การออกแบบและประเมินศักยภาพของสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน เพื่อรักษาโรคเอมไฟซีมาและอาร์ไธรทิส

(THE DESIGN, SYNTHESIS AND EVALUATION OF NEW PROTEASE INHIBITORS AS POTENTIAL DRUGS AGAINST EMPHYSEMA AND ARTHRITIS)

นางสาวนฤมล เครืออ่องอาจนุกูล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2529

ISBN 974-566-225-9

011883

I 15907028

THE DESIGN, SYNTHESIS AND EVALUATION OF NEW PROTEASE INHIBITORS AS POTENTIAL DRUGS AGAINST EMPHYSEMA AND ARTHRITIS

MISS NARUMOL KREUA-ONGARJNUKOOL, 1960-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Chemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1986

ISBN 974-566-225-9

Thesis Title	The Design, Synthesis and Evaluation of New Protease Inhibitors as Potential Drugs against Emphysema and Arthritis
By	Miss Narumol Kreua-ongarjnokool
Department	Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Phichai Tovivich,Ph.D.
	Professor Bela Ternai,Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for a Master's degree.

.....

(Associate Professor Sorachai Bhisalbutra,Ph.D.)

Acting Associate Dean for Academic Affairs

for

Acting Dean of the Graduate school

Thesis Committee

.....Chairman

(Professor Padet Sidisunthorn, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Supawan Tantayanon, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Phichai Tovivich, Ph.D.)

.....Member

(Professor Bela Ternai, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การออกแบบและประเมินศักยภาพของสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนเพื่อรักษาโรคเอมไฟซีมาและอาร์ไธรทิส
ชื่อนิสิต	นางสาวนฤมล เครืออองอาจนุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.พิชัย โตวิวิชญ์
	ศาสตราจารย์ ดร.เบลา เทอร์ไน
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2528

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการสังเคราะห์กลุ่มของสารที่มีฤทธิ์เฉพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์กลุ่มเซรีนโปรติเอส โดยใช้ทริพซินและไคโมทริพซินเป็นแม่แบบ สารยับยั้งที่สังเคราะห์ขึ้นทั้งหมดนี้เป็นสารใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีผู้ใดได้กระทำมาก่อน วิธีการสังเคราะห์สารยับยั้งเหล่านี้เป็นวิธีการที่รู้จักกันมาแล้ว การทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกหลายครั้ง ทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีทินเลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี ประกอบกับการวิเคราะห์ทาองค์ประกอบของธาตุในสารประกอบ นอกจากนี้ยังได้ทำการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ทุกตัวที่เกิดขึ้นได้กระทำอย่างละเอียดรอบคอบโดยวิธีทางสเปคโตรสโคปี ได้แก่ อินฟราเรด โปรตอนและคาร์บอน 13 นิวเคลียร์แมคเนติค-เรโซแนนซ์

ในการศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งต่อเอนไซม์ เริ่มต้นโดยการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ และทดสอบผลการยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์ทริพซินและไคโมทริพซินโดยใช้ไลน์ วีเวอร์-เบอร์คพลอต ทำให้ได้ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของสารซึ่งทำให้เราทราบได้ว่าสารยับยั้งที่ทำการศึกษานี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์อย่างไร จากผลของการศึกษานี้พบว่าเราสามารถพัฒนาสารยับยั้งชนิดใหม่ ที่ออกฤทธิ์อย่างเฉพาะเจาะจงที่มีประสิทธิภาพและเป็นสารยับยั้งที่ไม่มีพิษ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งเหล่านี้น่าจะเป็นตัวยาในการรักษาโรคเอมไฟซีมาและอาร์ไธรทิสในคนต่อไปได้

Thesis Title	The Design, Synthesis and Evaluation of New Protease Inhibitor as Potential Drugs against Emphysema and Arthritis
Name	Miss Narumol Kreua-ongarjnukool
Thesis Advisors	Associate Professor Phichai Tovivich, Ph.D. Professor Bela Ternai, Ph.D.
Department	Chemistry
Academic year	1985

ABSTRACT

In the course of this research work, a series of specific inhibitors of serine proteases were synthesised. All of these synthetic inhibitors are novel. The route to these new compounds followed well proven, known methods. Purification was effected by multiple recrystallizations. 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.

In the course of testing the inhibitory activities of these new inhibitors, firstly the optimum conditions for the enzyme-assays were established. Then the assays were carried out to determine the effectiveness of the inhibitors against trypsin and chymotrypsin. This was followed by accurate rate measurements as a function of concentration, in order to establish the mode of action of the inhibitors, by the interpretation of Lineweaver-Burk plots. As a result of these investigations new, effective, specific and non-toxic inhibitors were developed, which show promising as drugs against emphysema and arthritis in man.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

Firstly, I would like to express my deep gratitute to my major supervisor in Thailand, Associate Professor Dr.Phichai Tovivich, for his helpful suggestions and valuable assistance throughout the entire period of this research project. I would also like to express my sincere thanks to my co-supervisor , Professor Dr.Bela Ternai, for his helps in giving valuable advice, discussions and ideas for the design and synthesis of the inhibitors, including provision of some chemicals and equipment needed. I owe both of them a debt of gratitude for their suggestions and advice concerning my thesis.

