

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัย (Project)
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2558

ส่วนที่ 1 สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย (Project)

1.1 รหัส ว-ท(ด)178.58 ชื่อโครงการ การศึกษาการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์เพปซินโปรติเอสและพาเพนโปรติเอสของสารเชิงซ้อนของโลหะทองกับอนุพันธ์ของสารประกอบไทอะโซลิดเอโซ

1.2 ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว
 เป็นโครงการย่อยในชุดโครงการวิจัย (ระบุชื่อชุดโครงการวิจัย)

1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ **รศ.ดร. อภิสสิฎฐ์ ศงสะเสน**

1.4 หน่วยงานหลักรับผิดชอบ **ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์**

1.5 ประเภทโครงการ โครงการวิจัย 3 สาขา; เกษตรศาสตร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สังคมศาสตร์ฯ
 โครงการวิจัยสถาบันเพื่อพัฒนาคุณภาพ
 โครงการวิจัยและถ่ายทอดงานวิจัยสู่ประชาชน
 โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งด้านการวิจัย
 โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชี่ยวชาญเฉพาะ (SRU)
 โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการเพื่อการแข่งขันฯ
 โครงการวิจัยพัฒนาร่วมภาครัฐและเอกชน

1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 1 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2558 ถึงปีงบประมาณ 2558

1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล **ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์**

1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ 240,000 บาท

1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย **เพื่อทำการสังเคราะห์สารเชิงซ้อนของโลหะทองกับอนุพันธ์ของสารประกอบไทอะโซลิดเอโซ และศึกษาความสามารถของสารเชิงซ้อนของโลหะทองที่เตรียมได้ ในการเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพปซินโปรติเอสและพาเพนโปรติเอส**

1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ

ปีที่	เดือนที่	ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้
1.	1-6	เตรียมสารเชิงซ้อนระหว่าง Au(III) กับสารประกอบไทอะโซลิดเอโซ ทราบโครงสร้างสารเชิงซ้อน
		ศึกษาการยับยั้งเพปซินโปรติเอสด้วยสารเชิงซ้อน สามารถยับยั้งการทำงานได้
	7-12	ศึกษาการยับยั้งเพปซินโปรติเอสด้วยสารเชิงซ้อน สามารถยับยั้งการทำงานได้
		ศึกษาการยับยั้งพาเพนโปรติเอสด้วยสารเชิงซ้อน สามารถยับยั้งการทำงานได้

1.11 สรุปการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ (ตามแผน)	เป้าหมาย / ผลที่คาดหวัง (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)
1. เตรียมสารเชิงซ้อนระหว่าง Au(III) กับอนุพันธ์ของสารประกอบไพอะโซลิดเอโซ	1. ทราบโครงสร้างสารเชิงซ้อน	1. ทราบโครงสร้างของสารเชิงซ้อนที่ต้องการสังเคราะห์
2. ศึกษาการเกิดอันตรกิริยา ระหว่างสารเชิงซ้อนที่เตรียมได้กับ เอนไซม์เพปซินโปรติเอส	2. ทราบว่าสารเชิงซ้อนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพปซินโปรติเอสหรือไม่	2. ทราบว่าสารเชิงซ้อนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพปซินโปรติเอส
3. ศึกษาการเกิดอันตรกิริยา ระหว่างสารเชิงซ้อนที่เตรียมได้กับ เอนไซม์พาเพนโปรติเอส	3. ทราบว่าสารเชิงซ้อนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พาเพนโปรติเอสหรือไม่	3. ทราบว่าสารเชิงซ้อนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พาเพนโปรติเอส

1.12 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- บรรลุ.....
- บรรลุบางส่วน (ร้อยละ.....) เหตุผล.....
- ไม่บรรลุ เหตุผล.....

1.13 ผลผลิต/ สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs) (โปรดระบุรายละเอียด)

- องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐาน **ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานของรูปร่างโมเลกุลของสารเชิงซ้อนระหว่าง Au(III) กับอนุพันธ์ของสารประกอบไพอะโซลิดเอโซ และความสามารถในการพัฒนาหรือแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส**
- สายพันธุ์พืช/สัตว์/จุลินทรีย์.....
- ผลิตภัณฑ์.....
- สิ่งประดิษฐ์.....
- เทคโนโลยี/นวัตกรรม.....
- ฐานข้อมูล/ซอฟต์แวร์.....
- คู่มือ.....
- วิทยุทัศน์.....
- การสร้างนักวิจัย/สนับสนุนนิสิตปริญญาตรี.....คน ปริญญาโท.....คน ปริญญาเอก.....1.....คน
- สนับสนุนการศึกษาปัญหาพิเศษ.....เรื่อง (ระบุ)
วิทยานิพนธ์.....1.....เรื่อง (ระบุ) Synthesis, characterization, computational studies and biological activity of Au(III) with 3-(2'-thiazolylazo)-2,6- diaminopyridine as effective inhibitors for pepsin and papain
- อื่นๆ (ระบุ).....

1.14 ผลลัพธ์/ผลสำเร็จที่ได้/หรือคาดว่าจะได้จากการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

(1) เป้าหมายการนำไปใช้ประโยชน์ (ระบุกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยเชิงปริมาณ/คุณภาพ)

- ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนรู้การสอน **ผลิตบัณฑิตในระดับปริญญาเอก**
- ด้านการเกษตร
- ด้านอุตสาหกรรม
- ด้านทรัพยากรธรรมชาติ/สิ่งแวดล้อม
- ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย
- ด้านเศรษฐกิจ
- ด้านสังคม
- ด้านการทำนุบำรุงศิลป ศาสนา วัฒนธรรม
- ด้านการถ่ายทอดเทคโนโลยี/ฝึกอบรมแก่กลุ่มเป้าหมาย
- เสนอภาครัฐ เพื่อใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ
- นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป **สามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้**
- ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน/การสร้างเครือข่าย
- อื่นๆ (ระบุ)

(2) สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่ / ถ่ายทอด **ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ** (ระบุรายละเอียด อยู่ระหว่างดำเนินการส่งตีพิมพ์/ตีพิมพ์แล้วในรูปแบบเอกสารอ้างอิงและแนบสำเนาเป็น ภาคผนวกของรายงาน)

- ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศ 1 เรื่อง (ระบุ) **Synthesis, characterization, and pepsin inhibition study of Au(III)- 3-(2'-thiazolylazo)-2,6- diaminopyridine complex. ตีพิมพ์ใน Inorganic Chemistry Communication, Volume 59 ปี 2015 หน้า 88-90.**
- ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ เรื่อง (ระบุ)
- นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ต่างประเทศ เรื่อง (ระบุ)
- นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ในประเทศ เรื่อง (ระบุ)
- นำเสนอทางวิทยุ/โทรทัศน์/Website เรื่อง/ครั้ง (ระบุ)
- นำเสนอทางนิทรรศการ เรื่อง/ครั้ง (ระบุ)
- บทความ/เอกสารสิ่งพิมพ์/วีดิทัศน์ เรื่อง/ครั้ง (ระบุ)
- ถ่ายทอด/ฝึกอบรมแก่เกษตรกร/ผู้สนใจ เรื่อง/ครั้ง (ระบุ)
- ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชน/อุตสาหกรรม/ผู้ประกอบการ (ประโยชน์เชิงพาณิชย์) เรื่อง/ครั้ง (ระบุ)
- ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ (ระบุ)
- มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง (ระบุ)
- อื่นๆ (ระบุ)

1.15 การยื่นจด สิทธิบัตร อนุสิทธิบัตร ลิขสิทธิ์
 มีศักยภาพที่จะยื่นจด (ระบุ)..... ยื่นจดแล้ว เมื่อ.....

1.16 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ (ระบุว่าจะก่อให้เกิดผลกระทบอย่างไร)
 ด้านความมั่นคง อาทิ การเมืองการปกครอง กฎหมาย การต่างประเทศ โครงสร้างพื้นฐาน และบริการโทรคมนาคม ฯลฯ (ระบุ).....
 ด้านการเศรษฐกิจ อาทิ การพาณิชย์กรรม การเกษตรกรรม การอุตสาหกรรม การท่องเที่ยว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พลังงาน ฯลฯ (ระบุ) **สามารถพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้**.....
 ด้านคุณภาพชีวิตและสังคม ศักยภาพของคนและการศึกษา การแพทย์และสาธารณสุข หลักประกันความมั่นคง สวัสดิการสังคม วัฒนธรรม จริยธรรมและค่านิยม ฯลฯ (ระบุ).....
 ด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การบริหารจัดการการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์ การป้องกันการทำลาย ลดการสูญเสีย การฟื้นฟูทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ฯลฯ
 อื่นๆ (ระบุ).....

1.17 ผลการดำเนินงานวิจัยสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ชาติ ในด้าน
 ยุทธศาสตร์การจัดความยากจน
 ยุทธศาสตร์การพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณภาพ
 ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุล และแข่งขันได้
 ยุทธศาสตร์การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
 ยุทธศาสตร์การต่างประเทศและเศรษฐกิจระหว่างประเทศ
 ยุทธศาสตร์การพัฒนานโยบายและส่งเสริมการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี
 ยุทธศาสตร์การส่งเสริมประชาธิปไตยและกระบวนการประชาสังคม
 ยุทธศาสตร์การรักษาความมั่นคงของรัฐ
 ยุทธศาสตร์การรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลก
 อื่นๆ โปรดระบุ.....

