



BIVALENT PEPTIDIC INHIBITOR: การสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ทาง  
ชีวภาพ

โดย

นางสาวกิตตินาถ สายพฤกษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เคมี)

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

BIVALENT PEPTIDIC INHIBITOR: การสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ทาง  
ชีวภาพ

โดย

นางสาวกิตตินาถ สายพฤกษ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เคมี)

ภาควิชาเคมี

วิทยาศาสตร์เคมี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



BIVALENT PEPTIDIC INHIBITOR: SYNTHESSES AND BIOLOGICAL  
ACTIVITIES

BY

MISS KITTINAT SAIPHUK



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (CHEMISTRY)

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

THAMMASAT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2015

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวกิตตินาถ สายพฤกษ์

เรื่อง

BIVALENT PEPTIDIC INHIBITOR: การสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)

เมื่อ วันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2559

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(อ.ดร. โอบาส โตจิระ)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์



(อ.ดร. ภาณุมาศ ทองอยู่)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(อ.ดร. จริยา ร่มสายหยุด)

คณบดี



(รศ. ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	BIVALENT PEPTIDIC INHIBITOR: การสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวกิตตินาถ สายพฤษ์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ.ดร. ภาณุมาศ ทองอยู่
ปีการศึกษา	2558

### บทคัดย่อ

โรคหอบหืดเป็นโรคที่เกิดจากหลอดลมมีอาการอักเสบเรื้อรัง เนื่องจากมีเซลล์ มาสท์เซลล์ (mast cell) มาเกาะที่เยื่อผนังหลอดลม ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้ อาทิ ไรฝุ่น เกสรดอกไม้ ฝุ่นละออง โดยที่มาสท์เซลล์จะหลั่งเอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทริปเทส (human-beta-tryptase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ และจะส่งผลให้กล้ามเนื้อหลอดลมหดเกร็งตัว มีอาการแน่นหน้าอก ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาการสังเคราะห์ bivalent peptidic inhibitor โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยวิถีของแข็ง (solid phase peptide synthesis) ซึ่งมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทริปเทส ได้ดีกว่าตัวยับยั้ง (inhibitor) ซึ่งเป็น monovalent เนื่องจากสามารถจับกับ active site ได้ถึง 2 ตำแหน่ง โครงสร้างของ bivalent peptidic inhibitor จะประกอบไปด้วย 2 inhibitory loops และแกนของโครงสร้าง โดยในงานวิจัยนี้จะใช้ tartaric acid เป็นแกนของโครงสร้างในการสร้าง bivalent scaffold โครงสร้างของ bivalent peptidic inhibitor ที่สังเคราะห์ขึ้นมีต้นแบบมาจากตัวยับยั้งที่พบได้ในเมล็ดทานตะวัน sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งในกลุ่มของ Bowman-Birk inhibitor (BBIs) ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ซีรีนโปรติเอส รวมถึงมีฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง และพบว่า bivalent peptidic inhibitor ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้มีฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งในระดับไมโครโมลาร์ สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) มีค่า  $IC_{50} = 33 \pm 0.5 \mu M$  เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มีค่า  $IC_{50} = 54 \pm 0.8 \mu M$

**คำสำคัญ:** สังเคราะห์เพปไทด์ด้วยวิถีของแข็ง, Human- $\beta$ -tryptase, SFTI-1 inhibitor

Thesis Title	BIVALENT PEPTIDIC INHIBITOR: SYNTHESSES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES
Author	Miss Kittinat Saiphruk
Degree	Master of Science
Major Field/Faculty/University	Chemistry Faculty of Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Dr. Panumart thongyoo
Academic Years	2016

### ABSTRACT

Asthma is the common chronic inflammatory disease of the airways, which was infiltrated by mast cells. Human- $\beta$ -tryptase is the most abundant secretory granule-derived serine proteinase found in mast cells and released once mast cell is activated mainly as a result of certain allergic and inflammatory disorders. The aim of this project is to explore the synthetic approach of bivalent SFTI-1 inhibitor by using solid phase peptide synthesis. The structure of the bivalent SFTI-1 inhibitor is composed 2 inhibitor loops, each of which is comprised of 7 amino acids. To this approach, tartaric acid is applied as the core to create the bivalent motif. Sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1) are Bowman-Birk inhibitors (BBI) and isolated from sunflower seeds. Sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1) is a template for designing bivalent peptidic inhibitor structure. The synthesized bivalent SFTI-I was found to demonstrate a promising anti-cancer activity in micromolar region against HT29 with  $IC_{50} = 33 \pm 0.5 \mu M$ , and HeLa with  $IC_{50} = 54 \pm 0.8 \mu M$

**Keywords:** solid phase peptide synthesis, Human- $\beta$ -tryptase, SFTI-1 inhibitor

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณา ความอนุเคราะห์ และความดูแลเอาใจใส่จากบุคคลหลายฝ่ายที่ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดี ผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อ.ดร.ภานุมาศ ทองอยู่ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความรู้ เสนอแนะแนวทางการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ อ.ดร.จริยา ร่มสายหยุด อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และ อ.ดร.โอภาส ไตจิระ อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ คณะกรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมเกี่ยวกับงานวิจัยเพื่อให้ได้ผลออกมาดีที่สุดในตอนตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ช่วยชี้แนะความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ตลอดจนเอื้อเพื่อเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ 36/2557

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ ที่คอยอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัย อีกทั้งยังคอยให้กำลังใจและช่วยดำเนินเรื่องเอกสารให้ เป็นไปด้วยความเรียบร้อย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุก ๆ เรื่อง โดยเฉพาะในการเรียนของข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ในภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือที่ดีตลอดมา

นางสาวกิตติณาด สายพฤกษ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(9)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	6
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	6
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 เอนไซม์ (enzyme)	7
2.2 โปรติเอส (protease)	11
2.3 ตัวยับยั้ง (inhibitor)	16
2.4 ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส (protease Inhibitor)	17
2.5 sunflower trypsin inhibitor	19
2.6 Bivalent inhibitor	23



2.7 Bivalent peptide inhibitor	26
2.8 กรดอะมิโนและโปรตีน	30
2.9 การสังเคราะห์เปปไทด์	33
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	36
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	36
3.1.1 สารเคมี	
3.2.1.1 กรดอะมิโน	36
3.2.1.2 ตัวทำละลาย	37
3.2.1.3 สารเคมีอื่นๆ	37
3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์	38
3.1.3 เครื่องมือ	39
3.2 วิธีการทดลอง	40
3.2.1 การสังเคราะห์แกนของโครงสร้าง	40
3.2.1.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ทาร์ทริกแอซิดโดยมีหมู่เบนซิล (benzyl group) เป็นหมู่ป้องกัน (protecting group)	41
(1) การสังเคราะห์ไดเบนซิลทาร์เทรต (dibenzyl tartrate)	41
(2) การสังเคราะห์ Fmoc-Gly-dibenzyl tartrate	42
3.2.1.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ทาร์ทริกแอซิดโดยมีหมู่โพรพาจิล (propagyl group) เป็นหมู่ป้องกัน (protecting group)	42
(1) การสังเคราะห์ไดโพรพาจิลทาร์เทรต (propagyl tartrate)	42
3.2.1.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ทาร์ทริกแอซิดโดยมีหมู่เมทิล (methyl group) เป็นหมู่ป้องกัน (protecting group)	43
(1) การสังเคราะห์ไดเมทิลทาร์เทรต (dimethyl tartrate)	43
(2) การสังเคราะห์ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate	45
(3) การกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting group) Fmoc ของกรดอะมิโนไกลซีน	46
(4) การสังเคราะห์ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate	47

	(5) การกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting group) Fmoc ของกรดอะมิโนอาร์จินีน	48
	(6) การสังเคราะห์ Fmoc-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate	48
	(7) การกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting group) Fmoc ของกรดอะมิโนซิสทีอีน	50
	3.2.2 การสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ (linear peptide chain)	50
	(1) การเชื่อมต่อกรดอะมิโนตัวที่ 1 กับเรซิน (Amino acid loading)	51
	(2) การหาปริมาณของกรดอะมิโนที่ถูกเชื่อมต่อกับเรซิน (Amino acid loading)	52
	(3) ขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step) Fmoc ของกรดอะมิโนทรีโอนีน	52
	(4) ขั้นตอนการเชื่อมต่อกรดอะมิโน (coupling step) ไลซีน	52
	(5) ขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step) Fmoc ของกรดอะมิโนทรีโอนีน	53
	(6) ขั้นตอนการเชื่อมต่อกรดอะมิโน (Coupling step) ซีรีน	53
	(7) ขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step) Fmoc ของกรดอะมิโนซีรีน	53
	(8) ขั้นตอนการเชื่อมต่อกรดอะมิโน (Coupling step) ไอโซลิวซีน	53
	(9) ขั้นตอนการแยกส่วนของเปปไทด์ออกจากเรซิน (Cleavage step)	54
	3.2.3 การสังเคราะห์ตัวยับยั้ง	54
	(1) การเชื่อมต่อสายโซ่เปปไทด์กับส่วนของแกนโครงสร้าง (ligation)	54
	(2) การสังเคราะห์การปิดวง (cyclization)	55
	(3) การกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step)	55
	3.2.4 การตรวจยืนยันโครงสร้าง	56
	3.2.1.1 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)	56
	3.2.1.2 วิสแมสสเปกโทรเมทรี (mass spectrometry (MS))	56
	3.2.1.3 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography (HPLC))	56

3.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) ของ bivalent peptidic inhibitor	57
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	58
4.1 การสังเคราะห์ bivalent peptidic inhibitor	58
4.1.1 การสังเคราะห์แกนของโครงสร้าง	59
4.1.2 การสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์	70
4.1.3 การเพิ่มสายโซ่เปปไทด์เข้าไปในแกนของโครงสร้าง (peptide ligation)	72
4.1.4 การปิดวง (cyclization) และการกำบังหมู่ป้องกัน (deprotecting)	73
4.2 การทดสอบการออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง (anticancer activity)	75
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	76
รายการอ้างอิง	78
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	83
ภาคผนวก ข	85
ประวัติผู้เขียน	112

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ค่า $^1\text{H-NMR}$ ของไดเบนซิลทาร์เทรต (dibenzyl tartrate)	59
4.2 ค่า $^1\text{H-NMR}$ ของไดโพรพาจิลทาร์เทรต (dipropagyl tartrate)	61
4.3 ค่า $^1\text{H-NMR}$ และค่า $^{13}\text{C-NMR}$ ของไดเมทิลทาร์เทรต (dimethyl tartrate)	62
4.4 ค่า $^1\text{H-NMR}$ และค่า $^{13}\text{C-NMR}$ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)- ไกลซีน-ไดเมทิลทาร์เทรต (Fmoc-Gly-dimethyl tartrate)	64
4.5 ค่า $^1\text{H-NMR}$ และค่า $^{13}\text{C-NMR}$ ของ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate	67
4.6 ค่า $^1\text{H-NMR}$ และค่า $^{13}\text{C-NMR}$ Fmoc-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate	69

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 แสดงหลอดลมของคนปกติจะมีกล้ามเนื้อ (airway muscle) และเยื่อบุหลอดลม (airway lining) ในสภาวะปกติ	2
1.2 แสดงหลอดลมเมื่อร่างกายได้รับสารภูมิแพ้มากระตุ้น กล้ามเนื้อหลอดลมจะบีบตัว เยื่อบุหลอดลมจะมีการอักเสบเกิดการหนาตัว ร่วมกับการหลั่งของเสมหะเป็นปริมาณมาก ทำให้เกิดการอุดทางเดินหายใจ	2
1.3 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ human- $\beta$ -trypase ภาพ A เป็นโครงสร้างของ human- $\beta$ -trypase ซึ่งมีลักษณะเป็น tetramer ประกอบด้วย monomer 4 ตัว และภาพ B เป็น monomer แสดงส่วนบริเวณ active site ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน Ser-195, His-57 และ Asp-102	5
2.1 แสดงโมเดลตามทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key theory)	8
2.2 แสดงโมเดลตามทฤษฎีเหนี่ยวนำให้เหมาะสม (induced fit theory)	9
2.3 แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ serine protease โดยกลไกจะเริ่มต้นจาก serine และเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเอนไซม์ก็จะอยู่ในรูปของ active form	12
2.4 กลไกการทำงานของเอนไซม์ cysteine protease โดยกลไกจะเริ่มต้นจาก นิวคลีโอไฟล์ของ cysteine และเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเอนไซม์ก็จะอยู่ในรูปของ active form	13
2.5 กลไกการทำงานของเอนไซม์แอสปาติกโปรติเอส โดยกลไกจะเริ่มต้นจากแอสปาติกโปรติเอส และจะต้องมีโมเลกุลที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ 2 โมเลกุลที่ใช้ในปฏิกิริยา	14
2.6 กลไกการทำงานของเอนไซม์ metalloprotease โดยกลไกการทำงานจะมีอะตอมของโลหะเข้ามาเกี่ยวข้อง	15
2.7 โครงสร้างของ sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1) ซึ่งพบในเมล็ดทานตะวัน	18
2.8 ภาพ A แสดงลำดับกรดอะมิโนและตำแหน่ง P <sub>2</sub> ' โครงสร้างของ sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1) ภาพ B แสดงโครงสร้างของ sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1)	19
2.9 แสดงกรดอะมิโนที่ถูกแทนที่ในตำแหน่ง P <sub>2</sub> ' โครงสร้างของ sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1)	20
2.10 แสดงตัวยับยั้งของ Ewa Zabotna	21
2.11 แสดงตัวยับยั้งของ Adam Lesner	22
2.12 แสดงตัวยับยั้งของ Sheng Jiang	23

2.13 (A) การแสดงโครงสร้างริบบอน (ribbon model) ของฮิวแมนเบต้าทริปเทส ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยของเอนไซม์ทริปเทส คือ A B C และ D แสดงตามสีน้ำเงินแดง เขียว และเหลืองตามลำดับ (B) การแสดงแผนผังของหน่วยย่อยทั้ง 4 หน่วยของเอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทริปเทส โดยแสดงระยะห่างระหว่างกรดอะมิโนแอสพาเตด ตำแหน่ง 189 (Asp 189) ซึ่งอยู่ภายในตำแหน่งจับเอส 1 (S1 pockets) ของแต่ละหน่วยซึ่งมีสัญลักษณ์เป็นดอกจันสีแดง	24
2.14 แสดงตัวยับยั้งเอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทริปเทส ที่ Norbert Schaschke และคณะสังเคราะห์ขึ้น	25
2.15 แสดงโครงสร้างของตัวยับยั้ง CRA-2059	26
2.16 แสดงโครงสร้างของ Wenlong Lian	27
2.17 แสดงโครงสร้างตัวยับยั้งของ Alessandro Angelini	28
2.18 แสดงโครงสร้างตัวยับยั้งของ Adam	28
2.19 แสดงโครงสร้างตัวยับยั้งของ Michael D Carrithersl และ Michael R Lerner	29
2.20 แสดงโครงสร้างตัวยับยั้งของ Zhengding	29
2.21 แสดงการเกิดพันธะเปปไทด์	30
2.22 แสดงโครงสร้างของโปรตีน	33
2.23 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการกำจัดหมู่ป้องกันฟลูออรีนลเมทอกซีคาร์บอนิล (Fmoc)	34
2.24 แสดงกลไกการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis)	35
3.1 ภาพแสดงสมการของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไอบีนซิลทาร์เทรต	41
3.2 ภาพแสดงสมการของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Fmoc-Gly-dibenzyl tartrate	42
3.3 สมการแสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดโพรพาจิลทาร์เทรต	42
3.4 สมการแสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดเมทิลทาร์เทรต	43
3.5 ภาพแสดงสมการการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไดเมทิลทาร์เทรต	45
3.6 สมการแสดงการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์	51
4.1 ภาพแสดงโครงสร้างของ bivalent peptidic inhibitor	58
4.2 ภาพแสดงโครงสร้างของ dibenzyl tartrate	59
4.3 ภาพแสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ dibenzyl tartrate	60
4.4 ภาพแสดงโครงสร้างของ dipropagyl tartrate	61
4.5 ภาพแสดงโครงสร้างของไดเมทิลทาร์เทรต (dimethyl tartrate)	62

4.6 ภาพแสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ dimethyl tartrate	62
4.7 ภาพแสดงโครงสร้างของ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate	63
4.8 ภาพแสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate	64
4.9 ภาพแสดงโครงสร้างของ (Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate)	66
4.10 ภาพแสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate	67
4.11 ภาพแสดงโครงสร้างของ Fmoc-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate	68
4.12 ภาพแสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ Fmoc-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate	70
4.13 แสดงโครงสร้างของสายโซ่เปปไทด์ (Fmoc-Ile-Ser( $^t\text{Bu}$ )-Lys(Boc)-Thr( $^t\text{Bu}$ )-OH)	71
4.14 ภาพแสดงแมสสเปกตรัมและ HPLC สเปกตรัมของ Fmoc-ISKT-OH (สีน้ำเงิน) และ Fmoc-CRG-DMT (สีแดง)	71
4.15 ภาพแสดงโครงสร้างของ Fmoc-Ile-Ser( $^t\text{Bu}$ )-Lys(Boc)-Thr( $^t\text{Bu}$ )-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate	72
4.16 ภาพแสดงแมสสเปกตรัมและ HPLC สเปกตรัมของ Fmoc-Ile-Ser( $^t\text{Bu}$ )-Lys(Boc)-Thr( $^t\text{Bu}$ )-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate	73
4.17 ภาพแสดงโครงสร้างของ bivalent peptidic inhibitor	74
4.18 ภาพแสดงแมสสเปกตรัมและ HPLC สเปกตรัมของ bivalent peptidic inhibitor	74
4.19 กราฟแสดงค่าการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง	75
ข1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ dibenzyl tartrate	86
ข2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ dimethyl tartrate	87
ข3 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ dimethyl tartrate	88
ข4 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ dimethyl tartrate	89
ข5 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate	90
ข6 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate	91
ข7 Dept135 spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate	92
ข8 HMQC spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate	93
ข9 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate	94
ข10 HPLC chromatogram ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate	95
ข11 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-R(Pbf)G-dimethyl tartrate	96
ข12 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-R(Pbf)G-dimethyl tartrate	97
ข13 Dept135 spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-R(Pbf)G-dimethyl tartrate	98

ข14	HMQC spectrum (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) ของ Fmoc-R(Pbf)G-dimethyl tartrate	99
ข15	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ Fmoc-R(Pbf)G-dimethyl tartrate	100
ข16	<sup>1</sup> H-NMR spectrum (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) ของ Fmoc-C(Trt)RG-dimethyl tartrate	101
ข17	<sup>13</sup> C -NMR spectrum (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) ของ Fmoc-C(Trt)RG-dimethyl tartrate	102
ข18	Dept135 (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) ของ Fmoc-C(Trt)RG-dimethyl tartrate	103
ข19	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) Fmoc-C(Trt)RG-dimethyl tartrate	104
ข20	HPLC chromatogram ของ Fmoc-C(Trt)R(Pbf)G-dimethyl tartrate	105
ข21	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ Fmoc-IS( <sup>t</sup> Bu)K(Boc)T( <sup>t</sup> Bu)-OH	106
ข22	HPLC chromatogram ของ Fmoc-IS( <sup>t</sup> Bu)K(Boc)T( <sup>t</sup> Bu)-OH	107
ข23	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ Fmoc-IS( <sup>t</sup> Bu)K(Boc)T( <sup>t</sup> Bu)C(Trt)R(Pbf)G	
-DMT		108
ข24	HPLC chromatogram ของ Fmoc-IS( <sup>t</sup> Bu)K(Boc)T( <sup>t</sup> Bu)C(Trt)R(Pbf)G-DMT	109
ข25	แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ bivalent peptidic inhibitor	110
ข26	HPLC chromatogram ของ bivalent peptidic inhibitor	111



## รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	คำเต็ม/คำจำกัดความ
$\beta$	Beta
$\mu\text{M}$	Micromolar
$^{13}\text{C-NMR}$	Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy
$^1\text{H-NMR}$	Hydrogen 1 nuclear magnetic resonance spectroscopy
PIP	Piperidine
DCM	Dichloromethane
DMF	Dimethyl formamide
DMT	Dimethyl tartrate
SPPS	Solid phase peptide synthesis
TLC	Thin layer chromatography
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine
TFA	Trifluoroacetic acid
PBS	Phosphate buffered saline
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

## บทที่ 1

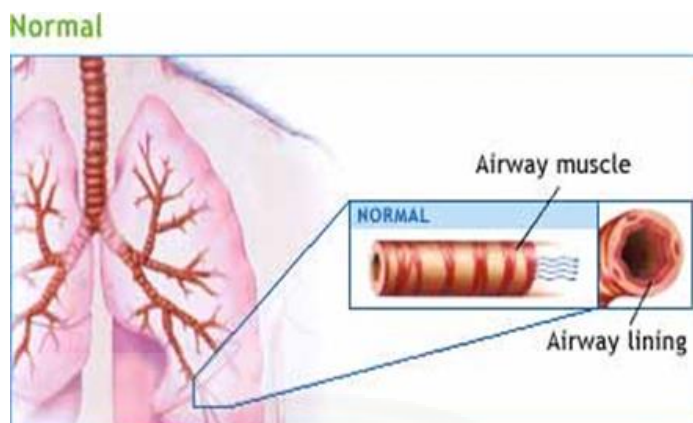
### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

โรคหอบหืดเป็นโรคที่ยังรักษาให้หายขาดไม่ได้และเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศต่างๆ ทั่วโลก [1] ในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของโรคหอบหืดถึง 1-20% ในเด็ก และ 30% ในผู้ใหญ่ [2-4] โรคหอบหืดเป็นโรคที่พบได้ใน ทุกเพศ ทุกวัย ผู้ป่วยจะมีอาการไอ หอบเหนื่อย หายใจไม่อิ่ม หายใจมีเสียงหวีด ซึ่งอาการเหล่านี้มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยค่อนข้างสูง จากการสำรวจพบว่าผู้ป่วยโรคหอบหืดมากกว่าครึ่งไม่สามารถทำกิจกรรมเหมือนคนปกติได้ [4] และนอกจากนี้ยาที่ใช้ในการรักษา ยังส่งผลข้างเคียงต่อร่างกายของผู้ป่วยอีกด้วย โรคหอบหืดเป็นโรคของหลอดลมที่มีการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammatory) เป็นผลให้มีเซลล์ต่างๆ เช่น มาสต์เซลล์ (mast cell), อีโอซิโนฟิล (Eosinophils), ที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte), แมคโครฟาจ (Macrophage) และนิวโทรฟิล (Neutrophil) มาสะสมที่เยื่อผนังหลอดลม ทำให้เยื่อผนังหลอดลมมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสารภูมิแพ้ และสิ่งแวดล้อมมากกว่าคนปกติ (bronchial hyper-reactivity) ผลจากการอักเสบจึงทำให้เยื่อผนังหลอดลมมีการหนาตัว กล้ามเนื้อหลอดลมมีการหดเกร็งตัว แสดงดังภาพที่ 1.2 ทำให้ผู้ป่วยมีอาการไอ แน่นหน้าอก หายใจมีเสียงหวีด และหอบเหนื่อย อาการหอบเหนื่อยจะเกิดขึ้นทันทีที่ได้รับสารภูมิแพ้ [5]

เมื่อหายใจเอาสารภูมิแพ้เข้าไปในปอดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในปอดดังนี้

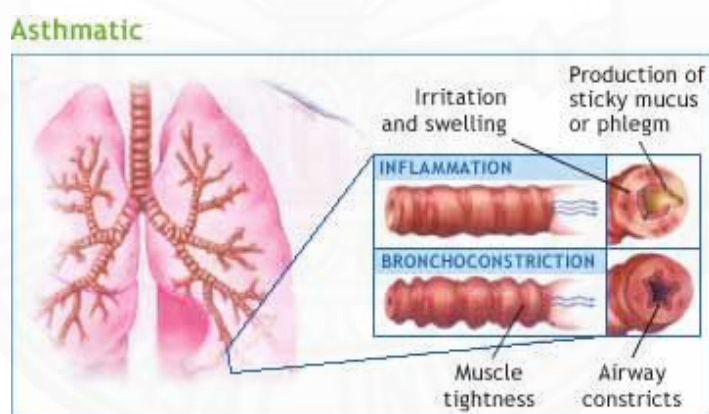
1. มีการหดเกร็งของกล้ามเนื้อหลอดลม (airway muscle) หลังจากได้รับสารภูมิแพ้ ทำให้ลมผ่านหลอดลมลำบาก
2. ผนังหลอดลมบวมเนื่องจากมีการหลั่งของน้ำทำให้ผู้ป่วยจะหอบเพิ่มขึ้น
3. มีเสมหะอุดหลอดลมทำให้อากาศผ่านหลอดลมลำบาก
4. มีการหนาตัวของผนังหลอดลมทำให้หลอดลมตีบเรื้อรัง



ภาพที่ 1.1 แสดงหลอดลมของคนปกติจะมีกล้ามเนื้อ (airway muscle) และเยื่อบุหลอดลม (airway lining) ในสภาพปกติ

(ที่มา:

[http://www.siamhealth.net/public\\_html/Disease/Respiratory/asthma1/Asthma.htm#.VyYoLdR97IU](http://www.siamhealth.net/public_html/Disease/Respiratory/asthma1/Asthma.htm#.VyYoLdR97IU))



ภาพที่ 1.2 แสดงหลอดลมเมื่อร่างกายได้รับสารภูมิแพ้มากระตุ้น กล้ามเนื้อหลอดลมจะบีบตัว เยื่อบุหลอดลมจะมีการอักเสบเกิดการหนาตัว ร่วมกับการหลั่งของเสมหะเป็นปริมาณมากทำให้เกิดการอุดตันทางเดินหายใจ

(ที่มา:

[http://www.siamhealth.net/public\\_html/Disease/Respiratory/asthma1/Asthma.htm#.VyYoLdR97IU](http://www.siamhealth.net/public_html/Disease/Respiratory/asthma1/Asthma.htm#.VyYoLdR97IU))

ในปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาโรคหอบหืดแบ่งเป็นสองกลุ่มด้วยกัน คือยาขยายหลอดลม และยาต้านการอักเสบ [6] ยาขยายหลอดลม เป็นยาที่ช่วยบรรเทาอาการขณะผู้ป่วยมีอาการ ใช้เพื่อขยายหลอดลม ลดอาการหอบเหนื่อย โดยยาขยายหลอดลมออกฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลม จะลดอาการหอบเหนื่อยในช่วงที่กำลังกำเริบ มีความจำเป็นในช่วงที่มี อาการฉุกเฉิน อาทิ ยากระตุ้นระบบประสาทซิมพาเทติก ยาประเภทนี้มีทั้งชนิดสูดดม ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และชนิดกิน ใช้ในรายที่เกิดอาการหอบเฉียบพลัน ออกฤทธิ์เร็วและได้ผลดี แต่ทำให้มือสั่น นอนไม่หลับ หัวใจเต้นเร็วขึ้น ความดันเลือดสูงขึ้น จึงห้ามใช้ในคนที่มีโรคหัวใจ, โรคความดันเลือดสูง, โรคคอกพอกเป็นพิษ และคนชรา ส่วนยากลุ่มแซนทีน (xanthines) มีเฉพาะชนิดกินและฉีด ถ้าใช้เกินขนาดจะเกิดพิษได้ อันได้แก่ อาการคลื่นไส้ อาเจียน, ปวดศีรษะ, ใจสั่น, หัวใจเต้นเร็ว, ชัก, หัวใจเต้นผิดจังหวะ และอาจเสียชีวิตได้ โดยความรุนแรงของอาการพิษขึ้นกับขนาดยาที่ได้รับ และยาด้านระบบประสาทพาราซิมพาเทติก นิยมใช้ในรูปสูดดม เพราะทำให้เกิดอาการข้างเคียงน้อย ในขณะที่ออกฤทธิ์ขยายหลอดลมได้ดี สามารถใช้ร่วมกับยาในกลุ่มยากระตุ้นระบบประสาทซิมพาเทติก อาการข้างเคียงของยาชนิดนี้ คือ คอแห้ง, เสมหะข้นเหนียว สำหรับยาด้านการอักเสบ ใช้ควบคุมโรคให้เข้าสู่ระยะสงบ เป็นยาหลักที่ใช้รักษาซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดที่ใช้รักษาโรคหืดในปัจจุบัน สามารถลดการกำเริบเฉียบพลัน และลดการทำลายหลอดลมอย่างถาวรได้ ได้แก่ ยาพ่นที่มีส่วนประกอบของสเตียรอยด์ เช่น pulmicort, flixotide, symbicort, seretide และยารับประทาน ได้แก่ singulair, nuelin SR, xanthium เป็นต้น

เนื่องจากโรคหอบหืดเป็นโรคเรื้อรัง ถ้าผู้ป่วยมีอาการรุนแรงในระดับหนึ่งจำเป็นต้องใช้ยาสเตียรอยด์ชนิดสูดอย่างต่อเนื่องจนอาการดีขึ้นแล้วจึงค่อยๆ ลดขนาดยาลง และเมื่อมีอาการบอบช้ำก็ต้องเพิ่มยาขึ้น ตามความรุนแรง แต่สเตียรอยด์เป็นยาซึ่งมีผลต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกาย การใช้สเตียรอยด์จึงอาจนำไปสู่อันตรายมากมายหลายประการ [7] อาทิ การใช้สเตียรอยด์ในขนาดสูงมีผลกดภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราได้ง่าย นอกจากนี้สเตียรอยด์ยังอาจบดบังอาการแสดงของโรคติดเชื้อ ทำให้ตรวจพบโรคเมื่ออาการรุนแรงแล้ว ก่อการทำงานของระบบที่ควบคุมการหลั่งฮอร์โมน ระบบที่ทำหน้าที่ควบคุมการหลั่งสเตียรอยด์ฮอร์โมน ก่อการทำงานของระบบอวัยวะที่ทำหน้าที่สร้างและควบคุมการหลั่งฮอร์โมน สเตียรอยด์มีผลทำให้เยื่อกระดูกอาหารบางลง และยับยั้งการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ทดแทนเนื้อเยื่อเก่าที่หลุดไป นอกจากนี้ผู้ป่วยบางรายยังพบว่า มีการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้นด้วย การใช้สเตียรอยด์อาจทำให้มีอาการกระเพาะอาหารทะลุ หรือเลือดออก ในกระเพาะอาหารได้ โดยไม่มีอาการปวดมาก่อน สเตียรอยด์ยังอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบุคลิกภาพ และอารมณ์ของผู้ใช้ได้ การใช้ยาขนาดสูงจะทำให้เกิดอารมณ์เป็นสุข จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ใช้มีอาการติดยา นอกจากนี้ยังพบ

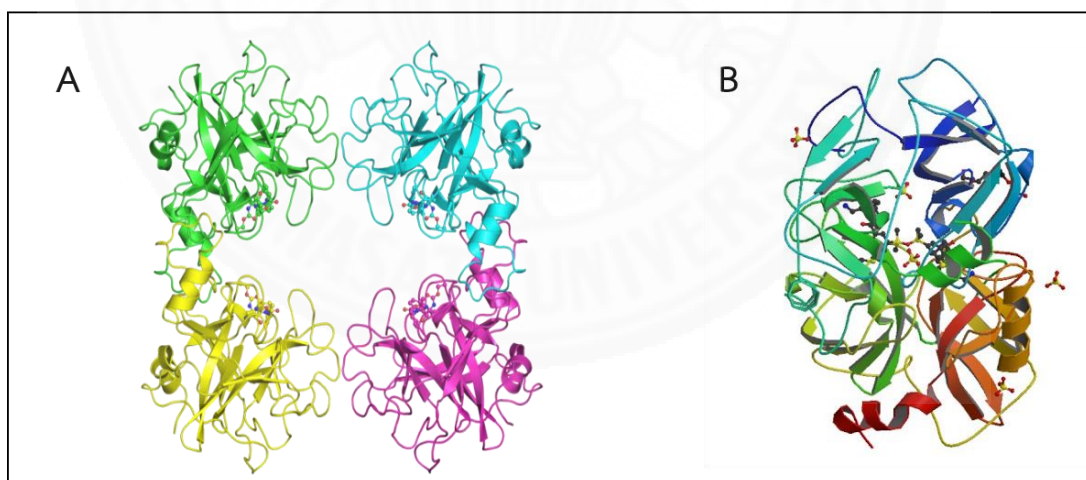
อาการไม่พึงประสงค์อื่น ๆ เช่น นอนไม่หลับ เจริญอาหาร กระสับกระส่าย หงุดหงิด นอกจากนี้การใช้สเตียรอยด์ติดต่อกันเป็นเวลานาน มีผลทำให้กระดูกผุ และยังพบว่าสเตียรอยด์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเด็ก การใช้สเตียรอยด์ ทำให้ร่างกายสูญเสียเกลือโปแตสเซียมทางปัสสาวะมาก โดยผู้ที่รับประทานโปแตสเซียมต่ำมาก อาจมีผลทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย กล้ามเนื้อไม่มีแรง และหัวใจเต้นผิดจังหวะ หรือหยุดเต้นได้ การใช้สเตียรอยด์เป็นระยะเวลาสั้น จะทำให้มีการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กล้ามเนื้อบริเวณต้นขาและแขน การใช้สเตียรอยด์ยังมีผลทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า Cushing 's Syndrome ลักษณะพบใน ผู้ป่วยประเภทนี้ เช่น อ้วน ขนดก ระบบประจำเดือนผิดปกติ ความดันโลหิตสูง กล้ามเนื้อไม่มีแรง ปวดหลัง เป็นสิว มีอาการทางจิตใจ หัวใจล้มเหลว และบวมหน้า เป็นต้น

#### เอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทริปเทส

เอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทริปเทส (human-beta-tryptase) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ [8] และกระบวนการเกิดโรคหอบหืด โดยลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์นี้คือมีโครงสร้างแบบเตตระเมอร์ (tetramer) คือประกอบไปด้วยทริปซิน (trypsin) ถึงสี่โมเลกุลต่อกัน human-beta-tryptase เป็นเอนไซม์ที่มีมากที่สุดในมาสต์เซลล์ ซึ่งจะหลั่งออกมาเมื่อมาสต์เซลล์ (mast Cell) ได้รับการกระตุ้นจากสารก่อภูมิแพ้ อาทิ ละอองเกสรดอกไม้ ขนสัตว์ พืชแมลง อาหาร สารเคมี โลหะ รวมทั้งตัวไรในฝุ่น ซึ่งเป็นแมลงตัวเล็กๆ มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น พบได้ง่ายตามผ้าปูที่นอน ผ้าห่ม พรหมเช็ดเท้า มาสต์เซลล์ถูกสร้างมาจากไขกระดูก จะพบอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ อาทิ เนื้อเยื่อบริเวณรอบๆ เส้นเลือด และเส้นประสาท ภายในระบบหายใจและระบบย่อยอาหาร และบริเวณผิวหนัง ซึ่งเมื่อร่างกายสัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ในครั้งแรก แอนติเจนหรือสิ่งแปลกปลอมจะเข้าไปกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวชนิดบีเซลล์ (B cell) กลายสภาพเป็นพลาสมาเซลล์ (plasma cell) เกิดการสร้างอิมมูโนโกลบูลินอี (IgE) ซึ่งเป็นแอนติบอดี (antibody) ไปจับกับผิวของมาสต์เซลล์ โดยในช่วงนี้จะไม่มีอาการแพ้ปรากฏขึ้น หากได้รับสารก่อภูมิแพ้ชนิดเดิมอีก สารก่อภูมิแพ้จะเข้าจับกับไอจีอี (IgE) ที่มีความจำเพาะทันที เกิดเป็นปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันขึ้นเรียกว่า “ปฏิกิริยาไวเกินแบบเกิดทันที” (immediate hypersensitivity reaction) ผลคือมาสต์เซลล์หลั่งสารสื่อกลาง (mediator) ได้แก่ ฮิสตามีน (histamine), ทริปเทส (tryptase), ลูโคไตรอิน (leukotrienes) และ พรอสตาแกลนดินส์ (prostaglandins) ส่งผลโดยตรงทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะหลอดลมหดเกร็ง มีการขยายตัวของหลอดเลือด และมีการซึมผ่าน (permeability) ของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการบวม (edema) มีการหลั่งสารคัดหลั่งออกมามากขึ้น (mucus constriction) อินเทอร์ลูคิน 5 กระตุ้นไขกระดูกทำให้เกิดการรวมตัวของอีโอสิโนฟิลขึ้น และนำไปสู่เนื้อเยื่อที่มีการอักเสบ ก่อนการทำลายเนื้อเยื่อของหลอดลม เกิดการหลุดลอกสะสมตัว หนาตัว และนำไปสู่การอุดกั้น

หลอดลม ทำให้เกิดการอุดตันทางเดินหายใจ และทำให้เกิดการอักเสบของหลอดลมอย่างเรื้อรัง เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดลมอย่างถาวร (airway remodeling) โดยพบว่ามีจำนวนของต่อมเมือกในทางเดินหายใจ (mucous gland) เพิ่มมากขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงและเพิ่มจำนวนจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (myofibroblast) มากขึ้น กล้ามเนื้อเรียบขนาดใหญ่ขึ้น และมีการซึมผ่านของหลอดเลือด และมีการสร้างพังผืดที่หลอดลมขึ้น ทำให้หลอดลมเกิดการแข็งตัว เสียความยืดหยุ่น ส่งผลให้เกิดภาวะอุดกั้นทางเดินหายใจอย่างเรื้อรังในที่สุด [9]

ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการพัฒนาตัวยับยั้งที่มีผลข้างเคียงน้อยที่สุด และมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ human- $\beta$ -tryptase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดโรคหอบหืด โดยโครงสร้างของ human- $\beta$ -tryptase มีลักษณะที่เป็น tetramer มีบริเวณเร่ง 4 ตำแหน่ง แสดงดังภาพที่ 1.3 ดังนั้นจึงทำการสังเคราะห์ peptide inhibitor ซึ่งมีลักษณะเป็น bivalent เนื่องจากหนึ่งโมเลกุลของ bivalent inhibitor จะสามารถจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ human- $\beta$ -tryptase ได้ถึงสองตำแหน่ง ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ human- $\beta$ -tryptase ได้



ภาพที่ 1.3 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ human- $\beta$ -tryptase ภาพ A เป็นโครงสร้างของ Human- $\beta$ -tryptase ซึ่งมีลักษณะเป็น tetramer ประกอบด้วย monomer 4 ตัว และภาพ B เป็น monomer แสดงส่วนบริเวณ active site ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน Ser-195, His-57, and Asp-102

(ที่มา: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=4MPV>)

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ bivalent peptidic Inhibitor โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เปปไทด์บนวิฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis)

1.2.2 ตรวจสอบและประเมินความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ bivalent peptide Inhibitor ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและ human-beta-tryptase

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 เพื่อเป็นองค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารในกลุ่มของ bivalent SFTI-1 inhibitor

1.3.2 เพื่อเป็นองค์ความรู้ที่สามารถนำไปศึกษาในสัตว์ทดลอง และพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

1.3.3 เพื่อนำผลการศึกษาไปเผยแพร่ในวารสารต่างๆ และงานประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้อง

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะสังเคราะห์ bivalent SFTI-1 inhibitor โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เปปไทด์บนวิฏภาคของแข็ง และนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์ซีรีนโปรติเอส และการต่อต้านเซลล์มะเร็ง



## บทที่ 2

### วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 เอนไซม์ (enzyme)

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความสำคัญต่อการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์ ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นเอนไซม์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นสารประเภทโปรตีน ซึ่งมีการขดม้วนตัวเป็นโครงสร้างสามมิติ มีบริเวณที่เป็นที่จับของสารตั้งต้นและเป็นบริเวณที่เกิดของปฏิกิริยา (active site) และมีตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา หรือ co-factor ที่ช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างเหมาะสม

เอนไซม์มีโครงสร้างรูป (conformation) ที่จำเพาะซึ่งถูกกำหนดโดยการเรียงลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบโครงสร้างของเอนไซม์อาจเปลี่ยนแปลงได้เช่นเดียวกับโปรตีนทั่วไป และขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย pH และอุณหภูมิ เอนไซม์จำนวนมากเป็นโปรตีนประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) ซึ่งจะจับตัวกันเป็นโครงสร้างจตุรภูมิที่ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในทางชีวภาพ (biological catalyst) แต่เอนไซม์มีลักษณะพิเศษที่แตกต่างจากตัวเร่งปฏิกิริยาอื่น ๆ คือ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาหรือ สารที่เข้าทำปฏิกิริยาชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น เป็นผลให้ร่างกายสามารถควบคุมปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้อย่างเหมาะสม

##### 2.1.1 การแบ่งประเภทของเอนไซม์

การแบ่งประเภทของเอนไซม์นิยมแบ่งตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งคณะกรรมการเอนไซม์นานาชาติ (International Enzyme Commission, IEC) ได้จัดแบ่งเป็น 6 ประเภท คือ

1. ออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน
2. ทรานส์เฟอเรส (transferase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมหรือ กลุ่มอะตอมจาก สารหนึ่งไปยังอีกสารหนึ่ง เช่น เอนไซม์ไคเนส (kinase)
3. ไฮโดรเลส (hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis)
4. ไลเอส (lyases) เป็นเอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยาการดึงเอาส่วนต่าง ๆ ออกจากโมเลกุลโดยไม่ใช้น้ำทำให้เกิดพันธะคู่ (double bond) ขึ้น



5. ไอโซเมอเรส (isomerases) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างจากไอโซเมอร์หนึ่งไปเป็นอีกไอโซเมอร์หนึ่ง

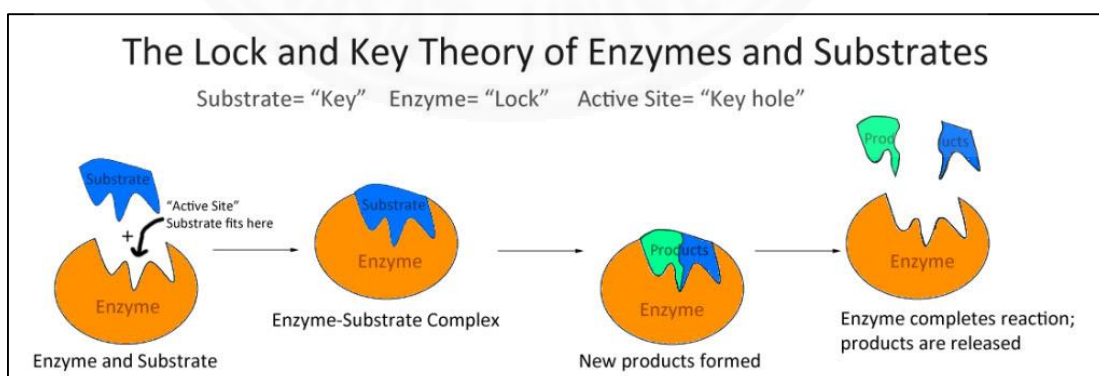
6. ไลเกส (lygases) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์หรือการสร้างพันธะชนิดต่าง ๆ

### 2.1.2 กลไกการทำงานของเอนไซม์

กลไกพื้นฐานในการเร่งปฏิกิริยาชีวเคมีของเอนไซม์ เริ่มจากการรวมตัวของโมเลกุลสารตั้งต้น (substrate) ที่บริเวณเฉพาะ (active site) ของเอนไซม์ หลังจากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงการกระจายอิเล็กตรอนในพันธะเคมีของสาร ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาเคมีเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ และผลิตภัณฑ์จะถูกปล่อยออกมาจากผิวของเอนไซม์ เพื่อให้เอนไซม์กลับไปอยู่ในรูปเดิมที่สามารถรวมตัวกับสารโมเลกุลอื่นได้อีก

ทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key theory)

ที่นำเสนอแนวคิดนี้คือ อีมิล ฟิชเชอร์ (Emil Fischer) โดยเปรียบเอนไซม์ (enzyme) เป็นเหมือนแม่กุญแจและสารตั้งต้น (substrate) เปรียบเป็นลูกกุญแจซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อไขด้วยลูกกุญแจ โดยลูกกุญแจจะต้องมีรูปร่างพอเหมาะกับแอกทีฟไซต์ของแม่กุญแจเท่านั้น จึงจะรวมกับเอนไซม์และเกิดปฏิกิริยากลายเป็นผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับได้ กล่าวคือ เอนไซม์เปลี่ยนสารตั้งต้นให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ให้กลายเป็นสารตั้งต้นได้ แสดงดังภาพที่ 2.1



