

# 中華民國第 62 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

---

高級中等學校組 化學科

**第二名**

050203

**理論計算、設計及高效率極簡合成 CaMKII 抑制劑之最佳潛力抗癌藥物**

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 劉芷言 高二 陳薇安	指導老師： 許名智
-------------------------	--------------

關鍵詞：苯基磺醯胺衍生物、鈣及攜鈣蛋白調節酶抑制劑、藥物合成

## 摘要

鈣及攜鈣蛋白調節酶(CaMKII)存在於大部分細胞中，研究顯示其在多種癌細胞中過度表現。苯基磺醯胺衍生物為市售 CaMKII 抑制劑(KN-93)的常見結構，因此本研究參考文獻<sup>[1]</sup>中抑制效果最佳的化合物**1**，並擴展臨床尚未解決問題，優化此類衍生物以製成抗癌藥物，以苯基磺醯胺為主架構，設計改良出多種候選分子。初步利用分子模擬分析軟體(Discovery Studio)模擬蛋白質與藥物分子結合，選定結合能最大且結合方位正確的結構。利用含一鍋化反應的步驟高效率三步合成化合物**34**，經核磁共振與高解析質譜儀驗證得出高純度產物。最後經生物毒性實驗發現化合物**34**對乳癌細胞毒性高且對於正常和乳癌細胞的選擇性都較市售抑制劑 KN-93佳，符合理論計算的預期，未來極具潛力作為抗乳癌的標靶藥物。

## 壹、前言

### 一、研究動機

鈣及攜鈣蛋白調節酶(CaMKII)是一種絲氨酸/蘇胺酸蛋白激酶，其活性透過鈣離子信號傳導調節。根據研究顯示，CaMKII 通過結合與激活鈣離子通道等靶點，在乳腺癌、肺癌、前列腺癌與結腸癌等多種癌症中表達。CaMKII 可磷酸化近四十種不同的蛋白質，包括酶、激酶、離子通道與轉錄因子等，並在多種癌細胞分化、增殖和凋亡的調節中發揮關鍵作用。

因已知鈣及攜鈣蛋白調節酶在人類多種癌細胞中表現，可推得抑制其活性可減少癌細胞生長與增殖。圖1列出 KN-93 與 KN-62 兩種市售 CaMKII 抑制劑，其效用僅止於抑制蛋白質，尚未應用至癌症治療。而其中存在芳香族基團和磺醯胺基團物質對其抑制活性極其重要，因此我們以苯基磺醯胺為主架構，接著根據參考文獻 *Benzenesulfonamide Derivatives as Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Inhibitors and Antiviral Agents against Dengue and Zika Virus Infections* 中，我們得知化合物 **1** (如圖1) 對鈣及攜鈣蛋白調節酶的抑制效果較好，所以我們以化合物 **1** 為架構，嘗試修改 A 環上的官能基以及 D 環的結構，希望可以增加藥物分子對鈣及攜鈣蛋白調節酶的親和能力，以抑制其活性。期望製備比 KN-93 效果更佳、更易合成且產率更高之 CaMKII 抑制劑，並且開發出具潛力之乳癌標靶藥物。

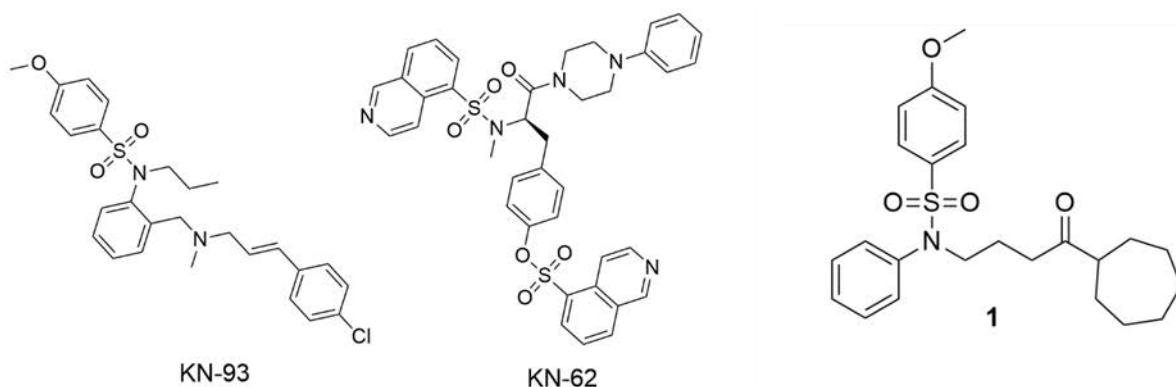


圖1. KN-93、KN-62 為市售鈣及攜鈣蛋白調節酶抑制劑。化合物1為參考文獻中提出之鈣及攜鈣蛋白調節酶抑制劑

## 二、研究目的

- (一) 利用吡啶延伸 C 環結構
- (二) 修改 A 環結構
- (三) 伸長／縮短 B 鏈 (3~6個碳)
- (四) 運用分子模擬分析軟體測定候選分子與鈣及攜鈣蛋白調節酶之結合
- (五) 合成目標化合物
- (六) 產物的結構鑑定
- (七) 細胞毒性檢測

## 三、文獻回顧

### (一) 理論計算

根據 Chemistry Europe 發表的 Structure-Based Target-Specific Screening Leads to Small-Molecule CaMKII Inhibitors，理論計算可看出化合物與鈣及攜鈣蛋白調節酶的結合方位，作者選用蛋白質結合模式1與化合物結合，軟體中可顯示四周與化合物作用的胺基酸序列。

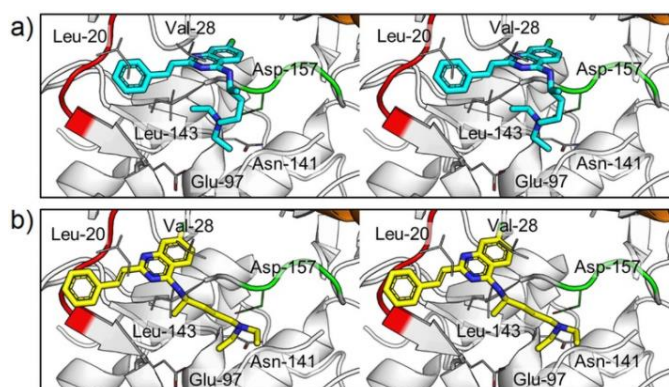
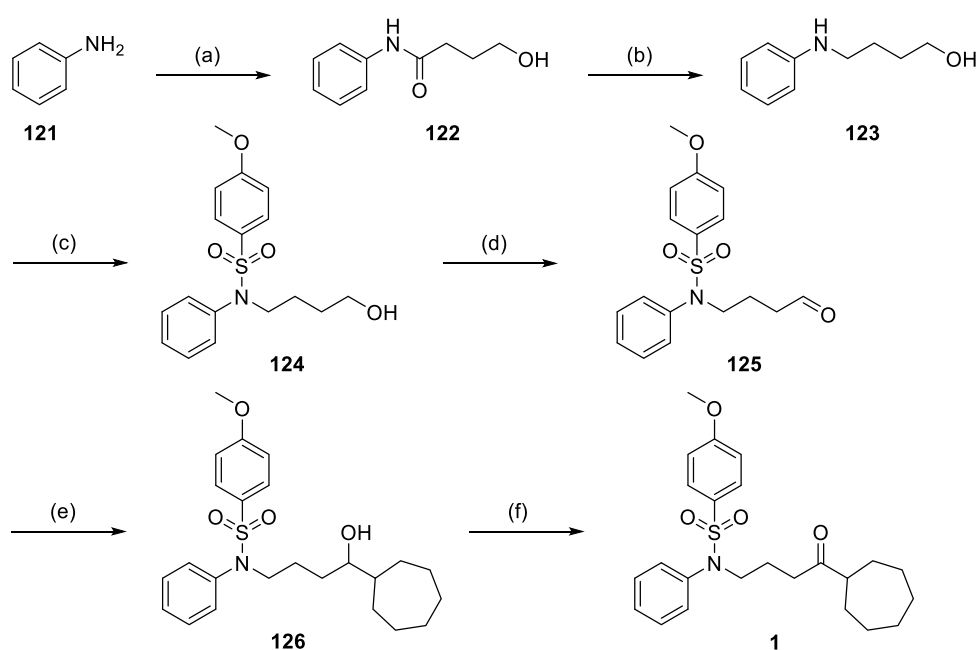


圖2. 論文中化合物與蛋白質的結合立體結構圖

## (二) 合成路徑

根據參考文獻<sup>[1]</sup>，可得化合物1的生物活性佳、對鈣及攜鈣蛋白調節酶的抑制效果較好，可經六步合成而出。

以下為六步合成之敘述：利用苯胺與氫化鈉反應後，將丁內酯開環，得到醇類，再將醯胺鍵用  $\text{LiAlH}_4$  還原，得到二級胺，再將其再將其磺酸化得到磺醯胺，再用 PDC(分子式  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}\cdot\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ，類似 PCC 一樣的溫和氧化劑，室溫下為橙黃色晶體，用來把醇有限度地氧化為醛)將醇氧化成醛，將醛與格林納試劑(是指烴基鹵化鎂 ( $\text{R-MgX}$ ) 一類有機金屬化合物，是一種很好的親核試劑)得到二級醇並接上溴環庚烷，最後與 PDC 反應得到最後的酮。



Reagents, conditions, and yields: (a1)  $\text{NaH}$ , THF, 30 min, 90 °C, (a2) butyrolactone, THF, 8 h, 90 °C, 90%; (b)  $\text{LiAlH}_4$ , THF, 8 h, 90 °C; (c) 4-methoxybenzenesulfonyl chloride,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 60 °C, 4 h, 76%; (d) PDC, DCM, 8 h, rt, 65%; (e1) bromocycloheptane, Mg, THF, rt, 2 h, (e2) aldehyde, THF, 60 °C, 2 h, 60%; (f) PDC, DCM, 8 h, rt.

圖3. 論文中化合物1之合成路徑

## 貳、研究設備及器材

### 一、研究設備

- (一) 超音波震盪機
- (二) 核磁共振光譜儀(NMR)
- (三) 減壓濃縮機(Rotavapor)
- (四) 加熱板(Hotplate)
- (五) 高解析度質譜儀(HRMS)

## 二、器材

- (一) 玻璃滴管
- (二) 100mL 雙頸瓶
- (三) 加藥漏斗
- (四) 分液漏斗

## 三、藥品

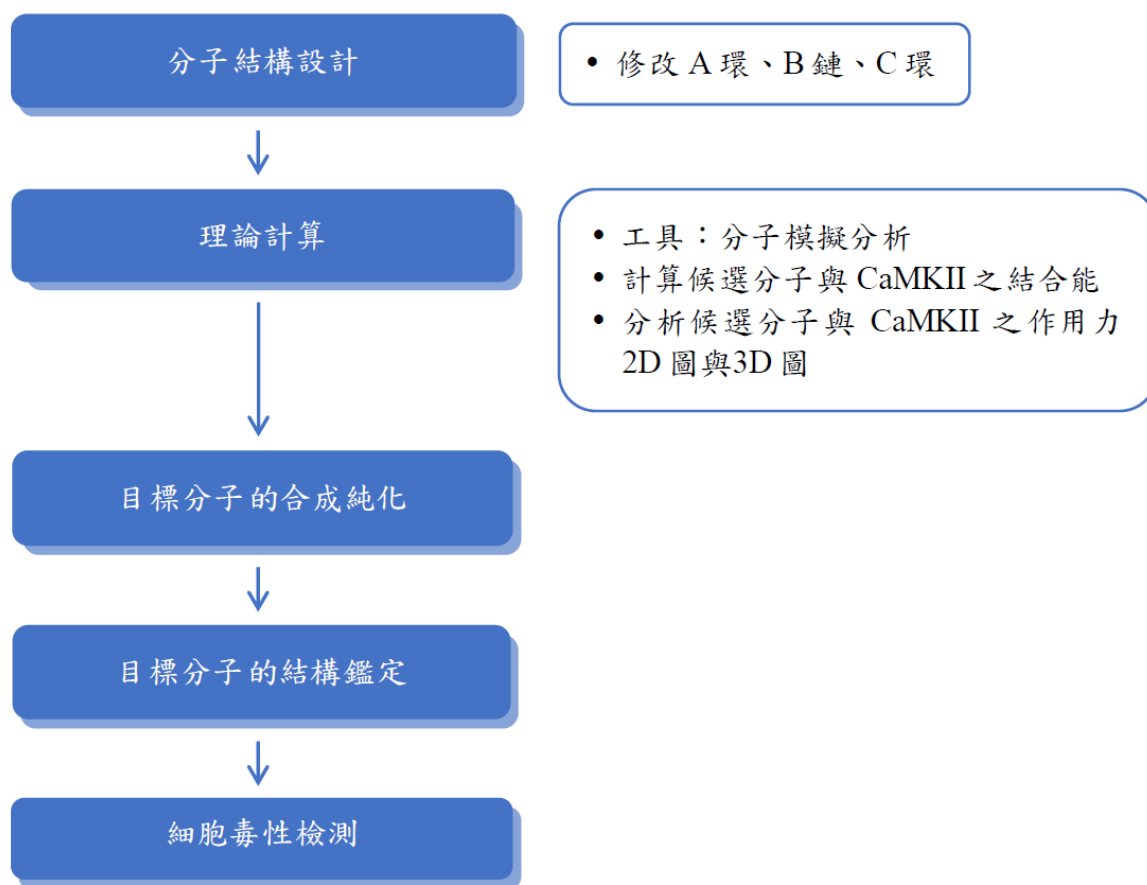
- (一) 4-環己基苯胺(4-cyclohexylaniline)
- (二) 4-溴丁酸乙酯(ethyl 4-bromobutyrate)
- (三) 4-甲氧基苯磺醯氯(4-methoxybenzenesulfonyl chloride)
- (四) 三乙胺(Triethylamine)
- (五) 二氯甲烷( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )
- (六) 氫氧化鋇八水合物( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ )
- (七) 甲醇( $\text{MeOH}$ )
- (八) 氮雜環庚烷(azepane)
- (九) 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺鹽酸鹽(EDC HCl)
- (十) 1-羥基苯並三唑一水合物(HOBt  $\cdot$   $\text{H}_2\text{O}$ )
- (十一) 乙基二異丙基胺(DIPEA)

