

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030001

參展科別 化學

作品名稱 合成 CaMKII 抑制劑作為抗癌潛力藥物

得獎獎項 二等獎

突尼西亞國際工程與科技節(I-FEST2)代表

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 李文山、許名智

作者姓名 陳薇安、劉芷言

關鍵詞 鈣及攜鈣蛋白調節酶、藥物合成、抗癌潛力藥物

作者簡介



大家好，我們是北一女中科學班三年級的陳薇安、劉芷言。我們自小就對於科學研究充滿熱忱，特別是化學相關領域，很高興我們能進入科學班並開始我們的化學專題研究。儘管在過程中難免跌跌撞撞，但我們在這一路上學習到許多實驗的技巧與精神，更拓展了我們的視野。非常榮幸能夠站上國際科展的舞台，讓我們能繼續精進自己！由衷感謝辛苦的指導教授、老師與學長姐，在研究過程中細心指導我們，並給予幫助與支持，讓我們在這次的研究中獲益良多，也留下美好回憶。

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 CaMKII 抑制劑的常見結構，而吲哚與靛紅是常見藥物結構，因此本研究參考文獻^[1]，並擴展臨床尚未解決問題，優化此兩類衍生物以製成抗癌藥物。第一系列以苯基磺醯胺為主架構，改良文獻^[1]中抑制效果最佳的化合物**1**，第二系列則修改吲哚與靛紅的取代基，設計出多種候選分子。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，考量結合能、結合方位、藥物取得及合成難易度，選定有潛力的 **WACY** 與 **CYWA** 系列結構進行合成。本實驗使用創新的步驟合成，簡易、高效率且符合綠色化學，再經核磁共振與高解析度質譜儀驗證得出高純度產物。最後根據生物檢測發現 **WACY-2** 對乳癌細胞毒性高和對於一般乳腺細胞和乳癌細胞的選擇性都較市售抑制劑 KN-93 佳，而 **WACY-6** 對 CaMKII 抑制效果為 **WACY** 系列最佳；**CYWA-2, 3, 6, 7** 對乳癌細胞的毒性和對 CaMKII 抑制效果又優於 KN-93 與 **WACY** 系列許多。本研究成功製備出符合理論計算預期且抑制蛋白質的效果較 KN-93 佳的化合物，未來極具潛力作為抗乳癌的標靶藥物。

Abstract

Calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) is seen in most human cells, while research indicates that it overexpresses in many cancers. Benzenesulfonamides were reported structures of CaMKII inhibitors; indole and isatin are common drug structures. Our research continued the clinical unsolved questions and optimized the two derivatives to produce anticancer drugs.

We reformed benzenesulfonamide^[1] for the first series and modified the substituents of indole and isatin for the second series, then simulated the drug-protein complex using Discovery Studio. By evaluating binding energy, binding orientation, and designing synthetic scheme, we selected **WACY** and **CYWA** series for synthesis. Our experiment included innovative and high efficiency synthetic pathways which conform to green chemistry, and further utilized NMR and HRMS to show high purity products.

According to the bioassays, **WACY-2** had higher toxicity and selectivity to breast cancer cells than commercial inhibitor KN-93, and **WACY-6** showed best CaMKII inhibition ability for **WACY** series. Moreover, the cytotoxicity of **CYWA-2, 3, 6, and 7** to breast cancer cells and the inhibitory effect on CaMKII are even much better than those of KN-93 and **WACY** series. Our results suggest that the developed structures seem more effective than commercially available CaMKII inhibitor, indicating the great potential as an anti-breast targeted drug in the future.

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列出兩種 CaMKII 抑制劑結構。

KN-93為市售抑制劑，其效用僅止於抑制蛋白質，尚未應用至癌症治療。其存在的芳香族基團和磺醯胺基團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^[1]，得知化合物 1 (圖1) 對 CaMKII 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 C 環的結構，希望可以增加藥物分子對 CaMKII 的親和能力，以抑制其活性；架構二為全新分子，嘗試修改 R₁及 R₂取代基以增強分子與 CaMKII 的結合。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。

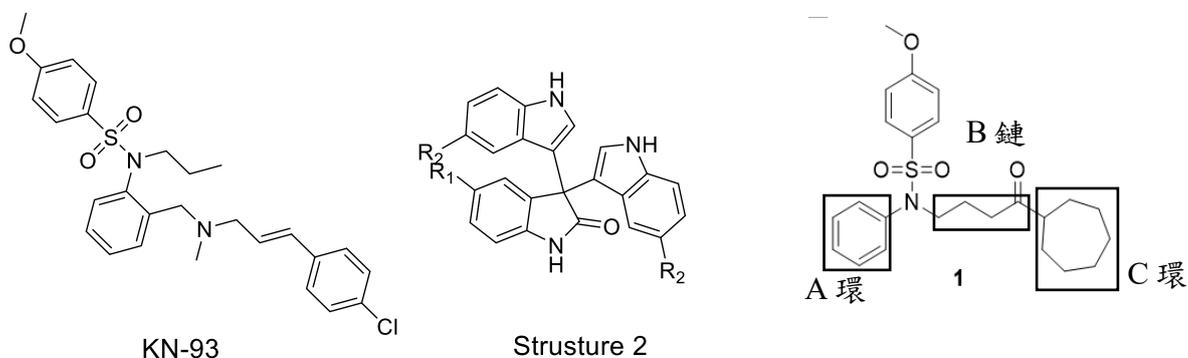


圖1. KN-93為市售鈣及攜鈣蛋白調節酶抑制劑。架構二為全新分子。化合物1為參考文獻中提出之鈣及攜鈣蛋白調節酶抑制劑

二、研究目的

- (一) 主結構分子設計
- (二) 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情形
- (三) 合成目標化合物
- (四) 產物結構鑑定
- (五) 生物檢測

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。

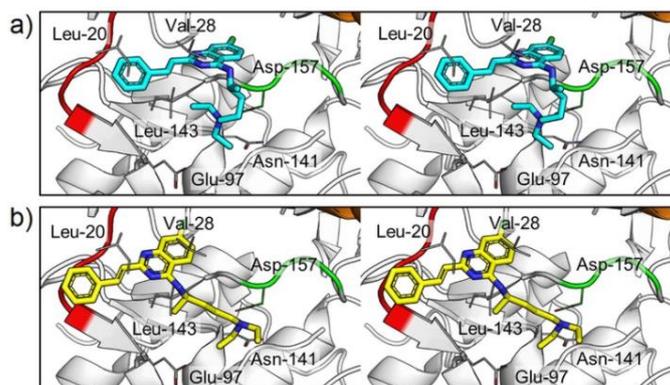


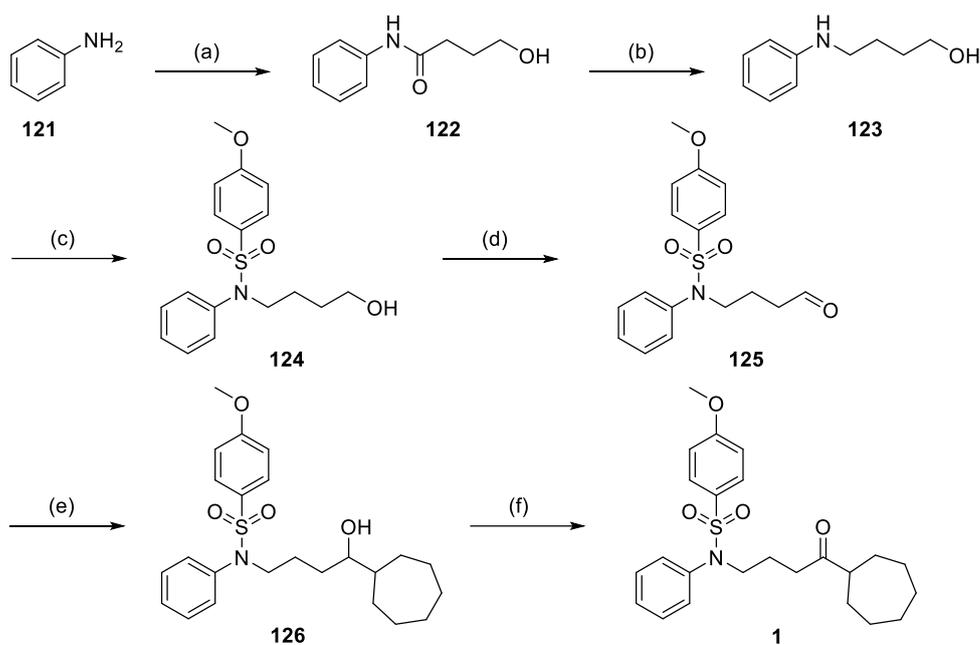
圖2. 論文中化合物與蛋白質的結合立體結構圖

(二) 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。可運用此軟體模擬候選分子與蛋白質的結合情形，計算其結合能，並觀察化合物與蛋白質結合的2D 圖，作為理論計算的基礎。

(三) 合成路徑

根據參考文獻^[1]，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。



Reagents, conditions, and yields: (a1) NaH, THF, 30 min, 90 °C, (a2) butyrolactone, THF, 8 h, 90 °C, 90%; (b) LiAlH₄, THF, 8 h, 90 °C; (c) 4-methoxybenzenesulfonyl chloride, Et₃N, 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) 真空泵(Vacuum Pump)

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) 3,4,5-三甲氧基苯胺(3,4,5-trimethoxyaniline)
- (三) 4-氟苯胺(4-fluoroaniline)

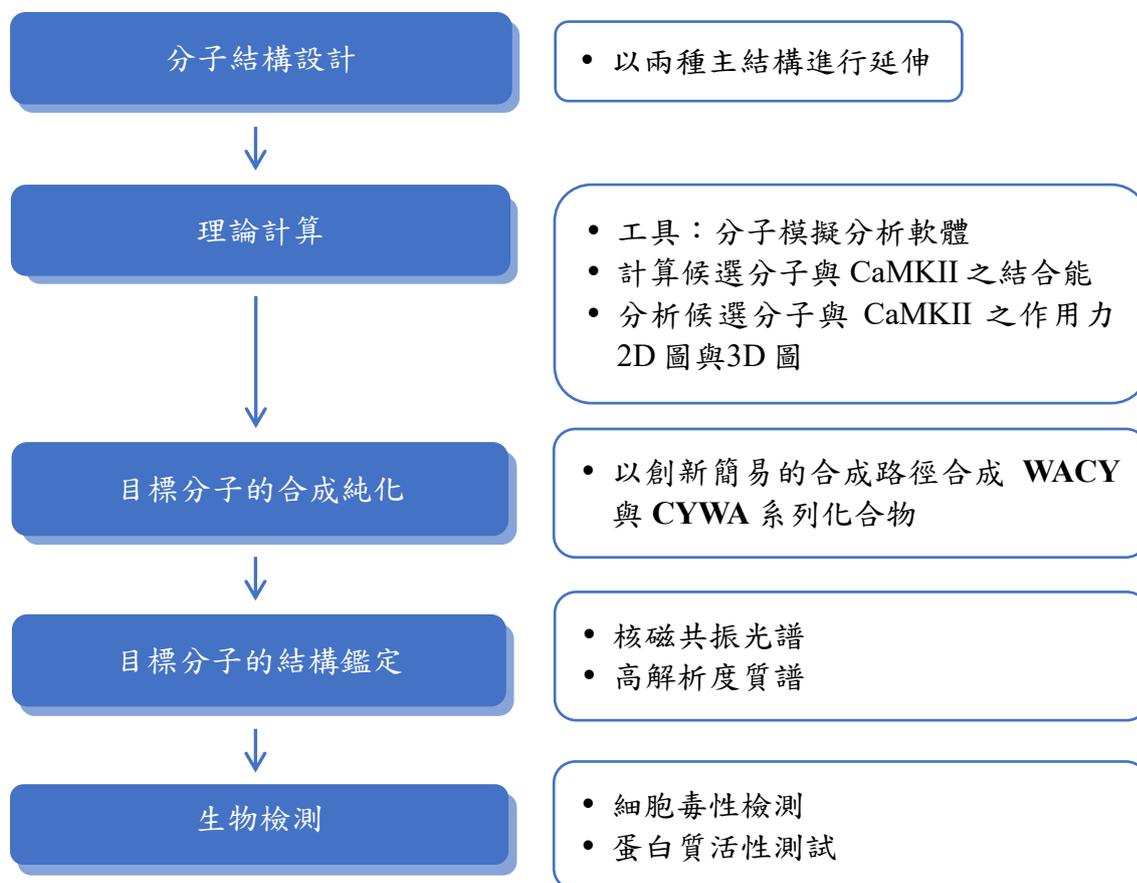
- (四) 4-溴苯胺(4-bromoaniline)
- (五) 4-異丙氧基苯胺(4-isopropoxyaniline)
- (六) 4-溴丁酸乙酯(ethyl 4-bromobutyrate)
- (七) 4-甲氧基苯磺醯氯(4-methoxybenzenesulfonyl chloride)
- (八) 三乙胺(Triethylamine)
- (九) 二氯甲烷(CH_2Cl_2)
- (十) 氫氧化鋇八水合物($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$)
- (十一) 甲醇(MeOH)
- (十二) 氮雜環庚烷(azepane)
- (十三) 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺鹽酸鹽($\text{EDC} \cdot \text{HCl}$)
- (十四) 1-羥基苯並三唑一水合物($\text{HOBT} \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- (十五) 乙基二異丙基胺(DIPEA)
- (十六) 5-硝基靛紅(5-nitroindoline-2,3-dione)
- (十七) 5-溴靛紅(5-bromoindoline-2,3-dione)
- (十八) 5-甲氧基靛紅(5-methoxyindoline-2,3-dione)
- (十九) 6-羧酸甲酯-1H-吲哚(methyl 1H-indole-6-carboxylate)
- (二十) 6-氟-1H-吲哚(6-fluoro-1H-indole)
- (二十一) 6-溴-1H-吲哚(6-bromo-1H-indole)
- (二十二) 6-甲氧基-1H-吲哚(6-methoxy-1H-indole)
- (二十三) 樟腦磺酸(Camphorsulfonic acid, CSA)
- (二十四) 乙醇(EtOH)

四、數據分析

- (一) 鈣及攜鈣蛋白調節酶 α (CaMKII α) 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

《WACY 系列》

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 Discovery Studio 中的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。