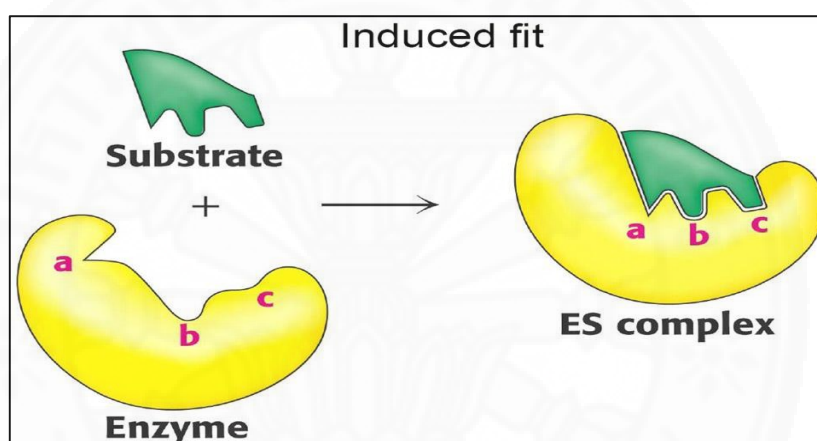
ภาพที่ 2.1 แสดงโมเดลตามทฤษฎีแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key theory)

(ที่มา:

<http://s677.photobucket.com/user/erica46829/media/LockandKeyTheory.jpg.html>)

ทฤษฎีเหนี่ยวนำให้เหมาะสม (induced fit theory)

เสนอโดย คอชแลนด์ (Koshland) อธิบายว่าเมื่อสารตั้งต้นเข้าจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์จะเหนี่ยวนำให้เอนไซม์เปลี่ยนโครงสร้างให้เหมาะสม ทำให้การจับกันระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นดีขึ้นและเกิดปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์ออกมา นอกจากนี้ สารที่ไม่ใช่สารตั้งต้นแต่มีลักษณะคล้ายสารตั้งต้น ก็สามารถเข้าจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ แต่ไม่สามารถชักนำให้เอนไซม์เปลี่ยนโครงสร้างที่เหมาะสม ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาและไม่ได้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งทฤษฎีนี้สามารถอธิบายได้กว้างกว่าทฤษฎีแรก เพราะแสดงถึงความยืดหยุ่นของเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง แสดงดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 แสดงโมเดลตามทฤษฎีเหนี่ยวนำให้เหมาะสม (induced fit theory)

(ที่มา: [http://images.slideplayer.com/25/7983196/slides/slide\\_16.jpg](http://images.slideplayer.com/25/7983196/slides/slide_16.jpg))

### 2.1.3 ความจำเพาะและประสิทธิภาพ (specificity and efficiency)

ความจำเพาะของเอนไซม์ หมายถึง การที่เอนไซม์สามารถเลือกปฏิกิริยาและซับสเตรต ในการเข้าทำปฏิกิริยาได้ เอนไซม์แต่ละชนิดมักจะมีหน้าที่หนึ่งหน้าที่ได้โดยเฉพาะความจำเพาะของเอนไซม์แบ่งออกเป็นสองส่วนใหญ่ ๆ คือ

1. ความจำเพาะทางปฏิกิริยา (reaction specificity) คือ การที่เอนไซม์ตัวหนึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เพียงชนิดเดียว เช่น ปฏิกิริยาการเปลี่ยนไพรูเวท (pyruvate) เป็นแลคเตท (lactate) และเป็นอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ปฏิกิริยาทั้งสองที่เกิดขึ้นกับสารตัวเดียวกันนี้ ต้องการเอนไซม์ต่างกันสองชนิด คือ แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) และ ไพรูเวทดีคาร์บอกซีเลส (pyruvate decarboxylase) ตามลำดับ

2. ความจำเพาะทางซับสเตรต (substrate specificity) คือ การที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาของซับสเตรตสับเตรตเฉพาะตัวเดียวหรือบางตัวเท่านั้น จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเดียวกันของซับสเตรตอื่นที่มีโครงสร้าง แตกต่างกันอย่างออกไปได้ เช่น แอลอะมิโนออกซิเดส (L-amino acid oxidase) จะออกซิไดส์เฉพาะกรดอะมิโนชนิด L แต่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิไดส์ของกรดอะมิโนชนิด D ได้ การที่เอนไซม์มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพในการทำหน้าที่เป็นตัวเร่งอธิบายได้ 2 ทฤษฎี คือ “กุญแจและลูกกุญแจ” (“look and key” theory) และอีกทฤษฎี “ทฤษฎีชักนำให้เหมาะสม” (“induced fit” theory) ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

#### 2.1.4 อิทธิพลที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

1. ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์เมื่อให้ความเข้มข้นของซับสเตรตคงที่

2. ผลของความเข้มข้นของซับสเตรตต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณการเพิ่ม ของซับสเตรต แต่เมื่อเพิ่มซับสเตรตจนถึงระดับหนึ่งแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตก็ตาม อัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะไม่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของซับสเตรตมีน้อย เอนไซม์ยังมีมากอัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดี และเมื่อมีซับสเตรตมากขึ้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเกิดเร็วขึ้น แต่เมื่อซับสเตรตมีมากถึงระดับหนึ่งเอนไซม์จะถูกใช้ไปหมด ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตจึงไม่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

3. ผลของ pH ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา pH ของสารละลายจะมีอิทธิพลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มาก ทั้งนี้เพราะเอนไซม์แต่ละชนิดจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH ใด pH หนึ่งเท่านั้นเรียก pH ที่เอนไซม์ทำงานที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดนี้ว่า optimum pH เช่น เอนไซม์เปปซิน (pepsin) ย่อย egg albumin จะมี optimum pH ที่ 1.5 เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ย่อยโปรตีนมี optimum pH 7.8 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ไปจาก optimum pH เพียงเล็กน้อยอาจจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงได้

4. ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีอัตราเร็วเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่จะมีที่อุณหภูมิหนึ่งซึ่งเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดเรียกอุณหภูมินี้ว่า optimum temperature โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมี optimum temperature ไม่สูงเกิน

กว่า 50 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้เอนไซม์จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เลย ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ถูกทำลายโครงสร้าง (denaturation) นั้นเอง

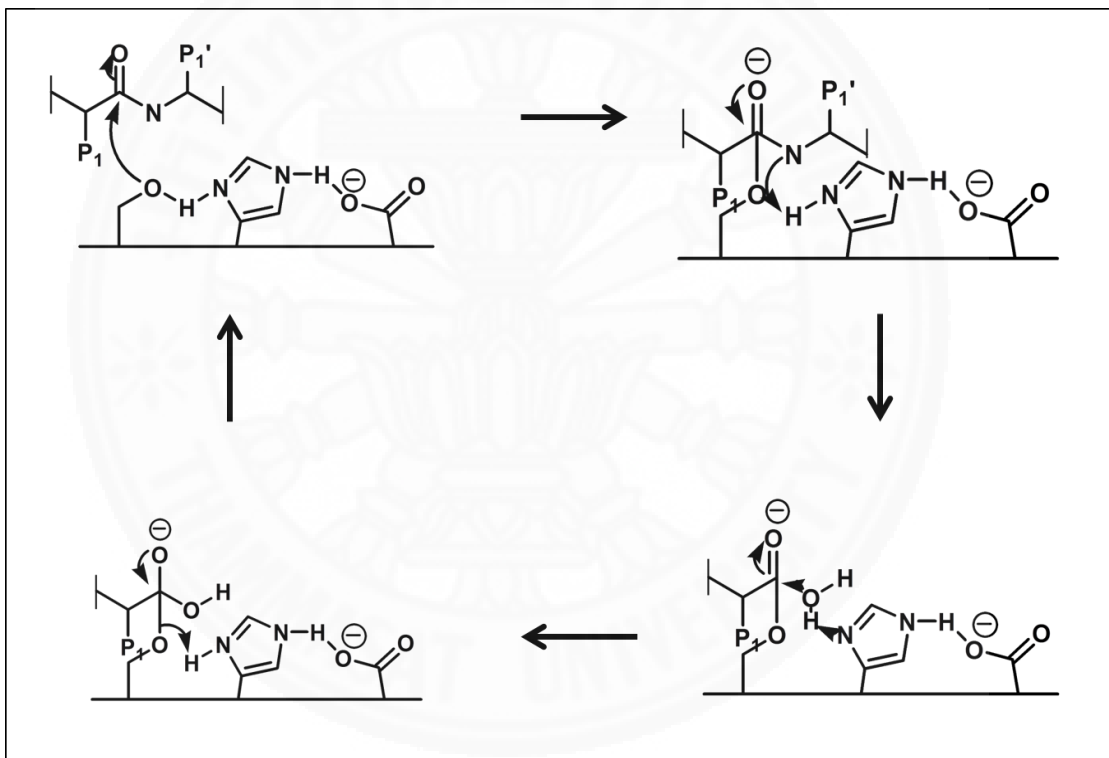
5. ผลของความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาการเติมผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลงไปในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง จะทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์กับอัตราเร็วของปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้เพราะจะทำให้การแตกตัวของเอนไซม์-ซับสเตรตคอมเพลกซ์ไปเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเกิดได้น้อยลงนอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เช่น เวลา แสง องค์ประกอบทางกายภาพ ความเข้มข้นของไอออน และสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ อีกด้วย

## 2.2 โปรติเอส (protease)

โปรติเอส (protease) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โปรตีนซึ่งเป็นพอลิเพปไทด์ หรือพอลิเมอร์ของกรดอะมิโน (amino acid) ได้เป็นเพปไทด์ที่สายสั้นลง สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิต อาทิ ระบบการย่อยอาหารของมนุษย์และสัตว์ พบในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก อาทิ เปปซิน (pepsin), เรนิน (rennin), ทริปซิน (trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) พบในพืช อาทิ โบรมีเลนจากสับปะรด ปาเปนจากยางมะละกอ และผลิตได้จากจุลินทรีย์ อาทิ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา เป็นต้น[10] เอนไซม์โปรติเอสมีความสำคัญอย่างมากต่อร่างกายมนุษย์ เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสจะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการทางชีวภาพ (biological process) หลายชนิดรวมทั้งระบบการแข็งตัวของเลือด (blood coagulation system) ระบบคอมพลีเมนต์ (complement cascade) การตายของเซลล์ และเกี่ยวข้องในระบบของฮอร์โมน โดยเอนไซม์โปรติเอสจะทำหน้าที่ในการย่อยพันธะเพปไทด์ เช่น การตัดเปลี่ยนโปรตีนและเอนไซม์ตัวอื่นๆ เพื่อทำหน้าที่ต่างๆ ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ นอกจากนี้โปรติเอสยังเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทมากในอุตสาหกรรมหลายประเภท อาทิ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมถ้ำรูป การบำบัดของเสีย และโดยเฉพาะอุตสาหกรรมสารซักล้าง เป็นต้น [11-12] หากแบ่งเอนไซม์โปรติเอสตามลักษณะการตัดบนสายโพลีเพปไทด์จะแบ่งได้เป็นสองชนิดคือ exopeptidase ซึ่งทำหน้าที่ตัดที่ปลายสาย C-terminal หรือ N-terminal ของสายโพลีเพปไทด์ (polypeptide) และ เอ็นโดเพปติเดส (endopeptidase) ซึ่งทำหน้าที่ตัดภายในระหว่างสายโพลีเพปไทด์ [13] International Union of Biochemistry (IUB) แบ่งตามหลักการทำงานของเอนไซม์ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) จะแบ่ง

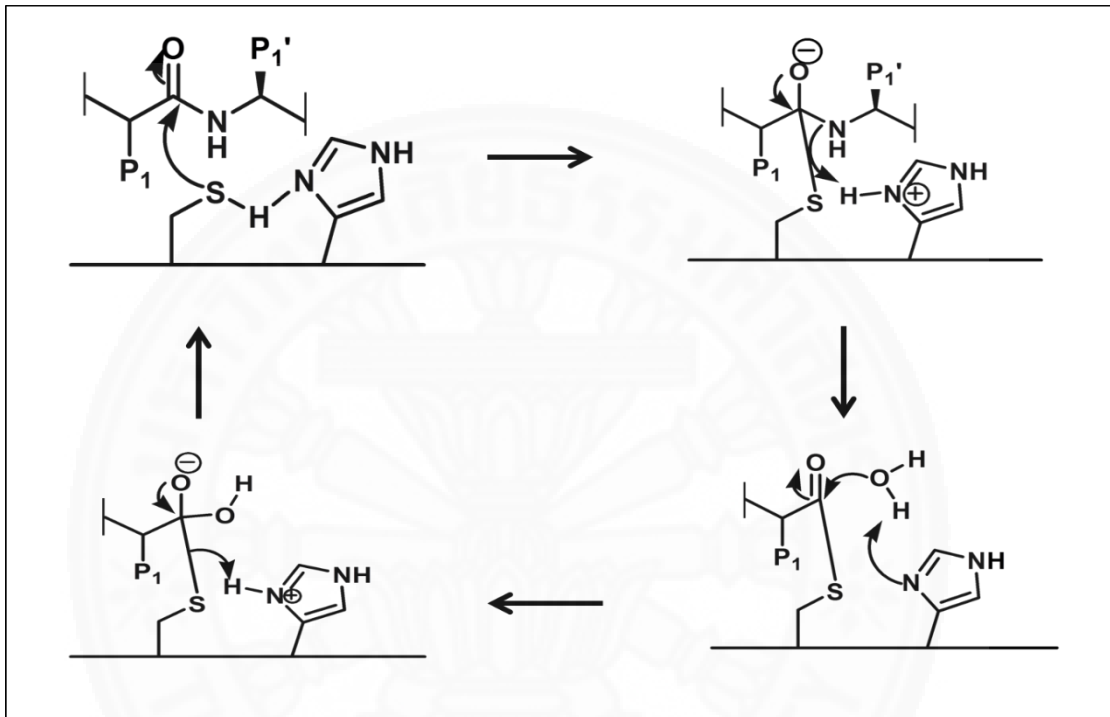
ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ ซีรีนโปรติเอส (serine protease), ซีสทีน (cysteine protease), แอสปาทิกโปรติเอส (aspartic protease) และเมทัลโลโปรติเอส (metalloprotease)

1. ซีรีนโปรติเอส (serine protease) เอนไซม์กลุ่มนี้ มีกรดอะมิโนซีรีน (serine) และฮิสทีดีน (histidine) อยู่ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา ช่วงพีเอช (pH) ที่เหมาะสมในการทำงานค่อนข้างกว้างระหว่าง 4.0 ถึง 11.0 โดยกลไกจะเริ่มจาก ที่หมู่  $-OH$  ของ serine เข้า attack ที่คาร์บอนตำแหน่ง carbonyl group ประจุลบ shift ไปอยู่ที่ออกซิเจน จากนั้นขั้นตอนต่อมาประจุลบ shift กลับมาทำให้สายเพปไทด์แตกออก จากนั้นเกิด ปฏิกิริยา hydrolysis ทำให้ได้ เอนไซม์ที่อยู่ใน active form เช่นเดิม



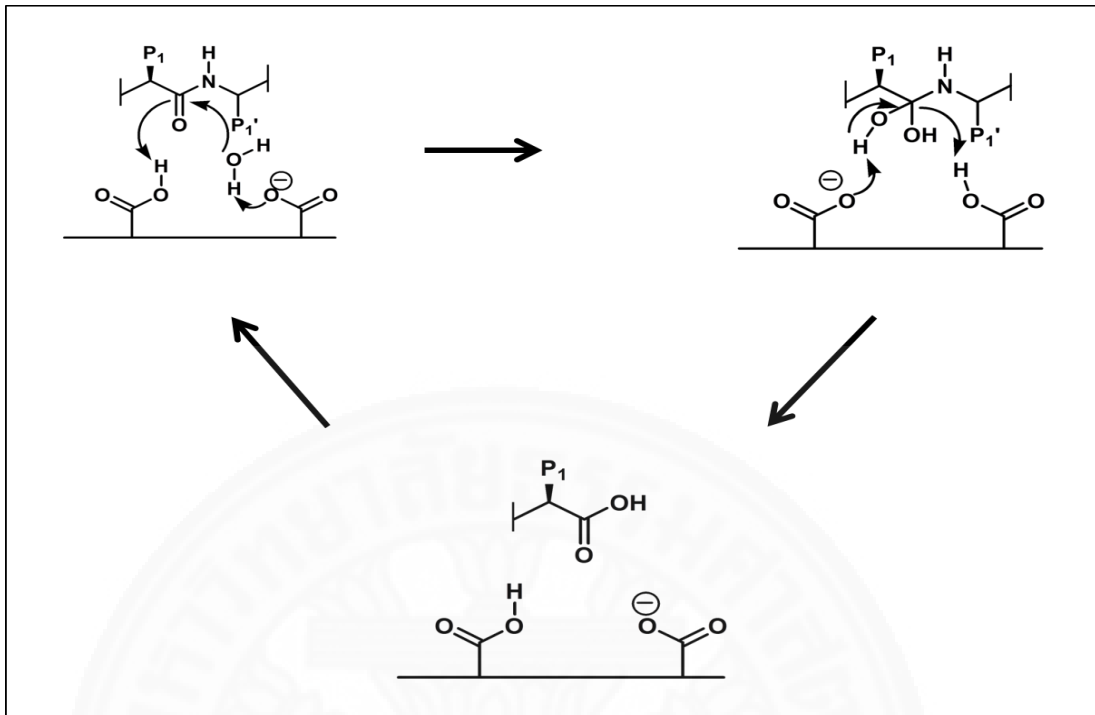
ภาพที่ 2.3 แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ serine protease โดยกลไกจะเริ่มต้นจาก serine และเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเอนไซม์ก็จะอยู่ในรูปของ active form

2. ซีสทีอิน (cysteine protease) ในบริเวณเร่งปฏิกิริยามีซีสทีอิน (cysteine) และ ฮิสทีดีน (histidine) เอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช (pH) ที่ค่อนข้างเป็นกลาง กลไกการทำงานคล้ายรีโนโปรติเอส แตกต่างที่กลไกจะเริ่มที่หมู่  $-SH$  ของซีสทีอิน เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้จากพืชชั้นสูง เช่น ปาเปน และโบรมีเลน



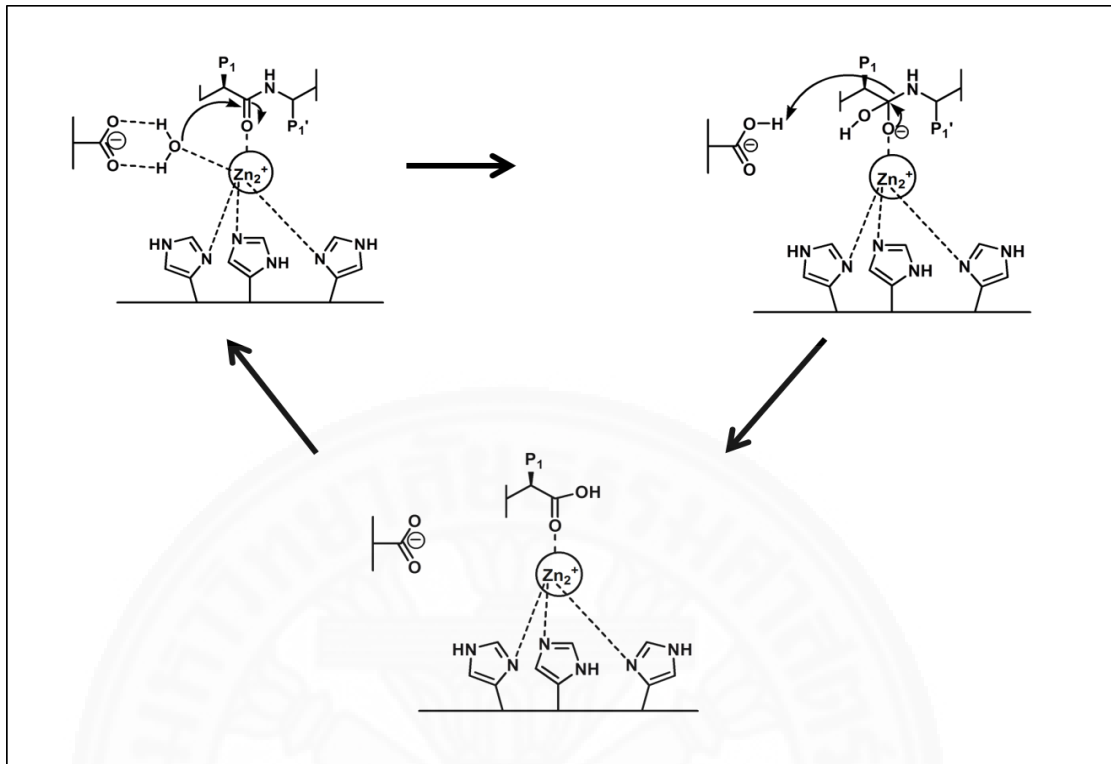
ภาพที่ 2.4 : กลไกการทำงานของเอนไซม์ cysteine protease โดยกลไกจะเริ่มต้นจาก นิวคลีโอไฟล์ของ cysteine และเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเอนไซม์ก็จะอยู่ในรูปของ active form

3. แอสปาติกโปรติเอส (aspartic protease) มีหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนแอสปาร์ติกอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เอนไซม์มีพีเอช (pH) ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 2.0 ถึง 4.0 กลไกเริ่มจากออกซิเจนบนแอสปาติกดึงไฮโดรเจนจากโมเลกุลของน้ำ จากนั้นออกซิเจนในโมเลกุลของน้ำ เข้า attack ที่คาร์บอนที่ตำแหน่งคาร์บอนิล ทำให้พันธะระหว่างคาร์บอนกับ ออกซิเจนแตกออกหนึ่งพันธะ แล้วดึงไฮโดรเจนจากโมเลกุลของแอสปาติกอีกตัว เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เรนิน และเปปซิน



ภาพที่ 2.5 : กลไกการทำงานของเอนไซม์แอสปาติกโปรตีเอส โดยกลไกจะเริ่มต้นจากแอสปาติกโปรตีเอส และจะต้องมีโมเลกุลที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ 2 โมเลกุลที่ใช้ในปฏิกิริยา

4. เมททัลโลโปรตีเอส (metalloprotease) ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาพบกรดอะมิโนกลูตามิกและอะตอมโลหะ (metal atom) ซึ่งไอออนของโลหะจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือนิวทรัลโปรตีเอส (neutral proteinase) เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของสังกะสี (Zn) อยู่ที่บริเวณเร่ง จะทำงานได้ดีที่พีเอช (pH) เป็นกลาง ตัวอย่างของนิวทรัลโปรตีเอสที่สำคัญ ได้แก่ เทอร์โมไลซิน (thermolysin) ที่ผลิตจากบาซิลลัส (bacillus) และ เป็นเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นส่วนประกอบที่บริเวณเร่ง ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช (pH) 7.0 ถึง 9.0 โดยอะตอมโลหะจะโคออร์ดิเนตอยู่กับกรดอะมิโนและน้ำ จากนั้นออกซิเจนในโมเลกุลของน้ำ เข้า attack ที่คาร์บอนตำแหน่งคาร์บอนิล ประจุลบ shift ไปอยู่ที่ออกซิเจน จากนั้นขั้นตอนต่อมาประจุลบ shift กลับมาทำให้สายเพปไทด์แตกออก และเอนไซม์กลับสู่ active form เช่นเดิม ตัวอย่างเช่น คาร์บอกซิเปปติเดส (carboxypeptidase)



ภาพที่ 2.6 : กลไกการทำงานของเอนไซม์ metalloprotease โดยกลไกการทำงานจะมีอะตอมของโลหะเข้ามาเกี่ยวข้อง

ในกลุ่มของซีรีนโปรติเอสก็จะประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิด เช่น อีลาสเทส (elastase) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ทริปซิน (trypsin) และทริปเทส (tryptase) เมื่อเกิดการ ทำงานที่ผิดปกติ เอนไซม์เหล่านี้ก็สามารถก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกาย คือสามารถก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น โรคตับอ่อนอักเสบ โรคมะเร็ง และโรคหอบหืด เป็นต้น

ทริปซิน (trypsin) เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน อยู่ในกลุ่มของซีรีนโปรติเอสและเป็นเอ็นโดเพพติเดส (endopeptidase) ซึ่งถูกสร้างมาจากตับอ่อน บริเวณเร่งปฏิกิริยาจะประกอบด้วยกรดอะมิโนซีรีน 195 (Ser195), ฮีสทิดีน 57 (His57) และแอสพาติก102 (Asp102) และที่บริเวณ S1 pocket จะมีแอสพาเตต189 (aspartate 189) ซึ่งมีประจุลบมีความจำเพาะกับกรดอะมิโนอาร์จินีนและกรดอะมิโนไลซีนซึ่งมีประจุบวก [14]



## 2.3 ตัวยับยั้ง (inhibitor)

ตัวยับยั้ง (inhibitor) หมายถึง สารซึ่งทำให้เอนไซม์ทำงานได้ช้าลง หรือสามารถหยุดการทำงานได้ แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

2.3.1 การยับยั้งแบบทวนกลับได้ (reversible inhibitor) เป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์หรือกับเอนไซม์-ซับสเตรตคอมเพล็กซ์ และเกิดปฏิกิริยาทวนกลับได้เช่นเดียวกันกับการจับของซับสเตรตกับเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 2 แบบ

1. การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) เกิดจากการที่ตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์ได้เช่นเดียวกันกับซับสเตรต เพราะตัวยับยั้งนั้นมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับซับสเตรต จึงแย่งจับกับเอนไซม์ ดังนั้นตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์กลายเป็น EI ซึ่งไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ ขณะที่ซับสเตรตจับกับเอนไซม์แล้วได้ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น การยับยั้งแบบแข่งขันนี้ ทั้งซับสเตรตและตัวยับยั้งจะแข่งขันกันจับกับเอนไซม์ ดังนั้นถ้ามีตัวยับยั้งมากปฏิกิริยาดำเนินไปได้ช้าเพราะซับสเตรตไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ แต่ถ้ามีซับสเตรตมากกว่าตัวยับยั้ง จะไม่ก่อให้เกิดผลใด ๆ ต่อปฏิกิริยาได้ เนื่องจากไม่มีเอนไซม์อิสระให้ตัวยับยั้งจับได้ ฉะนั้นการแก้ไขตัวยับยั้งแบบแข่งขันทำได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรต (S) มากๆ จะทำให้ปฏิกิริยาไม่ถูกยับยั้ง

2. ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) ตัวยับยั้งจะเข้าจับกับเอนไซม์บริเวณอื่นที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง โดยตัวยับยั้งจะเข้าจับกับเอนไซม์อิสระ (E) หรือเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-ซับสเตรต (ES) ก็ได้ และเมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-ซับสเตรต-ตัวยับยั้ง (ESI) แล้ว จะไม่เกิดผลิตภัณฑ์ขึ้น การที่มีเอนไซม์ (E) มากๆ ก็ไม่สามารถลดผลของการยับยั้งนี้ได้

3. ตัวยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibitor) ตัวยับยั้งแบบนี้จะเข้าจับกับสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-ซับสเตรต (ES) เท่านั้น ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-ซับสเตรต-ตัวยับยั้ง (ESI) แล้วไม่เปลี่ยนแปลงต่อไปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ แต่เมื่อมีซับสเตรต (S) มากๆ ก็ไม่สามารถลดผลของการยับยั้งนี้ได้

2.3.2 การยับยั้งอย่างถาวร (irreversible inhibition) เกิดจากตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ซึ่งมีความอยู่ตัวมากไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาทวนกลับได้หรือเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้

## 2.4 ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส (Protease Inhibitor)

อินฮิบิเตอร์เป็นสารยับยั้งที่มีความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ตัวยับยั้งจะแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ ตัวยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible inhibitor) และ ตัวยับยั้งแบบผันกลับได้ (reversible inhibitor) ตัวยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ จับกับเอนไซม์ด้วยพันธะที่มีความแข็งแรง เช่น พันธะโควาเลนต์ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่คงตัว เอนไซม์จึงสามารถเร่งปฏิกิริยาต่อไปได้ และไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีก สำหรับตัวยับยั้งแบบผันกลับได้มีอยู่ 3 ชนิด คือ ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) ตัวยับยั้งแบบนี้จะมีโครงสร้างเกือบเหมือนหรือคล้ายโครงสร้างของสารตั้งต้น จึงสามารถเข้าจับกับบริเวณเร่ง (active site) บนเอนไซม์ได้ สำหรับตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) ตัวยับยั้งเข้าจับที่ที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง โดยเข้าจับได้ทั้งกับสารเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น หรือเอนไซม์อิสระ ตัวยับยั้งชนิดนี้ไม่รบกวนการจับของสารตั้งต้นที่บริเวณเร่ง แต่จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ จึงเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้น้อยลง หรือเปลี่ยนไม่ได้เลย และตัวยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibitor) ตัวยับยั้งเข้าจับเฉพาะกับสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น แต่ไม่จับกับเอนไซม์อิสระ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์ทำให้เอนไซม์เสียโครงสร้างไป ความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์จึงลดลง หรือไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้

ในธรรมชาติสิ่งมีชีวิตชนิดสามารถสร้างสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เพื่อป้องกันการถูกทำลายด้วยแมลงและจุลินทรีย์ อาทิ ในใบและลำต้นมะเขือเทศและมันฝรั่ง จะมีสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส ตัวอย่างของสารยับยั้งเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส ในพืชตระกูลถั่วและธัญพืชจะมียับยั้งสารเอนไซม์ทริปซิน เช่น ถั่วเหลืองดิบมีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน 2 ชนิด ชนิดแรกคือ Kunitz inhibitor เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 21,000 ดาลตัน มีความเฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์ทริปซิน โดยรวมตัวกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในอัตราส่วน 1: 1 ตัวอย่างตัวยับยั้งในกลุ่มของ Kunitz inhibitor อาทิ soybean Kunitz trypsin inhibitor ซึ่งพบในถั่วเหลือง barley subtilisin inhibitor พบในข้าวบาร์เลย์ winged-bean chymotrypsin inhibitor พบได้ในถั่วพูเป็นต้น ชนิดที่สองคือ Bowman-Birk inhibitor เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8,300 ดาลตัน ยับยั้งได้ทั้งเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน โดยรวมตัวกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในอัตราส่วน 1 : 1 ตัวอย่างของ Bowman-Birk inhibitor อาทิ Bowman-Birk plant trypsin inhibitor unit 1 พบในถั่วเหลือง Bowman-Birk trypsin/chymotrypsin inhibitor พบในถั่วลิสง และ sunflower cyclic trypsin inhibitor พบในทานตะวันเป็นต้น

ถั่วเกือบทุกชนิดมีสารยับยั้งเป็น Bowman-Birk inhibitor ส่วน Kunitz inhibitor มีพันธะไดซัลไฟด์ 2 อัน จึงสามารถทนความร้อนได้น้อยกว่า Bowman-Birk inhibitor เนื่องจากมีพันธะไดซัลไฟด์ 7 อัน สำหรับ Bowman-Birk inhibitor ต้องใช้ความร้อนนาน 1 ชั่วโมง จึงจะทำลายได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นการต้มถั่วให้สุกจะทำให้ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทรिพซินในถั่วลดลง หรืออาจใช้สารรีดิวซิงเอเจนต์ เช่น ซิสทีอีน

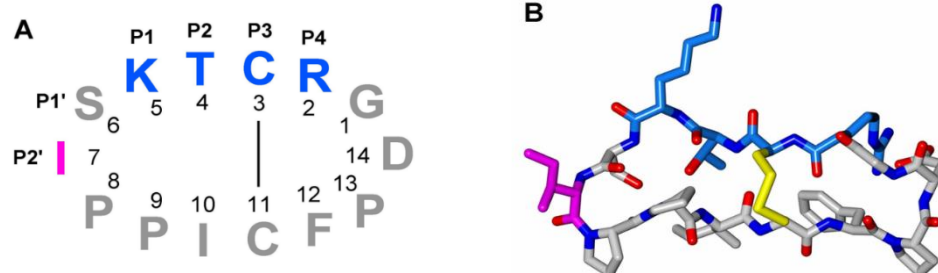
Bowman-Birk inhibitor (BBIs) เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ซีรีนโปรติเอสที่พบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดย BBIs ที่พบในพืชใบเลี้ยงคู่จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8,000 ดาลตัน และมีส่วนที่เกิดปฏิกิริยา (reactive site) 2 ตำแหน่ง ในขณะที่ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะพบ BBIs อยู่ 2 กลุ่มคือกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8,000 ดาลตัน และมีส่วนที่เกิดปฏิกิริยา (reactive site) 1 ตำแหน่ง และกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16,000 ดาลตัน และมีส่วนที่เกิดปฏิกิริยา (reactive site) 2 ตำแหน่ง [15] โดย BBIs ที่มีขนาดเล็กที่สุดที่สามารถพบในธรรมชาติ คือ SFTI-1 (sunflower trypsin inhibitor) แสดงดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 : โครงสร้างของ sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1) ซึ่งพบในเมล็ดทานตะวัน

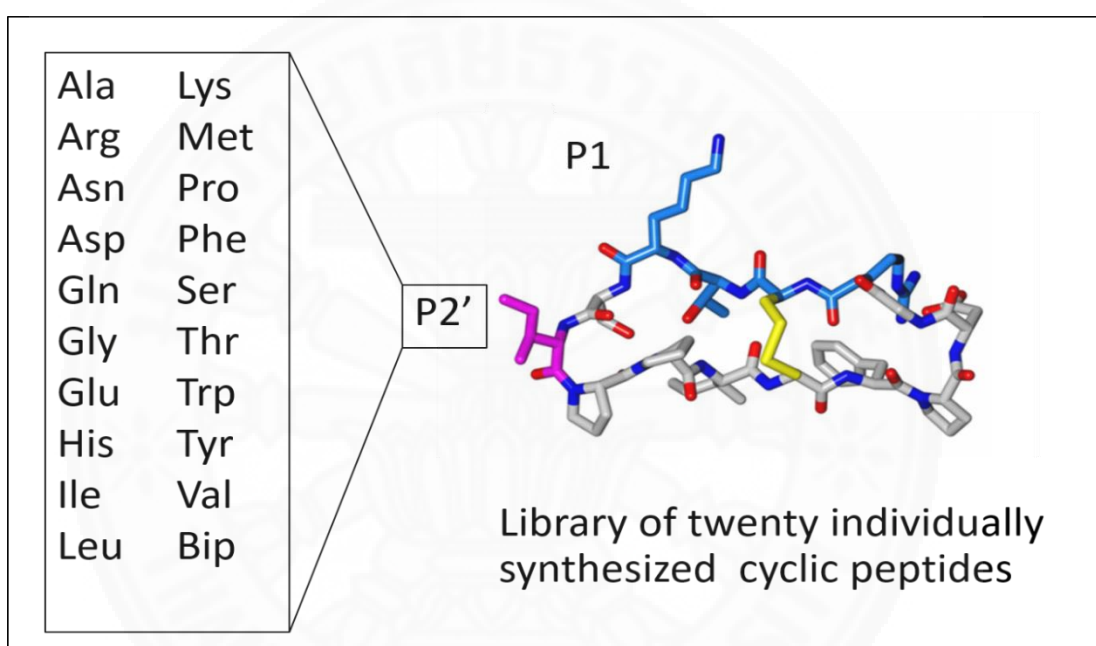
## 2.5 sunflower trypsin inhibitor

SFTI-1 (sunflower trypsin inhibitor) ซึ่งสามารถพบสารชนิดนี้ในเมล็ดทานตะวัน โดยที่ลักษณะสำคัญของ SFTI-1 คือประกอบด้วยกรดอะมิโน 14 ตัวต่อกัน ส่วนที่เกิดปฏิกิริยา P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' อยู่ที่ตำแหน่งไลซีนตำแหน่งที่ 5 ต่อกับซีรีนซึ่งเป็นตำแหน่งที่ 6 (Lys<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>) และมีพันธะไดซัลไฟด์อยู่ภายในโมเลกุล (disulfide bond) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนซิสทีอีนตำแหน่งที่ 3 กับซิสทีอีนที่ตำแหน่งที่ 11 ซึ่งทำหน้าที่เป็นแกนของวง แสดงดังภาพที่ 2.8 และยังมีพันธะไฮโดรเจนบอนด์จำนวนมากอยู่ภายในโครงสร้างทำให้โครงสร้างไม่ยืดหยุ่น (rigid) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดี การที่ภายในโมเลกุลมีพันธะไดซัลไฟด์เป็นแกนกลางของโครงสร้าง โครงสร้างจึงถูกแบ่งออกเป็นสองวงคือ วงที่เข้าจับกับเอนไซม์ (binding loop) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ตัวดังนี้ ทรีโอ닌 ไลซีน ซีรีน ไอโซลิวซีน โพรรีน โพรรีน และไอโซลิวซีน (Thr<sup>4</sup>-Lys<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Ile<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Ile<sup>10</sup>) และมีส่วนที่เกิดปฏิกิริยา ส่วนที่เกิดปฏิกิริยา P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' อยู่ที่ตำแหน่งไลซีนตำแหน่งที่ 5 ต่อกับซีรีนซึ่งเป็นตำแหน่งที่ 6 (Lys<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>) ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สำหรับในส่วนของวงที่สองเป็นเปปไทด์ที่เกิดจากปลายเอ็น (N-terminal) ของกรดอะมิโนสองตัวคือ ไกลซีนตำแหน่งที่ 1 และอาร์จินีนตำแหน่งที่ 2 (Gly<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>) เชื่อมต่อบิดวงแบบหัวต่อหาง (head-to-tail cyclization) กับปลายซี (C-terminal) ของกรดอะมิโนสามตัวคือ ฟีนิลอะลานีนตำแหน่งที่ 12 ต่อกับโพรลีนตำแหน่งที่ 13 และแอสพาทิกตำแหน่งที่ 14 (Phe<sup>12</sup>-Pro<sup>13</sup>-Asp<sup>14</sup>) ซึ่งส่วนนี้ไม่ได้เกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์โปรติเอส แต่จะช่วยให้โครงสร้างทั้งหมดมีความเสถียร [16] ด้วยลักษณะพิเศษทางโครงสร้างของ SFTI-1 นี้จึงส่งผลให้ SFTI-1 มีคุณสมบัติที่เสถียรอย่างมาก ต่อสภาวะที่อุณหภูมิสูงหรือสภาวะที่อยู่ภายใต้เอนไซม์ชนิดต่างๆ อันเป็นลักษณะที่สำคัญที่ไม่สามารถพบได้ใน linear peptide chain ทั่วไป เนื่องจาก SFTI-1 เป็นตัวยับยั้งที่มีขนาดเล็กและมีความทนทานสูง จึงเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ที่น่าสนใจในการนำไปเป็นแม่แบบในออกแบบและพัฒนาการสังเคราะห์ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสเพื่อใช้ในการรักษาโรค และตัวอย่างงานวิจัยที่ทำการสังเคราะห์ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสโดยมี sunflower trypsin inhibitor-1 เป็นแม่แบบมีดังนี้



ภาพที่ 2.8 ภาพ A แสดงลำดับกรดอะมิโนและตำแหน่ง P<sub>2</sub>' โครงสร้างของ sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1) ภาพ B แสดงโครงสร้างของ sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1)

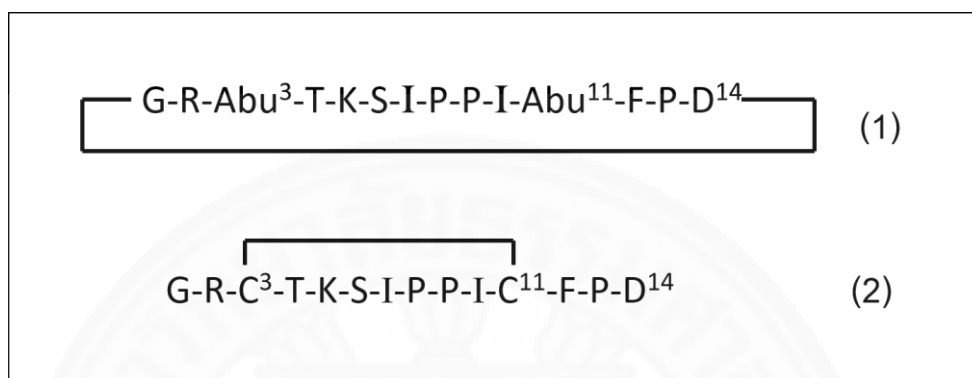
งานวิจัยของ Simon J. de Veer และคณะ [17] ได้ทำการสังเคราะห์ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส เพื่อปรับปรุงความจำเพาะของตัวยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์โปรติเอส โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของตัวยับยั้งที่ตำแหน่ง P2' โดยใช้ sunflower trypsin inhibitor-1 เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ แสดงดังภาพที่ 2.9 โดย Simon J. de Veer ได้กล่าวว่า sunflower trypsin inhibitor-1 มีโครงสร้างที่ค่อนข้างง่าย ประกอบด้วยวงซึ่งมีขนาดเล็ก ดังนั้นจึงเป็นแบบจำลองที่ดีเยี่ยมที่เหมาะสมสำหรับเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ตัวยับยั้งที่หลากหลายเพื่อใช้ในการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ



ภาพที่ 2.9 แสดงกรดอะมิโนที่ถูกแทนที่ในตำแหน่ง P2' โครงสร้างของ sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1)

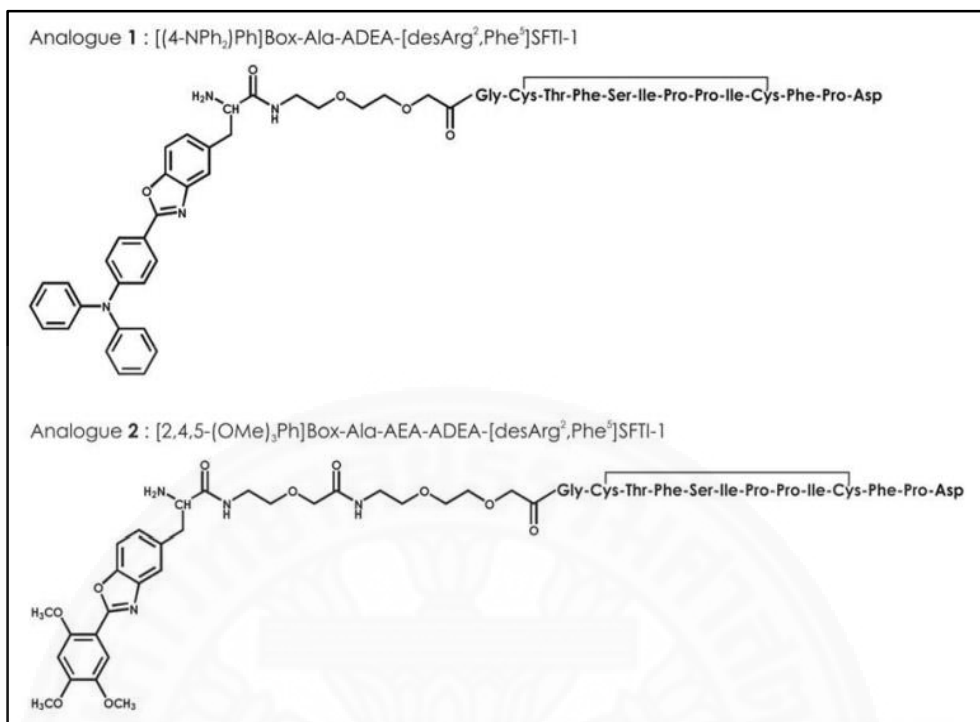
Ewa Zabtota และคณะ [18] ได้ทำการสังเคราะห์ตัวยับยั้งเอนไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) โดยมี sunflower trypsin inhibitor-1 เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ Ewa Zabtota ได้ให้เหตุผลว่า sunflower trypsin inhibitor-1 เป็นตัวยับยั้งที่มีขนาดเล็กและ strong activity จึงเหมาะที่จะเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ตัวยับยั้งใหม่ๆ ที่มีความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส โดยสังเคราะห์ตัวยับยั้ง 2 แบบด้วยกัน แบบที่ 1 ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ในโครงสร้างสังเคราะห์โดยใช้ aminobutyric acid แทนที่ตำแหน่งซิสทีอีนทั้งสองตำแหน่ง แสดงดังภาพ

ที่ 2.10 พบว่าความสามารถในการยับยั้งลดลงไป 3 เท่า และแบบที่ 2 มีพันธะไดซัลไฟด์แต่ไม่สังเคราะห์ปิวเวอพบว่ามีสามารถในการยับยั้งใกล้เคียงกันกับตัวยับยั้งต้นแบบ โดยดูจากค่า association equilibrium constants ( $K_a$ ).



