



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การพัฒนาและคัดกรองตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส NS3
ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 โดยใช้คอมพิวเตอร์

In silico developing and screening for inhibitors of the
dengue virus type 2 NS3 serine protease"

โดย อ. ภก. ดร. สันหัตต์ จันทร์ประภาพ

เดือน สิงหาคม ปี 2556

สัญญาเลขที่ MRG4980009

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การพัฒนาและคัดกรองตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส NS3
ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 โดยการใช้คอมพิวเตอร์

In silico developing and screening for inhibitors of the
dengue virus type 2 NS3 serine protease"

โดย อ. ภก. ดร. สันทัต จันทรประภาพ
ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG4980009

(รหัสโครงการ)

Project Title : "การพัฒนาและคัดกรองตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 (ชื่อโครงการ) โดยใช้คอมพิวเตอร์ (In silico developing and screening for inhibitors of the dengue virus type 2 NS3 serine protease)"

Investigator : ชื่อนักวิจัย และสถาบัน

(ชื่อนักวิจัย) อ. ภก. ดร. สันตต์ จันทร์ประภาพ

ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : schanprapaph@yahoo.com**Project Period :** 1 กรกฎาคม 2549 ถึง 30 มิถุนายน 2551

(ระยะเวลาโครงการ)

The 69 kDa NS3 protein of dengue virus contains multiple enzymatic activities including a serine protease domain in the N-terminal region and the protease mediates cleavage at dibasic sites within the nonstructural region of the viral polyprotein. Therefore, it represents a promising target for antiviral drug design. Previous studies with data for docked energy and binding geometries obtained by molecular docking using Autodock with a homology-based model of the dengue virus NS2B(H)-NS3p revealed that binding is more favourable in the presence of the NS2B cofactor and that binding of product peptides is similar to ground-state binding of corresponding substrates. In this study it is consistently demonstrated the similar results that hexapeptides based on the P1-P6 regions of all 4 cleavage sites were able to be inhibitors including peptide FAAGRK, EVKKQR, RTSKKR and TTSTRR. Moreover, pentapeptides based on the P1-P5 regions also were able to be inhibitors including peptide AAGRK, VKKQR, TSKKR and TSTRR. For shorter peptides such as SKKR, GKR, GRR, KKR, GKR, KRR, RRK, KRK, RKR, RKK, KR, RK and RR, they also displayed the potential to be inhibitors whereas peptide AGRR was less potential. Derek Program used for toxicity prediction

showed negligible toxicity for all of peptide structures tested. In conclusion, these results provide the prospect of developing potent inhibitors against the dengue virus NS3 protease by combinatorial optimization together with peptidomimetic design of product inhibitors based on native polyprotein cleavage junctions in order to increase the activity as well as lower the toxicity.

Keywords : dengue virus NS2B(H)-NS3p, molecular docking, toxicity

บทคัดย่อ

โปรตีน NS3 เป็นโปรตีนที่มีใช้ส่วนประกอบทางโครงสร้างของเชื้อไวรัสเดงกีซึ่งมีขนาดประมาณ 69 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยส่วนที่มีหน้าที่เป็นเอนไซม์ชนิดต่างๆรวมถึงเอนไซม์เซอรินโปรตีเอสซึ่งอยู่บริเวณปลายด้านอะมิโน และเอนไซม์โปรตีเอสจะตัดส่วนของโปรตีนตั้งต้นของเชื้อไวรัสในบริเวณที่มีการต่อมิโนชนิดที่เป็นต่างซึ่งเรียงต่อกัน 2 ตัวที่อยู่ภายในบริเวณที่เป็นโปรตีนที่มีใช้ส่วนประกอบทางโครงสร้าง ดังนั้นเอนไซม์โปรตีเอสจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญสำหรับการออกแบบยาต้านเชื้อไวรัส จากการศึกษาที่ผ่านมา ข้อมูลทั้ง docked energy และ binding geometries ที่ได้จากการทำ molecular docking ระหว่างสารทดสอบกับแบบจำลองของเอนไซม์สายเดี่ยวเชิงซ้อน NS2B(H)-NS3p ของเชื้อไวรัสเดงกี โดยใช้โปรแกรม AutoDock เสนอแนะว่าการจับกับเอนไซม์จะดีขึ้นเมื่อมี NS2B cofactor และการจับของเปปไทด์ที่ได้จากการตัดคล้ายกับการจับของซับสเตรตซึ่งสัมพันธ์กัน ในการศึกษานี้แสดงผลที่สอดคล้องกับการวิจัยที่ผ่านมาว่าเปปไทด์ที่ประกอบด้วย 6 อะมิโนแอซิดที่พัฒนามาจากขอบเขตด้าน P1-P6 ของตำแหน่งที่มีการตัดทั้ง 4 ตำแหน่ง มีความสามารถจะเป็นตัวยับยั้งได้ รวมถึงเปปไทด์ FAAGRK, EVKKQR, RTSKKR และ RTSKKR ยิ่งไปกว่านั้น เปปไทด์ที่ประกอบด้วย 5 อะมิโนแอซิดที่พัฒนามาจากขอบเขตด้าน P1-P5 รวมถึงเปปไทด์ AAGRK, VKKQR, TSKKR และ TSKKR ก็มีความสามารถที่จะเป็นตัวยับยั้งได้ด้วย สำหรับเปปไทด์ที่สายสั้นลง เช่น เปปไทด์ SKKR, GKR, GRR, KKR, GKR, KRR, RRR, KRK, RKR, RKK, KR, RK และ RR เปปไทด์เหล่านี้ก็มีความสามารถที่จะเป็นตัวยับยั้งได้เช่นเดียวกัน ในขณะที่เปปไทด์ AGRR มีความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งที่น้อยกว่า โปรแกรม Derek ที่ใช้สำหรับทำนายความเป็นพิษของเปปไทด์ที่ใช้ในการศึกษา Molecular docking แสดงถึงความเป็นพิษที่น้อยสำหรับเปปไทด์ทุกตัว โดยสรุป ผลการทดลองเหล่านี้สามารถนำมาใช้สำหรับการพัฒนาตัวยับยั้งที่มีความแรงต่อเอนไซม์โปรตีเอส NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี โดยการทำ combinatorial optimization ร่วมกับการออกแบบตัวยับยั้งประเภท peptidomimetic โดยอยู่บนพื้นฐานของตำแหน่งที่เกิดการตัดตามธรรมชาติของโปรตีนสายยาวเพื่อเพิ่มฤทธิ์และลดความเป็นพิษของตัวยับยั้ง

คำหลัก: dengue virus NS2B(H)-NS3p, molecular docking, ความเป็นพิษ

โครงการ "การพัฒนาและคัดกรองตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 โดยใช้คอมพิวเตอร์ (In silico developing and screening for inhibitors of the dengue virus type 2 NS3 serine protease)"

ในปัจจุบันโรคไข้เลือดออกที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสเดงกี จัดได้ว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ร้ายแรงโรคหนึ่งของประเทศไทย และนับวันจะทวีความรุนแรงมากขึ้นเรื่อยๆ การที่โรคไข้เลือดออกส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชากร จึงทำให้เกิดความสนใจมากขึ้นในการที่จะดำเนินการวิจัยและพัฒนาเพื่อที่จะผลิตวัคซีน หรือยามาใช้ในการป้องกัน บำบัด บรรเทา และรักษาโรคนี้ สำหรับวัคซีนป้องกันไข้เลือดออกนั้นกำลังอยู่ในระหว่างการวิจัยและพัฒนาในระยะหนึ่งแล้ว ดังนั้นการวิจัยและพัฒนา

จึงเป็นอีกช่องทางหนึ่งที่สามารถทำได้ในระหว่างที่ประเทศไทยกำลังรอวัคซีนสำหรับป้องกันไข้เลือดออกดังกล่าว เป้าหมายหนึ่งในการออกแบบยาต้านเชื้อไวรัสเดงกีที่เฉพาะเจาะจง คือเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี ซึ่งอยู่ในรูปเชิงซ้อนกับโปรตีน NS2B โดยโปรตีน NS2B ทำหน้าที่ในการกระตุ้นเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสให้มีฤทธิ์ เอนไซม์ NS3 โปรตีเอส จะทำหน้าที่ตัดส่วนของโปรตีนตั้งต้นของเชื้อไวรัสเดงกีในบริเวณที่มีกรดอะมิโนชนิดที่เป็นเบสเรียงต่อกัน 2 ตัว (dibasic residues) ที่อยู่ในบริเวณที่เป็นโปรตีนที่มีใช้ส่วนประกอบทางโครงสร้าง (nonstructural protein) ด้วยเหตุนี้เอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกีจึงเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างยิ่งในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี

จึงอาจกล่าวได้ว่าการยับยั้งเอนไซม์นี้เป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อไวรัสเดงกีเพิ่มจำนวนขึ้นตลอดจนไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเชื้อไวรัสที่มีความสามารถในการติดเชื้อเซลล์เป้าหมายได้ ในช่วงเวลาที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มจำนวนของเชื้อฟลาวิไวรัส ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ทางด้านของพันธุศาสตร์ของเชื้อฟลาวิไวรัสมากมาย ดังนั้นในการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ ส่วนใหญ่จึงให้ความสำคัญทางด้านชีวเคมี ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการตัดส่วนของโปรตีนที่มีใช้ส่วนประกอบทางโครงสร้าง รวมถึงโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อฟลาวิไวรัส กลไกของการที่โปรตีนขนาดเล็กซึ่งทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์กระตุ้นเอนไซม์โปรตีเอสให้มีฤทธิ์ วิธีวิเคราะห์ที่มีความไวสูงซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของยับยั้ง และการพัฒนาวิธีการคัดกรองตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูง

กระบวนการศึกษาวิจัยทั้งหมดที่กล่าวมานั้น เป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยและพัฒนา (Drug Research and Development Process) ตามขั้นตอนมาตรฐาน หากแต่ค่าใช้จ่ายในการวิจัยและพัฒนาอยู่ในระดับที่สูงสำหรับเชื้อไวรัสเดงกี และเป็นค่าใช้จ่ายที่สูงสำหรับประเทศไทยด้วยเช่นกัน ในขณะนี้ด้วยเทคโนโลยีทางด้านคอมพิวเตอร์ (Molecular Modelling) ที่ก้าวหน้าขึ้น ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะสามารถจะพัฒนาและคัดกรองยาต้านเชื้อไวรัสเดงกีได้เร็วขึ้นและใช้ต้นทุนที่ถูกลง อีกทั้งเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ในการวิจัยและพัฒนาโดยใช้คอมพิวเตอร์ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาอื่นๆ ที่ทราบเป้าหมายเช่นเดียวกับเชื้อไวรัสเดงกีที่มีเอนไซม์โปรตีเอสเป็นหนึ่งในเป้าหมายที่สำคัญ

การติดเชื้อไวรัสเดงกี

เชื้อไวรัสเดงกีเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคซึ่งมีอัตราการติดเชื้อต่อปีสูงเกินกว่า 50 ล้านราย ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะไม่ปรากฏอาการทางคลินิก แม้กระนั้นก็ยังมีส่วนน้อยที่เป็นไข้ต่ำๆ เป็นไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี (dengue fever, DF) จากนั้นพัฒนาไปสู่การเป็นไข้เลือดออก (dengue haemorrhagic fever, DHF) และหากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและทันเวลา ผู้ป่วยก็จะเสียชีวิตด้วยอาการช็อค (dengue shock syndrome, DSS) ในที่สุด ย้อนกลับไปในเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2322-2323 ซึ่งมีรายงานเป็นครั้งแรกว่าพบการเกิดไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี (DF) ในทวีปเอเชีย แอฟริกา และอเมริกาเหนือ ในช่วงเวลานั้น การเกิดไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี (DF) ถือว่าเป็นแบบอ่อน ไม่ถึงกับทำให้เสียชีวิต และโรคก็จำกัดอยู่เพียงบางบริเวณของพื้นที่โลกเท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์ยังคงแยกกันอยู่ แต่ในปัจจุบันนี้สถานการณ์ได้เปลี่ยนไปโดยสิ้นเชิง เชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์ได้เกิดการแพร่กระจายไปทั่วโลก และการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี (DF) มีความรุนแรงขึ้นเนื่องมาจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ต่างสายพันธุ์กัน (Hyperendipity) อีกทั้งอุบัติการณ์ของการเกิดไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี (DF) ก็สูงมากขึ้นด้วย

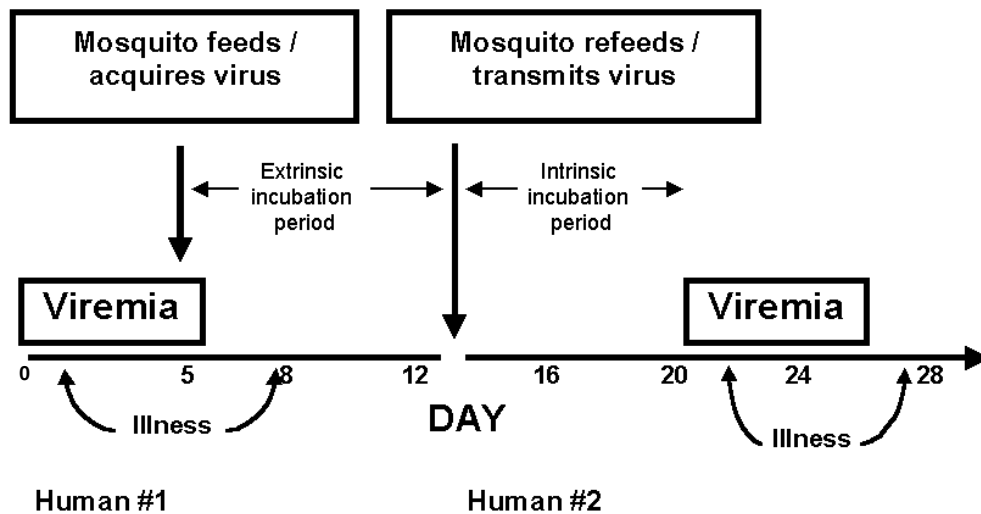
ถึงแม้ว่าโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีจะเป็นโรคที่เกิดขึ้นมานานแล้วก็ตาม ในขณะนี้ยังคงไม่มีวัคซีนหรือยาใดๆที่นำมาใช้รักษาได้ นักวิจัยได้ใช้ความพยายามอย่างมากมาในการที่จะพัฒนาวัคซีนมาเป็นเวลานานกว่าทศวรรษ แต่ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เหตุผลอันหนึ่งก็คือวัคซีนที่มีประสิทธิภาพจะต้องป้องกันเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์ได้พร้อมกัน ถ้าหากวัคซีนที่ผลิตขึ้นมาไม่สามารถป้องกันได้ทั้ง 4 สายพันธุ์พร้อมกันแล้ว ผู้ที่ได้รับการฉีดวัคซีนไปจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการที่จะเกิดไข้เลือดออก (DHF) สูงกว่าผู้ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน ดังนั้นในตอนนี้นักวิทยาศาสตร์ต่างจึงมุ่งมาที่การพัฒนาสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเดงกี (dengue viral inhibitors) เป็นส่วนใหญ่

การถ่ายทอดเชื้อไวรัสเดงกี ความชุกและผลที่เกิดขึ้น

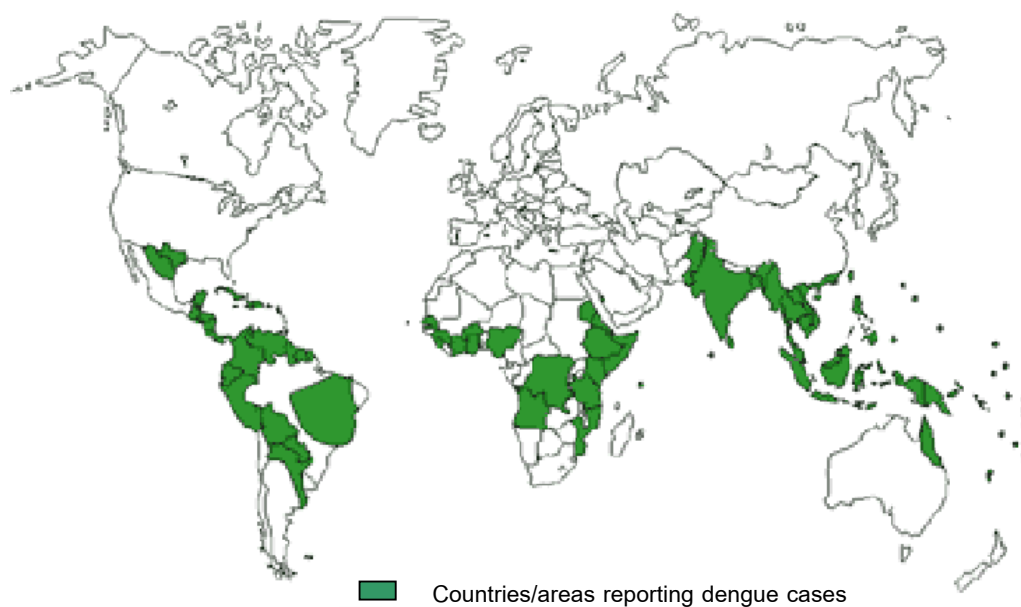
เชื้อไวรัสเดงกีถ่ายทอดไปสู่มนุษย์โดยการถูกยุงลายตัวเมียกัด ไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์ *Aedes aegypti* หรือ *Aedes albopitus* ในตอนกลางวัน (รูป 1) มนุษย์ ลิงชิมแปนซี ลิงกิบบอน และลิงมาคัสเป็นแหล่งอาศัยพักพิงของเชื้อไวรัสเดงกีตามธรรมชาติ สายพันธุ์ที่แตกต่างกันของมันเป็นสาเหตุที่สำคัญของความรุนแรงของโรคที่พบในมนุษย์ เชื้อไวรัสเดงกีอยู่ในแฟมิลี *Flaviviridae* เช่นเดียวกับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไข้เหลือง (yellow fever) สมออักเสบ (St. Louis encephalitis) และไข้จากเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ (West Nile fever) เป็นต้น เชื้อไวรัสเดงกีมี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 1 (DEN 1) สายพันธุ์ที่ 2 (DEN 2) สายพันธุ์ที่ 3 (DEN 3) และสายพันธุ์ที่ 4 (DEN 4) แต่ละสายพันธุ์จะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันที่มีอายุยาวนานตลอดชีวิต สำหรับตัวมันเอง แต่จะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันที่มีอายุสั้นหรือมีอายุอยู่เพียงชั่วคราวกับสายพันธุ์อื่นอีก 3 สายพันธุ์ที่ไม่ใช่ตัวมันเอง

ในปัจจุบันนี้มีประชากรประมาณ 2500 ล้านคนที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี และเชื้อไวรัสเดงกีก็แพร่ระบาดอยู่ในถิ่นต่างๆกว่า 100 ประเทศ ทั้งในทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแปซิฟิกตะวันตก (รูป 2) ความชุกของเชื้อไวรัสเดงกีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีสาเหตุมา

จากประชากรในเมืองเพิ่มจำนวนขึ้น การผสมพันธุ์ของยุงมีแพร่ขยายกว้างขวางขึ้น และมีการอพยพของผู้คนที่ได้รับเชื้อไวรัสเดงกี



รูป 1 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสเดงกีโดยยุงลาย *Aedes aegypti* หรือ *Aedes albopitus*



รูป 2 การแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อไวรัสเดงกีและ/หรือไขเลือดออก

ผลที่ตามมาก็คือ การระบาดของโรคไข้เลือดออกที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกีหลายสายพันธุ์มีอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นและไข้เลือดออก (DHF) ได้กลายมาเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของเด็กๆในหลายประเทศทั่วโลก

โดยทั่วไป ผู้ป่วยที่เป็นไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี (DF) จะจำกัดอาการอยู่ ไม่เป็นมากขึ้นจนถึงกับเป็นอันตรายถึงขั้นเสียชีวิตจากการเกิดไข้เลือดออก (DHF) อย่างไรก็ตาม มีปัจจัยเสี่ยงหลายปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเกิดไข้เลือดออก เช่น สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี ชนิดของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเดงกีที่มีอยู่ในร่างกายก่อนแล้ว พันธุกรรมของเจ้าบ้าน อายุ ความเสี่ยงจะสูงขึ้นหากเป็นการติดเชื้อครั้งที่สอง ความเสี่ยงจะสูงขึ้นหากอยู่อาศัยในพื้นที่ที่มีเชื้อไวรัสเดงกีตั้งแต่ 2 สายพันธุ์ขึ้นไป ทฤษฎีหนึ่งที่ใช้อธิบายถึงความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการถูกยุงลายที่มีเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์หนึ่งกัดในครั้งที่หนึ่ง และถูกกัดในครั้งต่อมาโดยยุงลายที่มีเชื้อไวรัสเดงกีคนละสายพันธุ์ เรียกว่า “antibody-dependent enhancement” กล่าวคือ ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์หนึ่งจะถูกกระตุ้นให้สร้าง non-neutralizing antibody ที่จะเพิ่มความสามารถในการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์อื่นที่เหลื่อ ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกีอย่างมากและเกิดการติดเชื้อที่รุนแรงขึ้น เชลล์ที่ติดเชื้อก็จะมีกลไกปลดปล่อยสารที่ทำให้เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือดและเกิดเลือดออกขึ้น นอกจากนั้น เนื้อเยื่อที่เป็นเป้าหมายของเชื้อไวรัสเดงกีอาจเป็นได้ทั้งโมโนนิวเคลียร์เซลล์ และเมกะคาริโอไซต์ในไขกระดูก

การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี

ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีวิธีการรักษาที่เฉพาะสำหรับการติดเชื้อไวรัสเดงกี ไม่ว่าจะเป็นวัคซีนหรือยาต้านเชื้อไวรัสเดงกี การรักษาที่กระทำกันโดยทั่วไปคือการรักษาตามอาการของผู้ป่วยโดยแพทย์และพยาบาล เช่น หากพบว่ามึนไข้ ก็ให้ยาพาราเซตามอลสำหรับลดไข้ เป็นต้น แต่จะไม่ใช้แอสไพริน หรือไอบรูโพรเฟน เนื่องจากจะทำให้เกิดอันตรายแก่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีและอาจทำให้เสียชีวิตได้ สำหรับการรักษาตามอาการดังกล่าวสามารถช่วยชีวิตผู้ป่วยไข้เลือดออกได้เป็นจำนวนมาก ดังนั้นอัตราการตายจึงลดลง

สำหรับการพัฒนาวัคซีนนั้น ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในตอนต้นว่าเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดโรคได้ และแต่ละสายพันธุ์ยังมีความแตกต่างในด้านของพันธุกรรมที่ทำให้เชื้อสามารถก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคและการแพร่ระบาดของโลกที่ต่างกันด้วย ดังนั้นวัคซีนที่มีประสิทธิภาพกับเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งหรือเพียงสองสายพันธุ์ ย่อมจะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคไข้เลือดออกที่มีความรุนแรงมากขึ้น ในขณะที่ได้มีการดำเนินการศึกษาวิจัยทางคลินิกโดยการให้วัคซีนที่พัฒนามาจากเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งจะส่งผลให้ร่างกายสามารถสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตาม คงต้องใช้เวลาอีกหลายปีกว่าที่จะมีวัคซีนสำหรับเชื้อไวรัสเดงกีใช้กัน ดังนั้นในช่วงเวลานี้ สิ่งที่เราสามารถทำได้ดีที่สุดคือการป้องกันโรคและการควบคุมยุงลายที่เป็นพาหะนำโรคโดย