1.18 ปัญหา อุปสรรค ในการดำเนินงานวิจัยและแนวทางแก้ไข ไม่มี

1.19 งานที่จะทำต่อไป/ค่าชี้แจงเพิ่มเติม -

1.20 ได้แนบ “รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project)” ตามหัวข้อ ในส่วนที่ 2 (หน้าถัดไป) มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

(รศ.ดร. อภิสีภูมิจิ ศงสะเสน)

...../...../.....วัน/เดือน/ปี ที่รายงาน

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2558

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด)178.58

ชื่อโครงการ การศึกษาการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์เพปซินโปรติเอสและพาเพนโปรติเอสของสาร
เชิงซ้อนของโลหะทองกับอนุพันธ์ของสารประกอบไทอะโซลเอโซ
Study on Pepsin Protease and Papain Protease Inhibitor property of gold
complex with thiazolyazo derivatives

อภิสิฏฐ์ ศงสะเสน⁽¹⁾ นลวัฒน์ บุญญาลัย⁽²⁾
Apisit Songsasen⁽¹⁾ Nolawat Noonyalai⁽²⁾

บทคัดย่อ

สารเชิงซ้อนของทอง(III) และ 3-(2'-thiazolyazo)-2,6-diaminopyridine (TADAP) ถูกสังเคราะห์
วิเคราะห์คุณลักษณะ และศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพปซินและพาเพน เมื่อ
ความเข้มข้นของสารเชิงซ้อนอยู่ในช่วง 0-200 μM โมเลกุลของสารเชิงซ้อนมีอัตราส่วนระหว่าง ทอง(III) ต่อ
TADAP เป็น 1:1 ที่ pH 3.0, 4.0 และ 5.0 และมีอัตราส่วนเป็น 1:2 ที่ pH 6.0 จากอินฟราเรดสเปกตรัม ทำให้
ทราบว่าอะตอมไนโตรเจนทั้งสองอะตอมของ TADAP เกิดพันธะกับทอง(III) ซึ่งสามารถยืนยันได้จากผลการ
คำนวณทางคอมพิวเตอร์โดยวิธี Density Functional Theory (DFT) ค่าคงที่เสถียรภาพ (K_{stab}) ของสาร
เชิงซ้อนที่ pH 6.0 มีค่า 9.205×10^9 และ 3.355×10^9 จากวิธี continuous variation (Job's method) และวิธี
Benesi-Hildebrand ตามลำดับ ค่า IC_{50} ของสารเชิงซ้อนในการยับยั้งเอนไซม์เพปซินและพาเพนมีค่าเท่ากับ
10.28 μM และ 11.77 μM ตามลำดับ ซึ่งจากผลจากการทดสอบ Kinetic parameter พบว่าสารเชิงซ้อน
ดังกล่าวจัดเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน

คำสำคัญ: เอนไซม์เพปซิน เอนไซม์พาเพน สารเชิงซ้อนของทอง(III) อนุพันธ์ของสารประกอบไทอะโซลเอโซ

⁽¹⁾ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ABSTRACT

Complex between Au(III) and 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine (TADAP) was synthesized, characterized and found to inhibit pepsin and papain activities at the concentrations range of 0-200 μM . The stoichiometric ratio between Au(III) and TADAP was 1:1 at pH 3.0, 4.0 and 5.0 and 1:2 at pH 6.0. The red shifts of the IR spectrum confirmed that both N positions of the ligand were the donor atoms which also ensured by the computational calculation using Density Functional Theory (DFT). The stability constant (K_{stab}) of the complex at pH 6.0 was 9.205×10^9 and 3.355×10^9 for Job's method and Benesi-Hildebrand's equation, respectively. The IC_{50} values of the complex were 10.28 μM for pepsin and 11.77 μM for papain. Kinetic study suggested that Au(III)-TADAP complex could act as the uncompetitive inhibitor.

Key words: Pepsin, Papain, Gold(III) complex, Thiazolylazo derivatives

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

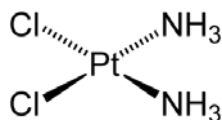
เปปซิน (pepsin) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรทีเอส (Aspartic Protease)¹ ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้เป็นที่น่าสนใจเนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้หลายชนิดมีความเกี่ยวข้องกับโรคที่กำลังพยายามหายารักษา เช่น เอชไอวี-1 โปรทีเอส (HIV-1 protease) ซึ่งเป็นหนึ่งในวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสเอชไอวี (Human Immunodeficiency Virus, HIV) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคเอดส์ (Acquired Immune Deficiency Syndrome - AIDS)², เบต้า-ซีเครเทส (β -secretase) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)³ เป็นต้น

เนื่องจากเปปซินเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคกรดไหลย้อน (Gastro-Esophageal Reflux Disease)⁴ คือภาวะที่มีกรดหรือน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ไหลย้อนขึ้นมาบริเวณหลอดอาหาร ซึ่งหลอดอาหารเป็นอวัยวะที่ไม่ทนต่อกรด จึงทำให้เกิดการอักเสบของหลอดอาหาร ซึ่งโดยปกติหลอดอาหารจะมีการบีบตัวไล่อาหารลงด้านล่าง และหูรูดจะทำหน้าที่ป้องกันการไหลย้อนของน้ำย่อย กรด หรืออาหาร ไม่ให้ไหลย้อนขึ้นมาบริเวณหลอดอาหาร แต่ในปัจจุบัน หูรูดส่วนนี้ทำงานได้น้อยลงในบางคน ซึ่งจะตรวจพบได้ประมาณ 1 ใน 5 คน โดยพบในคนทั่วไป ทุกกลุ่ม ทุกช่วงอายุ แต่จะพบได้มากในคนอ้วน หรือสูบบุหรี่ และการไหลย้อนของกรด ถ้ามีมาก อาจไหลออกนอกหลอดอาหาร อาจทำให้มีผลต่อกล่องเสียง ลำคอ หรือปอดได้ ซึ่งหากละเอียดไม่ไปพบแพทย์เพื่อทำการรักษา อาจทำให้เรื้อรังกลายเป็นมะเร็งหลอดอาหารได้

พาเพน (papain) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มซิสทีอินโปรทีเอส (Cysteine protease)⁵ ซึ่งเป็นเอนไซม์อีกชนิดที่มีผู้ศึกษาเนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์พาเพนมีลักษณะใกล้เคียงกับแคสเปส (Caspases) และคาเทปซิน (Cathepsin) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) และโรคมาลาเรีย (Malaria)⁶ ดังนั้นพาเพนจึงได้กลายมาเป็นเป้าหมายในการทดสอบการยับยั้ง เนื่องจากมีราคาถูกเพื่อพัฒนาเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรสดังกล่าวต่อไป

ดังนั้นการศึกษากการยับยั้งเพปซินและพาเพนนี้ จะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อม ประโยชน์ในทางตรงคือ ทำให้สามารถที่นำข้อมูลวิจัยมาพัฒนาสารที่สนใจให้เป็นยารักษาโรคต่อไป และผลประโยชน์ในทางอ้อมคือ หากสารที่นำมาศึกษามีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว ก็อาจจะมีแนวโน้มที่จะยับยั้งสารที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ ดังนั้นจึงสามารถนำข้อมูลมาใช้พัฒนาเป็นยารักษาโรคที่เกิดจากเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกันต่อไป

สารเชิงซ้อนของโลหะจึงเป็นตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากในอดีต cis-diammine-dichloridoplatinum(II) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อว่า cisplatin เป็นยาที่สามารถใช้รักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งและถูกใช้ในสถานพยาบาลไม่ต่ำกว่า 30 ปี ดังนั้นถือว่ายาชนิดนี้เป็นยาที่ประสบความสำเร็จในการรักษาโรคมะเร็งตัวหนึ่ง โครงสร้างของยาชนิดนี้จัดเป็นสารเชิงซ้อนโลหะดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ cisplatin

เนื่องจากแพลทินัมเป็นส่วนประกอบหนึ่งใน cisplatin ทำให้สารเชิงซ้อนกลายเป็นหัวข้อที่น่าสนใจในการวิจัยเพื่อหาว่ายาที่สามารถรักษาโรคมะเร็ง ด้วยเหตุนี้การพัฒนาสารเชิงซ้อนเหล่านี้จึงเป็นไปอย่างรวดเร็ว เพื่อให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เนื่องจากผลข้างเคียงของ cisplatin ในการรักษาโรคมะเร็งมีผลกระทบค่อนข้างมาก⁷ ดังนั้นจึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มที่สนใจในการเปลี่ยนชนิดของโลหะและชนิดของลิแกนด์โดยมีความคาดหวังที่จะสามารถสร้างยาที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและมีผลข้างเคียงที่น้อยลงได้ และจากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องยังพบว่าสารเชิงซ้อนของทอง(III) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเนื้องอก ซึ่งกำลังพัฒนาเป็นยาที่รักษามะเร็งเต้านม¹⁰ ดังนั้นทอง(III) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแพลทินัมจึงได้รับความสนใจที่จะนำมาเป็นโลหะในสารเชิงซ้อนเพื่อที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาต่อไป