ภาพที่ 2.10 แสดงตัวยับยั้งของ Ewa Zabtota

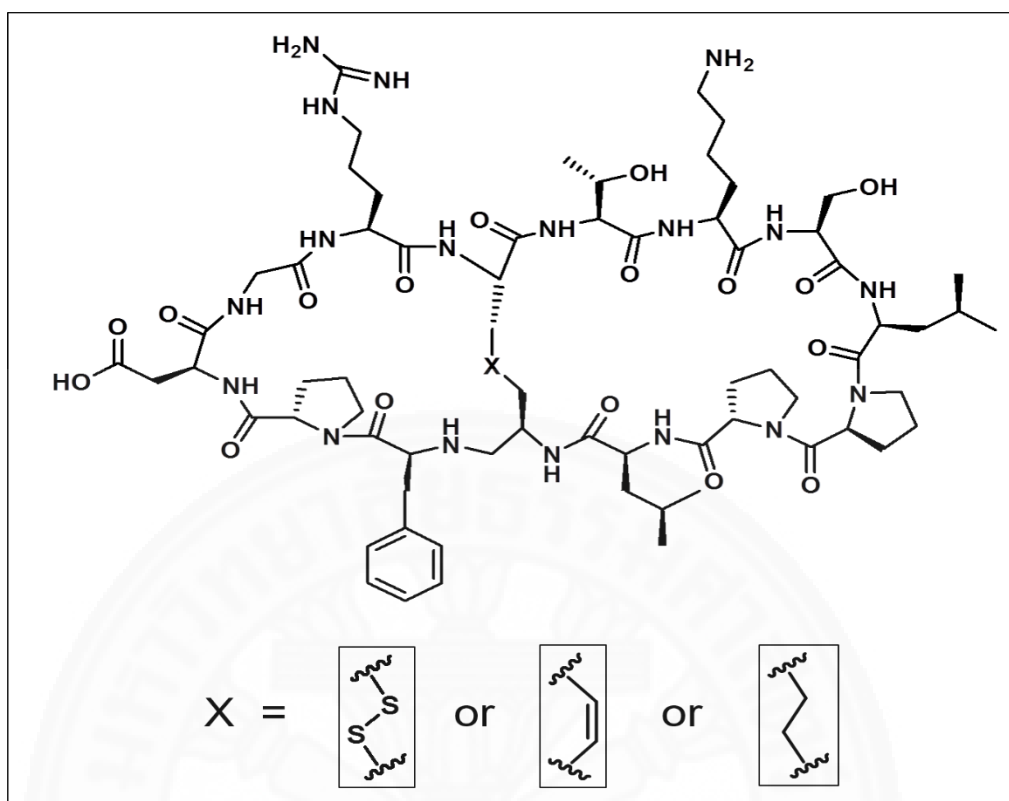
Adam Lesner และคณะ [19] สังเคราะห์ตัวยับยั้งโดยการเติมหมู่ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) เข้าไปยังตำแหน่งของปลายเอ็น (N-terminal) ของ sunflower trypsin inhibitor-1 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซิน โดยใช้อนุพันธ์ของ benzoxazole (3 - [2 - (4 - diphenylaminophenyl) benzoxazol-5 - yl] - L- alanine- [(4NPh<sub>2</sub>)Ph]Box-Ala และ 3-[2-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)benzoxazol-5-yl]-l-alanine- [2,4,5-(OMe)<sub>3</sub>Ph]BoxAla) เป็นหมู่ฟลูออเรสเซนต์ แสดงดังภาพที่ 2.11 และทดสอบการผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเซลล์มะเร็ง พบว่าตัวยับยั้งที่สังเคราะห์มีความสเถียรต่อการย่อยสลายและสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ แต่ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่าต่ำกว่า sunflower trypsin inhibitor-1



ภาพที่ 2.11 แสดงตัวยับยั้งของ Adam Lesner

Sheng Jiang และคณะ [20] ได้สังเคราะห์ตัวยับยั้งเอนไซม์มาทริปเทส (matriptase) ที่มีลักษณะเหมือนกับ sunflower trypsin inhibitor-1 โดยเปลี่ยนพันธะไดซัลไฟด์เป็นโอลิฟิน (olefin bridge) และเอทิลีน (ethylene bridge) เพื่อเพิ่มความเสถียรต่อปฏิกิริยารีดักชันแสดงดังภาพที่ 2.12 และพบว่าตัวยับยั้งทั้งสองแบบมีความเสถียรต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic stability) แต่ตัวยับยั้งที่เป็นเอทิลีนมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์มาทริปเทสใกล้เคียงกับตัวต้นแบบ แต่ตัวยับยั้งเป็นโอลิฟินมีความสามารถในการยับยั้งลดลงถึง 25 เท่าของตัวยับยั้งต้นแบบ





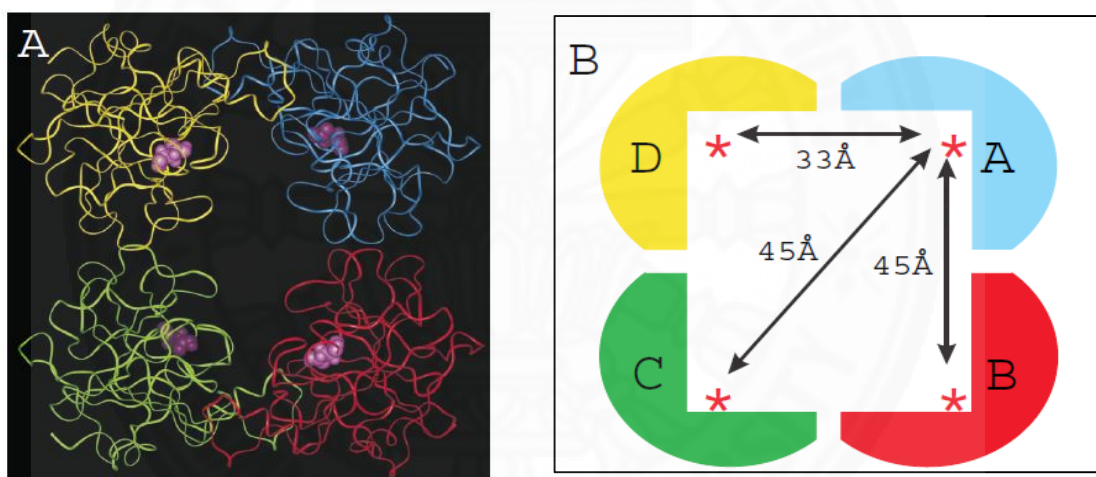
ภาพที่ 2.12 : แสดงตัวยับยั้งของ Sheng Jiang

## 2.6 Bivalent inhibitor

ในปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาโรคต่างๆ มีการพัฒนาเพิ่มมากขึ้น โดยมีการพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมมากขึ้น ส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยที่สุด การพัฒนาการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มความสามารถของตัวยับยั้งก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพ การสังเคราะห์ตัวยับยั้งที่มีลักษณะเป็น bivalent จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของตัวยับยั้งได้คือ ตัวยับยั้งหนึ่งตัวสามารถจับกับเอนไซม์ได้สองตัว หรือจับกับเอนไซม์ที่มีบริเวณเร่งปฏิกิริยาหลายตำแหน่งได้ถึงสองตำแหน่ง ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทร립เทส (human beta-tryptase) มีบริเวณเร่งทั้งหมด 4 ตำแหน่ง แสดงดังภาพที่ 2.13 โดยเอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทร립เทส เป็นซีรีนโปรติเอสซึ่งทำหน้าที่สลายพันธะเปปไทด์ (hydrolyzed peptide) ที่ปลายซี (C-terminal) ของกรดอะมิโนอาร์จินีนและกรดอะมิโนไลซีน [21-22]



ทรูปเทสเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคภูมิแพ้ เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และการเกิดโรคหอบหืด ก่อให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในระบบทางเดินหายใจ ดังนั้น เอนไซม์ทรูปเทสจึงเป็นเอนไซม์เป้าหมายที่มีความน่าสนใจ [23] จากโครงสร้างเอ็กซ์เรย์ของเอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทรูปเทส [24] แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยทั้งหมด 4 หน่วย เอ บี ซี และดี (A B C D) ซึ่งมีส่วนที่เกิดปฏิกิริยาในแต่ละหน่วย การจับกันของหน่วยย่อยทั้ง 4 หน่วยทำให้เกิดช่องตรงกลางขึ้น ตำแหน่งจับเอส 1 (S1 binding pockets) ซึ่งมีประจุลบ ของแต่ละหน่วยจะมีระยะห่างดังนี้ ระยะห่างระหว่างเอถึงบี (AB) ดีถึงซี (DC) และเอถึงซี (AC) มีค่าเท่ากับ 45 อังสตรอม ( $45\text{\AA}$ ) และระยะห่างระหว่าง เอถึงดี (AD) และบีถึงซี (BC) มีค่าเท่ากับ 33 อังสตรอม ( $33\text{\AA}$ ) ดังที่แสดงในรูป 2.12 ซึ่งจะใช้ในการออกแบบโครงสร้างของตัวยับยั้งแบบไบวาเลนต์ (bivalent inhibitor) ให้มีความเหมาะสมที่จะเกิดปฏิกิริยาได้



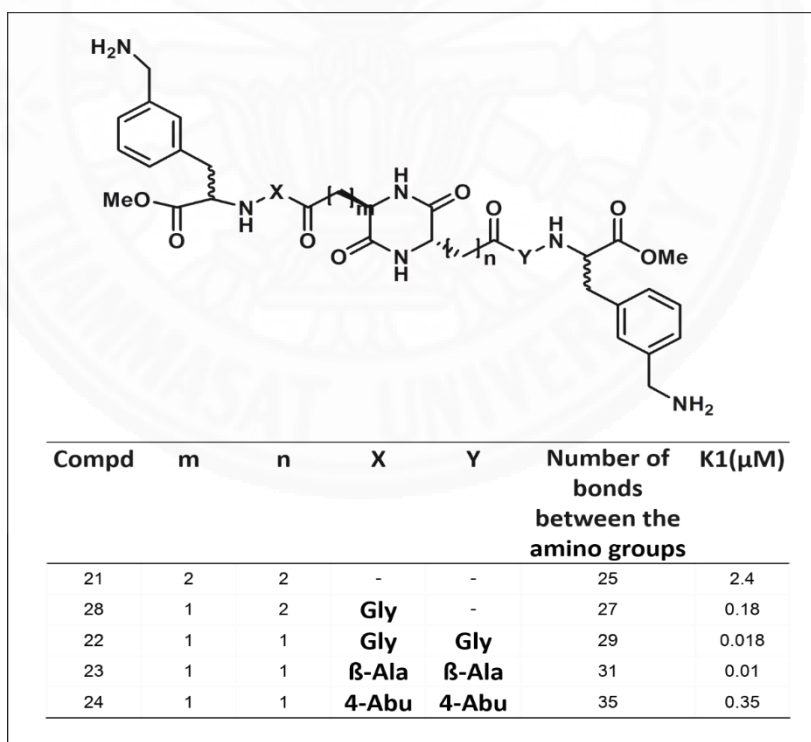
ภาพที่ 2.13 (A) การแสดงโครงสร้างริบบอน (ribbon model) ของฮิวแมนเบต้าทรูปเทส ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยของเอนไซม์ทรูปเทส คือ A B C และ D แสดงตามสีน้ำเงิน แดง เขียว และเหลืองตามลำดับ (B) การแสดงแผนผังของหน่วยย่อยทั้ง 4 หน่วยของเอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทรูปเทส โดยแสดงระยะห่างระหว่างกรดอะมิโนแอสพาเตต ตำแหน่ง 189 (Asp 189) ซึ่งอยู่ภายในตำแหน่งจับเอส 1 (S1 pockets) ของแต่ละหน่วยซึ่งมีสัญลักษณ์เป็นดอกจันสีแดง

เมื่อเปรียบเทียบกับตัวยับยั้งที่สามารถจับกับเอนไซม์ได้เพียงตำแหน่งเดียว (monovalent binding) ตัวยับยั้งที่สามารถจับได้สองตำแหน่ง (bivalent binding) มีข้อดีกว่า คือ ความสามารถในการจับ (affinity) และความสามารถในการเลือกจับ (selectivity) โดยดูจากผลของ

เอนโทรปี (entropy effect) การสังเคราะห์ด้วยยั้งที่สามารถจับกับบริเวณเร่งได้ถึง 2 ตำแหน่งจึงเป็นที่น่าสนใจ ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการศึกษาและสังเคราะห์ด้วยยั้งมีดังนี้

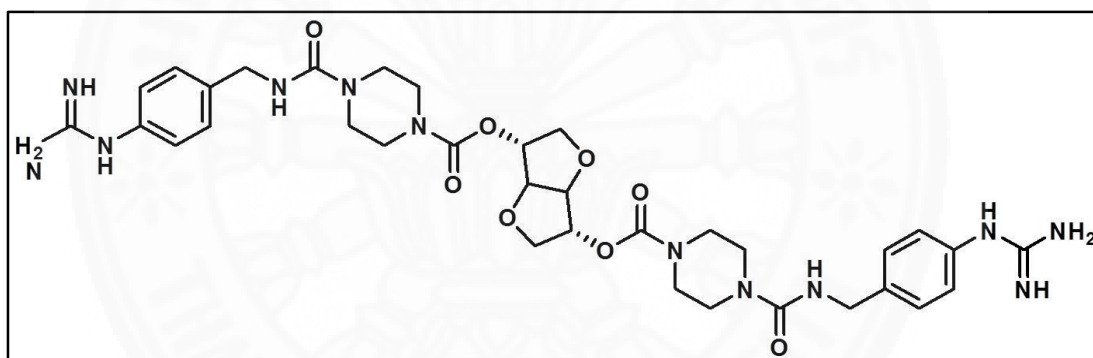
Norbert Schaschke และคณะ ได้สังเคราะห์ด้วยยั้งที่สามารถจับกับเอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทริปเทส (human beta-tryptase) ได้สองตำแหน่งโดยใช้ไซโคลเดกซ์ทริน (cyclodextrin) เป็นแกนโครงสร้างและใช้อะมิโนเมทิลเบนซีน (3-(aminomethyl)benzene) เป็นส่วนที่เข้าจับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับด้วยยั้งที่ใช้อะมิโนเมทิลเบนซีนซัลโฟนิลไกลซีน (3-(aminomethyl)benzenesulfonyl-glycine) เป็นส่วนที่เข้าจับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยา และพบว่าด้วยยั้งที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถจับกับเอนไซม์ได้

นอกจากนี้ Norbert Schaschke และคณะ ยังได้ทำการทดลองเพิ่มเติม โดยใช้ไดคีโตพีเพอราซีน (diketopiperazines) เป็นแกนและใช้อะมิโนเมทิลฟีนิลอะลานีน (m-aminomethyl-phenylalanine) เป็นส่วนที่เข้าจับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยา แสดงดังภาพที่ 2.14 โดยในการทดลองได้ทำการปรับระยะห่าง (distance scan) ของหมู่ที่เข้าทำปฏิกิริยาทั้งสองฝั่ง เพื่อหาระยะห่างที่เหมาะสมที่จะทำให้ด้วยยั้งมีความสามารถในการจับ (affinity) ที่เพิ่มขึ้น [21]



ภาพที่ 2.14 แสดงด้วยยั้งเอนไซม์ฮิวแมนเบต้าทริปเทส ที่ Norbert Schaschke และคณะสังเคราะห์ขึ้น

Trevor Selwood และคณะ สังเคราะห์ตัวยับยั้งที่มีชื่อว่า CRA-2059 โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.15 ซึ่งปลายสองข้างคือ ฟีนิลกวานิดิเนียม (phenylguanadinium group) ซึ่งมีประจุบวกจะทำหน้าที่จับกับตำแหน่งจับเอส 1 (S1 pockets) ซึ่งมีประจุลบ ความยาวระหว่างปลายทั้งสองของตัวยับยั้ง CRA-2059 มีความยาวเท่ากับ 33 อังสตรอม (33Å) ซึ่งมีความยาวเท่ากับระยะห่างระหว่างตำแหน่งจับเอส 1 (S1 pockets) ของเอดิงตี (AD) และบีถึงซี (BC) ในเอนไซม์ฮิวเมนเบต้าทริปเทส ดังนั้นจึงเป็นความยาวที่เหมาะสมที่จะเกิดปฏิกิริยาได้ และผลปรากฏว่าตัวยับยั้งที่ Trevor Selwood และคณะ ได้ทำการสังเคราะห์ขึ้นนี้มีความสามารถในการจับ (affinity) และมีความจำเพาะ (specificity) ต่อโมเลกุลของเอนไซม์ฮิวเมนเบต้าทริปเทสเพิ่มมากขึ้น มีค่าสมมูลการแยกเท่ากับ 620 พิโกโมลา ( $K_i = 620 \text{ pM}$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับฟีนิลกวานิดิเนียม (phenylguanadinium group) ที่เป็นมอนอเมอร์มีค่าสมมูลการแยกเท่ากับ 63 ไมโครโมลา ( $K_i = 63 \text{ }\mu\text{M}$ ) [25]



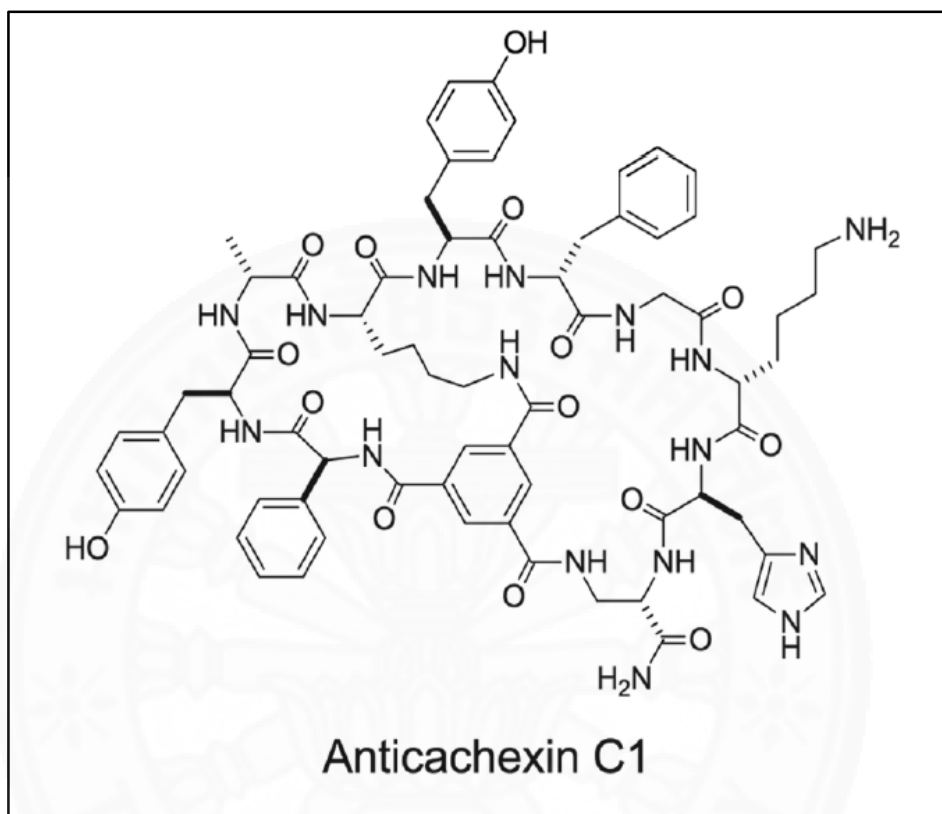
ภาพที่ 2.15 แสดงโครงสร้างของตัวยับยั้ง CRA-2059

## 2.7 Bivalent peptide inhibitor

การใช้เปปไทด์หรือโปรตีนมาสังเคราะห์เป็นตัวยับยั้งเพื่อใช้ในการรักษาโรคเป็นที่นิยม เนื่องจากมีความสามารถในการเลือกจับสูง มีความจำเพาะ ช่วยลดผลกระทบอื่นที่ไม่ต้องการและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีงานวิจัยมากมายที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับ bivalent peptide inhibitor ตัวอย่างเช่น

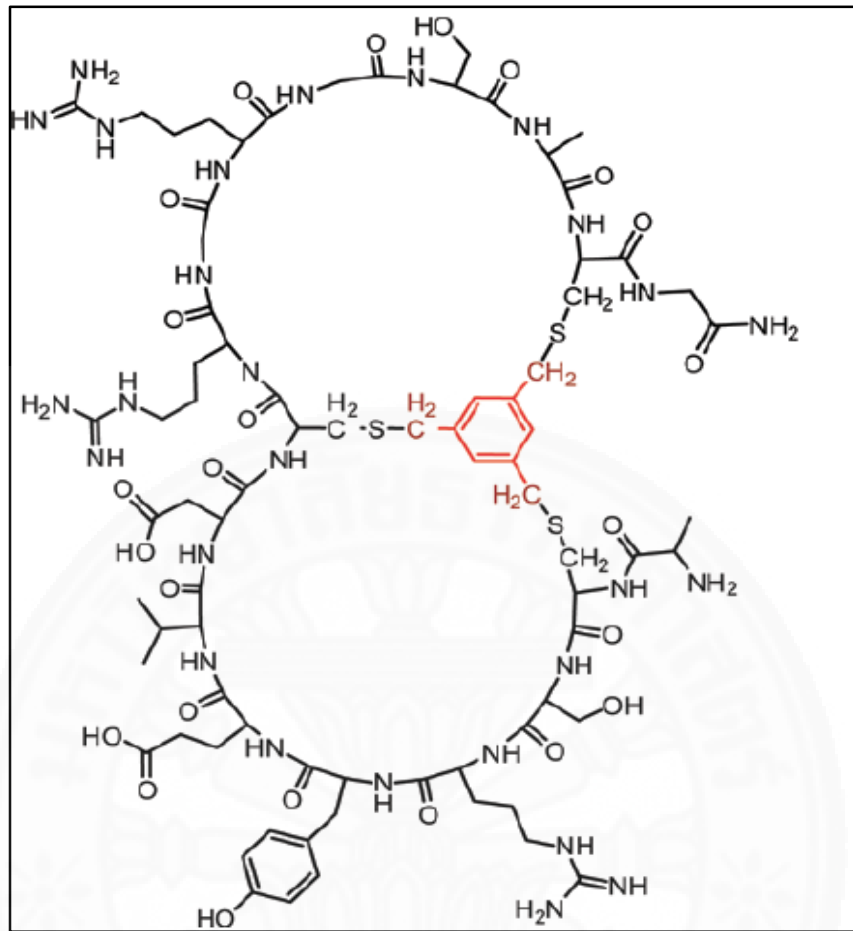
Wenlong Lian และคณะ ได้ทำการสังเคราะห์ bicyclic peptide inhibitor เพื่อใช้ยับยั้งการทำงานของ  $\text{TNF}\alpha$ - $\text{TNF}\alpha$  receptor พบว่าตัวยับยั้งมีความสามารถในการจับ (affinity)

และมีความจำเพาะ (specificity) สูงขึ้น และมีความสามารถในการยับยั้งในระดับไมโครโมลาร์ มีค่า  $IC_{50} = 3.1 \pm 0.3 \mu M$  [26]



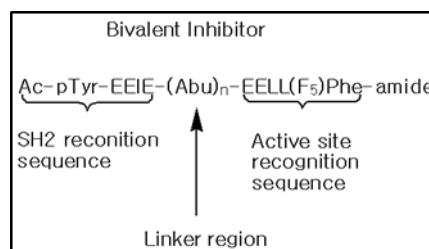
ภาพที่ 2.16 แสดงโครงสร้างของ Wenlong Lian

Alessandro Angelini และคณะ สังเคราะห์ bicyclic peptide inhibitor เพื่อใช้ในการยับยั้ง urokinase-type plasminogen activator (uPA) และพบว่าตัวยับยั้งที่สังเคราะห์ขึ้นมีความสามารถในการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นมากกว่าแบบที่เป็นมอนอเมอร์ [27]



ภาพที่ 2.17 แสดงโครงสร้างตัวยับยั้งของ Alessandro Angelini

งานวิจัยของ Adam และคณะ [28] สังเคราะห์ bivalent inhibitor ของ protein tyrosine kinases ซึ่งโครงสร้างของ bivalent inhibitor ประกอบไปด้วย SH2 recognition sequence และ active site recognition sequence ทั้งสองส่วนถูกเชื่อมด้วย 2-aminobutyric acid (Abu) และมีการปรับเปลี่ยนจำนวนของ Abu ซึ่งเป็น linker เพิ่มขึ้นทีละ 2 จาก 4 ถึง 12 โดยโครงสร้างแสดงดังภาพ การทดสอบประสิทธิภาพของ inhibitor ทำโดยหาค่า IC<sub>50</sub> โดยมี active site direct control peptide โครงสร้างเป็นดังนี้ Ac-EELL-(F5)Phe-amide จากผลการทดลองพบว่า bivalent inhibitor ทุกตัวมีประสิทธิภาพดีกว่า active site direct control peptide



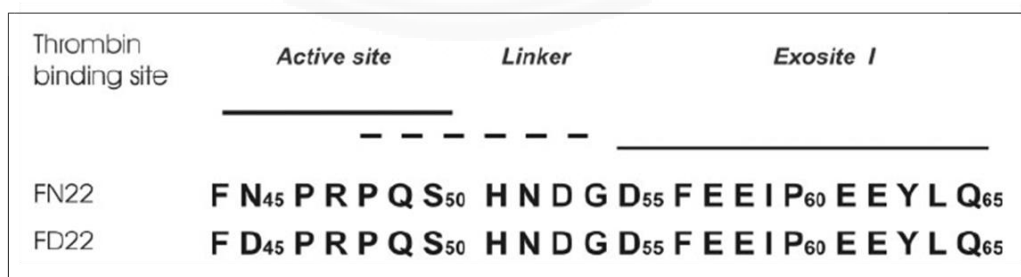
ภาพที่ 2.18 แสดงโครงสร้างตัวยับยั้งของ Adam

งานวิจัยของ Michael D Carrithersl และ Michael R Lerner [29] ได้ออกแบบ bivalent peptide ligands ที่ specific G-protein-coupled receptors โดยสังเคราะห์ ให้ peptide มีลักษณะเป็น dimer ของ  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH dimer) และอนุพันธ์ พบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่า  $\alpha$ -MSH ที่เป็น monomer



ภาพที่ 2.19 แสดงโครงสร้างตัวยับยั้งของ Michael D Carrithersl และ Michael R Lerner

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Zhengding และคณะ [30] ได้ออกแบบตัวยับยั้งที่ ยับยั้งการทำงานของ thrombin โดยออกแบบให้มีลักษณะเป็น bivalent โดยโครงสร้างจะประกอบ ไปด้วยส่วนที่จับกับ active site ส่วน linker และส่วนที่จับกับ exosite โดยมีการปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนบางตัวในส่วนที่จับกับ active site พบว่าbivalent inhibitor ที่สังเคราะห์ขึ้น ทุกตัวมี ประสิทธิภาพสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ inhibitor ที่มีเพียงส่วนที่จับกับ active site หรือ ส่วนจับ กับ exosite เพียงอย่างเดียว โดยใช้ค่า IC<sub>50</sub> ดังนั้นจะเห็นว่าการออกแบบให้ตัวยับยั้งมีลักษณะเป็น bivalent นั้นจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังพบว่าตัวยับยั้งที่เป็นเปปไทด์มีข้อดีหลายอย่าง คือเปปไทด์สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย มีความจำเพาะ และไม่เป็นที่พิษต่อ เซลล์

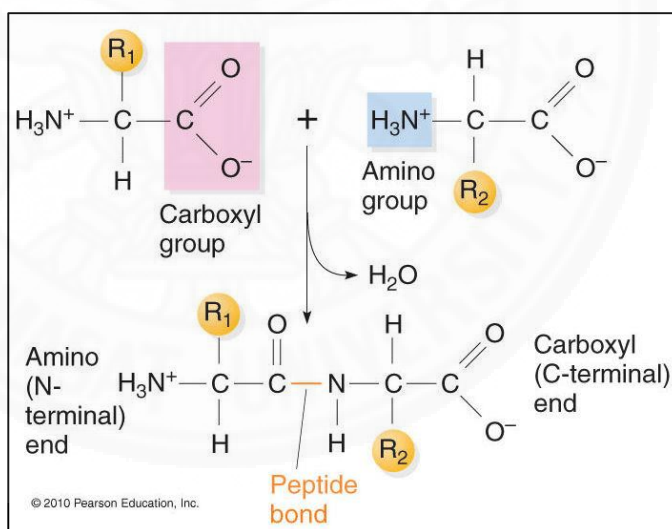


ภาพที่ 2.20 แสดงโครงสร้างตัวยับยั้งของ Zhengding

## 2.8 กรดอะมิโนและโปรตีน

โปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยปกติแล้วโปรตีน แต่ละโมเลกุลประกอบด้วยอะตอมนับพัน โปรตีนประกอบด้วยอะตอมของธาตุหลัก 4 ชนิดด้วยกัน คือ ไฮโดรเจน คาร์บอน ออกซิเจน และไนโตรเจน นอกจากนี้อาจมีกำมะถัน ฟอสฟอรัส เหล็ก ไอโอดีน หรือโคบอลต์ นอกจากนี้โปรตีนจะพบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกายในแต่ละระยะและเป็นส่วนประกอบของอวัยวะต่างๆ และโครงสร้างที่อ่อนนุ่ม สัตว์ต้องการใช้โปรตีนตลอดชีวิต เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ อีกทั้งสัตว์ยังต้องการโปรตีนเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของเลือด เนื้อ เอนไซม์ (enzyme) ภูมิคุ้มกัน (immune) และฮอร์โมน (hormone) และยังสามารถนำไปสร้างผลผลิตเพื่อการสืบพันธุ์ ซึ่งในสัตว์ต่างชนิดกัน โปรตีนจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ทั้งนี้ในเซลล์และเนื้อเยื่อของ

สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว พบว่าโปรตีนจะมีความแตกต่างและมีความหลากหลายมาก เพราะฉะนั้นอาจกล่าวได้ว่า มีโปรตีนอยู่เป็นจำนวนมากที่เราสามารถพบในธรรมชาติได้



ภาพที่ 2.21 แสดงการเกิดพันธะเปปไทด์

(ที่มา: [https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3\\_06-03\\_Figure-Lsmc.jpg](https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-03_Figure-Lsmc.jpg))

โปรตีนมีโครงสร้างพื้นฐานที่เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาวซึ่งต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) แสดงดังภาพที่ 2.18 เรียกสายยาวที่เกิดจากการเชื่อมต่อ



กันของกรดอะมิโนนี้ว่า โพลีเปปไทด์ (polypeptide) กรดอะมิโนจึงเป็นหน่วยพื้นฐานของโปรตีน พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 20 ชนิด โดยที่กรดอะมิโนทุกตัวประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจนและออกซิเจนเป็นหลัก

#### ลักษณะโครงสร้างของโปรตีน

โปรตีนทุกชนิดมีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จะเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเปปไทด์สารโพลีเปปไทด์ที่เกิดขึ้นนี้จะมีการจัดเรียงของกรดอะมิโนอย่างมีระเบียบ และมีลำดับที่แน่นอนสำหรับโปรตีนแต่ละชนิด ทำให้เกิดเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเฉพาะขึ้นเพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่างลักษณะโครงสร้างของโปรตีนแบ่งเป็น 4 ระดับ แสดงดังภาพที่ 2.19

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure)
2. โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure)
3. โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure)
4. โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure)

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) โครงสร้างระดับนี้เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายโพลีเปปไทด์ ด้วยพันธะเปปไทด์ดังได้กล่าวมาแล้ว การนับตำแหน่งของกรดอะมิโนบนสายโพลีเปปไทด์ จะเริ่มนับจากปลายด้านอะมิโน (N-Terminus) ซึ่งเขียนไว้ทางด้านซ้ายมือเป็นตำแหน่งที่หนึ่งและนับกรดอะมิโนตัวต่อ ๆ ไปเรื่อยไปจนถึงปลายด้านคาร์บอกซิล (C-Terminus) จัดเป็นโครงสร้างพื้นฐานของโปรตีนทุกชนิด ความผิดปกติของโปรตีนจะเกิดขึ้นในโครงสร้างระดับนี้คือ เกิดจากการเรียงตัวที่ผิดไปของกรดอะมิโน

2. โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) โครงสร้างระดับนี้เป็นการกำหนดการวางรูปของสายโพลีเปปไทด์ โดยจะมีการสร้างพันธะกัน在线โพลีเปปไทด์เดียวกัน หรือระหว่างต่างเส้นกัน พันธะที่สำคัญในการเกิดโครงสร้างระดับนี้ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ซึ่งเกิดจากการสร้างพันธะระหว่างอะตอม O และ H ของ C=O และ H=N ของสายโพลีเปปไทด์ที่อยู่ใกล้กัน ทำให้สายโพลีเปปไทด์เกิดการขดหรือม้วนตัวเป็นรูปต่าง ๆ ขึ้น นอกจากพันธะไฮโดรเจนแล้วยังอาจมีแรงยึดเหนี่ยวอื่นๆ เช่น แรงวานเดอร์วาล (Van der Waal force) , แรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic reaction) ช่วยให้เกิดโครงสร้างในระดับนี้ขึ้น โครงสร้างทุติยภูมิที่สำคัญได้แก่ เกลียวอัลฟา (  $\alpha$ -helix ) และแผ่นจีบปีตา (  $\beta$ -pleated sheet )

2.1 เกลียวอัลฟา (  $\alpha$  -helix ) โครงสร้างในลักษณะนี้สายโพลีเปปไทด์จะบิดเป็นเกลียว (helix) เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนที่เกิดจากอะตอมออกซิเจน (C=O) ของเปปไทด์หนึ่งสร้างพันธะกับ



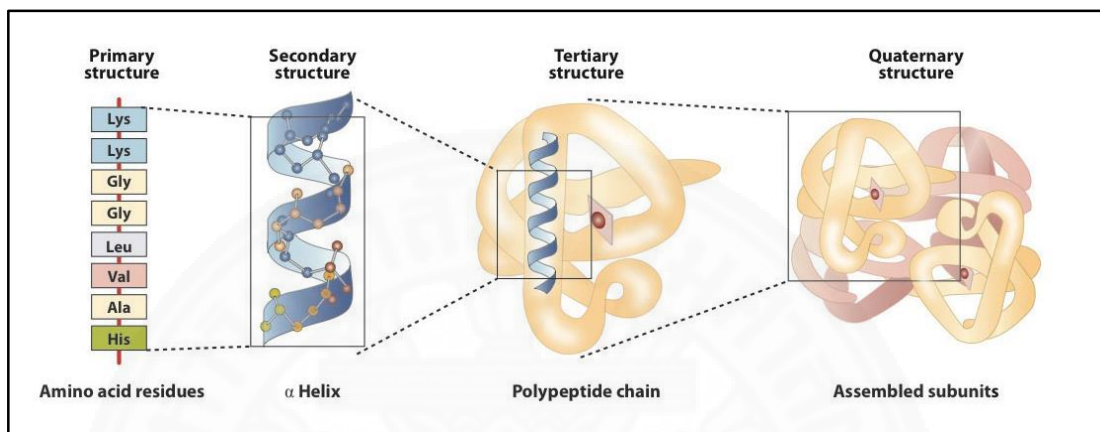
อะตอมไฮโดรเจน (H=N) ของเปปไทด์ที่อยู่ในตำแหน่งไกลออกไปในเส้นโพลีเปปไทด์เดียวกัน ทำให้สายโพลีเปปไทด์บิดเป็นเกลียวขึ้น เกลียวที่อยู่ตัวที่สุดคือเกลียวที่เรียกว่า เกลียวอัลฟา ( $\alpha$ -helix) ในเกลียวชนิดนี้ C=O ของกรดอะมิโนแต่ละตัวจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ H=N O ของกรดอะมิโนที่อยู่ถัดไป 4 ตำแหน่ง สายเปปไทด์จะม้วนตัวเป็นเกลียวเวียนขวา (Right-handed helix) หนึ่งรอบของเกลียวมีกรดอะมิโน 3.6 ตัว และมีระยะระหว่างเกลียวเท่ากับ 5.4 อังสตรอม (5.4 Å) แขนงข้างของกรดอะมิโนจะชี้ออกสู่ทางด้านนอกของเกลียว โปรตีนที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟา ได้แก่  $\alpha$ -keratin ในขนแกะ และ myosin ในกล้ามเนื้อ

2.2 แผ่นจีบปีตา ( $\beta$ -pleated sheet) เกิดจากการที่เส้นโพลีเปปไทด์สร้างพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างเส้นโพลีเปปไทด์ต่างเส้นกันซึ่งวิ่งขนานกัน โพลีเปปไทด์แต่ละเส้นจะมีการเหยียดตัวเต็มที่และอยู่ขนานกันไปเป็นแผ่น แขนงข้างจะชี้ออกสู่ด้านล่างและด้านบนของสายเปปไทด์ แผ่นจีบปีตาเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือเส้นเปปไทด์วิ่งสวนทางกัน เรียกว่า antiparallel โครงสร้างแบบนี้สายโพลีเปปไทด์จะวิ่งสวนทางกันสลับไปมา โดยนับจากปลาย N-Terminus ไปยัง C-Terminus และเส้นเปปไทด์วิ่งไปในทางเดียวกัน เรียกว่า parallel โครงสร้างแบบนี้สายโพลีเปปไทด์ที่เคียงคู่กันจะวิ่งไปในทางเดียวกันโปรตีนที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นแผ่นจีบปีตา ได้แก่ โปรตีนไฟโบรอิน ในเส้นไหม

3. โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) โครงสร้างระดับนี้เกิดจากการที่สายโพลีเปปไทด์ทั้งที่เป็นเกลียว หรือไม่เป็นเกลียว มีการขดหรือม้วนตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างที่แน่นอนในสามมิติ เกิดเป็นลักษณะก้อนกลม (globular) เช่น ไมโอโกลบินในกล้ามเนื้อ ลักษณะเป็นแท่ง (rod-like) หรือเป็นลักษณะที่เรียกว่า random coil พันธะที่ยึดเหนี่ยวที่ทำให้เกิดโครงสร้างในระดับนี้ ส่วนใหญ่จะเป็นพันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ซึ่งเกิดจากการที่บางส่วนของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนลักษณะไม่โพลาร์ จึงไม่สร้างพันธะกับโมเลกุลของน้ำ จะพยายามหันตัวหนีน้ำโดยเข้าจับกลุ่มกันเองเสมือนหนึ่งมีแรงยึดเหนี่ยวหรือมีพันธะเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังมีพันธะอื่นๆ อีก เช่น พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) พันธะไอออนิก (ionic interaction) ซึ่งจะช่วยยึดให้เกิดโครงสร้างที่แน่นอน ทำหน้าที่เฉพาะอย่างได้ เช่น ไมโอโกลบิน (myoglobin) ในกล้ามเนื้อ ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจน ให้แก่เซลล์ของกล้ามเนื้อ

3.4 โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) โครงสร้างที่เกิดจากการจับตัวกันของเส้นโพลีเปปไทด์ต่างๆ หรือหน่วยย่อย (subunit) เข้าด้วยกันเป็นกลุ่มด้วยแรงยึดเหนี่ยวอย่างอ่อน เช่น พันธะไอออนิก ไฮโดรโฟบิก หรือ วนเดอร์วาลอาจจะรวมตัวกันเป็นลักษณะก้อนกลม (globular protein) เช่น ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ในเม็ดเลือดแดง จะประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 4 สายมารวมกัน แรงที่ยึดติดกันนี้ส่วนใหญ่เป็นแรงวนเดอร์วาล โดยแต่ละสายจะมีการขดตัวคล้ายไมโอ

โกลบิน การรวมตัวกันของหน่วยย่อยเพื่อให้เกิดโครงสร้างจตุรภูมิขึ้นมา จะทำให้โปรตีนมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ดีขึ้น เหมือนกับหน้าที่ เช่น ฮีโมโกลบิน ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยจับออกซิเจนที่ปอด และปล่อยออกซิเจนเมื่อผ่านไปยังอวัยวะส่วนอื่นๆ ของร่างกาย



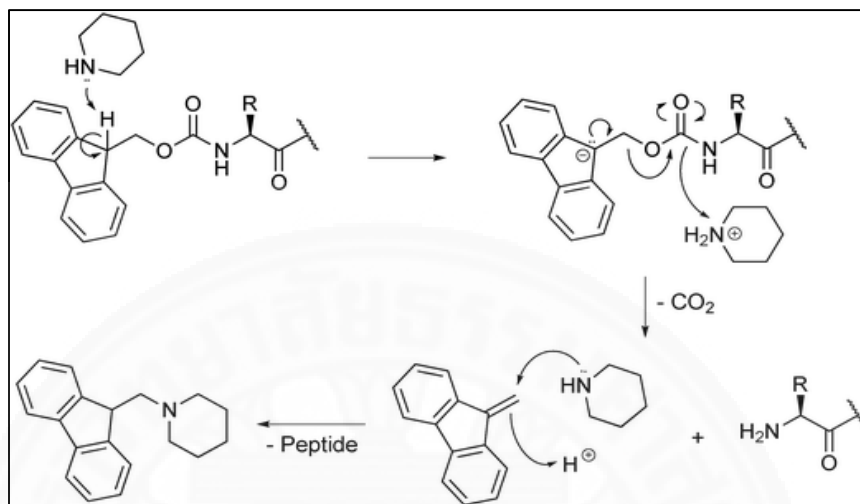
ภาพที่ 2.22 แสดงโครงสร้างของโปรตีน

(ที่มา:[http://xray.bmc.uu.se/lars/Practicals/IntroSwPDB/Bioinformatisk\\_strukturbiologi\\_2009\\_files/struc\\_levels.jpg](http://xray.bmc.uu.se/lars/Practicals/IntroSwPDB/Bioinformatisk_strukturbiologi_2009_files/struc_levels.jpg))

## 2.9 การสังเคราะห์เปปไทด์

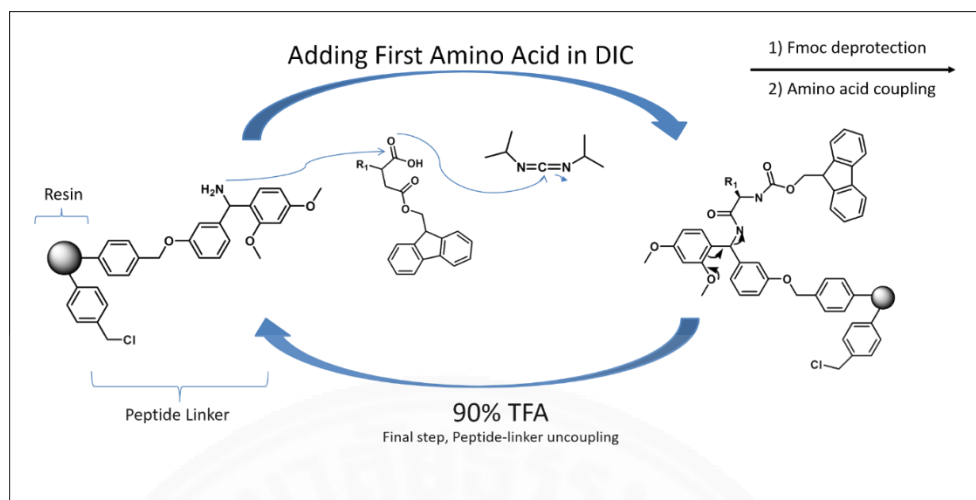
เปปไทด์เกิดจากการสร้างพันธะระหว่างกรดอะมิโน เรียกว่าพันธะเอไมด์ (amide bond) หรือพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ซึ่งเกิดจากการเชื่อมต่อระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิก (C-terminus) ของกรดอะมิโนตัวหนึ่งกับหมู่อะมิโน (N-terminus) ของกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่ง และเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการกรดอะมิโนจึงต้องมีหมู่ป้องกัน (protecting group) เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ หมู่ป้องกันมีอยู่หลายชนิด และการกำจัดหมู่ป้องกันออก (deprotection) จะใช้ปฏิกิริยาที่มีสถานะที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ให้เหมาะสม ตัวอย่างหมู่ป้องกัน อาทิเช่น ฟลูออรีนิลเมทอกซีคาร์บอนิล (9-fluorenylmethoxycarbonyl หรือ Fmoc) ไนโตรฟีนิลซัลโฟนิลเอทอกซีคาร์บอนิล (2-(4-Nitrophenylsulfonyl)ethoxycarbonyl หรือ Nsc) และ เอทานิลซัลโฟนิลเอทอกซีคาร์บอนิล (Ethanesulfonylethoxycarbonyl หรือ Esc) บิวทิลออกซีคาร์

