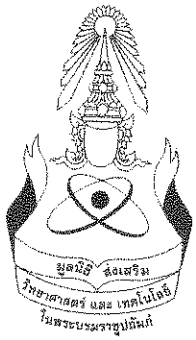
นักวิทยาศาสตร์ดีเด่น กับสังคมไทย

925.0593
ม686น
2546

งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์

or the Promotion of Science and Technology under the Patronage of His Majesty the King

เ่องง่าย โชคดีที่ผู้เขียน
วทางในการทำงานต่างๆ
ub) ทุกวันเสาร์ตอนเช้า
าเสมอ



การพัฒนา
ยามาลาเรียแบบมุ่งเป้า

ศาสตราจารย์ ดร. ยงยุทธ ยุทธวงศ์

นักวิทยาศาสตร์ดีเด่น พ.ศ. 2527
สาขาชีวเคมี

การพัฒนายามาลาเรียแบบมุ่งเป้า

เรื่องย่อ

การศึกษาชีวเคมีและชีววิทยาในระดับโมเลกุลของเชื้อมาลาเรียทำให้รู้จักเป้าหมายของยาบางชนิด เช่น เป้าหมายของยาประเภทแอนตีโฟเลต ซึ่งเป็นเอนไซม์ dihydrofolate reductase อันเป็นเอนไซม์ที่อยู่คู่กับ thymidylate synthase ในโมเลกุลเดียวกัน ทำให้รู้จักว่าเป้าหมายของยานี้มีความสำคัญอย่างไรสำหรับเชื้อ มีลักษณะอย่างไร มีการทำงานอย่างไร ยาเข้าไปจับกับเป้าหมายเพื่อยับยั้งการทำงานของมันได้อย่างไร และเกิดการเปลี่ยนแปลงอะไรขึ้นที่ทำให้เชื้อดื้อยา กลุ่มวิจัยของเราได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์นี้ทั้งในคนและในสัตว์ทดลอง โดยได้ใช้พันธุวิศวกรรมสังเคราะห์เอนไซม์จากเชื้อมาลาเรียของคนได้ในปริมาณมาก และได้แสดงให้เห็นว่าการดื้อยาเช่นพิริเมธามีน (pyrimethamine) และไซโคลกัวนิล (cycloguanil) เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ (mutation)ที่ตำแหน่งต่างๆในยีนมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งทำให้ยาไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ดีดังเดิม เราได้จำลองวิวัฒนาการของการดื้อยาโดยเอายีนจากเชื้อมาลาเรียไปใส่ในแบคทีเรีย แล้วศึกษาผลของการกลายพันธุ์ในยีนต่อการดื้อยาของแบคทีเรียนั้น ได้ใช้คอมพิวเตอร์จำลองโครงสร้างของเอนไซม์ ทั้งที่เป็นตัวดั้งเดิมและที่กลายพันธุ์ไปแล้ว และต่อมาได้สามารถตกผลึกเอนไซม์เหล่านี้จากเชื้อมาลาเรียของคน ทั้งแบบ *Plasmodium falciparum* และแบบ *P. vivax* แล้วหาโครงสร้างโดยการเลี้ยวเบนเอ็กซ์เรย์ การศึกษาเหล่านี้ทำให้รู้โครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปจากการกลายพันธุ์โดยละเอียด และทำให้รู้สาเหตุที่สำคัญของการดื้อยาว่า เกิดจากการที่โครงสร้างของบริเวณที่เป้าหมายจับกับยานั้นได้เปลี่ยนไป โดยมีบางส่วนกีดขวางไม่ให้ยาเข้ามาจับได้ดีดังเดิมได้ออกแบบและสังเคราะห์ยาใหม่ที่จะสามารถจับกับเอนไซม์ที่เปลี่ยนไปนั้นได้ดี ทำให้ยับยั้งเอนไซม์จากเชื้อที่ดื้อยา และมีผลต้านมาลาเรียที่ดื้อยาได้

ภูมิหลัง

มาลาเรีย หรือที่เดิมเรียกว่า ไข้จับสั่นหรือไข้ป่าเกิดขึ้นจากเชื้อโปรโตซัวที่เรียกว่า Plasmodium ซึ่งมีหลายชนิด ในคนมีสองสปีชีส์ที่สำคัญที่มีมากในเมืองไทย คือ *P. falciparum* และ *P. vivax* เชื้อเหล่านี้มียุงก้นปล่องเป็นตัวนำ เมื่อยุงที่มีเชื้อมากัด เชื้อจะเข้าร่างกายพร้อมกับน้ำลายของยุง เดินทางไปตามกระแสเลือดแล้วเข้าไปในเซลล์ตับ เจริญเติบโตแล้วแบ่งตัวเป็นจำนวนมาก ทำลายเซลล์ออกมาสู่กระแสเลือดอีกครั้ง ทีนี้จะเจาะเข้าไปในเม็ดเลือดแดง เติบโตและแบ่งตัวอีกจนเม็ดเลือดแตก เชื้อรุ่นใหม่กระจายออกมาทุกสองวัน คนไข้จะมีอาการหนาวสั่นในตอนนี้ แต่มาลาเรียไม่เพียงมีฤทธิ์ทำให้เป็นไข้หนาวสั่นเท่านั้น หากทำให้มีอาการอื่นอีกมากซึ่งทำให้ถึงชีวิตได้ อาการที่สำคัญคืออาการทางสมอง ที่เรียกว่า มาลาเรียขึ้นสมอง ซึ่งจะเกิดจากเชื้อประเภทฟาลซิปารัมเท่านั้น

เมื่อสามสิบปีที่แล้ว เป็นที่คาดหวังกันว่าจะขจัดมาลาเรียให้หมดไปได้ เนื่องจากมีสารเคมีปราบยุงประเภท ดีดีที อยู่มาก ซึ่งมีราคาถูก ใช้พ่นตามบ้านเรือนได้ผลดี แต่ความหวังนี้ต้องสลายลงเมื่อได้พบต่อมาว่า ยุงสามารถหลบเลี่ยงหรือดื้อต่อยาฆ่าแมลงได้ ผลต่อการขจัดยุงยิ่งทียิ่งน้อยลงเรื่อยๆ มิหนำซ้ำ ยังพบว่าสารฆ่าแมลงดังกล่าวมีพิษตกค้าง เป็นผลข้างเคียงที่ไม่พึงปรารถนาต่อสิ่งมีชีวิตอื่นอีกมาก ไม่เพียงเท่านั้น ยาต้านมาลาเรียซึ่งเคยใช้ได้ผลดีมานานกลับใช้ไม่ได้ผลมากขึ้นทุกที เนื่องจากเชื้อมีการดื้อยามากขึ้นเรื่อยๆ ยาเหล่านี้รวมถึงคลอโรควินควีนีน และยาประเภทแอนตีโฟเลต เช่น พิริเมธามีนและไซโคลกัวนิล (มาจากที่กินเป็นโปรกัวนิลเข้าไปแล้วเปลี่ยนในร่างกาย)

ยาประเภทแอนตีโฟเลตแตกต่างจากยาอื่นๆ อีกหลายตัว ตรงที่รู้กันแต่แรกว่ามีกลไกทำงานอย่างไร เนื่องจากยาในกลุ่มนี้มีการศึกษาและพัฒนามาใช้กันมานานแล้ว ยาในกลุ่มนี้ไม่เพียงแต่จะต้านโปรโตซัวอย่างเช่นเชื้อมาลาเรียเท่านั้น หลายตัวมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย หลายตัวเป็นยาต้านมะเร็ง เป็นที่รู้กันว่ามันทำงานโดยการยับยั้งเอนไซม์ที่เรียกว่า dihydrofolate reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ส่วนประกอบของดีเอ็นเอ (T ของส่วนประกอบสี่ตัว T, A, C และ G) โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ thymidylate synthase ในเชื้อมาลาเรียและโปรโตซัวอื่นๆ เอนไซม์ทั้งสองอยู่ร่วมกันเป็นโปรตีนเดียวกัน ยากลุ่มนี้เมื่อมีการใช้ต้านมาลาเรียในช่วงประมาณสี่สิบปีที่แล้วไม่นานก็เกิดการดื้อขึ้น แต่ต่อมามีการพัฒนายาผสม กล่าวคือ พิริเมธามีนผสมกับซัลฟาด็อกซีน เรียกว่า ยาแฟนซิดาร์ ก็ใช้ได้ผลจวบจนปัจจุบัน แต่ก็มีการดื้อมากขึ้นเป็นลำดับจนจะต้องหายาใหม่มาทดแทน

กลุ่มวิจัยของผู้เขียนได้ทำงานวิจัยเรื่องเอนไซม์นี้มาประมาณยี่สิบปีแล้ว โดยในช่วงต้นงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาชีวเคมีของมาลาเรีย เพื่อให้เข้าใจกลไกของการดื้อยา ทำควบคู่

ไปกับงานวิจัยพื้นฐานอื่นๆ ที่ศึกษาผลของการติดเชื้อมาลาเรียของเม็ดเลือดแดง อันเป็นงานที่ได้รับรางวัลนักวิทยาศาสตร์ดีเด่น ในระยะต่อมาจนปัจจุบันได้เน้นด้านการพัฒนายาใหม่ที่จะต่อสู้กับเชื้อที่ดื้อยาเดิมไปแล้ว ในปัจจุบันเรามุ่งอยู่สองด้านใหญ่ๆ ด้านหนึ่ง คือการศึกษากลไกการทำงานของยากลุ่มอาร์เตมิสินิน ซึ่งมาจากสมุนไพรจีน โดยมีสุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล เป็นนักวิจัยหลัก และอีกด้านหนึ่งคือ การศึกษาเป้าหมายยาและพัฒนายากลุ่มแอนตีโฟเลตที่จะกล่าวถึงต่อไป งานวิจัยนี้ เดิมทำที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งในปัจจุบันก็ยังมีผู้ร่วมงานที่นั่นอยู่ และในขณะนี้ทำโดยกลุ่มวิจัยที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) งานวิจัยที่ผ่านมาได้รับการสนับสนุนจากมูลนิธิร็อคกีเฟลเลอร์ องค์การอนามัยโลก ยูเสด และ National Institutes of Health สหรัฐฯ เป็นต้น และในปัจจุบันได้รับการสนับสนุนจากสหภาพยุโรป มูลนิธิเวลคัม และโครงการ Medicines for Malaria Venture นอกจากนั้น ผู้ร่วมงานยังได้รับการสนับสนุนจากโครงการ TDR และโครงการวิจัยและพัฒนาด้านโรคเขตร้อนประเทศไทย (Thailand Tropical Diseases Research) เป็นต้น

ผลงาน

การดื้อยาเกิดจากการกลายพันธุ์ของเป้าหมายยา

การศึกษาเอนไซม์ dihydrofolate reductase อันเป็นเป้าหมายของยาแอนตีโฟเลต ในช่วงแรกนั้น ต้องศึกษาจากเชื้อมาลาเรียของหนู เนื่องจากไม่สามารถเตรียมเอนไซม์จากเชื้อของคนได้เป็นปริมาณมากพอ เมื่อยี่สิบปีที่แล้วนั้นยังไม่ชัดเจนว่าการดื้อยาพิริเมธามีนนั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ ซึ่งทำให้ลดการจับระหว่างเอนไซม์กับยาลง หรือเกิดจากการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ ทำให้ยาไม่สามารถจับและยับยั้งได้ทั้งหมด วรชาติ สิรวราภรณ์ นักศึกษาปริญญาเอกขณะนั้นได้ศึกษาปัญหานี้ โดยใช้เชื้อที่เป็นโคลน (clone) ที่ไวต่อยา และโคลนที่ดื้อยาซึ่งได้มาจากโคลนแรกนั้น จึงมีพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการนอกจากการตอบสนองต่อยา (โคลนทั้งสองมาจาก David Walliker ที่เอดินบะระ) และได้ข้อมูลที่ชัดเจนว่า ปริมาณของเอนไซม์ใกล้เคียงกัน แต่คุณสมบัติของเอนไซม์จากโคลนทั้งสองนั้นต่างกันมาก โดยเอนไซม์จากเชื้อที่ดื้อยามีความสามารถจับกับยาได้น้อยไปกว่าเดิมถึงประมาณเกือบร้อยเท่า ดังนั้นจึงสรุปได้แน่นอนว่าการดื้อยาเกิดจากการกลายพันธุ์ของเป้าหมายยา

วิวัฒนาการของการดื้อยา

แม้ในขณะนั้นเราจะสามารถเลี้ยงเชื้อมาลาเรียของคนประเภทฟาลซิปารัมได้ดีแล้ว จากการที่ Bill Trager สามารถทำได้และได้มาจัดการฝึกที่ประเทศไทยเป็นแห่งแรก แต่หากจะศึกษาเอนไซม์ของเชื้อนี้ จะต้องหาทางเตรียมให้ได้เป็นปริมาณมากพอ ซึ่งยังเป็นเรื่องยาก พอดีที่ช่วงนั้นมีการพัฒนาพันธุวิศวกรรมอย่างรวดเร็ว เป็นไปได้ว่าจะสามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้โดยเอาไปฝากไว้ (เรียกว่า "โคลน") ในแบคทีเรีย ผู้เขียนจึงได้ติดต่อกับ Dan Santi ที่มหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย ซานฟรานซิสโก เพื่อหาทางโคลนและผลิตเอนไซม์นี้ ในช่วงเกือบสิบปีตั้งแต่ 2529 หลายคนในกลุ่มวิจัยของเรา (วรชาติ และรัชฎา สิรวราภรณ์ พิสิฐฐ์ ประพันธ์วัฒนะ มณีภู่กาญจนทวีป) รวมทั้งตัวผู้เขียนเอง ได้ทำวิจัยร่วมกับกลุ่มของ Santi โดยได้สามารถโคลนและผลิตเอนไซม์ของเชื้อมาลาเรียได้ในแบคทีเรีย อี โคไล ทั้งที่มาจากยีนที่มีอยู่ในเชื้อตามธรรมชาติ และที่เราสังเคราะห์ขึ้นเองเพื่อให้สามารถทำการกลายพันธุ์ได้โดยง่าย และผลิตได้เป็นปริมาณมาก ผลที่สำคัญคือ สามารถระบุว่าการดื้อยาทั้งพิริเมธามีนและไซโคลกัวนิลมีวิวัฒนาการมาอย่างไร การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 108 (หมายเลขของกรดอะมิโนในเอนไซม์) ทำให้มีการดื้อยาทั้งคู่ในระดับต่ำก่อน ตามด้วยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นๆ (51, 59, 164) ที่ทำให้การดื้อสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยวัดจากการจับกับยาที่ลดลงไปเรื่อยๆ แต่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 16 และ 108 ของเชื้อทำให้ดื้อเฉพาะยาไซโคลกัวนิลการที่เชื้ออาจดื้อยาใดยาหนึ่งอย่างเฉพาะเจาะจง ไม่ดื้อไปเสียทั้งหมด ทำให้เกิดความหวังว่า อาจจะพัฒนายาเดี่ยวหรือยาผสมที่ต่อสู้กับเชื้อที่ดื้อยาเดิมได้

ในการศึกษาที่ละเอียดยิ่งขึ้น โดยสุกัญญา ยงเกียรติตระกูล เราได้พบต่อมาว่า การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 108 จากกรดอะมิโน เซรีน เป็น แอสพาราจีน ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการดื้อยานั้น เป็นทางเลือกที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเชื้อ เนื่องจากมาจากการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมเพียงที่เบสตัวเดียว และมิวแตนท์ยังคงมีคุณสมบัติเอนไซม์ที่ดี พร้อมกับลดการจับกับยาลงด้วย

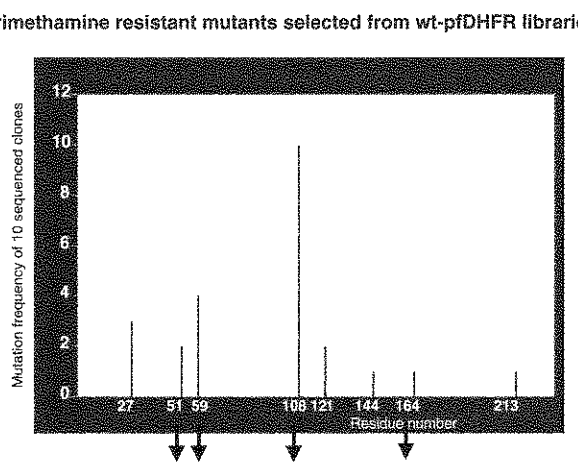
การจำลองวิวัฒนาการของการดื้อยา

หากจะต้องตามศึกษาการดื้อยาจากสิ่งที่เกิดขึ้นกับคนไข้เพียงอย่างเดียวคงช้าและไม่ทันการ เราได้คิดค้นวิธีที่จะคาดการณ์ไปข้างหน้าว่า จะมีการดื้อยาที่ใช้อยู่แล้วมากกว่าเดิม หรือเมื่อใช้ยาตัวใหม่จะมีการดื้อยาเกิดขึ้นหรือไม่ โดยการจำลองวิวัฒนาการของการดื้อยาในหลอดแก้ว การจำลองวิวัฒนาการเช่นนี้ทำได้ โดยเอายีนจากเชื้อมาลาเรียไปใส่ในแบคทีเรียแล้วศึกษาผลของการกลายพันธุ์ในยีนต่อการดื้อยาของแบคทีเรียนั้น แบคทีเรียที่มียีนของมาลาเรียอยู่ทำหน้าที่เป็นเสมือนเชื้อมาลาเรีย หากแต่สามารถเลี้ยงได้ง่ายและตรวจดูผลของยาได้ง่าย ด้วยวิธีนี้ สุดสงวน