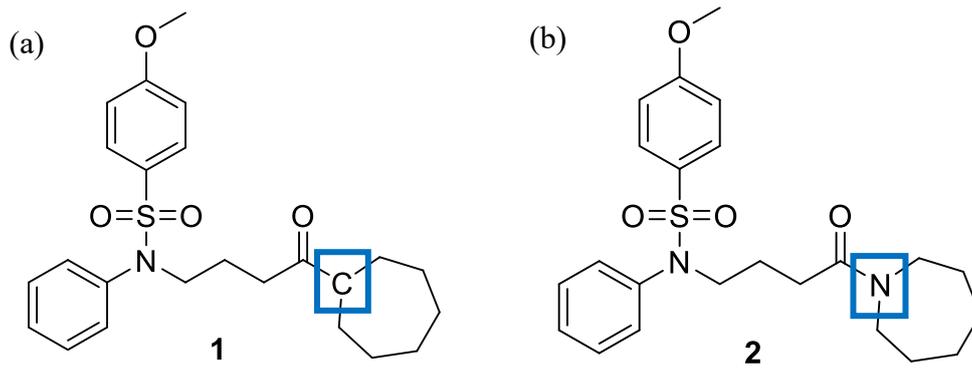


圖4. (a) 化合物1 (b) 化合物2

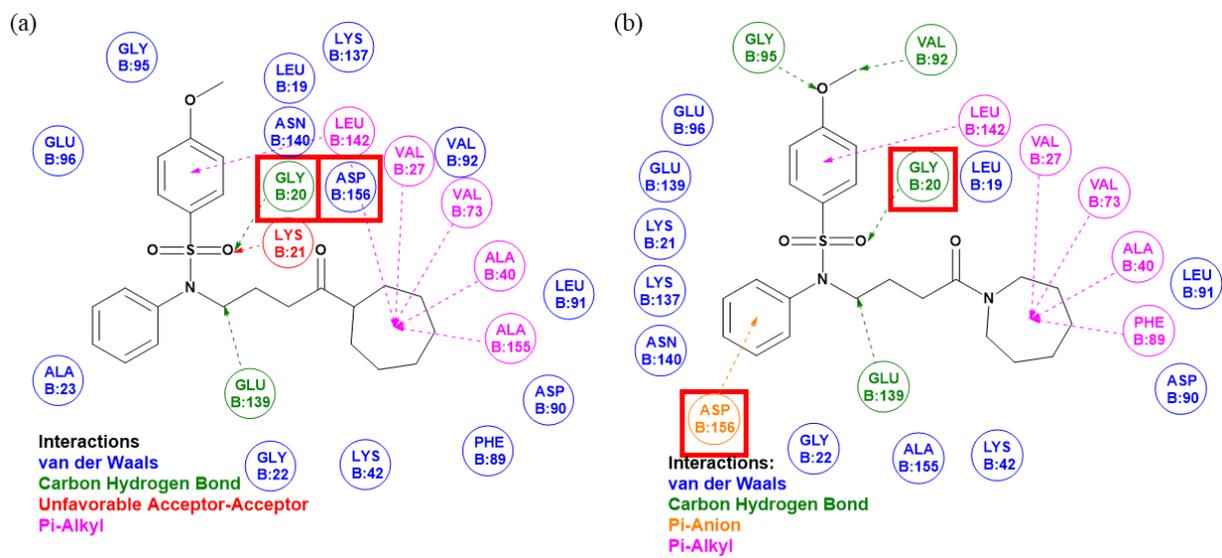


圖5. (a) 化合物1與 CaMKII 之作用力2D 圖 (b) 化合物2與 CaMKII 之作用力2D 圖

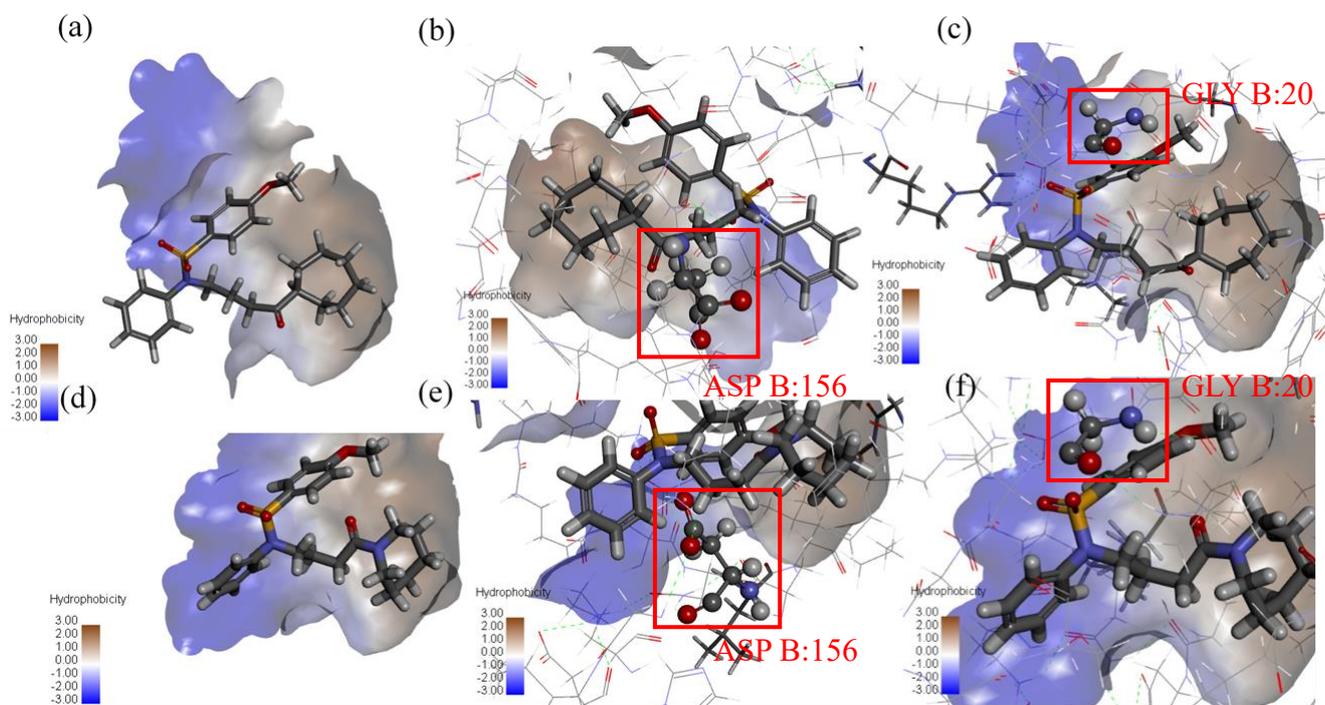
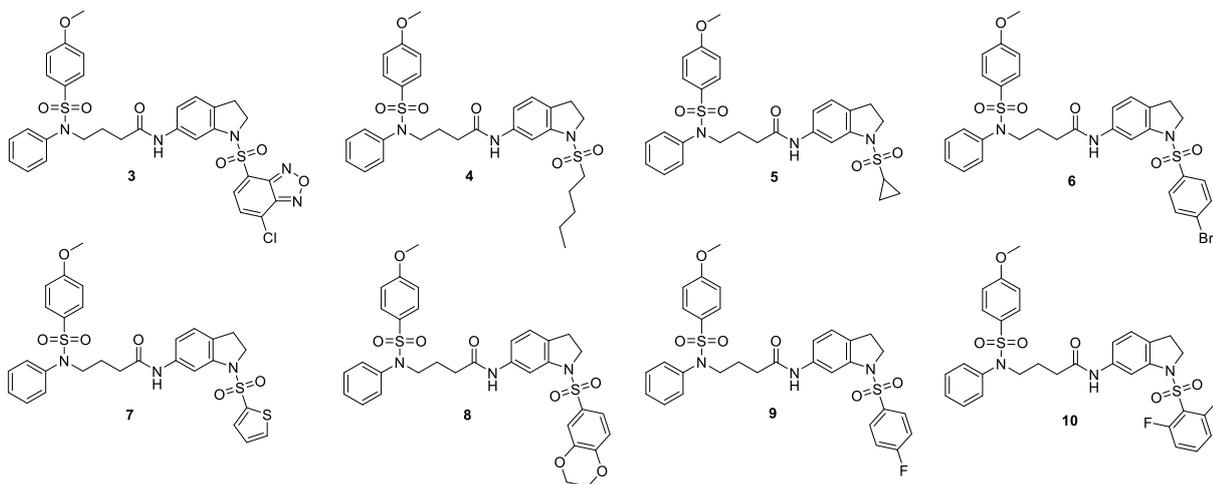


圖6. (a) 化合物1與 CaMKII 的結合位置 (b) 化合物1與胺基酸 ASP B:156 的相對位置 (c) 化合物1與胺基酸 GLY B:20 的相對位置 (d) 化合物2與 CaMKII 的結合位置 (e) 化合物2與胺基酸 ASP B:156 的相對位置 (f) 化合物2與胺基酸 GLY B:20 的相對位置

2. 利用吡啶置換 C 環結構



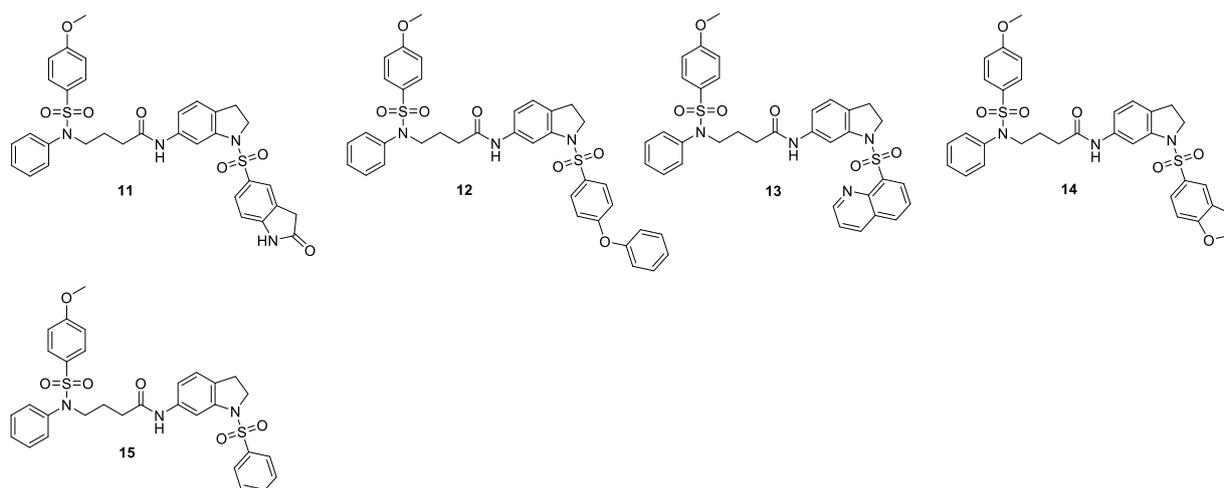
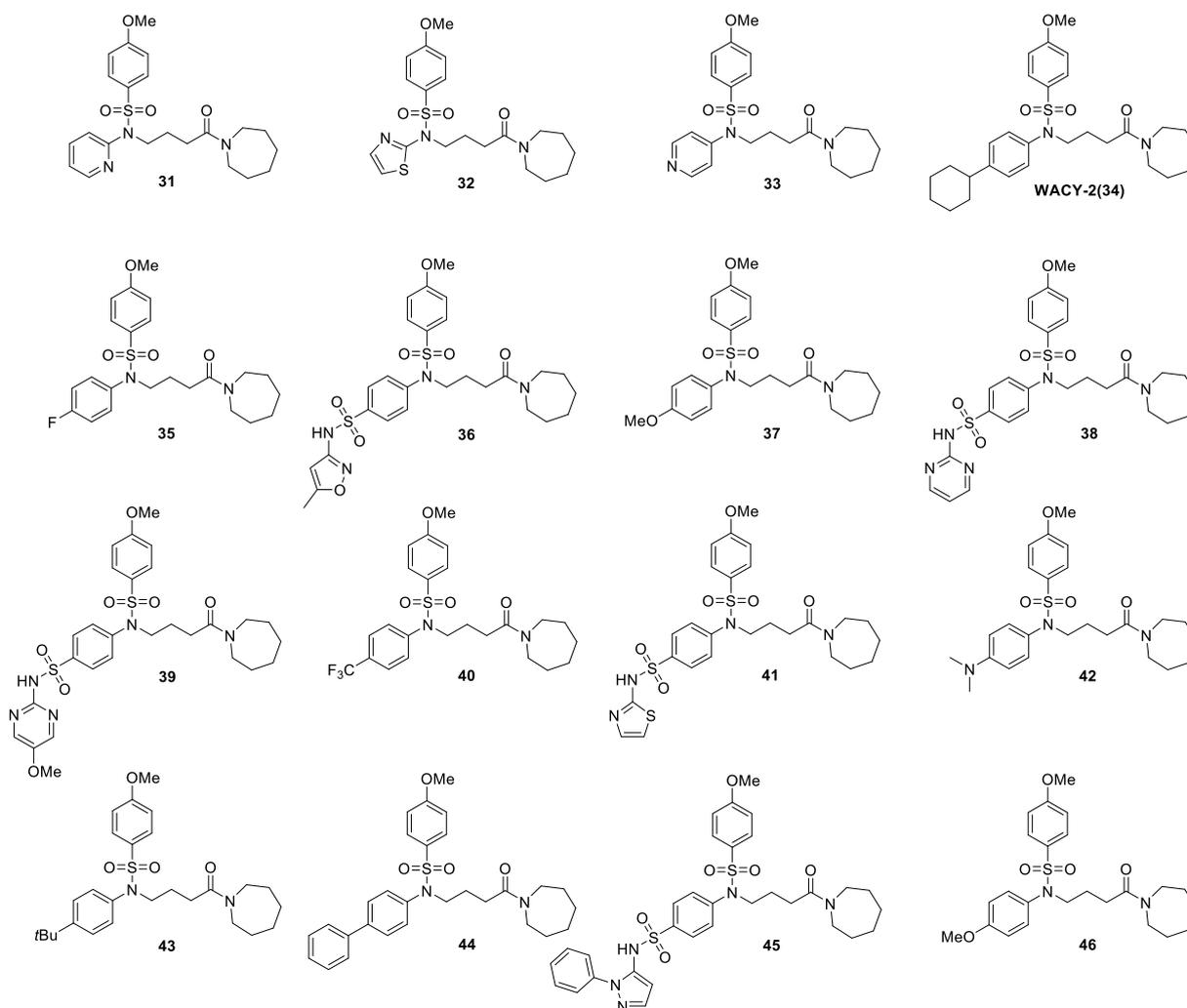