จากการรายงานผลของงานวิจัยจำนวนมากดังแสดงในการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง บ่งบอกว่าสารเชิงซ้อนของโลหะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ protease ได้ เนื่องจากสมมติฐานที่ว่า โลหะสามารถเกิดพันธะโคเวเลนต์และพันธะไอออนิกกับบริเวณ Active site ของเอนไซม์ ซึ่งเมื่อรวมกับคุณสมบัติของลิ

แกนดที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ จะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ protease มากยิ่งขึ้น

ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เพปซินและเอนไซม์พาเพนของสารเชิงซ้อนของโลหะทองคำกับสารประกอบ 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine (TADAP) โดยคาดหวังที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทำการสังเคราะห์สารเชิงซ้อนของโลหะทองคำกับอนุพันธ์ของสารประกอบไทอะโซลิดเอโซ
2. เพื่อศึกษาความสามารถของสารเชิงซ้อนของโลหะทองคำที่เตรียมได้ ในการเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพปซินโปรตีเอสและพาเพนโปรตีเอส

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาแนวทางในการเตรียมสารเชิงซ้อนของโลหะทองคำ โดยเน้นที่ Au(III) กับอนุพันธ์ของสารประกอบไทอะโซลิดเอโซ ในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้ 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine (TADAP) เมื่อเตรียมสารเชิงซ้อนได้แล้วจะศึกษาถึงโครงสร้างของสารเชิงซ้อนที่เตรียมได้ และนำสารเชิงซ้อนที่เตรียมได้ไปศึกษาการเกิดอันตรกิริยากับเอนไซม์เพปซินโปรตีเอสและพาเพนโปรตีเอส เพื่อทดสอบการยับยั้งเอนไซม์เพปซินโปรตีเอส และเอนไซม์พาเพนโปรตีเอส

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

Pascaline และคณะ⁷ ได้ทำการสังเคราะห์และวิเคราะห์คุณลักษณะของสารเชิงซ้อน $[3,5\text{-Me}_2\text{bpzaH}_2][\text{AuCl}_4]\text{Cl}$ (โดยที่ Me_2bpza คือ bis(3,5-dimethylpyrazolyl)acetic acid) หลังจากนั้นนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเชื้อไวรัสเอชไอวี จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารเชิงซ้อนนี้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase และ protease ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในเชื้อไวรัสเอชไอวี และเมื่อนำสารเชิงซ้อนดังกล่าวและ $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ มาเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ protease ที่ความเข้มข้น 25 μM และ 100 μM พบว่ามีการยับยั้งแบบมีนัยสำคัญของสารเชิงซ้อนของทองคำ $[3,5\text{-Me}_2\text{bpzaH}_2][\text{AuCl}_4]\text{Cl}$ ที่ความเข้มข้น 100 μM โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 63% และที่ความเข้มข้น 25 μM ไม่มีการออกฤทธิ์ยับยั้ง ในขณะที่ $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ แสดงให้เห็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 47% ที่ความเข้มข้น 100 μM และแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 8% ที่ความเข้มข้น 25 μM ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ protease น่าจะมาจากผลรวมการยับยั้งระหว่าง $[\text{AuCl}_4]^-$ และไอออน dipyrazolium

Milacic และคณะ¹¹ ได้ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์ของสารประกอบ gold(III) dithiocarbamate ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมของคน พบว่าสารประกอบดังกล่าวที่

ความเข้มข้น 5 $\mu\text{mol/L}$ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MDA-MB-231 ได้ 85% เมื่อเทียบกับ cisplatin ที่ความเข้มข้นเดียวกันพบว่ามีการยับยั้งน้อยกว่า 20% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 50 $\mu\text{mol/L}$ พบว่า cisplatin จะมีการยับยั้งประมาณ 40%. นอกจากนี้สารประกอบดังกล่าวที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{mol/L}$ ใช้เวลา 2 ชั่วโมงเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ MDA-MB-231 ตาย ในขณะที่ cisplatin ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{mol/L}$ ใช้เวลา 48 ชั่วโมงก็ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายได้ ซึ่งจากผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันความแตกต่างของกลไกในการยับยั้งระหว่างสารประกอบของทองและแพลทินัม

Zhao and Zhou¹² ได้ศึกษาแรงอันตรกิริยาของ $[\text{Au(III)(DMDT)(Cl)(H}_2\text{O)}]^+$ และ $[\text{Au(III)(DMDT)(H}_2\text{O)}_2]^+$ (DMDT = N,N-dimethyldithio carbamate) กับบริเวณโคออร์ดิเนชันของกรดอะมิโนซิสเทอีน คือ อะตอมของซัลเฟอร์ เนื่องจากทฤษฎี Hard-Soft-Acid-Base อะตอมทองสามารถที่จะสร้างพันธะกับอะตอมซัลเฟอร์เนื่องจากมีลักษณะเป็น Soft acid และ soft base ตามลำดับ เช่นเดียวกัน หรืออาจจะเป็นไปได้ที่อะตอมของทองจะสร้างพันธะกับอะตอมไนโตรเจน เนื่องจากในบางปฏิกิริยาไนโตรเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ดี นอกจากนี้ยังศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารเชิงซ้อนดังกล่าวกับเบสพิวรีน บนดีเอ็นเอ โดยการคำนวณด้วยระเบียบวิธี density functional theory (DFT) และ B3LYP/(LanL2DZ + 6-31G(d,p)/6-311++G (2d,2p)) จากผลการคำนวณแสดงให้เห็นว่าค่าพลังงานกระตุ้นของ $[\text{Au(III)(DMDT)(Cl)(H}_2\text{O)}]^+$ น้อยกว่า $[\text{Au(III)(DMDT)(H}_2\text{O)}_2]^+$ และเมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานอิสระ ในปฏิกิริยาการแทนที่ของ $[\text{Au(III)(DMDT)(Cl)(H}_2\text{O)}]^+$ พบว่ามีลำดับดังนี้ ตำแหน่งซัลเฟอร์และไนโตรเจนของซิสเทอีนมีค่าใกล้เคียงกันซึ่งน้อยกว่ากวานีน, อะดีนีน และ ซิสเทอีนที่ตำแหน่งออกซิเจน ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานอิสระ ในปฏิกิริยาการแทนที่ของ $[\text{Au(III)(DMDT)(H}_2\text{O)}_2]^+$ พบว่ากวานีนมีค่าต่ำที่สุด รองลงมาคือตำแหน่งอะตอมไนโตรเจนบนซิสเทอีน, อะดีนีน, ซิสเทอีนที่ตำแหน่งซัลเฟอร์และที่ตำแหน่งออกซิเจนตามลำดับ จากผลการคำนวณนี้ทำให้ทราบว่า Au(III) ชอบที่จะสร้างพันธะกับไนโตรเจนมากกว่าซัลเฟอร์ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของอะตอมไนโตรเจนและความเสถียรของโครงสร้างแบบวงที่มีโลหะทองเป็นส่วนประกอบที่น่าสนใจยิ่งกว่านั้นคือกวานีนจะชอบสร้างพันธะกับ $[\text{Au(III)(DMDT)(Cl)}_2]$ มากกว่าอะดีนีนซึ่งเป็นแนวโน้มเดียวกับ cisplatin และค่าพลังงานกระตุ้น ของสารเชิงซ้อนดังกล่าวเมื่อเกิดปฏิกิริยาแทนที่กับกวานีนและอะดีนีนยังมีพลังงานต่ำกว่า ค่าพลังงานกระตุ้น ของปฏิกิริยาการแทนที่ของ cisplatin กับกวานีนและอะดีนีนอีกด้วย จึงทำให้เห็นว่าสารเชิงซ้อนดังกล่าวอาจสามารถนำไปพัฒนาไปเป็นยาต้านมะเร็งในอนาคตได้

Khanye และคณะ¹³ ได้ทำการสังเคราะห์และวิเคราะห์คุณลักษณะของ gold(I) thiosemicarbazone ด้วยเทคนิค NMR, IR และ MS นอกจากนี้ยังนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากสาร thiosemicarbazone มีความสามารถการยับยั้งเอนไซม์ cruzain ซึ่งเป็นในหนึ่งเอนไซม์ตระกูลซิสเทอีนโปรทีเอสซึ่งมีความสำคัญมากในวัฏจักรชีวิตของ *Trypanosoma cruzi* โดยในการทดสอบนี้จะใช้ falcipain-2 เป็นตัวแทนของซิสเทอีนโปรทีเอสที่ก่อให้เกิดโรคมมาลาเรีย จากผลการทดสอบพบว่าสารเชิงซ้อน gold(I) thiosemicarbazone สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ falcipain-2 ได้ดีกว่าการใช้ thiosemicarbazone เพียงอย่างเดียว