ชูสกุลธนชัย ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อนำเอายีนของเอนไซม์นี้จากเชื้อมาลาเรียไปทำให้มีการกลายพันธุ์อย่างเดาสุ่ม แล้วใส่เข้าไปในแบคทีเรีย อี โคไล แล้วตรวจดูว่ายีนที่กลายพันธุ์ตัวใดทำให้เกิดการดื้อยาขึ้น ได้พบว่ามียีนกลายพันธุ์จำนวนหนึ่งที่ทำให้เกิดการดื้อยาดังกล่าว และยีนทลายตัวมีตำแหน่งของการกลายพันธุ์ตรงกันกับที่พบในธรรมชาติ เป็นการพิสูจน์อย่างสวยงามว่าระบบจำลองวิวัฒนาการของเรานั้นทำนายตรงกับความเป็นจริง (รูปที่ 1) ที่น่าสนใจก็คือ เมื่อเราลองดูว่า หากใช้ยาแอนตีโฟเลตใหม่ (เช่น WR99210) ที่ยังไม่เคยพบว่ามีการดื้อเกิดขึ้นในธรรมชาติ ก็เห็นว่าจะมีการดื้อเกิดขึ้นได้ในระบบทดลองของเรา เป็นการทำนายล่วงหน้า เพื่อให้มีโอกาสเตรียมตัวต่อการดื้อยาในอนาคต ระบบจำลองวิวัฒนาการของเรานี้ น่าจะเป็นประโยชน์ในการทดสอบว่า เชื้อจะดื้อต่อยาใหม่ๆ ที่พัฒนาขึ้นมาในอนาคตหรือไม่ เพียงใด

การศึกษาเอนไซม์เป้าหมายโดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง

เราได้เห็นแล้วว่า การกลายพันธุ์ทำให้เอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายยาเปลี่ยนคุณสมบัติไป เช่น ไม่จับกับตัวยับยั้งได้ดีเหมือนเดิม หากต้องการรู้จักเอนไซม์มากขึ้น เพื่อที่จะออกแบบตัวยับยั้งที่เหมาะสม ก็ทำได้โดยเลียนแบบการกลายพันธุ์ในธรรมชาติ หรือทำให้เกิดการกลายพันธุ์ใหม่ๆ ที่ไม่มีในธรรมชาติ หรือแม้แต่ตัดบางส่วนของเอนไซม์ในธรรมชาติออกไป สิ่งเหล่านี้เราสามารถทำได้โดยพันธุวิศวกรรม จากการเปรียบเทียบกับ dihydrofolate reductase ที่มีอยู่ในแบคทีเรีย



รูปที่ 1 การจำลองวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรียโดยก่อให้เกิดมิวเตชันในเอนไซม์ในหลอดทดลอง ให้ผลที่ตรงกับที่พบในคนไข้จริงและทำนายว่าจะมีมิวเตชันอื่นอีกด้วย ซึ่งยังไม่ได้พบในสถานการณ์จริง

และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แอสพาร์เตท ในตำแหน่งที่ 54 น่าจะเป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญยิ่งในการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อมาลาเรีย มีบทบาททั้งในการจับกับสับสเตรทและตัวยับยั้ง เราได้พิสูจน์ความสำคัญของมันโดยการเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนอื่นๆ ทั้ง 19 ตัว และพบว่าส่วนใหญ่เอนไซม์จะไม่สามารถทำงานได้นอกจากกลูตาเมท ซึ่งมิวแตนท์นี้ก็ทำงานได้อย่างอ่อนๆ เท่านั้น เราได้พิสูจน์ความสำคัญของทริปโตเฟนในตำแหน่งที่ 48 ด้วยการเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนอื่น ซึ่งทำให้เอนไซม์หมดประสิทธิภาพไปเช่นเดียวกัน

สิ่งที่น่าสนใจจากการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองก็คือ เมื่อมีการเปลี่ยนเพิ่มขึ้นอีกที่ตำแหน่งอื่น เอนไซม์ที่กลายพันธุ์ที่แต่แรกไม่มีประสิทธิภาพนั้นอาจกลับมามีใหม่ได้ ดังที่เราได้พบว่าหากเปลี่ยนมิวแตนท์ตำแหน่ง 54 เพิ่มเติมที่ตำแหน่งอื่นด้วย กลับได้เอนไซม์ที่ทำงานได้ดีกลับมาใหม่ แล้วยังมีฤทธิ์ดื้อยาอีกด้วย นี่เป็นกลไกที่อาจเรียกว่า "การกลายพันธุ์ชดเชย (compensating mutations)" ซึ่งเราได้พบว่ามีเกิดขึ้นในเชื้อที่เลี้ยงในจานทดลองด้วย แต่ยังรอดูว่าจะมีเกิดขึ้นในธรรมชาติจริงๆ ได้หรือไม่ เห็นได้ว่ากลไกของการดื้อยาโดยการกลายพันธุ์นั้น บางครั้งสามารถเปลี่ยนแม้แต่ตำแหน่งที่มีความสำคัญมาก แต่ต้องมีการเปลี่ยนแปลงที่อื่นด้วยเพื่อให้เอนไซม์กลับทำงานได้ใหม่