圖7. 置換 C 環結構

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。



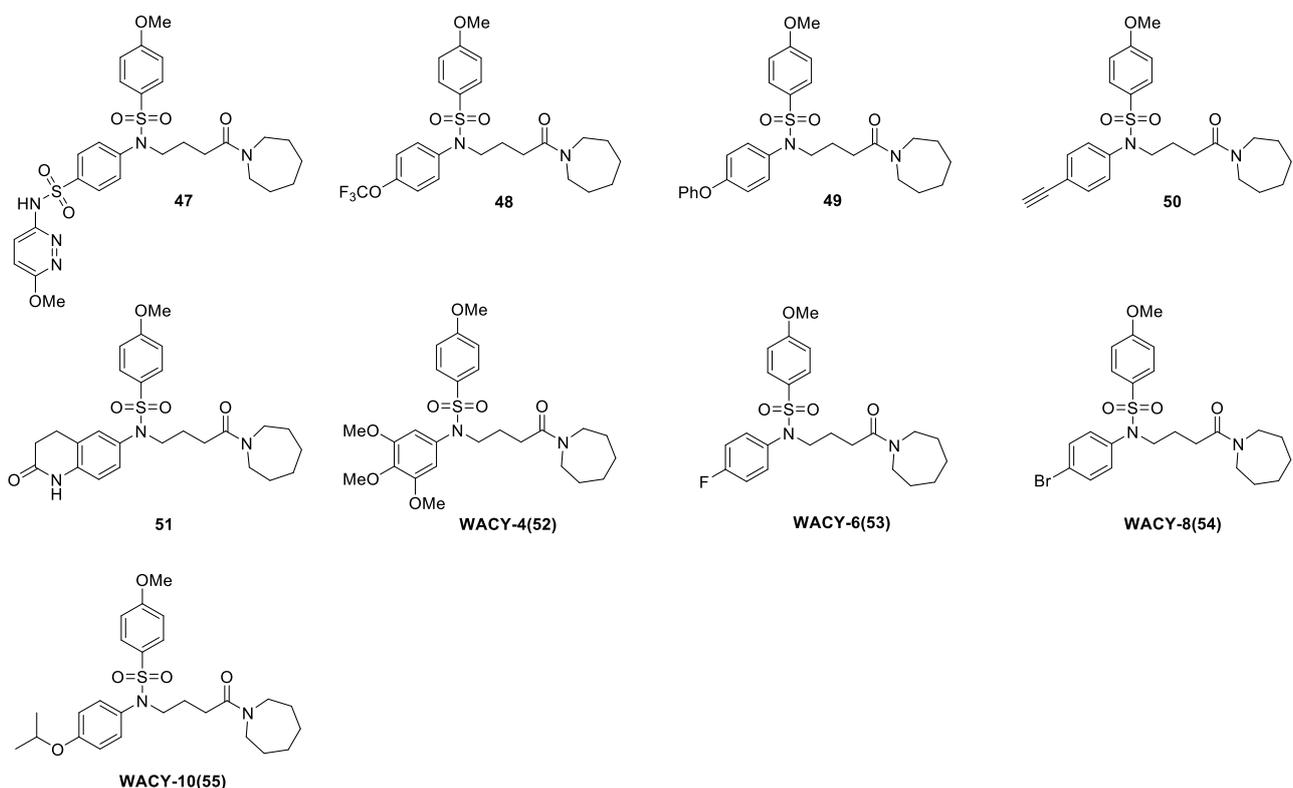


圖8. 延伸 A 環結構

4. 選定 **WACY-2**(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。

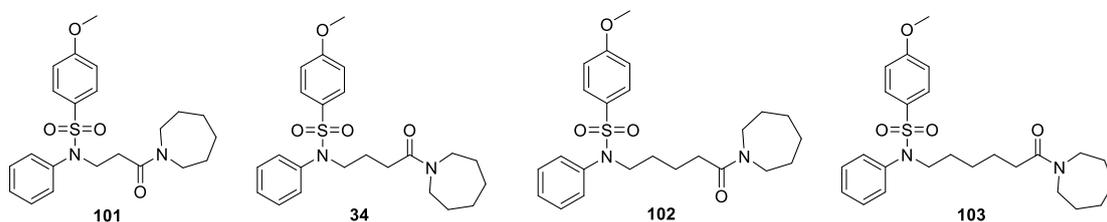


圖9. 伸長／縮短 B 鏈 (3~6個碳)

《CYWA 系列》

1. 參考常見藥物結構，選定吲哚 (indole) 與靛紅 (isatin)作為修改分子之主結構，並參考藥物常含有的官能基，分別在 indole 與 isatin 的5號位置上進行取代基的修改。

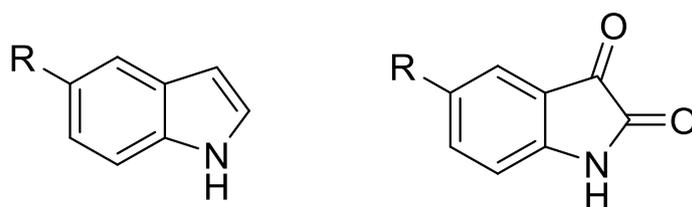


圖10. 左：吲哚 (indole)結構 右：靛紅 (isatin)結構

2. 先將 isatin 的取代基固定為碘，修改 indole 上的官能基，設計出化合物**201~214**，再將 indole 固定為沒有取代基，修改 isatin 上的官能基，設計出化合物**215~224**，共有25種結構。

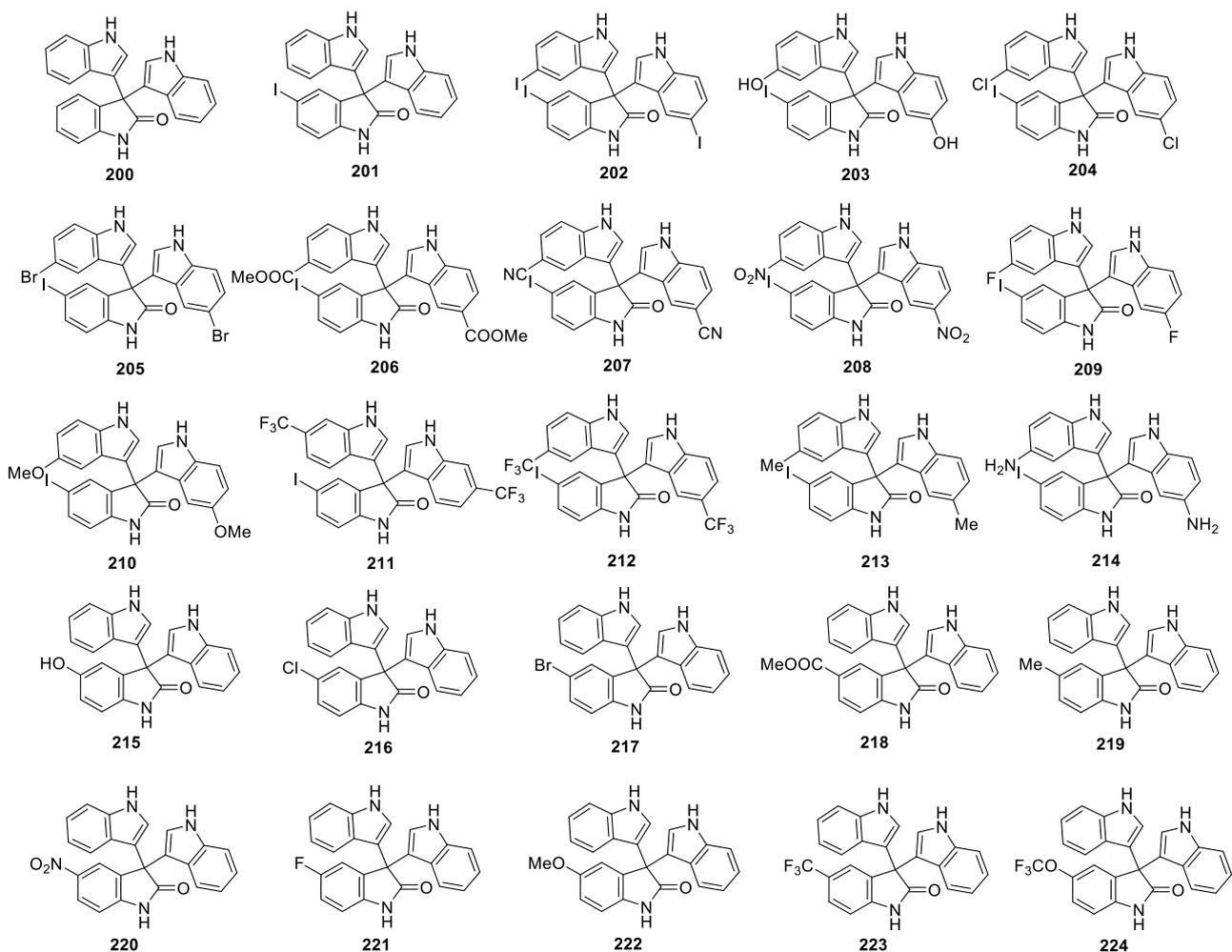


圖11. 修改 isatin 與 indole 取代基的25種結構

(二) 利用分子模擬分析軟體進行理論計算

1. 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。

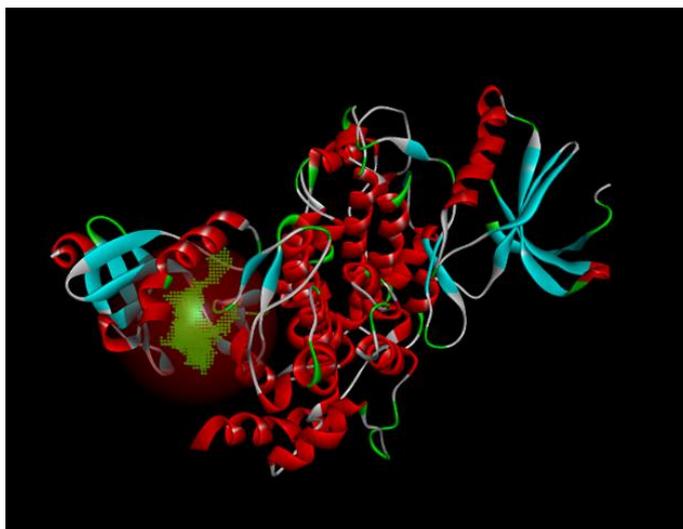


圖12. 紅色球為鈣與攜鈣蛋白調節酶的分子結合區域(binding site)

2. 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。

3. 篩選出合成目標分子

(1) WACY 系列化合物

依據結合能大小、作用力2D 圖、合成難易度及產率高低，選定 WACY 系列化合物為後續合成之目標分子。

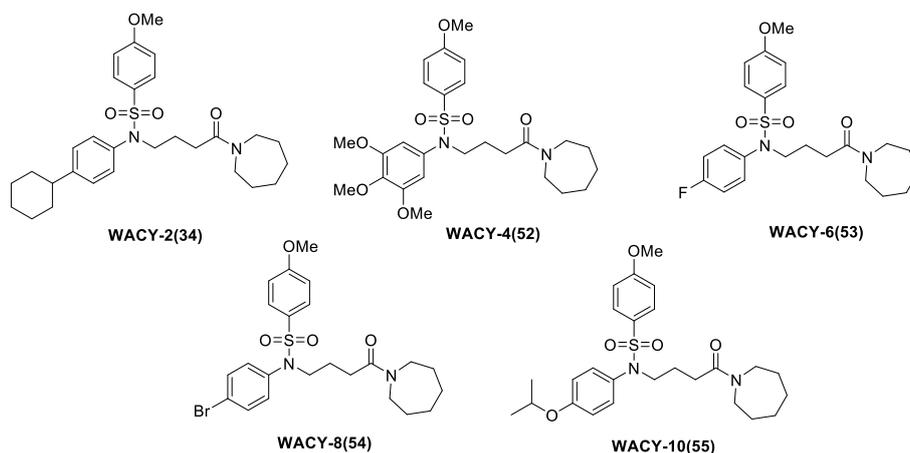


圖13. WACY 系列結構

(2) CYWA 系列化合物

依據結合能大小、作用力2D 圖與起始物價格篩選，並將官能基為推/拉電子基加入考量，含推電子基與拉電子基的化合物皆需合成，最後選定 CYWA 系列化合物為後續合成之目標分子。