## 四、數據分析

- (一) 鈣及攜鈣蛋白調節酶  $\alpha$  (CaMKII  $\alpha$ ) X 射線晶體繞射結構2VZ6

## 參、研究過程與方法

### 一、實驗設計



### 二、研究方法

#### (一) 分子結構設計

##### 1. 化合物1中的碳原子改換成化合物2中的氮原子

為減少兩步驟合成，我們嘗試將七環上的碳改為氮（圖4.(b) 化合物2）。由2D圖（圖5）和3D圖（圖6）可知，將碳改變為氮不影響蛋白質與化合物的作用方位，且與化合物1相比，化合物2與 CaMKII 多了與 ASP B:156 的 Pi-Anion 作用力（圖5），與蛋白質結合更穩定，因此我們決定以化合物2為主軸，對其進行改良。

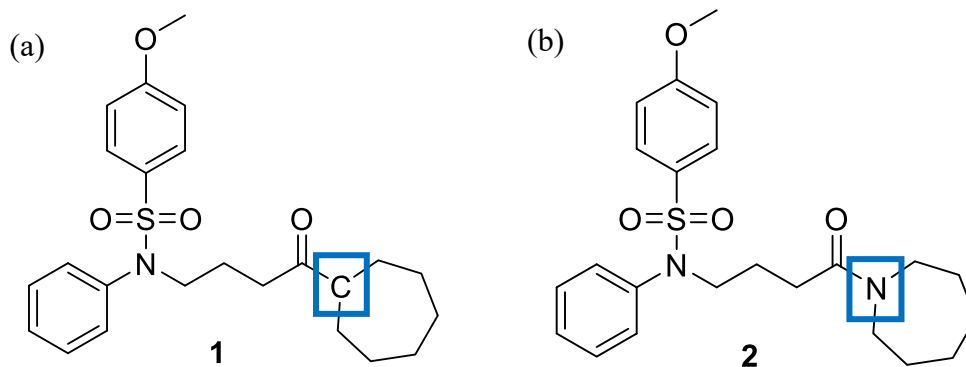


圖4. (a) 化合物1 (b) 化合物2

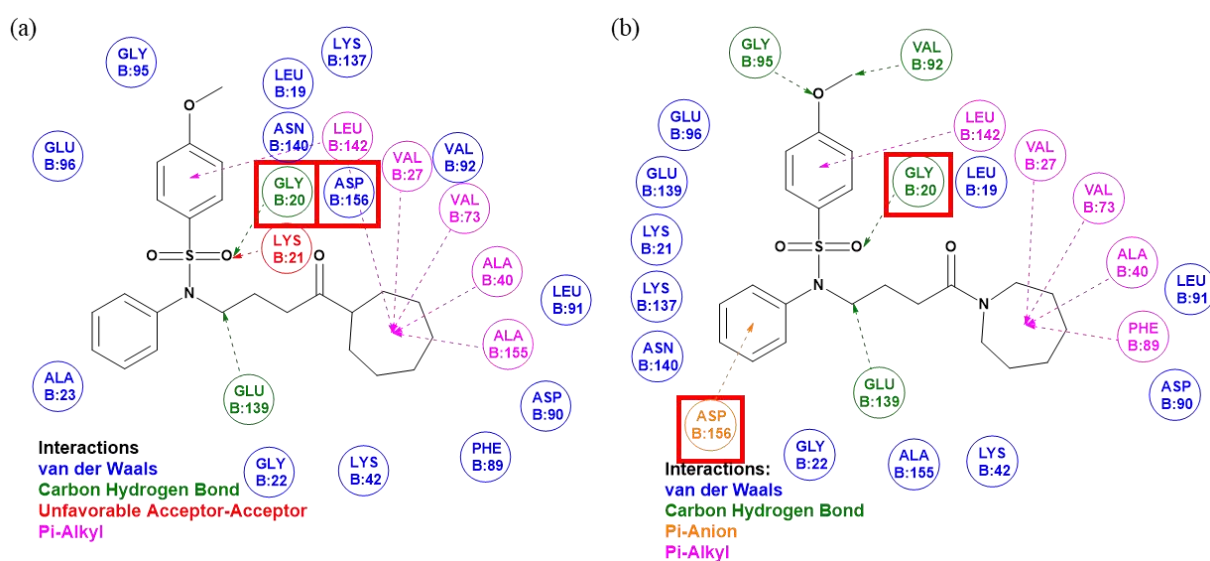


圖5. (a) 化合物1與 CaMKII 之作用力2D 圖 (b) 化合物2與 CaMKII 之作用力2D 圖

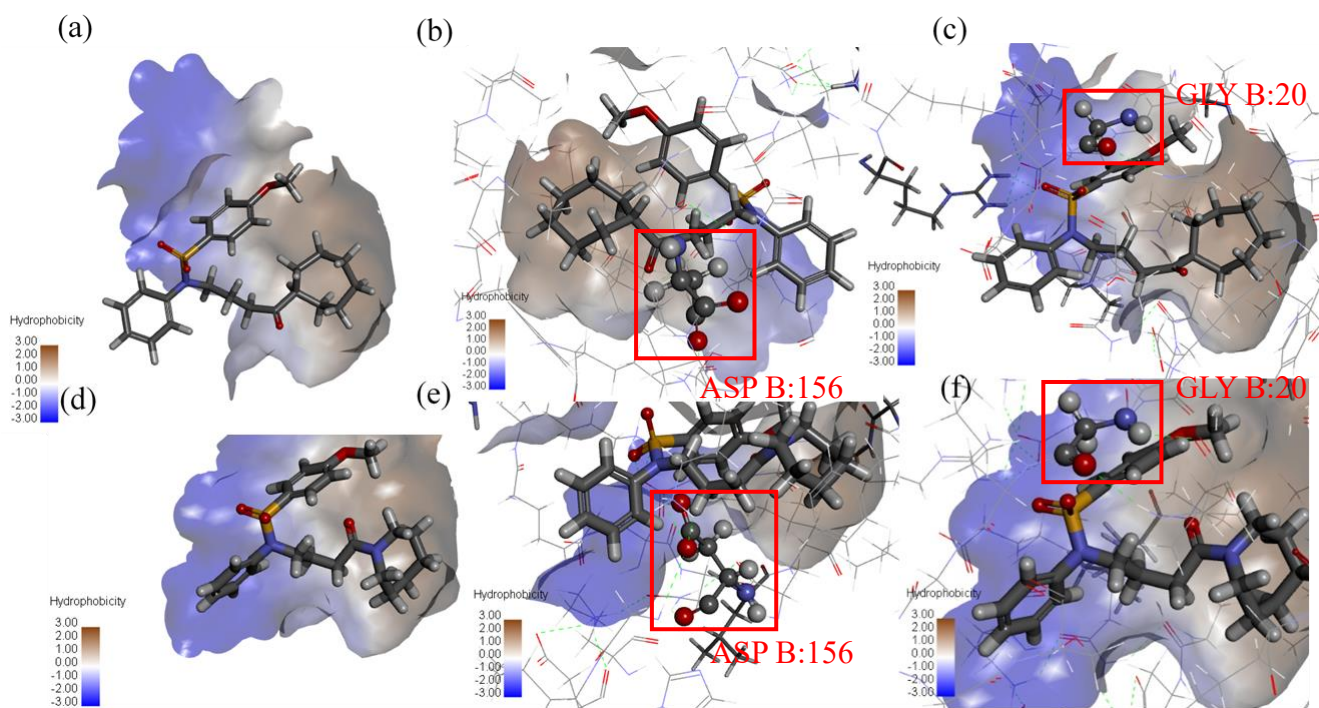
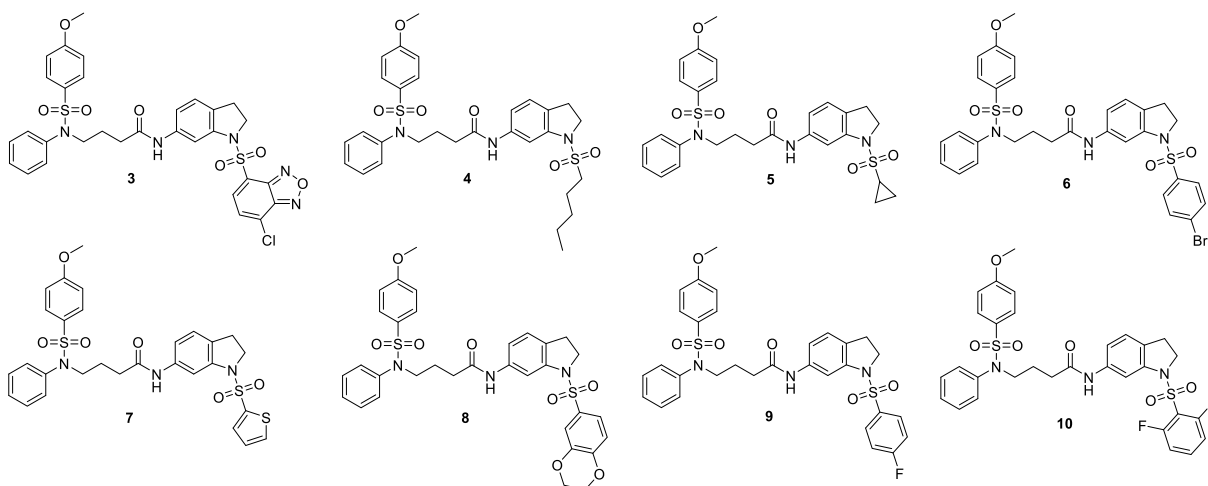


圖6. (a) 化合物1與 CaMKII 的結合位置 (b) 化合物1與胺基酸 ASP B:156 的相對位置 (c) 化合物1與胺基酸 GLY B:20 的相對位置 (d) 化合物2與 CaMKII 的結合位置 (e) 化合物2與胺基酸 ASP B:156 的相對位置 (f) 化合物2與胺基酸 GLY B:20 的相對位置