I am also greatful to Associate Professor Dr.Pipat Karntiang for his valuable assistance on the determination of NMR spectroscopy. Appreciation is also expressed to Mrs.Pornngarm Limtrakul who has given advice on enzyme properties.

My sincere thanks are due to Associate Professor Virul Mangclaviraj, the Director of the Scientific and Technological Research Equipment Centre (STREC) of Chulalongkorn University who has given special permission to use the facilities in the STREC for doing my research work, and to other people in the Department of Chemistry who have given encouragement and assistance throughout the entire project. I wish to thank the thesis committee for their comments and valuable suggestions.

Finally, I would like to express my greatest appreciation to my parents, my brother, Mr.Vichain Kreua-ongarjnukool for their encouragement throughout the entire study.

This research was partially supported by a grant of 15,000 Baht from the Prince of Songkla's Funds in Trust Chulalongkorn University.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figures Pages

Figures Pages

Figures Pages

List of Schemes

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Tables

Tables Pages

Tables Pages

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Abbreviations

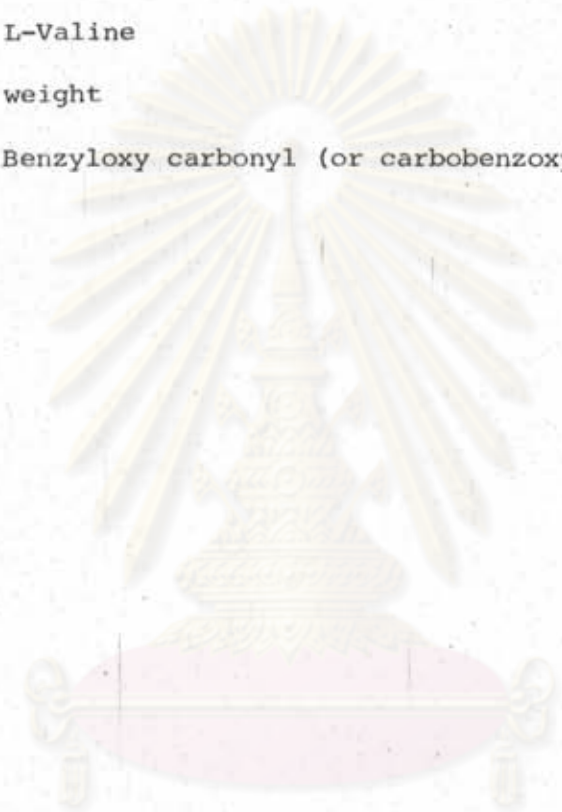
A	L-Alanine
Abs	Absorbance
BAN	t-butyloxy carbonyl-L-alanine 4-nitrophenyl ester
b.p.	boiling point
br	broad
°C	degree celsius
cm	centimeter
cm^3	cubic centimeter
^{13}C NMR	carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance
d	doublet
DMSO	dimethyl sulfoxide
E	enzyme
ϵ	molar extinction coefficient
ES	enzyme-substrate complex
ESI	enzyme-substrate-inhibitor complex
g	gram
HEPES	N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid
HLE	hyman leukocyte elastase
^1H NMR	proton Nuclear Magnetic Resonance
hrs	hours
I	inhibitor
ID_{50}	50% inhibition dose (the concentration which inhibits 50% of the enzyme activity under assay conditions specified in the experimental section)
IR	Infrared
Kg	kilogram

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

lit	liter
LD_{50}	lethal dose
M	mole per liter (or molar)
m	multiplet
mol	gram-molecule
m mole	milli gram-molecule
mm	millimeter
mM	millimolar
ml	milliliter
min	minute
mg	milligram
m.p.	melting point
nm	nanometer
P_n	amino acid position in polypeptide chain of substrate or inhibitor
PPE	porcine pancreatic elastase
ppm	parts per million
q	quartet
R_f	ratio of distance a compound moves to distance solvent front moves
s	singlet
S	substrate
S_n	subsite in active site of enzyme
Suc	succinyl
t	triplet
t-BOC	tertiary butyloxycarbonyl
THF	tetrahydrofuran

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TLC	thin layer chromatography
µl	microliter
µM	micromolar
UV	ultraviolet
v	volume
V	L-Valine
w	weight
Z	Benzyloxy carbonyl (or carbobenzoxy)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย