PDF4180015 ผศ.ดร. พรเทพ สมพรพิสุทธิ์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการออกแบบยาตามโครงสร้างสำหรับสารต้านโรคมาลาเรียในฐานะสารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส

โดย นายพรเทพ สมพรพิสุทธิ์ และคณะ

สิงหาคม 2546

สัญญาเลขที่ PDF/15/2541

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการออกแบบยาตามโครงสร้างสำหรับสารต้านโรคมาลาเรียในฐานะสารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นายพรเทพ สมพรพิสุทธิ์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. นายธีรยุทธ วิไลวัลย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. นายยอดหทัย เทพธรานนท์	มหาวิทยาลัยมหิดล
4. นายวรชาติ ศิรวราภรณ์	มหาวิทยาลัยมหิดล
5. นายยงยุทธ ยุทธวงศ์	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
6. นางสาวบงกช ธารชมพู	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
7. นางสาวสุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการวิจัยหลังปริญญาเอก

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ดำเนินโครงการขอขอบคุณทีมนักวิจัยจากภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาเคมีและภาควิชาชีวเคมีจากมหาวิทยาลัยมหิดล และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ที่ให้คำแนะนำที่มีคุณค่าต่อการดำเนินโครงการมาโดยตลอด ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์พันธุฯ สวทช ที่ได้ให้การสนับสนุนอุปกรณ์คอมพิวเตอร์และซอฟท์แวร์ทางด้านการออกแบบโมเลกุล และความช่วยเหลือทางด้านเทคนิค

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ผู้ดำเนินโครงการจึงขอน้อมรำลึกและขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

รหัสโครงการ : PDF/15/2541

ชื่อโครงการ : การออกแบบยาตามโครงสร้างสำหรับสารต้านโรคมาลาเรียในฐานะสารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส

ชื่อนักวิจัย : พรเทพ สมพรพิสุทธิ์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail Address: pornthep.S@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: กรกฎาคม 2541 – ตุลาคม 2542 และ ตุลาคม 2545 - กรกฎาคม 2546

ความเข้าใจอย่างลึกซึ้งในระดับโครงสร้างของโมเลกุลจะช่วยในการออกแบบโมเลกุลของยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมาลาเรีย โดยเฉพาะยาในกลุ่มสารต้านโฟเลตซึ่งกำลังประสพภาวะการดื้อยาเนื่องจากเอนไซม์จากเชื้อมาลาเรียเกิดการกลายพันธุ์

งานวิจัยนี้เสนอผลของการออกแบบโมเลกุลในกลุ่มของสารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสจากเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม โดยใช้เทคนิคการออกแบบยาตามโครงสร้างของเอนไซม์เป้าหมาย โครงสร้างของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสของเชื้อมาลาเรียสร้างขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการเทียบลำดับกรดอะมิโน โดยนำเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสจากสปีชีส์อื่นๆ ที่ทราบโครงสร้างรังสีเอ็กซ์มาเป็นแม่แบบ จากนั้นจึงสร้างโครงสร้างโมเลกุลของไพริเมธามีน และ ไซโคลกวานิลซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ของเชื้อมาลาเรีย และออกแบบให้ยาเข้าไปจับยึดกับเอนไซม์ตามข้อมูลรังสีเอ็กซ์ของเอนไซม์กับยาหรือเอนไซม์กับซับสเตรท ทำการจำลองระบบให้โมเลกุลเอนไซม์อยู่ในสภาวะสารละลายโดยการคำนวณด้วยวิธีพลวัติระดับโมเลกุล เพื่อศึกษาโครงสร้าง สมบัติทางพลวัติ และความเสถียรที่เกี่ยวกับอันตรกิริยาระหว่างยากับเอนไซม์ จากนั้นจึงออกแบบอนุพันธ์ของสารยับยั้งโดยใช้การวิเคราะห์อันตรกิริยาที่น่าจะเป็นไปได้กับกรดอะมิโนต่างๆ ที่อยู่ในบริเวณจับยึดของเอนไซม์ ในกระบวนการการคัดกรอง อนุพันธ์ที่ได้ออกแบบไว้จะถูกคัดออกจากกลุ่มถ้ามีคะแนนอันตรกิริยาต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดหรือเหมือนกับอนุพันธ์ที่ออกแบบโดยใช้เอนไซม์จากคน

โครงสร้างของเอนไซม์จากเชื้อมาลาเรียทำให้เข้าใจในระดับโมเลกุลถึงลักษณะการจับยึดที่สำคัญของยาต่อเอนไซม์ สามารถอธิบายสาเหตุของการดื้อยาของเอนไซม์กลายพันธ์บางชนิดได้ เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่ค้นพบไม่นานมานี้จากเทคนิครังสีเอ็กซ์พบว่าโครงสร้างทั้งสองคล้ายคลึงกัน ผลการสืบค้นหมู่แทนที่ปรากฏว่าได้อนุพันธ์ของสารยับยั้งจำนวน 7 อนุพันธ์ ในจำนวนนี้มีเพียง 1 อนุพันธ์คือหมู่เฟนิลโพรพิลที่สามารถทดสอบได้ และพบว่าค่าคงที่ของการยับยั้งของอนุพันธ์นี้ต่อเอนไซม์ชนิดไวด์ไทปใกล้เคียงกับค่าคงที่ของการยับยั้งของไพริเมทามีน การออกแบบสารยับยั้งโดยใช้โครงสร้างรังสีเอ็กซ์กำลังดำเนินการศึกษาและวิจัยในลำดับถัดไป

คำหลัก: การออกแบบยาตามโครงสร้าง, มาลาเรีย, ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส, พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม

Project Code :	PDF/15/2541
Project Title :	structure-based drug design for the antimalarial leads as dihydrofolate reductase inhibitors
Investigator :	Pornthep Sompornpisut
	Faculty of Science, Chulalongkorn University
E-mail Address :	pornthep.S@chula.ac.th
Project Period :	July 1998 – October 1999 and October 2002 - July 2003

Understanding the structural basis of protein-ligand complex will help to design an efficient drug against malaria disease. Particularly, the resistance to antifolate drugs is due to the mutation of the malarial enzyme.

This research presents the results of designing inhibitors for malarial dihydrofolate reductase from *Plasmodium falciparum* (PfDHFR) by means of structure-based drug design. The three-dimension structure of PfDHFR was constructed using sequence alignment and x-ray structures of dihydrofolate reductase from other species as the structural template. Structures of the malaria inhibitors, pyrimethamine (PYR) and cycloguanil (CYC), were built and then docked into the PfDHFR's binding site by adopting similar orientation to the DHFR's substrate or the inhibitors from x-ray structural data of the DHFR complexes. Molecular dynamics calculation was performed to simulate the enzyme in solution and to study the structure, dynamics, and the stability of the enzyme-drug interactions. On the basis of identifying possible interactions with amino acids in the enzyme binding sites, PYR's and CYC's derivatives were designed. In the screening process, an inhibitor will be eliminated from the designed list if the interacting score is below the cutoff or the derivative is as same as that designed from Human DHFR.

The homology model of PfDHFR provided an insight into the molecular basis of drug binding to the enzyme. The model can be used to describe the cause of drug resistance to some PfDHFR mutants. A comparison between the model and recent x-ray data of PfDHFR showed that both structures were considerably similar. Fragment-search analysis gave a total of seven derivatives, of which only one, phenylpropyl substituent, can be experimentally examined. The inhibition constant of this derivative complexed to the wildtype enzyme was similar to that of pyrimethamine. Inhibitor design using the x-ray data of PfDHFR is currently in progress.

Keywords: structure-based drug design, malaria, dihydrofolate reductase, *Plasmodium falciparum*

หน้าสรุปโครงการ

(Executive Summary)

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การออกแบบยาตามโครงสร้างสำหรับสารต้านโรคมาลาเรียในฐานะสารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส

(ภาษาอังกฤษ) Structure-based drug design for the antimalarial leads as dihydrofolate reductase inhibitors

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ นายพรเทพ สมพรพิสุทธิ์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท
เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-7604

โทรสาร 02-2187598

E-mail: pornthep.S@chula.ac.th

3. สาขาที่ทำการวิจัย Structure-Based Drug Design, Computational Chemistry

4. งบประมาณทั้งโครงการ 400,000 บาท

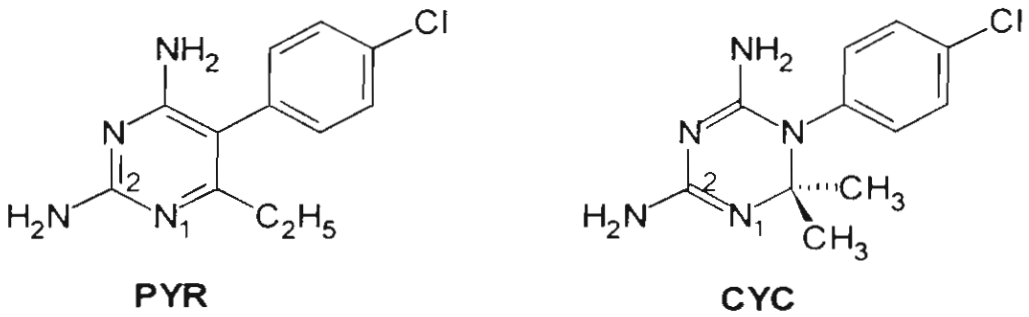
5. ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

6. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

โรคมาลาเรียเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญประการหนึ่งของประชากรโลกในเขตร้อนชื้น ซึ่งรวมถึงประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โรคมาลาเรียเกิดจากเชื้อปรสิตเซลล์เดียวในสกุลพลาสโมเดียม (Plasmodium) ซึ่งเข้าสู่มนุษย์ได้โดยมียุงก้นปล่อง (Anopheles mosquito) เป็นพาหะของโรค การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคมาลาเรียในคนโดยส่วนใหญ่นั้นมุ่งศึกษาเชื้อมาลาเรียจากพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงของโรคมากที่สุดถึงขั้นเสียชีวิต และยังเกี่ยวข้องกับการเกิดอาการแทรกซ้อนอื่นๆ อีกหลายชนิด อีกทั้งมีแนวโน้มว่าเชื้อดังกล่าวมีการเพิ่มจำนวนและขยายออกไปอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *P falciparum* สามารถดื้อต่อยาได้อย่างรวดเร็ว และการใช้ยาผสมก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ทำให้การเยียวยารักษาในปัจจุบันทำได้ยากยิ่งขึ้นเรื่อยๆ

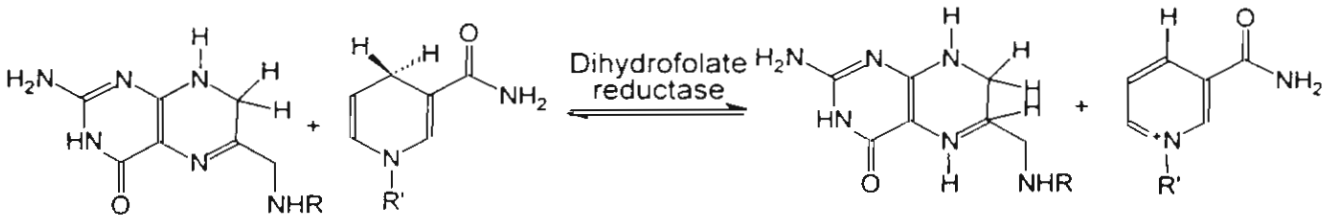
การศึกษาเพื่อให้เข้าใจวิถีการดำรงชีวิตของเชื้อมาลาเรียเป็นการศึกษาที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการหาวิธีการรักษาและการป้องกัน วัตถุประสงค์ประการหนึ่งของงานวิจัยเหล่านี้คือเพื่อพัฒนายาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส (DHFR) ในเชื้อมาลาเรียเป็นเอนไซม์เป้าหมายอันหนึ่งของยารักษาโรคมาลาเรีย ยาจำพวกนี้ได้แก่ ไพรีเมทามีน (Pyrimethamine, PYR) หรือ ไซโคลกวานิล (Cycloguanil, CYC)