บอซิล (tert-butyloxycarbonyl หรือ Boc) ไทรทิล (Trityl หรือ Trt) ไนโตรฟีนิลซัลโฟนิล (2-Nitrophenylsulfenyl หรือ Nps) เป็นต้น



ภาพที่ 2.23 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการกำจัดหมู่ป้องกันฟลูออรีนลเมทอกซีคาร์บอนิล (Fmoc) (ที่มา:<http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2012/CS/c1cs15214a/c1cs15214a-s2.gif>)

การสังเคราะห์เปปไทด์มีทั้งแบบสังเคราะห์เปปไทด์ในสารละลาย (solution phase) เป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์ และการสังเคราะห์เปปไทด์ในวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis (SPPS)) แสดงดังภาพที่ 2.21 โดยการสังเคราะห์เปปไทด์ในวัฏภาคของแข็ง เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในทางเคมี และชีวเคมี การสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ ช่วยลดค่าใช้จ่าย ลดปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ และใช้เวลาน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสังเคราะห์โดยใช้สังเคราะห์เปปไทด์ในสารละลาย



ภาพที่ 2.24 แสดงกลไกการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัสดุภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis)

วัสดุภาคของแข็งที่ใช้ในการสังเคราะห์คือเรซิน (resin) [30] ซึ่งเรซินที่เลือกมาใช้ในการสังเคราะห์จะต้องมีความเสถียร ไม่เกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ และตัวทำละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์ เรซินมีหลายชนิดต้องเลือกใช้ตามความเหมาะสม เช่น wang resin ให้ %loading ค่อนข้างต่ำ เหมาะสำหรับ peptide acid ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ 2-chlorotrityl chloride resin เนื่องจากเป็น resin ที่เหมาะสมกับ protected peptide fragments ให้ %loading ค่อนข้างสูง แต่ก็มีข้อเสียคือมีความไวต่อกรดมาก ดังนั้นในการสังเคราะห์จึงต้องทำด้วยความระมัดระวังโดยขั้นตอนแรกเริ่มจากเติม (coupling) กรดอะมิโนตัวแรกลงในเรซิน หลังจากนั้นคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนที่ถูกรวมเข้าไป (% amino acid loading) เพื่อที่จะนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนที่จะใช้ในปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป หลังจากนั้นทำการ capping เพื่อป้องกันไม่ให้ส่วนที่ไม่ได้ถูกรวมเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ ขั้นตอนต่อมาคือกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting) ออกแล้วเติม (coupling) กรดอะมิโนตัวต่อไป ทำการกำจัดหมู่ป้องกันและเติมกรดอะมิโนจนกระทั่งได้สายเปปไทด์ที่ต้องการแล้วจึงทำการตัดกรดอะมิโนออกจากเรซิน

## บทที่ 3

### วิธีการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

##### 3.1.1 สารเคมี

###### 3.1.1.1 กรดอะมิโน

(1) เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-ไกลซีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-glycine, Fmoc-Gly-OH) (AR grade; aapptec, USA)

(2) เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-2,2,4,6,7-เพนตาเมทิลไดไฮโดรเบนโซฟูราน-5-ซัลโฟนิล-แอล-อาร์จินีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-N'-2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-L-arginine, Fmoc-Arg(Pbf)-OH) (AR grade; aapptec, USA)

(3) เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอส-ไทรทิล-แอล-ซิสเทอีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-S-trityl-L-cysteine, Fmoc-Cys(Trt)-OH) (AR grade; aapptec, USA)

(4) เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-แอล-ไอโซลูซีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-isoleucine, Fmoc-Ile-OH) (AR grade; aapptec, USA)

(5) เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-โอ-ที-บิวทิล-แอล-เซอรีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-O-t-butyl-L-serine, Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH) (AR grade; aapptec, USA)

(6) เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-เอพิซิลอน-ที-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-N-epsilon-t-butyltoxycarbonyl-L-lysine, Fmoc-Lys(Boc)-OH) (AR grade; aapptec, USA)

(7) เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)-โอ-ที-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-O-t-butyl-L-threonine, Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH) (AR grade; aapptec, USA)

### 3.1.1.2 ตัวทำละลาย

- (1) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) (CG; RCI Labscan, Thailand)
- (2) เมทานอล (methanol) (CG; RCI Labscan, Thailand)
- (3) เอซิลอะซีเตต (ethyl acetate) (CG; RCI Labscan, Thailand)
- (4) เฮกเซน (hexane) (CG; RCI Labscan, Thailand)
- (5) ไดมethylฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide) (CG; RCI Labscan, Thailand)
- (6) อีเทอร์ (ether) (CG; RCI Labscan, Thailand)
- (7) คลอโรฟอร์ม-*d* (chloroform-*d*) (Sigma-Aldrich, Switzerland)
- (8) เมทานอล-*d*<sub>4</sub> (methanol-*d*<sub>4</sub>) (Cambridge Isotope Laboratories, UK)

### 3.1.1.3 สารเคมีอื่นๆ

- (1) 2-คลอโรไตรทิลเรซิน (2-chlorotriptyl-resin) (AR grade; aapptec, USA)
- (2) ไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (diisopropylethylamine (DIPEA)) (AR grade; Merck, Germany)
- (3) ไพเพอริดีน (piperidine , PIP) (AR grade; Merck, Germany)
- (4) ไฮดรอกซีเบนโซไตราโซล (hydroxybenzotriazole, HOBT) (AR grade; aapptec, USA)
- (5) เอ็น-เอ็น-เอ็น-เอ็น-เตตระเมทิล-โอ-(1-ไฮโดรเจน-เบนโซไตราโซล-1-อิล)ยูโรเนียม เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต (N,N,N',N'-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate, HBTU) (AR grade; aapptec, USA)

(6) 1-ปัสไตเมทิลอะมิโนเมทิลีน-1ไฮโดรเจน-1,2,3-ไตรเอโซ4,5-ปีริดีเนียม 3-ออกไซด์เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต (1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate, HATU) (AR grade; aapptec, USA)

(7) เอ็น,เอ็น'-ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมไมด์ (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, DCC) (AR grade; aapptec, USA)

(8) 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (4-dimethylaminopyridine, DMAP) (AR grade; aapptec, USA)

(9) ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) (AR grade; Fisher chemical, UK)

(10) พาราโทลูอินซัลโฟนิกแอซิด (*p*-toluenesulfonic acid, *p*-TsOH) (AR grade; Fluka, Switzerland)

(11) ทาร์ตาริกแอซิด (tartaric acid) (AR grade; ACROS, USA)

(12) ซิลิกาเจล (silica gel) (100-200 mesh; RANKEM, India)

(13) เซฟาเดกซ์ LH-20 (sephadex LH-20) (GE-Healthcare, Sweden)

(14) เบนซิลแอลกอฮอล์ (benzyl alcohol)

(15) โพรพาจิลแอลกอฮอล์ (propagyl alcohol)

### 3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์

(1) คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) (1.3x65 cm, 3x49 cm, 1.5x30 cm, 0.7x10 cm)

(2) โครมาโตกราฟีแบบผิบบาง (Thin Layer Chromatography (TLC)) (silica gel60 F<sub>254</sub>, layer 0.2 mm; MAEHEREY-NAGEL, Germany)

(3) กระดาษกรอง (filter paper) (no.1, 125 mm; Whatman, UK)

- (4) หลอดเอ็นเอ็มอาร์ (NMR tubes) (SCHOTT DURAN, Germany)
- (5) กระดาษกรองโม่บายเฟส (filtration membranes) (0.45 micron, 47 mm, nylon membrane; Munktell filter, USA)
- (6) หลอดฉีดยา (syringe) (NIPRO, Thailand)
- (7) เข็มฉีดยา HPLC (syringe HPLC)
- (8) ตัวกรองเข็มฉีดยา (syring filter) (0.45 micron, 13 mm, nylon; National Scientific, USA)
- (9) แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic Bar)
- (10) เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ (laboratory glassware)

### 3.1.3 เครื่องมือ

- (1) เตาทลุมไฟฟ้า (heating mantle) (Lab Heat, Thailand)
- (2) เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate & magnetic stirrer) (Clifton Cerastir, UK)
- (3) เครื่องเขย่า (shaker) (SSM1; Stuart, UK)
- (4) เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) (R-205; BUCHI, Switzerland)
- (5) เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง (balance 4 digit) (AB304-s; Mettler Toledo, Switzerland)
- (6) เครื่องปั๊มแบบสุญญากาศ (vacuum pump) (Vacuum brand)
- (7) เครื่องยูวีสเปกโตรสโกปี (UV-spectroscopy) (CM-10; Spectroline, USA)
- (8) เครื่องเอ็นเอ็มอาร์ (nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)) (Ultrashield 400 MHz; BRUKER, USA)
- (9) เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer)



(10) ตู้แช่แข็ง (freezer) (SIEMENS, Thailand)

(11) คิวเวต (cuvette) (Essex IG6 3UT; Starna Scientific, UK)

### 3.2 วิธีการทดลอง

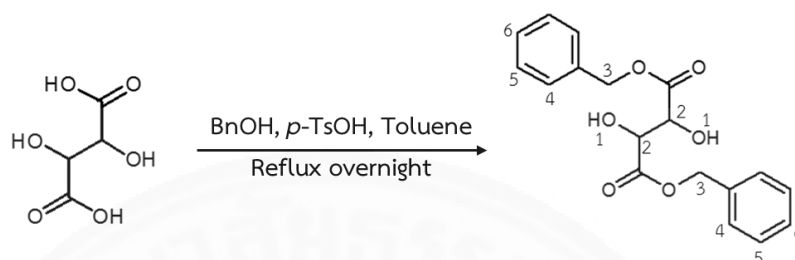
ในการสังเคราะห์ bivalent peptidic inhibitors จะแบ่งการสังเคราะห์ออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกคือการสังเคราะห์ส่วนของแกนของโครงสร้างโดยใช้ทาร์ทาริกแอซิด (tartaric acid) โดยการสังเคราะห์จะเริ่มจากการเติมหมู่ป้องกัน (protecting group) ที่ตำแหน่งไฮดรอกซิลของหมู่คาร์บอกซิลิกแอซิด และหลังจากนั้นทำการสังเคราะห์เพื่อด้วยกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) อาร์จินีน (arginine) และซิสเทอีน (cysteine) ตามลำดับ สำหรับในส่วนที่สองคือการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ (linear peptide chain) โดยจะสังเคราะห์โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis (SPPS)) และหลังจากนั้นจึงสังเคราะห์เพื่อเชื่อมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน (ligation) ตามด้วยขั้นตอนของการสังเคราะห์การปิดวง (cyclization) ตามลำดับ

#### 3.2.1 การสังเคราะห์แกนของโครงสร้าง

แกนของโครงสร้างที่สังเคราะห์เป็นอนุพันธ์ของทาร์ทาริกแอซิด โดยการสังเคราะห์เริ่มจากการป้องกัน (protecting) ที่ตำแหน่งไฮดรอกซิลของหมู่คาร์บอกซิลิกแอซิดของทาร์ทาริกแอซิดก่อนการเพิ่มเติมด้วยกรดอะมิโน ซึ่งหมู่ป้องกันที่ใช้ในการสังเคราะห์ ได้แก่ หมู่เบนซิล (benzyl group) หมู่โพรพาจิล (propagyl group) และหมู่เมทิล (methyl group) หลังจากนั้นจึงทำการเพิ่มเติมด้วยกรดอะมิโนเข้าไปทีละตัวตามลำดับดังนี้ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)-ไกลซีน หรือ Fmoc-Gly-OH, เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)-เอ็น-2,2,4,6,7-เพนตามิทิลไดไฮโดรเบนโซฟูแรน-5-ซิลโพนิล-แอล-อาร์จินีน หรือ Fmoc-Arg(Pbf)-OH และ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)-เอส-ไทโรทิล-แอล-ซิสเทอีน หรือ Fmoc-Cys(Trt)-OH ตามลำดับ โดยการเติมกรดอะมิโนจะเติมเข้าไปทางด้านของหมู่ไฮดรอกซิลของทาร์ทาริกแอซิด การสังเคราะห์การเชื่อมต่อกรดอะมิโนกับทาร์ทาริกแอซิดแบ่งเป็นสองขั้นตอนหลักๆ คือขั้นตอนการเชื่อมต่อ (coupling step) กรดอะมิโน และขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotection step) ก่อนที่จะเติมกรดอะมิโนตัวถัดไป

### 3.2.1.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ทาร์ทริกแอซิดโดยมีหมู่เบนซิล (benzyl group) เป็นหมู่ป้องกัน (protecting group)

#### (1) การสังเคราะห์ไดเบนซิลทาร์เทรต (dibenzyl tartrate)

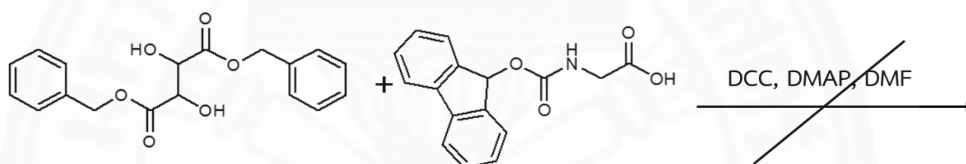


ภาพที่ 3.1 ภาพแสดงสมการของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดเบนซิลทาร์เทรต

ทำการเติมหมู่เบนซิล เข้าไปแทนที่ตำแหน่งของไฮโดรเจนของกรดคาร์บอกซิลิกแอซิด เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) โดยใช้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) แสดงดังภาพที่ 3.1 ในการทำการทดลองนำทาร์ทริกแอซิด (tartaric acid) (3 กรัม, 20 มิลลิโมล, 1 สมมูล) ใส่ในขวดก้นกลม จากนั้นเติมเบนซิลแอลกอฮอล์ (benzyl alcohol) (6.23 มิลลิลิตร, 60 มิลลิโมล, 3 สมมูล) พาราโทลูอินซัลโฟนิกแอซิด (*p*-TsOH) (0.0431 กรัม, 0.25 มิลลิโมล, 0.0125 สมมูล) และโทลูอิน (toluene) (40 มิลลิลิตร) ลงในขวดก้นกลม แล้วรีฟลักซ์ (reflux) โดยใช้ดีนสตาร์ก (Dean-Stark apparatus) และให้ความร้อนโดยใช้เตาหลุมไฟฟ้า (heating mantle) พร้อมทั้งปั่นกวน (stir) ที่งไว้วข้ามคืน หลังจากนั้นนำมาสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตอิ่มตัว (saturated sodium bicarbonate) และอีเทอร์ สกัดซ้ำ 3 ครั้ง โดยเก็บส่วนของอีเทอร์แล้วนำมาเติมโซเดียมซัลเฟตแล้วทำการกรองออก และระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) จะได้ของเหลวสีเหลืองใส ทำการตกผลึกโดยใช้เฮกเซน (hexane) และเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) ในขั้นตอนนี้จะได้นิโคตินิกแอซิด (nicotinic acid) ซึ่งมีลักษณะเป็นตะกอนสีขาวเป็นผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.4 (m, 8H-4, 5), 7.3 (t, 2H-6), 5.3 – 5.4 (dd,  $J = 17.1$ ,  $J = 12.1$ , 4H-3), 4.6 (d,  $J = 7.6$ , 2H-2), 3.2 (d,  $J = 7.6$ , 2H-1)

#### (2) การสังเคราะห์ Fmoc-Gly-dibenzyl tartrate

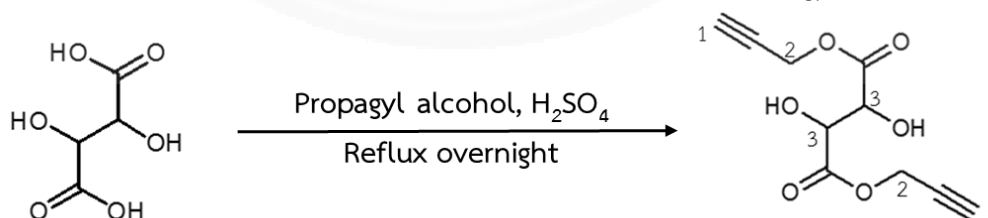
การเชื่อมต่อ (coupling) กรดอะมิโนตัวที่ 1 คือ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิล เมทิลออกซีคาร์บอนิล)-ไกลซีน หรือ Fmoc-Gly-OH โดยละลาย Fmoc-Gly-OH (281 มิลลิกรัม, 0.95 มิลลิโมล, 2.25 สมมูล) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (3 มิลลิลิตร) แล้วเติมลงในขวดกั่นกลม จากนั้นละลายไดเบนซิลทาร์เทรต (250 มิลลิกรัม, 0.76 มิลลิโมล, 1 สมมูล) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (3 มิลลิลิตร) และไดคลอโรมีเทน (3 มิลลิลิตร) และละลาย 4-ไดเมทิลอะมิโนไพรีดีน หรือ DMAP (9.2 มิลลิกรัม, 0.076 มิลลิโมล, 0.1 สมมูล) ด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (0.5 มิลลิลิตร) ละลายเอ็น,เอ็น-ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมไมด์ หรือ DCC (196 มิลลิกรัม, 0.95 มิลลิโมล, 1 สมมูล) ด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (2 มิลลิลิตร) แล้วเติมลงในขวดกั่นกลมตามลำดับ ทำการปั่นกววนที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยใช้ โครมาโตกราฟีแบบผิวนาง หรือ TLC โดยทดสอบเทียบกับสารตั้งต้นคือพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา



ภาพที่ 3.2 ภาพแสดงสมการของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Fmoc-Gly-dibenzyl tartrate

3.2.1.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ทาร์ทริกแอซิดโดยมีหมู่โพรพาจิล (propagyl group) เป็นหมู่ป้องกัน (protecting group)

(1) การสังเคราะห์ไดโพรพาจิลทาร์เทรต (propagyl tartrate)

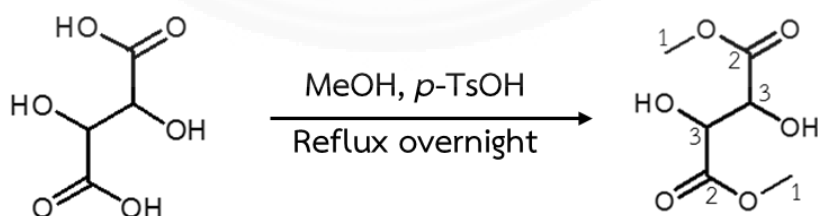


ภาพที่ 3.3 สมการแสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดโพรพาจิลทาร์เทรต

การทำปฏิกิริยา esterification โดยใช้ propargyl alcohol และใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถเตรียมได้โดยการนำทาทาริกแอซิด (tartaric acid) (5 กรัม, 33 มิลลิโมล, 1 สมมูล) ใส่ในขวดก้นกลม จากนั้นเติมโพรพาจิลแอลกอฮอล์ (propargyl alcohol) (50 มิลลิลิตร, ปริมาณมากเกินพอ) และกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (2 หยด) ลงในขวดก้นกลม แล้วรีฟลักซ์ (reflux) และให้ความร้อนในเตาหลุมไฟฟ้า (heating mantle) พร้อมปั่นกวนทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นทำการสกัดด้วยน้ำกลั่นและไดคลอโรมีเทน ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ทำการระเหยสารละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) แล้วจึงทำการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยการลงแบบแห้ง โดยระเหยสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) จะเหลือเป็นของเหลวมีลักษณะเป็นน้ำมัน แล้วละลายด้วยไดคลอโรมีเทนเพียงเล็กน้อย เติมหิวลิทาลีนแล้วคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) จนกระทั่งหิวลิทาลีนมีลักษณะระเหิด จากนั้นจึงทำการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ซึ่งมีหิวลิทาลีนเป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และใช้เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลาย เริ่มชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซนและค่อยๆ เพิ่มขั้วโดยใช้เอทิลอะซิเตตและเมทานอล ซึ่งผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นหยดน้ำมัน ร้อยละของผลิตภัณฑ์ไดเมทิลทาร์เตรตเท่ากับ 1.3 ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.6 (s, 4H-2), 4.9 (s, 2H-3), 2.9 (s, 2H-1)

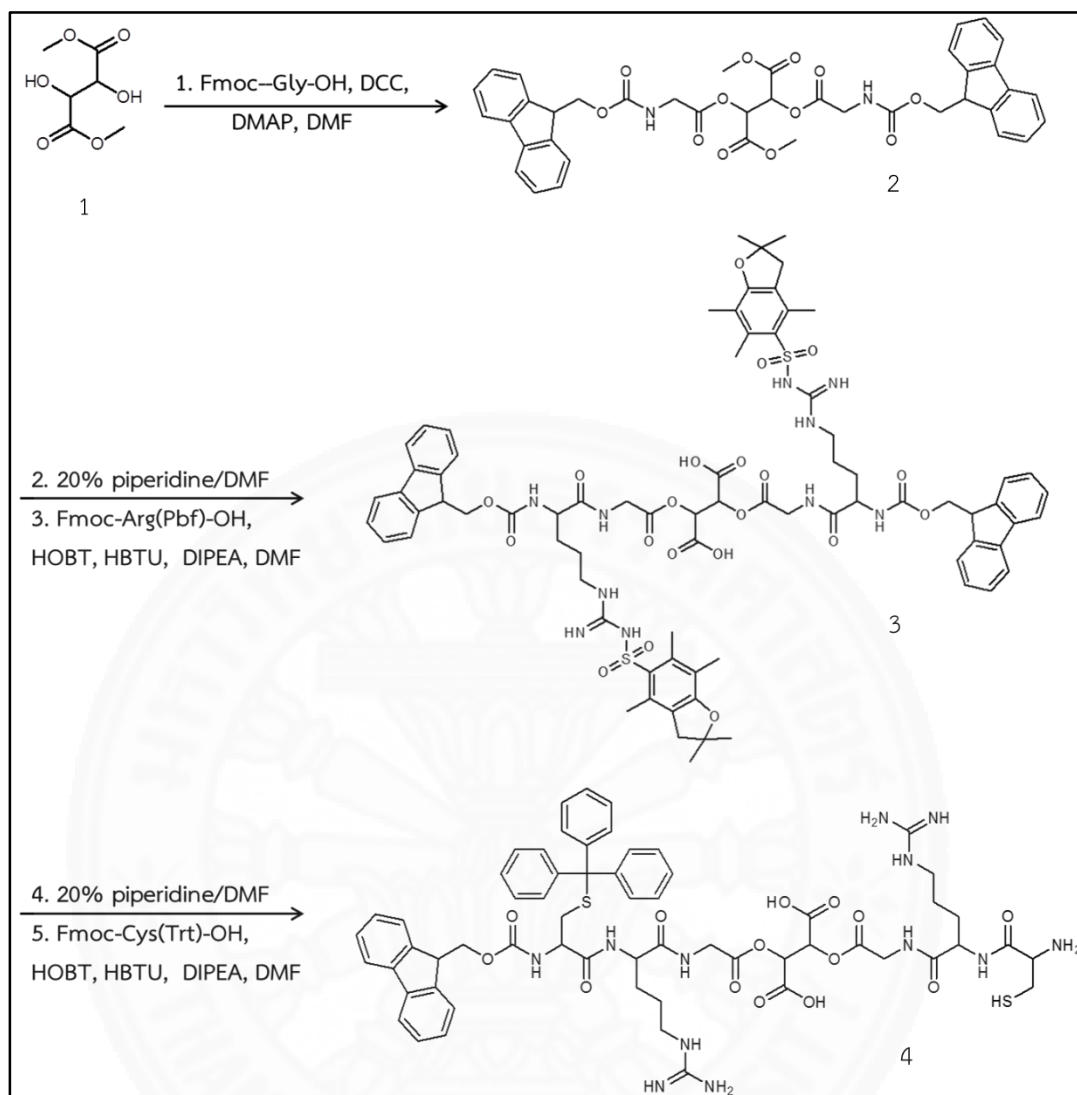
### 3.2.1.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ทาทาริกแอซิดโดยมีหมู่เมทิล (methyl group) เป็นหมู่ป้องกัน (protecting group)

#### (1) การสังเคราะห์ไดเมทิลทาร์เตรต (dimethyl tartrate)



ภาพที่ 3.4 สมการแสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดเมทิลทาร์เตรต

การทำปฏิกิริยาเอสเตอร์ฟิเคชัน (esterification) ของเมทานอล เริ่มจากการนำทาร์ทริกแอซิด (tartaric acid) (5 กรัม, 33 มิลลิโมล, 1 สมมูล) ใส่ในขวดก้นกลม จากนั้นเติมเมทานอล (methanol) (50 มิลลิลิตร, ปริมาณที่มากเกินไป) และ พาราโทลูอินซิลโฟนิคแอซิด (*p*-TsOH) (0.05 กรัม, 0.25 มิลลิโมล, 1 สมมูล) ลงในขวดก้นกลม แล้วรีฟลักซ์ (reflux) ให้ความร้อนในเตาหลุมไฟฟ้า (heating mantle) ที่งัวข้ามคืน จากนั้นทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยทดสอบเทียบกับสารตั้งต้น โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC) และใช้สารละลาย 10% เมทานอล/เอทิลอะซิเตต (10% MeOH/EtOAc) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่หลังจากนั้นนำโครมาโตกราฟีแบบผิวบางจุ่มสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต และนำไปให้ความร้อนโดยใช้ไดร์เป่าลมร้อน พบจุดสีน้ำตาลของสารที่ตำแหน่งที่ไม่ตรงกับจุดของสารตั้งต้น ดังนั้นจึงเตรียมสารเพื่อแยกสารให้บริสุทธิ์โดย ทำการระเหยเมทานอลซึ่งเป็นสารละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) และทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการกลั่นในระบบสุญญากาศ ในขั้นตอนนี้จะได้ไดเมทิลทาร์เตรต (dimethyl tartrate) ซึ่งมีลักษณะหนืดใสไม่มีสีเป็นผลิตภัณฑ์ ร้อยละของผลิตภัณฑ์ไดเมทิลทาร์เตรตเท่ากับ 59 ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.6 (s, 2H-3), 3.8 (s, 6H-1),  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.0 (C-2), 72.3 (C-1), 52.87 (C-3) และวิธีแมสสเปกโทรเมตรี GC-MS: Found 179  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , Calculated 178



ภาพที่ 3.5 ภาพแสดงสมการการสังเคราะห์หอนุพันธ์ของไดเมทิลทาร์เทรต

## (2) การสังเคราะห์ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate

กรดอะมิโนตัวแรกที่จะทำการเพิ่มเข้าไปในไดเมทิลทาร์เทรตคือ Fmoc-Gly-OH แสดงดังภาพที่ 3.5 โดยการสังเคราะห์เริ่มจากใส่ Fmoc-Gly-OH (835.14 มิลลิกรัม, 2.80 มิลลิโมล, 2.5 สมมูล) และ 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน หรือ DMAP (25.20 มิลลิกรัม, 0.21 มิลลิโมล, 0.2 สมมูล) ใส่ในขวดก้นกลมที่มีแท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) จากนั้นละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ หรือ DMF เติมไดเมทิลทาร์เทรต (dimethyl tartrate) (200 มิลลิกรัม, 1.12 มิลลิโมล, 1 สมมูล) ซึ่งละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และเติมเอ็น,เอ็น-ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบดิอิมไมด์ หรือ DCC (578.69 มิลลิกรัม, 2.80 มิลลิโมล, 2.5 สมมูล) ซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และจากนั้นปั่นกวน

ทิ้งไว้ข้ามคืน (stir overnight) หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC) โดยตรวจสอบเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือ Fmoc-Gly-OH โดยจุดสารที่มาจากปฏิกิริยาลงในแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง 2 จุด และจุดสารสารตั้งต้น Fmoc-Gly-OH 1 จุดและจุดลงไปผสมกับสารที่มาจากปฏิกิริยาจุดที่ 2 ที่จุดไว้ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วทดสอบโดยใช้สารละลาย 40% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน (40% ethyl acetate/Hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ต่อมาจะเป็นขั้นตอนของการเตรียมสารเพื่อใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์เริ่มจากระเหยสารละลายที่อยู่ในปฏิกิริยาโดยการกลั่นภายใต้ระบบสุญญากาศ แล้วละลายในไดคลอโรมีเทน และกรองตะกอนออก นำส่วนของสารที่ได้หลังการกรองไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) แล้วละลายด้วยไดคลอโรมีเทนอีกครั้งในปริมาณที่เหมาะสม ใส่ซิลิกาเจล (silica gel) ลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วระเหยไดคลอโรมีเทนออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศจนกระทั่งซิลิกาเจลมีลักษณะร่วนเป็นผง หลังจากนั้นเตรียมโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) ซึ่งภายในจะบรรจุด้วยซิลิกาเจลซึ่งเป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และใช้เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลาย เริ่มชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซนและค่อยๆ เพิ่มขั้วโดยใช้เอทิลอะซิเตตจนกระทั่งถึงเมทานอล จากนั้นทำการระเหยสารละลายด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) จะได้สารที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว คือ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-ไกลซีน-ไดเมทิลทาร์เทรต หรือ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate ร้อยละของผลิตภัณฑ์ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate (2) เท่ากับ 65 ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.8 (d,  $J = 7.5$ , 4H-14), 7.6 (d,  $J = 7.4$ , 4H-11), 7.4 (d,  $J = 7.4$ , 4H-13), 7.3 (d,  $J = 7.4$ , 4H-12), 5.8 (s, 2H-3), 4.4 (d,  $J = 7.1$ , 4H-5), 4.3 (t,  $J = 7.1$ , 2H-9), 4.1 (dd,  $J = 4.8$ ,  $J = 4.44$ , 4H-8), 3.8 (s, 4H-1) $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  169.0 (C-2), 166.0 (C-4), 156.7 (C-7), 143.9 (C-10), 141.3 (C-15), 127.7 (C-13), 125.1 (C-11), 127.1 (C-12), 119.9 (C-14), 71.2 (C-3), 67.3 (C-5), 53.4 (C-1), 47.2 (C-9), 42.2 (C-8) เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) HPLC (Supelco Discovery C18 250 mm  $\times$  4.6 mm column, acetonitrile in water, gradient from 0% to 100% in 60 min):  $R_t$  41.069 และวิธีแมสสเปกโทรเมทรี ESI-MS: Found 759.7  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , Calculated 736.2

### (3) การกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting group) Fmoc ของกรดอะมิโน

#### ไกลซีน

ก่อนที่จะเพิ่มกรดอะมิโนตัวถัดไปต้องทำปฏิกิริยาเพื่อเอาหมู่ป้องกัน (protecting group) ออกก่อน โดยทำ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate ซึ่งอยู่ในขวดก้นกลมให้แห้ง



โดยใช้ปัมสุญญากาศ ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) แล้วเติมสายละลาย 20% พีเพอริดีน ซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (20% piperidine/DMF) ทำการปั่นกวน (stir) เป็นเวลา 30 นาที ระเหยสายละลายให้แห้งโดยโดยใช้ปัมภายใต้ระบบสุญญากาศเช่นเดียวกับปฏิกิริยาของ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate จากขั้นตอนนี้จะได้ โกลซิน-ไดเมทิลทาร์เทรต ซึ่งไม่มีหมู่ป้องกัน หรือ H<sub>2</sub>N-Gly-dimethyl tartrate เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

#### (4) การสังเคราะห์ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate

กรดอะมิโนตัวที่สองที่เพิ่มลงไปคือ Fmoc-Arg(Pbf)-OH แสดงดังภาพที่ 5.3 โดยเริ่มจากใส่ Fmoc-Arg(Pbf)-OH (142.69 มิลลิกรัม, 0.22 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล), ไฮดรอกซีเบนโซไตรเอโซล หรือ HOBT (37.3 มิลลิกรัม, 0.22 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล) และเอ็น-เอ็น-เอ็น-เอ็น-เตตระเมทิล-โอ-(1-ไฮโดรเจน-เบนโซไตรเอโซ-1-อิว)ยูโรเนียม เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต หรือ HBTU (83 มิลลิกรัม, 0.22 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล) ใส่ในขวดก้นกลมที่มีแท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) จากนั้นละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ เติมไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน หรือ DIPEA (38.3 ไมโครลิตร, 0.22 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล) แล้วปั่นกวน (stir) เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นเติม H<sub>2</sub>N-Gly-dimethyl tartrate (736.6 มิลลิกรัม, 0.10 มิลลิโมล, 1 สมมูล) ที่ได้จากขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step) ซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และจากนั้นปั่นกวนทิ้งไว้ข้ามคืน (stir overnight) หลังจากนั้นตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง และตรวจสอบเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือ Fmoc-Arg(Pbf)-OH โดยจุดสารที่มาจากปฏิกิริยาลงในแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง 2 จุด และจุดสารตั้งต้น Fmoc-Arg(Pbf)-OH 1 จุดและจุดลงไปผสมกับสารที่มาจากปฏิกิริยาจุดที่ 2 ที่จุดไว้ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วแล้วใช้สารละลาย 40% เอทิลอะซิเตต/เฮกเซน (40% ethyl acetate/Hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ต่อมาจะเป็นขั้นตอนของการเตรียมสารเพื่อใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์เริ่มจากระเหยสารละลายที่อยู่ในปฏิกิริยาโดยการกลั่นภายใต้ระบบสุญญากาศ แล้วละลายด้วยไดคลอโรมีเทน และระเหยสารละลายด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) แล้วละลายด้วยไดคลอโรมีเทนอีกครั้งในปริมาณที่เหมาะสม ใส่ซิลิกาเจล (silica gel) ลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วระเหยไดคลอโรมีเทนออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ จนกระทั่งซิลิกาเจลมีลักษณะร่วนเป็นผง หลังจากนั้นเตรียมโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) ภายในจะบรรจุด้วยซิลิกาเจลซึ่งเป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และใช้เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลาย เริ่มชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซนและค่อยๆ เพิ่มขั้วโดยใช้เอทิลอะซิเตตจนกระทั่งถึงเมทานอล ระเหยสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) จะได้สารที่มีลักษณะของแข็งสีขาวของ เอ็น-แอลฟา-(9-



ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-2,2,4,6,7-เพนตามิทิลไดไฮโดรเบนโซฟูแรน-5-ซิลโฟนิล-แอล-อาร์จินีน-ไกลซีน-ไดเมทิลทาร์เทรต หรือ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate (3) ร้อยละของผลิตภัณฑ์ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate เท่ากับ 83 ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.8 (d,  $J = 7.0$ , 2H-18), 7.6 (d, 2H-15), 7.4 (t,  $J = 7.4$ , 2H-17), 7.3 (t,  $J = 7.4$ , 2H-16), 5.6 (s, 2H-2), 4.6 (d,  $J = 12.7$ , 4H-12), 4.5 (s, 4H-5), 4.3 (t,  $J = 6.6$ , 4H-8, 13), 3.0 (s, 4H-33), 2.6 (d,  $J = 19.7$ , 2H-22), 2.2 (s, 18H-36, 37, 38), 1.8 (b, 4H-20), 1.6 (b, 4H-21), 1.5 (s, 6H-39),  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  175.6 (C-1), 159.3 (C-7), 155.9 (C-4), 153.8 (C-30), 143.8 (C-24), 143.7 (C-10), 141.4 (C-14), 138.9 (C-19), 132.8 (C-27), 131.7 (C-28, 35), 127.8 (C-16), 127.1 (C-17), 125.0 (C-15), 124.8 (C-34), 119.9 (C-18), 117.8 (C-29), 86.6 (C-32), 77.3 (C-2), 67.2 (C-5), 47.2 (C-8, 13), 43.2 (C-33), 41.9 (C-12), 29.7 (C-20), 28.6 (C-39, 40), 25.3 (C-21), 19.6 (C-22), 12.4 (C-36, 37, 38) และวิธีแมสสเปกโทรเมทรี ESI-MS: Found 1347.3  $[\text{M}+2\text{Na}+\text{H}]^+$ , 683.9  $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^{2+}$ , Calculated 1302.49

#### (5) การกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting group) Fmoc ของกรดอะมิโนอาร์จินีน

ทำการกำจัดหมู่ป้องกัน (protecting group) ออกโดยนำ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate ซึ่งอยู่ในขวดก้นกลม ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) เติมสายละลาย 20% ไพเพอริดีนซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (20% piperidine/DMF) แล้วปั่นกวน (stir) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นระเหยสายละลายให้แห้งโดยการใช้ปั๊มภายใต้ระบบสุญญากาศ จากขั้นตอนนี้ได้ เอ็น-2,2,4,6,7-เพนตามิทิลไดไฮโดรเบนโซฟูแรน-5-ซิลโฟนิล-แอล-อาร์จินีน-ไกลซีน-ไดเมทิลทาร์เทรต หรือ  $\text{H}_2\text{N-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate}$  เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

#### (6) การสังเคราะห์ Fmoc-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate

กรดอะมิโนตัวสุดท้ายที่จะเพิ่มเข้าไปในแกนของโครงสร้างคือ Fmoc-Cys(Trt)-OH แสดงดังภาพที่ 5.3 โดยเริ่มจากใส่ Fmoc-Cys(Trt)-OH (49.6 มิลลิกรัม, 0.08 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล), ไฮดรอกซีเบนโซไตรเอโซล หรือ HOBT (14.9 มิลลิกรัม, 0.08 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล) และเอ็น-เอ็น-เอ็น-เอ็น-เตตระเมทิล-โอ-(1-ไฮโดรเจน-เบนโซไตรเอโซล-1-อิว)ยูโรเนียม เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต หรือ HBTU (33.4 มิลลิกรัม, 0.08 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล) ใส่ในขวดก้นกลมที่มีแท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) จากนั้นละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ เติมไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน หรือ

DIPEA (15 ไมโครลิตร, 0.08 มิลลิโมล, 2.2 สมมูล) แล้วปั่นกววน (stir) เป็นเวลา 60 นาที และเติม  $H_2N\text{-Arg(Pbf)-Gly-dimethyltartrate}$  (50 มิลลิกรัม, 0.04 มิลลิโมล, 1 สมมูล) ที่ได้จากขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step) ซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และจากนั้นปั่นกววนทิ้งไว้ข้ามคืน (stir overnight) หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง และตรวจสอบเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือ Fmoc-Cys(Trt)-OH โดยจุดสารที่มาจากปฏิกิริยาลงในแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง 2 จุด และจุดสารสารตั้งต้น Fmoc-Cys(Trt)-OH 1 จุดและจุดลงไปผสมกับสารที่มาจากปฏิกิริยาจุดที่ 2 ที่จุดไว้ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วใช้สารละลาย 40% เอทิลอะซิเตต/เฮกเซน (40% ethylacetate/hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ต่อมาทำการเตรียมสารเพื่อใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยเริ่มจากระเหยสารละลายที่อยู่ในปฏิกิริยาโดยการกลั่นภายใต้ระบบสุญญากาศ แล้วละลายในไดคลอโรมีเทน และระเหยสารละลายด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) แล้วละลายด้วยไดคลอโรมีเทนอีกครั้งในปริมาณที่เหมาะสม ใส่ซิลิกาเจล (silica gel) ลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วระเหยไดคลอโรมีเทนออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศจนกระทั่งซิลิกาเจลมีลักษณะร่วนเป็นผง หลังจากนั้นเตรียมโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) ภายในจะบรรจุด้วยซิลิกาเจลซึ่งเป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และใช้เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลาย เริ่มชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซนและค่อยๆ เพิ่มขี้วโดยใช้เอทิลอะซิเตตจนกระทั่งถึงเมทานอล ระเหยสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) จะได้ของแข็งสีขาวของ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอส-ไทรทิล-แอล-ซิสเทอีน-เอ็น-2,2,4,6,7-เพนตาเมทิลไดไฮโดรเบนโซฟูแรน-5-ซิลโพนิล-แอล-อาร์จินีน-ไกลซีน-ไดเมทิลทาร์เทรต หรือ Fmoc-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyltartrate (4) ร้อยละของผลิตภัณฑ์ Fmoc-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate เท่ากับ 47 ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)  $^1H\text{-NMR}$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ): 7.8 (d,  $J = 7.4$ , 4H-21), 7.7 (d,  $J = 7.2$ , 4H-18), 7.4 (t,  $J = 7.3$ , 2H-20), 7.4 - 7.3 (m, 17H-31, 32, 33), 5.7 (d,  $J = 8.7$ , 2H-2), 5.3 (t,  $J = 6.5$ , 2H-16), 4.6 (dd,  $J = 13.8$ ,  $J = 7.5$ , 2H-15), 4.4 - 4.3 (m, 6H-5, 8), 4.2 (t,  $J = 7.2$ , 2H-11), 3.2 - 3.0 (d,  $J = 24.8$ , 4H-28), 2.6 (t,  $J = 4.1$ , 4H-25),  $^{13}C\text{-NMR}$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  168.4 (C-1), 155.7 (C-13), 146.9 (C-7), 144.6 (C-4), 144.0 (C-27), 143.9 (C-10), 141.3 (C-17, 31), 135.0 (C-22), 129.6 (C-32), 128.0 (C-20), 127.7 (C-31), 126.9 (C-33), 126.8 (C-19), 125.2 (C-18), 119.9 (C-21), 77.2 (C-2), 67.1 (C-5, 8), 54.9 (C-30), 49.9 (C-11), 47.2 (C-16), 43.4 (C-15), 29.9 (C-23), 26.4 (C-24), 25.4 (C-28), 23.4 (C-25) เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) HPLC (Supelco Discovery C18 250 mm  $\times$  4.6 mm column, acetonitrile in water, gradient from 0% to

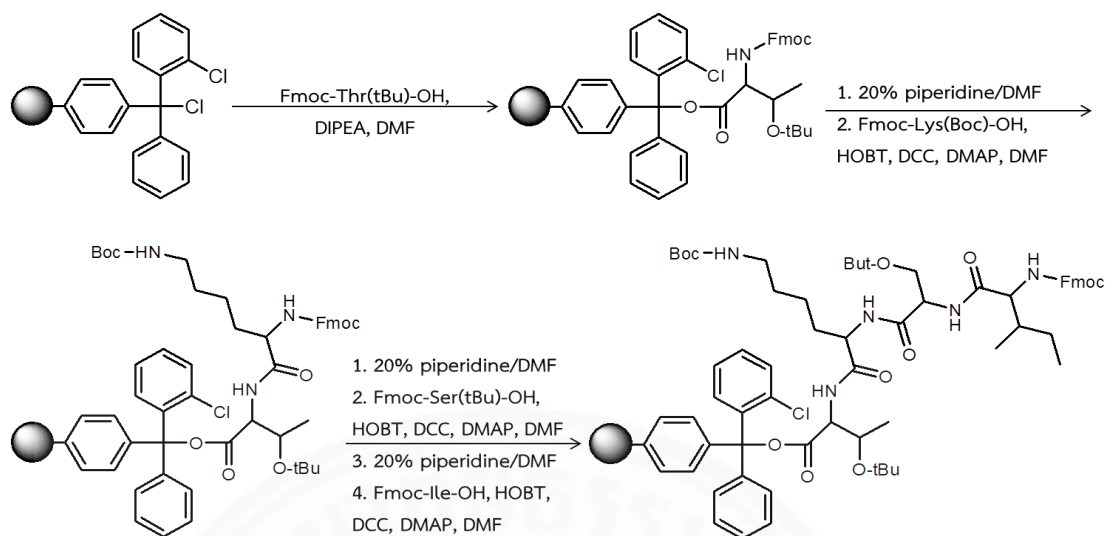
100% in 60 min):  $R_f$  52.5 และวิธีแมสสเปกโทรเมทรี ESI-MS: Found 1350.7  $[M+2ACN+Na]^+$ , 685.7  $[M+3ACN+2H]^{2+}$ , Calculated 1246.46

### (7) การกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting group) Fmoc ของกรดอะมิโนซิสทีอีน

ทำการกำจัดหมู่ป้องกัน (protecting group) ออกโดยนำ Fmoc-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyltartrate ซึ่งอยู่ในขวดกันกลมให้แห้งโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) แล้วเติมน้ำละลาย 20% พีเพอริดีนซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (20% piperidine/DMF) ทำการปั่นกวน (stir) เป็นเวลา 30 นาที ระเหยน้ำละลายให้แห้งโดยการกลั่นภายใต้ระบบสุญญากาศ จากขั้นตอนนี้จะได้ เอส-ไทโรทิล-แอล-ซิสเทอีน-เอ็น-2,2,4,6,7-เพนตามิทิลไดไฮโดรเบนโซฟิวแรน-5-ซัลโฟนิล-แอล-อาร์จินีน-ไกลซีน-ไดเมทิลทาร์เทรต หรือ  $H_2N$ -Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อ ligation ไป