## 2. 利用吡啶延伸 C 環結構





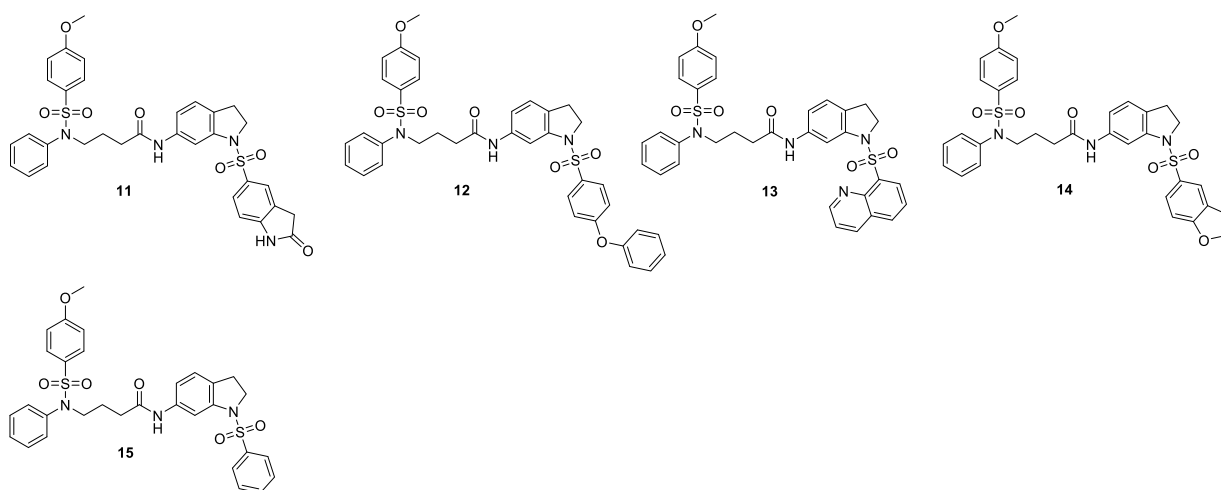
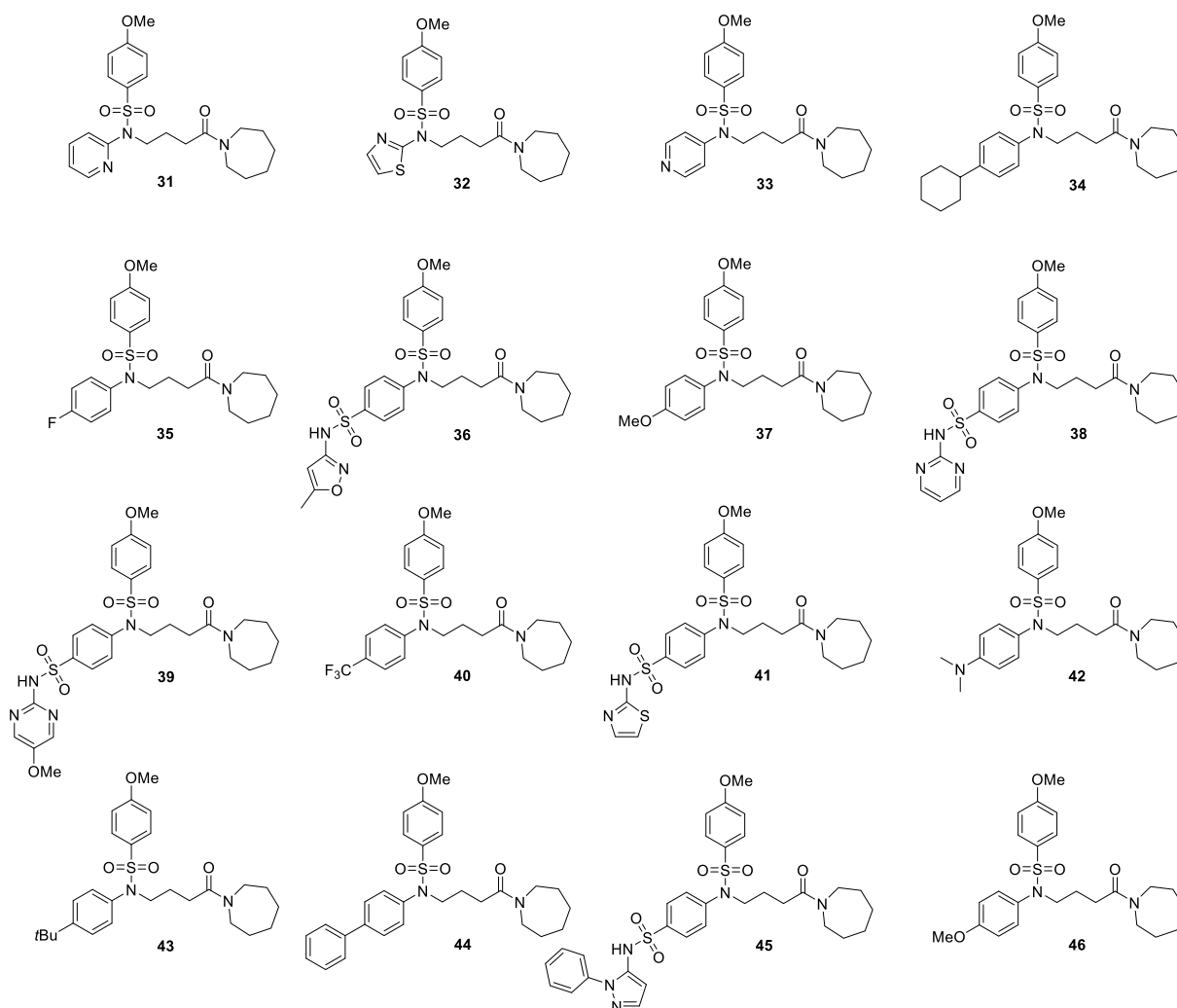


圖7. 延伸 C 環結構

3. 由圖5. (b)可知有 Pi-Anion 作用於化合物2的 A 環上，得知 A 環結構中的苯環在生物活性中扮演十分重要的角色，因此我們以化合物2作為主架構，保留芳香環，修改 A 環結構。



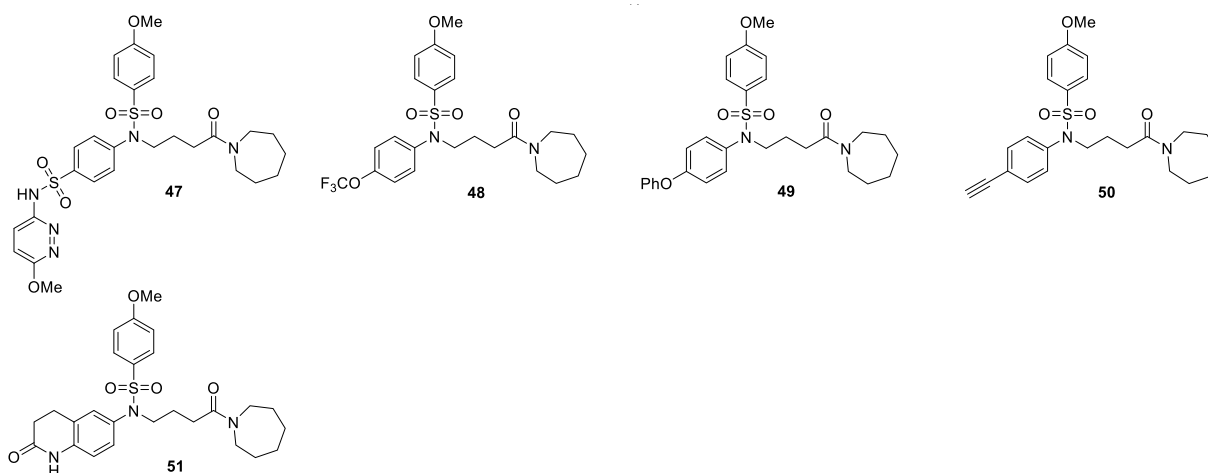


圖8. 延伸 A 環結構

4. 選定化合物**34**為合成目標分子後，伸長與縮短其 B 鏈長度，分別是3個、4個、5個及6個碳。

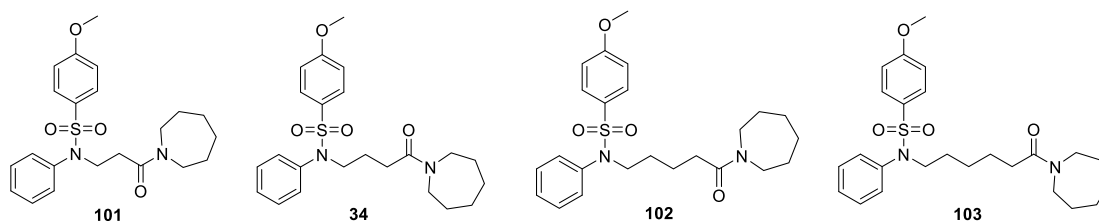


圖9. 伸長／縮短 B 鏈 (3~6個碳)

## (二) 利用分子模擬分析軟體測定化合物與 CaMKII 之結合情形

### 1. 分子模擬分析軟體

分子模擬分析軟體可構建三維分子、模擬分子結合，程式會利用蛋白質的結構資訊以及受體的活性位來篩選出有潛力的藥物分子，可應用於大小分子的結合以及藥物設計，常用於實驗生物學家、藥物化學家、結構生物學家等。我們運用此軟體模擬候選分子與 CaMKII 的結合情形，計算其結合能，並觀察化合物與蛋白質結合的2D與3D圖，作為理論計算的基礎。

### 2. 計算候選分子與 CaMKII 之結合能

我們首先至蛋白質資料庫(Protein Data Bank, PDB)下載蛋白質晶體結構，再將蛋白質能量最小化並定義分子結合區域，將候選分子的能量也最小化後在結合區域內將分子與蛋白質結合，並藉由電腦計算出的蛋白質—候選分子複合體的結合能，比較出何種複合體結合能最低。

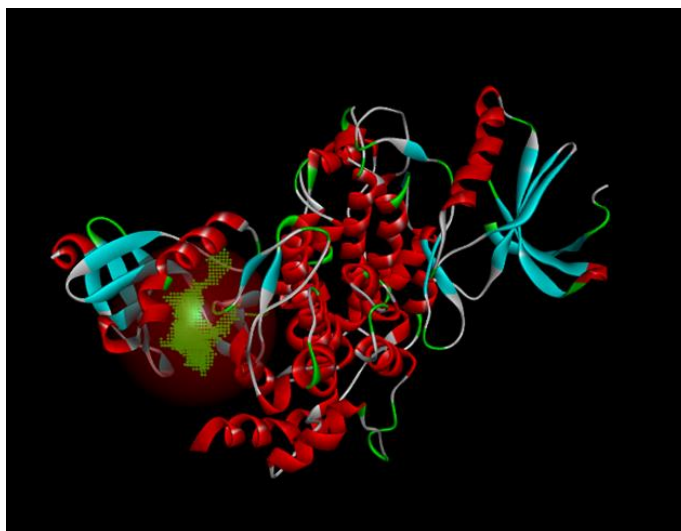


圖10. 紅色球為鈣與攜鈣蛋白調節酶的分子結合區域(binding site)

### 3. 分析候選分子與 CaMKII 之作用力2D 圖

分子模擬分析軟體可模擬候選分子與 CaMKII 結合並繪製出作用力2D 圖，我們會觀察與分析2D 圖中的各種作用力，綜合考慮結合能大小與作用力2D 圖找出與 CaMKII 結合最穩定的藥物分子。

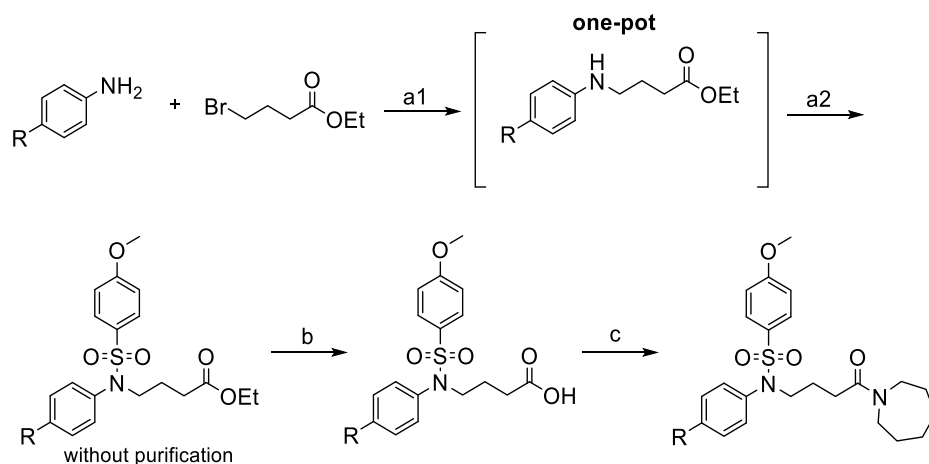
### (三) 合成目標物分子

本研究創新結果：

1. 綜合考量結合能大小、合成難易度及產率高低，選定化合物**34**作為合成目標分子。
2. 使用實驗室新研發之合成方法（圖11），只需三步便可合成出化合物**34**
3. 第一步（步驟 a）為一鍋化反應，減少純化過程，可提高產率、縮短製備時間並減少資源浪費。
4. 所設計的合成路徑，僅需改變 A 環或 C 環上的官能基或取代基，便可使用相同的合成步驟合成多樣的候選分子。

合成步驟：

- (a1) 取代反應生成二級胺
- (a2) 將二級胺進行磺酸化反應生成苯磺醯胺
- (b) 酯鍵的水解反應，生成羧酸化合物
- (c) 將羧酸進行醯胺化反應72小時，並以管柱液相層析純化。



Reagents and conditions: (a1) Et<sub>3</sub>N, neat, r.t., 18 h (a2) 4-methoxybenzenesulfonyl chloride, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 6 h (b) Ba(OH)<sub>2</sub>, MeOH, r.t., 24 h, 42%(overall) (c) azepane, EDC, HOBT, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.

