

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



190783

รายงานการวิจัย

การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์อสมมาตรยูเรียเรียดต่อตัวรับ P2Y

(Synthesis and biological activity of
asymmetrical urea derivatives at P2Y receptors)

โดย

ดร. ดรุณี หงษ์วิเศษ

รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบัน ศิริธัญญาลักษณ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2552

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



รายงานการวิจัย

การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์อสมมาตรยูเรียต่อดั้วรับ P2Y

(Synthesis and biological activity of
asymmetrical urea derivatives at P2Y receptors)

โดย



ดร. ดรุณี หงษ์วิเศษ

รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบัน ศิริธัญญาลักษณ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2552

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คำนำ

เนื่องจากเทคโนโลยีทางวิทยาศาสตร์ได้มีการพัฒนาก้าวหน้าขึ้นอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน มีการค้นพบตำแหน่งการออกฤทธิ์และกลไกในการออกฤทธิ์ของยาในระดับโมเลกุลเพิ่มขึ้นอย่างมากมาย รวมถึงมีการค้นคว้าถึงโครงสร้างและการทำงานของตำแหน่งออกฤทธิ์ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นที่รีเซปเตอร์ channel โปรตีน หรือ ดีเอ็นเอ จากผลที่ได้จากการศึกษาทำให้สามารถจัดแบ่งกลุ่มหรือตำแหน่งการออกฤทธิ์ได้เป็นชนิดย่อยต่างๆมากมายตามลักษณะ ตำแหน่งที่พบ และผลที่เกิดจากการกระตุ้นหรือยับยั้ง การพัฒนา สารที่สามารถออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้นหรือตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อรีเซปเตอร์หนึ่งๆจึงมีความจำเป็นต้องมีการพัฒนาด้วยเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบผลการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ดีและผลข้างเคียงที่ลดลง งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ในการสนับสนุนงบประมาณจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะช่วยเป็นแนวทางหรือเป็นประโยชน์ในการศึกษาพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ต่อ P2Y receptor ที่มีความจำเพาะ และอาจเป็นประโยชน์ต่อแนวทางการพัฒนายาใหม่ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Prof. Dr. Matthias U Kassack รวมทั้งสมาชิกในห้องแลปทั้งที่ University of Bonn และจาก Duesseldorf ได้แก่ Sabine Meis, Alexandra Hamacher และ Heiko Ullmann ที่ช่วยสอนตั้งแต่การใช้เครื่องมือต่างๆ ทั้งที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการทำงาน

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลางและห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี ที่ให้ความช่วยเหลือด้านสารเคมี อุปกรณ์การทำงานและเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษานี้

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

190783

อนุพันธ์อสมมาตรยูเรีย ตัวได้แก่ 8-(4-ฟลูออโร-3-(3-(3-ฟีนิลยูริโด)เบนซออะมิโด)เบนซออะมิโด)-แนฟธาซีน-1,3,5-ไตรซัลโฟเนต โซเดียม, 8-(4-เมทิล-3-(3-(3-ฟีนิลยูริโด)เบนซออะมิโด)เบนซออะมิโด)-แนฟธาซีน-1,3,5-ไตรซัลโฟเนต โซเดียม, 8-(4-เมทอกซี-3-(3-(3-ฟีนิลยูริโด)เบนซออะมิโด)เบนซออะมิโด)-แนฟธาซีน-1,3,5-ไตรซัลโฟเนต โซเดียม, และ 8-(3-(เอ็น'-(3-(เอธิลคาร์บอนิล)-ฟีนิล)-ยูริโด)เบนซออะมิโด)-4-ฟลูออโรเบนซออะมิโด)-แนฟธาซีน-1,3,5-ไตรซัลโฟเนต โซเดียม ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารเอมีนและไอโซไซยาเนต โครงสร้างสารที่สังเคราะห์ได้พิสูจน์ได้โดย โปรตอน 1-และคาร์บอน 13-นิวเคลียสมกเนติกสเปกโตรเมตรี มัลติเมตรี และการวิเคราะห์องค์ประกอบสาร การทอพอแมสสเปกโตรตรวจสอบความบริสุทธิ์ทำโดยโครมาโตกราฟีผิวบาง และหาปริมาณโซเดียมคลอไรด์โดยวิธีไทเทรต ฤทธิ์ต่อ P2Y₁₁ รีเซปเตอร์ของสารทั้งสี่ตัวถูกประเมินโดยการวัดระดับแคลเซียมในเซลล์ โดยใช้ P2Y รีเซปเตอร์1 รีคอมบิแนนท์-321N1 แอสโตรไซโตมาเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าไม่มีตัวใดมีฤทธิ์กระตุ้นรีเซปเตอร์ แต่ทุกตัวสามารถต้านฤทธิ์ที่กระตุ้นโดยอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (เอทีพี) ได้ด้วยค่า (pKi 6.58, 6.71, 6.39 และ ตามลำดับ 7.04 ฤทธิ์ที่ได้จากอนุพันธ์อสมมาตรยูเรีนี้นับว่าสูงกว่าอนุพันธ์เอมีนตั้งต้นแต่ต่ำกว่าอนุพันธ์มาตรฐานยูเรีย NF157