นอกจากการกลายพันธุ์แล้วเรายังสามารถใช้พันธุวิศวกรรมในการทำเอนไซม์ที่ได้ตัดกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของมันบางตัวออกไปด้วย ที่ทำเช่นนี้เพื่อจุดมุ่งหมายสองประการใหญ่ๆ ประการแรก เพื่อศึกษาว่ากรดอะมิโนเหล่านั้นเป็นส่วนประกอบที่จำเป็นในการทำงานของเอนไซม์หรือไม่ หรือสามารถตัดออกไปได้โดยไม่ทำให้เอนไซม์เสียไป ประการที่สอง ซึ่งเกี่ยวโยงกันคือ เอนไซม์ที่ได้ตัดบางส่วนออกไปนั้น สามารถมีการละลายดีขึ้นหรือไม่ และนำไปตกผลึกได้หรือไม่ ซึ่งผลึกที่ตกได้จะสามารถนำไปส่องด้วยเอกซ์เรย์แล้วหาโครงสร้างของเอนไซม์ได้ เราได้พยายามตกผลึกเอนไซม์ทั้งตัวมาหลายปีแล้ว แต่พบปัญหาการละลายไม่ดีพอ ได้ตะกอนแทนที่จะได้ผลึก หากตัดบางส่วนออกไปได้แล้วยังไม่เสียความสามารถในการทำงานแล้วยังละลายดีขึ้นและตกผลึกได้ก็จะเป็นเรื่องที่ดี (ในที่สุดแล้วเราก็สามารถตกผลึกเอนไซม์ได้โดยไม่ต้องตัดส่วนอะไรออกเลย ดังจะกล่าวถึงต่อไป นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีมิวเตชันที่ทำให้เอนไซม์ละลายดียิ่งขึ้นด้วย)

หลังจากพยายามตัดบางส่วนของเอนไซม์ทั้งส่วนต้นและส่วนกลางบางตอนออก ไม่ปรากฏว่าจะช่วยให้การละลายหรือการตกผลึกดีขึ้น แต่การทดลองในกลุ่มนี้กลับให้ผลที่น่าสนใจมากอีกด้านหนึ่ง กล่าวคือ Pradip Rathod ที่วอชิงตันเคยตีพิมพ์ผลงานว่า dihydrofolate reductase ของเชื้อมาลาเรียมีความสำคัญต่อการทำงานของ thymidylate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในโปรตีนเดียวกัน โดยหากตัดส่วนต้นของเอนไซม์แรกออกไปมากพอ เอนไซม์

ทั้งสองจะหมดความสามารถทำงาน แม้ส่วนที่ตัดนั้นจะยังไม่ถึงเอนไซม์ตัวที่สองด้วยซ้ำ งานนี้นำทางให้เราตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ทั้งสอง โดยใช้ dihydrofolate reductase ที่ช่วงต้นถูกตัดออกไป และได้พบว่าเอนไซม์นี้จะยังมีความสามารถทำงานได้แม้กรดอะมิโนในช่วงต้นถูกตัดไปบ้าง แต่ที่น่าสนใจกว่านั้นก็คือ เมื่อตัดกรดอะมิโนของเอนไซม์นี้ออกไปอีก ก็จะมีผลในการยับยั้งการทำงานของ thymidylate synthase ด้วย ผลงานนี้แสดงว่า เอนไซม์ทั้งสองมีความสัมพันธ์กันที่ลึกซึ้งและอาจมีทางยับยั้งตัวหนึ่งตัวใดหรือทั้งคู่ได้ หากสามารถทำลายความสัมพันธ์อันนี้ นับเป็นแนวทางใหม่ในการพัฒนายาได้

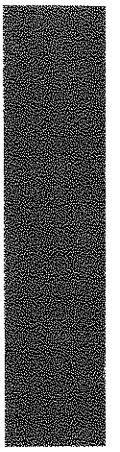
เอนไซม์เป้าหมายของมาลาเรียประเภทไวแวกซ์เทียบกับฟาลซิปารัม

ยาแอนตีโฟเลตตามปรกติแล้วจะใช้กับมาลาเรียประเภทฟาลซิปารัมเป็นหลักเท่านั้น มักไม่ใช้กับมาลาเรียอีกประเภทหนึ่งที่เรียกว่าไวแวกซ์ เนื่องจากยิ่งมีการดื้อยาสูงกว่าเสียอีก ถึงกับมีหลายคนเชื่อว่ามาลาเรียไวแวกซ์นั้นดื้อต่อยาประเภทนี้แม้ตั้งแต่แรกโดยไม่มีการกลายพันธุ์แล้ว แต่จากความร่วมมือกับกลุ่มวิจัยที่หน่วยเวลค้มที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน อุบลศรี เลิศสกุลพานิช ได้นำยีนจากเชื้อไวแวกซ์มาขยายจำนวนแล้วศึกษา ปรากฏว่ามีข้อสรุปที่ต่างจากความเชื่อที่ว่าเชื้อนี้ดื้อยาแต่แรกแล้ว กล่าวคือ เชื้อในสภาพธรรมชาติมียีนที่ผลิตเอนไซม์ที่ไวต่อยายิ่งเสียกว่าฟาลซิปารัมอีก ต่อเมื่อมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในตำแหน่งที่คล้ายกันกับในฟาลซิปารัม ก็จะเกิดการลดการจับกับตัวยับยั้งที่ทำให้เกิดการดื้อยาขึ้น โดยเมื่อเทียบกับฟาลซิปารัมแล้วผลของการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการดื้อยาจะแรงกว่า

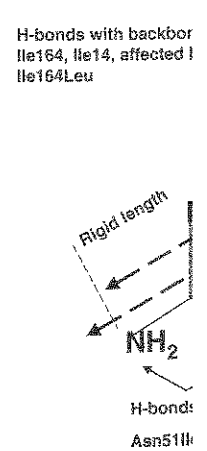
การจำลองโครงสร้างเอนไซม์เป้าหมายนำไปสู่การออกแบบยาใหม่