圖11. 合成路徑

#### (四) 細胞毒性檢測

細胞存活率分析(MTT assay)為一種判斷細胞存活率的實驗方法。MTT 為黃色化合物，一種接受氫離子的染料，可作用於活細胞粒線體中的電子傳遞鏈，在琥珀酸脫氫酶(SDH)和細胞色素 C 的作用下四氮唑環會開裂，生成紫色的甲臍結晶，利用 DMSO 將甲臍溶解，再測定吸光度以計算細胞存活率。因死細胞中的琥珀酸脫氫酶會消失，所以甲臍結晶的生成量與活細胞數目成正比。故在培養基中投入藥物，可評估藥物對細胞的增生或死亡有無具體影響。

藥物的安全性測試為藥物開發的第一項試驗，利用細胞存活率分析判斷藥物對一般細胞是否有毒性。因此我們以一般乳腺細胞為目標細胞，分別測定 KN-93與我們合成出的化合物在不同濃度下48小時後的細胞存活率，分析二者對一般乳腺細胞的毒性，測試藥物的安全性。

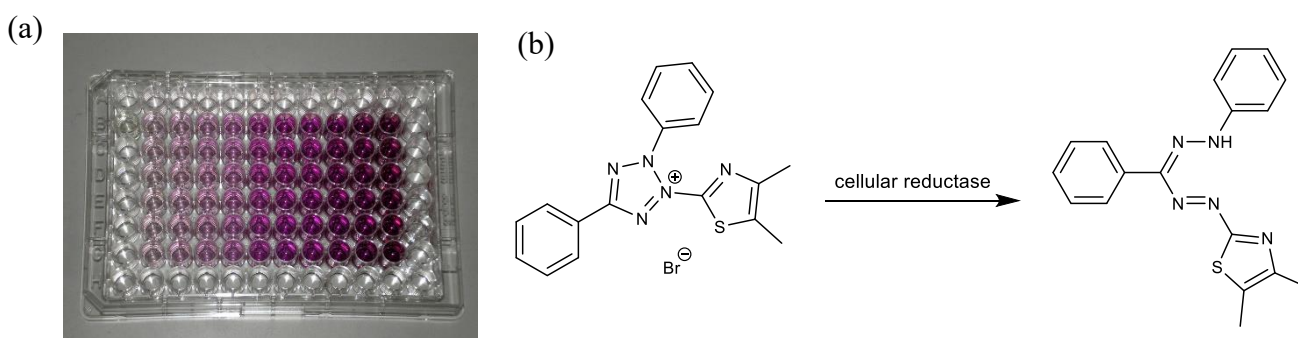


圖12. (a) 細胞代謝生成紫色甲臍結晶 (b) 細胞代謝產生甲臍的反應圖

## 肆、研究結果與討論

### 一、理論計算

(一) 延伸 C 環結構：計算13個候選分子與 CaMKII 的結合能

表1. 延伸 C 環結構之結合能

候選分子編號	結合能(kJ/mol)	候選分子編號	結合能(kJ/mol)
化合物 1	-37.3002	化合物 9	-33.8852
化合物 2	-32.8595	化合物 10	-31.076
化合物 3	-38.9481*	化合物 11	-13.0149
化合物 4	-32.9138	化合物 12	-10.7474
化合物 5	-40.1977*	化合物 13	-25.457
化合物 6	-38.007*	化合物 14	-36.4652
化合物 7	-38.9423*	化合物 15	-32.1782
化合物 8	-35.2327		

\*：結合能大，屬於較佳的候選分子

(二) 修改 A 環結構：計算21個候選分子與 CaMKII 的結合能

表2. 修改 A 環結構之結合能

候選分子編號	結合能(kJ/mol)	候選分子編號	結合能(kJ/mol)
化合物 31	-30.5349	化合物 42	-40.5274
化合物 32	-35.9305	化合物 43	-41.7942
化合物 33	-38.4308	化合物 44	-34.4175
化合物 34	-43.5352*	化合物 45	-38.1236
化合物 35	-37.0368	化合物 46	-40.8114
化合物 36	-41.2927	化合物 47	-43.0451*
化合物 37	-40.8114	化合物 48	-31.6462
化合物 38	-42.2273*	化合物 49	-34.5627
化合物 39	-39.4017	化合物 50	-28.6991
化合物 40	-29.9331	化合物 51	-41.6833
化合物 41	-29.0072		

\*：結合能大，屬於較佳的候選分子

(三) 以化合物**34**為主架構，延長與縮短 B 鏈：計算3個候選分子與 CaMKII 的結合能

表3. 延長/縮短 B 鏈長度之結合能

候選分子編號	結合能(kJ/mol)	候選分子編號	結合能(kJ/mol)
化合物 <b>101</b>	-31.80569	化合物 <b>102</b>	-29.8175
化合物 <b>34</b>	-43.5352*	化合物 <b>103</b>	-23.7882

\*：結合能大，屬於較佳的候選分子

### 【討論】

由表1可知化合物**3**、**5**、**6**、**7**有較大的結合能，分別為-38.9481 kJ/mol，-40.1977 kJ/mol，-38.007 kJ/mol，和-38.9423 kJ/mol，且均較化合物**1**低。

由表2得知化合物**34**、**38**、**47**有較大的結合能，分別為-43.5352 kJ/mol、-42.2273 kJ/mol 和-43.0451 kJ/mol。

經分子模擬分析軟體計算後，由表3得知延長與縮短 B 鏈後，結合能均較化合物**34**小，4 個碳的化合物**34**結合能最大，因此仍選定化合物**34**為合成目標分子。

### (四) 分析候選分子與 CaMKII 之作用力2D 圖

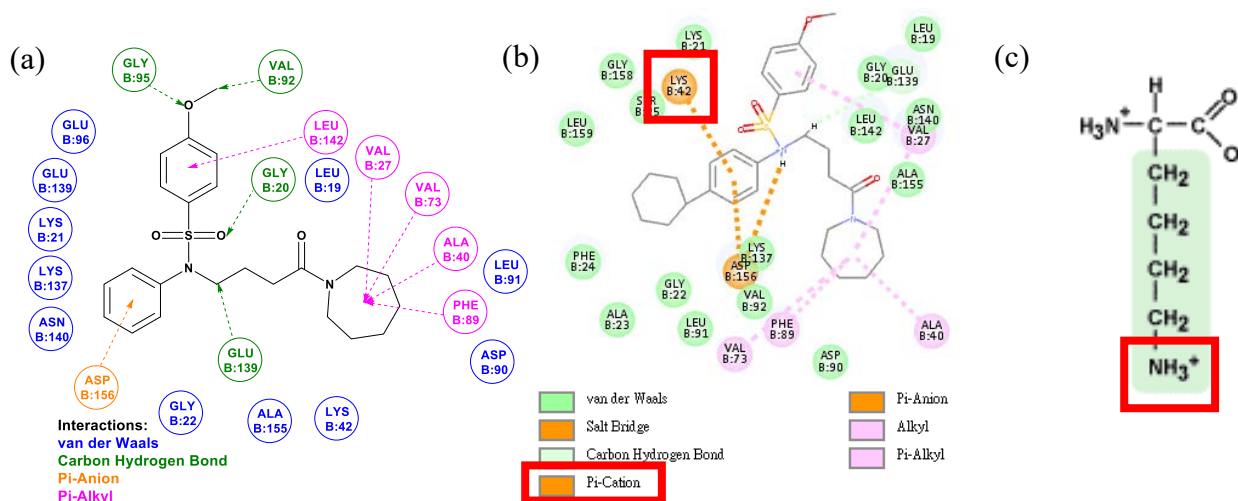


圖13. (a) 化合物**2**作用力2D 圖 (b) 化合物**34**作用力2D 圖 (c) 離胺酸結構

### 【討論】

與化合物**2**的作用力2D 圖比較，化合物**34**與 CaMKII 間多了 Pi-Cation 作用力，也就是苯環與離胺酸(LYS)氮陽離子間的作用力，因此與蛋白質的結合更穩定，有較大的結合能。

化合物**34**與蛋白質的結合能大、易合成與純化、產率高、且起始物價格低，易取得。綜合各方面考量，我們以化合物**34**作為後續合成的目標分子。

## 二、合成目標分子（化合物34）

### （一）合成各步驟藥物劑量

表4. 步驟(a)藥物劑量

	分子量	重量(g)	mmol	當量	mL	密度(g/cm <sup>3</sup> )
4-環己基苯胺	175.28	1.13	6.45	1.00		
4-溴丁酸乙酯	195.05	1.51	7.74	1.20		
三乙胺(a1)	101.19	0.85	8.39	1.30	1.20	0.726
二氯甲烷(0.25M)					25.8	
三乙胺(a2)	101.19	1.63	16.13	2.50	2.30	0.726
4-甲氧基苯磺醯氯	206.65	2.67	12.90	2.00		

表5. 步驟(b)藥物劑量

	分子量	重量(g)	mmol	當量	mL
步驟(a)初產物	459.60	2.50	6.45	1.00	
氫氧化鋇八水合物	315.46	3.05	9.68	1.50	
甲醇(0.06M)					108

表6. 步驟(c)藥物劑量

	分子量	重量(mg)	mmol	當量	mL	密度(g/cm <sup>3</sup> )
步驟(b)初產物	431.55	216	0.50	1.00		
氮雜環庚烷	99.18	50	0.50	1.00	0.057	0.88
1-乙基-3-(3-二甲 基氨基丙基)碳醯 二亞胺鹽酸鹽	191.70	144	0.75	1.50		
1-羥基苯並三唑一 水合物	153.14	115	0.75	1.50		
乙基二異丙基胺	129.25	84	0.65	1.30	0.113	0.742
二氯甲烷(0.1M)					5.00	

### （二）管柱液相層析

根據 TLC 片結果，以展開液乙酸乙酯：正己烷=1：4可使各個點完全分離，且欲得到的產物化合物34約位於 TLC 片的中間偏下，因此最終以展開液乙酸乙酯：正己烷=1：6進行管柱液相層析。

根據管柱液相層析結果，在收集的50管中化合物34落在第20~40管，且20~40管的 TLC 片僅一點，無其他雜點的產生。

### (三) 總產率計算

起始物劑量如表4，限量試劑為4-環己基苯胺。

$$\text{總產率} = \frac{1.16}{\frac{512.71}{6.45}} \times 1000 \approx 0.35 = 35\%$$

