การสังเคราะห์และประเมินผลการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนของอนุพันธ์กรดอะมิโนที่มีต่อ คาเธพซิน-จี ทริพซิน และไคโมทริพซิน

นางสาววิมล พรสวัสดิ์ชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2532

ISBN-974-576-488-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015789
| 10302578

SYNTHESIS AND EVALUATION OF AMINO ACID DERIVATIVES AS PROTEASE INHIBITORS ON CATHEPSIN G TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN

MISS WIMON PORNSAWATCHAI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Chemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1989

ISBN-974-576-488-4

Thesis Title Synthesis and Evaluation of Amino Acid Derivatives as Protease Inhibitors on Cathepsin G, Trypsin and Chymotrypsin

By Miss Wimon Pornsawatchai

Department Chemistry

Thesis Advisor Associate Professor Phichai Tovivich, Ph.D.
Associate Professor Suchata Jinachitra
Professor Bela Ternai, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree.

.....Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman
(Professor Padet Sidisunthorn, Ph.D.)

.....Thesis advisor
(Associate Professor Phichai Tovivich, Ph.D.)

.....Thesis advisor
(Associate Professor Suchata Jinachitra)

.....Member
(Associate Professor Sunibhond Pummangura, Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Supawan Tantayanon, Ph.D.)

วิมล พรสวัสดิ์ชัย : การสังเคราะห์และประเมินผลการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนของอนุพันธ์กรดอะมิโนที่มีต่อ คาเธพซิน-จี ทริพซิน และไคโมทริพซิน (SYNTHESIS AND EVALUATION OF AMINO ACID DERIVATIVES AS PROTEASE INHIBITORS ON CATHEPSIN G, TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. พิชัย โตวิวิชญ์, รศ. สุชาตา ชินะจิตร, ศ. ดร. เบลา เทอร์ไน, 121 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์เปปไตด์หรืออนุพันธ์ของกรดอะมิโนโดยวิธี mixed anhydride สารที่สังเคราะห์ขึ้นทั้งหมดจำนวน 10 ตัวนี้เป็นสารใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีผู้ใดสังเคราะห์มาก่อน การทำเปปไตด์ที่สังเคราะห์ให้บริสุทธิ์ทำได้โดยการตกผลึกหลายครั้ง แล้วทำการทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีทินแลร์โครมาโทกราฟี และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของธาตุในสารประกอบ นอกจากนี้ยังได้ทำการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ทุกตัวโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ อินฟราเรด โปรตอน และ คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

จากการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์กลุ่มเซรีนโปรติเอส 3 ชนิด คือ ทริพซิน ไคโมทริพซิน และคาเธพซิน-จีที่สภาวะทางสรีระ พบว่าตัวยับยั้งทั้งหมดให้ค่าการยับยั้งที่ต่ำสำหรับทริพซิน และเป็นตัวยับยั้งที่ดีสำหรับไคโมทริพซิน อย่างไรก็ตามสำหรับคาเธพซิน-จีในสภาพที่ทำการทดสอบให้ค่าการออกฤทธิ์ที่ต่ำมากจนไม่สามารถทำการทดสอบกับตัวยับยั้งที่สังเคราะห์ได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบสารสังเคราะห์ดังกล่าวว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไคโมทริพซินแบบใดโดยใช้ Lineweaver-Burk Plot และพบว่าสารสังเคราะห์ทุกตัวเป็นตัวยับยั้งชนิดแข่งขัน (Competitive Inhibitor) ของเอนไซม์ไคโมทริพซิน

ภาควิชา เคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เคมีอินทรีย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2531

WIMON PORNSAWATCHAI : SYNTHESIS AND EVALUATION OF AMINO ACID DERIVATIVES AS PROTEASE INHIBITORS ON CATHEPSIN G, TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PHICHAI TOVIVICH,Ph.D., ASSO. PROF. SUCHATA JINACHITRA, PROF. BELA TERNAI,Ph.D., 121 PP.

In the course of this research work, a series of peptides or amino acid derivatives were synthesized by mixed anhydride method. All of these synthetic peptides are novel. These synthetic compounds were purified by fractional recrystallisation. The purity of the end products was confirmed by thin-layer chromatography and elemental analysis. All the structures were thoroughly elucidated by infrared, proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopies.

The effectiveness of the synthetic compounds as inhibitors was determined against three serine proteases namely trypsin, chymotrypsin and cathepsin G at the physiological conditions. The results showed that all the synthetic compounds gave a poor inhibitory activity against trypsin, but they are quite good inhibitors against chymotrypsin. However, at the testing conditions, cathepsin G gave such a low activity that it was impossible to test with the synthetic compounds. All the synthetic inhibitors were also tested to determine the type of inhibition against chymotrypsin by the interpretation of Lineweaver-Burk plots. The results showed that all of them are competitive inhibitors.

ภาควิชา เคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เคมีอินทรีย์

ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ACKNOWLEDGEMENT

This thesis was made possible with the assistance of several individuals. I wish to express my deepest gratitude to my supervisor and co-advisor, Associate Professor Dr. Phichai Tovivich and Associate Professor Suchata Jinachitra, for their guidance, thoughtful suggestions and fruitful discussion throughout the entire period of this research. I would also like to express my sincere thanks to my co-advisor, Professor Dr. Bela Ternai of La Trobe University, Australia, for his help in giving some chemicals and equipments needed.

I am also grateful to Associate Professor Thepjumnong Sangsuntorn for the least square program and Dr. Suganya Soontaros for giving advice on enzyme properties.

I also thank to Miss Supa Polman for her help to type some chapters in this thesis, and to Miss Wanida Jinsart for her kindness to test HLC-G . I wish to thank the thesis committee for their comments and valuable suggestions.

Finally, I would like to express my greatest appreciation to my mother and brother for their support and encouragement throughout the entire study. I would also like to thank the Department of Chemistry for providing the laboratory, chemicals and equipments. And I wish to thank the Professor Dr. Buarech Khamthong Foundation and the Graduate School of Chulalongkorn university for some financial supports during my study.

CONTENTS

LIST OF FIGURES

Figures Pages

Figures Pages

LIST OF SCHEMES

LIST OF TABLES

LIST OF ABBREVIATIONS

Abs	absorbance
Ala	L-Alanine
Ar	aromatic
Arg	L-Arginine
BAPNA	N -Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide
b.p.	boiling point
br.	broad
Bz	Benzoyl
calc'd	calculated
°C	degree celcius
cm	centimeter
d	doublet
dd	doublet of doublet
D	Dalton
DMSO	dimethyl sulfoxide
E	enzyme
ES	enzyme-substrate complex
ESI	enzyme-substrate-inhibitor complex
Eq.	equation
Fig.	Figure
g	gram
Gly	glycine
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid
HLC-G	Human leukocyte cathepsin G
HLE	Human leukocyte elastase

I	inhibitor	v	volume
Lit	literature	w	weight
m	multiplet	Z	carbobenzoxy
M	mole per liter or molar		
mg	milligram		
min	minute		
mL	milliliter		
mm	millimeter		
mM	millimolar		
mmole	millimole		
m.p.	melting point		
μL	microliter		
μM	micromolar		
M_r	relative molecular weight		
nm	nanometer		
ppm	parts per million		
Phe	L-Phenylalanine		
Pro	L-Proline		
q	quartet		
R_f	rate of flow in chromatography		
s	singlet		
S	substrate		
SDS	sodium dodecyl sulfate		
t	triplet		
THF	tetrahydrofuran		
TLC	thin layer chromatography		
Tyr	tyrosine		