Palanichamy และคณะ¹⁴ ได้สังเคราะห์สารเชิงซ้อนทอง(III) ทั้งหมดสี่ชนิดดังนี้ $[\text{Au}(\text{Phen})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$, $[\text{Au}(\text{DPQ})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$, $[\text{Au}(\text{DPPZ})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$ และ $[\text{Au}(\text{DPQC})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$ โดยที่ Phen = 1,10-phenanthroline, DPQ = dipyrido[3,2-d:2',3'-f]quinoxaline, DPPZ = dipyrido[3,2-a:2',3'-c] phenazine และ DPQC = dipyrido[3,2-d:2',3'-f] cyclohexylquinoxaline ซึ่งสารเชิงซ้อนทั้งสี่นี้แสดงความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า cisplatin โดยมีค่า %growth inhibition ที่มากกว่าและมีค่า IC_{50} น้อยกว่า และที่น่าสนใจคือเมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ A2780-CP70 สารเชิงซ้อนทั้งสี่ชนิดเทียบกับ cisplatin พบว่า cisplatin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 100 μM ในขณะที่สารเชิงซ้อนทั้งสี่สารมีค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่า โดยสารเชิงซ้อนที่มีค่า IC_{50} สูงสุด จะมีค่าเพียง 52 μM และเมื่อทดสอบกับเซลล์ A2780 พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของ $[\text{Au}(\text{DPQ})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$ มีค่าเท่ากับ 84% ซึ่งเมื่อเทียบกับ cisplatin ที่ความเข้มข้นเดียวกันมีค่าเพียง 47% จากผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่าสารเชิงซ้อนดังกล่าวอาจสามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต่อไปในอนาคตได้

Florence และคณะ⁹ ได้ทำการสังเคราะห์สารเชิงซ้อนทองแดง(II) โดยมี N1-(4-methyl-2-pyridyl)-2,3,6-trimethoxybenzamide เป็นลิแกนด์ โดยมีความคาดหวังที่จะใช้สารเชิงซ้อนดังกล่าวมายับยั้งเอนไซม์ protease ที่อยู่ในเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารเชิงซ้อนระหว่างโลหะและสารอินทรีย์สามารถเข้าจับกับตำแหน่งบริเวณเร่งของเอนไซม์ protease ได้อย่างแข็งแรง เนื่องมาจากการรวมความสามารถระหว่างโลหะที่สามารถเกิดพันธะโคเวเลนต์และพันธะไอออนิก กับคุณสมบัติของลิแกนด์ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ ซึ่งงานวิจัยนี้ตั้งอยู่บนสมมติฐานที่ว่าไอออนของโลหะสามารถจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ protease ผ่านทางโมเลกุลน้ำซึ่งจะสามารถหยุดยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ และนอกจากนี้การออกแบบลิแกนด์ให้มีขนาดพอดีกับช่องในตำแหน่งบริเวณ Active site เป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากผลการทดลองพบว่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protease เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารเชิงซ้อนดังกล่าวกับ CuCl_2 ชี้ให้เห็นว่าสารเชิงซ้อนของทองแดงสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นเดียวกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบแนวทางการนำสารเชิงซ้อนของโลหะทองกับอนุพันธ์ของสารประกอบไทอะโซลิดเอโซ มาใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพปซินโปรติเอสและพาเพนโปรติเอส ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคหรือการนำไปสู่การยับยั้งเอนไซม์ชนิดอื่นซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน
2. สามารถผลิตนักวิจัยคือ นิสิตในระดับบัณฑิตศึกษา
3. เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารทั้งในระดับนานาชาติ และระดับชาติ

วิธีวิจัย

อุปกรณ์

1. UV-Vis spectrophotometer, Perkin Elmer Lambda 35
2. Fourier transform infrared spectrometer, Perkin Elmer system 2000
3. NMR spectrometer, INNOVA 400
4. Fluorescence spectrometer, Perkin Elmer LS 45
5. Mass spectrometer, Agilent 1100

สารเคมี

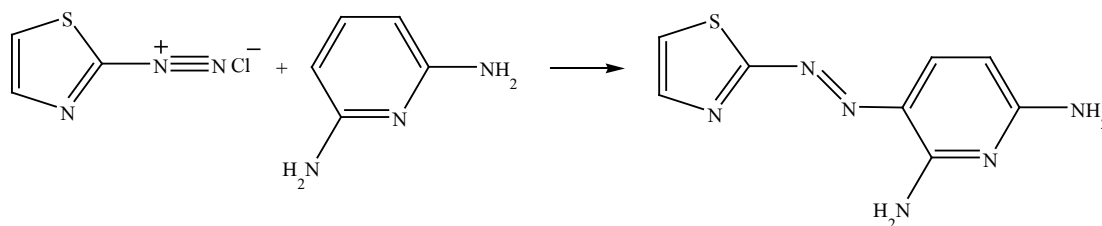
1. 2-aminothiazole
2. 2,6-diaminopyridine
3. Acetic acid
4. Acetone
5. Benzyl bromide
6. L-Cystiene
7. Dichloromethane
8. Dimethylsulfoxide, d-6
9. Double distilled water
10. E-64
11. Ethyl alcohol
12. Hydrochloric acid
13. Methyl alcohol
14. Nitric acid
15. Papain
16. Papstatin A
17. Pepsin
18. Perchloric acid
19. Potassium bromide
20. Potassium tetrachloroaurate(III)
21. Sephadex LH-20
22. Silica gel 600 (063-0.200 mm)
23. Sodium acetate anhydrous
24. Sodium acetate trihydrate
25. Sodium chloride
26. Sodium dihydrogen phosphate
27. Sodium hydrogen phosphate
28. Sodium hydroxide

29. Sodium nitrite
30. Sodium phosphate
31. Tetrahydrofuran
32. Tris(hydroxymethyl)aminomethane
33. Yellow Head Virus (YHV) peptide
34. Z-Phe-Arg-NMec peptide

ขั้นตอนการเตรียมสารเชิงซ้อนทอง(III)

1. สังเคราะห์ 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine (TADAP)

ละลายสาร 2-aminothiazole 1 กรัม ในสารละลาย 6M hydrochloric acid 16 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย sodium nitrite 0.7 กรัม ในน้ำเล็กน้อย สารละลายทั้งสองจะถูกแช่อยู่ในภาคน้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิ ค่อยๆเทสารละลาย 2-aminothiazole ลงในสารละลาย sodium nitrite อย่างช้าๆ ละลายสาร 2,6-diaminopyridine 1 กรัม ในสารละลาย 4M hydrochloric acid 40 มิลลิลิตรซึ่งถูกแช่อยู่ในภาคน้ำแข็งเช่นเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายที่ผสมในขั้นตอนที่แล้วเทลงในสารละลาย 2,6-diaminopyridine กรองและล้างตะกอนด้วยน้ำเย็น จากนั้นนำของแข็งที่ได้ไปตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่าง Methanol และ Hexane นำไปวิเคราะห์ด้วย FT-IR (KBr), ^1H NMR และ Mass spectroscopy



2. สังเคราะห์สารเชิงซ้อนทอง(III) ที่มี 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine เป็นลิแกนด์

ละลายสาร potassium tetrachloroaurate(III) 0.1814 กรัม ในสารละลาย tetrahydrofuran 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงเติมสารละลาย 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine 0.1056 กรัม ที่ละลายอยู่ใน tetrahydrofuran 25 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองในขวดก้นกลม 50 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม sodium chloride 0.0058 g ลงในสารละลาย จากนั้นทำการรีฟลักซ์นานเป็นเวลา 8 ชม. หลังจากระเหยสารละลายออกไปจะได้ตะกอนซึ่งนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกสารด้วยโครมาโทกราฟีโดยมีคอลัมน์เป็น Sephadex LH-20 และใน methanol เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) วิเคราะห์ด้วย FT-IR (KBr) และ ^1H NMR

3. ศึกษาโครงสร้างของสารเชิงซ้อนทอง(III) ที่มี 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine เป็นลิแกนด์

ศึกษาโครงสร้างด้วยวิธี continuous variation ที่ pH 3.0 ถึง 6.0 โดยการเตรียม stock solutions ของทอง(III) และ TADAP ที่มีความเข้มข้นเท่ากันคือ 4.0×10^{-3} M หลังจากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยการผสม stock solutions ทั้งสองในปริมาณต่างกันซึ่งความเข้มข้นรวมระหว่างทอง(III) และ TADAP มีค่า

เท่ากัน นำสารละลายมาวัดการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer ที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นสร้างกราฟระหว่างค่าอัตราส่วนโมลของ TADAP กับค่าการดูดกลืนแสง ที่จุดที่ค่าการดูดกลืนแสงจะทำให้ทราบอัตราส่วนของทอง(III) และ TADAP ในสารเชิงซ้อน และหาค่าคงที่เสถียรภาพ (stability constant) ด้วยวิธี continuous variation และสมการของ Benesi-Hildebrand

4. การวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์

การคำนวณจะใช้โปรแกรม GAUSSIAN ด้วยหลักการคำนวณแบบ Density functional (DFT) ใช้พารามิเตอร์ฟังก์ชันของ B3LYP (Becke, Lee- Yang-Parr correlation functional) และมีเบสิคเซตคือ 6-31G(d) สำหรับทุกอะตอมยกเว้นทองที่จะใช้เบสิคเซตเป็น LANL2DZ เนื่องจากจะมีความเหมาะสมในการคำนวณอะตอมทองมากกว่า จากการคำนวณจะทำให้ทราบถึงพลังงานและพารามิเตอร์ของพันธะของสารเชิงซ้อน และค่าพลังงาน Enthalpy of formation (ΔH_f) จะคำนวณตามสมการด้านล่าง