### 【討論】

根據20~40管的 TLC 片可知其產物量多且純度高、無雜質，分離的結果成功。從總產率的計算也可知其產率相當高。

### 三、化合物34的結構鑑定

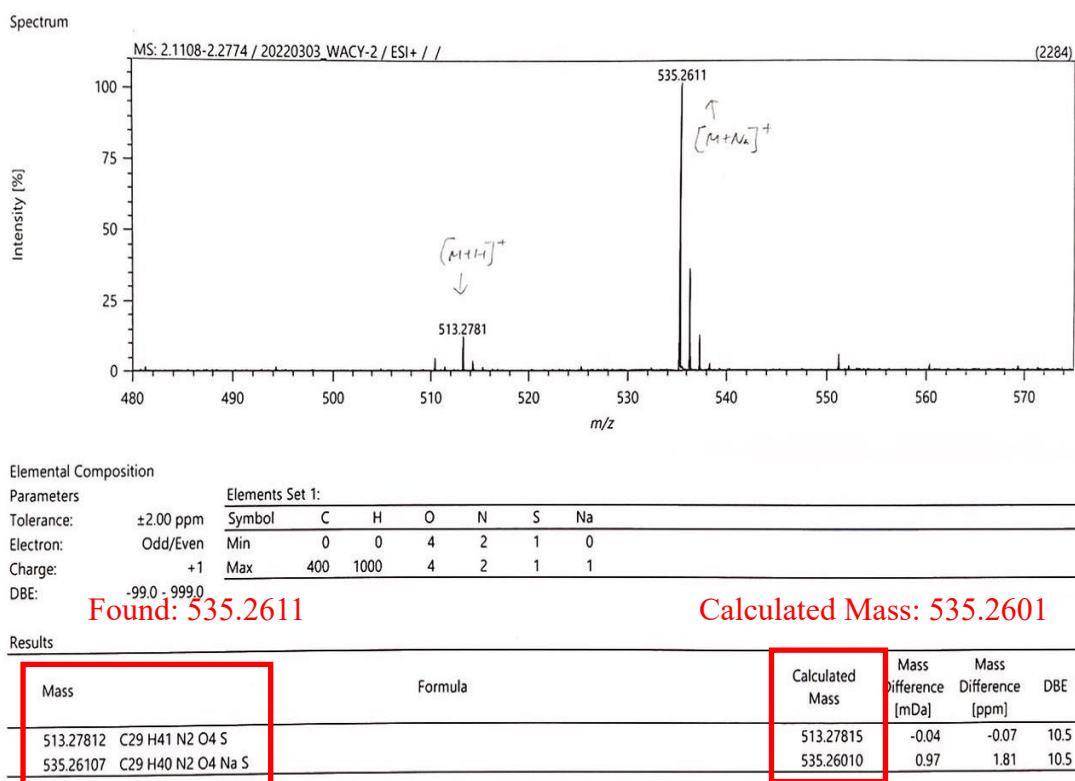


圖14. 化合物34質譜



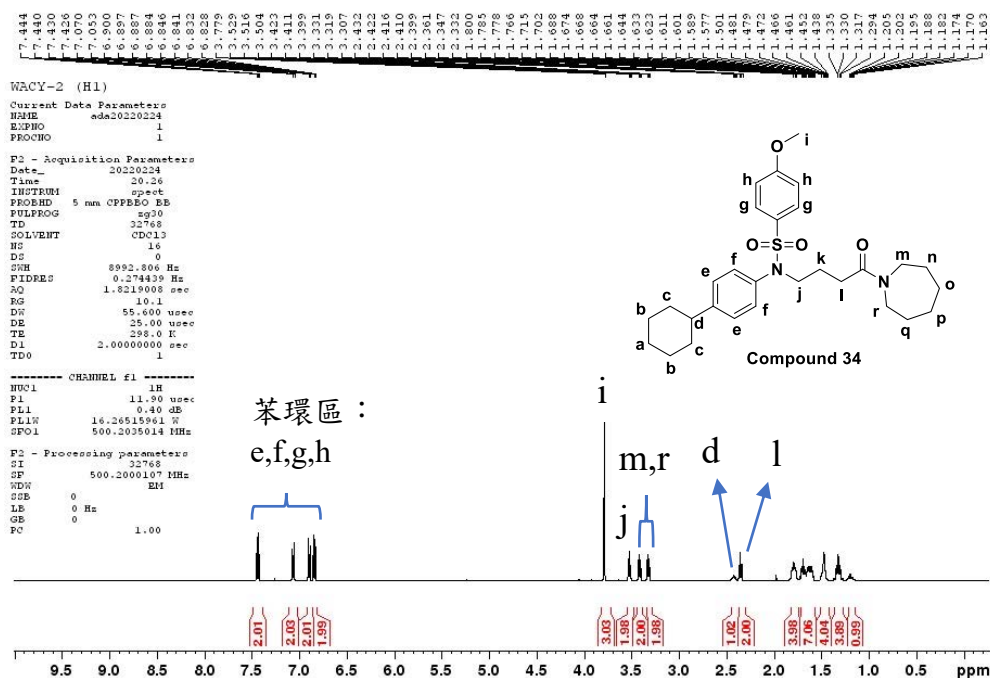


圖 15. 化合物34 NMR 氫譜

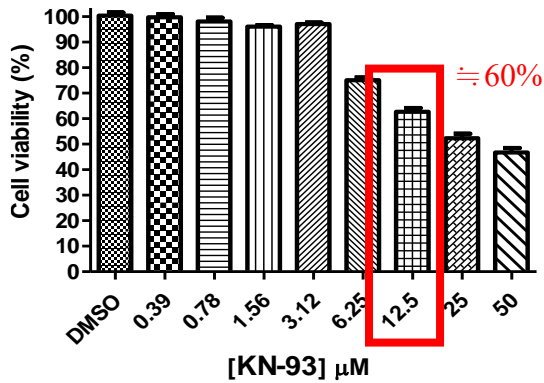
### 【討論】

質譜儀結果：HRMS (ESI+) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>NaS [M+Na]<sup>+</sup>, 535.2601; found, 535.2611。測得分子量與理論值相符。

NMR 圖譜：NMR 鑑定圖譜各峰值符合化合物34之結構，且圖譜雜訊少純度高。圖下方的積分恰等於氫數。苯環區的氫約落在7~7.5ppm 的位置，分別為碳 e, f, g, h 上的氫；氮及氧旁邊的碳上的氫約落在3~4ppm 的位置，氧旁邊的碳 i 上有三個氫，因此峰高且積分為3，碳 m 及 r 上的氫環境相似，因此為兩個峰型相似的峰，另一峰則為碳 j 上的氫；雙鍵旁的碳上的氫約落在2.5ppm 的位置，分別為碳 d 和碳 l 上的氫；其他剩餘的碳上的氫均集中在1~2ppm 的位置。

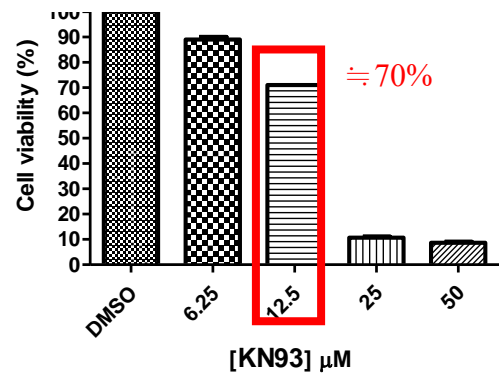
四、細胞毒性檢測

Cytotoxicity of KN-93 in M10/48hr

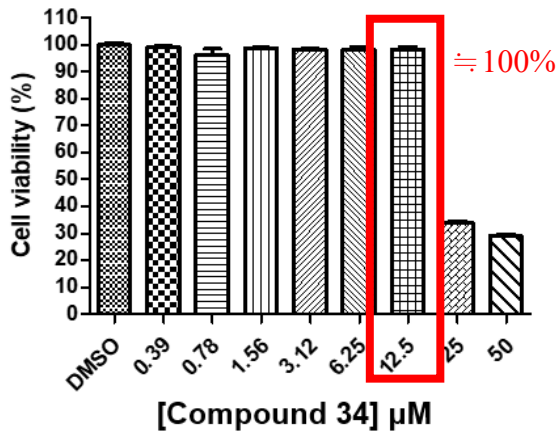


(a) 正常乳腺細胞在 KN-93 的存活率

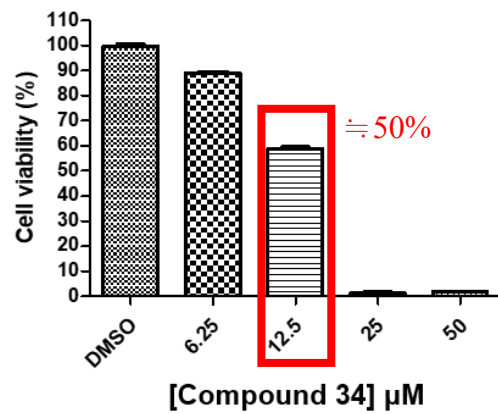
Cytotoxicity of KN93 in MDA-MB-231/48hr



(b) 乳癌細胞在 KN-93 的存活率



(c) 正常乳腺細胞在化合物34的存活率



(d) 乳癌細胞在化合物34的存活率

圖16. 正常乳腺細胞(M10)和乳癌細胞(MDA-MB-231)之細胞存活率分析

【討論】

表7. 抑制劑濃度為12.5 $\mu\text{M}$ 時兩種細胞的存活率

抑制劑分子	細胞存活率	
	正常乳腺細胞	乳癌細胞
KN-93	60%	70%
Compound 34	100%	50%

根據上表，化合物34對乳癌細胞的毒性大於 KN-93；化合物34在濃度為12.5 $\mu\text{M}$ 時對正常細胞的毒性幾乎為零，而其可毒殺將近50%的乳癌細胞，表示化合物34對正常細胞和乳癌細胞的選擇性優於 KN-93。

根據上圖的趨勢，若化合物34作為抗癌藥物，其治療範圍(therapeutic window)介於 6.25~12.5 $\mu\text{M}$  之間。

## 伍、結論

### 一、理論計算

- (一) 化合物**34**與 CaMKII 結合能大、合成純化過程簡易，且起始物易取得，因此選定其為後續合成的目標分子。
- (二) 以電腦進行理論計算可排除不可能的候選分子，快速探討多種結構，減少不必要的資源浪費。

### 二、合成

- (一) 本合成路徑製程短、合成效率及產物純度高。
- (二) 若在 A 環或 C 環改變不同連接基團，便可製成各種候選分子，因此我們設計的合成路徑具備多變性與彈性，有利於新藥物的開發。

### 三、鑑定

- (一) 質譜測得分子量符合理論值。
- (二) NMR 圖譜雜訊少，表示成功合成出高純度的抑制劑。

### 四、細胞毒性檢測

- (一) 化合物**34**在濃度為12.5 $\mu$ M 時對乳癌細胞的毒性高，且對正常細胞和乳癌細胞具有選擇性，未來可望用於標靶治療，作為治療乳癌的潛力藥物。
- (二) 若化合物**34**作為抗癌藥物，其治療範圍(therapeutic window)介於6.25~12.5 $\mu$ M 之間。

## 陸、參考文獻資料

- 一、Chen, W. C., Simanjuntak, Y., Chu, L. W., Ping, Y. H., Lee, Y. L., Lin, Y. L., & Li, W. S. (2020). Benzenesulfonamide derivatives as calcium/calmodulin-dependent protein kinase inhibitors and antiviral agents against dengue and zika virus infections. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(3), 1313-1327.
- 二、Brzozowski, J. S., & Skelding, K. A. (2019). The multi-functional calcium/calmodulin stimulated protein kinase (CaMK) family: Emerging targets for anti-cancer therapeutic intervention. *Pharmaceuticals*, 12(1), 8.
- 三、Simanjuntak, Y., Liang, J. J., Lee, Y. L., & Lin, Y. L. (2017). Japanese encephalitis virus exploits dopamine D2 receptor-phospholipase C to target dopaminergic human neuronal cells. *Frontiers in Microbiology*, 8, 651.

## 【評語】 050203

本研究優點綜合多項研究，包括設計並一鍋化合成鈣及攜鈣蛋白調節酶 CaMKII 的抑制劑，並用理論計算解釋結構-功能關係，找出比已知 KN-93 與 KN-62 兩種市售更好的 CaMKII 抑制劑，具潛力作為抗乳癌的化療藥物。有些可再改進的缺點或可更清楚說明的詳列於下：

1. 應說明鈣及攜鈣蛋白調節酶的抑制劑能殺腫瘤的機制為何。在所列的第一篇論文是用來抗病毒。也有論文說是治療心臟病。
2. 應說明為何 KN-93 與 KN-62 兩種市售 CaMKII 抑制劑，其效用僅止於制蛋白質，尚未應用至治療。是有毒性等副作用嗎？毒性等副作用的原因為何會成為你們要改進的重點？另外文獻報導 KN-93 是結合在  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  而非 CaMKII. 你們的化合物卻直接結合在 CaMKII，確定嗎？
3. 圖 2. 論文中化合物 1 與蛋白質的結合立體結構圖，看起來化合物 1 有 4 個標藍色的氮原子及二個環是化學結構沒有的。
4. 雖然看得出來在哪，仍應標示化合物 1 化學結構的 A, B, C 環(應無 D 環)及 B 鏈。

5. 具氮雜環庚烷(azepane)的化合物 2 比具環庚烷的化合物 1 差，也比化合物 5 差，為何要保持氮雜環庚烷去合成 31~51，再選出 34 為標的？
6. 圖 13 顯示化合物 2 與化合物 34 的結合模式不同，其實化學結構只有 A 環多個環己烷，為何化合物 34 會多出 Pi-Cation 作用力，也就是苯環與離胺酸(LYS)氮陽離子間的作用力？是環己烷迫使苯環位移嗎？A 環的容納空間有限嗎？都要詳盡說明。
7. 氮譜要說明積分和氮數目是否吻合，訊號分裂及 coupling constants 是否吻合結構。
8. 細胞毒性檢測最好是報告 IC50 (對乳癌細胞的半抑制常數) 及 CC50(對正常乳腺細胞的半抑制常數)，再求 therapeutic index(CC50/IC50)才較準確，而非只比較某一濃度的細胞抑制比。例如化合物 34 在 25  $\mu$ M 就比 KN-93 對正常乳腺細胞毒。