190783

Four asymmetrical urea derivatives, 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium, 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium, 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium and 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium, were synthesized from reaction of amine and isocyanates. The structure was confirmed by H-1 and C-13 nuclear magnetic resonance spectrometry, MALDI-TOF mass spectrometry and elemental analysis. Purification was done by thin layer chromatography and sodium chloride content was determined by titration. The activities of four compounds were determined by measuring of intracellular calcium, using P2Y receptor recombinantly expressed 1321N1 astrocytoma cells. The results showed that all of them expressed no agonist activity at P2Y₁₁ receptor but possessed antagonist activity, using adenosine triphosphate (ATP) as agonist, with pKi 6.58, 6.71, 6.39 and 7.04, respectively. Activities of asymmetrical urea derivatives were higher than precursor amine but still lower than the symmetrical standard derivative NF157.

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทนำ	1
ระเบียบวิธีการวิจัย/การทดลอง	8
ผลการทดลอง	11
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	46
เอกสารอ้างอิง	48

สารบัญรูป

	หน้า
รูป 1 โครงสร้างทางเคมีของ ticlopidine clopidogrel และ prasugrel	3
รูป 2 โครงสร้างทางเคมีของ P2Y ₂ receptor agonists; Diquafosol และ Denufosal.	3
รูป 3 โครงสร้างของ P2Y ₁₁ receptor agonists ที่เป็นนิวคลีโอไทด์และอนุพันธ์	5
รูป 4 โครงสร้างของ non-nucleotide P2Y ₁₁ receptor agonists: Iso-iantheran A และ NF546	5
รูป 5 โครงสร้างของ suramin และ reactive blue 2- P2Y ₁₁ receptor antagonists	6
รูป 6 โครงสร้างของ NF157 และ NF340	6
รูป 7 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ 2.0 - 14.0 ppm	12
รูป 8 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ขยายพิคในส่วน 6.90 – 7.80 ppm	12
รูป 9 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ขยายพิคในส่วน 7.90 – 8.65 ppm	13
รูป 10 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ทำ D ₂ O exchange ที่ 6.80 - 12.80 ppm	13
รูป 11 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ทำ D ₂ O exchange ขยายพิคที่ 6.90 - 7.71 ppm	14
รูป 12 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ทำ D ₂ O exchange ขยายพิคที่ 7.90 - 8.28 ppm	14
รูป 13 ¹³ C NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ 113 - 171 ppm	16
รูป 14 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ 1.0 - 14.0 ppm	18
รูป 15 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยายพิคในส่วน 6.80 – 8.30 ppm	18
รูป 16 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-	19

1,3,5-trisulfonate sodium ขยายพีคในส่วน 8.40 – 13.10 ppm	
รูป 17 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ D ₂ O exchange ที่ 0.0 - 15.0 ppm	19
รูป 18 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ D ₂ O exchange ขยายพีคในส่วน 6.80 – 8.20 ppm	20
รูป 19 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ D ₂ O exchange ที่ขยายพีคในส่วน 8.45 - 9.40 ppm	20
รูป 20 ¹³ C NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ 0- 180 ppm	22
รูป 21 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ 2.0 - 15.0 ppm	24
รูป 22 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยายพีคในส่วน 6.80 – 7.90 ppm	24
รูป 23 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยายพีคในส่วน 7.90 – 8.20 ppm	25
รูป 24 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยายพีคในส่วน 8.30 – 9.70 ppm	25
รูป 25 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ D ₂ O exchange ที่ 2.0 – 15.0 ppm	26
รูป 26 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ D ₂ O exchange ที่ขยายพีคในส่วน 6.70 – 8.20 ppm	26
รูป 27 ¹³ C NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ 30 - 170 ppm	28
รูป 28 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate Sodium ที่ 0 – 14 ppm	31
รูป 29 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 12.3 – 13.0 ppm	31
รูป 30 ¹ H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 9.1 – 10.6 ppm	32