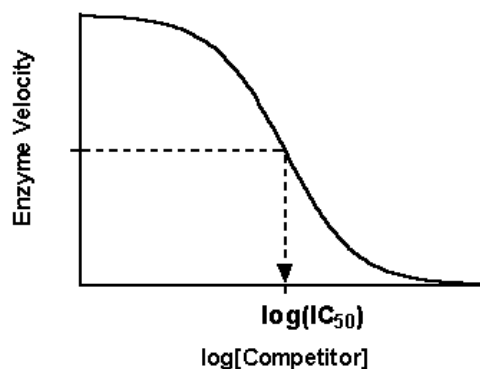
$$\Delta H_f = [(H_{\text{complex}})] - [(H_{\text{Au(III)}}) + 2(H_{\text{TADAP}})]$$

โดย H_{complex} คือค่าพลังงานทั้งหมดของสารประกอบเชิงซ้อนส่วน $H_{\text{Au(III)}}$ และ H_{TADAP} คือค่าพลังงานของทอง (III) และ TADAP

ขั้นตอนการทดสอบ protease assay

1. การยับยั้งเอนไซม์เพปซิน

วิธีการทดสอบจะทำตามวิธีของ Gomes¹⁶ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดย Yellow head virus (YHV) ทำหน้าที่เป็นเพปไทด์ซึ่งเป็นตัววัดความสามารถในการตัดของเอนไซม์เพปซิน มีโครงสร้างคือ DABCYL-Lys-Ala-Val-His-Tyr-Leu-Glu-His-Asn-Val-Lys-Glu-EDANS¹⁶ ในหลอดทดสอบจะบรรจุสารละลายทั้งหมด 400 μL ประกอบไปด้วยเพปซิน (2.5 μM) ตัวยับยั้ง (0-200 μM) ใน บัฟเฟอร์ sodium acetate (0.05 M, pH 4.0) หลังจากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง จากนั้นเติมเพปไทด์ YHV (2.5 μM) แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนซ์เป็นเวลา 10 นาทีที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength) 336 nm และความยาวคลื่นปลดปล่อย (Emission wavelength) 490 nm ในการทดสอบนี้ Pepstatin A จะถูกใช้เป็นตัวยับยั้งอ้างอิง และค่า IC_{50} จะคำนวณจากความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่ทำให้ความสามารถในการทำงานของเพปซินลดลงครึ่งหนึ่ง ดังแสดงในภาพ

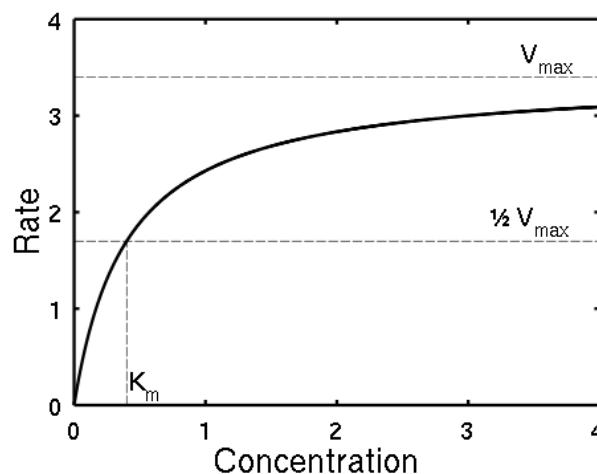


2. การยับยั้งเอนไซม์ฟาเพน

วิธีการทดสอบจะทำตามวิธีของ Gawlik and Gutowicz¹⁷ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย Z-Phe-Arg-NMec ทำหน้าที่เป็นเปปไทด์ซึ่งเป็นตัววัดความสามารถในการตัดของเอนไซม์ฟาเพน¹⁹ ในหลอดทดสอบจะบรรจุสารละลายทั้งหมด 400 μL ประกอบไปด้วยฟาเพน (8 nM) ตัวยับยั้ง (0-200 μM) ซีตเทอีน (4 mM) ใน บัฟเฟอร์ phosphate (0.1 M, pH 6.8) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม เปปไทด์ Z-Phe-Arg-NMec (5 μM) แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนซ์เป็นเวลา 10 นาทีที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength) 380 nm และความยาวคลื่นปลดปล่อย (Emission wavelength) 460 nm ในการทดสอบนี้ E-64 จะถูกใช้เป็นตัวยับยั้งอ้างอิง และค่า IC_{50} จะคำนวณจากความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่ทำให้ความสามารถในการทำงานของฟาเพนลดลงครึ่งหนึ่ง

3. ขั้นตอนการทดสอบ Kinetic parameter ของเอนไซม์เพปซิน

วิธีการทดสอบจะทำตามวิธีของ Gomes¹⁵ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย Yellow head virus (YHV) ทำหน้าที่เป็นเปปไทด์ซึ่งเป็นตัววัดความสามารถในการตัดของเอนไซม์เพปซินมีโครงสร้างคือ DABCYL-Lys-Ala-Val-His-Tyr-Leu-Glu-His-Asn-Val-Lys-Glu-EDANS¹⁷ ในหลอดทดสอบจะบรรจุสารละลายทั้งหมด 500 μL ประกอบไปด้วยเพปซิน (2.5 μM) ตัวยับยั้ง (12.5 และ 24.5 μM) ใน บัฟเฟอร์ sodium acetate (0.05 M, pH 4.0) หลังจากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง จากนั้นเติมสับสเตรทเปปไทด์ (0.625-10 μM) แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนซ์เป็นเวลา 10 นาทีที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength) 336 nm และความยาวคลื่นปลดปล่อย (Emission wavelength) 490 nm ในการทดสอบนี้ Pepstatin A จะถูกใช้เป็นตัวยับยั้งอ้างอิง และค่า K_m และ V_{max} จะเป็นค่าที่ได้จากการสร้างกราฟให้เข้ากับอัตราเริ่มต้นเทียบกับความเข้มข้นของซับสเตรทโดยผ่านสมการของ Michaelis-Menten ดังแสดงในภาพ



4. ขั้นตอนการทดสอบ Kinetic parameter ของเอนไซม์ฟาเพน

วิธีการทดสอบจะทำตามวิธีของ Gawlik and Gutowicz¹⁷ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย Z-Phe-Arg-NMec จำทำหน้าที่เป็นเพปไทด์เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการตัดของเอนไซม์ฟาเพน¹⁸ ในหลอดทดสอบจะบรรจุสารละลายทั้งหมด 400 μ l ประกอบไปด้วยฟาเพน (8 nM) ตัวยับยั้ง (12.5 และ 25.0 μ M) ซีตเทอีน (4 mM) ใน บัฟเฟอร์ phosphate (0.1 M, pH 6.8) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม เพปไทด์ Z-Phe-Arg-NMec (0-7.6 μ M) แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนซ์เป็นเวลา 10 นาทีที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength) 380 nm และความยาวคลื่นปลดปล่อย (Emission wavelength) 460 nm ในการทดสอบนี้ E-64 จะถูกใช้เป็นตัวยับยั้งอ้างอิง และค่า K_m และ V_{max} จะเป็นค่าที่ได้จากการสร้างกราฟให้เข้ากับอัตราเริ่มต้นเทียบกับความเข้มข้นของซับสเตรตโดยผ่านสมการของ Michaelis-Menten

ผลและวิจารณ์

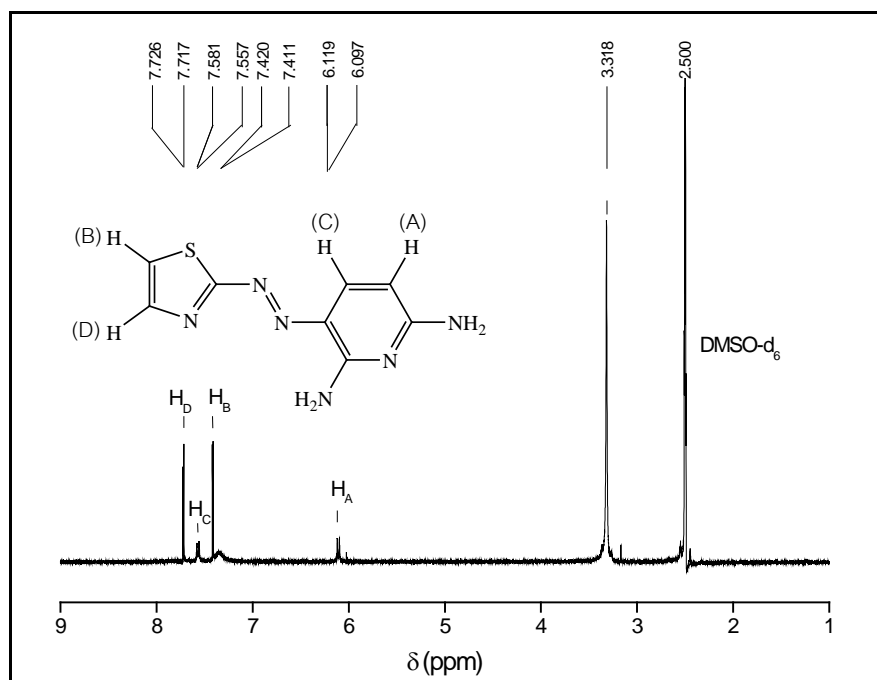
วิเคราะห์โครงสร้างของสารเชิงซ้อนทอง(III)

1. วิเคราะห์ 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine ด้วย FT-IR (KBr), ¹H NMR และ Mass spectroscopy

¹H NMR: (DMSO-d₆): δ 6.108 (1H, d, H_A, J = 9.17 Hz.), 7.415 (1H, d, H_B, J = 3.48 Hz.), 7.570 (1H, d, H_C, J = 8.97 Hz.) และ 7.722 (1H, d, H_D, J = 3.48 Hz.) ดังแสดงในภาพที่ 2

IR (KBr cm^{-1}): 3335 cm^{-1} , 3217 cm^{-1} (w, N-H stretch), 3082 cm^{-1} (w, C-H stretch aromatic), 1660 cm^{-1} (s, C=N stretch), 1631 cm^{-1} (s, N-H bend aromatic) 1454 cm^{-1} (m, N=N stretch), 1292 cm^{-1} (s, C-N stretch) และ 1159 cm^{-1} (m, C-S stretch)

MS: m/z (relative intensity): 221.4 (100), 136.4 (19), 108.4 (52), 81.5 (20).