## 作品簡報

中華民國第62屆中小學科學展覽會

理論計算、設計及高效率極簡合成

CaMKII 抑制劑之最佳潛力抗癌藥物

組別：高級中等學校組

科別：化學科

編號：050203

# 前言

## 一、鈣及攜鈣蛋白調節酶(CaMKII)

- 已知在人類多種癌細胞中過度表現，抑制其活性可減少癌細胞增殖
- 市售抑制劑：KN-93（尚未應用至癌症治療）

## 二、乳癌

- 台灣女性癌症死亡原因第四名
- 本研究測試之乳癌細胞：MDA-MB-231

## 三、研究目的

- 製備比 KN-93 效果更佳、更易合成且產率更高之 CaMKII 抑制劑
- 開發具有潛力之乳癌標靶藥物

## 四、實驗流程

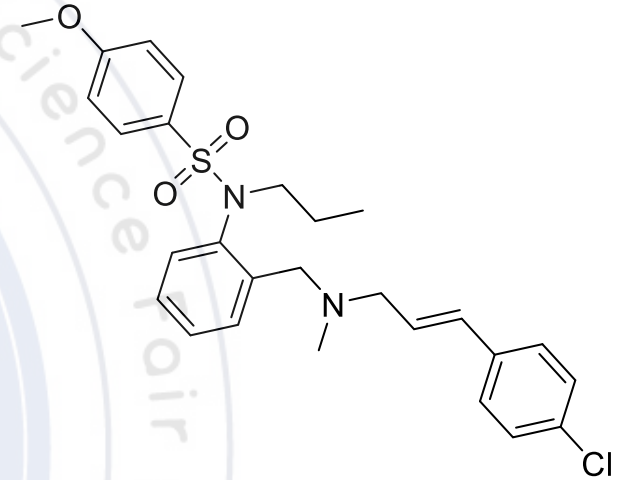


圖1：KN-93結構

### 分子結構設計

- 共設計出 42 種候選分子

### 理論計算

- 利用分子模擬分析軟體篩選出有潛力的藥物分子

### 合成純化

- 一鍋化三步合成，減少純化次數

### 生物測試

- MTT 實驗
- 酵素活性測試

### 動物實驗

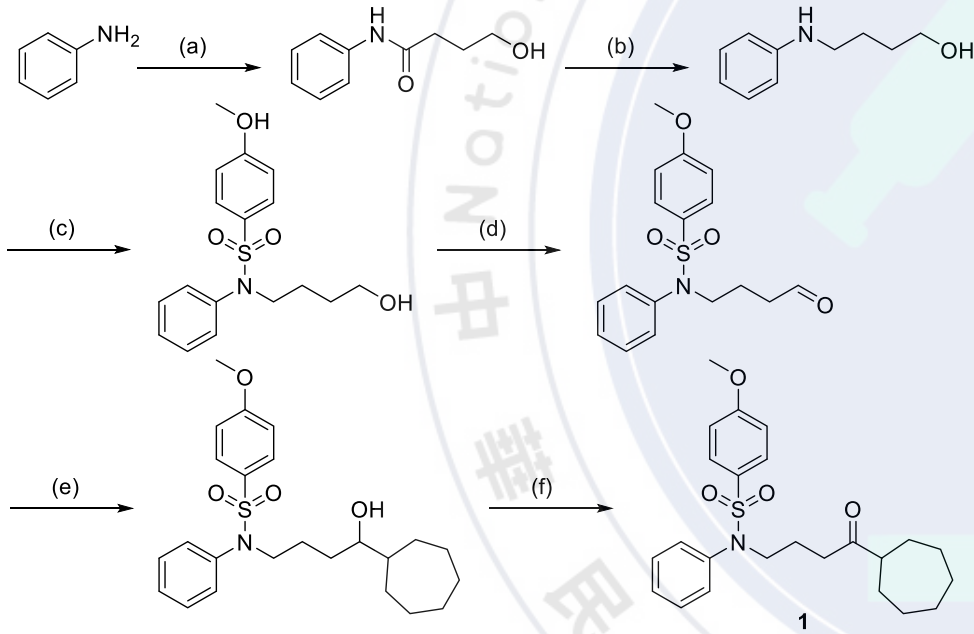
- 未來使用裸鼠進行藥效測試



# 前言

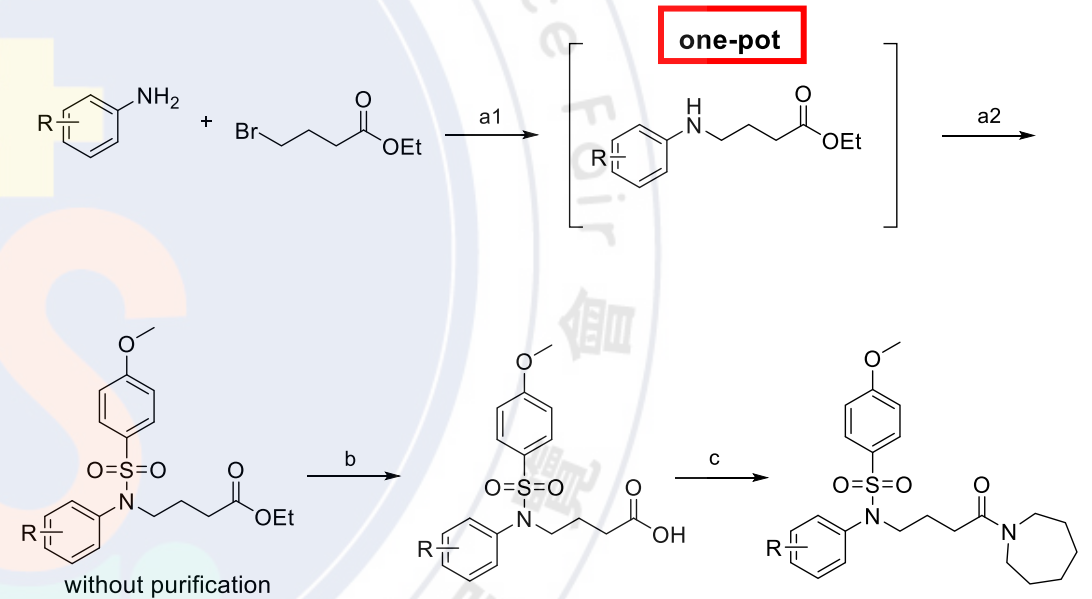
## 五、本研究創新結果

- 透過**創新的合成路徑**，製備精準消滅癌細胞的藥物分子。
- 先利用分子模擬分析軟體進行理論計算，可快速探討多種分子結構，減少資源浪費。
- 新穎的合成路徑，簡單、成功率高、純度高、產率高、具多變性。由文獻<sup>[1]</sup>中的六步驟合成縮短為三步驟，第一步為一鍋化反應，減少純化次數。



使用藥品及反應條件：(a1) NaH, THF, 30 min, 90 °C, (a2) butyrolactone, THF, 8 h, 90 °C, 90%; (b) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 8 h, 90 °C; (c) 4-methoxybenzenesulfonyl chloride, Et<sub>3</sub>N, THF, 60 °C, 4 h, 76%; (d) PDC, DCM, 8 h, 室溫, 65%; (e1) bromocycloheptane, Mg, THF, 室溫, 2 h, (e2) aldehyde, THF, 60 °C, 2 h, 60%; (f) PDC, DCM, 8 h, 室溫

圖2：文獻<sup>[1]</sup>中化合物1的合成路徑(六步驟)



使用藥品及反應條件：(a1) Et<sub>3</sub>N, neat 反應, 室溫, 18 h (a2) methoxybenzenesulfonyl chloride, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 6 h; (b) Ba(OH)<sub>2</sub>, MeOH, 室溫, 24 h; (c) azepane, EDC, HOBT, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室溫

圖3：本研究目標分子 (WACY系列) 的合成路徑(三步驟)

# 研究方法與過程

## 一、分子結構設計

### 1. 化合物1中的碳原子改換成化合物2中的氮原子 (圖5)

- 目的：可減少兩步驟的合成，且最後一步改為醯胺化反應，成功率與產率均提高
- 不影響其與 CaMKII 中胺基酸的作用方位 (圖4)，且較化合物1多了與 ASP B:156 的 Pi-Anion 作用力，與蛋白質結合更穩定

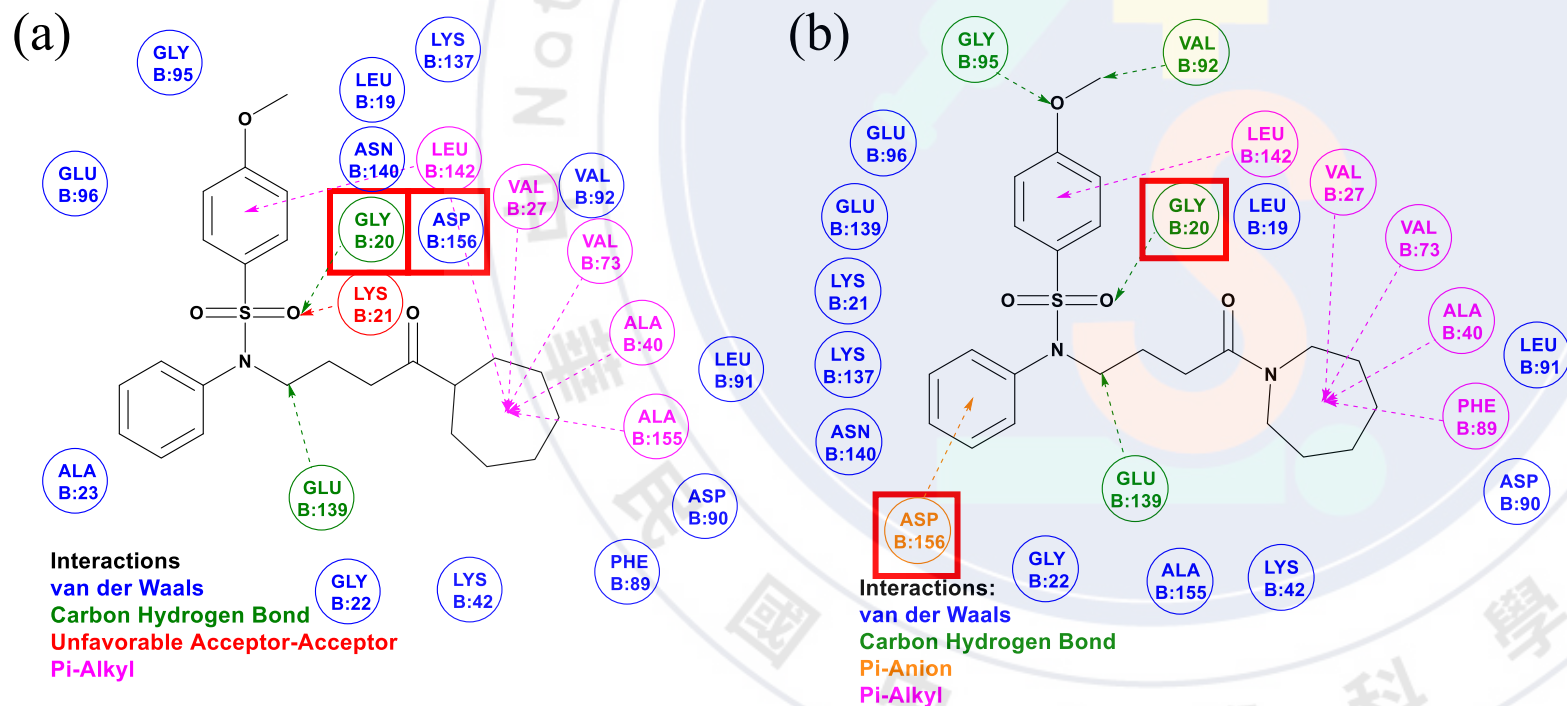


圖4：(a) 化合物1與 CaMKII 之作用力2D圖 (b) 化合物2與 CaMKII 之作用力2D圖

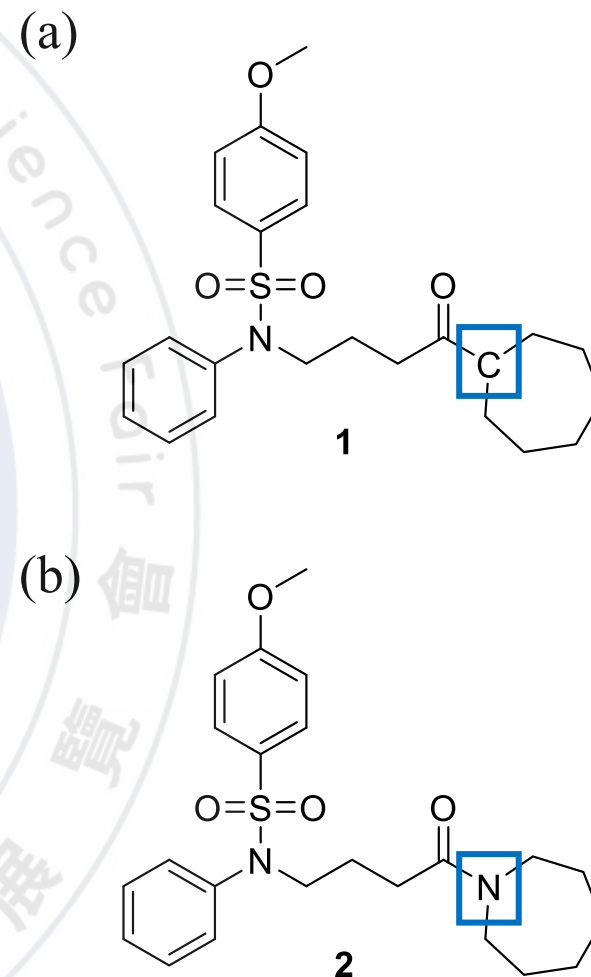


圖5：(a) 化合物1 (b) 化合物2

# 研究方法與過程

2. 延伸C環結構 (圖8)
3. 修改A環結構 (圖7)
4. 伸長/縮短B鏈 (3~6個碳: 共三種)

## 二、分子模擬分析軟體測定化合物與 CaMKII 之結合情形

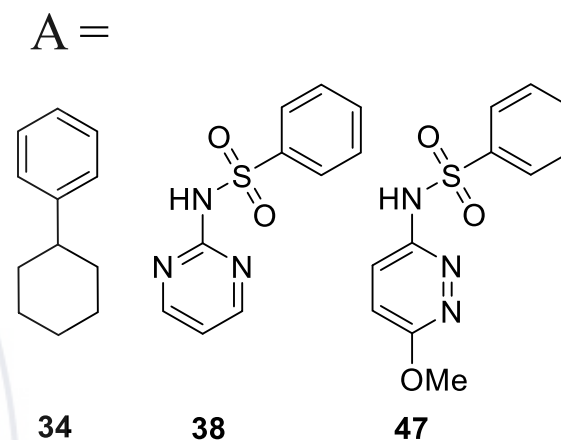
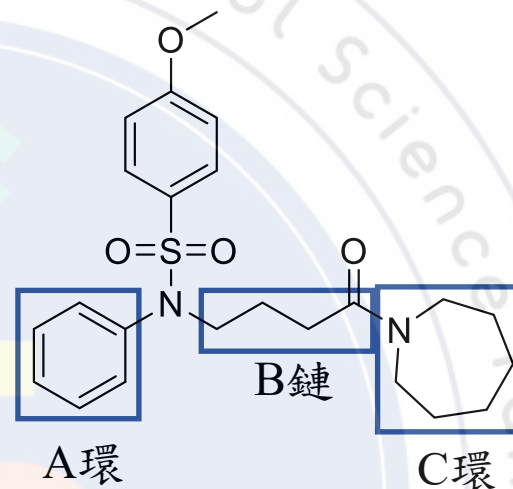
1. 計算候選分子與 CaMKII 之結合能
2. 分析候選分子與 CaMKII 之作用力2D圖

## 三、合成有潛力之化合物

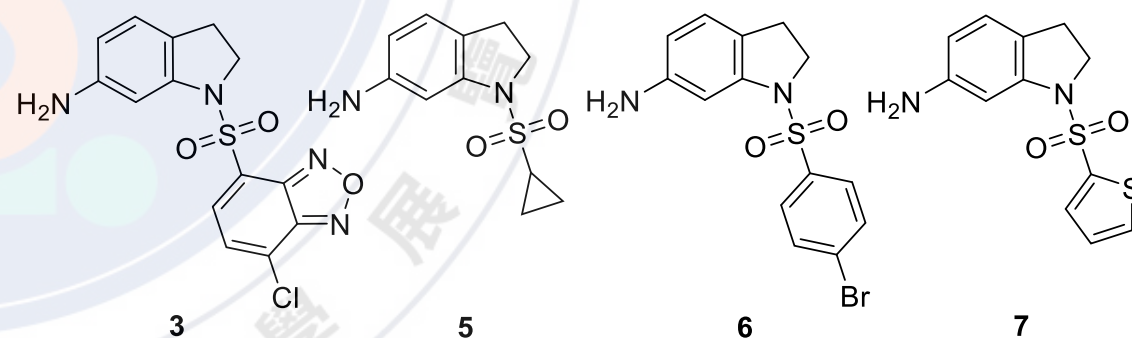
1. 綜合考量結合能大小、合成難易度及產率高低，選定WACY系列化合物作為合成目標分子
2. 三步簡易合成，第一步為一鍋化反應，只需最後兩步進行純化

## 四、生物測試

1. 細胞毒性檢測：比較正常乳腺細胞及乳癌細胞分別在 KN-93 與化合物中的細胞存活率。
2. 酵素活性測試：檢測藥物分子對酵素活性之抑制效果。



C =



# 研究結果與討論

## 一、理論計算

### (一) 延伸C環結構：共13個候選分子

表1：延伸C環結構之結合能

候選分子	結合能 (kJ/mol)	候選分子	結合能 (kJ/mol)
<b>3</b>	-38.9481	<b>6</b>	-38.0070
<b>5</b>	-40.1977	<b>7</b>	-38.9423

### (二) 修改A環結構：共26個候選分子

表2：修改A環結構之結合能

候選分子	結合能 (kJ/mol)	候選分子	結合能 (kJ/mol)
<b>2</b>	-32.8595	<b>WACY-6 (53)</b>	-44.0056
<b>WACY-2 (34)</b>	-45.4609	<b>WACY-8 (54)</b>	-37.3460
<b>WACY-4 (52)</b>	-41.5254	<b>WACY-10 (55)</b>	-39.2281

### (三) 延長/縮短B鏈長度 (3~6個碳)：多三個候選分子

表3：延長/縮短B鏈長度之結合能

候選分子	結合能 (kJ/mol)	候選分子	結合能 (kJ/mol)
<b>101</b>	-31.8057	<b>102</b>	-29.8175
<b>WACY-2 (34)</b>	-45.4609	<b>103</b>	-23.7882

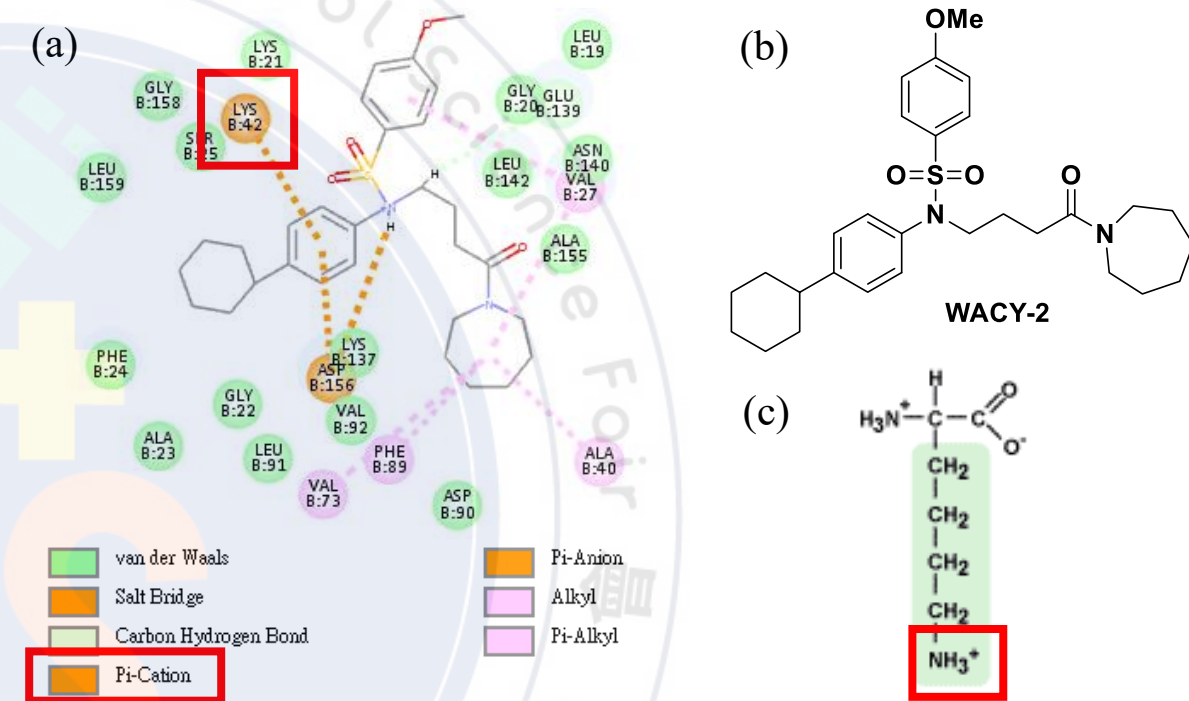


圖9：(a) WACY-2之作用力2D圖 (b) WACY-2結構 (c) 離胺酸結構

- 與化合物2比較，WACY-2與CaMKII間多了Pi-Cation作用力（苯環與離胺酸(LYS)氮陽離子間的作用力），因此與蛋白質的結合更穩定。
- A環衍生物易合成與純化，產率高，且起始物價格低，易取得。綜合各方面考量，我們以WACY系列化合物作為後續合成的目標分子。

# 研究結果與討論

## 二、合成目標分子

### ➤ 合成步驟：

(a1) 取代反應生成二級胺

(a2) 磺酸化反應，生成苯磺醯胺

(b) 酯鍵的水解反應，生成羧酸化合物

(c) 醯胺化反應72小時，進行管柱液相層析純化。以 **WACY-2** 為例，展開液乙酸乙酯：正己烷=1：6，收集第20~40管。

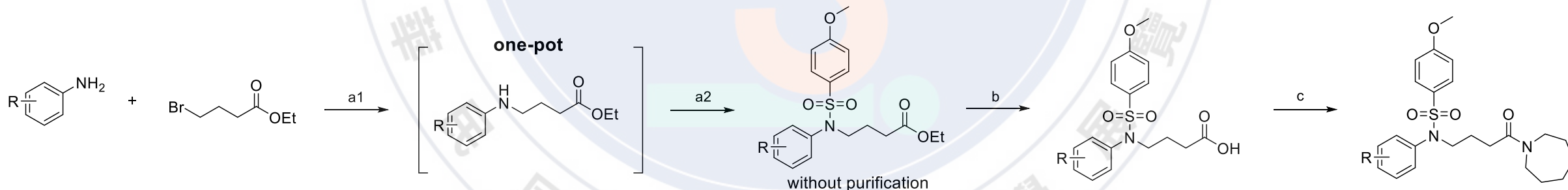
### ➤ 產率計算：

起始物劑量如表4，**WACY-2**的限量試劑為4-cyclohexylaniline

$$\text{總產率} = \frac{1.81}{512.71} \times 1000 \div 10 \cong 0.35 = 35\%$$

➤ 步驟(a1)及(a2)為一鍋化反應，且合成僅需三步，減少純化過程，可**提高產率，縮短製備時間**

➤ 所設計的合成路徑，僅需改變A環或C環上的官能基或取代基，**便可合成多樣的候選分子**



使用藥品及反應條件: (a1) Et<sub>3</sub>N, neat反應, 室溫, 18 h (a2) 4-methoxybenzenesulfonyl chloride, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 6 h; (b) Ba(OH)<sub>2</sub>, MeOH, 室溫, 24 h; (c) azepane, EDC, HOBt, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室溫

圖3：WACY系列之合成路徑

# 研究結果與討論

## 二、合成目標分子

表4：步驟(a1)之起始物劑量

起始物	wt(g)	mmol	eq	備註
ethyl 4-bromobutanoate	2.34	12	1.20	共同起始物
Et <sub>3</sub> N	1.32	13	1.30	共同起始物
4-cyclohexylaniline	1.75	10	1.00	<b>WACY-2</b> 起始物
3, 4, 5-trimethoxyaniline	1.83	10	1.00	<b>WACY-4</b> 起始物
4-fluoroaniline	1.11	10	1.00	<b>WACY-6</b> 起始物
4-bromoaniline	1.72	10	1.00	<b>WACY-8</b> 起始物
4-isopropoxyaniline	1.51	10	1.00	<b>WACY-10</b> 起始物

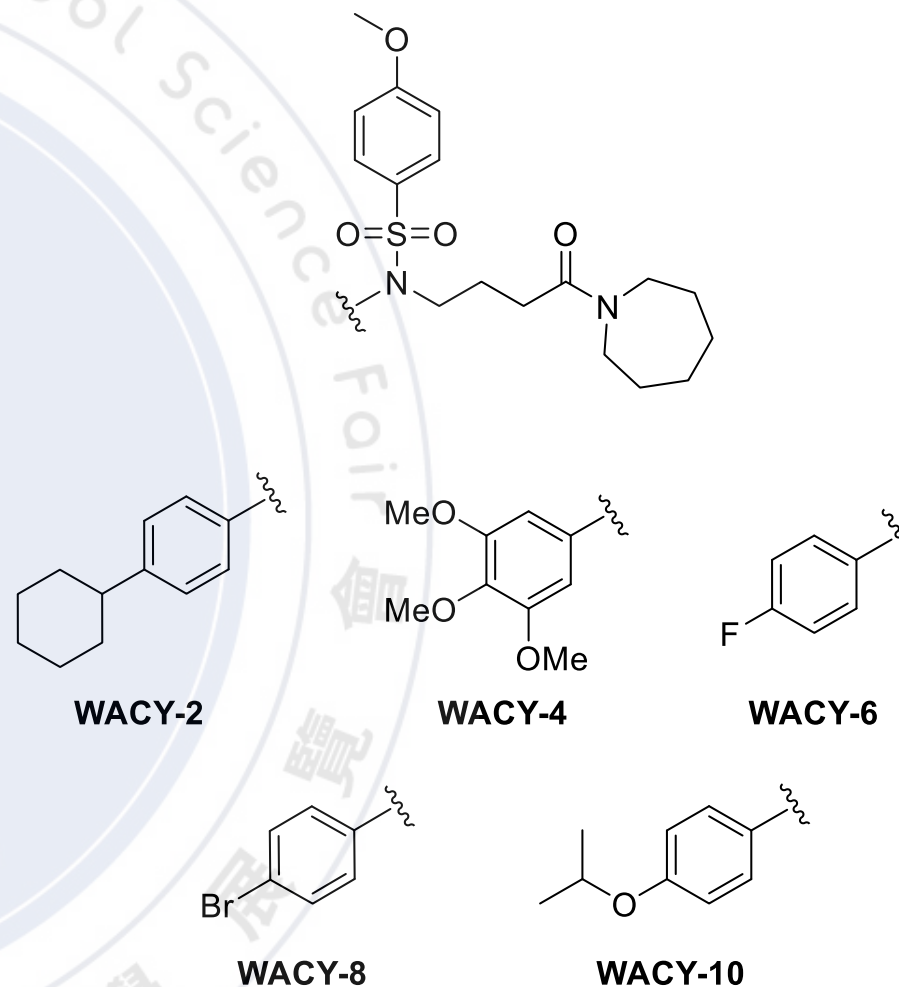


圖10：WACY-2~10結構

# 研究結果與討論

## 三、WACY系列化合物的結構鑑定

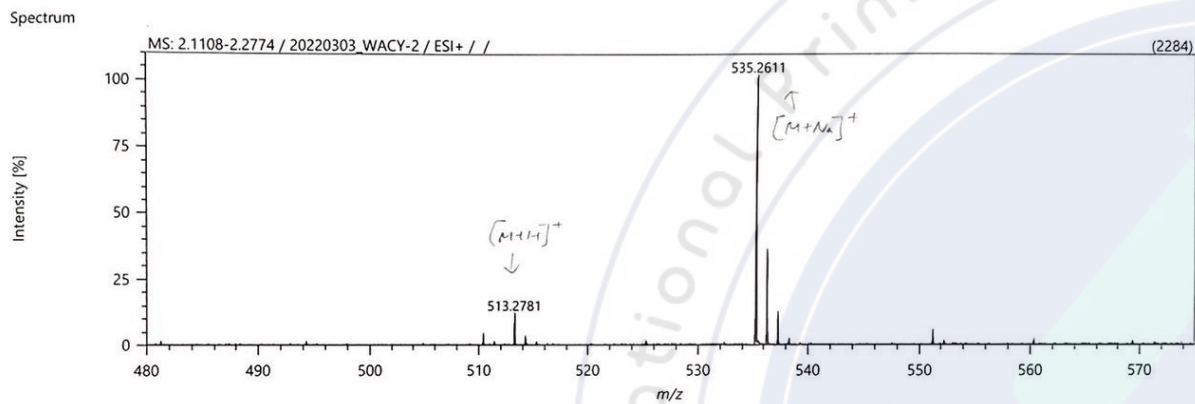
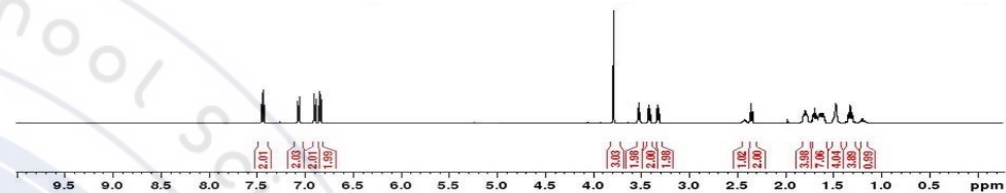