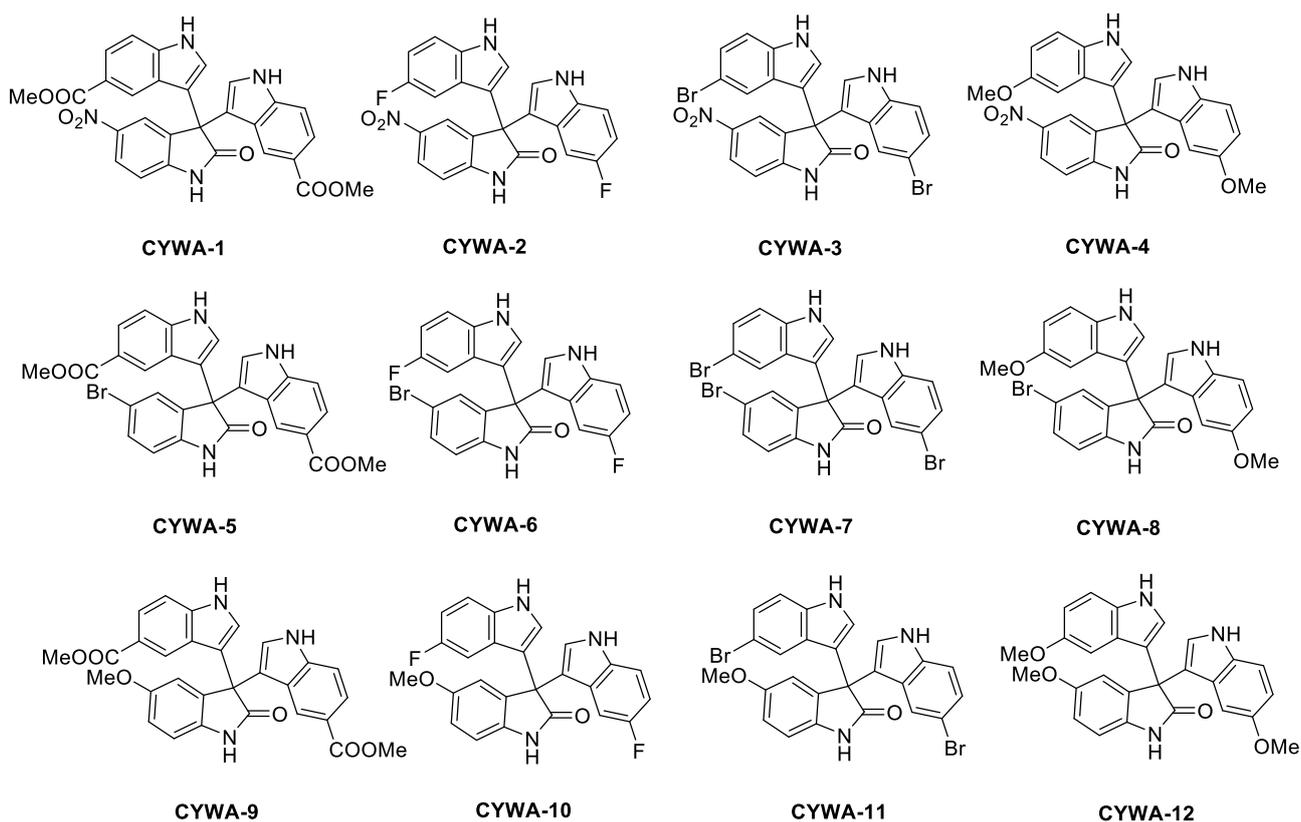
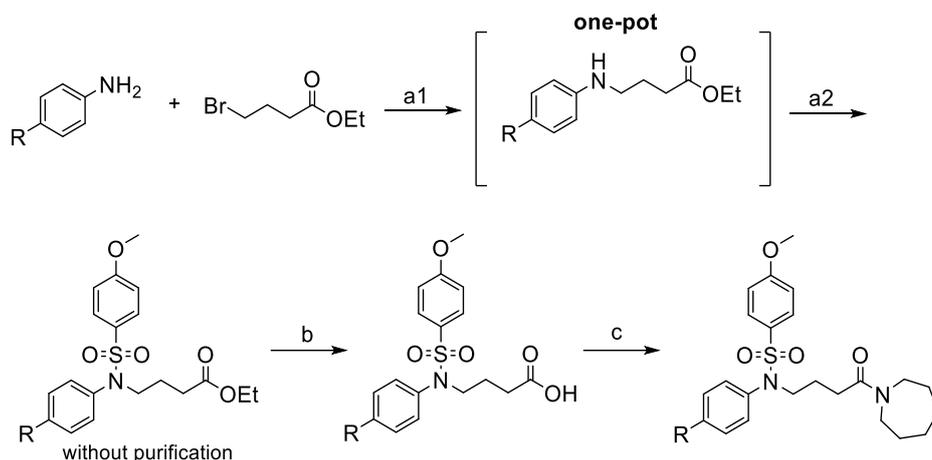


圖14. CYWA 系列結構

(三) 合成目標物分子

《WACY 系列》

1. 使用實驗室新研發之合成方法 (圖15)，只需三步便可合成出 WACY 化合物
2. 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。
3. 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。
4. 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。

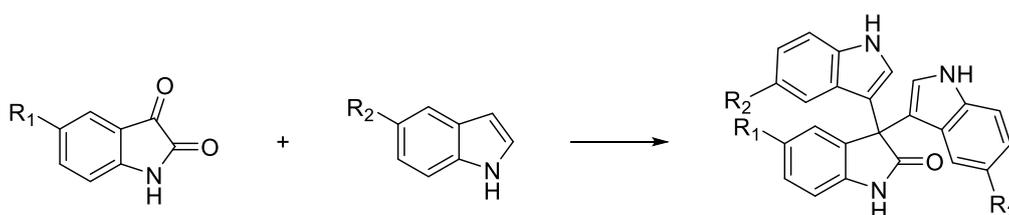


Reagents and conditions: (a1) Et₃N, neat, r.t., 18 h (a2) 4-methoxybenzenesulfonyl chloride, Et₃N, CH₂Cl₂, 6 h (b) Ba(OH)₂, MeOH, r.t., 24 h, 42%(overall) (c) azepane, EDC, HOBT, DIPEA, CH₂Cl₂, r.t.

圖15. WACY 系列化合物合成路徑

《CYWA 系列》

1. 使用新研發之合成方法（圖16），只需一步便可合成出 CYWA 化合物。
2. 此合成路徑遵守綠色化學，為一鍋化反應，且不需 HPLC 純化，提高產率並減少資源浪費。
3. 創新的合成路徑具多變性與彈性，只需改變 indole 和 isatin 上的取代基，便可使用相同的合成方法合成多種藥物分子。
4. 合成步驟：
 - (1) 將 indole 與 isatin 反應得到初產物。
 - (2) 利用沉澱法，反覆清洗純化得到最終產物。



Reagents and conditions: camphorsulfonic acid (CSA), EtOH, r.t., 24h

圖16. CYWA 系列化合物合成路

(五) 生物檢測

1. 細胞毒性檢測

細胞存活率分析(MTT assay)為一種檢測細胞存活率的實驗方法。MTT 本身為黃色，是一種接受氫離子的染劑，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 的作用下四氫唑環會開裂，生成紫色的甲臞結晶，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，可檢測藥物對細胞有無毒性。

藥物的毒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細胞是否具有毒性。我們以一般乳腺細胞及乳癌細胞為目標細胞，分別測定 KN-93、WACY 和 CYWA 系列化合物在不同濃度下48小時後的細胞存活率，分析藥物是否毒殺乳癌細胞，同時也檢測藥物是否對一般細胞也有毒性，測試藥物的安全性與選擇性。

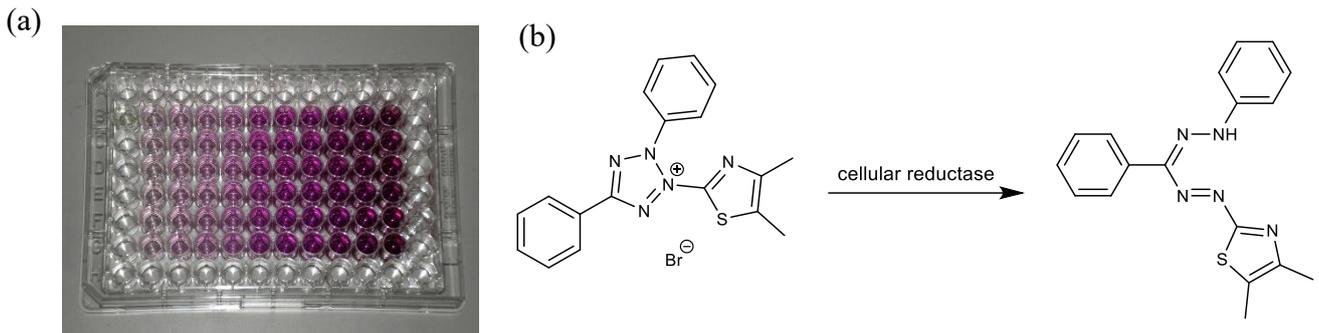


圖17. (a) 細胞代謝生成紫色甲臍結晶 (b) 細胞代謝產生甲臍的反應圖

2. 蛋白質活性測試

利用冷光強度測得蛋白質活性。如圖13，CaMKII 與受質作用時會將 ATP 轉換為 ADP，使受質磷酸化。此活性測試使用 ADP-Glo Reagent 耗盡殘留 ATP 並將反應過後的 ADP 轉換成 ATP。最後利用冷光偵測進行定量分析，測得冷光越強則初始 ADP 數量越多，表示 CaMKII 活性越大。

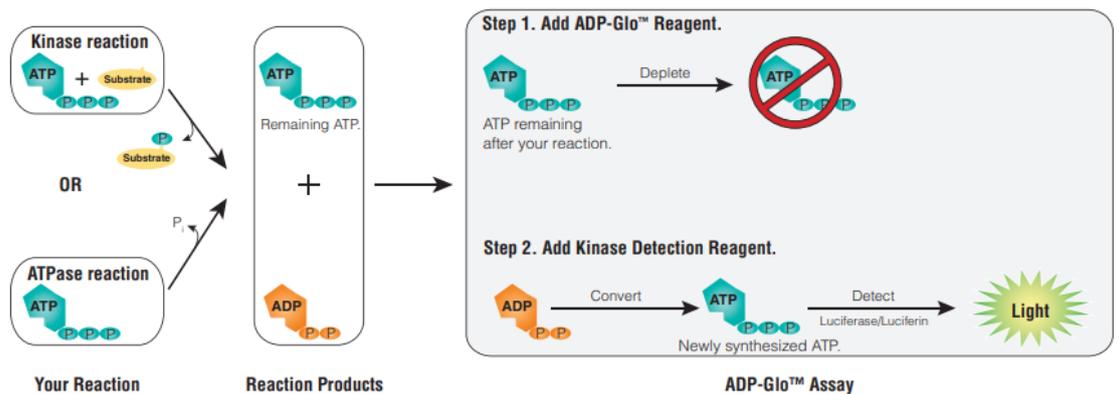


圖18. 蛋白質活性測試原理

肆、研究結果與討論

一、理論計算

《WACY 系列》

(一) 延伸 C 環結構：計算 13 個候選分子與 CaMKII 的結合能 (化合物 1 為參考文獻^[1]中化合物，化合物 2 為改良分子之基礎)

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	-31.0760
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	-25.4570
化合物 6	-38.0070*	化合物 14	-36.4652
化合物 7	-38.9423*	化合物 15	-32.1782
化合物 8	-35.2327		

*：屬於較佳的候選分子

(二) 修改 A 環結構：計算 25 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 44	-34.4175
化合物 32	-35.9305	化合物 45	-36.1236
化合物 33	-36.4308	化合物 46	-34.8114
WACY-2(34)	-45.4609*	化合物 47	-34.0451
化合物 35	-37.0368	化合物 48	-31.6462
化合物 36	-35.2927	化合物 49	-34.5627
化合物 37	-33.8114	化合物 50	-28.6991
化合物 38	-35.2273	化合物 51	-36.6833
化合物 39	-36.4017	WACY-4(52)	-41.5254*

化合物 40	-29.9331	WACY-6(53)	-44.0056*
化合物 41	-29.0072	WACY-8(54)	-37.3460*
化合物 42	-36.5274	WACY-10(55)	-39.2281*
化合物 43	-32.7942		

*：屬於較佳的候選分子

(三) 以 **WACY-2** 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 101	-31.80569	化合物 102	-29.8175
WACY-2(34)	-45.4609*	化合物 103	-23.7882

*：屬於較佳的候選分子

(四) 分析候選分子與 CaMKII 之作用力2D 圖

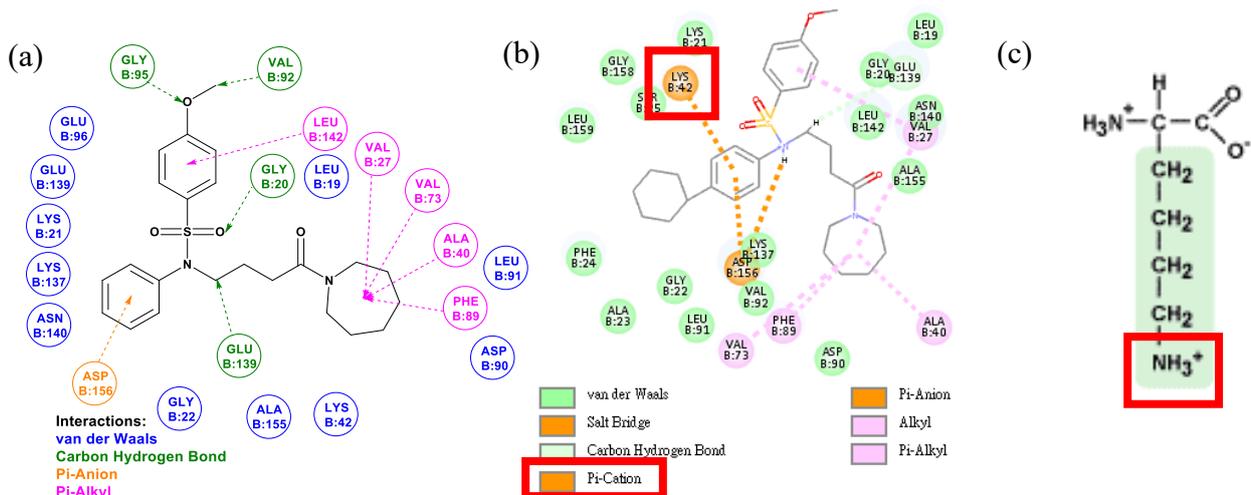


圖19. (a) 化合物2作用力2D 圖 (b) **WACY-2**作用力2D 圖 (c) 離胺酸結構

【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可知 **WACY-2**、**WACY-4**、**WACY-6**、**WACY-8**及 **WACY-10**有較大的結合能，分別為-45.4609 kJ/mol、-41.5254 kJ/mol、-44.0056 kJ/mol、-37.3460 kJ/mol和 -39.2281 kJ/mol。由表3可知 **WACY-2**仍有較大的結合能，表示當 B 鏈為四個碳時長度最適合插入蛋白質孔隙中。

以結果最佳的 **WACY-2** 為例，與化合物2的作用力2D 圖比較後，**WACY-2**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。

修改 A 環的結構易合成與純化、產率高、且起始物價格低，易取得。綜合各方面考量，優先選擇修改 A 環的結構進行合成。

經結合能的計算、2D 圖比較，以及合成難易度的評估後，WACY 系列化合物各方表現均較優異，因此最終選擇 WACY 系列化合物進行後續的合成。

《CYWA 系列》

(一) 固定 Isatin 修改 Indole 及固定 Indole 修改 Isatin

表4. 化合物200~224之結合能

修改 indole		修改 isatin	
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 200	-32.9549	化合物 215	-30.4887
化合物 201	-33.0195	化合物 216	-32.2405
化合物 202	-49.9717	化合物 217	-29.9106*
化合物 203	-35.6865	化合物 218	-35.697
化合物 204	-44.3184	化合物 219	-29.9594
化合物 205	-40.6657*	化合物 220	-32.7582*
化合物 206	-41.1838*	化合物 221	-32.7221
化合物 207	-30.6427	化合物 222	-32.3387*
化合物 208	-33.0626	化合物 223	-35.3328
化合物 209	-31.7786*	化合物 224	-35.1157
化合物 210	-38.014*		
化合物 211	-36.6703		
化合物 212	-39.8829		
化合物 213	-33.2429		
化合物 214	-33.8679		