1. การพักผ่อนโดยเฉพาะในเวลากลางวันเพื่อป้องกันไม่ให้ยุงกัด ไม่เล่นในที่อับและมืด

2. ปราบ และทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ซึ่งชอบวางไข่ในน้ำสะอาดที่อยู่นิ่ง ๆ ตามภาชนะต่าง ๆ ที่มีน้ำขัง
3. ในกรณีที่เป็นไข้เลือดออกแล้ว ผู้ป่วยไม่ควรให้ถูกยุงกัดภายใน 5 วันแรกของโรค เพราะผู้ป่วยยังมีไวรัสอยู่ในเลือด ทำให้แพร่เชื้อไปให้คนอื่นได้
4. รายงานคนไข้ไปที่โรงพยาบาล หรืออนามัยจังหวัด เพื่อส่งเจ้าหน้าที่ไปทำการกำจัดยุงบริเวณนั้น ก่อนที่จะมีการระบาดเพิ่มขึ้น

ในตอนนี้นักวิจัยและพัฒนาส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปยังการหาสารประกอบที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีได้อย่างจำเพาะเจาะจง

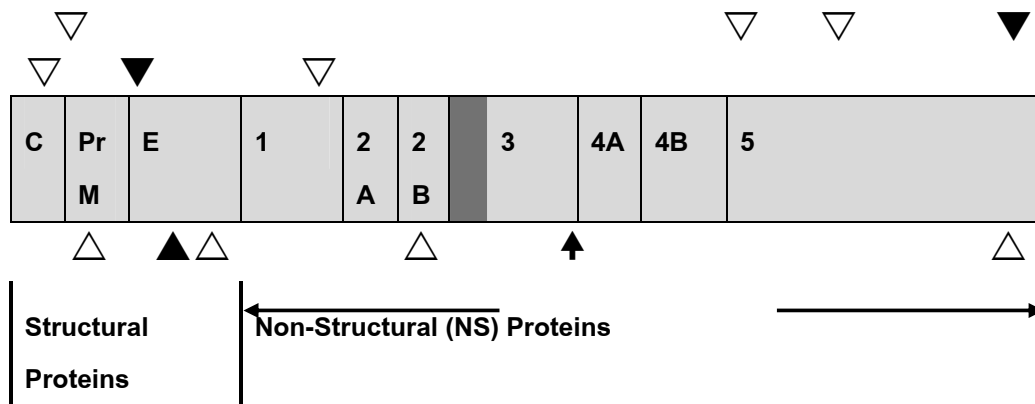
เชื้อไวรัสเดงกีและการตัดโปรตีนตั้งต้น

เชื้อไวรัสเดงกีเป็นสมาชิกของแฟมิลี *Flaviviridae* มีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยวแบบ positive ซึ่งสามารถถอดรหัสได้เป็นโปรตีนของไวรัสที่สามารถทำหน้าที่ได้เมื่อผ่านกระบวนการตัดส่วนของโปรตีนตั้งต้น ของเชื้อไวรัส การตัดดังกล่าวเกิดขึ้นในทั้ง 2 ขั้นตอน คือในระหว่างที่กำลังถอดรหัสและหลังจากที่ถอดรหัสเรียบร้อยแล้ว โดยเอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ในการตัดประกอบด้วยเอนไซม์ของเจ้าบ้าน (host protease) และเอนไซม์ของเชื้อไวรัสเดงกี (viral protease) จีโนมของเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ที่ 2 ประกอบด้วย 10,723 นิวคลีโอไทด์และสามารถถอดรหัสได้เป็นกรดอะมิโนที่ต่อกันเป็นโปรตีนตั้งต้น 3,391 ตัว โปรตีนแต่ละชนิดของเชื้อไวรัสจัดเรียงตามลำดับดังนี้

C-prM-E-NS1-

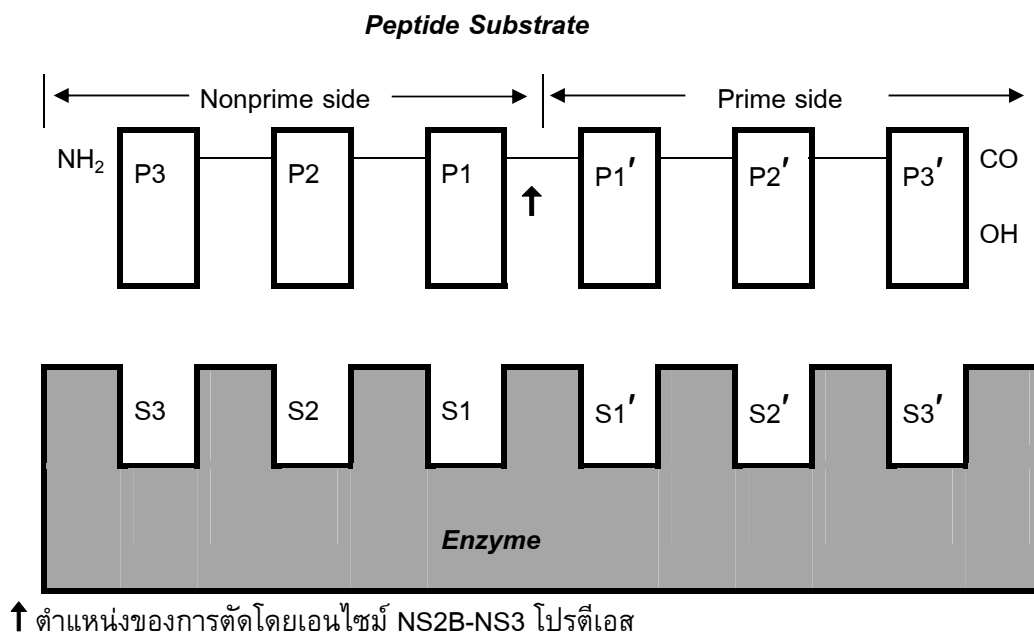
NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 โดย C คือ nucleocapsid, prM คือ โปรตีนตั้งต้นของ membrane protein, E คือ envelope protein และ NS คือ โปรตีนที่มีใช้ส่วนประกอบทางโครงสร้าง กระบวนการตัดจะทำให้ได้โปรตีนที่เป็นโครงสร้าง 3 โปรตีนคือ C, prM และ E และได้โปรตีนที่มีใช้ส่วนประกอบทางโครงสร้างอีก 5 โปรตีนคือ NS1, NS2, NS3, NS4 และ NS5 (รูป 3)

เอนไซม์ signalase ของเจ้าบ้านจะทำหน้าที่ตัดที่ตำแหน่งระหว่างโปรตีน C กับโปรตีน prM (C-prM), โปรตีน prM กับโปรตีน E (prM-E), โปรตีน E กับโปรตีน NS1 (E-NS1) และโปรตีน NS4A กับโปรตีน NS4B (NS4A-NS4B) เอนไซม์ furin ของเจ้าบ้านจะทำหน้าที่ตัดโปรตีน prM ให้เป็นโปรตีน M (membrane protein) เอนไซม์โปรตีเอส NS2B-NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกีที่อยู่ในรูปเชิงซ้อนระหว่าง NS3 protease domain กับโปรตีน NS2B ทำหน้าที่ตัดโปรตีนตั้งต้นในหลายตำแหน่ง รวมถึงตำแหน่งระหว่างโปรตีน NS2A และ โปรตีน NS2B (NS2A-NS2B), โปรตีน NS2B และ โปรตีน NS3 (NS2B-NS3), โปรตีน NS3 และ โปรตีน NS4A (NS3-NS4A) และ โปรตีน NS4B และ โปรตีน NS5 (NS4B-NS5) นอกจากนั้นเอนไซม์ยังตัดที่ตำแหน่งในโปรตีน C, โปรตีน NS4A และภายในโปรตีน NS3 เอง (รูป 3) ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอสประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็นเบสสองตัวติด กัน เช่น Lys-Arg, Arg-Arg และ Arg-Lys ที่ตำแหน่ง P1 และ P2 และต่อด้วยกรดอะมิโนที่มี side chain เล็ก เช่น Gly, Ala และ Ser ที่ตำแหน่ง P1' (รูป 4) ยกเว้นตำแหน่งที่อยู่ระหว่างโปรตีน NS2B และโปรตีน NS3 (NS2B-NS3) จะมีกรดอะมิโน Gln ที่ตำแหน่ง P2



รูป 3 กระบวนการตัดส่วนของโปรตีนตั้งต้นโดยเอนไซม์ของเจ้าบ้านและเอนไซม์ของเชื้อไวรัส

- △ ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์ signalase
- ▲ ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์ furin
- ↑ ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์โปรตีเอสชนิดที่ไม่ทราบชัดเจน
- ▼ ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอส
- ▽ ตำแหน่งอื่นๆของการตัดโดยเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอส



รูป 4 วิธีการกำหนดตำแหน่งบนเอนไซม์และซับสเตรทโดย Schechter and Berger

รูปแสดงให้เห็นถึงกรดอะมิโนบนซัสเตรทที่เป็นเปปไทด์ที่เรียกว่าตำแหน่ง P1-Pn จากตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัดไปปลายด้านที่เป็นกลุ่มอะมิโน และเรียกว่าตำแหน่ง P1'-Pn' จากตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัดไปปลายด้านที่เป็นกลุ่มคาร์บอกซิลิก สำหรับตำแหน่งบนเอนไซม์ที่ตรงกันกับตำแหน่งบนซัสเตรทซึ่งจะจับกันพอดีเรียกว่าตำแหน่ง S1-Sn และ S1'-Sn'

เอนไซม์ NS3 โปรตีเอส

โปรตีน NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกีซึ่งมีขนาดประมาณ 69 กิโลดาลตัน (รูป 5) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลายอย่างกล่าวคือ กรดอะมิโน 167 ตัวดัดแปลงไปเป็นกลุ่มอะมิโน (สีเทา) ของโปรตีน NS3 จะมีฤทธิ์เป็นเอนไซม์โปรตีเอส ชนิดที่เรียกว่าเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน และด้านปลายที่เป็นกลุ่มคาร์บอกซิลของโปรตีน NS3 จะมีฤทธิ์เป็นเอนไซม์ nucleoside triphosphatase (NTPase) และเอนไซม์ RNA helicase จากการศึกษาโดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถทำให้ระบุได้ถึงกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีส่วนสำคัญในการทำให้เอนไซม์ NS3 โปรตีเอสมีฤทธิ์ในการตัดโปรตีนตั้งต้นซึ่งเรียกว่า catalytic triad อันประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ตัวคือ His51, Asp75 และ Ser135 และจากการศึกษาโดยการแทนที่กรดอะมิโน Ser ในตำแหน่งที่ 135 โดยกรดอะมิโน Ala พบว่าเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสจะไม่มีฤทธิ์ ดังนั้นเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสจึงมีส่วนสำคัญในการทำให้เชื้อไวรัสเดงกีเพิ่มจำนวนขึ้นและสามารถไปติดเชื้อเซลล์เป้าหมายได้

ในปัจจุบันมีเพียงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสเท่านั้นที่มีการศึกษา (รูป 6) โดยเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสมีการพับตัวของโปรตีนคล้ายกับเอนไซม์ chymotrypsin (chymotrypsin-like serine proteases) ที่เป็น 6-stranded β -barrel conformation อย่างไรก็ตาม โครงสร้างดังกล่าวที่มีการศึกษาไม่ใช่โครงสร้างที่เอนไซม์ NS3 โปรตีเอสมีฤทธิ์ แต่ว่าเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสจะมีฤทธิ์เมื่ออยู่ในรูปเชิงซ้อนกับโปรตีน NS2B โดยโปรตีน NS2B ทำหน้าที่ในการกระตุ้นเอนไซม์ NS3 โปรตีเอส ซึ่งโครงสร้างในรูปเชิงซ้อนนี้ยังไม่มีการศึกษาจนถึงปัจจุบันนี้

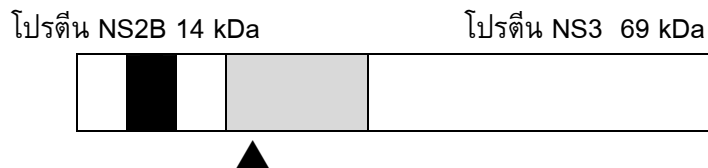
จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกีที่ไม่มี NS2B มาจับในรูปเชิงซ้อนเทียบกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ NS3-NS4A โปรตีเอสของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบว่าใกล้เคียงกันมาก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีกลไกการกระตุ้นโดยโปรตีนที่เป็นโคแฟกเตอร์ (NS2B: โคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี NS4A: โคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี) ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าตำแหน่งที่มีการจับของซัสเตรทบนเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกีค่อนข้างตื้น และไม่พบปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสกับซัสเตรทในตำแหน่งที่ไกลกว่า P2 และ P2' บนซัสเตรทเมื่อไม่มี NS2B โปรตีนจับกับอยู่กับเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสในรูปเชิงซ้อน

NS2B โคแฟกเตอร์

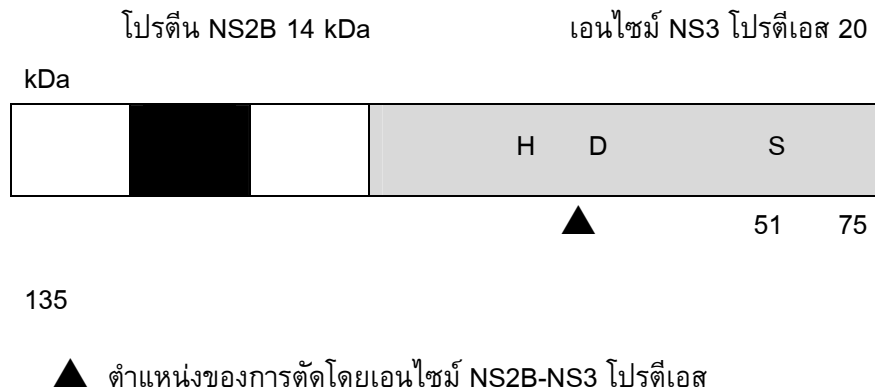
โดยปกติเอนไซม์โปรตีเอสของฟลาวิไวรัส จะสามารถทำหน้าที่ในการตัดซัสเตรทตามธรรมชาติของมันได้ มีความจำเป็นที่จะต้องมีการโปรตีนขนาดเล็กหรือที่เรียกว่าโคแฟกเตอร์ ในการทำ

หน้าที่กระตุ้นเอนไซม์โปรตีเอส สำหรับกรณีของเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี แม้จะพบว่าเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสเพียงลำพังมีฤทธิ์ในการตัดซับสเตรทที่มีกรดอะมิโนชนิดเบสสองตัวเรียงต่อกันที่ตำแหน่ง P1 และ P2 แบบที่ไม่ขึ้นกับ NS2B โคแฟกเตอร์ แต่ความสามารถในการตัดซับสเตรทดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอย่างมากเมื่อมี NS2B โคแฟกเตอร์อยู่ในรูปเชิงซ้อนกับเอนไซม์ NS3 โปรตีเอส จากการศึกษาพบว่าจำนวนของกรดอะมิโนเพียง 40 ตัวเท่านั้นที่จำเป็นสำหรับความสามารถของ NS2B โคแฟกเตอร์ในการกระตุ้นเอนไซม์ NS3 โปรตีเอส ไม่จำเป็นต้องใช้โปรตีน NS2B ทั้งหมด กรดอะมิโน 40 ตัวดังกล่าวเป็นส่วนที่เป็น hydrophilic ของโปรตีน NS2B เรียกว่า NS2B(H) หรือ cofactor domain (รูป 5 บริเวณที่เป็นสีดำ) สำหรับกรดอะมิโนส่วนที่เป็น hydrophobic ที่อยู่ด้านข้างทั้งสองข้างของ cofactor domain มีความเป็นไปได้ที่จะมีหน้าที่ในการนำเอนไซม์ที่อยู่ในรูปเชิงซ้อนนี้ไปยังผนังของเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (ER)

a.



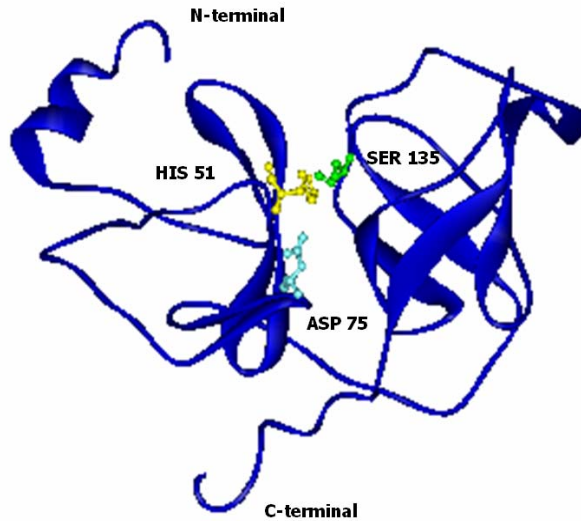
b.



รูป 5 โครงสร้างของเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี

รูป 5a. แสดงให้เห็นโปรตีน NS2B โดยมีโคแฟกเตอร์ NS2B(H) สีดำ และโปรตีน NS3 โดยมีเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสสีเทา ซึ่งมีขนาด 14 kDa และ 69 kDa ตามลำดับ

รูป 5b. แสดงให้เห็นโปรตีน NS2B โดยมีโคแฟกเตอร์ NS2B(H) สีดำ และเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสสีเทา และแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ประกอบกันขึ้นเป็น catalytic triad: H51, D75 และ S135

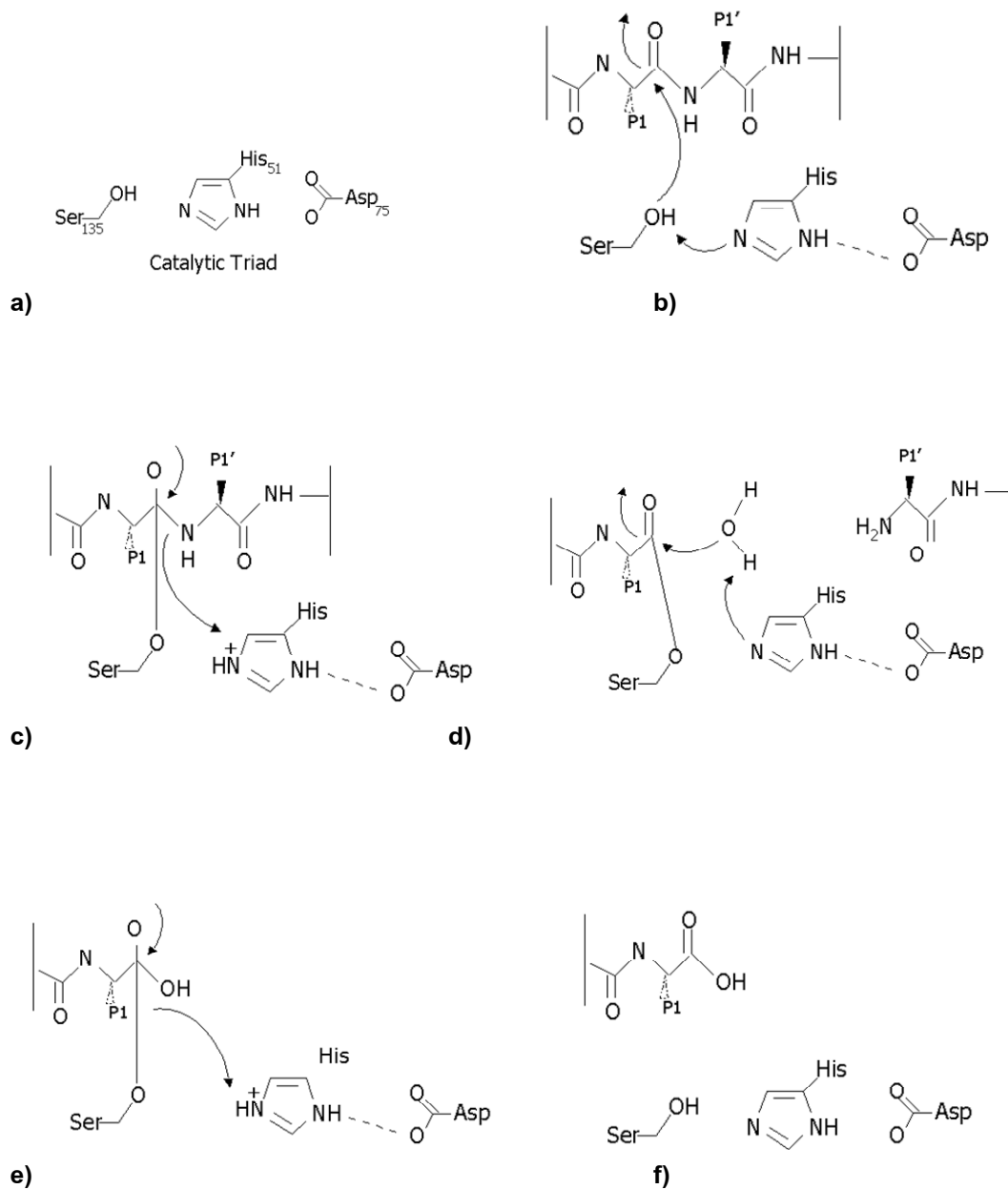


รูป 6 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี

ในการผลิตเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสในเชื้อ *E. coli* เอนไซม์ที่ได้จะอยู่ในรูปที่ไม่มีฤทธิ์ (inactive) ต้องนำไปผ่านกระบวนการ refolding ทำให้เอนไซม์เปลี่ยนแปลงกลับมาอยู่ในสภาพที่มีฤทธิ์ และพบว่าการหลอมรวมของ NS2B(H) เข้ากับ NS3 โปรตีเอสทำให้ได้เอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสที่มีความสามารถเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากในการตัดโปรตีนตั้งต้น ทั้งยังพบการตัดตัวเอง (autoprocessing) ของเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 ที่ตำแหน่งเชื่อมต่อกันระหว่าง NS2B(H) และ NS3 โปรตีเอสด้วย การนำตัวเชื่อม (linker) คือ Gly₄-Ser-Gly₄ ซึ่งเป็นกรดอะมิโน 9 ตัวมาเชื่อมต่อกันระหว่างส่วนของ NS2B(H) กับส่วนของ NS3 โปรตีเอสทำให้ตำแหน่งระหว่าง NS2B(H) และ NS3 โปรตีเอสมีความทนต่อการตัดโดยเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอส และมีความสามารถเพิ่มขึ้นในการตัดซับสเตรทซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ตัวที่มาจากโปรตีนตั้งต้นในตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติ

ความจำเพาะเจาะจงของซับสเตรท

ปัจจุบันนี้ยังมีความพยายามอย่างจำกัดในการที่จะศึกษาวิเคราะห์ถึงคุณลักษณะ และคุณสมบัติของซับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี โดยทั่วไปในการพัฒนาเพื่อหาตัวยับยั้งสำหรับเอนไซม์โปรตีเอสกลุ่มเซอริน มักจะเริ่มต้นจากเปปไทด์ซับสเตรทซึ่งได้มาจากลำดับของกรดอะมิโนทางฝั่งที่เป็น nonprime side จากตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติ (รูป 4) โดยมีการเปลี่ยนพันธะเอไมด์ให้เป็น electrophile ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโน Ser (ดูกลไกการออกฤทธิ์ของเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอริน รูป 7) ที่เปปไทด์อะมิโนตัวหนึ่งใน catalytic triad (รูป 5b, 6)



รูป 7 กลไกการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสกลุ่มเซอริน ของเชื้อไวรัสเดงกี

จากการศึกษาทางชีวเคมีของเอนไซม์ทั้งสองแบบคือ เอนไซม์ NS3 โปรตีเอส (ไม่มี NS2B โคแฟกเตอร์) และเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอส พบว่าเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสสามารถทำปฏิกิริยากับ *N*-

α -benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPA) ซึ่งเป็นซับสเตรทที่มีขนาดเล็กที่มีกรดอะมิโนเพียงแค่ตำแหน่ง P1 ได้และดีกว่าเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอส ข้อมูลดังกล่าวนี้ชี้ให้เห็นว่าความจำเพาะของซับสเตรทต่อเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอสขึ้นกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันของเอนไซม์กับซับสเตรทในตำแหน่งที่มากกว่าเพียงแค่ตำแหน่ง P1

เปปไทด์ที่ติดฉลาก (fluorogenic tripeptides) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ตัวโดยมีกรดอะมิโนในตำแหน่ง P1 และ P2 เป็นเบสทั้งสองตำแหน่ง สามารถถูกตัดโดยเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอส และซับสเตรทที่ดีที่สุดคือ GRR-MCA โดยมีค่า K_m 180 μM ค่า k_{cat} 0.031 s^{-1} และ ค่า k_{cat}/K_m 172 $s^{-1}M^{-1}$ ซับสเตรทอื่นๆ เช่น เปปไทด์ที่ติดฉลาก *p*-nitroanilide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ตัวที่ได้มาจากลำดับของกรดอะมิโนที่ nonprime side ของตำแหน่งที่มีการตัดของซับสเตรทตามธรรมชาติพบว่าซับสเตรทที่ดีที่สุดคือ Ac-TTSTRR-pNA ซึ่งได้มาจากลำดับของกรดอะมิโนที่ nonprime side ของตำแหน่งที่มีการตัด ของโปรตีน NS4B และ NS5 (NS4B-NS5) โดยมีค่า K_m 346 μM ค่า k_{cat} 0.095 s^{-1} และ ค่า k_{cat}/K_m 275 $s^{-1}M^{-1}$ และเมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้มีการศึกษาซับสเตรทที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 12 ตัวที่ได้มาจากลำดับของกรดอะมิโนของซับสเตรทตามธรรมชาติของเอนไซม์ (nonprime side 6 ตัวและ prime side อีก 6 ตัว) โดยใช้เอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอส พบว่าซับสเตรททุกตัวสามารถถูกตัดได้ ณ ตำแหน่งของการตัดตามธรรมชาติ และตัวเอนไซม์เองไม่เกิดการตัดตัวเอง (autocleavage) เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอส พบว่าความสามารถในการตัดของเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอสลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่โครงสร้างเปลี่ยนรูปอันเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำของส่วนที่เป็น hydrophobic ที่อยู่ด้านข้างทั้งสองข้างของ cofactor domain (NS2B(H)) และการกระตุ้นเอนไซม์โปรตีเอสที่ไม่มีประสิทธิภาพ

การพัฒนาต่อต้านเชื้อไวรัสเดงกี

เอนไซม์โปรตีเอสเป็นเป้าหมายที่สำคัญอันหนึ่งในกระบวนการของการค้นพบยา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน ซึ่งเป็นเอนไซม์พื้นฐานในวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสต่างๆ และเป็นโปรตีนตัวหนึ่งที่มีการศึกษามากที่สุด ยิ่งไปกว่านั้นโครงสร้างผลึกและโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์โปรตีเอสที่จับกับซับสเตรทหรือตัวยับยั้งก็ได้มีการศึกษาเป็นจำนวนมาก สำหรับมนุษย์แล้ว เอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆภายในร่างกายหลายอย่าง เช่น การอักเสบ การสลายไขมัน การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน การย่อย การแข็งตัวของเลือด เป็นต้น ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ที่ว่า เมื่อใดก็ตามที่เราต้องใช้ยายับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเพื่อรักษาโรคในมนุษย์ ยาดังกล่าวนั้นจะต้องมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัส ไม่เช่นนั้นยาอาจจะก่อให้เกิดอาการอื่นไม่พึงประสงค์กับมนุษย์ได้

ที่ผ่านมาได้มีการค้นพบยาที่ใช้ยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน ออกมามากมาย ทั้งที่ได้จากการคัดกรองผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ และการคัดกรองจากสารเคมีต่างๆ วิธีการออกแบบยาอย่างหนึ่งที่เป็นนิยมนำกันคือ การใช้ซับสเตรทของเอนไซม์โปรตีเอสในธรรมชาติที่เป็นสายเปปไทด์ มาเป็นโครงสร้างเริ่มต้นในการออกแบบตัวยับยั้ง และต่อด้วยกระบวนการปรับเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในแต่ละ

ตำแหน่งบนสายเปปไทด์ที่เหมาะสม โดยปกติแล้วเปปไทด์ที่ใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบยาเหล่านี้ มักจะมีคุณสมบัติทางเภสัชพลศาสตร์ที่ดี เช่น การออกฤทธิ์ของยาเมื่อจับกับตัวรับ แม้กระนั้นก็ตาม จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าเปปไทด์เหล่านั้นไม่สามารถนำมาใช้เป็นยาได้เนื่องจากคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่ไม่ดี เช่น การดูดซึม การกระจายยา การเปลี่ยนแปลงยา และการกำจัดยาออกจากร่างกาย สิ่งเหล่านี้ส่งผลให้มีปริมาณความเข้มข้นของยา ณบริเวณที่ออกฤทธิ์ลดลง ดังนั้นเพื่อที่จะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าว จึงได้มีความพยายามที่จะทำการออกแบบยา โดยเปลี่ยนแปลงจากเปปไทด์ที่ค้นพบว่ามีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสมาเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับเปปไทด์ แต่ไม่ใช่เปปไทด์ที่เรียกว่า peptidomimetics หรือ nonpeptides

ข้อมูลต่างๆที่เป็นรายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติที่ได้จากการศึกษาผลึก หรือ การศึกษา NMR จะช่วยให้การออกแบบยาเป็นไปอย่างถูกต้องมีเหตุผลขึ้น การศึกษาถึงตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ (active site) หรือตำแหน่งบนเอนไซม์ที่จับสเตรทไปจับ (binding site) สามารถทำได้โดยอาศัยการสร้างโมเดลในคอมพิวเตอร์ด้วยซอฟต์แวร์สำหรับการสร้างโมเดล สิ่งต่างๆเหล่านี้จะช่วยอย่างมากในการออกแบบยา ตัวอย่างของตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน เช่น ตัวยับยั้ง thrombin ตัวยับยั้งเชื้อไวรัส HIV ตัวยับยั้งเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ตัวยับยั้งของ ACE (angiotensin-converting enzyme)

โดยทั่วไป ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน จะพัฒนามาจากซีสเทรทที่เป็นเปปไทด์จากด้าน nonprime side เนื่องมาจากข้อเท็จจริงที่ว่าเอนไซม์โปรตีเอสจับกับซีสเทรทได้ดีทางด้าน nonprime side (ดูรูป 5 เมื่อเกิดการตัดสายเปปไทด์ที่เป็นซีสเทรท ด้าน prime side จะหลุดออกไปก่อน ในขณะที่ด้าน nonprime side ยังติดกับตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ของเอนไซม์) ตัวยับยั้งส่วนใหญ่ที่พัฒนามาจากด้าน nonprime side พันธะเอไมด์ที่ถูกตัดจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น electrophile เช่น aldehydes, trifluoromethyl ketones, pentafluoroethyl ketones, α -keto amides, α -ketoesters, α -diketones, α -ketoheterocycles, organoboronic acids และ organophosphonate esters เป็นต้น Electrophile เหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโน Ser ที่เป็นกรดอะมิโนตัวหนึ่งซึ่งรวมกันเป็น catalytic triad (Ser, His and Asp) เกิดเป็นสารระหว่างกลางที่มีพันธะโควาเลนต์และสามารถเปลี่ยนแปลงได้ การที่ electrophile เหล่านี้มีความสามารถที่จะเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสที่ดี ก็เนื่องจากมันสามารถจับกับกรดอะมิโน Ser ใน catalytic triad ได้ดีกว่าซีสเทรทตามธรรมชาติของเอนไซม์โปรตีเอส และเกิดเป็นสารระหว่างกลางที่มีพันธะโควาเลนต์ จึงเรียกตัวยับยั้งเหล่านี้ว่า serine-trap inhibitors

อย่างไรก็ตาม ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน ที่พัฒนามาจากกรดอะมิโนด้าน prime side ก็มีอยู่จำนวนมากเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาของกรดอะมิโนในด้าน prime side ก็สามารถเพิ่มความชอบในการจับของตัวยับยั้งกับเอนไซม์ ตัวอย่างของตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสกลุ่มเซอรีนที่พัฒนามาจากกรดอะมิโนด้าน prime side เช่น ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สำหรับการออกแบบและพัฒนา ยา สิ่งที่ต้องระวังคือ อาการอันไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้ยานั้น ดังนั้นตัวยับยั้งที่นำมาใช้ในมนุษย์ควรที่จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ของเชื้อไวรัสมากกว่า เอนไซม์ของมนุษย์

เมื่อเทียบกับโปรตีนเอสของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษามากที่สุดในบรรดาเอนไซม์โปรตีนเอสของฟลาไวรัส การออกแบบและพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อไวรัสเดงกีนั้นว่ายังจำกัดอยู่ในวงแคบ อย่างไรก็ตาม ในขั้นแรกได้มีการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อไวรัสเดงกีโดยใช้เปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยเลียนแบบลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติระหว่างโปรตีน NS3 และ โปรตีน NS4A (NS3-NS4A) และระหว่างโปรตีน NS4B และ โปรตีน NS5 (NS4B-NS5) จากตำแหน่ง P6-P2' (ตารางที่ 1) โดยมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่เกิดการตัดในสายเปปไทด์เป็น α -keto amide ซึ่งไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ พบว่าเปปไทด์ดังกล่าวมีฤทธิ์ในการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อไวรัสเดงกี มีค่า K_i อยู่ในช่วงไมโครโมลาร์ และเมื่อมีการแทนที่กรดอะมิโนในตำแหน่ง P1'-P2' เป็น carboxy terminal aldehyde ในเปปไทด์ที่ได้จากลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติระหว่างโปรตีน NS3 และ โปรตีน NS4A (NS3-NS4A) (Ac-FAAGR-CHO) ทำให้ได้ตัวยับยั้งที่มีค่า K_i 16 μ M เมื่อเร็ว ๆ นี้ เปปไทด์ที่ได้จากลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติระหว่างโปรตีน NS2A และ โปรตีน NS2B (NS2A-NS2B) ระหว่างโปรตีน NS2B และ โปรตีน NS3 (NS2B-NS3) ระหว่างโปรตีน NS3 และ โปรตีน NS4A (NS3-NS4A) ระหว่างโปรตีน NS4B และ โปรตีน NS5 (NS4A-NS5) ฝั่ง nonprime side ตำแหน่ง P6-P1 ได้รับการทดสอบและพบว่ามีฤทธิ์ในการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อไวรัสเดงกี แบบแข่งขัน ในขณะที่เปปไทด์ที่ได้จากฝั่ง prime side ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ในความเข้มข้นที่มากกว่า 1 ไมโครโมลาร์ และตัวยับยั้งที่ดีที่สุดคือ เปปไทด์ที่ได้จากลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติระหว่างโปรตีน NS2A และ โปรตีน NS2B (NS2A-NS2B) (Ac-RTSKKR-CONH₂) มีค่า K_i 12 μ M (ตารางที่ 2)