圖11：WACY-2質譜

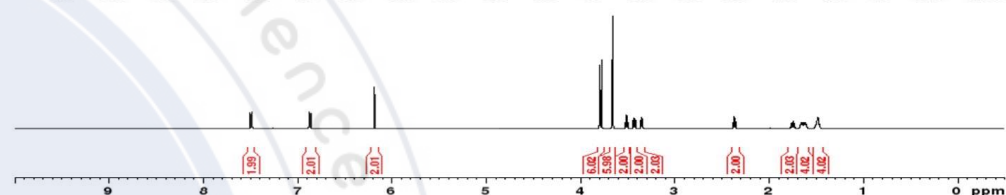
➤ 質譜儀結果：

<b>WACY-2</b>	HRMS (ESI+) calcd for	$C_{29}H_{40}N_2O_4NaS$ [M+Na] <sup>+</sup>	535.2601	found,	535.2611
<b>WACY-4</b>		$C_{26}H_{36}N_2O_7NaS$ [M+Na] <sup>+</sup>	543.2131		543.2135
<b>WACY-6</b>		$C_{23}H_{29}N_2O_4FNaS$ [M+Na] <sup>+</sup>	471.1729		471.1724
<b>WACY-8</b>		$C_{23}H_{29}N_2O_4NaSBr$ [M+Na] <sup>+</sup>	531.0933		531.0924
<b>WACY-10</b>		$C_{26}H_{36}N_2O_5NaS$ [M+Na] <sup>+</sup>	511.2246		511.2237

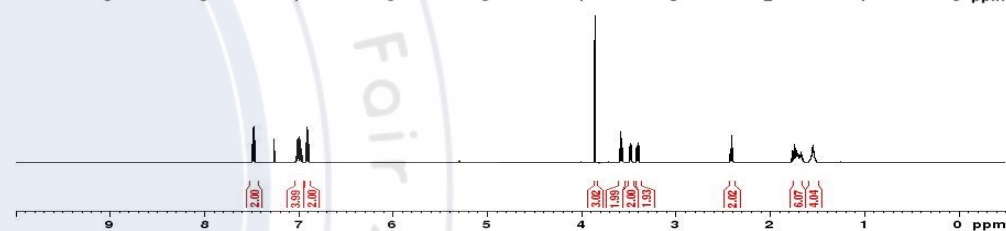
**WACY-2**



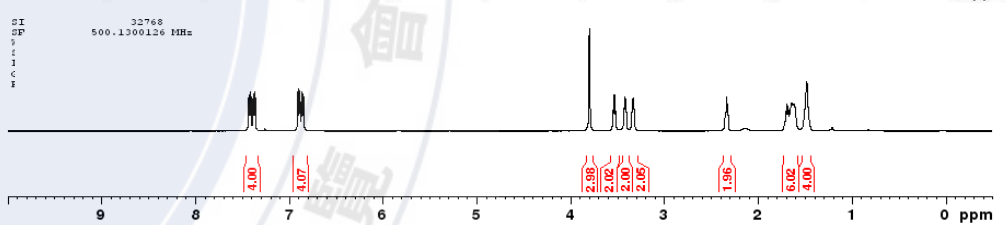
**WACY-4**



**WACY-6**



**WACY-8**



**WACY-10**

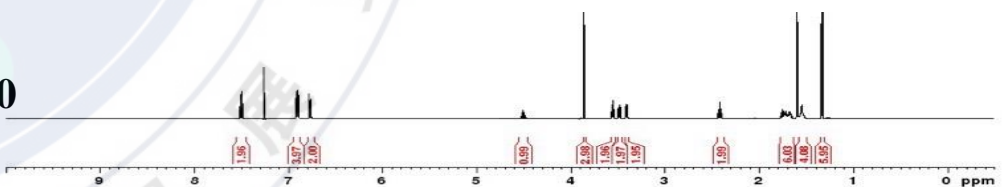


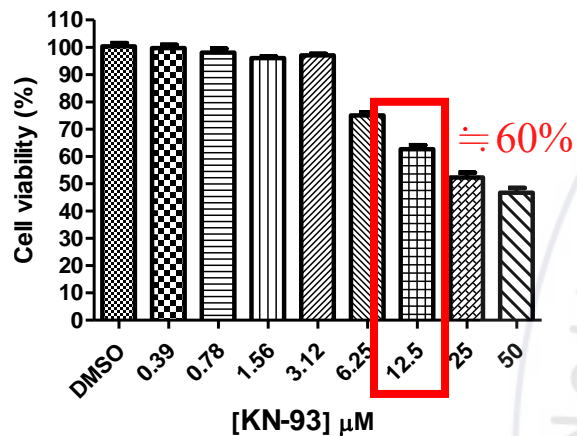
圖12：WACY系列化合物的NMR氫譜

➤ NMR圖譜：

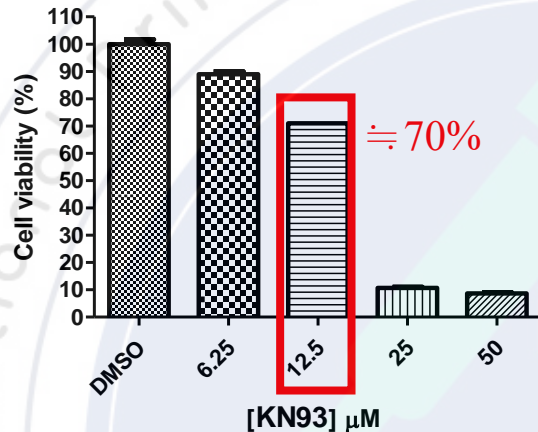
圖譜符合化合物之結構，且雜訊少，表示純度高。

# 研究結果與討論

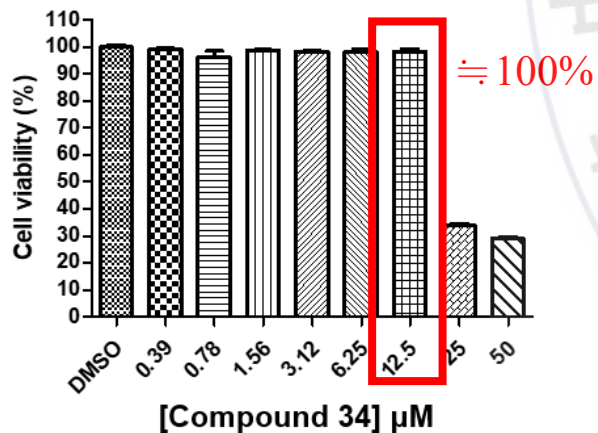
## 四、生物檢測



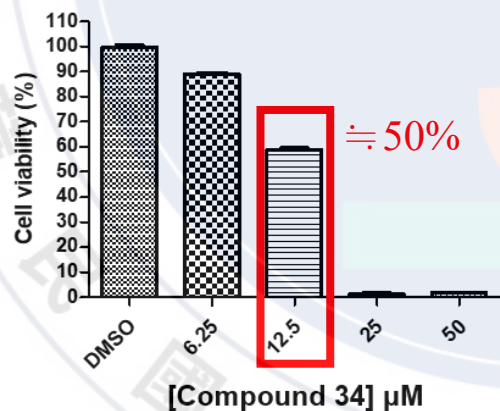
(a) 正常乳腺細胞在KN-93的存活率



(b) 乳癌細胞在KN-93的存活率



(c) 正常乳腺細胞在WACY-2的存活率



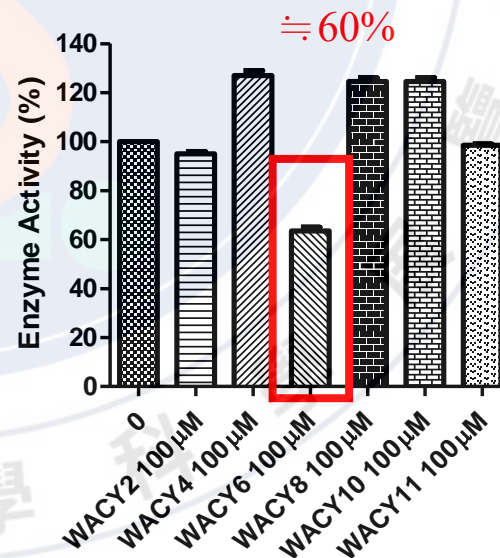
(d) 乳癌細胞在WACY-2的存活率

圖13：正常乳腺細胞(M10)和乳癌細胞(MDA-MB-231)之細胞存活率分析

表5：抑制劑濃度為12.5 $\mu\text{M}$ 時兩種細胞的存活率

抑制劑分子	細胞存活率	
	正常乳腺細胞	乳癌細胞
KN-93	60%	70%
WACY-2	100%	50%

- WACY-2對乳癌細胞的毒性大於KN-93；WACY-2對正常細胞和乳癌細胞的選擇性優於KN-93。
- 若WACY-2作為抗癌藥物，其治療範圍介於6.25~12.5 $\mu\text{M}$ 。



- WACY-6的蛋白質抑制能力最佳，為最具有潛力的CaMKII抑制劑。
- WACY-6可作為其他具備CaMKII過度活化的癌症的潛力藥物。

圖14：WACY系列對CaMKII的抑制能力分析



# 結論

## 1. 理論計算：

- WACY系列化合物與 CaMKII 結合能大、合成純化過程簡易，且起始物易取得，因此選定其為後續合成的目標分子。

## 2. 合成：

- 本合成路徑製程短、合成效率及產物純度高。
- 若在A環或C環改變不同連接基團，便可製成各種候選分子，如WACY系列化合物，因此我們設計的合成路徑具備多變性與彈性，有利於新藥物的開發。

## 3. 鑑定：

- 質譜測得分子量符合理論值；NMR圖譜雜訊少，表示成功合成出高純度的抑制劑。

## 4. 生物檢測：

- WACY-2在濃度為12.5 $\mu$ M時對乳癌細胞的毒性高，且對正常細胞和乳癌細胞具有選擇性，未來可望用於標靶治療，作為治療乳癌的潛力藥物。
- WACY-6對CaMKII的抑制能力最佳，為最具有潛力的CaMKII抑制劑，可作為其他CaMKII過度活化的癌症的潛力藥物。
- WACY-2和WACY-6為兩個最具潛力的抗癌藥物，且理論計算中也是結合能最低的兩個，生物檢測結果與理論計算相符。

## 5. 未來展望：

- 若WACY-2作為抗癌藥物，其治療範圍(therapeutic window)介於6.25~12.5 $\mu$ M之間。

# 參考資料

1. Chen, W. C., Simanjuntak, Y., Chu, L. W., Ping, Y. H., Lee, Y. L., Lin, Y. L., & Li, W. S. (2020). Benzenesulfonamide derivatives as calcium/calmodulin-dependent protein kinase inhibitors and antiviral agents against dengue and zika virus infections. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(3), 1313-1327.
2. Brzozowski, J. S., & Skelding, K. A. (2019). The multi-functional calcium/calmodulin stimulated protein kinase (CaMK) family: Emerging targets for anti-cancer therapeutic intervention. *Pharmaceuticals*, 12(1), 8.
3. Simanjuntak, Y., Liang, J. J., Lee, Y. L., & Lin, Y. L. (2017). Japanese encephalitis virus exploits dopamine D2 receptor-phospholipase C to target dopaminergic human neuronal cells. *Frontiers in Microbiology*, 8, 651.