*：選擇之取代基

(二) 組合選定之 Isatin 及 Indole

表5. CYWA-1~12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)
CYWA-1	-31.9175	CYWA-7	-38.5829
CYWA-2	-39.1626	CYWA-8	-32.3896
CYWA-3	-37.9988	CYWA-9	-30.5121
CYWA-4	-34.6458	CYWA-10	-31.5904
CYWA-5	-33.9885	CYWA-11	-32.1526
CYWA-6	-40.6609	CYWA-12	-33.3788

【討論】

經結合能的計算、2D 圖比較，取代基電子傾向，以及合成難易度的評估後，選擇化合物205、206、209、210、217、220、222進行排列組合，合成 CYWA-1~12。

二、合成目標分子

《WACY系列》

(一) 合成各步驟藥物劑量

表6. 步驟(a)藥物劑量

	分子量	重量(g)	mmol	當量	mL	密度 (g/cm ³)	備註
4-環己基苯胺	175.28	1.75	10	1.00			WACY-2 起始物
3,4,5-三甲氧基苯胺	183.21	1.83	10	1.00			WACY-4 起始物
4-氟苯胺	111.12	1.11	10	1.00			WACY-6 起始物
4-溴苯胺	172.03	1.72	10	1.00			WACY-8 起始物
4-異丙氧基苯胺	151.21	1.51	10	1.00			WACY-10 起始物

4-溴丁酸乙酯	195.05	2.34	12	1.20			
三乙胺(a1)	101.19	1.32	13	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7. 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	4.60	10	1.00	
氫氧化鋇八水合物	315.46	3.15	15	1.50	
甲醇(0.06M)					167

表8. 步驟(c)藥物劑量

	分子量	重量(mg)	mmol	當量	mL	密度(g/cm ³)
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) 純化與分離

WACY-2：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 **WACY-2**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。**WACY-2**落在第20~40管，且20~40管的 TLC 片僅一點，無其他雜點的產生。

WACY-4：以展開液乙酸乙酯：正己烷=1：1至1.5：1進行管柱液相層析。**WACY-4**落在28~37管。

WACY-6：以展開液乙酸乙酯：正己烷=1：3至1：1進行管柱液相層析。**WACY-6**落在32~37管。

WACY-8：結晶為透明帶棕的晶體。

WACY-10：以展開液乙酸乙酯：正己烷=1：3至1：1進行管柱液相層析。**WACY-10**落在30~35管，產物為透明液體。

(三) 總產率計算

表9. WACY 化合物產率

分子	總產率計算
WACY-2	$\frac{\frac{1.81}{512.71} \times 1000}{10} \doteq 35\%$
WACY-4	$\frac{\frac{1.88}{518.67} \times 1000}{10} \doteq 36\%$
WACY-6	$\frac{\frac{1.63}{446.58} \times 1000}{10} \doteq 36\%$
WACY-8	$\frac{\frac{1.73}{507.48} \times 1000}{10} \doteq 34\%$
WACY-10	$\frac{\frac{1.88}{486.67} \times 1000}{10} \doteq 39\%$

【討論】

經純化與分離後，所得產物在 TLC 片上均僅呈現一點，且產物之產率均大於30%，表示此反應的純度與產率均高。

《CYWA 系列》

(一) 合成各步驟藥物計量

表10. CYWA 合成步驟藥物劑量

	分子量	重量(mg)	mmol	當量	mL	備註
5-NO ₂ isatin	192.13	480	2.50	1		Isatin 及 Indole 各擇一，可得 CYWA-1~12
5-Br isatin	226.03	565	2.50	1		
5-OMe isatin	177.20	443	2.50	1		
5-COOMe indole	175.19	920	5.25	2.1		
5-F indole	135.14	709	5.25	2.1		
5-Br indole	196.05	1030	5.25	2.1		
5-OMe indole	147.17	773	5.25	2.1		
乙醇					4	
CSA	232.3	116.2	0.5	0.2		

(二) 純化與分離

以酒精及大量水沖洗，並利用抽氣過濾法取固體產物。若含雜質則以甲醇反覆沖洗，靜置取沉澱，此為目標產物。

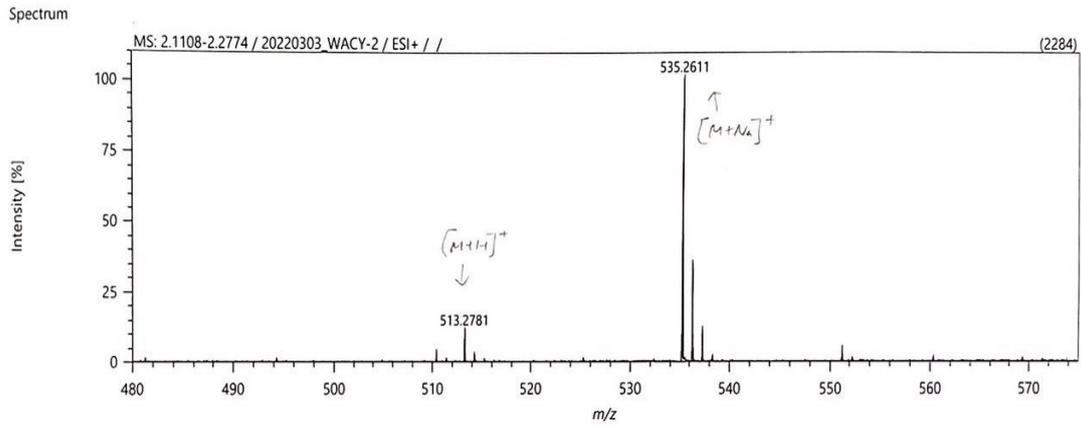
(三) 總產率計算

表11. CYWA 化合物產率

分子	總產率	分子	總產率
CYWA-1	68%	CYWA-7	66%
CYWA-2	82%	CYWA-8	83%
CYWA-3	79%	CYWA-9	88%
CYWA-4	74%	CYWA-10	84%
CYWA-5	67%	CYWA-11	95%
CYWA-6	75%	CYWA-12	90%

三、化合物結構鑑定

《WACY 系列》



Elemental Composition

Parameters

Tolerance: ± 2.00 ppm
 Electron: Odd/Even
 Charge: +1
 DBE: -99.0 - 999.0

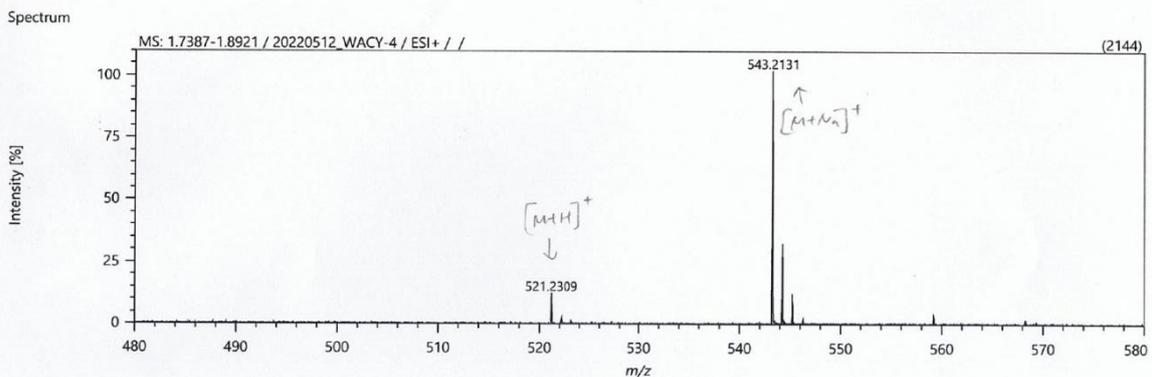
Elements Set 1:

Symbol	C	H	O	N	S	Na
Min	0	0	4	2	1	0
Max	400	1000	4	2	1	1

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
513.27812	C ₂₉ H ₄₁ N ₂ O ₄ S	513.27815	-0.04	-0.07	10.5
535.26107	C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₄ Na S	535.26010	0.97	1.81	10.5

圖20. WACY-2質譜



Elemental Composition

Parameters

Tolerance: ± 3.00 ppm
 Electron: Odd/Even
 Charge: +1
 DBE: -99.0 - 999.0

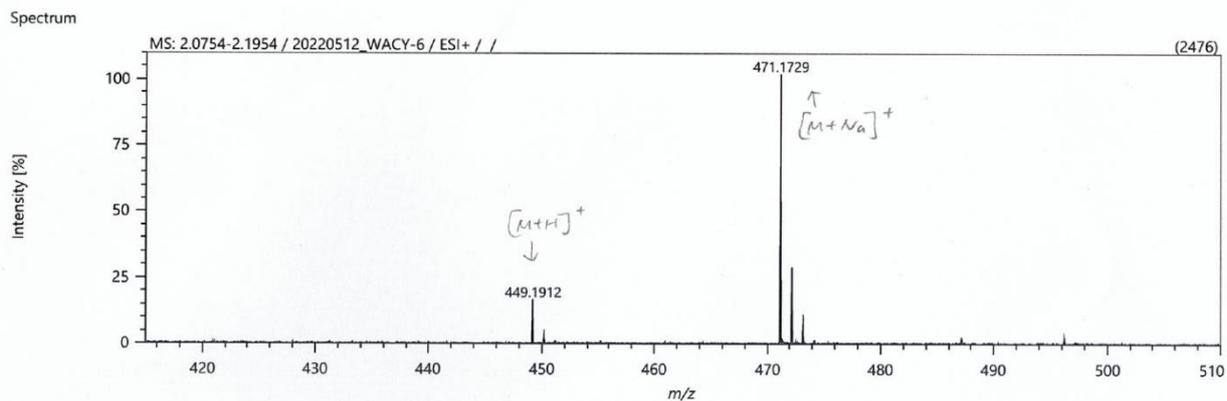
Elements Set 1:

Symbol	C	H	O	N	S	Na
Min	0	0	7	2	1	0
Max	400	1000	7	2	1	1

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
521.23093	C ₂₆ H ₃₇ N ₂ O ₇ S	521.23160	-0.67	-1.28	9.5
543.21307	C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₇ Na S	543.21354	-0.47	-0.87	9.5

圖16. WACY-4質譜



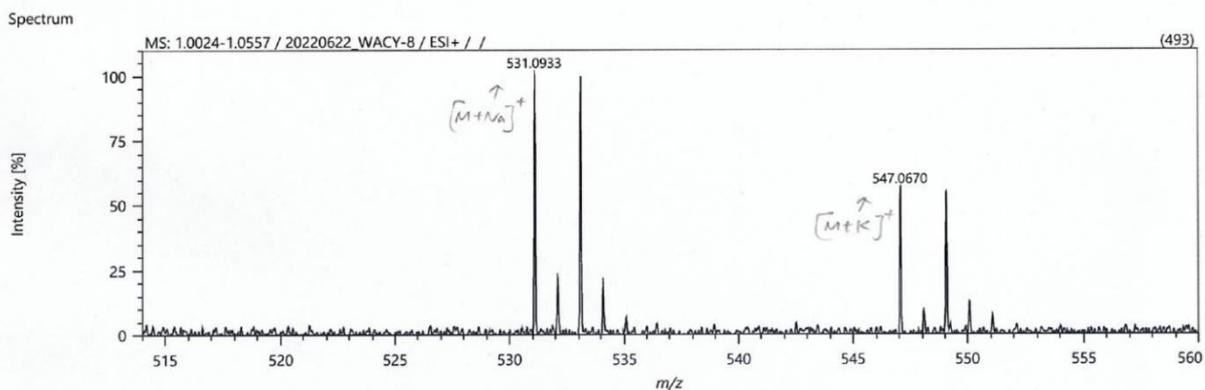
Elemental Composition

Parameters		Elements Set 1:							
Tolerance:	±3.00 ppm	Symbol	C	H	O	N	F	S	Na
Electron:	Odd/Even	Min	0	0	4	2	1	1	0
Charge:	+1	Max	400	1000	4	2	1	1	1
DBE:	-99.0 - 999.0								

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
449.19121	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₄ F ₅	449.19048	0.73	1.62	9.5
471.17285	C ₂₃ H ₂₉ N ₂ O ₄ F ₅ Na ₁ S ₁	471.17243	0.42	0.90	9.5

圖21. WACY-6質譜



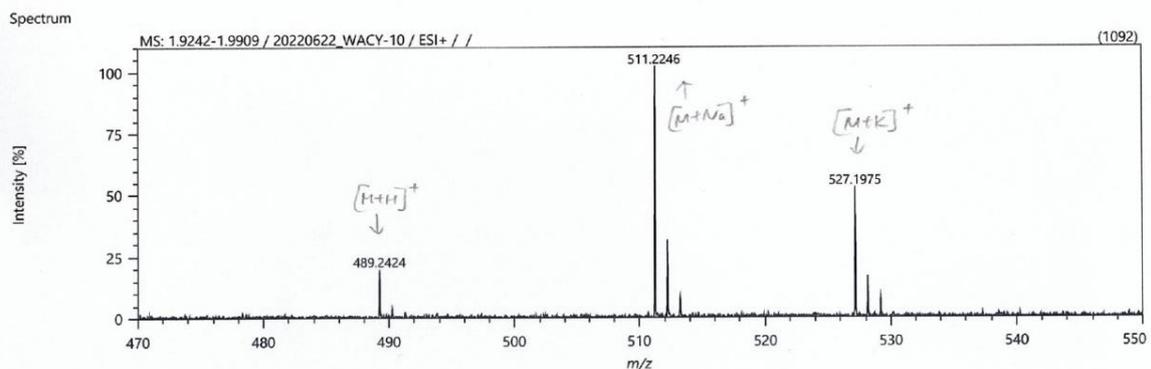
Elemental Composition

Parameters		Elements Set 1:								
Tolerance:	±2.00 ppm	Symbol	C	H	O	N	S	Na	K	Br
Electron:	Odd/Even	Min	0	0	4	2	1	0	0	1
Charge:	+1	Max	400	1000	4	2	1	1	1	1
DBE:	-99.0 - 999.0									