### 3.2.2 การสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ (linear peptide chain)

การสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์จะใช้วิธีการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis (SPPS)) โดยลำดับของกรดอะมิโนที่ใช้สังเคราะห์คือ Fmoc-I-S(<sup>t</sup>Bu)-K(Boc)-T(<sup>t</sup>Bu)-OH ซึ่งตำแหน่งของกรดอะมิโนไลซีนเป็นส่วนที่เกิดการจับตัวกับเอนไซม์ที่ตำแหน่ง S1 โดยการสังเคราะห์จะเริ่มสังเคราะห์จากปลายหมู่คาร์บอกซิลิกไปยังหมู่อะมิโนของสายโซ่เปปไทด์ และใช้ 2-คลอโรไตรทิลคลอไรด์เรซิน (2-chlorotrityl chloride resin) เป็นวัฏภาคของแข็งขั้นตอนของการสังเคราะห์โดยใช้วิธีนี้จะเริ่มจากการเติมกรดอะมิโนตัวแรกคือ ทรีโอนีน (threonine) เข้าไปที่เรซิน หรือเรียกว่า loading หลังจากนั้นจึงทดสอบหาปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับเรซิน หรือการหา % amino acid loading โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 301 นาโนเมตร เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนที่จะใช้ต่อไป แต่ก่อนที่จะทำการเติมกรดอะมิโนตัวถัดไปจะต้อง cap เรซินส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนตัวแรกเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ และจากนั้นจึงทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step) ก่อนที่จะทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนตัวถัดไป (coupling step)



ภาพที่ 3.6 สมการแสดงการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์

สายโซ่เปปไทด์จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 4 ตัวคือ ทรีโอนีน (threonine), ไลซีน (lysine), เซอรีน (serine) และไอโซลิวซีน (isoleucine) ตามลำดับ โดยไลซีน, เซอรีน, ไอโซลิวซีน, ไฮดรอกซีเบนโซโทรเอโซล (HOBT), เอ็น,เอ็น-ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบดิอิมไมด์ (DCC) และ 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (DMAP) จะเตรียมไว้ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยมีไดเมทิลฟอร์มาไมด์เป็นตัวละลาย

### (1) การเชื่อมต่อกรดอะมิโนตัวที่ 1 กับเรซิน (amino acid loading)

ละลาย เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนนิลเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)-โอ-ที-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน หรือ Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH (378.6 มิลลิกรัม, 0.95 มิลลิโมล, 1.5 สมมูล) (0.95 มิลลิโมล) ด้วย ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ หรือ DMF 5 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลม เติมไดไซโคลเฮกซิลเอทิลลามีน หรือ DIPEA (0.162 มิลลิลิตร, 0.95 มิลลิโมล, 1.5 สมมูล) และเติม 2-คลอโรโทรไทลคอลลไรด์เรซิน (500 มิลลิกรัม, 0.635 มิลลิโมล, 1 สมมูล) แล้วเขย่าทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นกรองสารละลายออก และล้าง resin ด้วย ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และ ไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการทดลองซ้ำอีก 1 ครั้ง เพื่อให้กรดอะมิโนตัวแรกเข้าไปจับกับเรซินได้มากที่สุด จากนั้นล้าง resin ด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์, ไดคลอโรมีเทน และ อีเทอร์ ตามลำดับ ทำให้แห้งด้วยปั๊มสุญญากาศ

## (2) การหาปริมาณของกรดอะมิโนที่ถูกเชื่อมต่อกับเรซิน (amino acid loading)

ซังเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-โอ-ที-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน-ไทโรทิลคอลไรด์เรซิน หรือ Fmoc-Thr<sup>(t)Bu</sup>-Trityl resin 1 มิลลิกรัม ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็ก (vial) จากนั้นเติมสายละลาย 20% ไพเพอริดีนซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (20% piperidine/DMF) ลงในขวดแก้วขนาดเล็ก 3 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของเหลวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 301 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณจากสมการ (ปริมาณของกรดอะมิโนที่ถูกเชื่อมต่อกับเรซิน (amino acid loading) มีค่าเท่ากับ 0.45 มิลลิโมลต่อกรัม)

$$\text{amino acid loading (mmol.g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Abs}_{\text{solv}} - \text{Abs}_{\text{ref}}}{1.28 \times \text{mg sample}}$$

$$\% \text{ amino acid loading} = \frac{\text{amino acid loading (mmol.g}^{-1}\text{)}}{\text{resin (mmol.g}^{-1}\text{)}} \times 100$$

## (3) ขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step) Fmoc ของกรดอะมิโนทรีโอนีน

เติมสายละลาย 20% ไพเพอริดีนซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (20% piperidine/DMF) 1.5 มิลลิลิตร ลงใน เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-โอ-ที-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน-ไทโรทิลคอลไรด์เรซิน หรือ Fmoc-Thr<sup>(t)Bu</sup>-Trityl resin จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายออก และล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ

## (4) ขั้นตอนการเชื่อมต่อกับกรดอะมิโน (coupling step) ไลซีน

ทำการเติมกรดอะมิโนตัวถัดมาคือ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-เอพซิลอน-ที-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน หรือ Fmoc-Lys(Boc)-OH, เติม Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล) HOBT (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล), DMAP (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล) และ DCC (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล) ลงในเรซิน แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายออก และล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ จากขั้นตอนนี้จะได้ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิล

ลออกซีคาร์บอร์นิล)-เอ็น-เอพซิลอน-ที-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน-โอ-ที-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน-ไทโรทิลคอลไรด์เรซิน หรือ Fmoc-Lys(Boc)-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Trityl resin

#### (5) ขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step) Fmoc ของกรดอะมิโนทรีโอนีน

เติมสายละลาย 20% พีเพอริดีนซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (20 % piperidine/DMF) 1.5 มิลลิลิตร ลงใน เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)-เอ็น-เอพซิลอน-ที-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน-โอ-ที-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน-ไทโรทิลคอลไรด์เรซิน หรือ Fmoc-Lys(Boc)-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Trityl resin จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายออก และล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ

#### (6) ขั้นตอนการเชื่อมต่อกกรดอะมิโน (Coupling step) ซีรีน

ทำการเติมกรดอะมิโนตัวถัดมาคือ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)-โอ-ที-บิวทิล-แอล-เซอรีน หรือ Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH, เติม Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล) HOBT (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล), DMAP (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล) และ DCC (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล) ลงในเรซิน แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายออก และล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ จากขั้นตอนนี้จะได้เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)-โอ-ที-บิวทิล-แอล-เซอรีน-เอ็น-เอพซิลอน-ที-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน-โอ-ที-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน-ไทโรทิลคอลไรด์เรซิน หรือ Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Trityl resin

#### (7) ขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step) Fmoc ของกรดอะมิโนซีรีน

เติมสายละลาย 20% พีเพอริดีนซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (20% piperidine/DMF) 1.5 มิลลิลิตร ลงใน เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)-โอ-ที-บิวทิล-แอล-เซอรีน-เอ็น-เอพซิลอน-ที-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน-โอ-ที-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน-ไทโรทิลคอลไรด์ เรซิน หรือ Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Trityl resin จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายออก และล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ

#### (8) ขั้นตอนการเชื่อมต่อกกรดอะมิโน (Coupling step) ไอโซลิวซีน

ทำการเติมกรดอะมิโนตัวถัดมาคือ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอร์นิล)-แอล-ไอโซลิวซีน หรือ Fmoc-Ile-OH, เติม Fmoc-Ile-OH (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3



สมมูล) HOBT (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล), DMAP (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล) และ DCC (0.25 มิลลิลิตร, 75 ไมโครโมล, 3 สมมูล) ลงในเรซิน แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายออก และล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ จากนั้นจะได้อิน-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-แอล-ไอโซลิวซีน-โอ-ที-บิวทิล-แอล-เซอร์อิน-เอ็น-เอพิซิลอน-ที-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน-โอ-ที-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน-ไทโรทิลคอลไรด์เรซิน หรือ Fmoc-Ile-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Trityl resin

### (9) ขั้นตอนการแยกส่วนของเปปไทด์ออกจากเรซิน (Cleavage step)

เติม 1% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด/ไดคลอโรมีเทน (1% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ลงในเรซิน แล้วเขย่าเป็นเวลา 2 นาที กรองสารละลายเก็บไว้ ทำซ้ำ 3 ครั้ง ระเหยสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) จากนั้นทำสารให้แห้งโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ ร้อยละของผลิตภัณฑ์ Fmoc-Ile-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH เท่ากับ 87 ยืนยันโครงสร้างด้วย HPLC (Supelco Discovery C18 250 mm × 4.6 mm column, acetonitrile in water, gradient from 0% to 100% in 60 min): R<sub>t</sub> 39.7 ESI-MS: Found 1785.9 [2M+Na]<sup>+</sup>, 905.0 [M+Na]<sup>+</sup>, Calculated 881.5

### 3.2.3 การสังเคราะห์ตัวยับยั้ง

#### (1) การเชื่อมต่อสายโซ่เปปไทด์กับส่วนของแกนโครงสร้าง (ligation)

ละลายสายโซ่เปปไทด์ (36.5 มิลลิกรัม, 0.042 มิลลิโมล, 3 สมมูล) ด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ เติมไฮดรอกซีเบนโซไตรเอโซล (HOBT) (36.5 มิลลิกรัม, 0.042 มิลลิโมล, 3 สมมูล) และเอ็น-เอ็น-เอ็น-เอ็น-เตตระเมทิล-โอ-(1-ไฮโดรเจน-เบนโซไตรเอโซล-1-อิว)ยูโรเนียม เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต (HBTU) (15.9 มิลลิกรัม, 0.042 มิลลิโมล, 3 สมมูล) ซึ่งละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ จากนั้นเติมไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (DIPEA) (49 ไมโครลิตร, 0.042 มิลลิโมล, 3 สมมูล) แล้วปั่นกวนทิ้งไว้ 60 นาที จากนั้นทำการเติมส่วนแกนของโครงสร้าง (17.2 มิลลิกรัม, 0.014 มิลลิโมล, 1 สมมูล) โดยละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ แล้วปั่นกวนทิ้งไว้ข้ามคืน ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) โดยใช้เซฟาเดกซ์ แอลเอช-20 (Sephadex LH-20) เป็นในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และใช้ 70% ของไดคลอโรมีเทนในเมทานอล (70% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ระเหยสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) จากนั้นทำสารให้แห้งโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ ร้อยละของผลิตภัณฑ์ของ Fmoc-Ile-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate เท่ากับ 7 ยืนยันโครงสร้างที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

(HPLC) HPLC (Supelco Discovery C18 250 mm × 4.6 mm column, acetonitrile in water, gradient from 0% to 100% in 60 min):  $R_t$  44.9 และวิธีแมสสเปกโทรเมทรี ที่ 1771.6  $[M+2Na]^{2+}$ , 897.9  $[M+4Na]^{4+}$ , Calculated 3497.8

## (2) การสังเคราะห์การปิดวง (cyclization)

กำจัดหมู่ป้องกัน Fmoc ของ Fmoc-Ile-Ser<sup>(t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr<sup>(t</sup>Bu)-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate (9.6 มิลลิกรัม, 0.78 ไมโครโมล, 1 สมมูล) โดยใช้สายละลาย 20% ไพเพอริดีนซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (20% piperidine/DMF) ทำการปั่นกววน (stir) เป็นเวลา 30 นาที ระเหยสายละลายให้แห้งโดยการกลั่นภายใต้ระบบสุญญากาศ จากนั้นละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ เติมไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน หรือ DIPEA (1.6 ไมโครลิตร, 9.42 ไมโครโมล, 12 สมมูล) แล้วเติม 1-ปิสโตเมทิลอะมิโนเมทิลีน-1-ไฮโดรเจน-1,2,3-ไตรเอโซ 4,5-ปีพิริดีเนียม 3-ออกไซด์เอกซะฟลูออโรฟอสเฟต หรือ HATU (1.8 มิลลิกรัม, 4.7 ไมโครโมล, 6 สมมูล) ซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (2.5 มิลลิลิตร) โดยค่อยๆ หยดอย่างช้าๆ ผ่านหลอดฉีดยา แล้วปั่นกววนทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยทดสอบสารละลายในปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือ Fmoc-Ile-Ser<sup>(t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr<sup>(t</sup>Bu)-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate และใช้สารละลาย 80% เมทานอล/เอทิลอะซิเตต (80% methanol/ethyl acetate) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ต่อมาทำการเตรียมสารเพื่อใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยเริ่มจากระเหยสารละลายที่อยู่ในปฏิกิริยาโดยการกลั่นภายใต้ระบบสุญญากาศ แล้วละลายในสารละลาย 70% ไดคลอโรมีเทนในเมทานอล (70% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH) เพียงเล็กน้อยและแยกสาร ให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) โดยใช้เซฟาเดกซ์ แอลเอช-20 (sephadex LH-20) เป็นในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และใช้ 70% ของไดคลอโรมีเทนในเมทานอล (70% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ระเหยสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator)

## (3) การกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting step)

กำจัดหมู่ป้องกันที่เหลือทั้งหมดโดยใช้สารละลาย TFA : H<sub>2</sub>O : EDT : Tips ในอัตราส่วน 94 : 2.5 : 2.5 : 1 ทำการปั่นกววนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้น flow สารละลายโดยใช้แก๊สไนโตรเจน ละลายสารที่ได้ด้วยเมทานอลเพียงเล็กน้อย และเติมน้ำก่อนนำไปทำให้แห้งโดยใช้ฟรีซไดร (freeze dry) หลังจากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) โดยใช้เซฟาเดกซ์ ฟลูริซิล (Florisil) เป็นในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และใช้เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำ



ละลาย เริ่มชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซนและค่อยๆ เพิ่มขั้วโดยใช้เอทิลอะซิเตตจนกระทั่งถึงเมทานอล ระเหยสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) จากนั้นทำสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ร้อยละของผลิตภัณฑ์ของ  $H_2N-Ile-Ser-Lys-Thr-Cys-Arg-Gly-dimathy$  tartrate เท่ากับ 3 ยืนยันโครงสร้างที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) HPLC (Supelco Discovery C18 250 mm × 4.6 mm column, acetonitrile/ water, gradient from 0% to 100% in 60 min):  $R_f$  39.0 และวิธีแมสสเปกโตรเมตรี ที่ 1648.7  $[M+ACN+H]^+$ , 803.4  $[M+2H]^{2+}$  และ 274.6  $[M-1372.6+ACN+H]^+$ , Calculated 1605

### 3.2.4 การตรวจยืนยันโครงสร้าง

#### 3.2.4.1 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)

นำเอาความชื้นออกจากสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ จากนั้นนำมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยตัวทำละลายนั้นจะต้องเป็นตัวทำละลายที่ใช้สำหรับวัดนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีเท่านั้น เนื่องจากตัวทำละลายเหล่านี้จะถูกแทนที่จากไฮโดรเจนให้เป็นดิทเทอร์เรียม โดยในการทดลองนี้ใช้คลอโรฟอร์ม-*d* เป็นตัวทำละลายในการละลาย จากนั้นนำไปวัดหาจำนวนโปรตอนและคาร์บอนด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) และนำเอาผลที่ได้มาระบุยืนยันผลของโครงสร้าง

#### 3.2.4.2 วิธีแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry (MS))

นำเอาความชื้นออกจากสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ จากนั้นนำเอาสารบริสุทธิ์ที่ได้ละลายกับตัวทำละลายที่เหมาะสม ฉีดสารละลายเข้าเครื่องแมสสเปกโตรเมตรีและนำเอาผลที่ได้มายืนยันผลของโครงสร้าง

#### 3.2.4.3 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography (HPLC))

นำเอาความชื้นออกจากสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ จากนั้นนำเอาสารบริสุทธิ์ที่ได้ละลายกับตัวทำละลายที่เหมาะสม ฉีดสารละลายเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ซี 18 (C18) เป็นวัฏภาคนิ่ง (Stationary phase) หรือตัวดูดซับ และใช้น้ำดีไอ (DI water) และเมทานอล (methanol) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลาย และนำเอาผลที่ได้มาประกอบการยืนยันผลของโครงสร้าง

### 3.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) ของ bivalent peptidic inhibitor

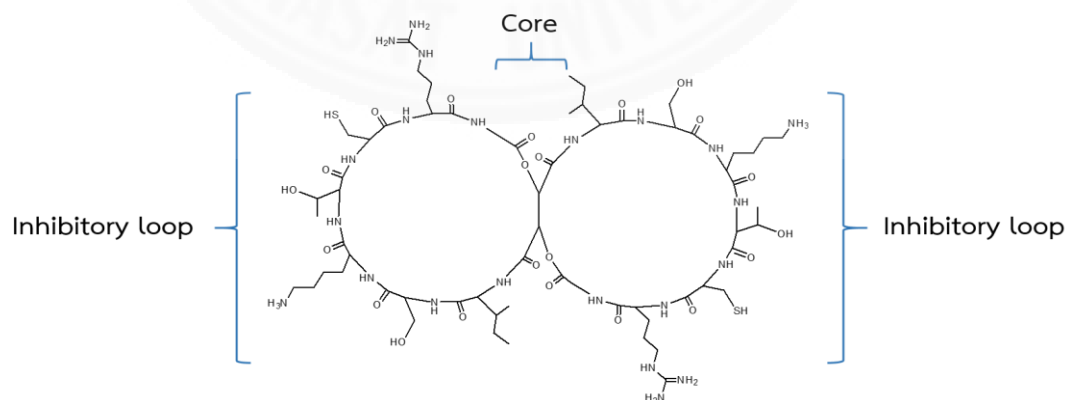
เลี้ยงเซลล์ไตมนุษย์ (HEK293), เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มีการเติม 10% fetal calf serum (FCS), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 mg/mL) และ L-glutamine (4 mM) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ 5% CO<sub>2</sub> สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับข้างต้นโดยมีการเติม 1% insulin ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย เติมเซลล์จำนวน  $1 \times 10^4$  เซลล์ลงจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมเพื่อใช้ในวันต่อไป ก่อนจะทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกก่อนแล้วล้างด้วย PBS หลังจากนั้นเติมตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย PBS และเติม 3-(4,5-ไดเมทิลไทเอโซล-2-อิล)-2,5-ไดฟีนิลเตตระโซเลียมโบรไมด์ (MTT) 100 ไมโครลิตร ซึ่งละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมงจะเกิดผลึกของฟอร์มazan (formazan) ขึ้นในเซลล์ที่มีชีวิต ทำการละลายผลึกด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันและวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ทำการทดสอบซึ่งกำหนดให้เป็นร้อยละ 100

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 การสังเคราะห์ bivalent peptidic inhibitor

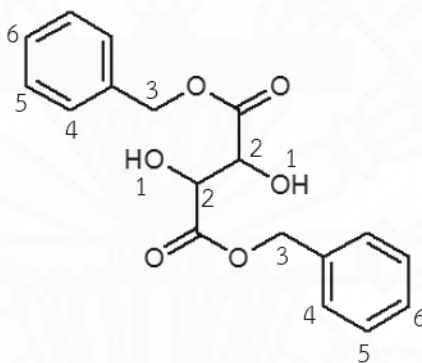
Bivalent peptidic inhibitor ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้ประกอบด้วยส่วนที่ทำหน้าที่เข้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ตำแหน่ง S1 pocket หรือที่เรียกว่า inhibitory loops ซึ่งในโครงสร้าง bivalent peptidic inhibitor จะมี inhibitory loops อยู่สองส่วน ซึ่งแต่ละส่วนสร้างอยู่บนแกนของโครงสร้างซึ่งสังเคราะห์จากทาร์ทริกแอซิด แสดงดังภาพที่ 4.1 โดยในงานวิจัยนี้ได้แบ่งการสังเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วนคือการสังเคราะห์ในส่วนที่เป็นแกนของโครงสร้างซึ่งจะสังเคราะห์ในวัฏภาคของเหลว (liquid phase) และการสังเคราะห์ส่วนของสายโซ่เปปไทด์ (linear peptide chain) โดยจะสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis (SPPS)) โดยทั้งสองส่วนจะทำการเชื่อมเข้าด้วยกัน (ligation) แล้วจึงทำการสังเคราะห์เพื่อปิดวง (cyclization) เพื่อสร้างโครงสร้างที่เป็น bivalent โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการยืนยันโครงสร้าง โดยใช้วิธีทางสเปกโตรสโกปี อาทิ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR), แมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry (MS)), เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography (HPLC)) รวมทั้งทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) อาทิ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela)



ภาพที่ 4.1 ภาพแสดงโครงสร้างของ bivalent peptidic inhibitor

#### 4.1.1 การสังเคราะห์แกนของโครงสร้าง

จากการศึกษาการสังเคราะห์ bivalent peptidic inhibitor ในส่วนของแกนโครงสร้าง โดยเริ่มจากการป้องกันหมู่คาร์บอกซิลของทาร์ทริกแอซิด โดยใช้ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของเบนซิลแอลกอฮอล์ เนื่องจากหมู่เบนซิลเป็นหมู่ที่มีความเสถียร และยังสามารถกำจัดออกได้ง่ายในสภาวะที่ไม่รุนแรงโดยใช้ปฏิกิริยา hydrogenolysis ซึ่งคาดว่าจะไม่น่าจะส่งผลต่อการสลายพันธะเอสเทอร์ในบริเวณของแกนกลาง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของเบนซิลแอลกอฮอล์คือไดเบนซิลทาร์เทรต (dibenzyl tartrate) แสดงดังภาพที่ 4.2 ซึ่งมีลักษณะเป็นเป็นตะกอนสีขาว และสามารถยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) ได้ดังนี้

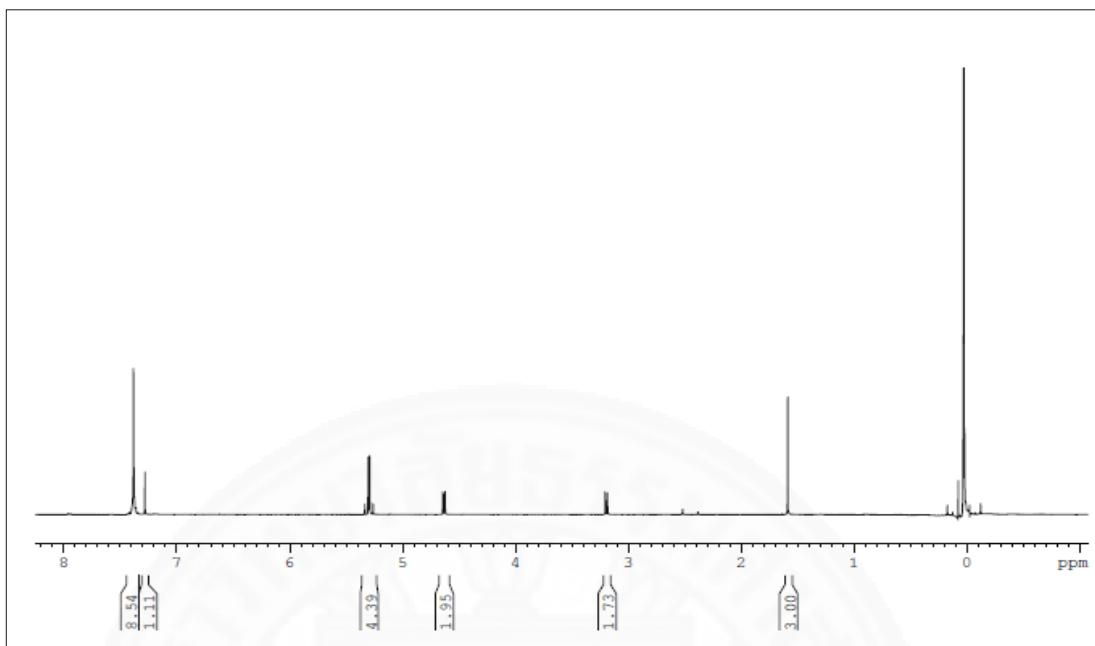


ภาพที่ 4.2 ภาพแสดงโครงสร้างของ dibenzyl tartrate

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.4 (m, 8H-4, 5), 7.3 (t, 2H-6), 5.3 – 5.4 (dd,  $J = 17.1$ ,  $J = 12.1$ , 4H-3), 4.6 (d,  $J = 7.6$ , 2H-2), 3.2 (d,  $J = 7.6$ , 2H-2)

ตาราง 4.1 ค่า  $^1\text{H-NMR}$  ของไดเบนซิลทาร์เทรต (dibenzyl tartrate)

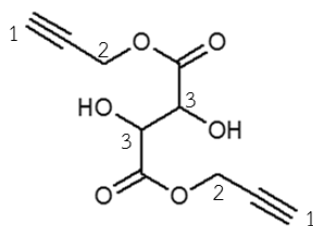
ตำแหน่ง	ค่า chemical shift ( $^1\text{H-NMR}$ )
2	3.2
2	4.6
3	5.3 – 5.4
4, 5	7.4
6	7.3



ภาพที่ 4.3 ภาพแสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของ dibenzyl tartrate

ในการทดลองการเชื่อมต่อ (coupling) ของกรดอะมิโนตัวที่ 1 คือ Fmoc-Gly-OH เข้าที่ตำแหน่งไฮดรอกซิลของไดเบนซิลทาร์เทรต จากการตรวจสอบด้วยโครมาโตกราฟีแบบผิวนาง (TLC) โดยทดสอบสารละลายในปฏิกิริยาเทียบกับสารตั้งต้นคือ Fmoc-Gly-OH พบเพียงจุดของสารในปฏิกิริยาที่ตรงกับจุดของ Fmoc-Gly-OH ซึ่งเป็นสารตั้งต้น ดังนั้นการสังเคราะห์นี้จึงไม่เกิดปฏิกิริยาซึ่งอาจจะเกิดจากหมู่เบนซิลมีขนาดใหญ่ 2 หมู่มีความเกะกะ ในขณะที่ทาร์ทริกมีจำนวนคาร์บอนที่เป็นแกนกลางเพียง 2 ตัว ปฏิกิริยาจึงเกิดขึ้นได้ยาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดลองโดยเปลี่ยนหมู่ป้องกันให้มีความเกะกะน้อยลง จึงทดลองใช้หมู่ป้องกันเป็นหมู่โพรพาลิล (propagyl) โดยใช้โพรพาลิลแอลกอฮอล์ (propagyl alcohol) และหมู่เมทิล (methyl group) โดยใช้เมทานอล (methanol) ในการป้องกันหมู่คาร์บอกซิลในทาร์ทริกแอซิด

จากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของทาร์ทริกแอซิด กับ โพรพาลิลแอลกอฮอล์ (propagyl alcohol) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดโพรพาลิลทาร์เทรต แสดงดังภาพที่ 4.4 ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน แต่พบว่าให้ร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 1 แม้จะมีความเกะกะน้อยแต่การสังเคราะห์ก็ให้ผลิตภัณฑ์น้อยจึงไม่คุ้มค่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้หมู่เมทิลเป็นหมู่ป้องกันซึ่งจะกล่าวต่อไป การยืนยันโครงสร้างของโพรพาลิลทาร์เทรตสามารถยืนยันได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี คือ เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^1\text{H-NMR}$ ) ( $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.6 (s, 4H-2), 4.9 (s, 2H-3), 2.9 (s, 2H-1)



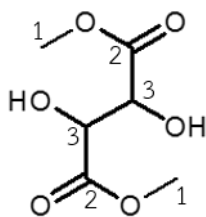
ภาพที่ 4.4 ภาพแสดงโครงสร้างของ dipropargyl tartrate

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.6 (s, 4H-2), 4.9 (s, 2H-3), 2.9 (s, 2H-1)

ตาราง 4.2 ค่า  $^1\text{H-NMR}$  ของไดโพรพาร์จิลทาร์เทรต (dipropargyl tartrate)

ตำแหน่ง	ค่า chemical shift ( $^1\text{H-NMR}$ )
1	2.9
2	5.6
3	4.9

การสังเคราะห์ส่วนแกนของโครงสร้างโดยใช้หมู่ป้องกันเป็นหมู่เมทิลจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของเมทานอล และผลิตภัณฑ์ที่ได้คือไดเมทิลทาร์เทรต แสดงดังภาพที่ 4.5 เป็นสารที่มีลักษณะเป็นน้ำมันหนืดใสไม่มีสี การเก็บไดเมทิลทาร์เทรตจำเป็นต้องเก็บในที่ที่ปราศจากกรดและความชื้น เนื่องจากหมู่เมทิลสามารถเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะดังกล่าวและควรทำการกลั่นทุกครั้งก่อนทำปฏิกิริยาเพื่อกลั่นเอาเฉพาะ dimethyl tartrate ออกจาก กรดทาร์ทาริกที่อาจจะปนเปื้อน ร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 59 โดยสามารถยืนยันโครงสร้างได้ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี คือ เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) และวิธีแมสสเปกโทรเมทรี (MS) ได้ผลดังนี้



ภาพที่ 4.5 ภาพแสดงโครงสร้างของไดเมทิลทาร์เทรต (dimethyl tartrate)

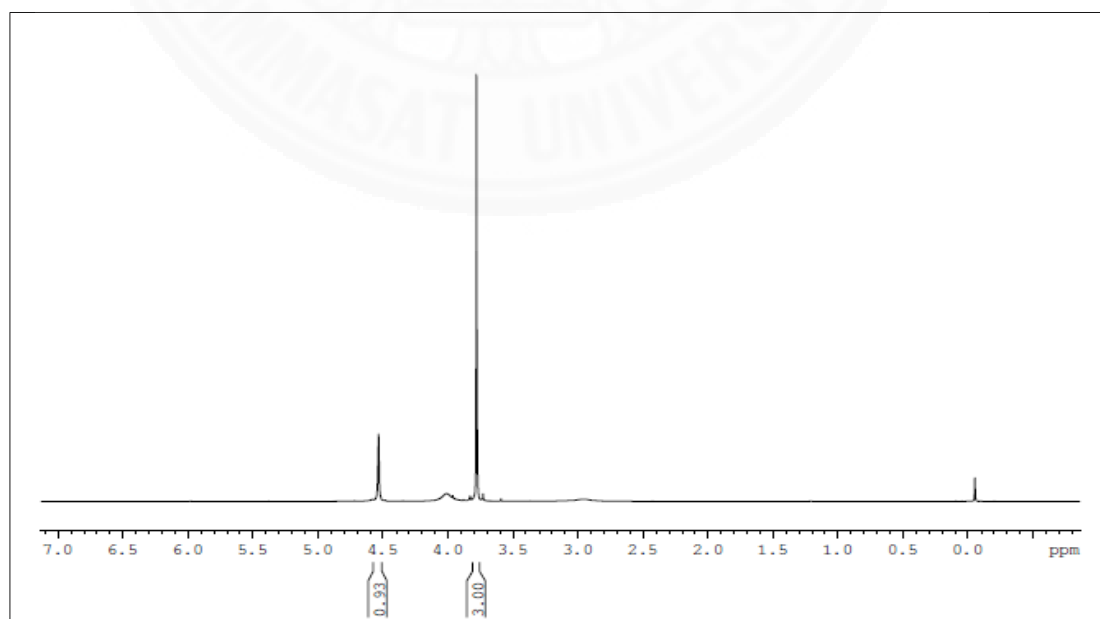
GC-MS:  $m/z$  (%rel. intensity) 179  $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.6 (s, 2H-3), 3.8 (s, 6H-1)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.0(C-2), 72.3(C-1), 52.9(C-3)

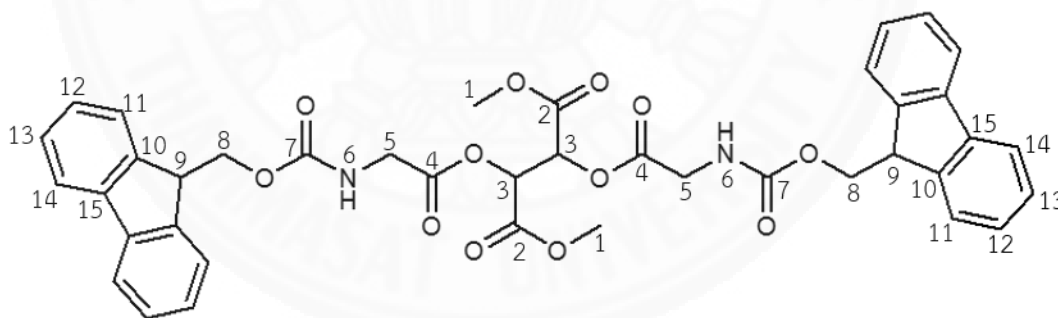
ตาราง 4.3 ค่า  $^1\text{H-NMR}$  และค่า  $^{13}\text{C-NMR}$  ของไดเมทิลทาร์เทรต (dimethyl tartrate)

ตำแหน่ง	ค่า chemical shift	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	3.8	72.3
2	-	172.0
3	4.6	52.9



ภาพที่ 4.6 ภาพแสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของ dimethyl tartrate

หลังจากที่ป้องกันทางด้านหมู่ของคาร์บอกซิล (carboxylic acid) เรียบร้อยแล้วในรูปของ dimethyl ester จึงทำการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มไกลซีนเข้าไปทางด้านหมู่ไฮดรอกซิล โดยทำปฏิกิริยาระหว่างไดเมทิลทาร์เทรตกับเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-ไกลซีน (Fmoc-Gly-OH) ทำปฏิกิริยาในอัตราส่วน 1 : 2.5 สมมูล (1 eq : 2.5 eq) ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นตะกอนสีขาว ซึ่งโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 4.7 ร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 65 และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ดังนี้ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR), วิธีแมสสเปกโตรเมตรี (MS) และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งจากข้อมูลของโปรตรอน นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^1\text{H-NMR}$ ) พบพีคของ Fmoc ที่ค่าเคมีคัลชิฟต์ประมาณ 7.33 – 7.90 ppm และพบพีคของกรดอะมิโนไกลซีนที่ค่าเคมีคัลชิฟต์ 4.42 ppm และจากข้อมูลคาร์บอน 13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) ดังแสดงในตาราง 4.3 และนอกจากนี้ยังสามารถยืนยันได้จากแมสสเปกตรัม พบพีคของโมเลกุลาร์ไอออน (molecular ion) ที่ 759.7  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ซึ่งแมสของสารจากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 736.2 ( $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{12}$ )



ภาพที่ 4.7 ภาพแสดงโครงสร้างของ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate

HPLC (Supelco Discovery C18 250 mm  $\times$  4.6 mm column, acetonitrile in water, gradient from 0% to 100% in 60 min):  $R_t$  41.069

ESI-Mass:  $m/z$  (%rel. intensity) 759.7  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

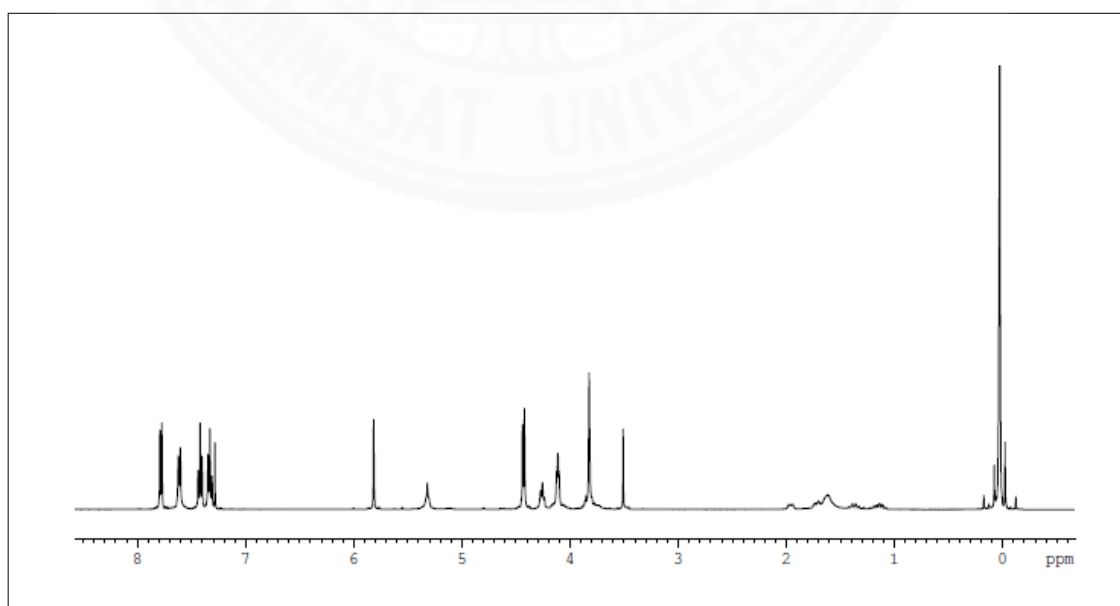


$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.8 (d,  $J = 7.5$ , 4H-14), 7.6 (d,  $J = 7.4$ , 4H-11), 7.4 (d,  $J = 7.4$ , 4H-13), 7.3 (d,  $J = 7.4$ , 4H-12), 5.8 (s, 2H-3), 4.4 (d,  $J = 7.1$ , 4H-5), 4.3 (t,  $J = 7.1$ , 2H-9), 4.1 (dd,  $J = 4.8$ ,  $J = 4.44$ , 4H-8), 3.8 (s, 6H-1)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  169.0 (C-2), 166.0 (C-4), 156.7 (C-7), 143.9 (C-10), 141.3 (C-15), 127.7 (C-13), 125.1 (C-11), 127.1 (C-12), 119.9 (C-14), 71.2 (C-3), 67.3 (C-5), 53.4 (C-1), 47.2 (C-9), 42.2 (C-8)

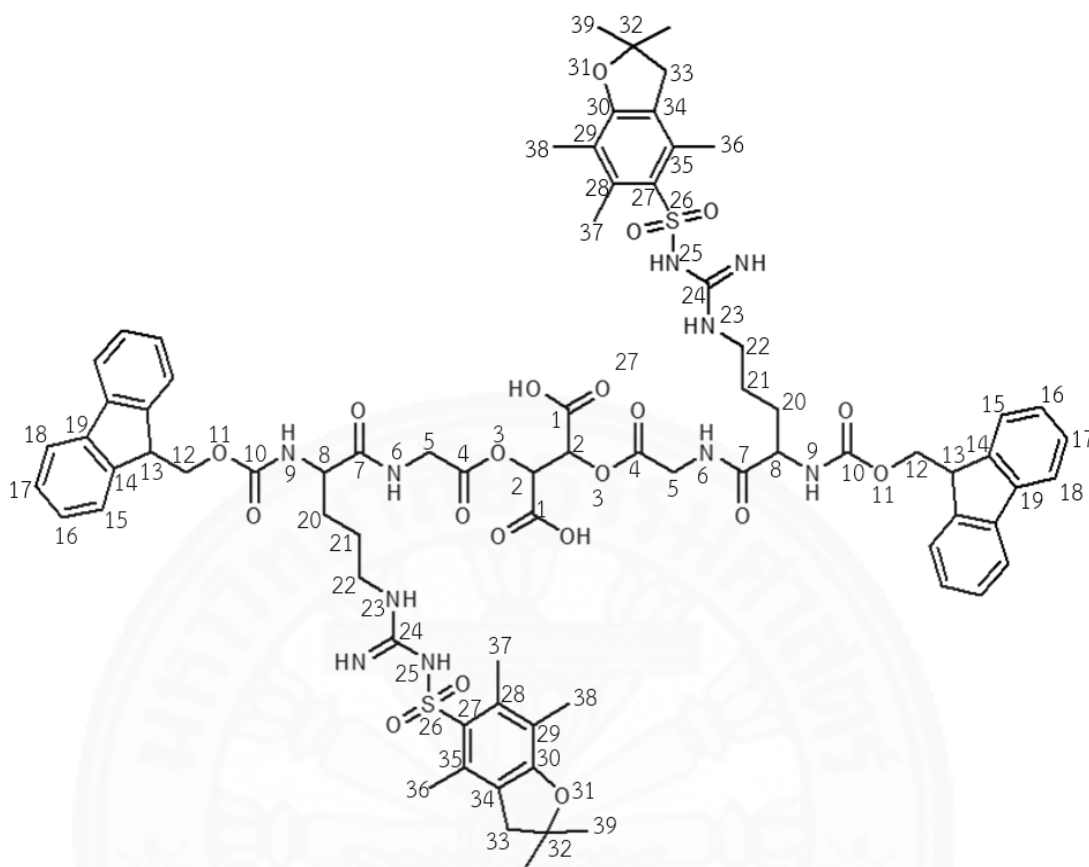
ตาราง 4.4 ค่า  $^1\text{H-NMR}$  และค่า  $^{13}\text{C-NMR}$  เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-ไกลซีน-ไดเมทิลทาร์เทรต (Fmoc-Gly-dimethyl tartrate)

ตำแหน่ง	ค่า chemical shift		ตำแหน่ง	ค่า chemical shift	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$		$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	3.8	53.4	9	4.3	47.2
2	-	169.0	10	-	143.8
3	5.8	71.2	11	7.6	125.1
4	-	166.0	12	7.3	127.1
5	4.4	67.3	13	7.4	127.7
7	-	156.7	14	7.8	119.9
8	4.1	42.2	15	-	141.3



ภาพที่ 4.8 ภาพแสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate

จากการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มกรดอะมิโนตัวถัดมาคืออาร์จินีนเข้าไป โดยใช้ Fmoc-Gly-dimethyl tartrate ทำปฏิกิริยากับเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-2,2,4,6,7-เพนตาเมทิลไดไฮโดรเบนโซฟูแรน-5-ซิลโฟนิล-แอล-อาร์จินีน (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) ในอัตราส่วน 1 : 2.25 สมมูล (1 eq : 2.5 eq) ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate แสดงดังภาพที่ 4.9 ซึ่งลักษณะเป็นตะกอนสีขาว ร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 83 และจากการยืนยันโครงสร้างได้ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี พบพีคโปรตรอน นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^1\text{H-NMR}$ ) ของ Pbf ซึ่งเป็นหมู่ป้องกันหมู่กวานิดีนของกรดอะมิโนอาร์จินีน และพีคของกรดอะมิโนอาร์จินีนที่บริเวณ 1.5 – 3.0 ppm และจากข้อมูลคาร์บอน 13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) ดังแสดงในตาราง 4.4 นอกจากนี้ยังพบว่าเมทิลซึ่งป้องกันหมู่คาร์บอกซิลิกของทาร์ทาริกหลุดทั้งหมดออกโดยพบว่าไม่มีพีคของหมู่เมทิลทั้ง 2 หมู่ ที่ประมาณ 3.8 ppm (จาก  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัม) และหมู่ Fmoc 1 หมู่ซึ่งป้องกันหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนอาร์จินีน เนื่องจากพบว่าค่าอินทิกรัลของไฮโดรเจนที่บริเวณ 7.4 – 7.8 ppm มีค่าลดลง 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่าอินทิกรัลของไฮโดรเจนที่ตำแหน่งอื่นๆ และนอกจากนี้ยังสามารถยืนยันได้จากแมสสเปกตรัม พบพีคของโมเลกุลาร์ไอออน (molecular ion) ที่ 1347.3  $[\text{M}+2\text{Na}+\text{H}]^+$  และ 683.9  $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^{2+}$  ซึ่งแมสของสารจากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 1302.9 ( $\text{C}_{61}\text{H}_{78}\text{N}_{10}\text{O}_{18}\text{S}_2$ )



