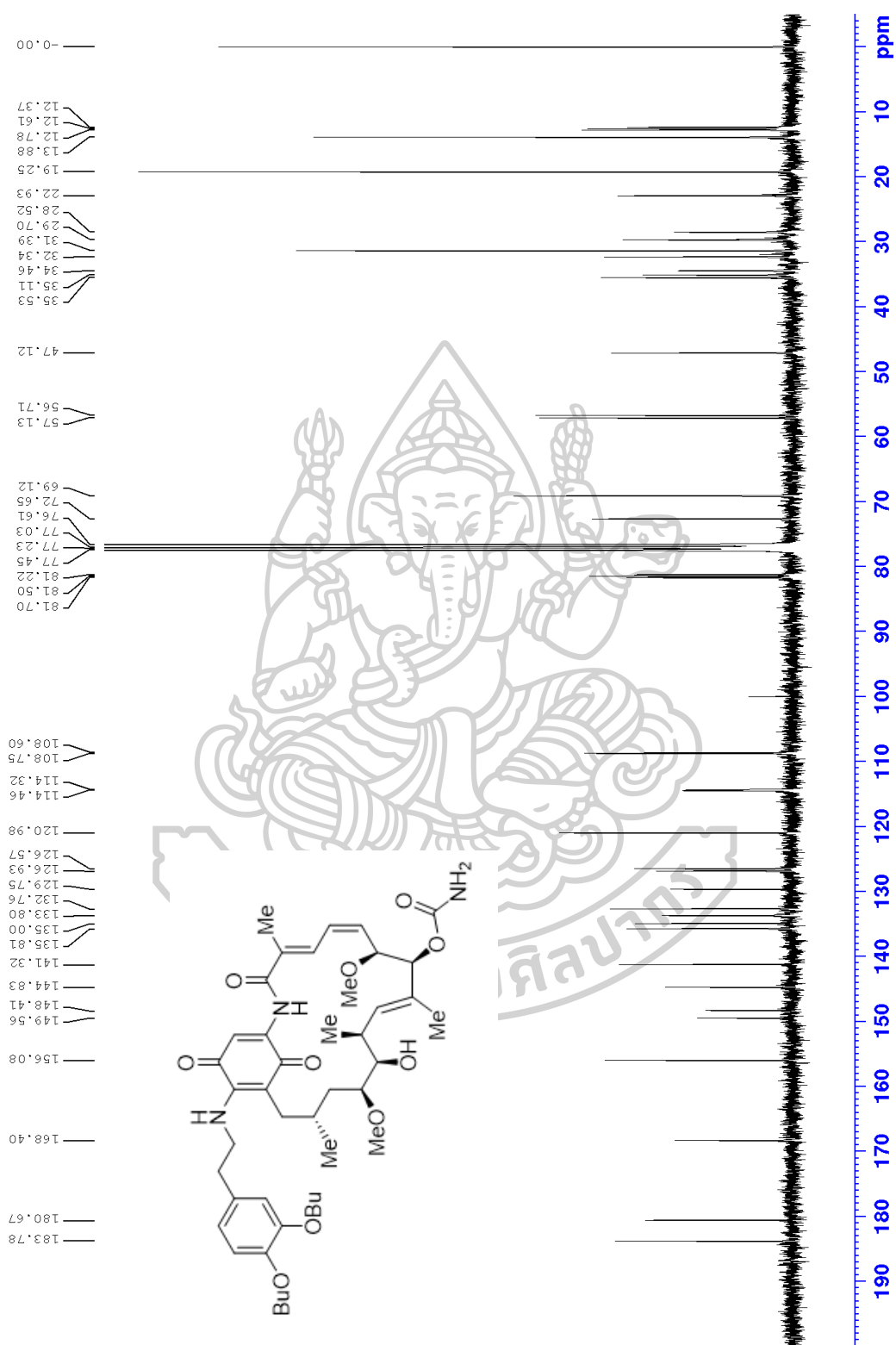


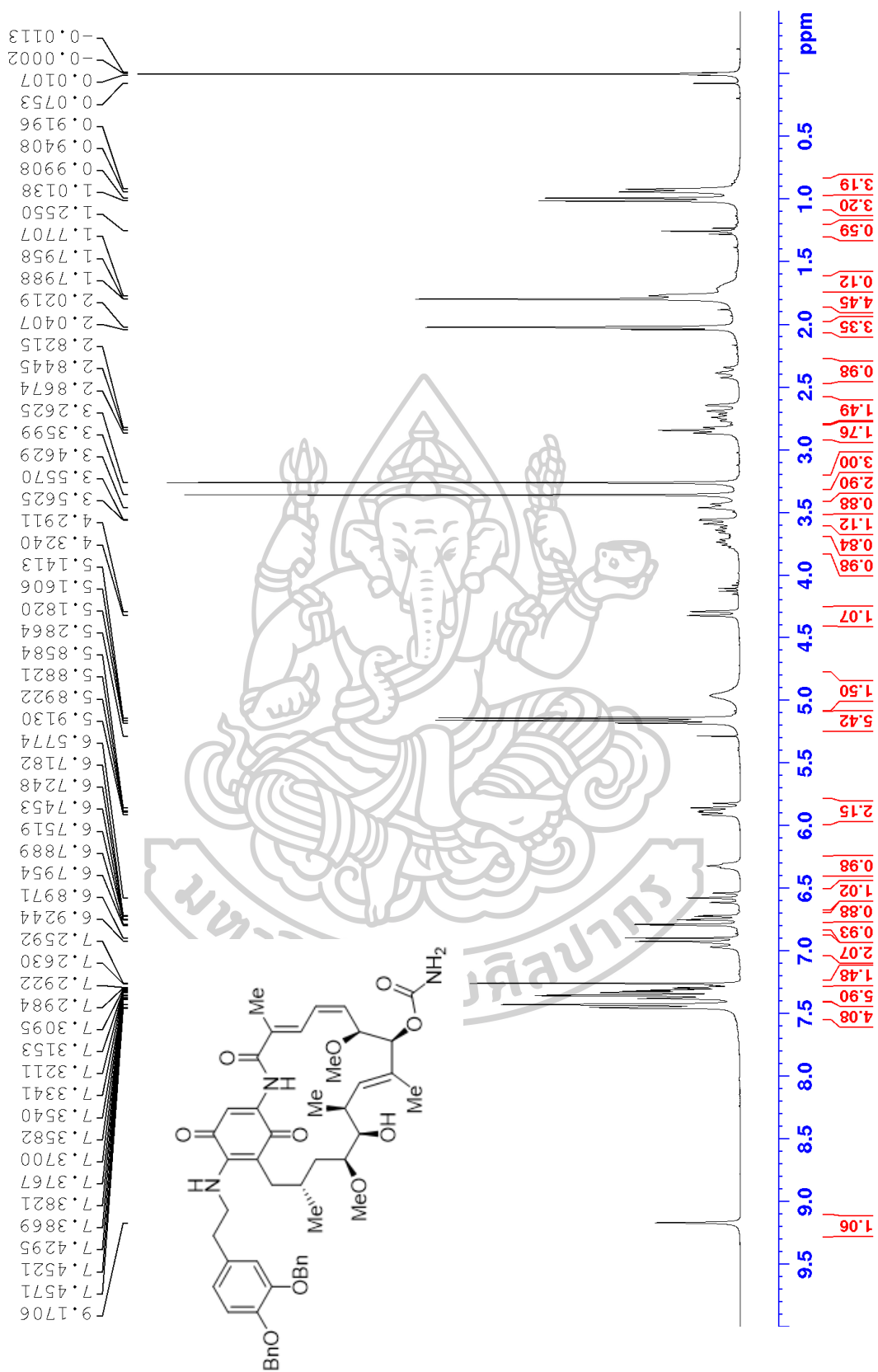