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
531.09327	C ₂₃ H ₂₉ N ₂ O ₄ Na ₁ S ₁ Br ₁	531.09236	0.91	1.70	9.5
547.06701	C ₂₃ H ₂₉ N ₂ O ₄ S ₁ K ₁ Br ₁	547.06630	0.71	1.30	9.5

圖22. WACY-8質譜



Elemental Composition

Parameters		Elements Set 1:							
Tolerance:	±2.50 ppm	Symbol	C	H	O	N	S	Na	K
Electron:	Odd/Even	Min	0	0	5	2	1	0	0
Charge:	+1	Max	400	1000	5	2	1	1	1
DBE:	-99.0 - 999.0								

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
489.24245	C ₂₆ H ₃₇ N ₂ O ₅ S	489.24177	0.68	1.39	9.5
511.22460	C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₅ NaS	511.22371	0.88	1.73	9.5
527.19751	C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₅ SK	527.19765	-0.14	-0.27	9.5

圖23. WACY-10質譜

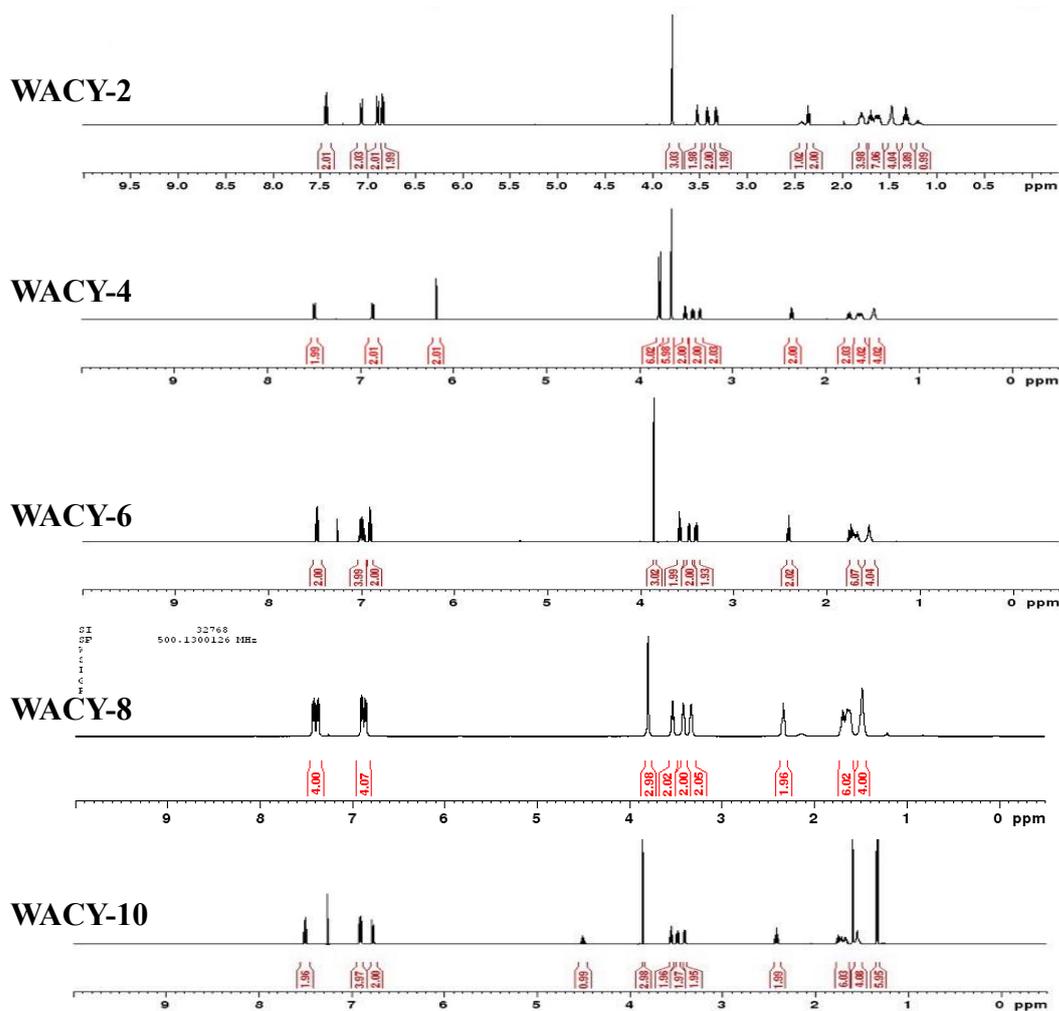


圖24. WACY 系列化合物氫譜

【討論】

質譜儀結果：

WACY-2: HRMS (ESI+) calcd for C₂₉H₄₀N₂O₄NaS [M+Na]⁺, 535.2601; found, 535.2611。

WACY-4: HRMS (ESI+) calcd for C₂₆H₃₆N₂O₇NaS [M+Na]⁺, 543.2131; found, 543.2135。

WACY-6: HRMS (ESI+) calcd for C₂₃H₂₉N₂O₄FNaS [M+Na]⁺, 471.1729; found, 471.1724。

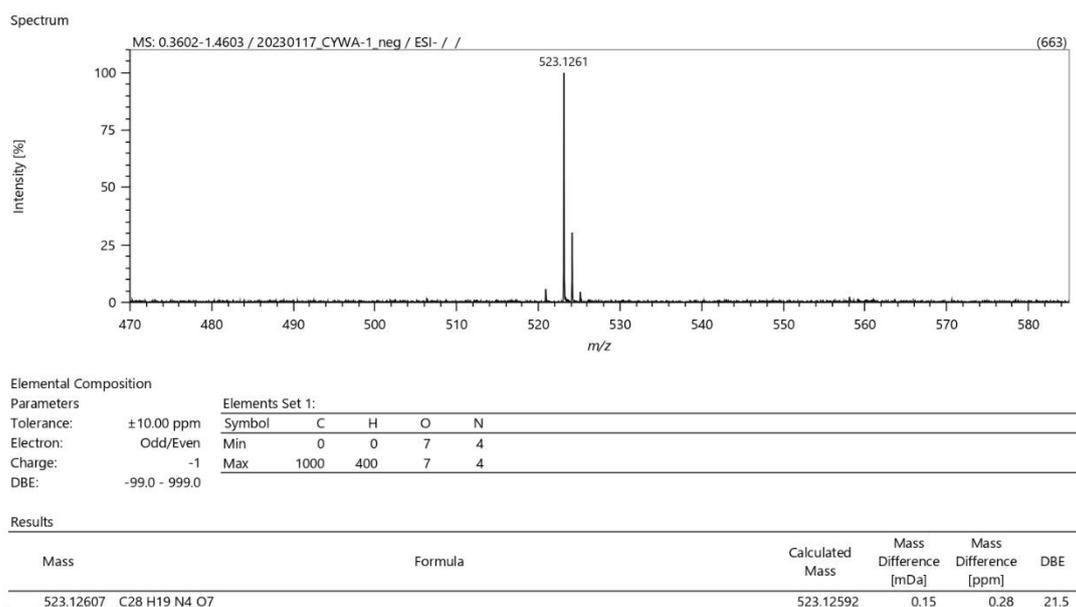
WACY-8: HRMS (ESI+) calcd for C₂₃H₂₉N₂O₄NaSBr [M+Na]⁺, 531.0933; found, 531.0924。

WACY-10: HRMS (ESI+) calcd for C₂₆H₃₆N₂O₅NaS [M+Na]⁺, 511.2246; found, 511.2237。

WACY-2至 WACY-10測得分子量與理論值相符，代表合成出之結構為目標產物。

NMR 圖譜：NMR 鑑定圖譜各峰值符合化合物之結構，且圖譜雜訊少。而圖下方的積分恰等於氫數。由此可知，鑑定結構均符合目標產物，且產物純度高。

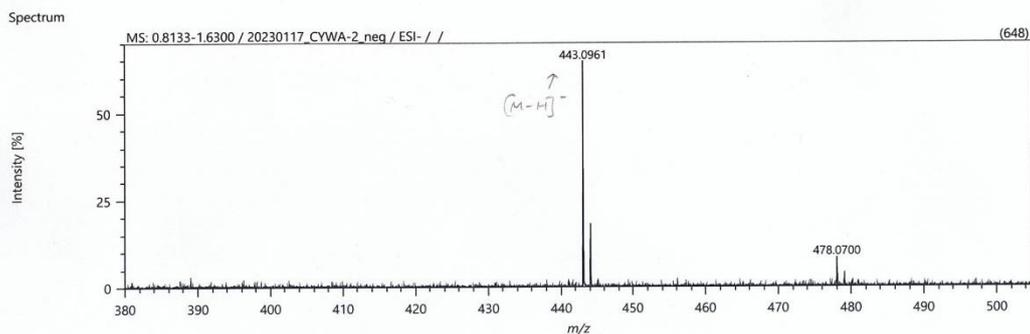
《CYWA 系列》



1 / 1

圖25. CYWA-1質譜

CYWA-2 (HR-ESI neg)



Elemental Composition

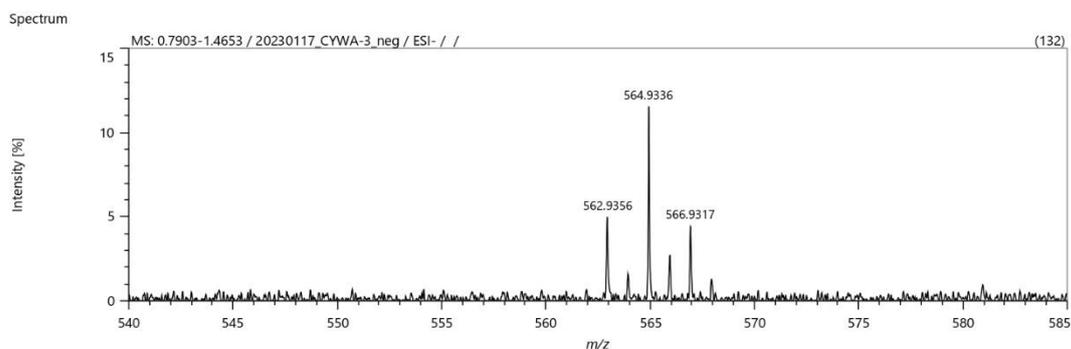
Parameters		Elements Set 1:					
Tolerance:	±10.00 ppm	Symbol	C	H	O	N	F
Electron:	Odd/Even	Min	0	0	3	4	2
Charge:	-1	Max	1000	400	3	4	2
DBE:	-99.0 - 999.0						

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
443.09607	C ₂₄ H ₁₃ N ₄ O ₃ F ₂	443.09612	-0.05	-0.11	19.5

1 / 1

圖26. CYWA-2質譜



Elemental Composition

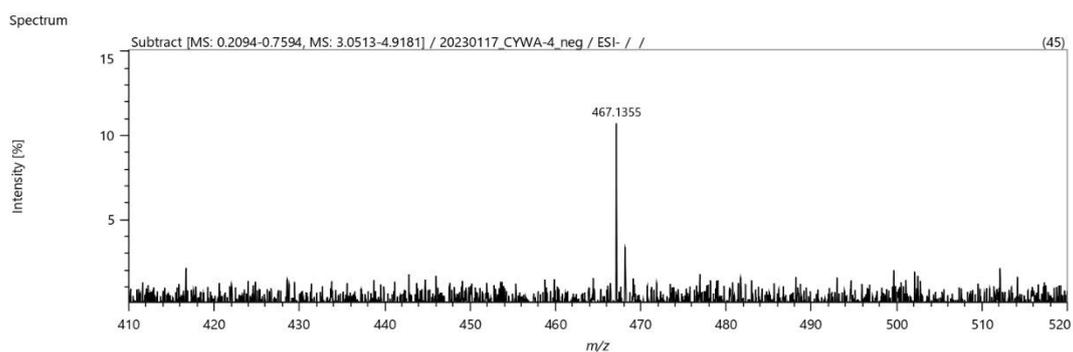
Parameters		Elements Set 1:					
Tolerance:	±10.00 ppm	Symbol	C	H	O	N	Br
Electron:	Odd/Even	Min	0	0	3	4	2
Charge:	-1	Max	1000	400	3	4	2
DBE:	-99.0 - 999.0						

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
562.93560	C ₂₄ H ₁₃ N ₄ O ₃ Br ₂	562.93599	-0.39	-0.69	19.5

1 / 1

圖27. CYWA-3質譜



Elemental Composition

Parameters

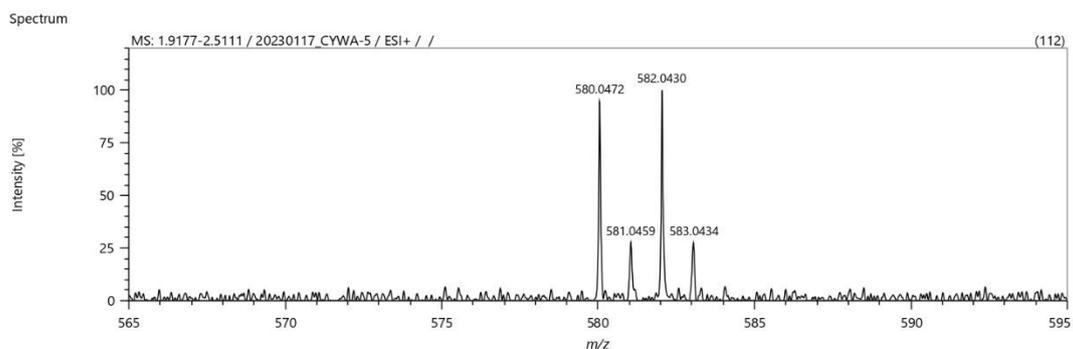
Parameters	Value	Elements Set 1:				
Tolerance:	±10.00 ppm	Symbol	C	H	O	N
Electron:	Odd/Even	Min	0	0	5	4
Charge:	-1	Max	1000	400	5	4
DBE:	-99.0 - 999.0					

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
467.13553	C ₂₆ H ₁₉ N ₄ O ₅	467.13609	-0.57	-1.21	19.5