ภาพที่ 4.9 ภาพแสดงโครงสร้างของ (Fmoc-Arg(Pbf)-Gly)-dimethyl tartrate

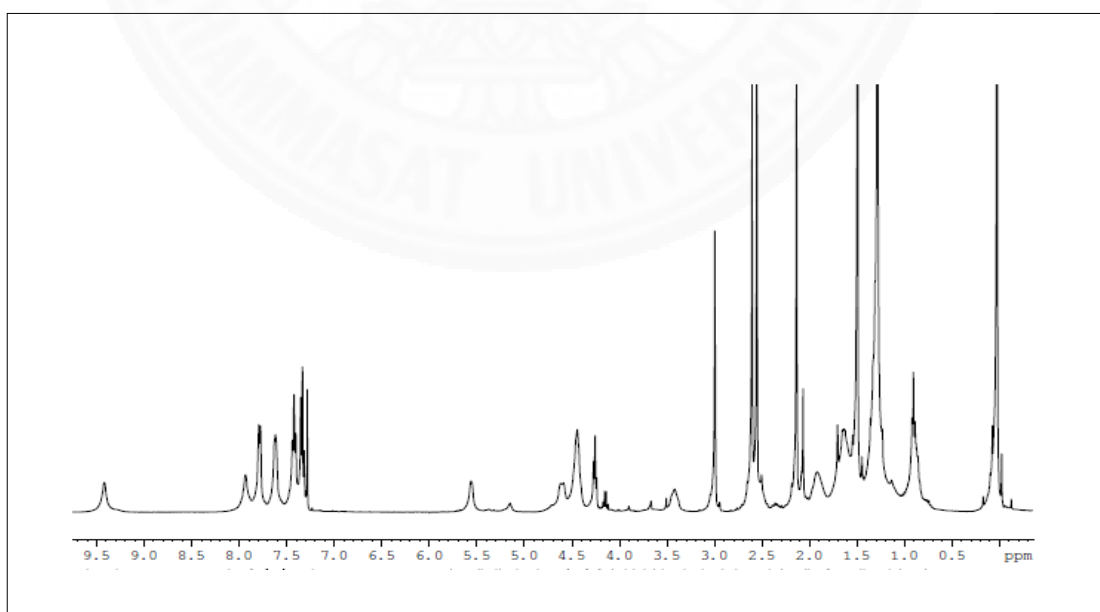
ESI-Mass:  $m/z$  (%rel. intensity) 683.9  $[M+ACN+Na]^{2+}$ , 1347.3  $[M+2Na+H]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.8 (d,  $J = 7.0$ , 2H-18), 7.6 (d, 2H-15), 7.4 (t,  $J = 7.4$ , 2H-17), 7.3 (t,  $J = 7.4$ , 2H-16), 5.6 (s, 2H-2), 4.6 (d,  $J = 12.7$ , 4H-12), 4.5 (s, 4H-5), 4.3 (t,  $J = 6.6$ , 4H-8, 13), 3.0 (s, 4H-33), 2.6 (d,  $J = 19.7$ , 2H-22), 2.2 (s, 18H-36, 37, 38), 1.8 (b, 4H-20), 1.6 (b, 4H-21), 1.5 (s, 6H-39)

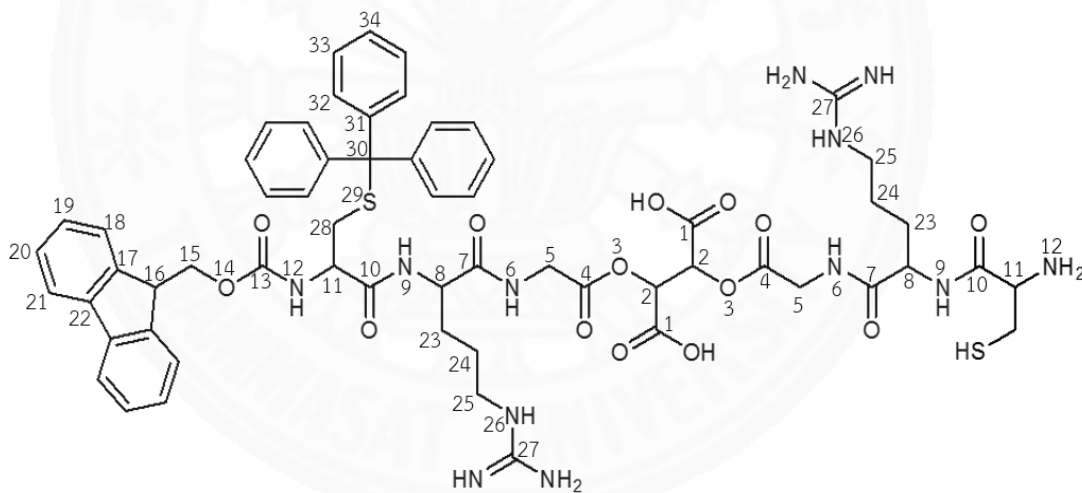
$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  175.6 (C-1), 159.3 (C-7), 155.9 (C-4), 153.8 (C-30), 143.8 (C-24), 143.7 (C-10), 141.4 (C-14), 138.9 (C-19), 132.8 (C-27), 131.7 (C-28, 35), 127.8 (C-16), 127.1 (C-17), 125.0 (C-15), 124.8 (C-34), 119.9 (C-18), 117.8 (C-29), 86.6 (C-32), 77.3 (C-2), 67.2 (C-5), 47.2 (C-8, 13), 43.2 (C-33), 41.9 (C-12), 29.7 (C-20), 28.6 (C-39, 40), 25.3 (C-21), 19.6 (C-22), 12.4 (C-36, 37, 38)

ตาราง 4.5 ค่า  $^1\text{H-NMR}$  และค่า  $^{13}\text{C-NMR}$  ของ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate

ตำแหน่ง	ค่า chemical shift		ตำแหน่ง	ค่า chemical shift	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$		$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	-	175.6	20	1.8	29.7
2	5.6	77.3	21	1.6	25.3
4	-	155.9	22	2.6	19.6
5	4.5	67.2	24	-	143.9
7	-	159.3	27	-	132.8
8, 13	4.3	47.2	28, 35	-	131.7
10	-	143.7	29	-	117.8
12	4.6	41.9	30	-	153.8
14	-	141.4	32	-	86.6
15	7.6	125.0	33	3.0	43.2
16	7.3	127.8	34	-	124.8
17	7.4	127.1	36, 37, 38	2.2	12.4
18	7.8	119.97	39	1.5	28.6
19	-	138.90			

ภาพที่ 4.10 ภาพแสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate

การสังเคราะห์เพื่อเพิ่มกรดอะมิโนตัวถัดมาคือซิสเทอีน โดยใช้ Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate ทำปฏิกิริยากับเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอส-ไทรทิล-แอล-ซิสเทอีน (Fmoc-Cys(Trt)-OH) ในอัตราส่วน 1:2.25 สมมูล (1 eq. : 2.5 eq) ได้ผลิตภัณฑ์คือ Fmoc-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate แสดงดังภาพที่ 4.11 มีลักษณะเป็นตะกอนสีขาว ร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 47 และจากการยืนยันโครงสร้างได้ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี พบพีคโปรตรอน นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^1\text{H-NMR}$ ) ของ กรดซิสทีอีนที่ 4.25 และ 3.00 – 3.18 ppm พีคของหมู่ Trt ที่ 7.3 – 7.4 ppm ไม่พบพีคของ Pbf แสดงว่าหมู่ Pbf หลุดออก และจากข้อมูลคาร์บอน นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) ดังแสดงในตาราง 4.6 จากค่าอินทิกรัลอาจจะไม่สามารถยืนยันได้แน่ชัดว่ามีหมู่ Fmoc หลุดหนึ่งหมู่ และ Trt หลุด 1 หมู่ เนื่องจากสารไม่บริสุทธิ์จึงให้ค่าอินทิกรัลที่มากกว่าปกติ แต่สามารถยืนยันได้จากแมสสเปกตรัม พบพีคของโมเลกุลาร์ไอออน (molecular ion) ที่ 1350.7  $[\text{M}+2\text{ACN}+\text{Na}]^+$  และ 685.7  $[\text{M}+3\text{ACN}+2\text{H}]^{2+}$  ซึ่งแมสของสารจากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 1246.5 ( $\text{C}_{60}\text{H}_{70}\text{N}_{12}\text{O}_{14}\text{S}_2$ )



ภาพที่ 4.11 ภาพแสดงโครงสร้างของ Fmoc-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate

HPLC (Supelco Discovery C18 250 mm  $\times$  4.6 mm column, acetonitrile in water, gradient from 0% to 100% in 60 min):  $R_t$  52.5

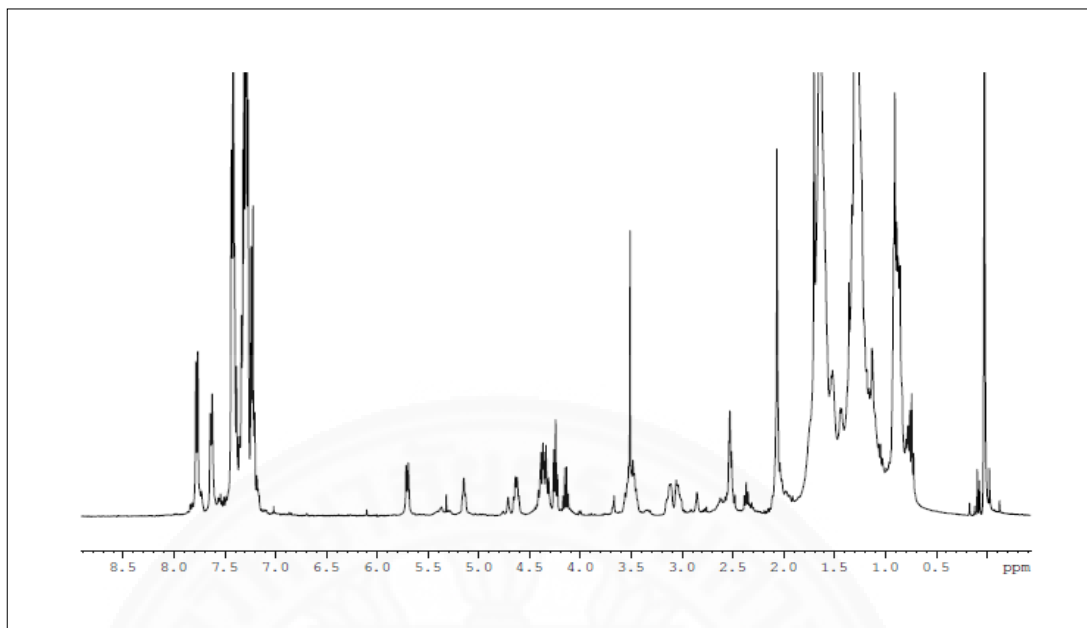
ESI-Mass:  $m/z$  (%rel. intensity): 1350.7  $[\text{M}+2\text{ACN}+\text{Na}]^+$ , 685.7  $[\text{M}+3\text{ACN}+2\text{H}]^{2+}$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.8 (d,  $J = 7.4$ , 4H-21), 7.7 (d,  $J = 7.2$ , 4H-18), 7.4 (t,  $J = 7.3$ , 2H-20), 7.4 – 7.3 (m, 17H-31, 32, 33), 5.7 (d,  $J = 8.7$ , 2H-2), 5.3 (t,  $J = 6.5$ , 2H-16), 4.6 (dd,  $J = 13.8$ ,  $J = 7.5$ , 2H-15), 4.4 - 4.3 (m, 6H-5, 8), 4.2 (t,  $J = 7.2$ , 2H-11), 3.2 -3.0 (d,  $J = 24.8$ , 4H-28), 2.6 (t,  $J = 4.1$ , 4H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  168.4 (C-1), 155.7 (C-13), 146.9 (C-7), 144.6 (C-4), 144.0 (C-27), 143.9 (C-10), 141.3 (C-17, 31), 135.0 (C-22), 129.6 (C-32), 128.0 (C-20), 127.7 (C-31), 126.9 (C-33), 126.8 (C-19), 125.2 (C-18), 119.9 (C-21), 77.2 (C-2), 67.1 (C-5, 8), 54.9 (C-30), 49.9 (C-11), 47.2 (C-16), 43.4 (C-15), 29.9 (C-23), 26.4 (C-24), 25.4 (C-28), 23.4 (C-25)

ตาราง 4.6 ค่า  $^1\text{H-NMR}$  และค่า  $^{13}\text{C-NMR}$  Fmoc-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate

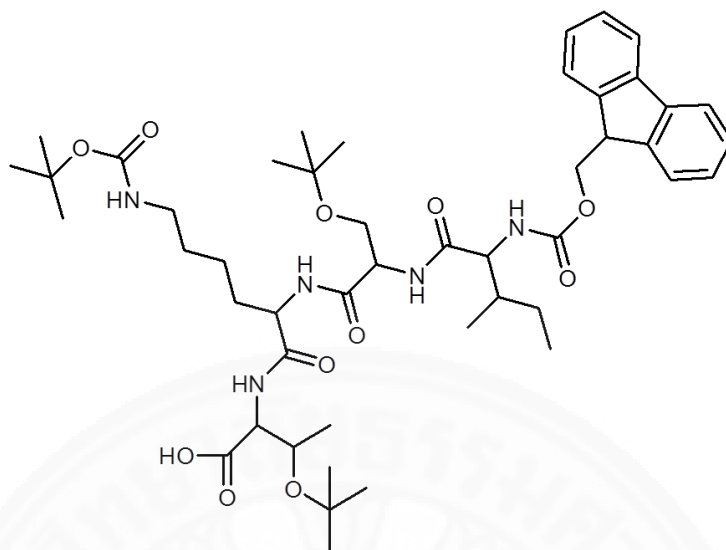
ตำแหน่ง	ค่า chemical shift		ตำแหน่ง	ค่า chemical shift	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$		$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	-	168.4	20	7.40	128.0
2	5.7	77.2	21	7.8	119.9
4	-	144.5	22	-	135.0
5, 8	4.4 - 4.3	67.1	23	-	29.7
7	-	146.9	24	-	26.7
10	-	143.9	25	2.6	23.4
11	4.3	49.9	27	-	144.09
13	-	155.7	28	3.2 -3.0	25.4
15	4.6	43.4	30	-	54.9
16	5.3	47.2	31	7.4 – 7.3	127.7
17, 31	-	141.3	32	7.4 – 7.3	129.6
18	7.7	125.2	33	7.4 – 7.3	126.9
19	7.4 – 7.3	126.8			



ภาพที่ 4.12 ภาพแสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของ Fmoc-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate

#### 4.1.2 การสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์

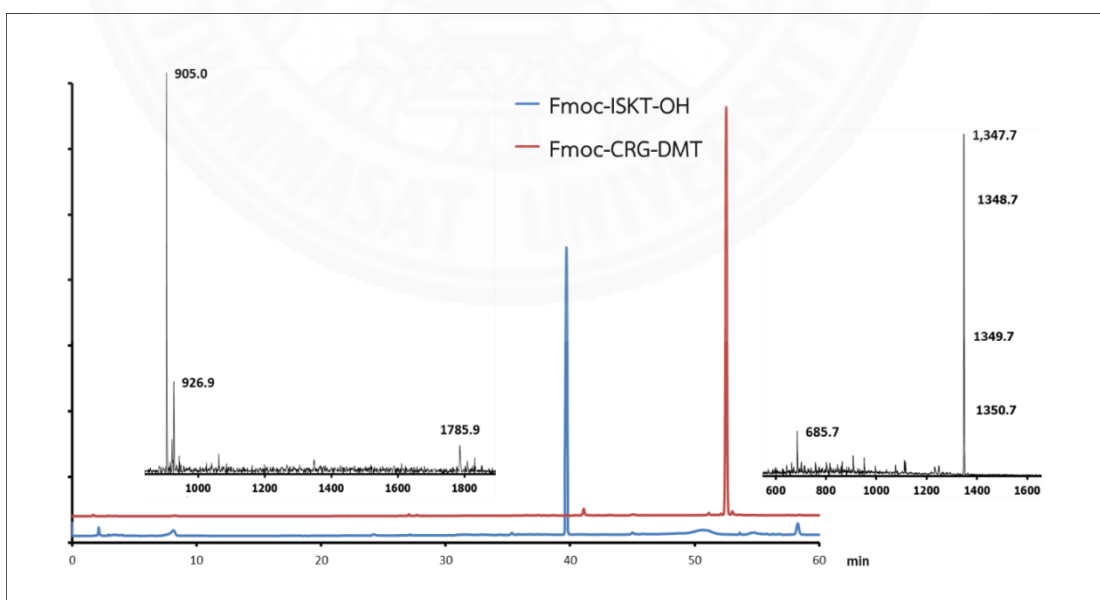
สังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ด้วยวิธีทางเคมีโดยสังเคราะห์โดยวิธีการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis (SPPS)) และมี 2-คลอโรไตรทิลคลอไรด์เรซิน (2-chlorotriethyl chloride resin) เป็นวัฏภาคของแข็ง ซึ่งสายโซ่นี้ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 4 ตัวคือ ไอโซลิวซีน, ซีรีน, ไลซีน และทรีโอนีนโดยกรดอะมิโนแต่ละตัวมีหมู่ปกป้อง จากนั้นจึงทำการตัดสายโซ่เปปไทด์ออกจากเรซินโดยใช้สารละลาย 1% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด/ไดคลอโรมีเทน (1% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) จะได้ Fmoc-Ile-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH มีลักษณะเป็นตะกอนสีขาวและร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 88 และแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยพบพีคของสารที่เวลา 39.7 นาที และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (MS) พบพีคของโมเลกุลาร์ไอออน (Molecular ion) ที่ 1785.9 [2M+Na]<sup>+</sup> และ 905.0 [M+Na]<sup>+</sup> ซึ่งแมสของสารจากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 881.5 (C<sub>47</sub>H<sub>71</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>)



ภาพที่ 4.13 แสดงโครงสร้างของสายโซ่เปปไทด์ (Fmoc-Ile-Ser<sup>(t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr<sup>(t</sup>Bu)-OH)

HPLC (Supelco Discovery C18 250 mm × 4.6 mm column, acetonitrile in water, gradient from 0% to 100% in 60 min):  $R_t$  39.7

ESI-Mass:  $m/z$  (%rel. intensity) 1785.9  $[2M+Na]^+$ , 905.0  $[M+Na]^+$

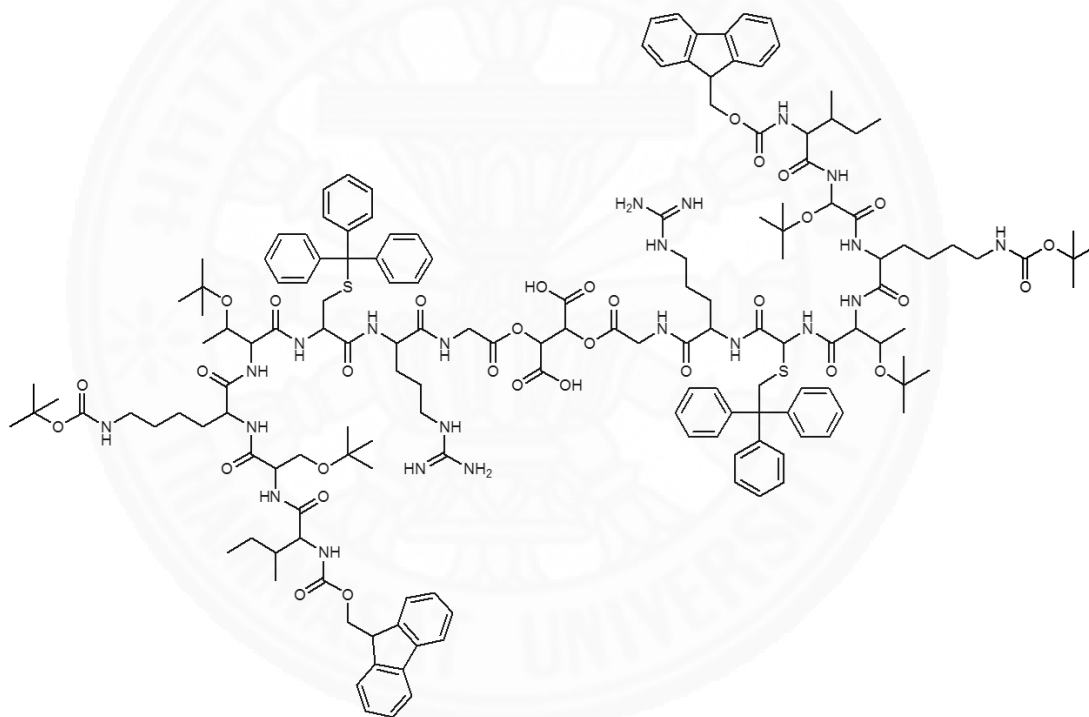


ภาพที่ 4.14 ภาพแสดงแมสสเปกตรัมและ HPLC สเปกตรัมของ Fmoc-ISKT-OH (สีน้ำเงิน) และ Fmoc-CRG-DMT (สีแดง)



#### 4.1.3 การเพิ่มสายโซ่เปปไทด์เข้าไปในแกนของโครงสร้าง (peptide ligation)

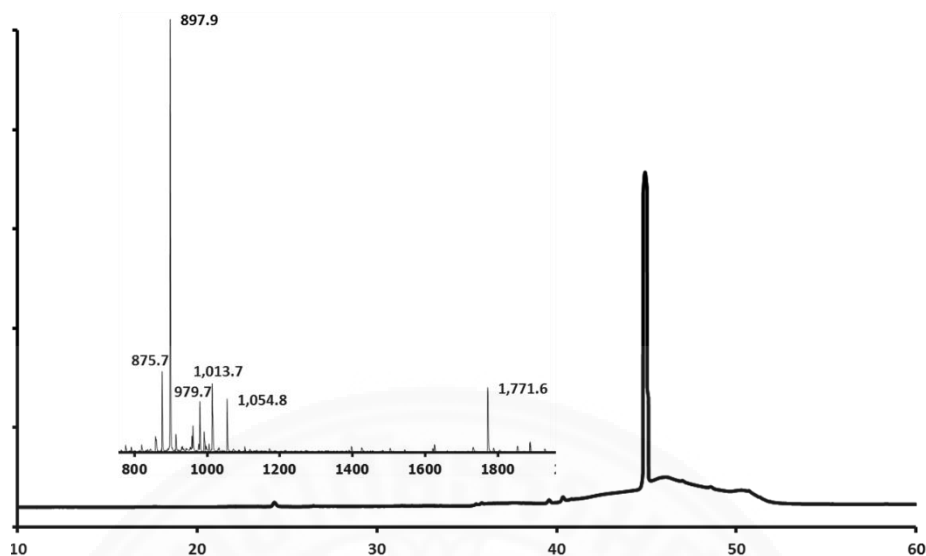
สังเคราะห์สายการเชื่อมต่อ (coupling) โซ่เปปไทด์ กับแกนโครงสร้างที่เป็นทาร์ทาริกแอซิด โดยใช้ Fmoc-Ile-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH กับ Fmoc-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-dimethyl tartrate ในอัตราส่วน 3 : 1 สมมูล (3 eq : 1 eq) ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นตะกอนสีขาวและร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 7 ซึ่งโครงสร้างของสารแสดงดังภาพที่ 4.15 แยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบพีคของสารที่เวลา 44.9 นาที และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี (MS) พบพีคของโมเลกุลาร์ไอออน (molecular ion) ที่ 1771.6 [M+2Na]<sup>2+</sup>, 897.9 [M+4Na]<sup>4+</sup> ซึ่งแมสของสารจากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 3497.8 (C<sub>186</sub>H<sub>248</sub>N<sub>22</sub>O<sub>38</sub>S<sub>4</sub>)



ภาพที่ 4.15 ภาพแสดงโครงสร้างของ Fmoc-Ile-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr(<sup>t</sup>Bu)-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate

HPLC (Supelco Discovery C18 250 mm × 4.6 mm column, acetonitrile in water, gradient from 0% to 100% in 60 min): R<sub>t</sub> 44.9

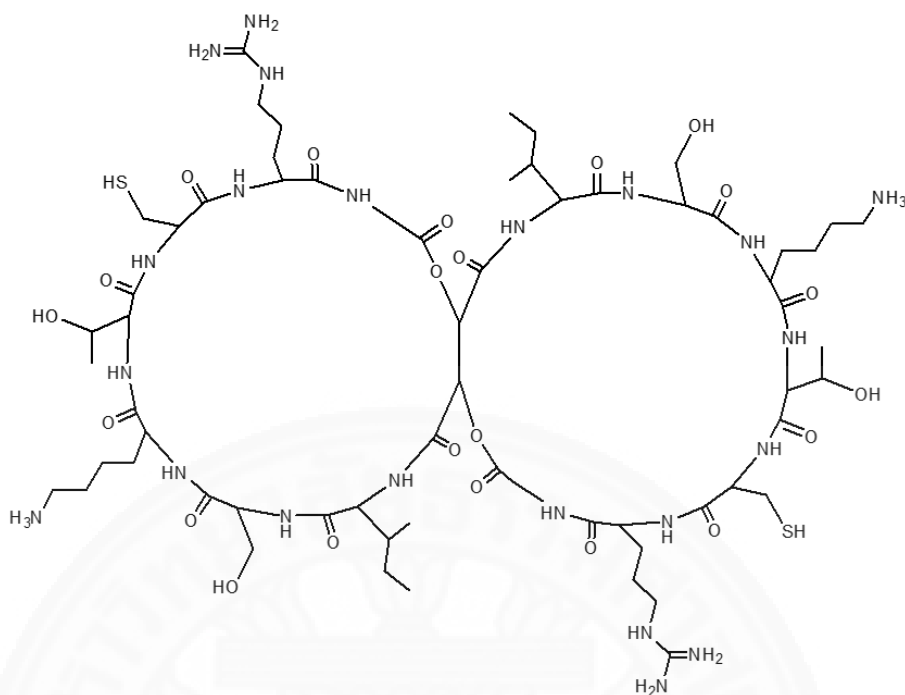
ESI-Mass: *m/z* (%rel. intensity): 1771.6 [M+2Na]<sup>2+</sup>, 897.9 [M+4Na]<sup>4+</sup>



ภาพที่ 4.16 ภาพแสดงแมสสเปกตรัมและ HPLC สเปกตรัมของ Fmoc-Ile-Ser<sup>(t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr<sup>(t</sup>Bu)-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate

#### 4.1.4 การปิดวง (cyclization) และการกำจัดหมู่ป้องกัน (deprotecting)

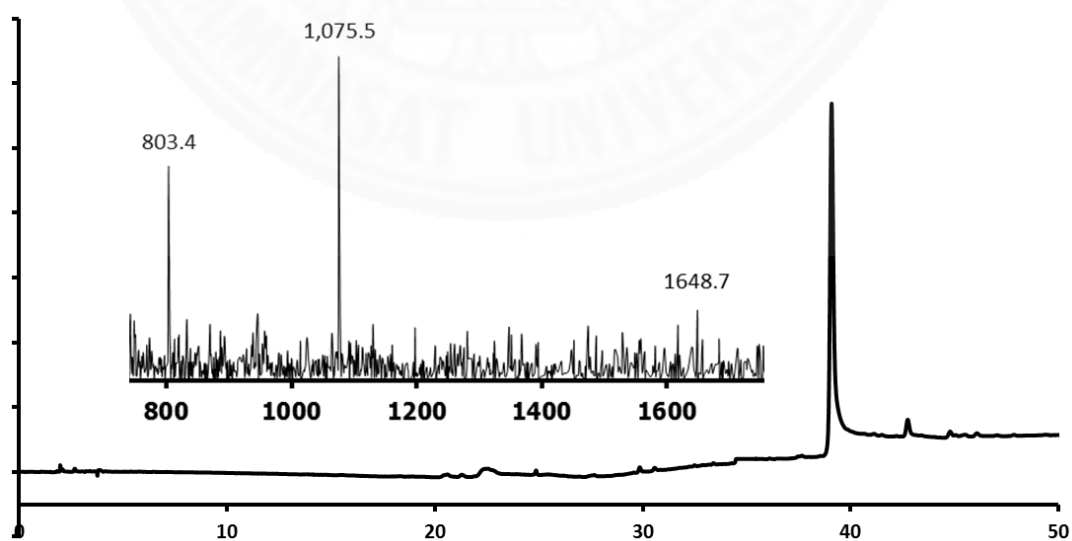
จากการสังเคราะห์การปิดวง (cyclization) โดยใช้ Fmoc-Ile-Ser<sup>(t</sup>Bu)-Lys(Boc)-Thr<sup>(t</sup>Bu)-Cys(Trt)-Arg-Gly-dimethyl tartrate : DIPEA : HATU ในอัตราส่วน 1 : 12 : 6 สมมูล (1 eq. : 12 eq. : 6 eq.) และจากการกำจัดหมู่ป้องกันออกจะได้ผลิตภัณฑ์คือ bivalent peptidic inhibitor แสดงดังรูปที่ 4.17 มีลักษณะเป็นผลึก ร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 3 แยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบพีคของสารที่เวลา 39.0 นาที และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (MS) พบพีคของโมเลกุลาร์ไอออน (molecular ion) ที่ 1648.7 [M+ACN+H]<sup>+</sup>, 803.4 [M+2H]<sup>2+</sup> และพีคของ fragment ที่ 274.6 [M-tartaric-2GTKSI-RC]<sup>+</sup>, 701.9 [M-tartaric-2-RCTKSI]<sup>+</sup>, 1075.5 [M-GRCTK] ซึ่งแมสของสารจากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 1605 (C<sub>64</sub>H<sub>112</sub>N<sub>22</sub>O<sub>22</sub>S<sub>2</sub>)



ภาพที่ 4.17 ภาพแสดงโครงสร้างของ bivalent peptidic inhibitor

HPLC (Supelco Discovery C18 250 mm × 4.6 mm column, acetonitrile in water, gradient from 0% to 100% in 60 min):  $R_t$  39.0

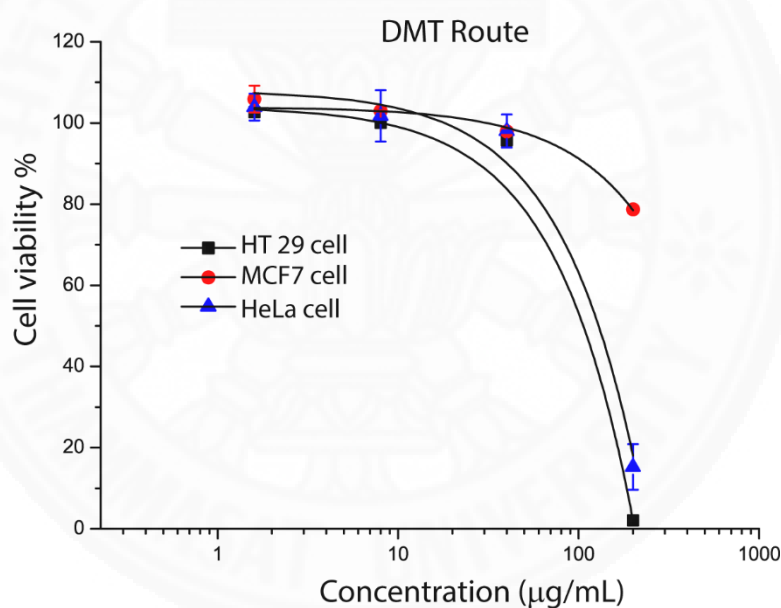
ESI-Mass:  $m/z$  (%rel. intensity) 1648.7 [M+ACN+H]<sup>+</sup>, 803.4 [M+2H]<sup>2+</sup>, 274.6 [M-tartaric-2GTKSI-RC]<sup>+</sup>, 701.9 [M-tartaric-2-RCTKSI]<sup>+</sup> และ 1075.5 [M-GRCTK]



ภาพที่ 4.18 ภาพแสดงแมสสเปกตรัมและ HPLC สเปกตรัมของ bivalent peptidic inhibitor

#### 4.2 การทดสอบการออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) ของ bivalent SFTI-1 inhibitor

ทดสอบการออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งตัวของยับยั้งที่สังเคราะห์ขึ้นโดยทดสอบ bivalent SFTI-1 inhibitor กับเซลล์มะเร็งดังนี้ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และพบว่า bivalent SFTI-1 inhibitor มีฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งในระดับไมโครโมลาร์ ( $\mu\text{M}$ ) สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มีค่า  $\text{IC}_{50} = 33 \pm 0.5 \mu\text{M}$  เซลล์มะเร็งปากมดลูก  $\text{IC}_{50} = 54 \pm 0.8 \mu\text{M}$  แต่ไม่พบฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งเต้านมที่ระดับความเข้มข้น  $100 \mu\text{M}$



ภาพที่ 4.19 กราฟแสดงค่าการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

การศึกษาและการสังเคราะห์ bivalent peptidic inhibitor ทำให้มีตัวยับยั้งตัวใหม่ที่มีฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง จึงเป็นตัวยับยั้งที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคมะเร็งต่อไป และโรคอื่นๆ ที่มีสาเหตุมาจากเอนไซม์ทริปเปส นอกจากนี้ยังสามารถใช้ bivalent peptidic inhibitor เป็นต้นแบบเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ตัวยับยั้งอื่นๆ โดยการปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนให้มีความเหมาะสมกับเอนไซม์ที่ต้องการได้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาและพัฒนาการสังเคราะห์ bivalent peptidic inhibitor โดยตัวยับยั้งที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นเปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นวง 2 วง (bicyclic peptide) และมีส่วนที่สามารถยับยั้งการจับตัวของเอนไซม์ (inhibitory loop) ถึงสองตำแหน่งภายในโมเลกุลเดียว โดยจากโครงสร้างหลักของ bivalent peptidic inhibitor จะประกอบด้วย 2 ส่วนด้วยกันคือส่วนที่เป็นแกนของโครงสร้าง ซึ่งสังเคราะห์มาจากทาร์ทาริกแอซิด (tartaric acid) และส่วนที่ยับยั้งการจับตัวของเอนไซม์ (inhibitory loop) ซึ่งเป็นสายโซ่เปปไทด์ที่มาจากตัวยับยั้งที่พบได้ในธรรมชาติคือ SFTI-1 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสที่มีขนาดเล็กและสามารถพบในเมล็ดทานตะวัน โดยในการสังเคราะห์จะมีการปกป้องหมู่คาร์บอกซิลในรูปของ dimethylester เพื่อหลีกเลี่ยงปฏิกิริยาที่อาจจะเกิดขึ้นแข่งขัน แล้วทำปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอไมด์กับกรดอะมิโนตัวแรกคือไกลซีน (glycine) แล้วตามด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) และซิสทีอีน (cysteine) ตามลำดับ

ในส่วนของกลุ่มที่ยับยั้งการจับตัว (inhibitory loop) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 ตัวคือ กรดอะมิโนทรีโอนีน (thr) กรดอะมิโนไลซีน (lys) กรดอะมิโนซีรีน (ser) และกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (Ile) สังเคราะห์ด้วยวิธีการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis) หลังจากนั้นจึงต่อสายโซ่เปปไทด์ส่วนนี้เข้ากับแกนของโครงสร้าง และทำการปิดวง (cyclization) เป็นขั้นตอนสุดท้าย และตรวจยืนยันโครงสร้างและมวลโมเลกุลด้วยวิธีทางสเปกโตรสโคปีและยืนยันความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) และจากการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) ของ bivalent peptidic inhibitor พบว่าสามารถในการแสดงฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งในระดับไมโครโมลาร์ ( $\mu\text{M}$ ) สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มีค่า  $\text{IC}_{50} = 33 \pm 0.5 \mu\text{M}$  เซลล์มะเร็งปากมดลูกมีค่า  $\text{IC}_{50} = 54 \pm 0.8 \mu\text{M}$  แต่ไม่พบฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งเต้านมที่ระดับความเข้มข้น  $100 \mu\text{M}$

ในการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ ของ bivalent peptidic inhibitor ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้ นอกจากการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งแล้ว กลุ่มวิจัยมีจุดมุ่งหมายเพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อื่นๆ อาทิ เอนไซม์ทริพซิน (trypsin), อีลาสเตส (elastase), ทริปเทส (trypsinase) และมาทริปเทส (matrypsin) ในอนาคตต่อไปโดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนไลซีนที่ตำแหน่งที่ 1 (P1) ให้มีความเหมาะสมที่จะสามารถจับกับ S1 pocket ของเอนไซม์

ตัวอื่นๆ ได้ นอกจากนี้ยังสามารถออกแบบการทดลองโดยการทดลองเปลี่ยนแกนของโครงสร้างให้มีความยาวเพิ่มมากขึ้น เพื่อที่จะสามารถเพิ่มสายโซ่เปปไทด์ให้มีลำดับกรดมิโนที่ยาวขึ้นได้อีกด้วย



## รายการอ้างอิง

1. ชลัญจกร โยธาสมุทร, อภิญญา มัตเตซ, วรุฒ เลิศศราวุธ, นรินทร์ธร จันทร์ไพจิตร, อนงค์วดี ด่านปาน, เบญจรินทร์ สันตติวงศ์ไชย. รั้วรอบ หอบหืดเด็ก. จุลสารโครงการประเมินเทคโนโลยีและนโยบายด้านสุขภาพ. 2559;9(27):1-24
2. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. BMC Public Health. 2012;12:204.
3. Lai CKW, Beasley R, Crane J, Foliaki S, Shah J, Weiland S, et al. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: Phase Three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Thorax. 2009;64(6):476-83.
4. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez Mí G, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2014;8(7).
5. สยามเฮลท์. *โรคหอบหืด*. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2558, จาก [http://www.siamhealth.net/public\\_html/Disease/Respiratory/asthma1/Asthma.htm#VyYoLdR97IU](http://www.siamhealth.net/public_html/Disease/Respiratory/asthma1/Asthma.htm#VyYoLdR97IU)
6. อารยา. (2551). *โรคหอบหืดคืออะไร*. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2558, จาก <http://www.thaihealth.or.th/node/6850>
7. กลุ่มพัฒนาระบบ กองพัฒนาศักยภาพผู้บริโภค. (2545). *รู้จักสเต็มเซลล์หรือยัง*. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2558, จาก <http://webnotes.fda.moph.go.th/consumer/csmb/csmb2546.nsf/723dc9fee41b850847256e5c00332fb4/0aedb8b0fe960133c7256cbb0025d1a9?OpenDocument>
8. Fajardo I, Pejler G. Formation of active monomers from tetrameric human beta-tryptase. Biochemical Journal. 2003;369(Pt 3):603-10.
9. วันวิสา. (2545). *กรณีศึกษาประสิทธิภาพการดูแลโรคหืดในเด็ก*. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2558, จาก <http://hpc11.go.th/information/7.1/3.9/38.pdf>

10. Boonsawat W, Charoenphan P, Kiatboonsri S, Wongtim S, Viriyachaiyo V, Pothirat C, et al. Survey of asthma control in Thailand. *Respirology (Carlton, Vic)*. 2004;9(3):373-8.
11. Outtrup H, Boyce COL. Microbial Proteinases and Biotechnology. In: Fogarty WM, Kelly CT, editors. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1990. p. 227-54.
12. Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 1999;17(7):561-94.
13. Monod M, Borg-von ZM. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biological chemistry*. 2002;383(7-8):1087-93.
14. Inagami T. THE MECHANISM OF THE SPECIFICITY OF TRYPSIN CATALYSIS. I. INHIBITION BY ALKYL AMMONIUM IONS. *The Journal of biological chemistry*. 1964;239:787-91.
15. Qi R-F, Song Z-W, Chi C-W. Structural Features and Molecular Evolution of Bowman-Birk Protease Inhibitors and Their Potential Application. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2005;37(5):283-92.
16. Lesner A, Legowska A, Wysocka M, Rolka K. Sunflower trypsin inhibitor 1 as a molecular scaffold for drug discovery. *Current pharmaceutical design*. 2011;17(38):4308-17.
17. de Veer SJ, Wang CK, Harris JM, Craik DJ, Swedberg JE. Improving the Selectivity of Engineered Protease Inhibitors: Optimizing the P2 Prime Residue Using a Versatile Cyclic Peptide Library. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;58(20):8257-68.
18. Zabłotna E, Kaźmierczak K, Jaśkiewicz A, Kupryszewski G, Rolka K. Inhibition of bovine  $\alpha$ -chymotrypsin by cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds and its two acyclic analogues. *Letters in Peptide Science*. 2002;9(2):131-4.
19. Lesner A, Karna N, Psurski M, Legowska A, Wysocka M, Guzow K, et al. Fluorescent analogs of trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds--synthesis and applications. *Biopolymers*. 2014;102(1):124-35.