จากการค้นพบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าฝั่ง nonprime side มีความชอบที่จะจับกับเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อไวรัสเดงกี และทำให้สามารถพัฒนาตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อไปได้โดยวิธี combinatorial optimization ด้วยการแทนที่กรดอะมิโนในตำแหน่งต่างๆเพื่อดูว่ากรดอะมิโนตัวใดควรจะอยู่ในตำแหน่งใด จึงจะให้ฤทธิ์ของตัวยับยั้งที่ดีที่สุด นอกจากนั้นก็ยังสามารถทราบถึงขนาดของตัวยับยั้งที่เหมาะสมว่าควรมีขนาดเท่าไร เช่น 2-mer (กรดอะมิโน 2 ตัว) 3-mer (กรดอะมิโน 3 ตัว) หรือ 10-mer (กรดอะมิโน 10 ตัว) เป็นต้น ผลที่ได้พบว่า ขนาดที่เล็กที่สุดของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คือ 2-mer (กรดอะมิโน 2 ตัว) ได้แก่ Ac-KR-CONH₂ มีค่า K_i ประมาณ 121 μ M (ตารางที่ 2)

ผลดังกล่าวได้รับการยืนยันโดยการทำ molecular docking ระหว่างเปปไทด์ยับยั้งกับเอนไซม์ NS3 โปรตีนเอส (ไม่มี NS2B(H)) และระหว่างเปปไทด์ยับยั้งกับเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีนเอสที่ได้จากการทำ homology modeling โดยมีโครงสร้างของเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นต้นแบบ ซึ่งพบว่าเปปไทด์ยับยั้งที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีนเอสสามารถจับกับตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ (active site) ได้ใกล้เคียงและมีค่าพลังงานของการจับที่เหมาะสมกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การจับของยับยั้งกับเอนไซม์ NS3 โปรตีนเอส (ไม่มี NS2B(H)) ซึ่งผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการจับของ NS2B(H) กับ เอนไซม์ NS3 โปรตีนเอส น่าจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

conformation ของโปรตีน โดยเฉพาะที่ตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ (active site) จึงทำให้เกิดการจับของซับสเตรตกับตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ได้ใกล้ชิดยิ่งขึ้น

จากขั้นตอนในการพัฒนาตัวยับยั้งของเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกีที่กล่าวมาแล้ว แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาตัวยามาเพื่อใช้บำบัด บรรเทา และรักษาการติดเชื้อไวรัสเดงกี แต่เนื่องจากโครงสร้าง 3 มิติของผลึกของเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสในรูปเชิงซ้อนของเชื้อไวรัสเดงกียังไม่มีการศึกษา ดังนั้นจึงอาจต้องใช้เวลาอีกระยะหนึ่งเพื่อให้มีการศึกษาผลึกของเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสในรูปเชิงซ้อน และการศึกษาทาง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ซึ่งจะให้ข้อมูลในรายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม ในขณะนี้ได้มีการศึกษาถึงความจำเพาะเจาะจงของซับสเตรตต่อเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี โดยอาศัย internally quenched peptides ซึ่งจะช่วยเพิ่มความไวในการทดสอบหาซับสเตรตที่สูงขึ้น ในเบื้องต้นพบว่าซับสเตรตที่ได้จากการการใช้เปปไทด์ดังกล่าวมีความชอบในการจับกับเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอส และ ให้ค่า k_{cat}/K_m ที่ดีกว่าซับสเตรตที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดขณะนี้คือ GRR-MCA หลายเท่า และในที่สุดแล้ว มีความเป็นไปได้ว่าจะได้ซับสเตรตที่มีขนาดความยาวที่พอเหมาะ ประกอบกับทราบถึงกรดอะมิโนที่มีความเหมาะสมในตำแหน่งต่างๆด้วย ซึ่งจะช่วยเพิ่มความชอบในการจับกับเอนไซม์ของซับสเตรต และการได้มาซึ่งซับสเตรตที่ดีดังกล่าวนี้นำไปสู่การคัดกรองหาตัวยับยั้งเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกีที่มีความแรงสูง และบางทีอาจจะทำให้ได้ตัวยับยั้งเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในขนาดความเข้มข้นระดับ nanomolar หรือ picomolar ซึ่งทำให้มีความเหมาะสมที่จะพัฒนาต่อไปเป็นยาที่ใช้สำหรับมนุษย์ได้ โดยต้องผ่านขั้นตอนการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองและการศึกษาวิจัยทางคลินิกก่อน

ตารางที่ 1 แสดงลำดับของกรดอะมิโนจากตำแหน่ง P6-P6' ที่ตำแหน่งของการตัดตามธรรมชาติ ระหว่างโปรตีน NS2A และโปรตีน NS2B (NS2A-NS2B), ระหว่างโปรตีน NS2B และโปรตีน NS3 (NS2B-NS3), ระหว่างโปรตีน NS3 และโปรตีน NS4A (NS3-NS4A) และ ระหว่างโปรตีน NS4B และโปรตีน NS5 (NS4B-NS5) ของเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ที่ 2

ตำแหน่งของการตัดตามธรรมชาติ	ลำดับของกรดอะมิโนจากตำแหน่ง P6-P6'
NS2A-NS2B	RTSKKR _ SWPLNE
NS2B-NS3	EVKKQR _ AGVLWD
NS3-NS4A	FAAGRK _ SLTLNL
NS4B-NS5	TTSTRR _ GTGNIG

NH₂-P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-COOH

ตารางที่ 2 ค่า K_i ของเปปไทด์ที่เป็นตัวยับยั้งสำหรับเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี สายพันธุ์ที่ 2

เปปไทด์ที่สังเคราะห์	ค่า K_i ของเปปไทด์ (μM)
1. Ac-FAAGRK-CONH ₂	25.87
2. Ac-EVKKQR-CONH ₂	66.68
3. Ac-RTSKKR-CONH ₂	12.14
4. Ac-TTSTRR-CONH ₂	45.96
5. Ac-AGR-CONH ₂	> 1000
6. Ac-SKKR-CONH ₂	187.60
7. Ac-KKR-CONH ₂	22.31
8. Ac-GKR-CONH ₂	152.30
9. Ac-KR-CONH ₂	121.53
10. Ac-AGVLW-CONH ₂	> 1000
11. Ac-GTGNI-CONH ₂	> 1000
12. Ac-SLTLN-CONH ₂	> 1000
13. Ac-SWPLN-CONH ₂	> 1000

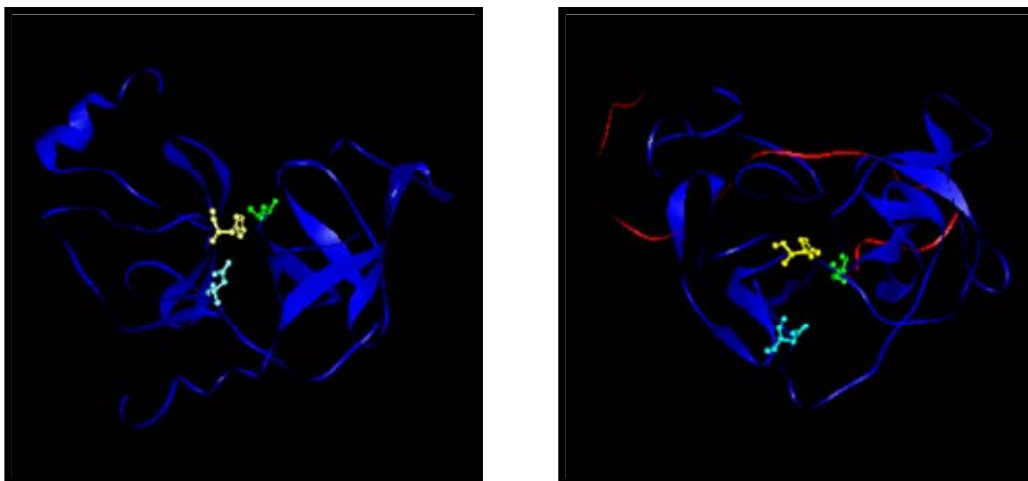
วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ด้วยเทคโนโลยีทางด้านคอมพิวเตอร์ (Molecular Modelling)
2. เพื่อทำนายความเป็นพิษของตัวยับยั้งที่ได้จากการวิจัยด้วยโปรแกรม DEREK for Windows

วิธีการทดลอง

การสร้าง homology model ของ DEN 2 NS2B(H)-NS3(pro)

Homology model ของ DEN2 NS2(B)H-NS3(pro) ที่ใช้ในการทดลองนำมาจากการศึกษาของ Niyomrattanakit



รูปที่ 8 เปรียบเทียบโครงสร้างผลึกของ DEN2 NS3 protease และ homology model ของ DEN 2 NS2B(H)-NS3 protease using HCV protease เป็นต้นแบบ

Catalytic triad, His 51, Asp 75 และ Ser 135, นำเสนอในรูป ball and stick model ด้วยสีเหลือง ฟอสฟอรัส และเขียว ตามลำดับ ปลายอะมิโนและคาร์บอกซีระบุเป็น N และ C ตามลำดับ โครงสร้างต่างๆสร้างจาก WebLab Viewer Pro 3.7

การสร้างเปปไทด์สำหรับการทำ molecular docking

ชุดของเปปไทด์สำหรับการทำ molecular docking สร้างจาก SYBYL 6.8. โดยแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้:

1. ชุดของเปปไทด์ที่มาจาก N-terminal cleavage site

a) dimer: KR (P2-P1), RK (P2-P1), RR (P2-P1)

b) trimer: GKR (P3-P2-P1), GRR (P3-P2-P1), KKR (P3-P2-P1), KRR (P3-P2-P1),
RRK (P3-P2-P1), KRK (P3-P2-P1), RKR (P3-P2-P1), RKK (P3-P2-P1)

c) tetramer: AGRR (P4-P3-P2-P1), SKKR (P4-P3-P2-P1)

d) pentamer: VKKQR (P5-P4-P3-P2-P1), AAGRK (P5-P4-P3-P2-P1),
AAGRR (P5-P4-P3-P2-P1), TSKKR (P5-P4-P3-P2-P1),
TSTRR (P5-P4-P3-P2-P1)

e) hexamer: EVKKQR (P6-P5-P4-P3-P2-P1), FAAGRK (P6-P5-P4-P3-P2-P1)
FAAGRR (P6-P5-P4-P3-P2-P1), RTSKKR (P6-P5-P4-P3-P2-P1)
TTSTRR (P6-P5-P4-P3-P2-P1)

2. ชุดของเปปไทด์ที่มาจาก C-terminal cleavage site

a) pentamer: AGVLW (P1'-P2'-P3'-P4'-P5'), GTGNI (P1'-P2'-P3'-P4'-P5'),
SLTLN (P1'-P2'-P3'-P4'-P5'), SWPLN (P1'-P2'-P3'-P4'-P5')