1 / 1

圖28. CYWA-4質譜



Elemental Composition

Parameters

Parameters	Value	Elements Set 1:						
Tolerance:	±10.00 ppm	Symbol	C	H	O	N	Br	Na
Electron:	Odd/Even	Min	0	0	5	3	1	1
Charge:	+1	Max	1000	400	5	3	1	1
DBE:	-99.0 - 999.0							

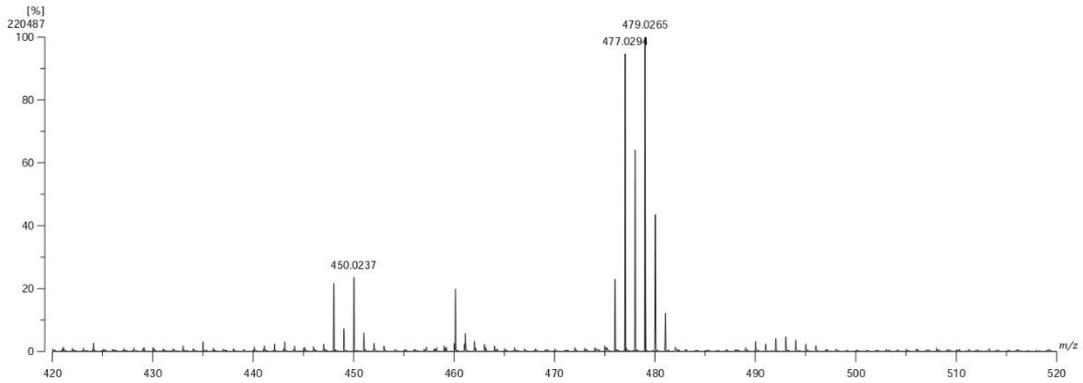
Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
580.04721	C ₂₈ H ₂₀ N ₃ O ₅ NaBr	580.04785	-0.65	-1.12	19.5

1 / 1

圖29. CYWA-5質譜

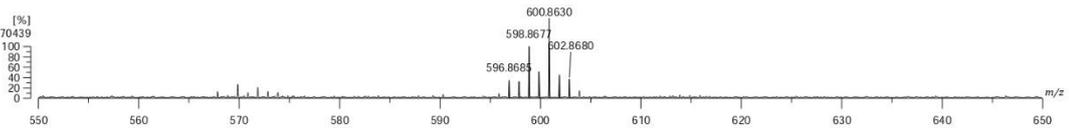
[Mass Spectrum]
 Data : 20230118.CYWA-6-HR-001 Date : 18-Jan-2023 16:18
 Sample : CYWA-6
 Note : NBA
 Ion Mode : FAB+
 RT : 0.53 min Scan# : (9,10)
 Elements : C 1000/0, H 1000/0, 79Br 1/0, 81Br 1/0, F 2/2, N 3/3, O 1/1
 Mass Tolerance : 5mmu
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10000



Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	F	N	O
477.0294	94.64									
1 477.0288			+1.2 / +0.6 18.0	24	14	1	-	2	3	1
Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	F	N	O
479.0265	100.00									
2 479.0268			-0.6 / -0.3 18.0	24	14	-	1	2	3	1

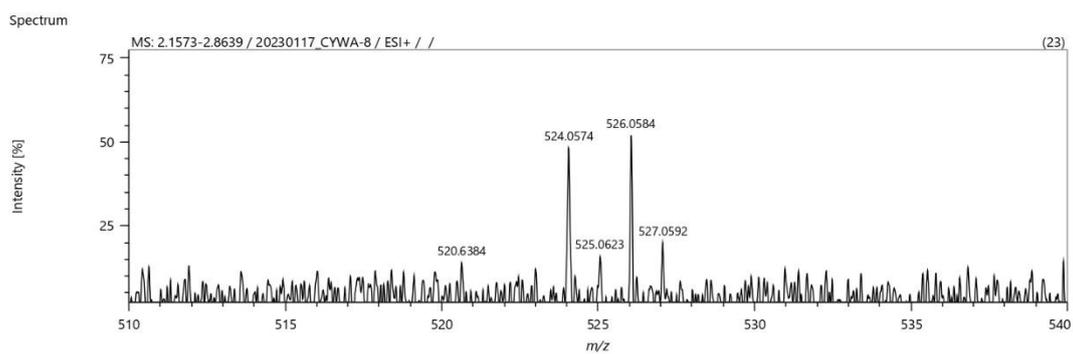
圖30. CYWA-6質譜

[Mass Spectrum]
 Data : 20230118.CYWA-7-HR-001 Date : 18-Jan-2023 16:23
 Sample : CYWA-7
 Note : NBA
 Ion Mode : FAB+
 RT : 0.00 min Scan# : (1,14)
 Elements : C 24/24, H 14/14, 79Br 3/0, 81Br 3/0, N 3/3, O 1/1
 Mass Tolerance : 10mmu
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10000



Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	N	O
596.8685	34.79								
1 596.8687			-0.3 / -0.2 18.0	24	14	3	-	3	1
Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	N	O
597.8595	32.33								
Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	N	O
598.8677	100.00								
2 598.8666			+1.8 / +1.1 18.0	24	14	2	1	3	1
Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	N	O
599.8620	51.32								
Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	N	O
600.8630	99.06								
3 600.8646			-2.7 / -1.6 18.0	24	14	1	2	3	1
Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	N	O
601.8673	45.10								
Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	N	O
602.8680	37.12								
4 602.8626			+9.0 / +5.4 18.0	24	14	-	3	3	1

圖31. CYWA-7質譜



Elemental Composition

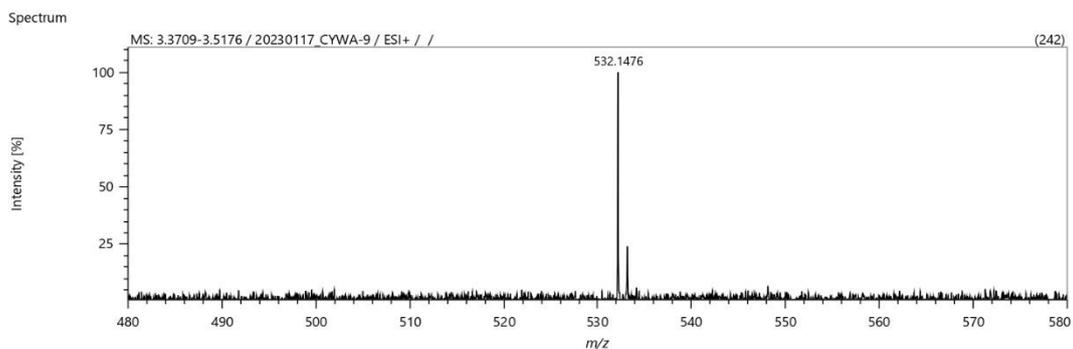
Parameters		Elements Set 1:						
Tolerance:	±10.00 ppm	Symbol	C	H	O	N	Br	Na
Electron:	Odd/Even	Min	0	0	3	3	1	1
Charge:	+1	Max	1000	400	3	3	1	1
DBE:	-99.0 - 999.0							

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
524.05738	C ₂₆ H ₂₀ N ₃ O ₃ NaBr	524.05803	-0.65	-1.24	17.5

1 / 1

圖32. CYWA-8質譜



Elemental Composition

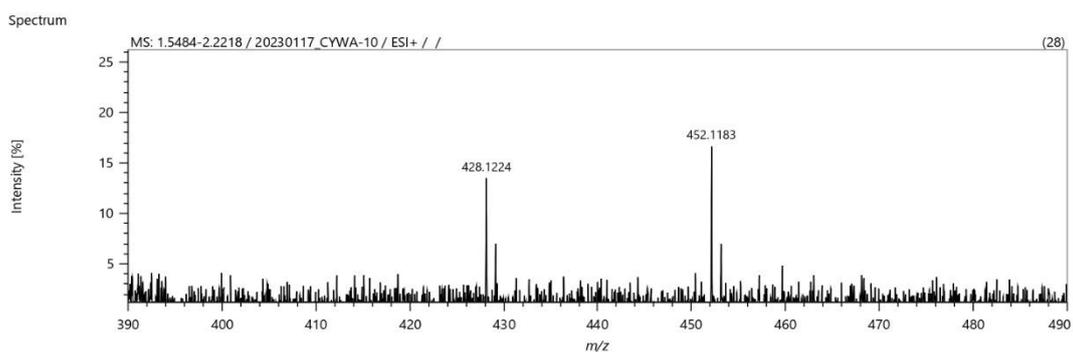
Parameters		Elements Set 1:					
Tolerance:	±10.00 ppm	Symbol	C	H	O	N	Na
Electron:	Odd/Even	Min	0	0	6	3	1
Charge:	+1	Max	1000	400	6	3	1
DBE:	-99.0 - 999.0						

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
532.14765	C ₂₉ H ₂₃ N ₃ O ₆ Na	532.14791	-0.26	-0.49	19.5

1 / 1

圖33. CYWA-9質譜



Elemental Composition

Parameters		Elements Set 1:						
Tolerance:	±10.00 ppm	Symbol	C	H	O	N	F	Na
Electron:	Odd/Even	Min	0	0	2	3	2	1
Charge:	+1	Max	1000	400	2	3	2	1
DBE:	-99.0 - 999.0							

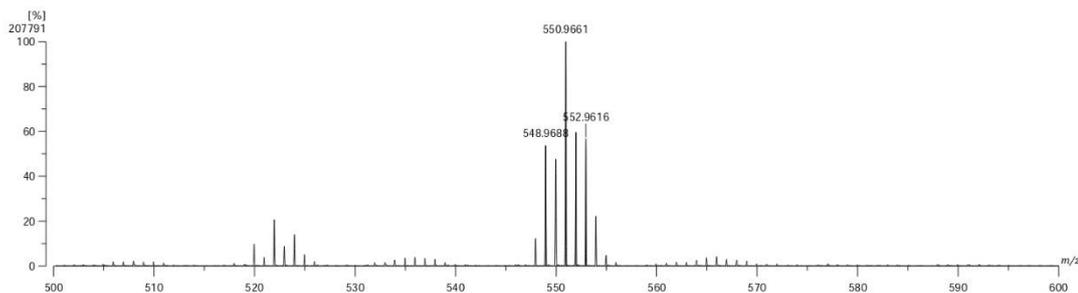
Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
452.11830	C ₂₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ F ₂ Na	452.11810	0.19	0.42	17.5

1 / 1

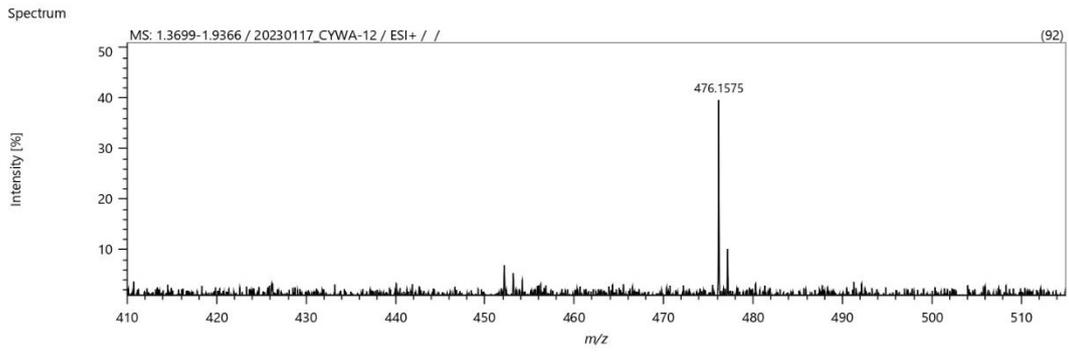
圖34. CYWA-10質譜

[Mass Spectrum]
 Data : 20230118_Cywa-11-HR-001 Date : 18-Jan-2023 16:39
 Sample : CYWA-11
 Note : NBA
 Ion Mode : FAB+
 RT : 0.25 min Scan# : (5,6)
 Elements : C 1000/0, H 1000/0, 79Br 2/0, 81Br 2/0, N 3/3, O 2/2
 Mass Tolerance : 5mmu
 Unsaturation (U.S.) : 0.5 - 1000.0



Observed m/z	Int%						
548.9688	53.66						
Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	N	O
1 548.9687	+0.1 / +0.1 18.0	25	17	2	-	3	2
Observed m/z	Int%						
550.9661	100.00						
Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	N	O
2 550.9667	-1.1 / -0.6 18.0	25	17	1	1	3	2
Observed m/z	Int%						
551.9653	59.60						
Observed m/z	Int%						
552.9616	56.73						
Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	79Br	81Br	N	O
3 552.9647	-5.5 / -3.1 18.0	25	17	-	2	3	2

圖35. CYWA-11質譜



Elemental Composition

Parameters

Tolerance: ± 10.00 ppm
 Electron: Odd/Even
 Charge: +1
 DBE: -99.0 - 999.0

Elements Set 1:

Symbol	C	H	O	N	Na
Min	0	0	4	3	1
Max	1000	400	4	3	1

Results

Mass	Formula	Calculated Mass	Mass Difference [mDa]	Mass Difference [ppm]	DBE
476.15747	C27 H23 N3 O4 Na	476.15808	-0.61	-1.28	17.5