หากรู้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เป้าหมาย และรู้ว่าเมื่อมีการดื้อยาโครงสร้างนี้เปลี่ยนไปอย่างไร เราก็จะสามารถออกแบบยาที่จะต้านเชื้อที่ดื้อยาได้ แต่แม้ยังไม่รู้โครงสร้างที่แท้จริงจากการศึกษาผลึกของมัน ก็ยังอาจใช้วิทยาการสารสนเทศและคอมพิวเตอร์จำลองโครงสร้างของมันได้ โดยที่เรารู้ว่าลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบเป็นอย่างไร และนำมาเปรียบเทียบกับโครงสร้างของเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่รู้แล้วจากสิ่งมีชีวิตอื่นเช่น แบคทีเรีย หรือโปรโตซัวอื่น เราได้ทำแบบจำลองเอนไซม์ของเราขึ้น อันเป็นผลงานร่วมระหว่าง พรเทพ สมพรพิสุทธิ์ จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จิรันดร ยูวะนิยม จากมหาวิทยาลัยมหิดล และ Giulio Rastelli จากมหาวิทยาลัยโมเดนาในอิตาลี (ดูรูปที่ 2) ซึ่งทำให้เห็นว่า เอนไซม์ของเราจับกับตัวยับยั้งอย่างเฉพาะเจาะจง และเมื่อมีการกลายพันธุ์ที่ทำให้ดื้อยา ส่วนของเอนไซม์ที่เปลี่ยนไปนั้นจะเบียดบังตัวยับยั้ง ทำให้ไม่สามารถจับได้ดีเท่าเดิม ที่สำคัญคือ กรดอะมิโนในตำแหน่ง 108 ที่

เปลี่ยนไปนั้น ทำให้เกิดการเบีย
แต่ตัวยับยั้งที่ใช้ได้ผล เช่น WI
พันธุ์ไปแล้วได้ดี ส่วนเอนไซม์ที่
ตำแหน่ง 16 ที่เปลี่ยนไปจนเบี
คุณสมบัติทางเคมีของตัวยับยั้ง
ทำโครงสร้างต้นแบบของตัวยับยั้
(ดูรูปที่ 3)

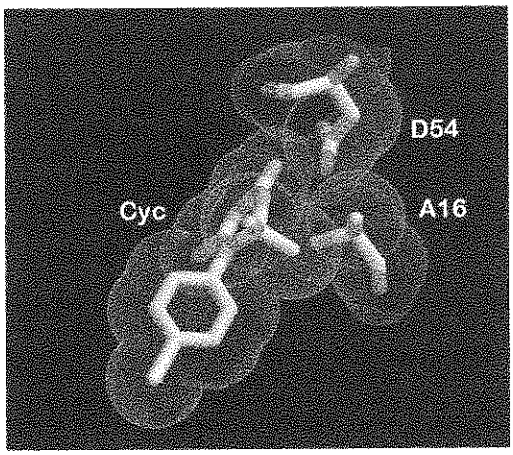


รูปที่ 2 การจำลองการจับของยา
16 มีแขนใกล้กับบางส่วน
จับได้ดีเท่าเดิม ทำให้เกิด

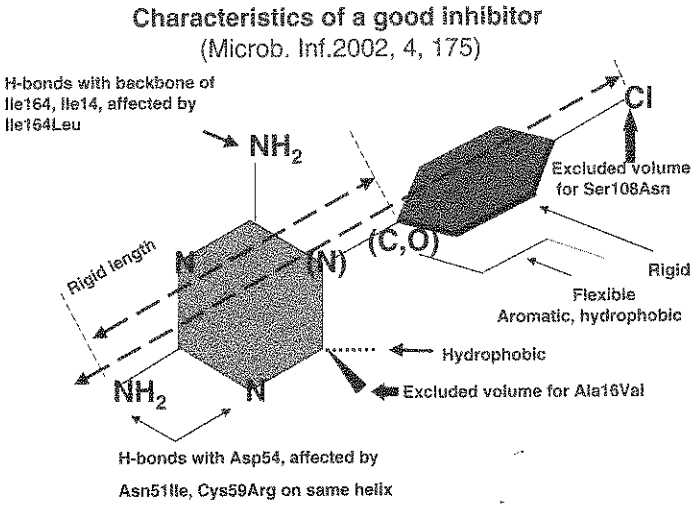


รูปที่ 3 ลักษณะของยาที่สามารถ

เปลี่ยนไปนั้น ทำให้เกิดการเบียดกับคลอรีนอะตอมของตัวยับยั้งทั้ง พิริเมธามีนและไซโคลกัวนิล แต่ตัวยับยั้งที่ใช้ได้ผล เช่น WR99210 สามารถเบี่ยงตัวออกไป ทำให้ยังจับกับเอนไซม์ที่กลายพันธุ์ไปแล้วได้ดี ส่วนเอนไซม์ที่กลายพันธุ์จนเชื้อดื้อต่อเฉพาะยาไซโคลกัวนิลนั้น มีกรดอะมิโนในตำแหน่ง 16 ที่เปลี่ยนไปจนเบียดกับหมู่เมธิลของไซโคลกัวนิล จากการศึกษาแบบจำลองและคุณสมบัติทางเคมีของตัวยับยั้ง ประกอบกับฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เราสามารถทำโครงสร้างต้นแบบของตัวยับยั้งที่จะเลี่ยงผลของการกลายพันธุ์ที่ทำให้มันจับกับเป้าหมายลดลงได้ (ดูรูปที่ 3)