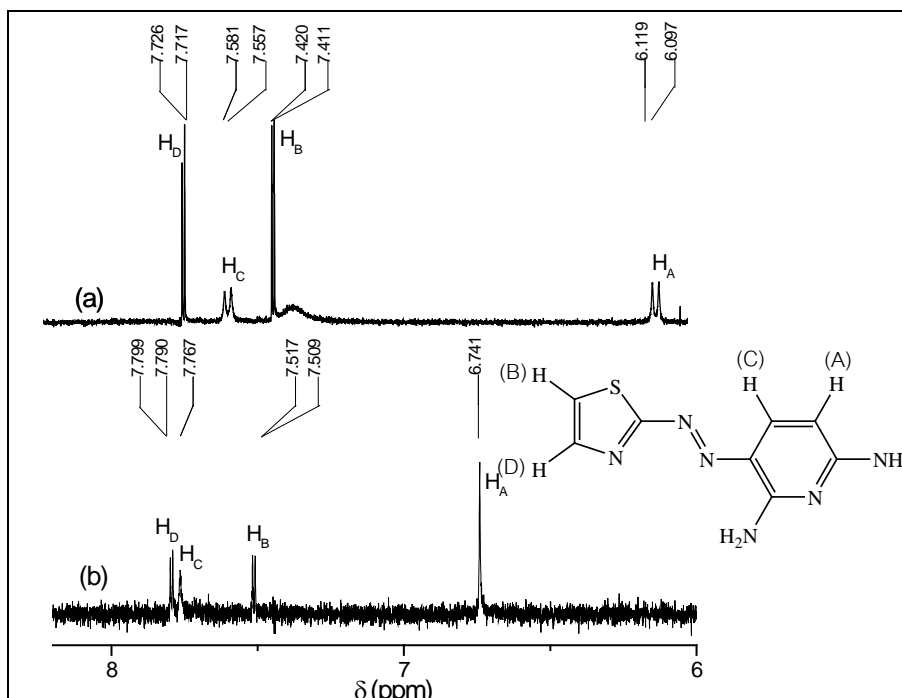


ภาพที่ 2 ^1H NMR spectrum ของ 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine (TADAP)

2. วิเคราะห์สารเชิงซ้อนของ(III) ที่มี 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine เป็นลิแกนด์ด้วย FT-IR (KBr) และ ^1H NMR

^1H NMR: (DMSO- d_6): δ 6.741 (1H, s, H_A), 7.510 (1H, d, H_B , $J = 3.50$ Hz.), 7.767 (1H, s, H_C) และ 7.794 (1H, d, H_D , $J = 3.48$ Hz.) ดังแสดงในภาพที่ 3

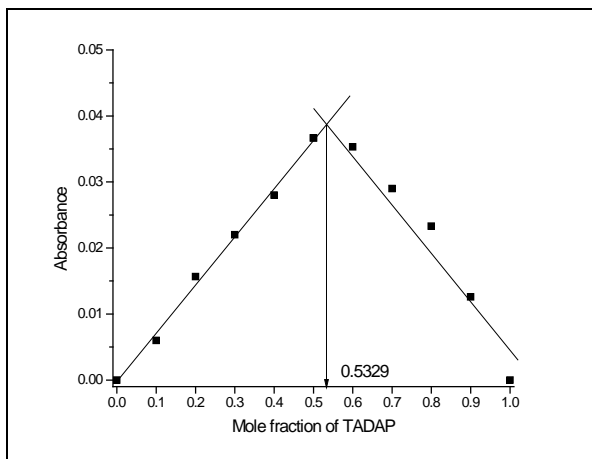
IR (KBr cm^{-1}): 3322 cm^{-1} (w, N-H stretch), 3187 cm^{-1} (w, C-H stretch aromatic), 1606 cm^{-1} (s, N-H bend aromatic) 1405 cm^{-1} (m, N=N stretch), 1210 cm^{-1} (s, C-N stretch) และ 1122 cm^{-1} (m, C-S stretch).



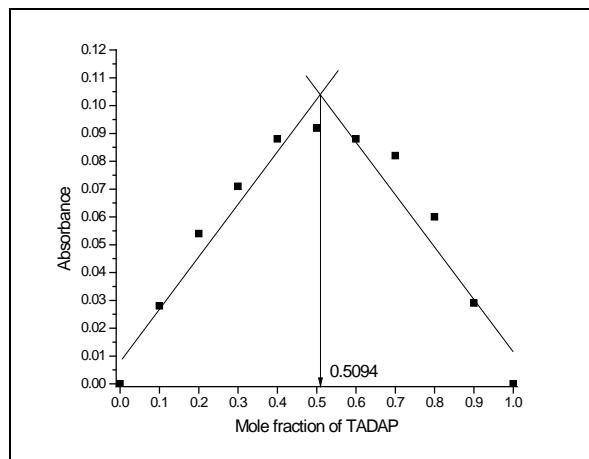
ภาพที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบ¹H NMR spectrum ของ a) 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine
 b) สารประกอบเชิงซ้อนของ(III) ที่มี 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine เป็นลิแกนด์

3. วิเคราะห์โครงสร้างของสารเชิงซ้อนของ(III) ที่มี 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine เป็น ลิแกนด์
 อัตราส่วนระหว่างทอง(III) และ TADAP จะเป็น 1:1 ที่ pH 3.0, 4.0 และ 5.0 และเป็น 1:2 ที่ pH 6.0
 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาณของไฮดรอกไซด์ในสารละลาย เนื่องจากที่ pH 3.0, 4.0 และ 5.0 มีปริมาณ
 ไฮดรอกไซด์ของคลอไรด์มากทำให้ไฮดรอกไซด์ของทองจะเกิดสารเชิงซ้อนกับไฮดรอกไซด์ซึ่งทำให้อัตราส่วน
 ระหว่างทอง(III) และ TADAP จะเป็น 1:1 แต่ในขณะที่ pH 6.0 ปริมาณของไฮดรอกไซด์น้อยจึงทำให้อัตราส่วน
 ระหว่างทอง(III) และ TADAP จะเป็น 1:2

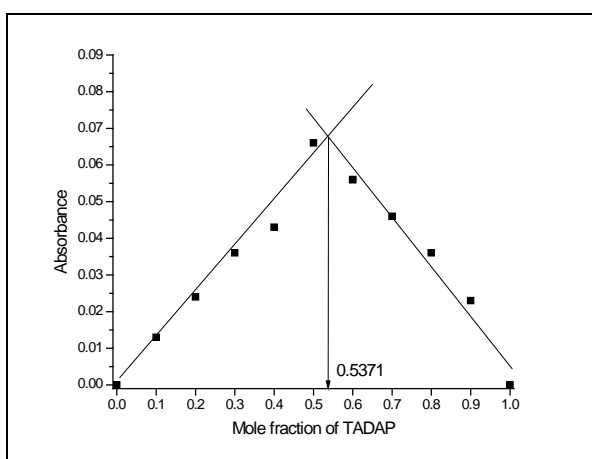
ค่าคงที่ stability ของสารประกอบเชิงซ้อนที่ pH 6.0 มีค่า 9.205×10^9 และ 3.355×10^9 จากวิธี
 continuous variation และสมการของ Benesi-Hildebrand ตามลำดับ



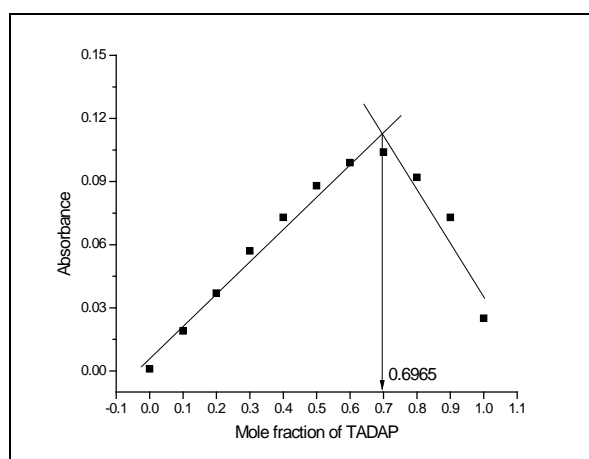
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

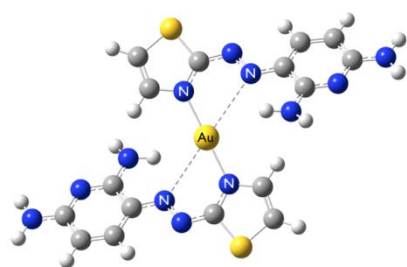
ภาพที่ 4 กราฟ continuous variation ระหว่างทอง(III) และ TADAP ในสภาวะละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH (ก) 3.0, (ข) 4.0, (ค) 5.0 และ (ง) 6.0.