20. Jiang S, Li P, Lee S-L, Lin CY, Long Y-Q, Johnson MD, et al. Design and Synthesis of Redox Stable Analogues of Sunflower Trypsin Inhibitors (SFTI-1) on Solid Support, Potent Inhibitors of Matriptase. *Organic Letters*. 2007;9(1):9-12.
21. Schaschke N, Dominik A, Matschiner G, Sommerhoff CP. Bivalent inhibition of beta-tryptase: distance scan of neighboring subunits by dibasic inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2002;12(6):985-8.
22. Schaschke N, Matschiner G, Zettl F, Marquardt U, Bergner A, Bode W, et al. Bivalent inhibition of human  $\beta$ -tryptase. *Chemistry & Biology*. 2001;8(4):313-27.
23. Sommerhoff CP. Mast Cell Tryptases and Airway Remodeling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001;164(supplement\_2):S52-S8.
24. Schaschke N, Matschiner G, Zettl F, Marquardt U, Bergner A, Bode W, et al. Bivalent inhibition of human beta-tryptase. *Chem Biol*. 2001;8(4):313-27.
25. Selwood T, Elrod KC, Schechter NM. Potent bivalent inhibition of human tryptase-beta by a synthetic inhibitor. *Biological chemistry*. 2003;384(12):1605-11.
26. Lian W, Upadhyaya P, Rhodes CA, Liu Y, Pei D. Screening Bicyclic Peptide Libraries for Protein-Protein Interaction Inhibitors: Discovery of a Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Antagonist. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(32):11990-5.
27. Angelini A, Cendron L, Chen S, Touati J, Winter G, Zanotti G, et al. Bicyclic peptide inhibitor reveals large contact interface with a protease target. *ACS chemical biology*. 2012;7(5):817-21.
28. Desamero RZ, Kang J, Dol C, Chinwong J, Walters K, Sivarajah T, et al. Spectroscopic characterization of the SH2- and active site-directed peptide sequences of a bivalent Src kinase inhibitor. *Applied spectroscopy*. 2009;63(7):767-74.
29. Carrithers MD, Lerner MR. Synthesis and characterization of bivalent peptide ligands targeted to G-protein-coupled receptors. *Chemistry & Biology*. 1996;3(7):537-42.
30. Su Z, Vinogradova A, Koutychenko A, Tolkathev D, Ni F. Rational design and selection of bivalent peptide ligands of thrombin incorporating P4-P1 tetrapeptide

sequences: from good substrates to potent inhibitors. Protein engineering, design & selection : PEDS. 2004;17(8):647-57.25. Selwood, T., Elrod, K. C., and Schechter, N. M. (2003) Potent Bivalent Inhibition of Human Trypsin by a Synthetic Inhibitor. in *Biological Chemistry*

31. Karoly Agoston, Armin Geyer, Burkhard König, Michael Kruppa and Andreas Grauer. COMBINATORIAL CHEMISTRY AND SOLID PHASE SYNTHESIS: SEMINAR AND LABORATORY COURSE. *Department of Chemistry and Pharmacy – Universität Regensburg*. Handbook



ภาคผนวก



## ภาคผนวก ก

### การเตรียมสารละลาย

#### การเตรียมสารละลาย 20% พีเพอริดีน (20% piperidine/DMF)

เติมไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ 8 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมพีเพอริดีน 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะทำปฏิกิริยา

#### การเตรียมสารละลาย 1% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (1% TFA/DCM)

เติมไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดเซนตริฟิวส์ หลังจากนั้นเติมไดคลอโรมีเทน (DCM) 9.9 มิลลิลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากัน

#### การเตรียมสารละลาย 0.3M Fmoc-Lys(Boc)-OH

ชั่ง Fmoc-Lys(Boc)-OH 0.4217 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ จากนั้นเติมไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) จนกระทั่งสารละลายมีปริมาณเท่ากับ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเขย่าให้ละลายควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะทำปฏิกิริยา

#### การเตรียมสารละลาย 0.3M Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH

ชั่ง Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH 0.3451 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ จากนั้นเติมไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) จนกระทั่งสารละลายมีปริมาณเท่ากับ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเขย่าให้ละลายควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะทำปฏิกิริยา

#### การเตรียมสารละลาย 0.3M Fmoc-Ile-OH

ชั่ง Fmoc-Ile-OH 0.2121 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ จากนั้นเติมไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) จนกระทั่งสารละลายมีปริมาณเท่ากับ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเขย่าให้ละลายควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะทำปฏิกิริยา

#### การเตรียมสารละลาย 0.3M DCC

ชั่ง DCC 0.6189 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ จากนั้นเติมไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) จนกระทั่งสารละลายมีปริมาณเท่ากับ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเขย่าให้ละลายควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะทำปฏิกิริยา


**การเตรียมสารละลาย 0.3M DMAP**

ชั่ง DMAP 0.3660 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ จากนั้นเติมไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) จนกระทั่งสารละลายมีปริมาณเท่ากับ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเขย่าให้ละลายควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะทำปฏิกิริยา

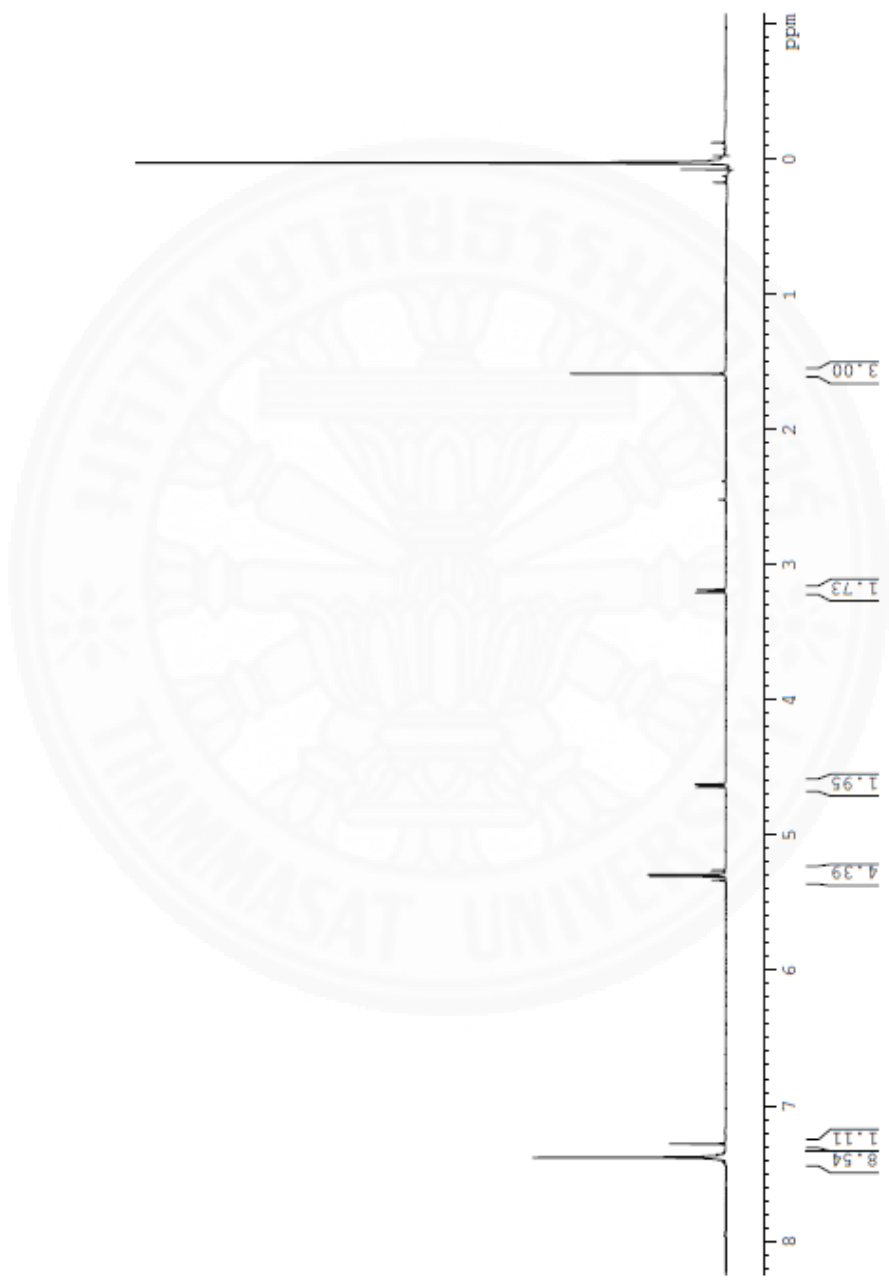
**การเตรียมสารละลาย 0.3M HOBT**

ชั่ง HOBT 0.5088 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ จากนั้นเติมไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) จนกระทั่งสารละลายมีปริมาณเท่ากับ 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเขย่าให้ละลายควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะทำปฏิกิริยา



The image features a large, faint watermark of the Thammasat University seal in the background. The seal is circular and contains the university's name in Thai and English, along with a central emblem. Overlaid on this seal is the following text:

ภาคผนวก ข  
สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา

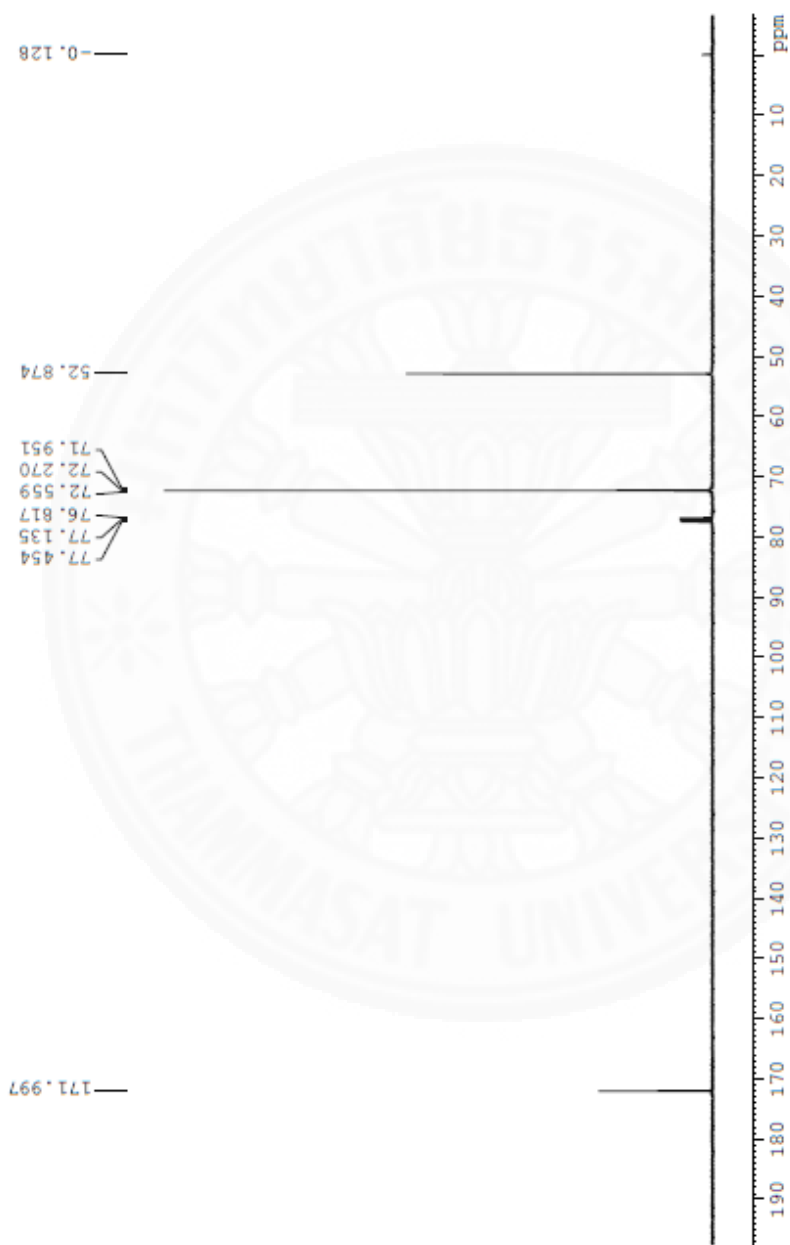


ภาพที่ ๑1  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ dibenzyl tartrate

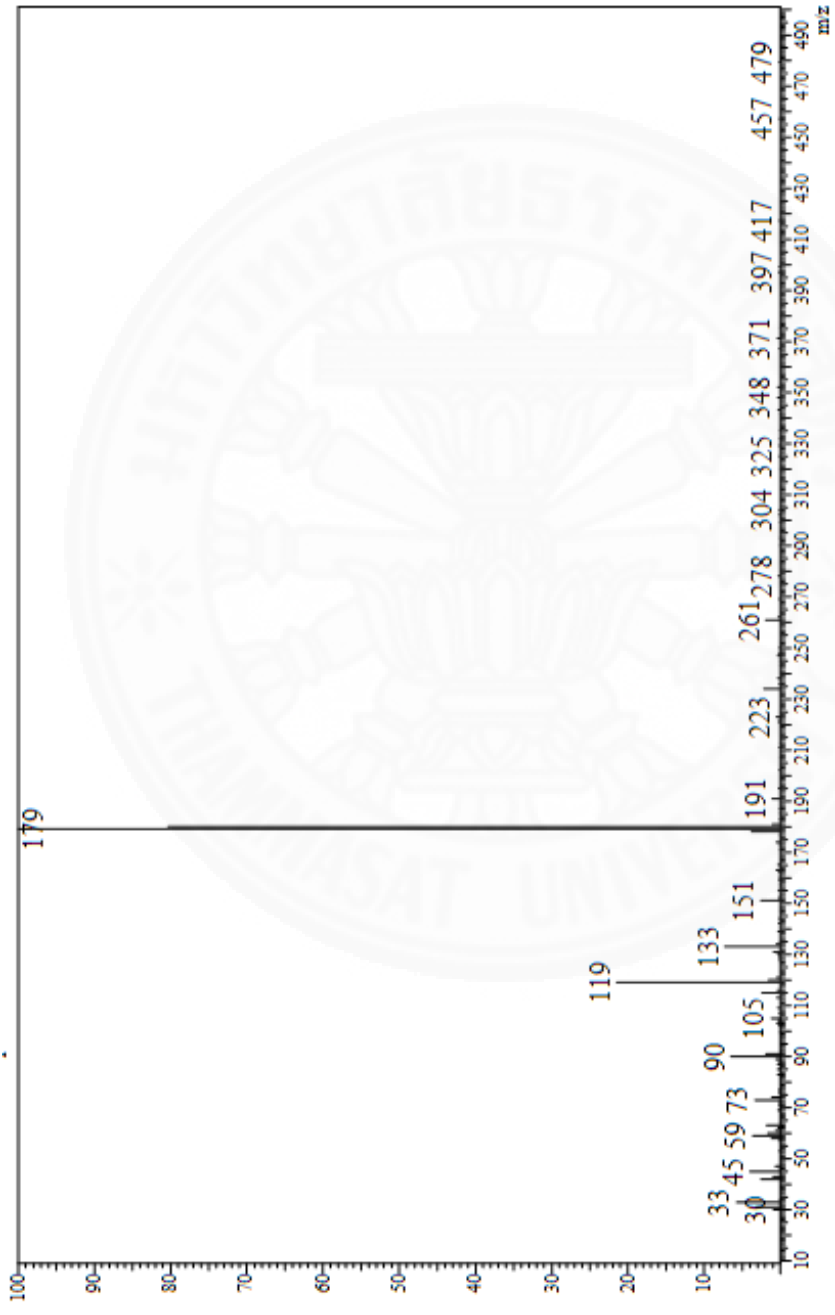


ภาพที่ ๑๒  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ dimethyl tartrate

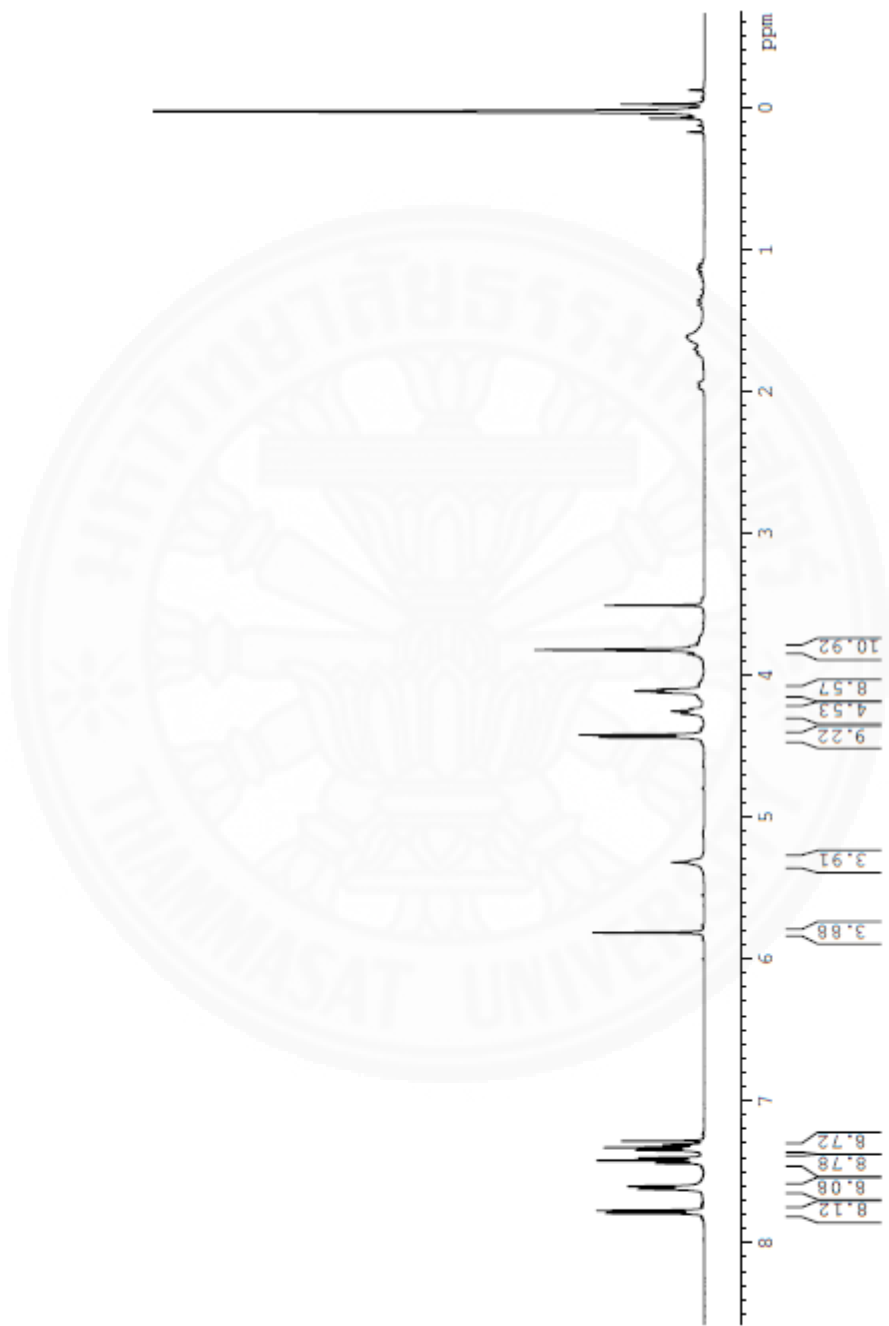




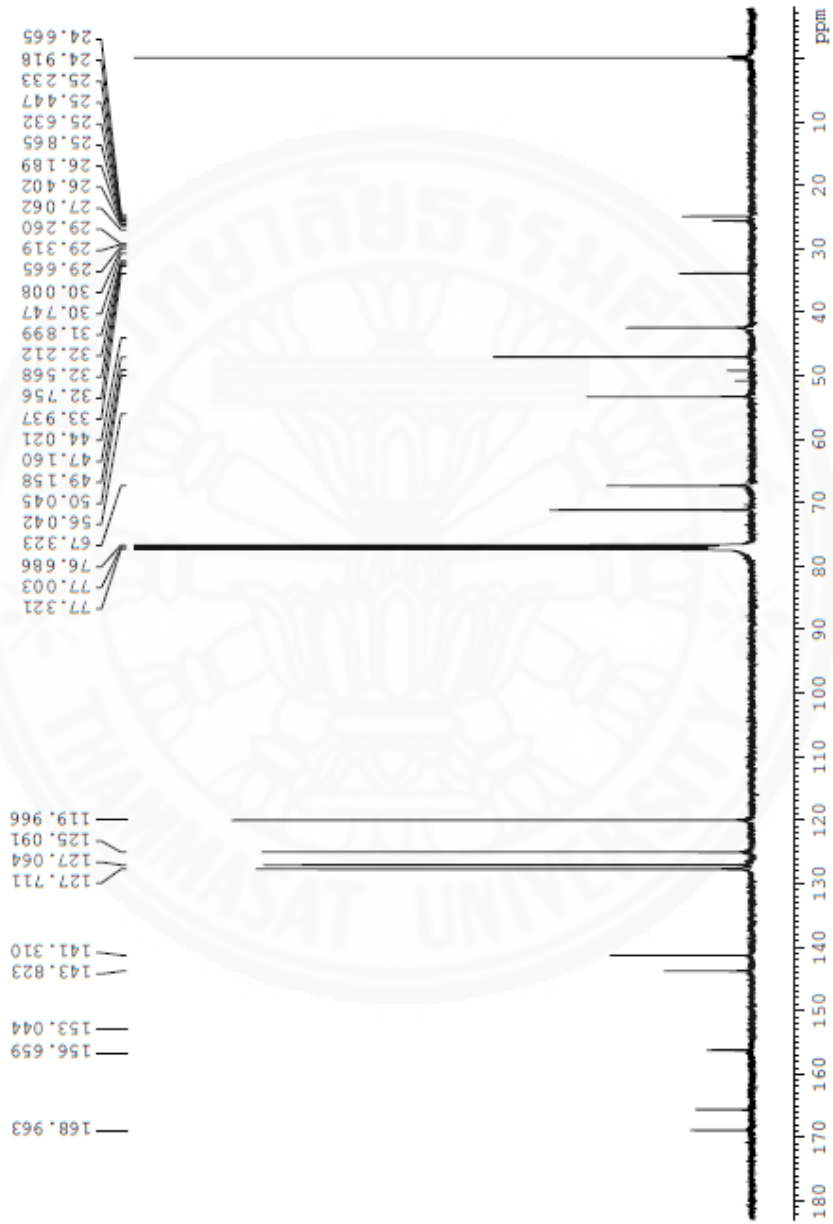
ภาพที่ ๓  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ dimethyl tartrate



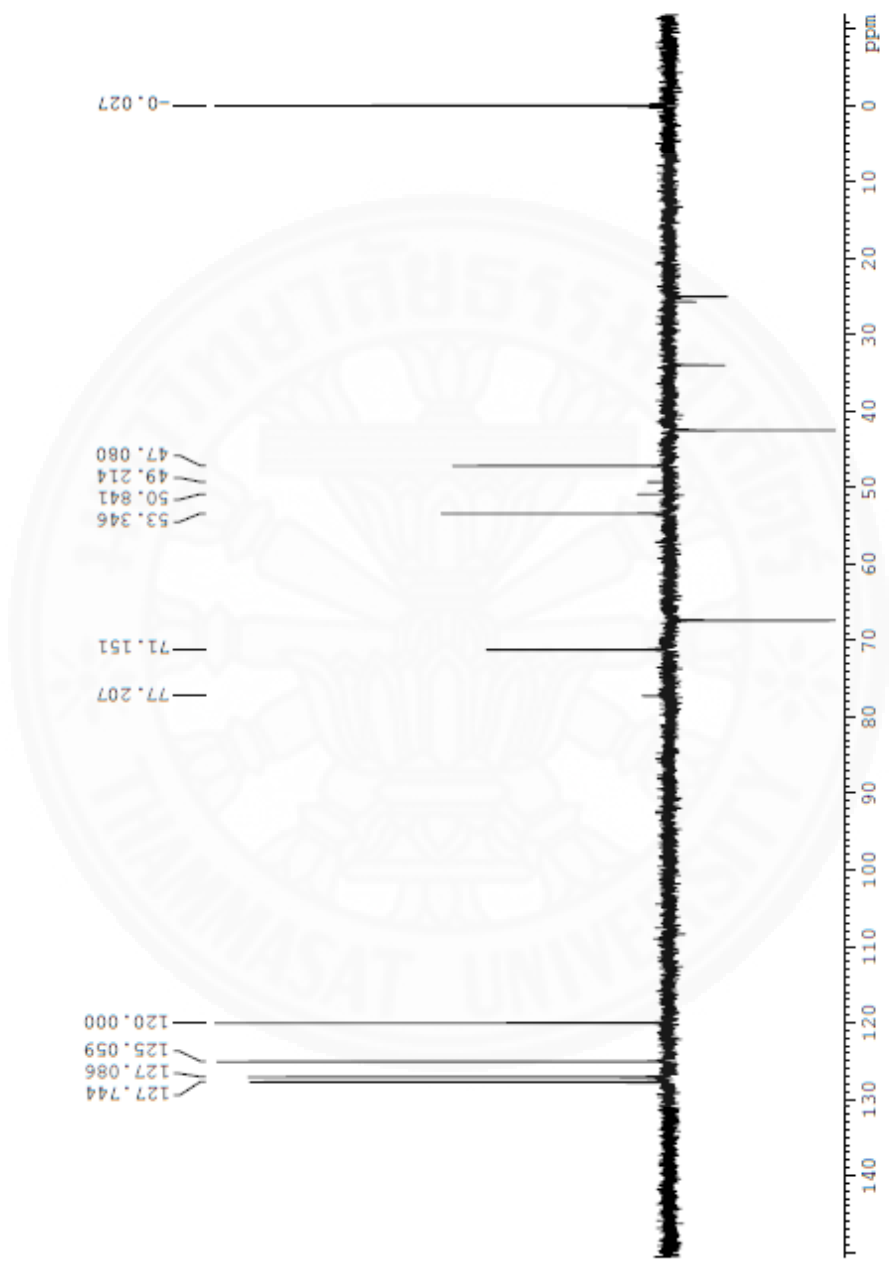
ภาพที่ ๗4 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ dimethyl tartrate



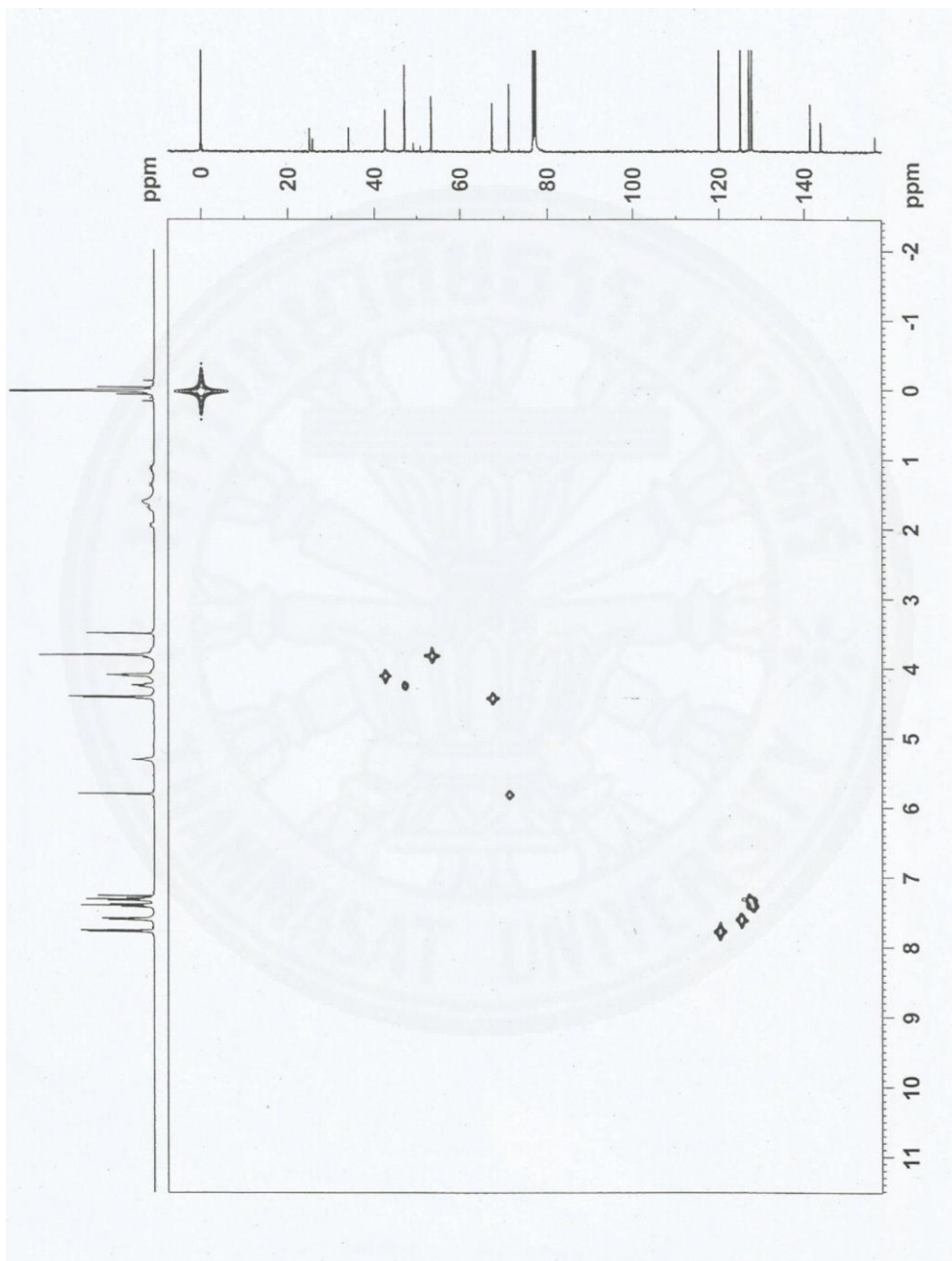
ภาพที่ ๑5 <sup>1</sup>H-NMR spectrum (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate



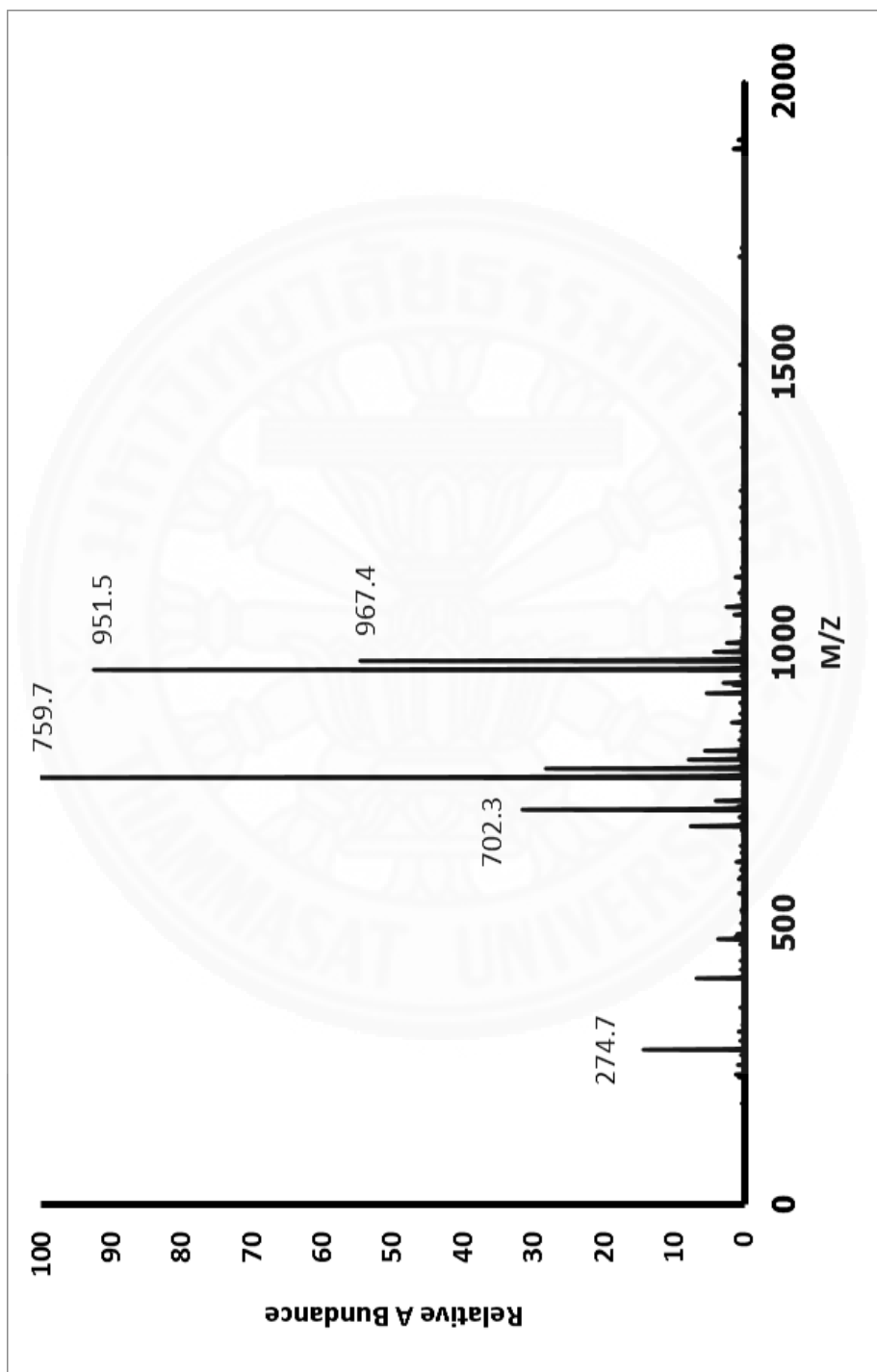
ภาพที่ ๑๖  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate



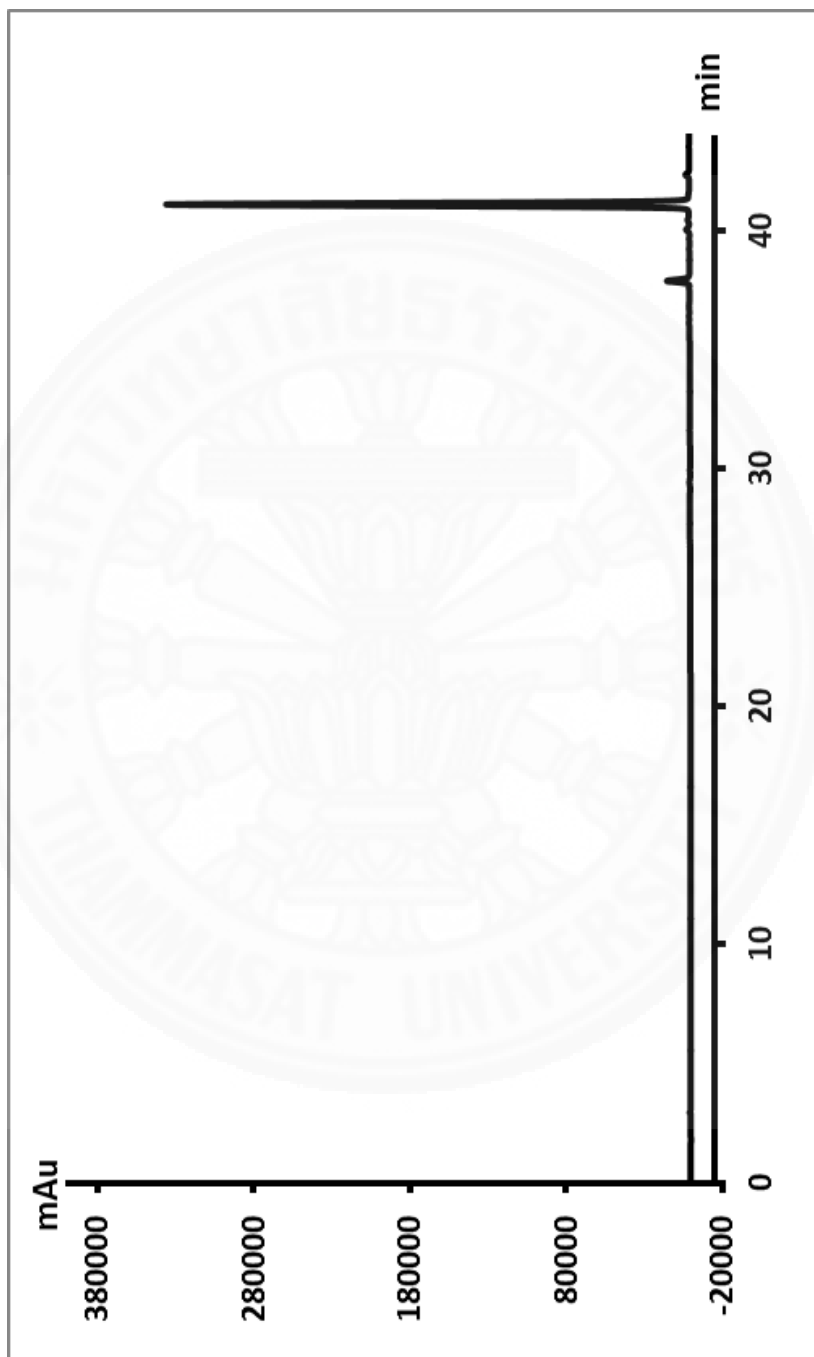
ภาพที่ ๗7 Dept135 spectrum (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate



ภาพที่ ๑๘ HMQC spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate

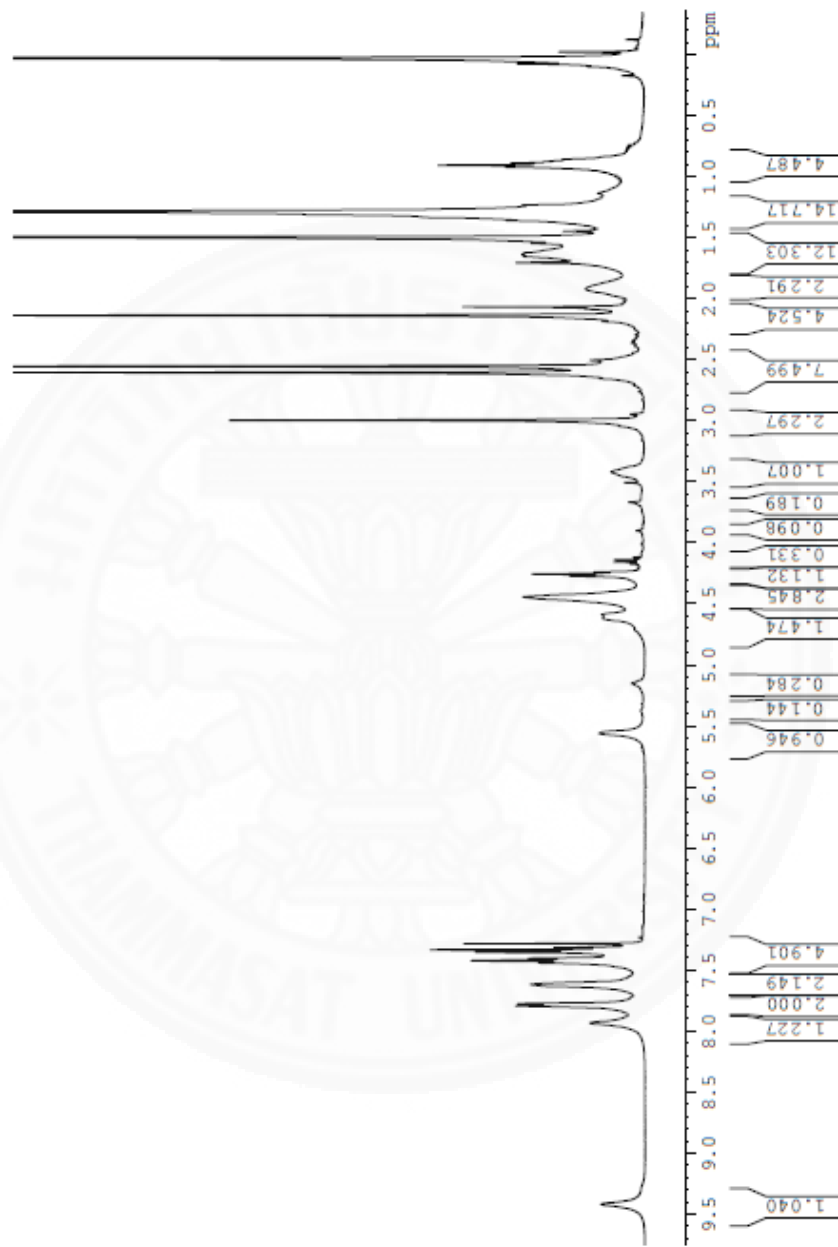


ภาพที่ ๑๙ แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate

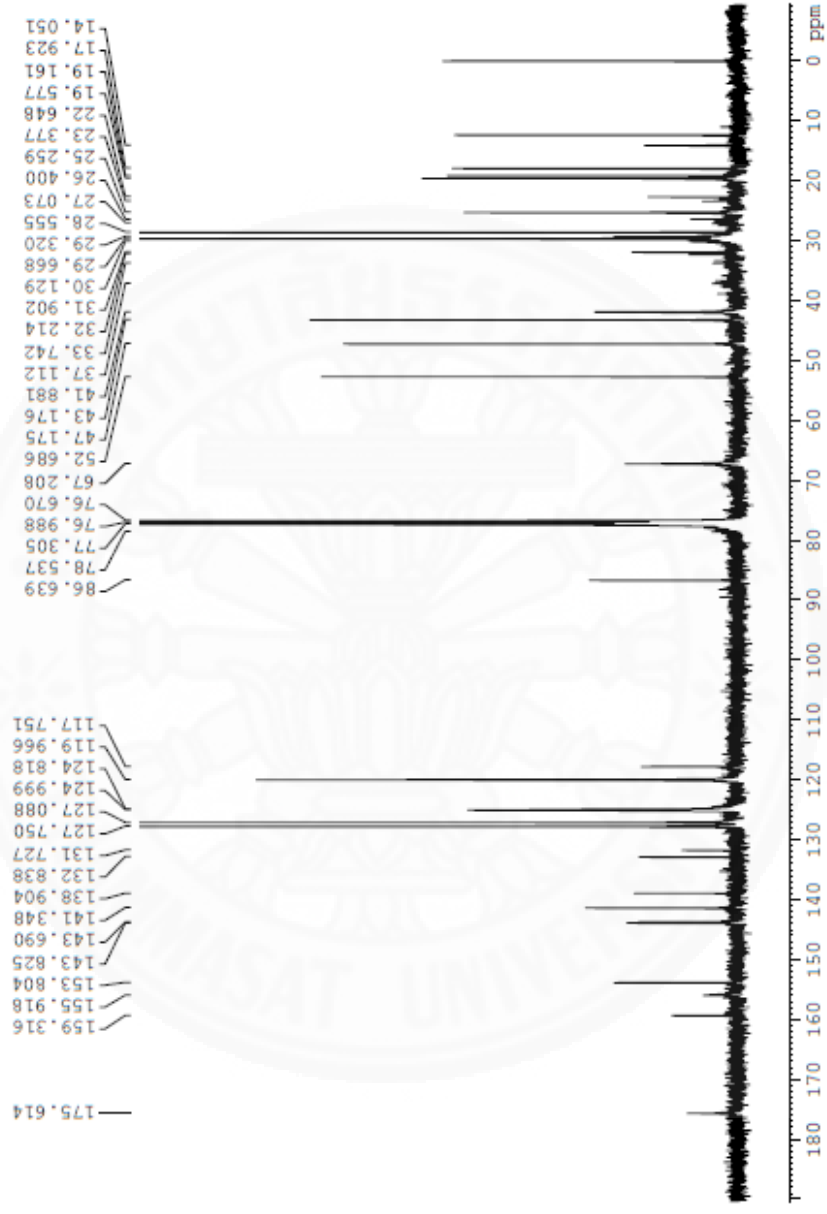


ภาพที่ ๑10 HPLC chromatogram ของ Fmoc-G-dimethyl tartrate

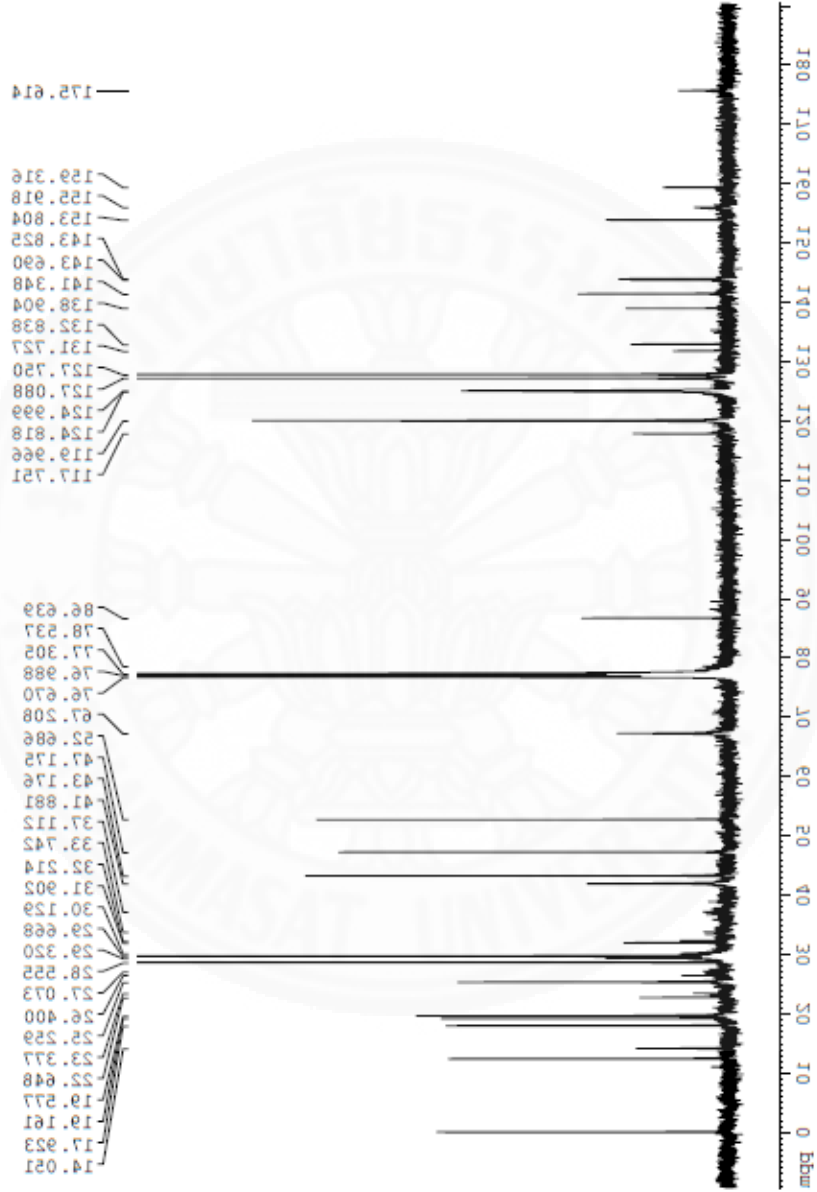




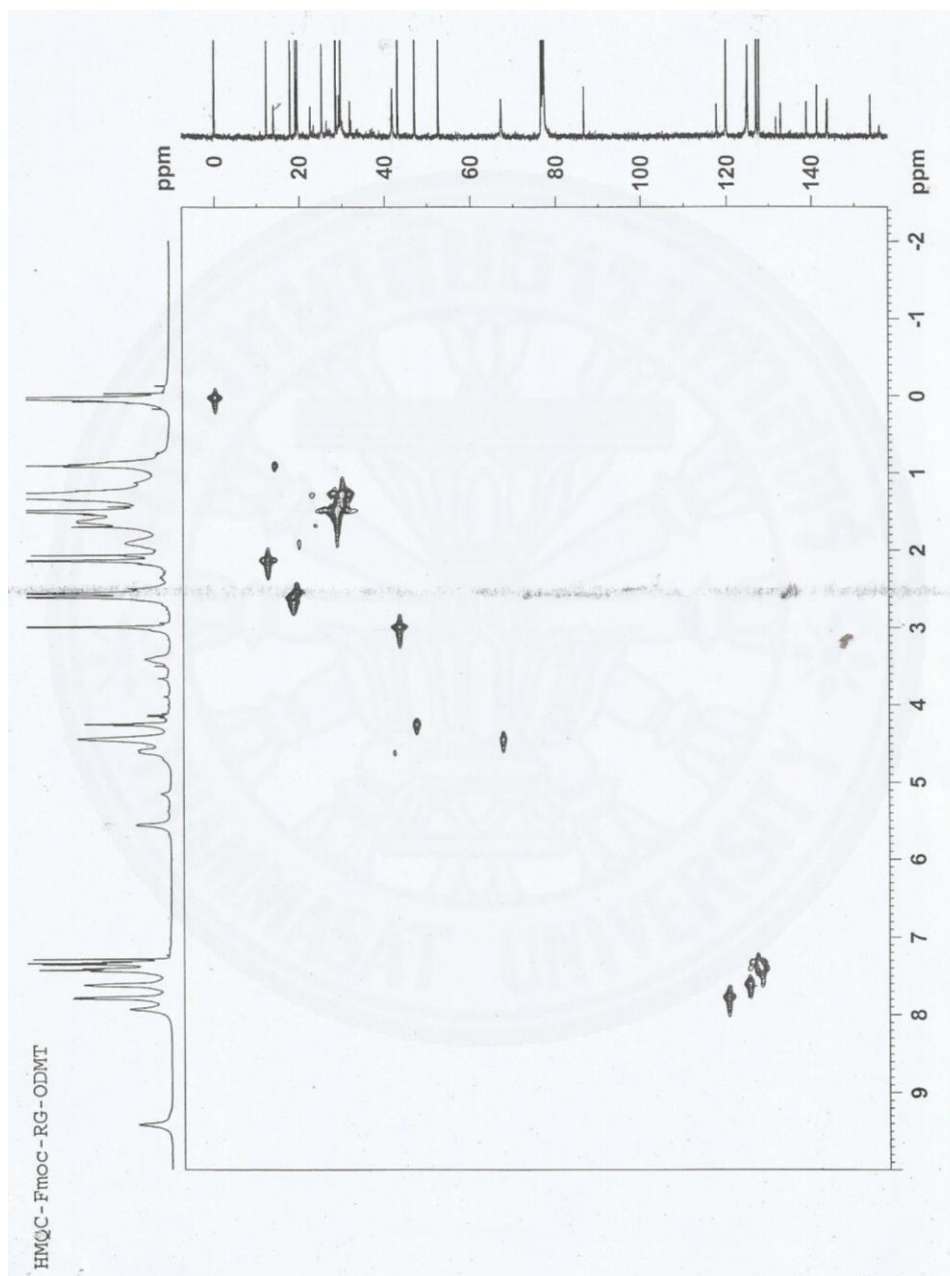
ภาพที่ ๑๑  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-R(Pbf)G-dimethyl tartrate