(รูปที่ 1) ซึ่งยาเหล่านี้จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ซึ่งเป็นปฏิกิริยารีดักชันของสารประเภทโฟเลต (รูปที่ 2) ในเชื้อมาลาเรีย



PYR **CYC**

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ Pyrimethamine (PYR) **และ** Cycloguanil (CYC)



Dihydrofolate, DHF Tetrahydrofolate, THF

รูปที่ 2 ปฏิกริยารีดักชันของ DHF **โดยมี** Dihydrofolate reductase **และ** NADPH **เป็นเอนไซม์ และ** Co-factor **ตามลำดับ**

ในปัจจุบันการออกแบบโมเลกุลโดยอาศัยเทคนิคการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์มีบทบาทอย่างมากในกระบวนการพัฒนายา ตัวอย่างวิธีการที่สำคัญในการนำคอมพิวเตอร์มาประยุกต์งานดังกล่าว ได้แก่ วิธี Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR และ วิธี Structure-Based Drug Design สำหรับวิธี QSAR เป็นวิธีที่สามารถคำนวณฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้ง โดยใช้วิธีทางสถิติสร้างสมการเชิงเส้นหลายตัวแปร ซึ่งในการสร้างสมการจะต้องมีชุดข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพจากกลุ่มอนุพันธ์ของสารยับยั้งที่สนใจเสียก่อน แล้วสร้างแบบความสัมพันธ์กับสมบัติทางโครงสร้างของอนุพันธ์สารยับยั้งเหล่านั้นที่คำนวณทางทฤษฎี ข้อบกพร่องที่สำคัญของวิธีนี้ คือ ประการแรก จะต้องมีชุดข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นจำนวนที่มากพอที่จะใช้ในการสร้างสมการ และประการที่สอง การทำนายฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค QSAR จะอยู่บนพื้นฐานของชุดข้อมูลของสารยับยั้งเพียงด้านเดียวแต่จะขาดข้อมูลของโมเลกุลเป้าหมายของสารยับยั้ง ถึงแม้เทคนิค QSAR จะพยายามปรับปรุงโดยใช้ Probe Atoms แทนอะตอมของโมเลกุลเป้าหมายที่สารยับยั้งจะเข้าไปจับยึด อย่างไรก็ดี การใช้ Probe ยังทำได้เพียงบางส่วน และยังห่างจากภาพความเป็นจริงอยู่

วิธี Structure-Based Drug Design ใช้ในการออกแบบยาหรือสารยับยั้งโดยอาศัยความเหมาะสมทางโครงสร้าง เช่น รูปร่าง ขนาด และอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลเป้าหมายกับสารยับยั้ง วิธีนี้อาศัยข้อมูลคือโครงสร้างสามมิติของโมเลกุลเป้าหมายเป็นหลัก การออกแบบจะทำได้โดยการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่อยู่ภายในบริเวณที่กำหนด เช่น Binding Site ว่าชอบที่จะสร้างอันตรกิริยาแบบใด เช่น Sidechain ของ Aspartic ชอบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนโดยทำหน้าที่เป็น Hydrogen Acceptor หรือ Sidechain ของ Tryptophan ชอบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิค เป็นต้น การออกแบบโมเลกุลสารยับยั้งด้วยวิธีนี้จะพิจารณาทั้งสารยับยั้งและโมเลกุลเป้าหมายซึ่งมีความสมจริงมากขึ้น แต่ข้อเสียก็คือ ต้องทราบโครงสร้างสามมิติของโมเลกุลเป้าหมายเสียก่อน อย่างไรก็ดี ปัจจุบันข้อมูลโครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของโปรตีนมีมากขึ้นหรือเทคนิคการจำลองโครงสร้างด้วยวิธี Homology Modeling สามารถสร้างโครงสร้างที่ให้ผลที่น่าเชื่อได้ในระดับหนึ่งดังนั้น วิธี Structure-Based Drug Design จึงเป็นเทคนิคที่ใช้ในกระบวนการออกแบบยาที่น่าสนใจอีกเทคนิคหนึ่ง