ที่ pH 6.0 จากค่าเอนทัลปีของการเกิด (Enthalpy of formation) ทำให้ทราบว่าสารประกอบเชิงซ้อนทอง(III) กับ TADAP มีอัตราส่วนเป็น 1:2 และมีลักษณะโครงสร้างเป็นสี่เหลี่ยมแบนราบ ซึ่งโครงสร้างที่มีพลังงานต่ำสุดคือ -1445.21 kcal/mol เป็นโครงสร้างที่ทองเกิดพันธะกับไนโตรเจนของลิแกนด์สี่อะตอม (รูปภาพ 5ก)

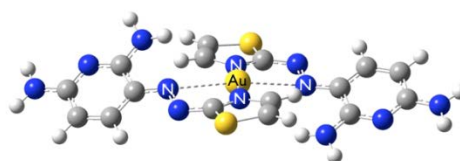
นอกจากนี้การเลื่อนของพีค IR สามารถช่วยยืนยันการเกิดพันธะระหว่างอะตอมที่ให้อิเล็กตรอนกับโลหะ ดังนี้ N-H stretching จาก 3435 cm^{-1} และ 3217 cm^{-1} ไป 3322 cm^{-1} , N=N stretching จาก 1454 cm^{-1} ไป 1405 cm^{-1} , C-N stretching จาก 1292 cm^{-1} ไป 1210 cm^{-1} และ C-S stretching และ 1159 cm^{-1} ไป 1122 cm^{-1} . การเกิด red shifts ของสเปกตรัมของ IR เนื่องจากการลดลงของอันดับพันธะ (bond order) ของอะตอมที่ให้อิเล็กตรอน และเนื่องจากการเคลื่อนเกิดขึ้นในพันธะ C-N ($\Delta\text{C-N stretching } 82\text{ cm}^{-1}$) มากกว่าพันธะ C-S ($\Delta\text{C-S stretching } 37\text{ cm}^{-1}$) จึงช่วยยืนยันการเกิดพันธะระหว่างไนโตรเจนกับทอง(III) มีความเป็นไปได้มากกว่าซัลเฟอร์กับทอง(III)

ตารางที่ 1 ค่าเอนทัลปีของการเกิด (Enthalpy of formation, ΔH_f) ของโครงสร้างที่มีความเป็นไปได้และประจุของอะตอมของสารประกอบเชิงซ้อนของทอง (III) และ TADAP จากการคำนวณโดยโปรแกรม Gaussian09 ที่ B3LYP ที่มีเบสิกเซตเป็น 6-31G(d) และ LANL2DZ

Models	Enthalpy of formation (kcal/mol)	Atomic charge distributions		
		Au	N	S
NN-Au-NN	-1445.21	+0.276	-0.525	+0.346
NN-Au-NS	-1416.58	+0.122	-0.381	+0.319
NS-Au-NS	-1410.84	+0.100	-0.391	+0.327

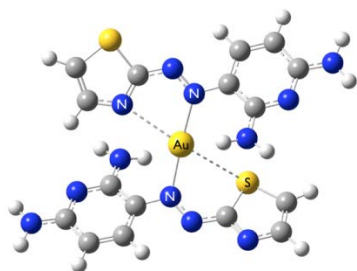


ด้านบน

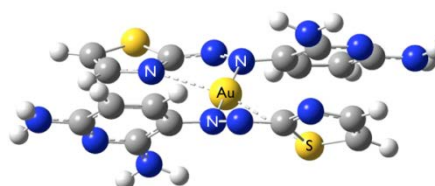


ด้านข้าง

(ก)

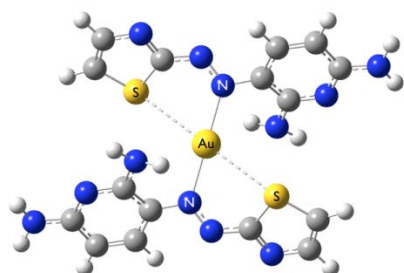


ด้านบน

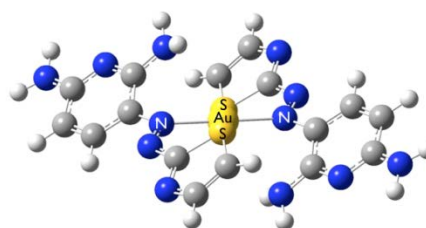


ด้านข้าง

(ข)



ด้านบน



ด้านข้าง

(ค)

ภาพที่ 5 โครงสร้างทั้งหมดที่เป็นไปได้ของสารเชิงซ้อนระหว่างทอง(III) และ TADAP (1:2)

(ก) NN-Au-NN, (ข) NN-Au-NS และ (ค) NS-Au-NS

การทดสอบ protease assay

1. การยับยั้งเอนไซม์เพปซินและพาเพน

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เพปซินของสารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP พบว่าค่า IC₅₀ ของสารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP (ตารางที่ 2) มีค่าต่ำกว่าค่า IC₅₀ ของทอง(III) และ TADAP ประมาณ 2 และ 2.7 เท่าตามลำดับ ซึ่งให้เห็นว่าการเกิดสารเชิงซ้อนสามารถเพิ่มความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เพปซินและ ความสามารถดังกล่าวนี้ไม่ได้มากจากผลของการรวมความสามารถในการยับยั้งของทอง(III) และ TADAP แต่มาจากความสามารถของสารเชิงซ้อนเอง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำค่า IC₅₀ ของสารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP ยังค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวยับยั้ง Pepstatin A

ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์พาเพนของสารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP พบว่าค่า IC₅₀ ที่ได้มีแนวโน้มที่สอดคล้องกับการศึกษาการยับยั้งเพปซิน ซึ่งค่า IC₅₀ ของสารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP (ตารางที่ 2) มีค่าต่ำกว่าค่า IC₅₀ ของทอง(III) และ TADAP ประมาณ 6.5 และ 2.3 เท่าตามลำดับ แต่ยังไม่ดีนักพอเมื่อเปรียบเทียบกับตัวยับยั้ง E-64 จากผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าสารเชิงซ้อนดังกล่าวสามารถยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอสทั้งสองชนิดได้แต่ยังต้องได้รับการพัฒนาต่อไป

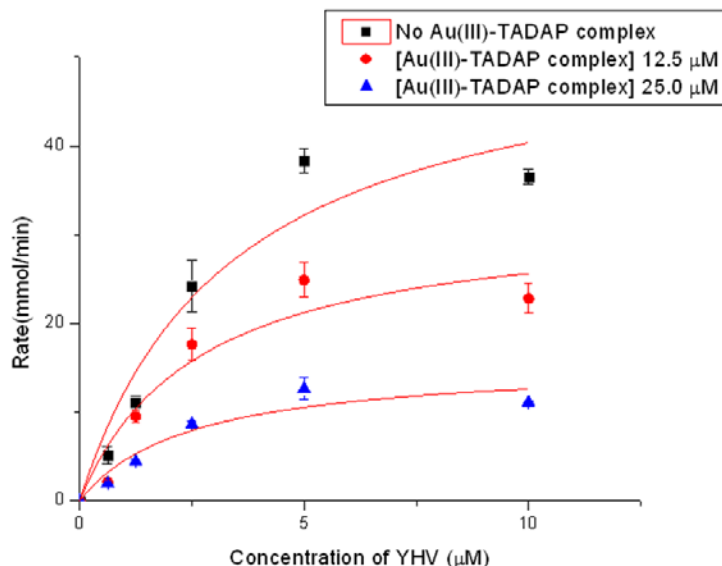
ตารางที่ 2 ค่า IC₅₀ และค่าความคลาดเคลื่อนของตัวยับยั้งเพปซินและพาเพน

ตัวยับยั้ง	IC ₅₀ (µM)	
	เพปซิน	พาเพน
ทอง(III)	19.63 ± 1.12	76.68 ± 12.39
TADAP	27.78 ± 4.40	27.65 ± 6.99
สารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP	10.28 ± 1.35	11.77 ± 0.59
Pepstatin A	0.08 ± 0.01	-
E-64	-	3.37 ± 0.75 nM

2. การทดสอบ Kinetic parameter ของเอนไซม์เพปซินและพาเพน

ในการทดสอบ Kinetic parameter ของเอนไซม์เพปซิน (ภาพที่ 6 และตารางที่ 3) พบว่าเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง K_m และ V_{max} จะมีค่าเท่ากับกับ 3.4 µM และ 54 nmol/minute ตามลำดับ ซึ่งค่า Km ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับค่าที่ได้จากงานวิจัยของ Yonezawa และคณะ¹⁹ ซึ่งศึกษาเอนไซม์เพปซินกับเพปไทด์ Dns-Ala-Phe-Trp-Val-Leu-OCH₂Py ได้ค่า K_m เท่ากับ 80 µM ซึ่งความแตกต่างของค่า K_m นี้ น่าจะมาจากความแตกต่างของสิ่งแวดล้อมในการทดสอบและชนิดของเพปไทด์ที่แตกต่างกัน และจากการศึกษาสารเชิงซ้อนที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งที่ความเข้มข้น 12.5 µM และ 25 µM พบว่าเมื่อค่าความเข้มข้นของสารเชิงซ้อนสูงขึ้นจะทำให้ค่า K_m และ V_{max} มีค่าต่ำลง จากข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าสารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP จัดเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (uncompetitive inhibitor)