圖36. CYWA-12質譜

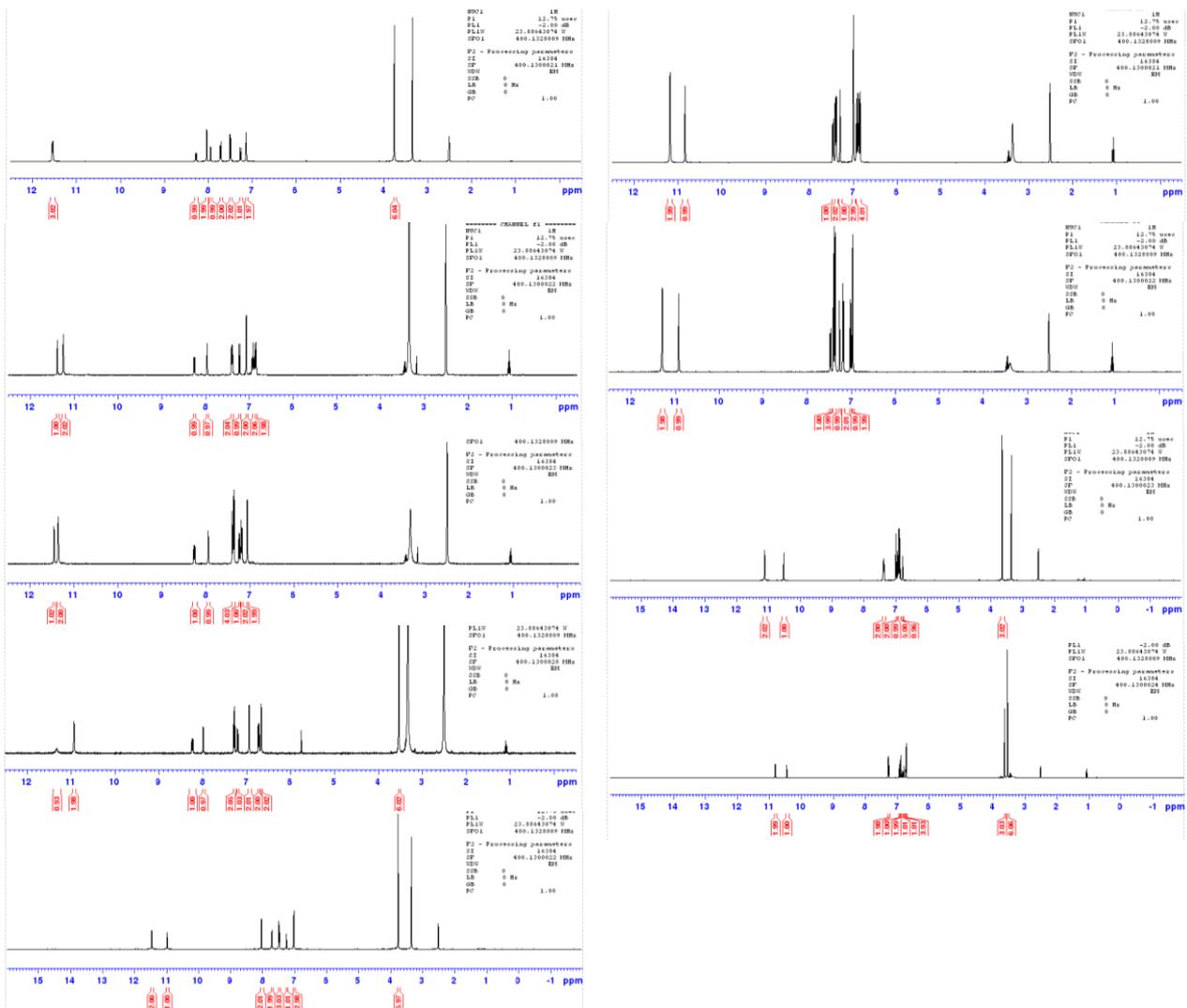


圖37. CYWA-1~12 NMR 氫譜

【討論】

質譜儀結果：

CYWA-1: HRMS (ESI+) calcd for $C_{28}H_{19}N_4O_7[M-H]^-$, 523.1259; found, 523.1261

CYWA-2: HRMS (ESI+) calcd for $C_{24}H_{13}N_4O_3F_2[M-H]^-$, 443.0961; found, 443.0961.

CYWA-3: HRMS (ESI+) calcd for $C_{24}H_{13}N_4O_3Br_2[M-H]^-$, 562.9360; found, 562.9356

CYWA-4: HRMS (ESI+) calcd for $C_{26}H_{19}N_4O_5[M-H]^-$, 467.1361; found, 467.1355

CYWA-5: HRMS (ESI+) calcd for $C_{28}H_{20}N_3O_5NaBr[M+Na]^+$, 580.0479; found, 580.0472

CYWA-6: HRMS (FAB+) calcd for $C_{24}H_{14}N_3OBrF_2[M]^+$, 479.0268; found, 479.0265

CYWA-7: HRMS (FAB+) calcd for $C_{24}H_{14}N_3OBr_3[M]^+$, 602.8626; found, 602.8680

CYWA-8: HRMS (ESI+) calcd for $C_{28}H_{20}N_3O_3NaBr[M+Na]^+$, 524.0580; found, 524.0574

CYWA-9: HRMS (ESI+) calcd for $C_{29}H_{23}N_3O_6Na[M+Na]^+$, 532.1479; found, 532.1477

CYWA-10: HRMS (ESI+) calcd for $C_{25}H_{17}NO_2F_2Na[M+Na]^+$, 452.1181; found, 452.1183

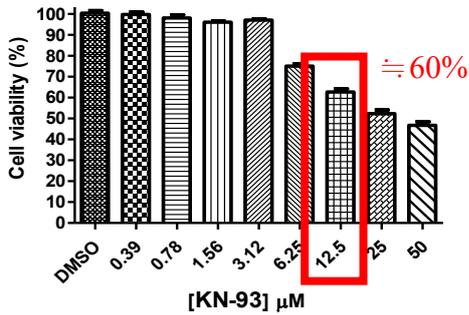
CYWA-11: HRMS (FAB+) calcd for $C_{25}H_{17}N_3O_2Br_2[M]^+$, 550.9667; found, 550.9661

CYWA-12: HRMS (ESI+) calcd for $C_{27}H_{23}N_3O_4Na[M+Na]^+$, 476.1581; found, 476.1575

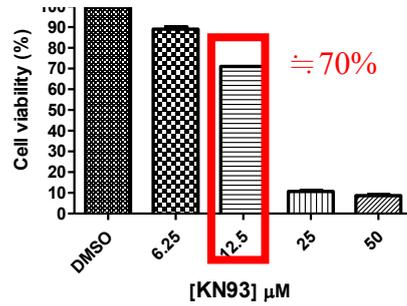
NMR 圖譜：NMR 鑑定圖譜各峰值符合化合物之結構，且圖譜雜訊少。而圖下方的積分恰等於氫數。由此可知，鑑定結構均符合目標產物，且產物純度高。

四、生物檢測

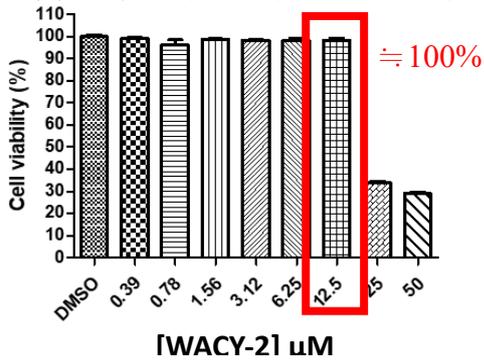
《WACY 系列》



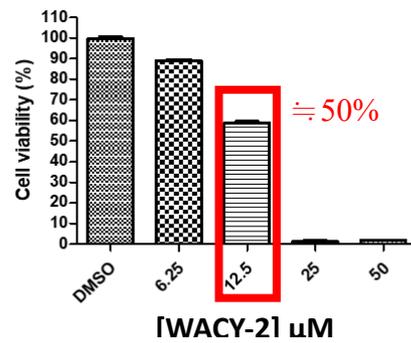
(a) 正常乳腺細胞在 KN-93 的存活率



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

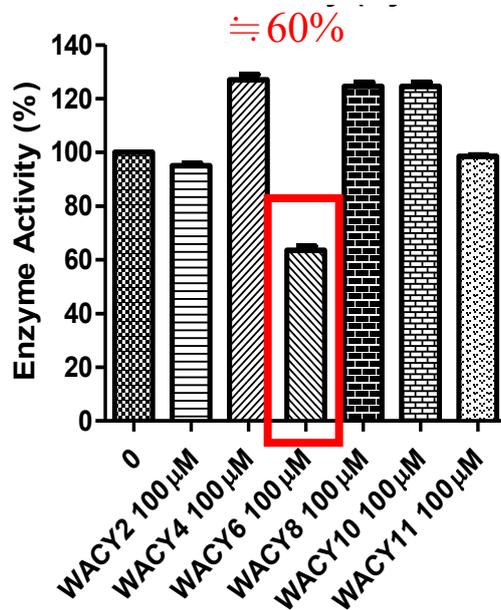


圖39. WACY 系列對 CaMKII 的抑制能力分析

【討論】

表12. 抑制劑濃度為12.5μM 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%

根據表12及圖38，WACY-2對乳癌細胞的毒性大於 KN-93；WACY-2在濃度為12.5μM 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 WACY-2對正常細胞和乳癌細胞的選擇性優於 KN-93。

根據圖39，WACY-6的蛋白質抑制能力最佳，為最具有潛力的 CaMKII 抑制劑。且 WACY-6可作為其他具備 CaMKII 過度活化的癌症的潛力藥物。

《CYWA 系列》

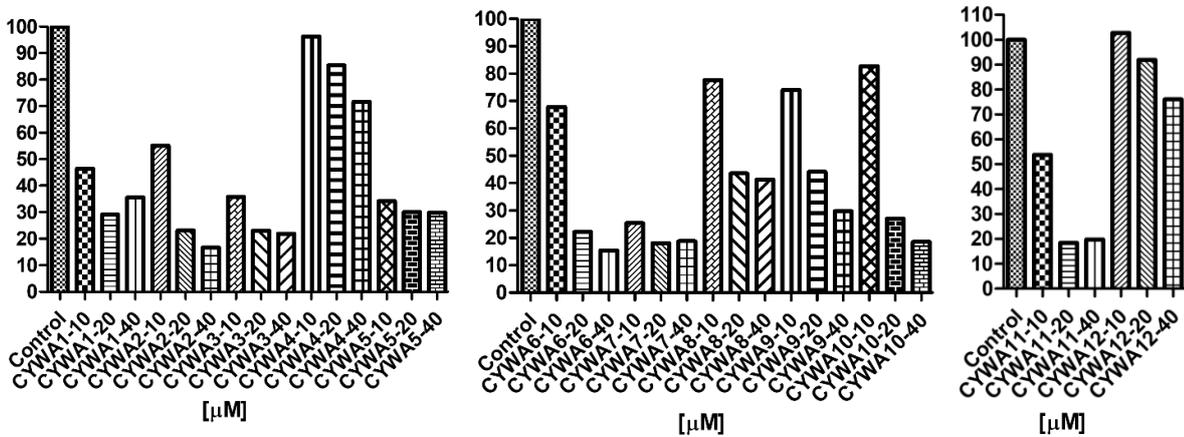


圖40. CYWA 系列對乳癌細胞之毒性分析

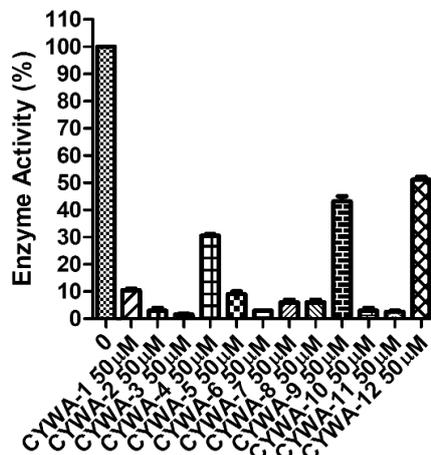


圖41. CYWA 系列對 CaMKII 的抑制能力分析

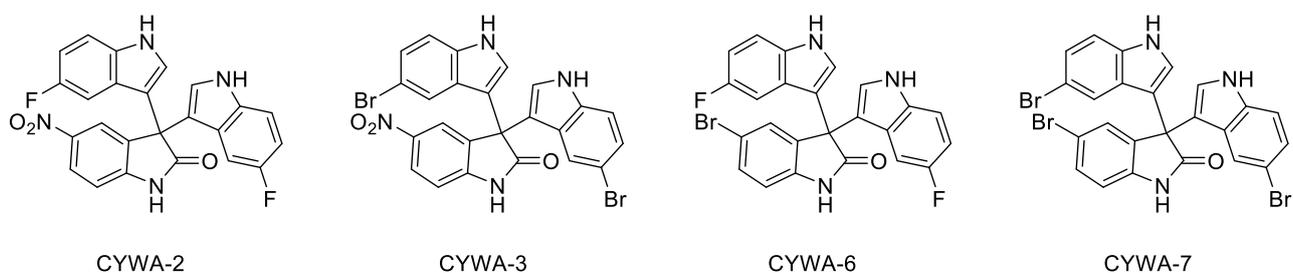


圖42. CYWA-2, 3, 6, 7結構圖

【討論】

根據圖40，CYWA-2, 3, 6, 7, 11對乳癌細胞的毒性高，濃度為20 μ M時細胞存活率均小於30%；同時根據圖41，其對CaMKII的抑制能力佳，濃度為50 μ M時CaMKII的活性均降至10%以下。由此可得，CYWA-2, 3, 6, 7, 11均為優秀的抗癌藥物候選分子。

如圖42，CYWA-2, 3, 6, 7, 11的indole所接取代基均為拉電子基，表示此類結構更能抑制CaMKII活性。

綜合WACY及CYWA的細胞毒性測試及CaMKII活性測試，CYWA-2, 3, 6, 7, 11的毒性及抑制能力均優於WACY-2, 6，而WACY-2對一般乳腺細胞及乳癌細胞具有選擇性，因此另有機會發展為標靶藥物，且CYWA及WACY系列均優於市售CaMKII抑制劑KN-93。

伍、結論

一、理論計算

- (一) WACY及CYWA系列化合物與CaMKII結合能大、作用力穩定、合成純化過程簡易，且起始物易取得，因此選定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) 本研究使用完全創新的合成路徑，優點為製程短、合成效率及產物純度高，符合原子經濟性。
- (二) 此路徑遵循綠色化學，內含一鍋化反應且利用沉澱法取代HPLC，減少溶劑使用量。
- (三) 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、生物檢測

- (一) **CYWA-2, 3, 6, 7, 11**的毒性及抑制能力均優於 **WACY-2, 6**，為最具有潛力的 CaMKII 抑制劑，可作為 CaMKII 過度活化之癌症的潛力藥物。
- (二) **WACY-2**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。
- (三) 未來可再進行動物實驗及藥物物理性質測試，將兩系列之可能性抗癌分子發展為注射藥、口服藥抑或標靶藥物。

陸、參考資料

- 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】 030001

1. 很穩健完整的藥物化學研究，利用理論計算計算出多個分子的結合能，並且利用合成化學，經多步驟反應合成出其中預測結合能最強的候選分子。最後利用毒性及蛋白質測試取得其生物活性。
2. 理論計算及實驗驗證成果的連結可嘗試進行解釋。
3. 化學合成的產率必須詳細提供。