รูป 31 ^1H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 7.9 – 8.7 ppm	32
รูป 32 ^1H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 7.28 – 7.80 ppm	33
รูป 33 ^1H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 4.2 – 4.4 ppm	33
รูป 34 ^1H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 1.1 – 1.5 ppm	34
รูป 35 ^1H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ proton exchange ที่ 0.0 - 15.0 ppm	34
รูป 36 ^1H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ D_2O exchange ขยาย peak ที่ 12.28 – 12.68 ppm	35
รูป 37 ^1H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ D_2O exchange ขยาย peak ที่ 8.40 – 9.50 ppm	35
รูป 38 ^1H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ D_2O exchange ขยาย peak ที่ 7.88 – 8.28 ppm	36
รูป 39 ^1H NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ D_2O exchange ขยาย peak ที่ 7.28 – 7.84 ppm	36
รูป 40 ^{13}C -NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(Ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate Sodium (A4)	38
รูป 41 ผลการกระตุ้นเซลล์สารทดสอบ เพื่อดูฤทธิ์ Agonist ต่อ P2Y_{11} receptor	39
รูป 42 Dose response curve ของการกระตุ้น 1321N1P2Y_{11} receptor ด้วย ATP	40
รูป 43 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการเรืองแสงซึ่งแสดงได้ถึงความสามารถในการยับยั้งฤทธิ์ของ NF157 ต่อ P2Y_{11} receptor เมื่อใช้ $1 \mu\text{M}$ ATP เป็น agonist	40
รูป 44 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการเรืองแสงซึ่งแสดงได้ถึงความสามารถในการยับยั้ง	41

ฤทธิ์ของ 8-(3-(3-((N'-(phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorbenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A1) ต่อ P2Y ₁₁ receptor เมื่อใช้ 1 μM ATP เป็น agonist	
รูป 45 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการเรืองแสงซึ่งแสดงได้ถึงความสามารถในการยับยั้ง	42
ฤทธิ์ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A2) ต่อ P2Y ₁₁ receptor เมื่อใช้ 1 μM ATP เป็น agonist	
รูป 46 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการเรืองแสงซึ่งแสดงได้ถึงความสามารถในการยับยั้ง	43
ฤทธิ์ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A3) ต่อ P2Y ₁₁ receptor เมื่อใช้ 1 μM ATP เป็น agonist	
รูป 47 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการเรืองแสงซึ่งแสดงได้ถึงความสามารถในการยับยั้ง	44
ฤทธิ์ 8-(3-(3-(N'-(3-(Ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene-1,3,5-trisulfonate Sodium (A4) ต่อ P2Y ₁₁ receptor เมื่อใช้ 1 μM ATP เป็น agonist	
รูป 48 Dose- response curve ของการกระตุ้น 1321N1P2Y ₁ receptor ด้วย 2-MeSADP	44
รูป 49 Dose- response curve ของการกระตุ้น 1321N1P2Y ₂ receptor ด้วย UTP	45

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การแบ่งกลุ่ม P2Y receptors, G-protein couple และ การกระจายในร่างกาย	2
ตารางที่ 2 Agonists and antagonists of P2Y receptors	4
ตารางที่ 3 ผล Mass spectrometry ที่ run ใน positive mode ของสาร A1	17
ตารางที่ 4 ผล Mass spectrometry ที่ run ใน positive mode ของสาร A2	23
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบตำแหน่งพิกัดที่พบใน ^{13}C -NMR เฉพาะบริเวณ naphthalene ring ของสาร A1-A3	28
ตารางที่ 6 ผล Mass spectrometry ที่ run ใน positive mode ของสาร A3	29
ตารางที่ 7 สรุปโครงสร้างแล pKi ที่ได้เมื่อทดสอบฤทธิ์ต่อ P2Y ₁₁ receptor	47