จากการทดสอบ Kinetic parameter ของเอนไซม์ฟาเพน (ตารางที่ 3) พบว่าเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง K_m และ V_{max} จะมีค่าเท่ากับกับ 142.6 μM และ 398.9 nmol/minute ตามลำดับ ซึ่งค่า K_m ที่ได้นี้มีความคล้ายคลึงกับค่าที่ได้จากงานวิจัยของ Ménard และคณะ²⁰ ซึ่งศึกษาเอนไซม์เพปซินกับเพปไทด์ชนิดเดียวกัน ได้ค่า K_m เท่ากับ 420 μM ซึ่งความแตกต่างของค่า K_m นี้ น่าจะมาจากความแตกต่างของสิ่งแวดล้อมในการทดสอบและวิธีทดสอบที่ต่างกันไป และจากการศึกษาสารเชิงซ้อนที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งที่ความเข้มข้น 12.5 μM และ 25 μM พบว่าเมื่อค่าความเข้มข้นของสารเชิงซ้อนสูงขึ้นจะทำให้ค่า K_m และ V_{max} มีค่าต่ำลง จากข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าสารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP จัดเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (uncompetitive inhibitor)



ภาพที่ 6 กราฟ Michaelis-Menten ของสารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP ในการยับยั้งเพปซิน

ตารางที่ 3 ค่า K_m และ V_{max} ของสารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP ในการยับยั้งเพปซินและฟาเพน

ตัวยับยั้ง	เพปซิน*		ฟาเพน*	
	K_m (μM)	V_{max} (nmol/minute)	K_m (μM)	V_{max} (nmol/minute)
ไม่มีตัวยับยั้ง	3.4 ± 1.6	54.0 ± 10.5	142.6 ± 53.6	398.9 ± 131.9
12.5 μM สารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP	2.6 ± 1.4	32.4 ± 6.5	5.2 ± 1.2	1.5 ± 0.2
25 μM สารเชิงซ้อนทอง(III) และ TADAP	2.4 ± 1.2	15.6 ± 1.2	1.8 ± 0.4	0.4 ± 0.0

*** ไม่สามารถเปรียบเทียบค่า K_m และ V_{max} ระหว่างเอนไซม์ได้เนื่องจากใช้เพปไทด์คนละชนิดกัน

สรุปและเสนอแนะ

สารเชิงซ้อนของทอง(III) และ 3-(2'-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine (TADAP) มีอัตราส่วนเป็น 1:1 ที่ pH 3.0, 4.0 และ 5.0 และที่ pH 6.0 เป็น 1:2 จากผลของสเปกตรัมของ IR ทำให้ทราบว่าอะตอมไนโตรเจนทั้งสองอะตอมของ TADAP เกิดพันธะกับทอง(III) ซึ่งสามารถยืนยันได้จากผลการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยการคำนวณด้วยหลักการคำนวณแบบ Density functional (DFT) ใช้พารามิเตอร์ฟังก์ชันของ B3LYP มีเบสิคเซตคือ 6-31G(d) สำหรับทุกอะตอมยกเว้นทองที่จะใช้เบสิคเซตเป็น LANL2DZ และค่าคงที่ stability ของสารประกอบเชิงซ้อนที่ pH 6.0 มีค่า 9.205×10^9 และ 3.355×10^9 จากวิธี continuous variation และสมการของ Benesi-Hildebrand ตามลำดับ สารเชิงซ้อนดังกล่าวยังมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เพปซินและพาเพนโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.28 μ M และ 11.77 μ M ตามลำดับ ซึ่งจากผลจากการทดสอบ Kinetic parameter พบว่าสารเชิงซ้อนดังกล่าวจัดเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน

เอกสารอ้างอิง

1. Andreeva, N.S., 1994, How and why is pepsin stable and active at pH 2?, *Journal of Molecular Biology* (28): 1400–1406.
2. Vassar, R., 2001, The β -secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* (17): 157–170.
3. Tang, J., P. Sepulveda, J. Marciniuszyn Jr., K.C.S. Chen, W.-Y. Huang, and N. Tao, 1973, Amino acid sequence of porcine pepsin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (70): 3437–3439.
4. Cynthia, W., C.S. Davis, and P.M. Fisichella, 2011, Current applications of evolving methodologies in gastroesophageal reflux disease testing. *International Journal of Biological Macromolecules* (45): 213–220.
5. Afshar, R.K., A.K. Patra, and P.K. Mascharak, 2005, Light-induced inhibition of papain by a $\{Mn-NO\}^6$ nitrosyl: Identification of papain-SNO adduct by mass spectrometry. *Journal of Inorganic Biochemistry* (99): 1458–1464.
6. Babine, R.E. and S.L. Bender, 1997, Molecular Recognition of Protein-Ligand Complexes: Applications to Drug Design. *Chemical Reviews* (97): 1359-1472.
7. Pascaline N.F., F.K. Keter, D. Meyer, I.A. Guzei, and J. Darkwa, 2009. Tetra-chloro-(bis-(3,5-dimethylpyrazolyl)methane)gold(III) chloride: an HIV-1 reverse transcriptase and protease inhibitor. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103:190-194.

8. Tebogo, V.S., I.A. Guzei, L.C. Spencer, W.E.V. Zyl and J. Darkwa, 2009, (Pyrazolylmethyl)-pyridine platinum(II) and gold(III) complexes: synthesis, structures and evaluation as anticancer agents. **Inorganica Chimica Acta** 362:3314-3324.
9. Florence L., N. Boggetto, M. Ledecq, F. Durant, Z. Benatallah, S. Sicsic, R. Lapouyade, O. Kahn, A. M. Mickalad, G. D. Dupont, and M. R. Ravaux. 2002, Metal-organic compounds: a new approach for drug discovery N1-(4-methyl-2-pyridyl)-2,3,6-trimethoxybenzamide copper(II) complex as an inhibitor of human immunodeficiency virus 1 protease. **Biochemical Pharmacology** 63:1863-1873.
10. Milacic, V., and Q.P. Dou, 2009, The tumor proteasome as a novel target for gold(III) complexes: Implications for breast cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews** 253: 1649–1660.
11. Milacic, V., D.Chen, L. Ronconi, K.R. Landis-Piwowar, D. Fregona, and Q.P. Dou, 2006, A Novel Anticancer Gold(III) Dithiocarbamate Compound Inhibits the Activity of a Purified 20S Proteasome and 26S Proteasome in Human Breast Cancer Cell Cultures and Xenografts. **American Association for Cancer Research**. 66 (21).
12. Zhao, H. and L. Zhou, 2012, A theoretical study on transition state of the antitumor drug: Gold(III) dithiocarbamate derivative interaction with cysteine and DNA purine bases. **Computational and Theoretical Chemistry** 979: 22–32
13. Khanye, S.D., G.S. Smith, C. Lategan, P.J. Smith, J.Gut, P.J. Rosenthal, and K. Chibale, 2010, Synthesis and in vitro evaluation of gold(I) thiosemicarbazone complexes for antimalarial activity. **Journal of Inorganic Biochemistry** 104: 1079–1083.
14. Palanichamy, K., N. Sreejayan, and A.C. Ontko, 2012, Overcoming cisplatin resistance using gold(III) mimics: Anticancer activity of novel gold(III) polypyridyl complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry** 106: 32–42
15. Gomes, R.A.d.S., R.P. Batista, A.C. de Almeida, D.N. da Fonseca, L. Juliano and V. Hial, 2003, A Fluorimetric Method for the Determination of Pepsin Activity. **Analytical Biochemistry** 316 (1): 11-14.
16. Ziebuhr, J., S. Bayer, J.A. Cowley and A.E. Gorbalenya, 2003, The 3c-Like Proteinase of an Invertebrate Nidovirus Links Coronavirus and Potyvirus Homologs. **Journal of Virology** 77 (2): 1415-1426.
17. Gawlik, K. and J. Gutowicz, 2008, Inhibitory Activity against Papain, a Ca¹ Cysteine Peptidase, in Saccharomycetaceae. **Microbiological Research** 163 (5): 545-555.
18. Barrett, A.J., 1980, Fluorimetric Assays for Cathepsin B and Cathepsin H with Methylcoumarylamide Substrates. **Biochemical Journal** 187 (3): 909-912.

19. Moruno-Dávila, M.A., C.G.-d. Solo, M. García-Moreno, F. García-Cánovas, and R. Varón, 2001, Kinetic analysis of enzyme systems with suicide substrate in the presence of a reversible, uncompetitive inhibitor, **Biosystems**. 61: 5-14.
20. Ménard, R., H.E. Khouri, C. Plouffe, R. Dupras, D. Ripoll, T. Vernet, D.C. Tessier, F. Laliberté, D.Y. Thomas, and A.C. Storer, 1990, A Protein Engineering Study of the Role of Aspartate 158 in the Catalytic Mechanism of Papain, **Biochemistry** 29: 6706-6713.