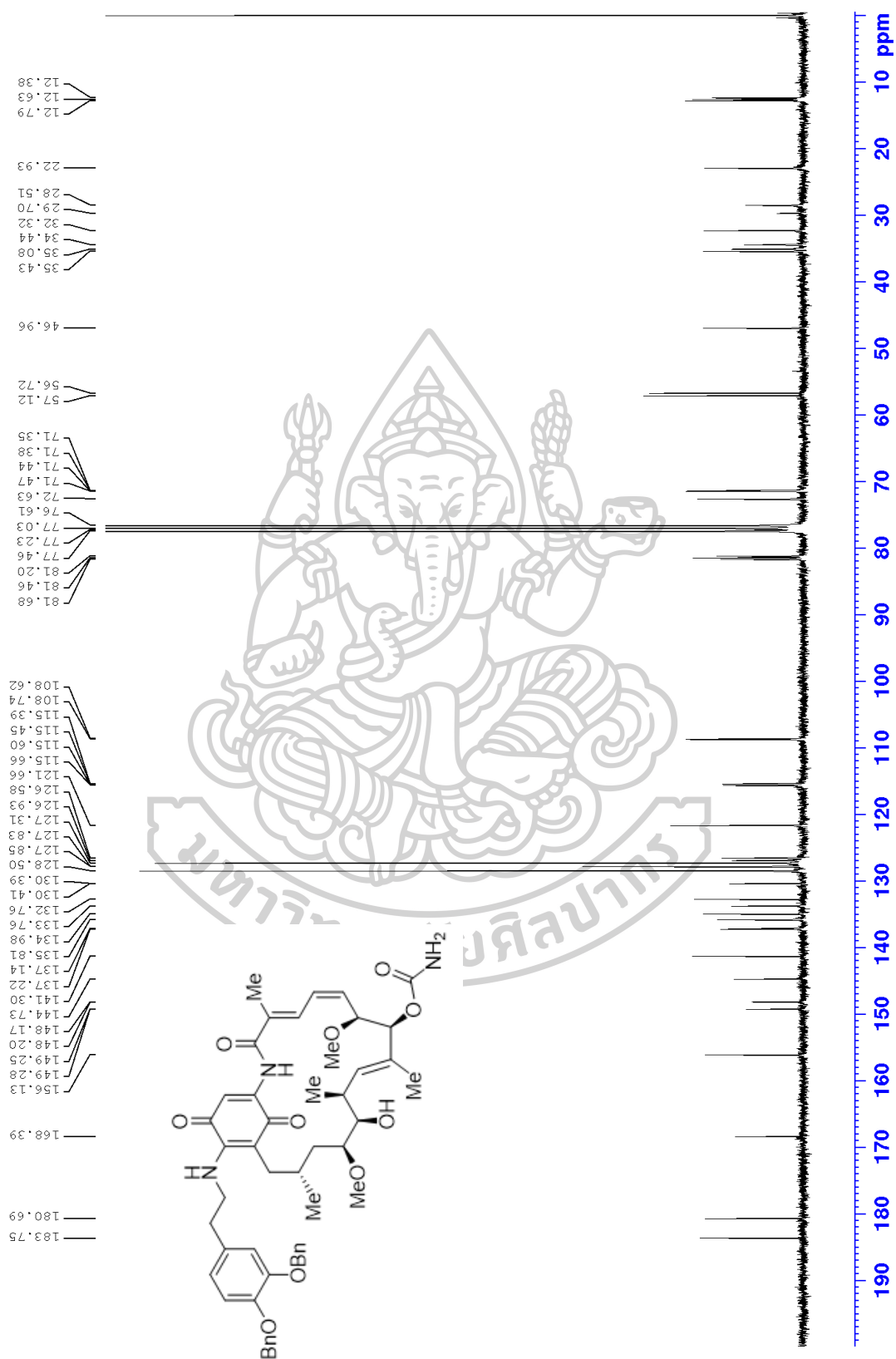


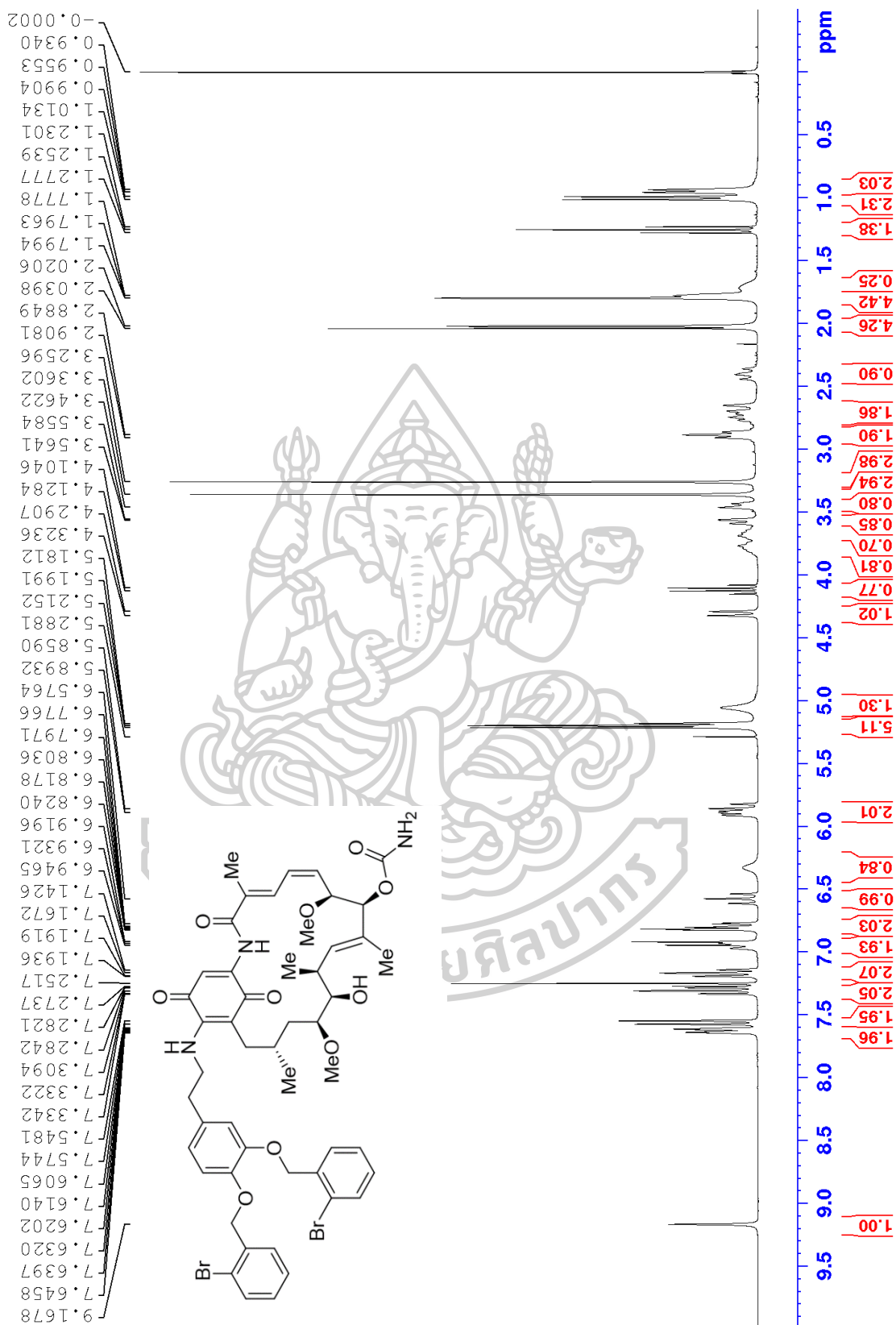


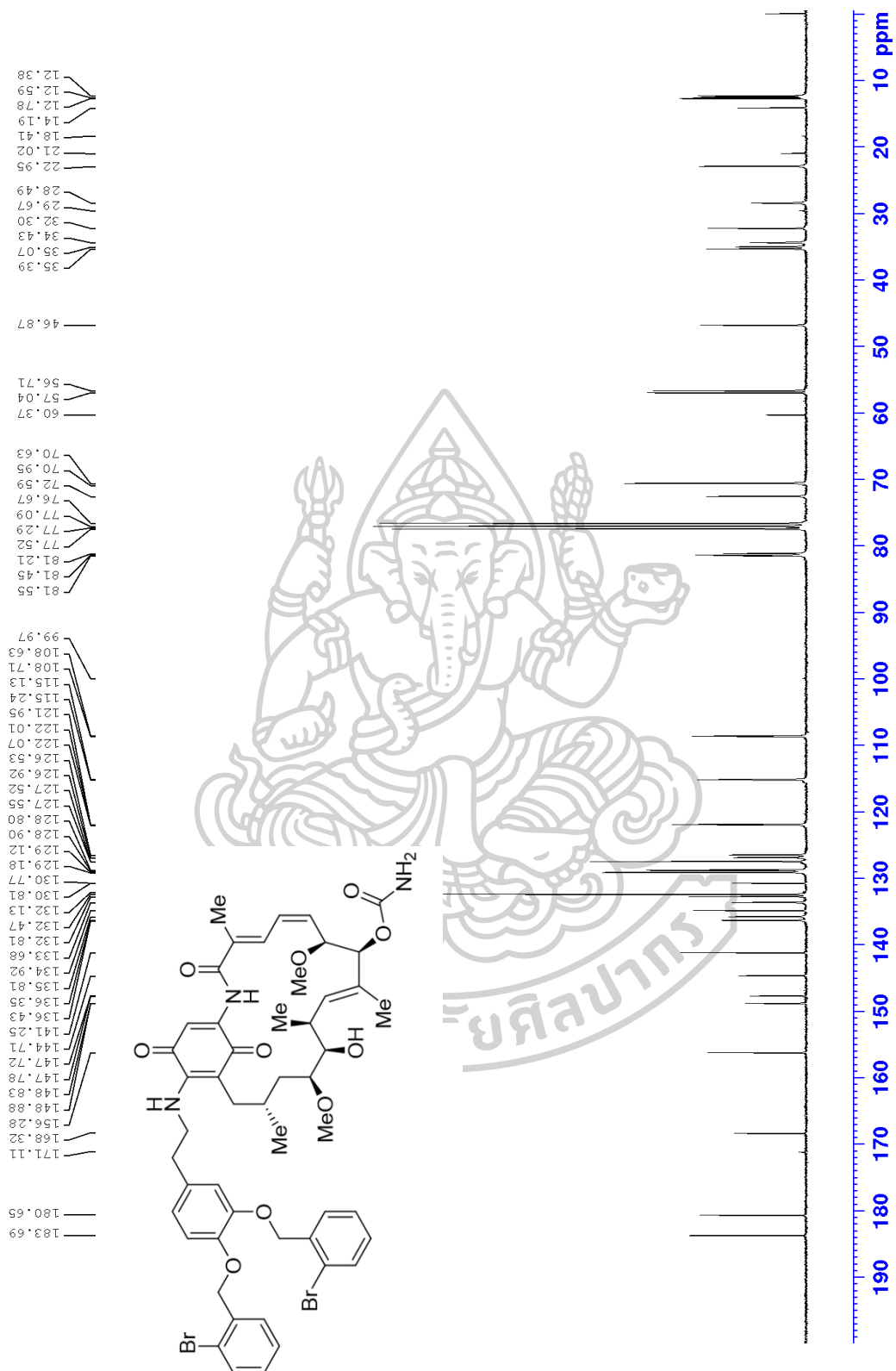












ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ทิพพรรัตน์ เสมสวัสดิ์
วัน เดือน ปี เกิด	2 ตุลาคม 2539
สถานที่เกิด	อุบลราชธานี
วุฒิการศึกษา	มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	289 หมู่ 5 ตำบล เขื่องใน อำเภอ เขื่องใน จังหวัดอุบลราชธานี 34150