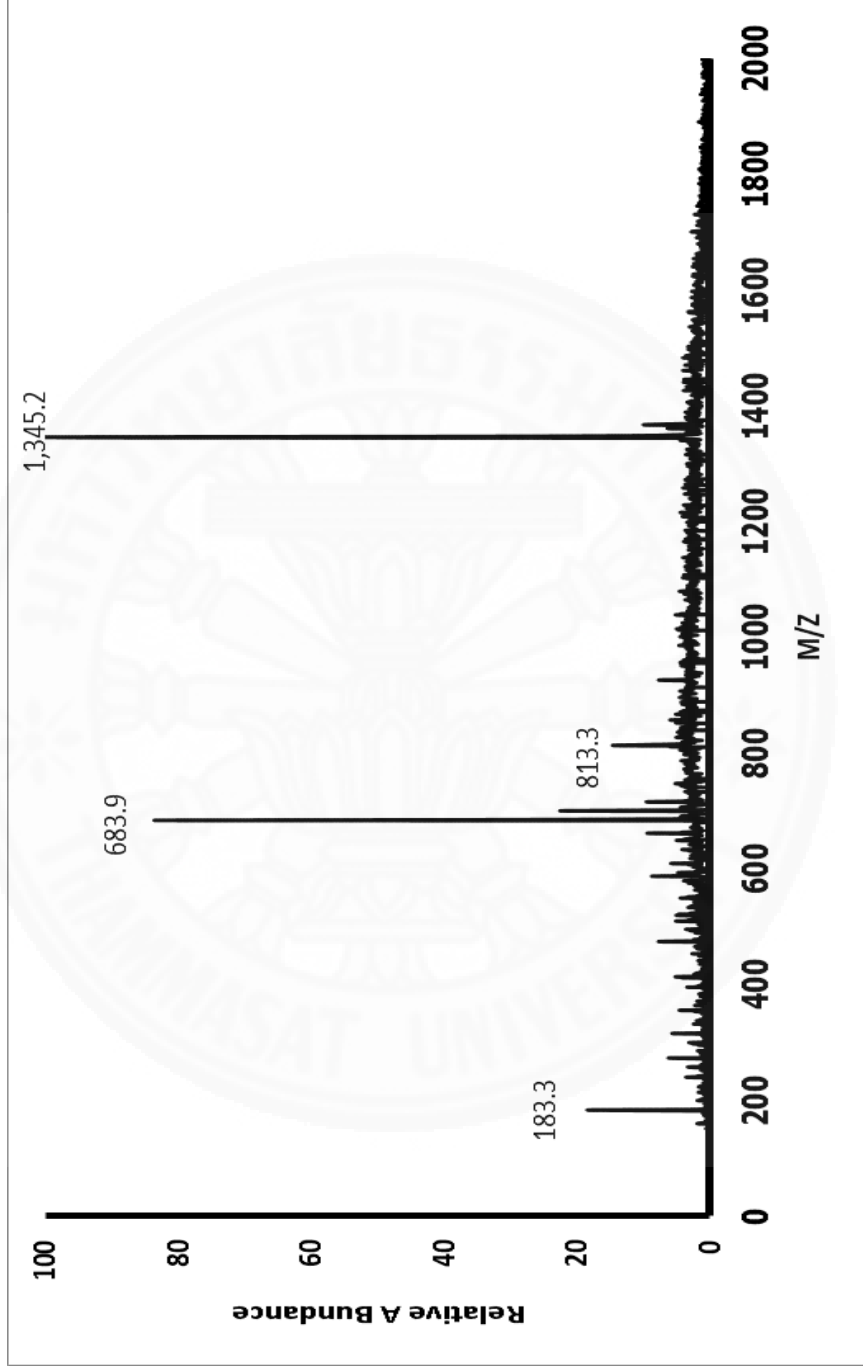
ภาพที่ ๑12  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-R(Pbf)G-dimethyl tartrate



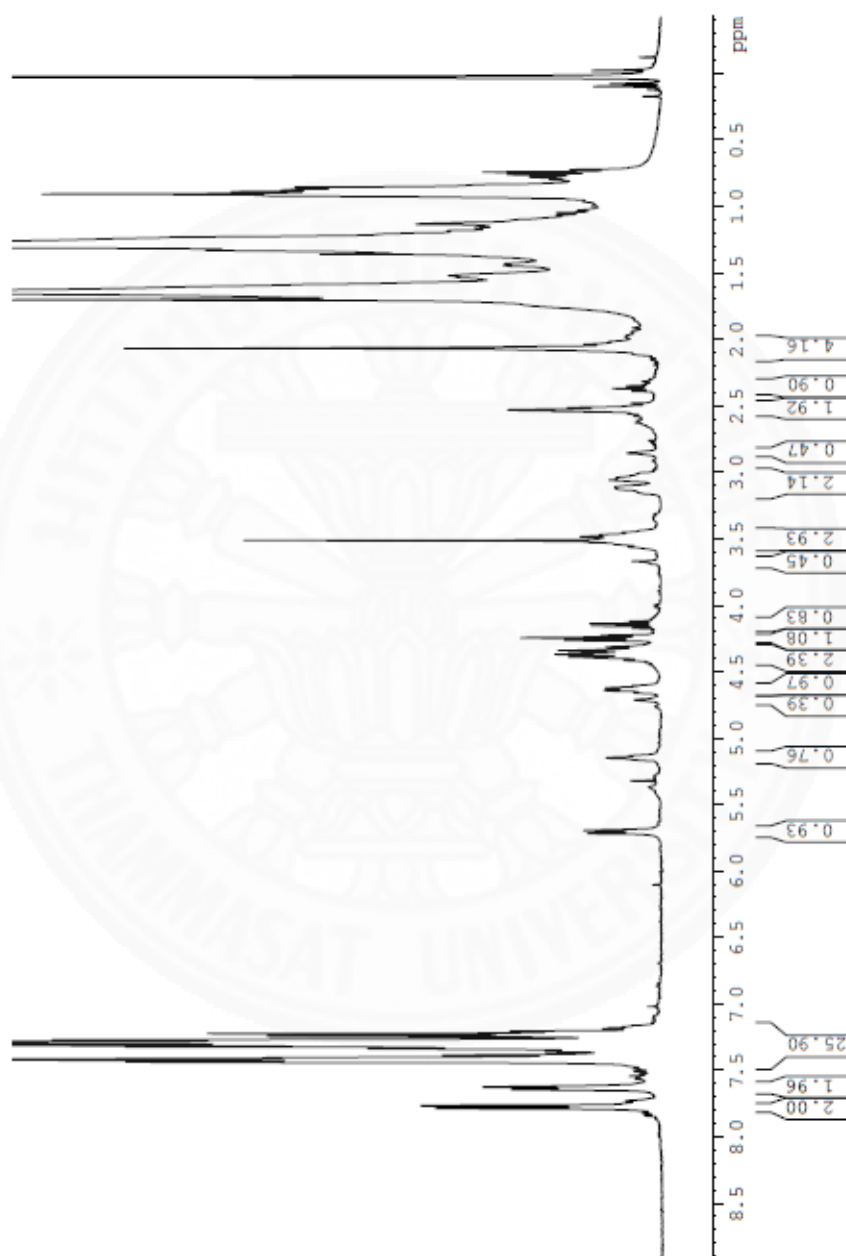
ภาพที่ ๑13 Dept135 spectrum (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) ของ Fmoc-R(Pbf)G-dimethyl tartrate



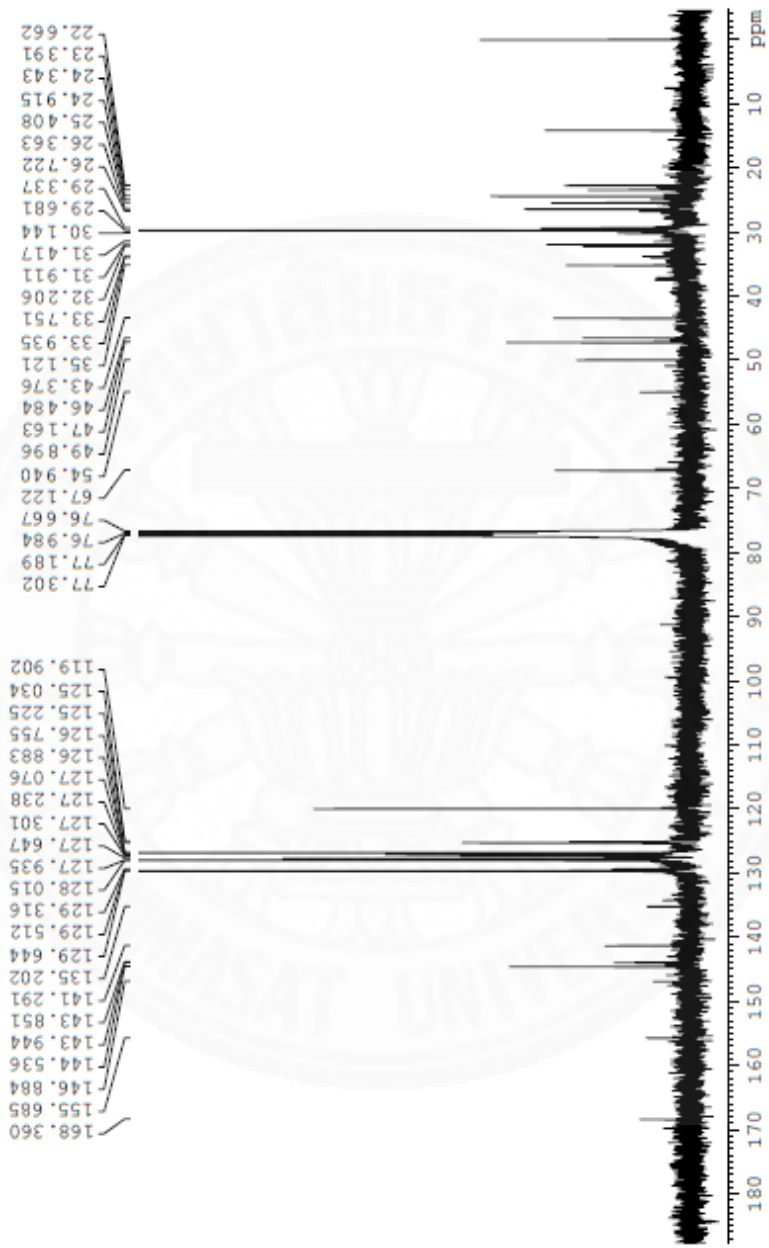
ภาพที่ ๑๑๔ HMQC spectrum (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) ของ Fmoc-R(Pbf)G-dimethyl tartrate



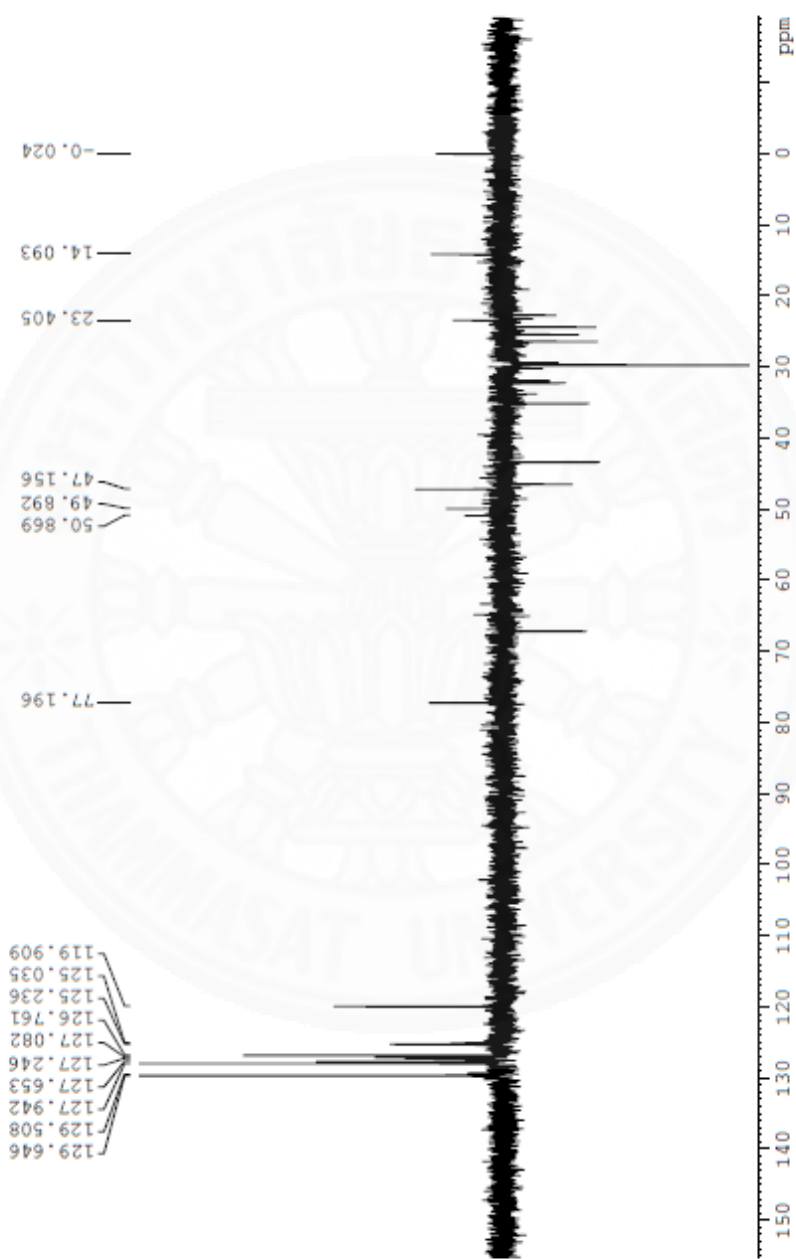
ภาพที่ ข15 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ Fmoc-R(Pbf)G-dimethyl tartrate



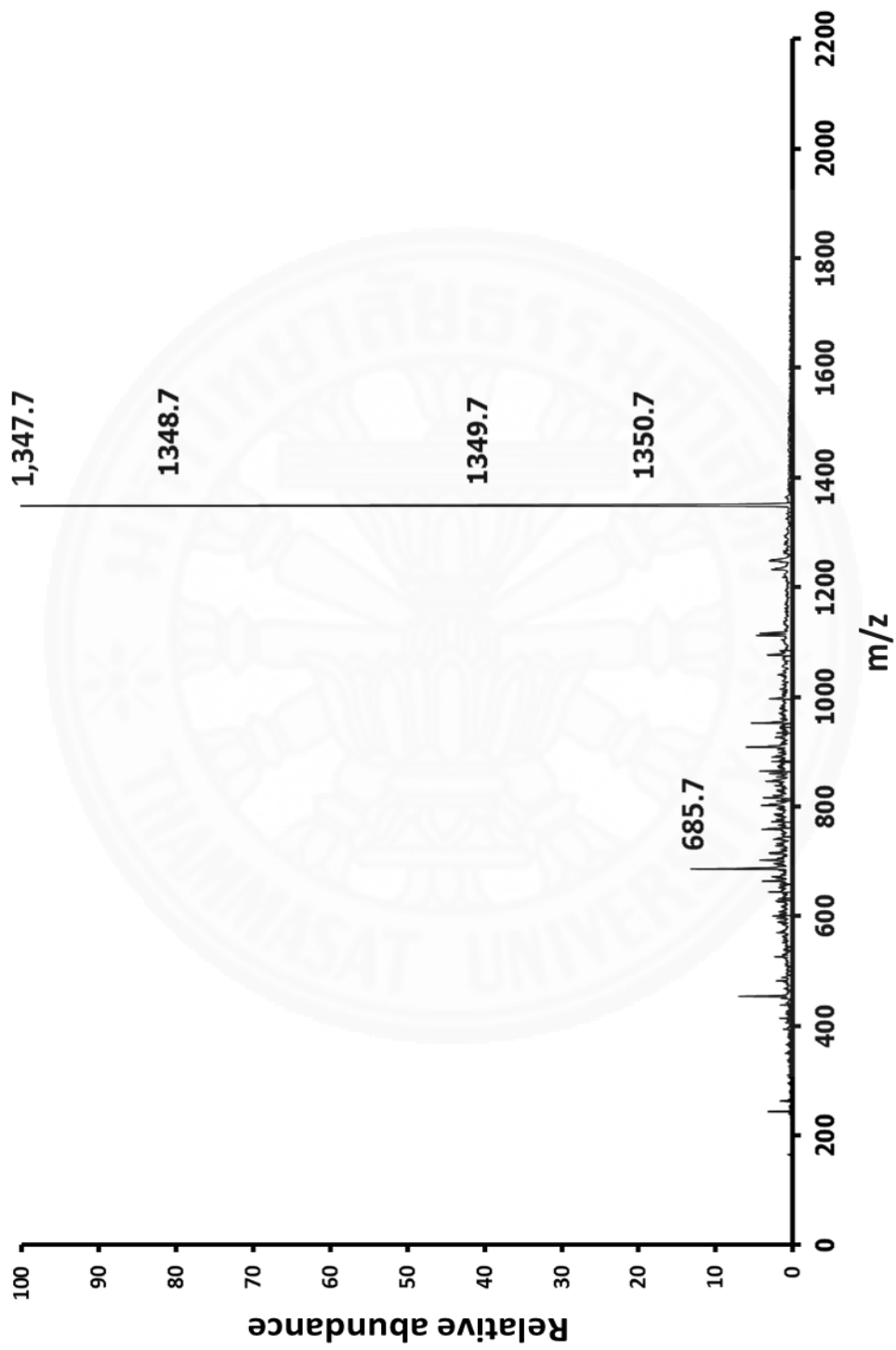
ภาพที่ ๑16  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-C(Trt)RG-dimethyl tartrate



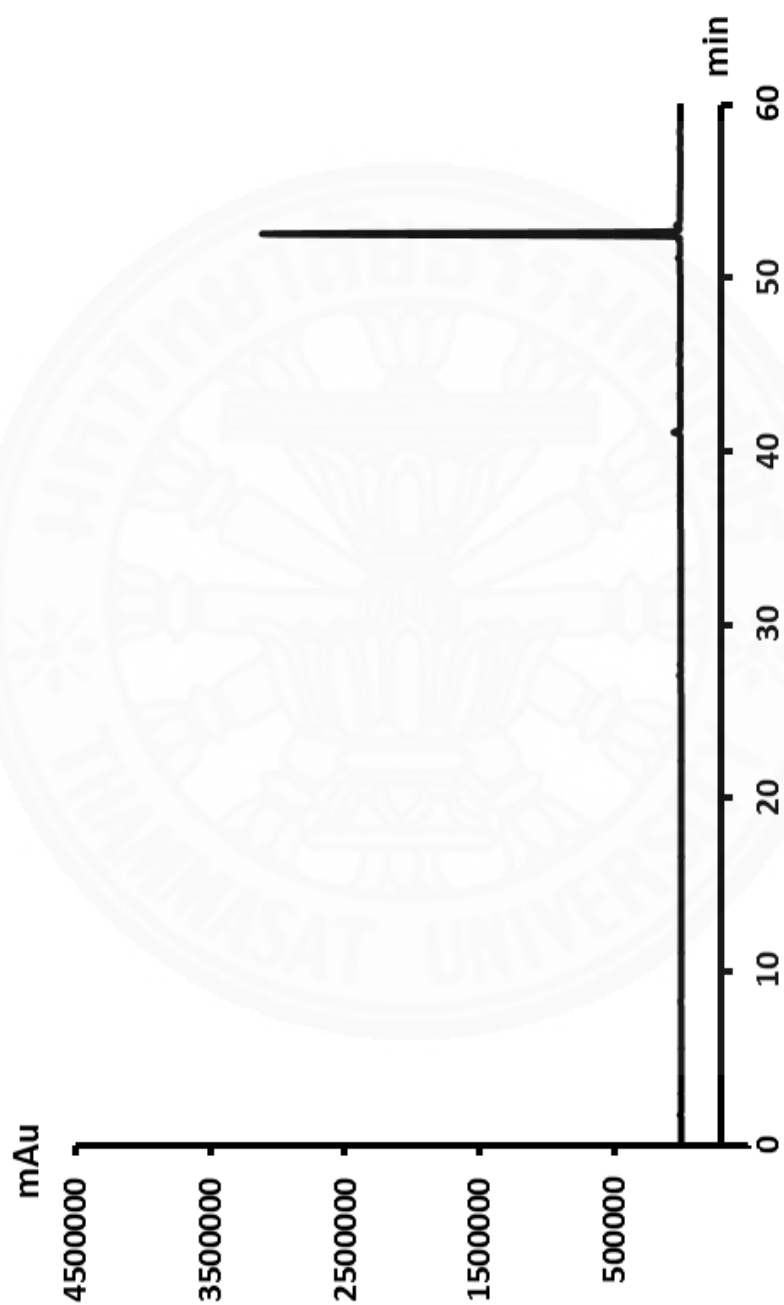
ภาพที่ ๑๗  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) ของ Fmoc-C(Trt)RG-dimethyl tartrate

ภาพที่ ๑๑๘ Dept135 (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) ของ Fmoc-C(Trt)RG-dimethyl tartrate

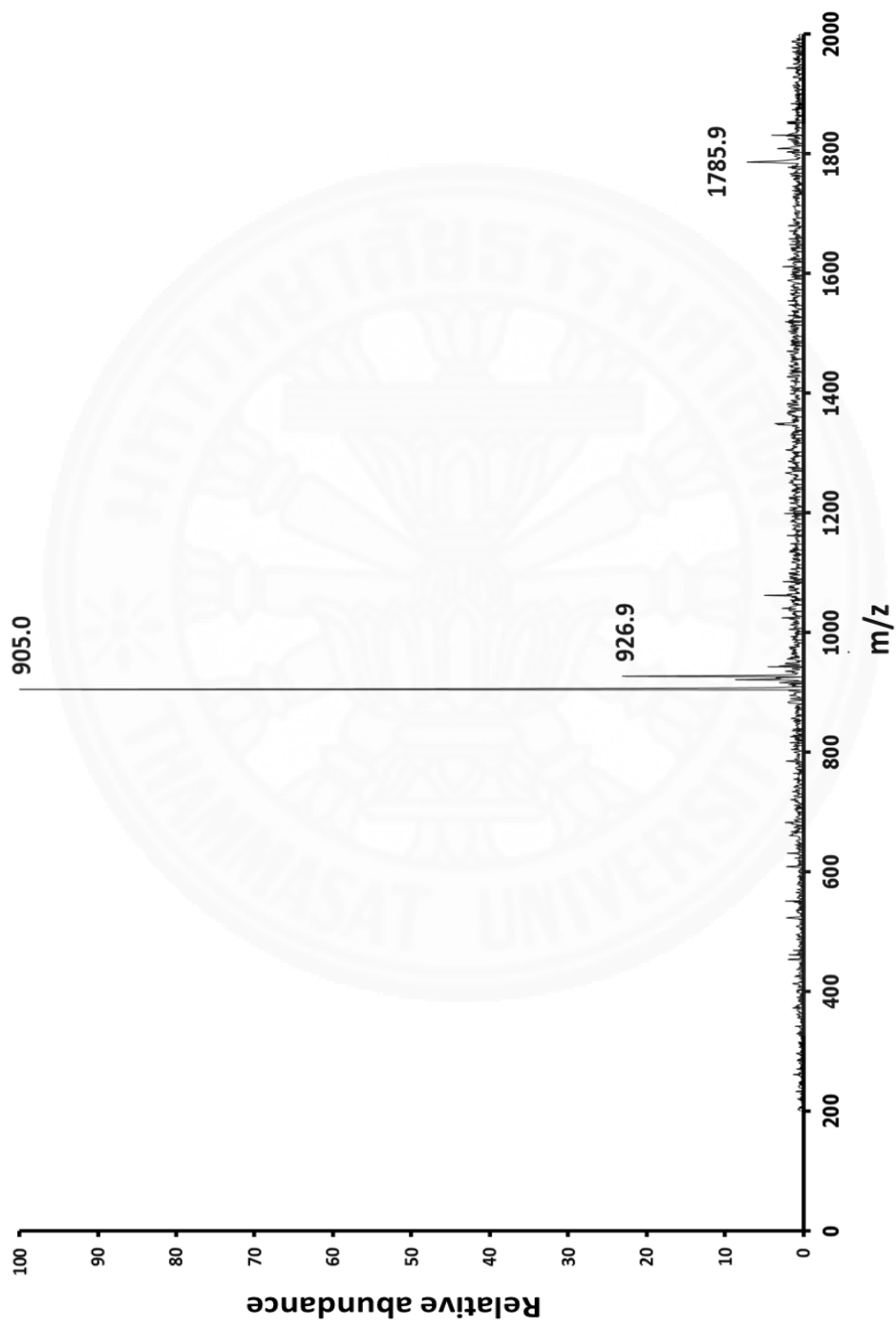




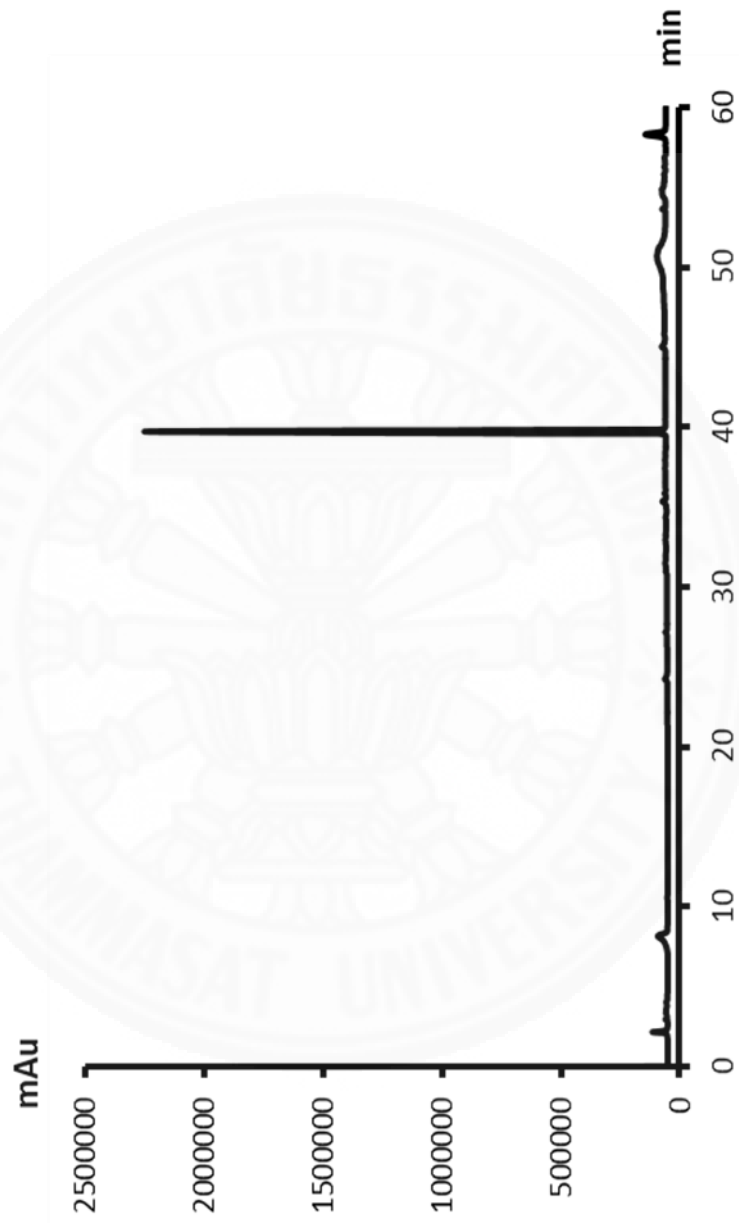
ภาพที่ ๑๑๙ แมสสเปกตรัม (mass spectrum) Fmoc-C(Trt)RG-dimethyl tartrate



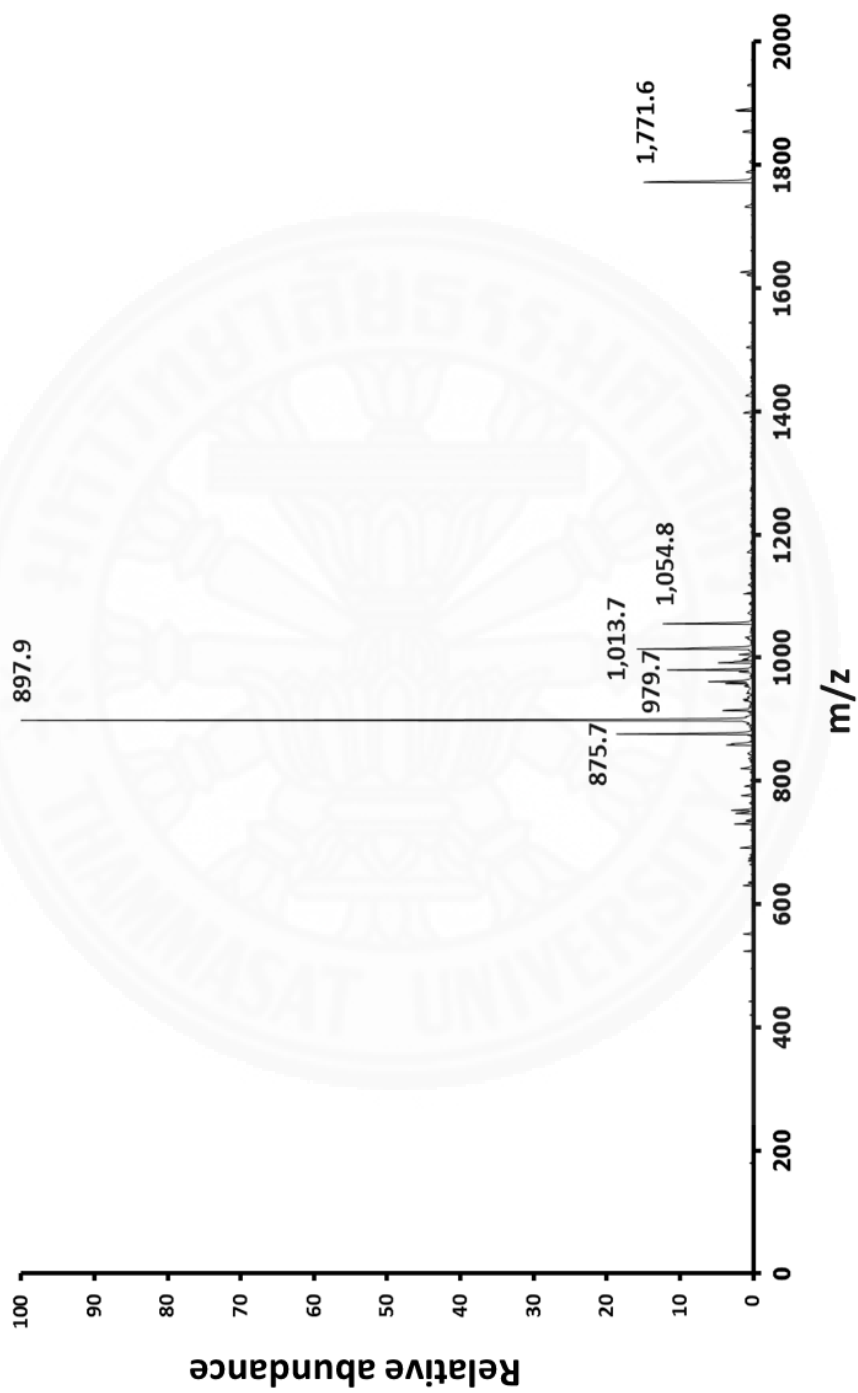
ภาพที่ ๒๐ HPLC chromatogram ของ Fmoc-C(Trt)-RG-dimethyl tartrate



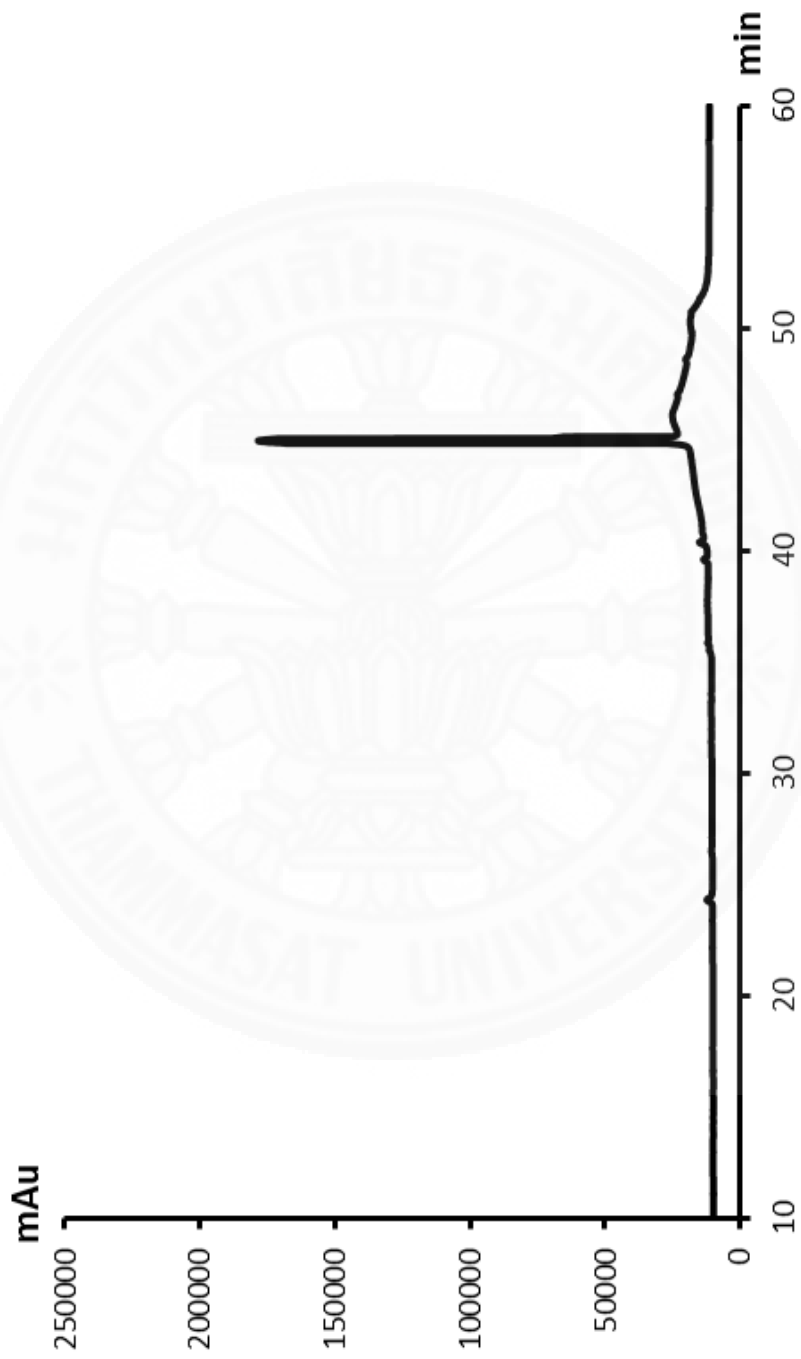
ภาพที่ ข21 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ Fmoc-Is(Bu)K(Boc)T(Bu)-OH



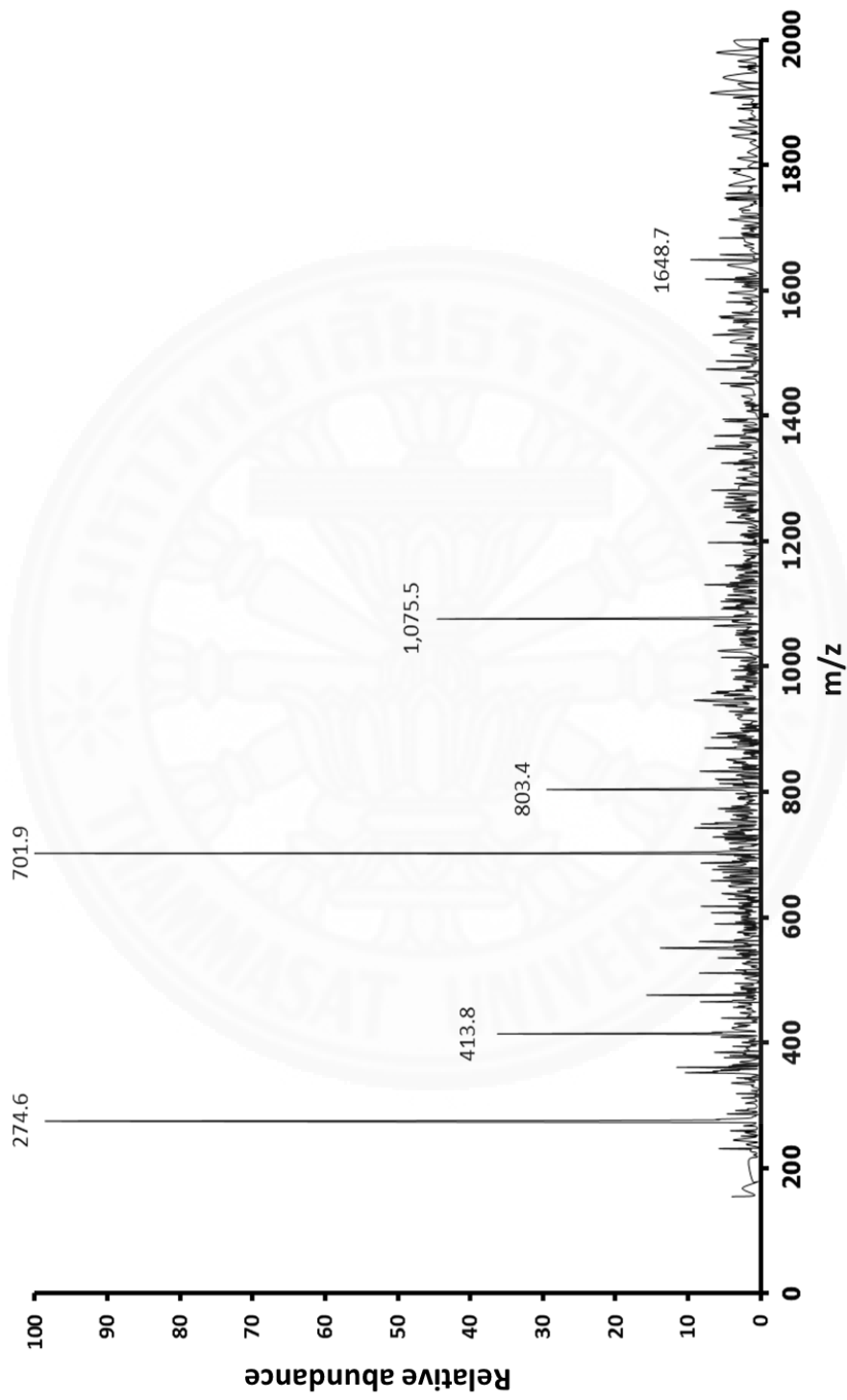
ภาพที่ ๒๒ HPLC chromatogram ของ Fmoc-*S*(<sup>t</sup>Bu)K(Boc)T(<sup>t</sup>Bu)-OH



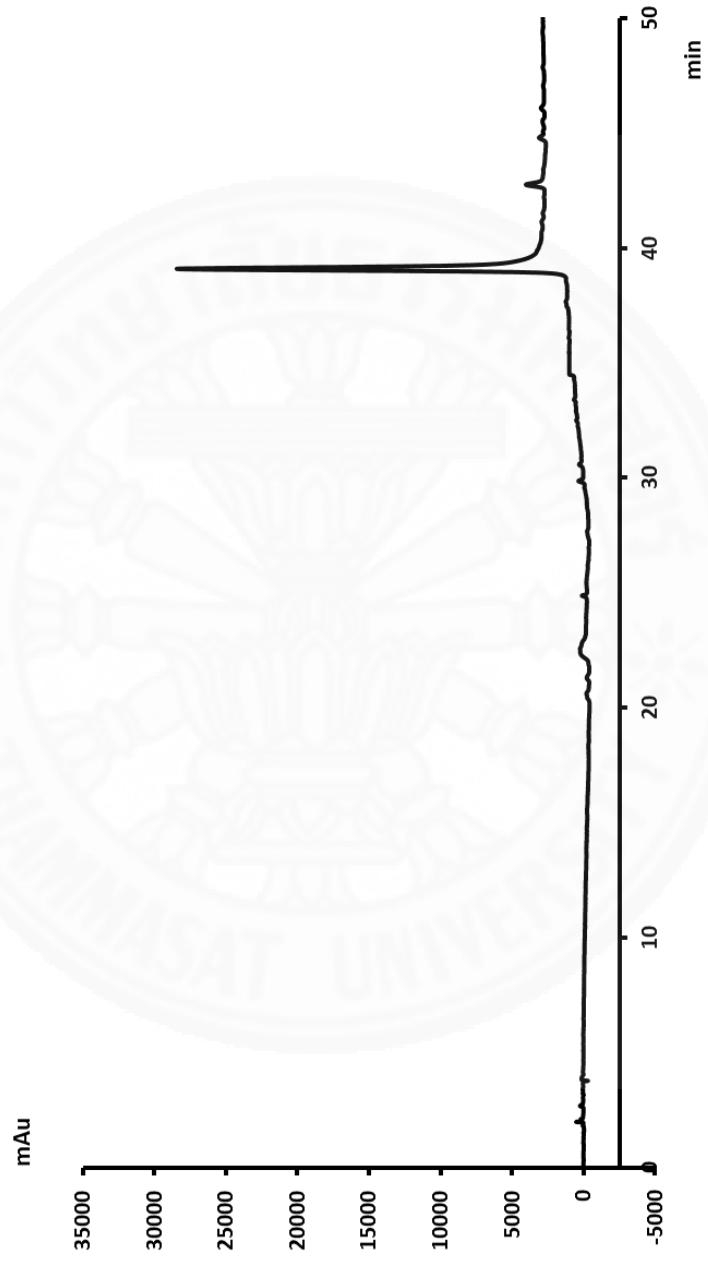
ภาพที่ ข23 แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ Fmoc-Is(Bu)K(Boc)T(Bu)C(Trt)RG-DMT



ภาพที่ ๒๔ HPLC chromatogram ของ Fmoc-IS(<sup>t</sup>Bu)K(Boc)T(<sup>t</sup>Bu)C(Trt)RG-DMT



ภาพที่ ๒๕ แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของ bivalent peptidic inhibitor



ภาพที่ ๒๒๖ HPLC chromatogram ของ bivalent peptidic inhibitor



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาว กิตตินาถ สายพฤกษ์
วันเดือนปีเกิด	22 มกราคม 2532
ตำแหน่ง	-
ทุนการศึกษา (ถ้ามี)	ทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์: ทุนวิจัยทั่วไป

### ผลงานทางวิชาการ

Kittinat Saiphruk, Puthon Kraisuriyawong, Yuttana Senpradit, Panumart Thongyoo\*,  
The synthesis of derived bivalent SFTI-1 inhibitor, The Fifth International Conference  
on Natural Products Health and Beauty (NATPRO 5); 5 – 8 May 2014; Phuket, Thailand

### ประสบการณ์ทำงาน

-