3. ชุดของเปปไทด์ที่มาจากทั้ง N และ C-terminal cleavage site

a) trimer: RR-S (P2-P1- P1'), KK-S (P2-P1- P1'), KR-S (P2-P1- P1'), RK-S (P2-P1- P1'),
RR-G (P2-P1- P1'), KK-G (P2-P1- P1'), KR-G (P2-P1- P1'), RK-G (P2-P1- P1')

b) tetramer: GRR-G (P3-P2-P1- P1'), GKR-G (P3-P2-P1- P1'), GKK-G (P3-P2-P1- P1'),
GRK-G (P3-P2-P1- P1'), KKR-G (P3-P2-P1- P1'), KRK-G (P3-P2-P1- P1'),
GRR-S (P3-P2-P1- P1'), GKR-S (P3-P2-P1- P1'), GKK-S (P3-P2-P1- P1'),
GRK-S (P3-P2-P1- P1'), KKR-S (P3-P2-P1- P1'), KRK-S (P3-P2-P1- P1'),
RR-SW (P2-P1- P1'-P2')

c) pentamer: KKR-SW (P3-P2-P1- P1'-P2'), AGRK-S (P4-P3-P2-P1- P1')

d) heptamer: RTSKKR-S (P6-P5-P4-P3-P2-P1- P1'), KKR-SWPL (P3-P2-P1- P1'-P2'-P3'-P4')

e) octamer: RTSKKR-SW (P6-P5-P4-P3-P2-P1- P1'-P2'),
FAAGRR-SL (P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'),
AGRK-SLTL (P4-P3-P2-P1- P1'-P2'-P3'-P4')

จากชุดของเปปไทด์เหล่านี้สามารถทำการทดลอง docking เพื่อศึกษาว่า nonprime-side residue, prime-side residue และ both nonprime-side และ prime-side residue มีความสำคัญอย่างไร

ต่อผลของการจับกับตำแหน่งที่สารออกฤทธิ์และหาความยาวที่เหมาะสมของการเป็นตัวยับยั้งของเปปไทด์

การทำ Molecular docking

การทำ Docking อาศัยโครงสร้าง 3 มิติ ของ NS3 protease domain และ homology model ของ NS2B(H)-NS3p complex ของ dengue virus เป็นต้นแบบ โดยใช้โปรแกรม Autodock 3.05 ดังนี้

การจำลองในคอมพิวเตอร์และการคำนวณทำโดยอาศัย multiple Linux cluster system มีการสร้าง three-dimensional affinity grids โดยการใช้ auxiliary program AutoGrid และ center ของ the protein mass ถูกเลือกให้เป็น grid center โปนิจินถูกวางใน three-dimensional grid และ probe atom ถูกวางที่แต่ละ grid point ค่า affinity และ electrostatic potential grid คำนวณสำหรับแต่ละชนิดของอะตอมในโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีเอส จำนวน grid points ณ แกน x-, y-, z- คือ 121 x 121 x 121 โดยแต่ละ grid points แยกกัน 0.375 Å³ เติม Kollman-united atomic charges เข้าไปในเอนไซม์โปรตีเอสและเปปไทด์ที่ทดสอบ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันระหว่างเอนไซม์และไลแกนด์คำนวณโดยอาศัย docked energies ค่า energies ที่ได้จากการคำนวณรวมถึง intermolecular และ intramolecular interaction energies AUTODOCK รายงาน final docked energies สำหรับการทดลองแต่ละครั้งตาม energy function สำหรับโครงสร้างที่ทำ docking

ผลการทดลอง

ผลการทดลองสำหรับ molecular docking ของเปปไทด์ที่ทดสอบกับโครงสร้างผลึกของ NS3(pro) และ homology model ของ NS2B(H)-NS3(pro) แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 Molecular docking ของเปปไทด์ที่มาจากโพลีโปรตีนต่อเอนไซม์ dengue virus NS3pro และ NS2B(H)-NS3pro proteases

เปปไทด์	Docked energy (kcal/mol)		Binding distance (Å)	
	NS3p	NS2B(H)-NS3p	NS3p	NS2B(H)-NS3p
ชุดของเปปไทด์ที่มาจาก N-terminal cleavage site				
a) dimer:				
1. KR	-7.40	-7.56	4.42	3.22
2. RK	-7.02	-7.41	4.54	3.41
3. RR	-7.33	-7.54	3.91	3.98
b) trimer:				
4. GKR	-7.26	-7.24	3.63	3.71
5. GRR	-7.70	-8.74	4.11	3.51
6. KKR	-6.68	-6.53	4.42	3.25
7. KRR	-7.60	-8.62	4.13	3.61
8. RRK	-7.28	-7.43	4.14	3.15
9. KRK	-7.50	-8.72	4.18	3.42
10. RKR	-6.68	-6.53	4.42	3.25
11. RKK	-6.48	-6.63	4.35	3.37
c) tetramer				
12. AGRR	-8.61	-9.79	5.02	5.86
13. SKKR	-7.14	-10.51	7.37	3.53
d) pentamer				
14. VKKQR	-0.66	-0.78	3.13	3.44
15. AAGRK	-7.23	-8.60	5.43	3.16
16. AAGRR	-4.45	-9.21	4.52	2.55
17. TSKKR	-3.51	-3.92	4.82	3.79
18. TSTRR	-0.49	-6.24	3.12	5.17
e) hexamer				
19. EVKKQR	-0.53	-0.77	3.09	3.28
20. FAAGRK	-7.59	-8.72	5.53	3.01
21. FAAGRR	-4.51	-9.20	4.41	2.63
22. RTSKKR	-3.69	-3.88	4.89	3.87

23. TTSTRR	-0.52	-6.82	3.23	5.26
ชุดของเปปไทด์ที่มาจาก C-terminal cleavage site				
a) pentamer				
24. AGVLW	-6.69	-8.43	5.31	6.64
25. GTGNI	-4.47	-4.37	3.71	3.39
26. SLTLN	-6.75	-7.17	4.57	5.47
27. SWPLN	-8.33	-10.74	4.83	4.85
ชุดของเปปไทด์ที่มาจากทั้ง N และ C-terminal cleavage site				
a) trimer				
28. RR-S	-5.62	-8.26	3.75	2.71
29. KK-S	-5.91	-8.52	3.43	2.96
30. KR-S	-5.84	-8.73	3.65	2.82
31. RK-S	-5.42	-8.76	3.61	2.73
32. RR-G	-5.51	-8.32	3.84	2.80
33. KK-G	-5.72	-8.39	3.52	2.63
34. KR-G	-5.86	-8.33	3.59	2.87
35. RK-G	-5.72	-8.34	3.71	2.63
b) tetramer				
36. GRR-G	-5.80	-8.13	3.82	2.83
37. GKR-G	-5.93	-8.24	3.95	2.72
38. GKK-G	-5.83	-8.14	3.72	2.61
39. GRK-G	-5.48	-8.39	3.94	2.75
40. KKR-G	-5.86	-8.26	3.79	2.83
41. KRK-G	-5.73	-8.42	3.61	2.73
42. GRR-S	-5.47	-8.53	3.92	2.83
43. GKR-S	-5.83	-8.27	3.52	2.91
44. GKK-S	-5.89	-8.38	3.86	2.73
45. GRK-S	-5.65	-8.61	3.84	2.68
46. KKR-S	-5.28	-8.46	4.41	3.26
47. KRK-S	-5.18	-8.29	4.71	3.21
48. RR-SW	-7.33	-8.92	5.47	3.31
c) pentamer				
49. KKR-SW	-6.38	-9.53	8.75	5.47

50. AGRK-S	-8.91	-8.31	4.36	2.87
d) heptamer				
51. RTSKKR-S	-1.69	-5.67	7.13	2.84
52. KKR-SWPL	-6.63	-7.89	9.72	6.32
e) octamer				
53. RTSKKR-SW	-3.73	-2.96	8.44	5.11
54. FAAGR-SL	-7.52	-8.89	5.51	6.37
55. AGRK-SLTL	+0.89	-4.41	5.62	3.59

การทำนายความเป็นพิษของเปปไทด์ด้วยโปรแกรม DEREK for Windows

เพื่อทำนายความเป็นพิษของชุดเปปไทด์จากการศึกษา Molecular docking ข้างต้น ต้องทำการเตรียมตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. วาดโครงสร้างทางเคมีของชุดเปปไทด์โดยอาศัย ISIS/Draw
2. เปิดไฟล์ ISIS/Draw ที่สร้างขึ้น (*.skc) หรือนำเข้า Molfiles (*.mol)
3. เปิด Derek for Windows Files (*.drk)
4. โครงสร้างที่จะทดสอบได้รับการทำนายผลพิษโดยตรวจสอบกับฐานข้อมูลของ Derek สามารถทำนายผลที่จะโครงสร้างหรือทำนายหลายโครงสร้างโดยใช้ AutoDerek (Molfiles (*.mol))

ผลการทดลอง

โปรแกรม DEREK for Windows ได้ทำนายความเป็นพิษของชุดเปปไทด์จากการศึกษา Molecular docking โดยทำนายความเป็นพิษที่อาจเกิดในมนุษย์ ในหนู ในสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมอื่นๆ นอกจากหนู ในหัวข้อต่างๆดังนี้ จากฐานข้อมูลพิษวิทยาของโปรแกรม Derek

การก่อมะเร็ง (Carcinogenicity)

Carcinogenicity

Photocarcinogenicity

การระคายเคือง (Irritation)

Irritation (of the eye and respiratory tract)

Irritation (of the eye)

Irritation (of the gastrointestinal tract)

Irritation (of the respiratory tract)

Irritation (of the skin and eye)

Irritation (of the skin, eye and respiratory)

Lachrymation

จุดยุติอื่น ๆ

alpha-2-mu-Globulin nephropathy

Anaphylaxis

Anticholinesterase activity

Bladder urothelial hyperplasia

Cerebral oedema

Chloracne
Cumulative effect on white cell count
และ immunology
Cyanide-type effects
Developmental toxicity
Hepatotoxicity
HERG channel inhibition
High acute toxicity
Methaemoglobinaemia
Neurotoxicity
Oestrogenicity
Peroxisome proliferation
Phospholipidosis
Phototoxicity
Pulmonary toxicity
Teratogenicity
Testicular toxicity
Uncoupler of oxidative phosphorylation

ความเป็นพิษต่อยีน (Genotoxicity)

Chromosome damage
Genotoxicity
Mutagenicity
Photo-induced chromosome damage
Photogenotoxicity
Photomutagenicity

การกระตุ้นระบบหายใจ (Respiratory Sensitisation)

Occupational asthma
Respiratory sensitisation

การกระตุ้นผิวหนัง (Skin Sensitisation)

Photoallergenicity

Skin sensitisation

ความเป็นพิษของต่อมไทรอยด์ (Thyroid Toxicity)

Thyroid toxicity

นิยามศัพท์ความไม่แน่นอน (Glossary of Uncertainty Terms) ที่ใช้ในการแปลผล

Certain	There is proof that the proposition is true.
Probable	There is at least one strong argument that the proposition is true and there are no arguments against it.
Plausible	The weight of evidence supports the proposition.
Equivocal	There is an equal weight of evidence for and against the proposition.
Doubted	The weight of evidence opposes the proposition.
Improbable	There is at least one strong argument that the proposition is false and there are no arguments that it is true.
Impossible	There is proof that the proposition is false.
Open	There is no evidence that supports or opposes the proposition.
Contradicted	There is proof that the proposition is both true and false.

เนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุลที่ใช้ทดสอบทั้งหมดเป็นเปปไทด์และสายสั้น เมื่อโปรแกรมทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลความเป็นพิษต่างๆที่มีอยู่กับโครงสร้าง ไม่พบว่าเปปไทด์ทั้งหมดให้ผลพิษอย่างไรก็ตาม อาจต้องทำการตรวจสอบกับฐานข้อมูล CCIS ต่อไปเพื่อยืนยัน

จากการศึกษาที่ผ่านมา ข้อมูลทั้ง docked energy และ binding geometries ที่ได้จากการทำ molecular docking ระหว่างสารทดสอบกับแบบจำลองของเอนไซม์สายเดี่ยวเชิงซ้อน NS2B(H)-NS3p ของเชื้อไวรัสเดงกี โดยใช้โปรแกรม AutoDock เสนอแนะว่าการจับกับเอนไซม์จะดีขึ้นเมื่อมี NS2B cofactor และการจับของเปปไทด์ที่ได้จากการตัดคล้ายกับการจับของซับสเตรตซึ่งสัมพันธ์กัน ในการศึกษาี้แสดงผลที่สอดคล้องกับการวิจัยที่ผ่านมาว่าเปปไทด์ที่ประกอบด้วย 6 อะมิโนแอซิดที่พัฒนามาจากขอบเขตด้าน P1-P6 ของตำแหน่งที่มีการตัดทั้ง 4 ตำแหน่ง มีความสามารถจะเป็นตัวยับยั้งได้ รวมถึงเปปไทด์ FAAGRK, EVKKQR, RTSKKR และ RTSKKR ยิ่งไปกว่านั้น เปปไทด์ที่ประกอบด้วย 5 อะมิโนแอซิดที่พัฒนามาจากขอบเขตด้าน P1-P5 รวมถึงเปปไทด์ AAGRK, VKKQR, TSKKR และ TSKKR ก็มีความสามารถที่จะเป็นตัวยับยั้งได้ด้วย สำหรับเปปไทด์ที่สายสั้นลง เช่น เปปไทด์ SKKR, GKR, GRR, KKR, GKR, KRR, RRR, KRK, RKR, RKK, KR, RK และ RR เปปไทด์เหล่านี้ก็มีความสามารถที่จะเป็นตัวยับยั้งได้เช่นเดียวกัน ในขณะที่เปปไทด์ AGRR มีความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งที่น้อยกว่า โปรแกรม Derek ที่ใช้สำหรับทำนายความเป็นพิษของเปปไทด์ที่ใช้ในการศึกษา Molecular docking แสดงถึงความเป็นพิษที่น้อยสำหรับเปปไทด์ทุกตัว โดยสรุป ผลการทดลองเหล่านี้สามารถนำมาใช้สำหรับการพัฒนาตัวยับยั้งที่มีความแรงต่อเอนไซม์โปรตีเอส NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี โดยการทำให้ combinatorial optimization ร่วมกับการออกแบบตัวยับยั้งประเภท peptidomimetic โดยอยู่บนพื้นฐานของตำแหน่งที่เกิดการตัดตามธรรมชาติของโปรตีนสายยาวเพื่อเพิ่มฤทธิ์และลดความเป็นพิษของตัวยับยั้ง

เอกสารอ้างอิง

1. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998; 352(9132): 971-977.
2. Dengue and dengue haemorrhagic fever. WHO fact sheet No. 117. 2002. 3. World Health Organization. Weekly epidemiological record. WHO Geneva 2002; 6(77): 41-48.
3. World Health Organization. Weekly epidemiological record. WHO Geneva 2002; 6(77): 41-48.
4. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in 21st century. *Trends Microbiol* 2002; 10(2): 100-103.
5. Gubler DJ. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(3): 480-496.
6. Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic fever. Centers for Disease Control and prevention. [updated 2002 Feb 13; cited 2004 June 9].
Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue>.
7. Lin, Y et al. Study of dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. *J Virol* 1999; 72(12): 9729-9730.
8. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L et al. *Flaviviridae*. *Intervirology* 1985; 24(4): 183-192.
9. Nimmannitya S. Dengue haemorrhagic fever with unusual clinical manifestations. *Asian J Trop Med Public Health* 1987; 18: 398-406.
10. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenic cascade. *Rev Infect Dis* 1989; 11 Suppl 4: S830-9.
11. Nelson ER, Bierman HR, Chulajata R. Hematologic phagocytosis in postmortem bone marrows of dengue haemorrhagic fever. (Hematologic phagocytosis in Thai hemorrhagic fever). *Am J Med Sci* 1966; 252(1): 68-74.
12. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BM, et.al., editors. *Field virology*. Lippincott-Raven Publishers, 1996: 961-1034.
13. Bhamarapravati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 2000; 18 Suppl 2: 44-47.
14. Kanesa-athan N, Sun W, Kim-Ahn G, Van Albert S, Putnak JR, King A, Raengsakulrach B, Christ-Schmidt H, Gilson K, Zahradnik JM, Vaughn I, Innis BL, Saluzzo J, Hoke CH Jr. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine* 2001; 19(23-24): 3179-3188.
15. Huang CY. Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 as a potential candidate type 1 virus vaccine. *J Virol* 2000; 74(7): 3020-3028.
16. Kochel T. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provide protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine* 2002; 18(27): 3166-3173.
17. Porter AG, Davidson EW, Liu JW. Mosquitocidal toxins of *Bacilli* and their genetic manipulation of effective biological control of mosquitoes. *Microbiol Rev* 1993; 57(4): 838-861.

18. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990; 44: 649-688.
19. Billoir F, de Chesse R, Tolou H, de Micco P, Gould EA, de Lamballerie X. Phylogeny of the genus *Flavivirus* using complete coding sequence of arthropod-borne viruses and viruses with no known vector. *J Gen Virol* 2000; 81(Pt 3): 781-790.
20. Irie K, Mohan PM, Sasaguri Y, Putnak R, Padmanabhan R. Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (Znew Guinea-C strain). *Gene* 1989; 75(2): 197-211.
21. Markoff L. In vitro processing of dengue virus structural proteins: cleavage of the pre-membrane protein. *J Virol* 1989; 63(8): 217-228.
22. Ruiz-Linares A, Cahour A, Despres P, Girard M, Bouloy M. Processing of yellow fever virus polyprotein: role of cellular proteases in maturation of the structural proteins *J Virol* 1989; 63(10): 4199-4209.
23. Cahour A, Falgout B, Lai CJ. Cleavage of the dengue virus polyprotein at the NS3/NS4A and NS4B/NS5 junctions is mediated by viral protease NS2B/NS3, whereas NS4A/NS4B may be processed by a cellular protease. *J Virol* 1992; 66(3): 1535-1542.
24. Falgout B, Chanock R, Lai CJ. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2A. *J Virol* 1989; 63(5): 1852-1860.
25. Hori H, Lai CJ. Cleavage of dengue virus NS1-NS2A requires an octapeptide sequence at the C terminus of NS1. *J Virol* 1990; 64(9): 4573-4577.
26. Falgout B, Markoff L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 1995; 69(11): 7232-7243.
27. Randolph VB, Winkler G, Stolar V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology* 1990; 174(2): 450-458.
28. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* 1991; 65(5): 2467-2475.
29. Arias CF, Preugschat F, Strauss JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* 1993; 193(2): 888-899.
30. Lin C, Amberg SM, Chambers TJ, Rice CM. Cleavage at the novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *J Virol* 1993; 67 (4): 2327-2335.
31. Lobigs M. Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(13): 6218-6222.
32. Teo KF, Wright PJ. Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. *J Gen Virol* 1997; 78(Pt 2): 337-341.

33. Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNAstimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol* 1999; 73(4): 3108-3116.
34. Wengler G, Wengler G. The NS3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology* 1993; 197(1): 265-273.
35. Warrener P, Tamura JK, Collett MS. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. *J Virol* 1993; 67(2): 989-996.
36. Cui T, Sugrue RJ, Xu Q, Lee AK, Chan YC, Fu J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPaseactivity regulated by the NS5 protein. *Virology* 1998; 246(2): 409-417.
37. Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusakawa J, Ebner KE, Padmanabhan R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem* 1995; 270(32): 19100-19106.
38. Bartholomeusz AI, Wright PJ. Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5. *Arch Virol* 1993;128(1-2): 111-121.
39. Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicases of flavi-and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(10): 3889-3897.
40. Bazan JF, Fletterick RJ. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 1989; 171(2): 637-639.
41. Chambers TJ, Weir RC, Grakoui A, McCourt DE, Bazan JF, Fletterick RJ et al. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavage in the viral poly protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(22): 8898-8902.
42. Preugschat F, Yao CW, Strauss JH. In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B and NS3. *J Virol* 1990; 64(9): 4367- 4374.
43. Wengler G, Czaya G, Färber PM, Hegemann JH. In vitro synthesis of West Nile virus protein indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. *J Gen Virol* 1991; 72(Pt 4): 851-858.
44. Falgout B, Miler RH, Lai CJ. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2BNS3 protease activity. *J Virol* 1993; 67(4): 2034-2042.
45. Clum S, Ebner KE, Padmanabhan R. Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. *J Biol Chem* 1997; 272(49): 30715-30723.
46. Brinkworth RI, Fairlie DP, Leung D Young PR. Homology model of the dengue 2 virus NS3 protease: putative interactions with both substrate and NS2B cofactor. *J Gen Virol* 1999; 80(Pt 5): 1167-1177.

47. Yusof R, Clum S, Wetzel M, Murthy HM, Padmanabhan R. Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro. *J Biol Chem* 2000; 275(14): 9963-9969.
48. Leung D, Schroder K, White H, Fang NX, Stoermer MJ, Abbenante G et al. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. *J Biol Chem* 2001; 276(49): 45762-45771.
49. Niyomrattanakit P, Winoyanu wattikun P, Chanprapaph S, Angsuthanasombat C, Panyim S, Katzenmeier G. Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation, *J Virol* 2004; 78(24): 13708-13716.
50. Murthy HM, Clum S, Padmanabhan R. Dengue virus NS3 serine protease. Crystal structure and insights into interaction of the active site with substrates by molecular modeling and structural analysis of mutational effects. *J Biol Chem* 1999; 274(9): 5573-5580.
51. Murthy HM, Judgen K, DeLucas L, Padmanabhan R. Crystal structure of Dengue virus NS3 protease in complex with a Bowman-Birk inhibitor: implication for flaviviral polyprotein processing and drug design. *J Mol Biol* 2000; 301(4): 759-767.
52. Lesk AM, Fordham WD. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J Mol Biol* 1996; 258(3): 501-537.
53. Love RA, Parge HE, Wickersham JA, Hostomsky Z, Habuka N, Moomaw EW et al. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 1996; 87(2): 331-342.
54. Walker B, Lynas JF. Strategies for the inhibition of serine proteases. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(4): 596-624.
55. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophysics Res Commun* 1967; 27(2): 157-162.
56. Khumthong R, Niyomrattanakit P, Chanprapaph S, Angsuthanasombat C, Panyim S, Katzenmeier G. Steady-state cleavage kinetics for dengue virus type 2 NS2B-NS3(pro) serine protease with synthetic peptides. *Prot Pept Letts* 2003; 10(1): 19-26.
57. Morris GM, Goodsell DS, Huey R, Hart WE, Halliday S, Belew R, Olson AJ. Autodock Version 3.0.3., The Scripps Research Institute, Molecular Graphics Laboratory, 1999.
58. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* 1998; 19: 639-1662.
59. Chanprapaph S, Saparpakorn P, Sangma C, Niyomrattanakit P, Hannongbua S, Angsuthanasombat C, Katzenmeier G. (2005) Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serine protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavage sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 20;330(4):1237-46.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. กำลังดำเนินการร่างผลงานเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Drug Discovery and Therapeutics เมื่อได้รับการ accept แล้วจะแจ้งสกว. ทราบต่อไป
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือกับมหาวิทยาลัยมหิดล (สถาบันอนุพันธุและวิศวกรรมศาสตร์ และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์)
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอนในหลักสูตรมหาบัณฑิตและดุษฎีบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยาและพิษวิทยาเพื่อผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่)