รูปที่ 2 การจำลองการจับของยาไซโคลกัวนิลกับเอ็นไซม์ แสดงว่ากรดอะมิโน Alanine (A) ในตำแหน่ง 16 มีแขนใกล้กับบางส่วนของยามาก เมื่อเกิดมิวเตชันขึ้น ทำให้แขนนี้เกะกะ และยาไม่สามารถจับได้ดีเท่าเดิม ทำให้เกิดการดื้อยาขึ้น



รูปที่ 3 ลักษณะของยาที่สามารถชนะการดื้อยาจากมิวเตชันได้สรุปจากการจำลองแบบและการทดลองจริง

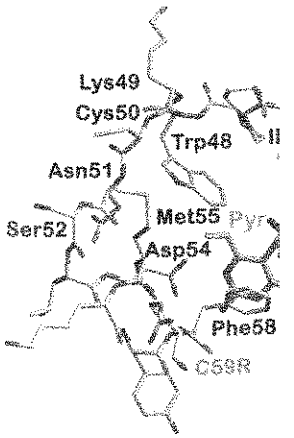
จากโครงสร้างต้นแบบดังกล่าวนี้ เราสามารถออกแบบตัวยับยั้งและสังเคราะห์ตามแบบพร้อมกับสังเคราะห์ตัวยับยั้งอื่นๆ ด้วย เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ที่กลายพันธุ์ไป และทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรียที่มีการกลายพันธุ์จนดื้อยาเดิมไป จากการทำงานร่วมกันระหว่าง ธีรยุทธ์ วิไลวัลย์ จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บงกช ธารชมภู ชะวะนีศิริชัยวัฒน์ สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล จากไบโอเทค ยอดทยัย เทพธรานนท์ จากมหาวิทยาลัยมหิดล และ Gordon Lowe และ Rachel Quarrell จากมหาวิทยาลัยออกซ์ฟอร์ด ผลปรากฏว่า ได้ตัวยับยั้งใหม่ๆ หลายตัวที่มีความสามารถจับกับเอนไซม์กลายพันธุ์ได้ดีมาก (จับได้ในความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ หรือ 10^{-9} โมลาร์ ซึ่งดีกว่ายาเดิมนับพันเท่า) หลายตัวมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาได้ดีทีเดียว (ในความเข้มข้นระดับน้อยกว่าไมโครโมลาร์ หรือ 10^{-6} โมลาร์) แม้ตัวยับยั้งที่เราได้มายังไม่ดีพอที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาได้ในทันทีและบางตัวก็มีความเป็นพิษสูงเกินไป แต่ก็มีโอกาสที่จะนำมาดัดแปลงโครงสร้างให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและลดความเป็นพิษลงได้

การตกผลึกและการหาโครงสร้างที่แท้จริงของเอนไซม์เป้าหมาย

กลุ่มวิจัยของเราได้พบความสำเร็จที่สำคัญในปี 2544 เมื่อเพ็ญจิตร จิตรนำทรัพย์ สามารถตกผลึกเอนไซม์จากเชื้อฟาลซิปารัมได้ เริ่มด้วยเอนไซม์กลายพันธุ์ C59R+S108N ตามด้วยเอนไซม์แบบดั้งเดิม จากนั้นผู้ร่วมงานก็ตกผลึกเอนไซม์ทั้งจากฟาลซิปารัมและไวแวกซ์ได้ทั้งแบบดั้งเดิมและที่กลายพันธุ์แล้ว และทั้งในสภาพฟรีและสภาพที่จับกับตัวยับยั้ง ความสำเร็จนี้เกิดขึ้นพอดีกับที่เรามีความร่วมมือกับกลุ่มวิจัยโครงสร้างด้วยเอ็กซ์เรย์ของ Malcolm Walkinshaw ที่มหาวิทยาลัยเอดินบะระ ทำให้สามารถนำผลึกต่างๆ ไปศึกษา เพื่อหาโครงสร้างของโมเลกุลโดยการเลี้ยวเบนเอ็กซ์เรย์ ทั้งโดยใช้เอ็กซ์เรย์ปกติ และที่มาจากซินโครตรอน จิรันดร ยูวะนิยม และพลังพล คงเสรี จากมหาวิทยาลัยมหิดล ได้ดำเนินการวิเคราะห์โครงสร้างของเอนไซม์จากเชื้อทั้งสองชนิด ผลปรากฏว่า มีหลายส่วนที่คล้ายคลึงกับโครงสร้างที่จำลองมาก่อนแล้ว แต่ก็มีส่วนที่โครงสร้างจำลองไม่สามารถทำนายได้ เช่น ส่วนพิเศษที่มีเฉพาะในเอนไซม์ของเชื้อมาลาเรีย ส่วนที่อยู่ห่างกัน แต่มาสัมผัสกัน และส่วนที่ต่อกันระหว่างเอนไซม์ทั้งสอง รูปที่ 4 แสดงให้เห็นโครงสร้างของเอนไซม์โดยรวม รูปที่ 5 แสดงให้เห็นการจับของพิริเมธามีน ซึ่งถูกรบกวนโดยการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง108 ทำให้ไม่สามารถจับได้ดีเท่าเดิม และรูปที่ 6 แสดงให้เห็นการจับของ WR99210 ซึ่งสามารถหลีกเลี่ยงผลของการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 108 ได้ ทำให้ยังจับได้ดีและเป็นยามาลาเรียที่ได้ผลแม้กับเชื้อที่ดื้อยาอื่น

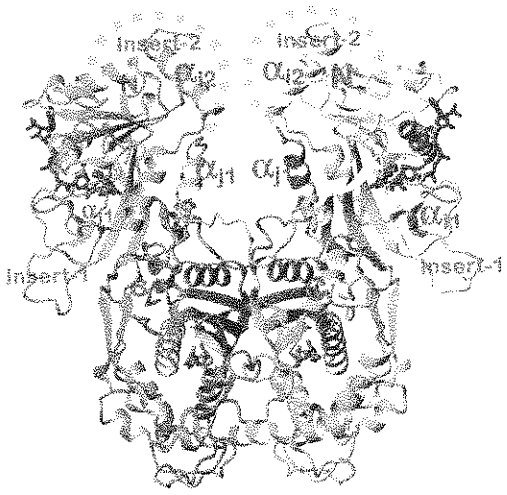
การได้รู้โครงสร้างที่แท้
ออกแบบยารุ่นใหม่ได้อย่างแม่
บริษัทยายักษ์ใหญ่คือ แกล็กโ
เป้าหมายยาเป็นหลัก ที่น่าตื่นเ
รู้ได้ด้วยการศึกษาของจริงนี้อาจ

รูปที่ 4 โครงสร้างของเอนไซม์
เอ็กซ์เรย์ของผลึกเอนไซ

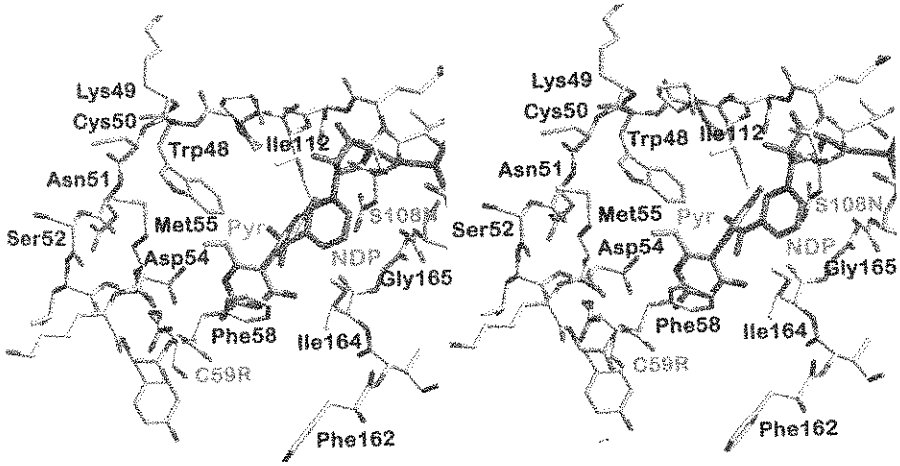


รูปที่ 5 การจับระหว่างยา พิริเม
จาก serine เป็น aspara

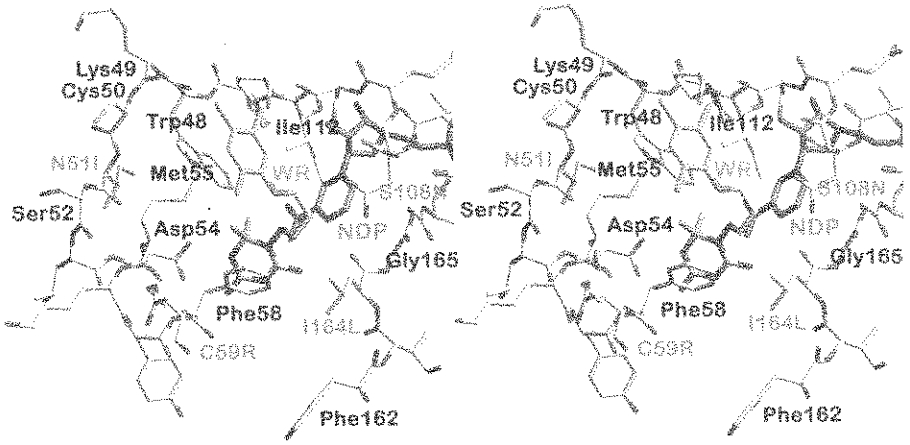
การได้รู้โครงสร้างที่แท้จริงของเป้าหมายที่ไม่ได้มาจากการจำลอง จะทำให้เราสามารถออกแบบยารุ่นใหม่ได้อย่างแม่นยำและได้ผลดียิ่งขึ้น ผลงานนี้ทำให้เราได้รับความสนใจจากบริษัทยายักษ์ใหญ่คือ แกล็กโซสมิธไคลน์ ที่จะร่วมกันพัฒนายารุ่นใหม่โดยใช้โครงสร้างของเป้าหมายยาเป็นหลัก ที่น่าตื่นเต้นก็คือ โครงสร้างบางส่วนที่ไม่เคยรู้มาก่อนด้วยการจำลองและรู้ได้ด้วยการศึกษาของจริงนี้อาจนำไปสู่การออกแบบยาใหม่ๆ ได้ หากสามารถหาสารที่แทรกแซง



รูปที่ 4 โครงสร้างของเอนไซม์ DHFR-TS จากเชื้อมาลาเรียประเภทฟาลซิปารัมได้จากการกระเจิงเอ็กซ์เรย์ของผลึกเอนไซม์



รูปที่ 5 การจับระหว่างยา พิริเมธามีนกับเอ็นไซม์ที่มาจากเชื้อดื้อยา กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 108 ได้เปลี่ยนจาก serine เป็น asparagine ทำให้เบียดกับส่วนคลอรีนของยา และยาไม่สามารถจับได้ดี



รูปที่ 6 การจับระหว่างยา WR99210 กับเอ็นไซม์จากเชื้อที่ดื้อยาอื่น ยานี้สามารถเลี่ยงการเบียดที่เกิดจากมิวเตชันได้ ทำให้ทำงานได้ผลดี

สัมผัสระหว่างส่วนต่างๆ ที่ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ สารเหล่านี้จะเป็นตัวยับยั้งชนิดใหม่ที่ไม่ได้ทำงานโดยการจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ และเชื้ออาจไม่สามารถกลายพันธุ์เพื่อจะดื้อได้ หากเป็นเช่นนั้นจริง การศึกษาคุณสมบัติและหาโครงสร้างของเอนไซม์เป้าหมายที่ทำมานานและต่อเนื่องก็คงจะคุ้มค่า