7. วัตถุประสงค์

7.1 ใช้วิธี Structure-Based Drug Design ออกแบบโมเลกุลในกลุ่มของสารยับยั้งโฟเลตเพื่อเป็นแนวทางต่อการสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส จาก *P. falciparum*

7.2 เพื่อสร้างระบบของกระบวนการวิจัยด้วยวิธีดังกล่าว เพื่อพัฒนาเป็นองค์ความรู้เชิงวิชาการต่อไป

7.3 สร้างกลุ่มนักวิจัยที่สนใจเกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้างของชีวโมเลกุลด้วยวิธีการออกแบบเชิงโมเลกุลในประเทศไทย

8. ระเบียบวิธีวิจัย

โครงสร้างของ PfDHFR สร้างขึ้นโดยอาศัยเทคนิค Homology Modeling โดยนำเอนไซม์ DHFR จาก *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, human, chicken liver และ *Pneumocystic carinii* ซึ่งทราบโครงสร้างรังสีเอ็กซ์มาเป็นแม่แบบ จากนั้นจึงสร้างโครงสร้างโมเลกุลของสารยับยั้ง PYR และ CYC และออกแบบให้ยาเข้าไปจับยึดกับเอนไซม์โดยใช้ข้อมูลรังสีเอ็กซ์ของเอนไซม์กับยาหรือซับสเตรทที่นำมาเป็นแม่แบบ ทำการจำลองระบบให้โมเลกุลเอนไซม์อยู่ในสภาวะสารละลายโดยการคำนวณด้วยวิธีพลวัติระดับโมเลกุล (Molecular Dynamics) เพื่อศึกษาโครงสร้าง สมบัติทางพลวัติและความเสถียรที่เกี่ยวข้องกับอันตรกิริยาระหว่างยากับเอนไซม์

จากนั้นจึงออกแบบอนุพันธ์ของสารยับยั้งจากข้อมูลทางโครงสร้างของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่น่าจะเป็นไปได้ของกรดอะมิโนต่างๆ ที่อยู่ในบริเวณจับยึดของเอนไซม์เสียก่อน แล้วจึงทำการสืบค้นหา Fragment หรือหมู่แทนที่ที่เหมาะสมกับอันตรกิริยาที่ได้วิเคราะห์ไว้ อีกทั้งพิจารณาความเหมาะสมของรูปร่างและ Surface area ของ Fragment เพื่อป้องกันไม่ให้เกิด Steric Conflict กับอะตอมต่างๆของเอนไซม์ด้วย ตำแหน่งของสารยับยั้งที่จะมีการแทนที่เพื่อสร้างอนุพันธ์ ได้แก่ ตำแหน่งหมู่เอธิล (-

CH_2CH_3) ของ PYR หรือ dimethyl carbon ของ CYC *m*-H และ *p*-Cl ใน p-chlorophenyl ของทั้ง PYR และ CYC (รูปที่ 1) อนุพันธ์ที่สืบค้นได้จะผ่านกระบวนการคัดกรอง โดยมีเงื่อนไขในการคัดกรองว่าอนุพันธ์ที่ได้จะถูกคัดออกจากกลุ่มถ้ามีคะแนนอันตรกิริยาต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดหรือเหมือนกับอนุพันธ์ที่ออกแบบโดยใช้เอนไซม์ DHFR จากคน

9. ผลการวิจัยและบทวิจารณ์

ผลจาก Sequence Alignment พบว่า Primary Sequence ของ PfDHFR มี 2 ช่วงที่ไม่สามารถเทียบเคียงกับ Primary Sequence ของ DHFR อื่นๆ ได้ ช่วงดังกล่าว คือ 22-38 และ 64-98 อย่างไรก็ตาม Overall Folding ของ PfDHFR ถือว่าคล้ายคลึงกับ DHFR อื่นๆ เมื่อพิจารณาการวางตัวของโมเลกุลของ CYC และ PYR ในบริเวณจับยึดของ PfDHFR พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน โดยที่ HN ของ 2-amino group และ Protonated Hydrogen ที่ตำแหน่ง N1 ของ PYR และ CYC อยู่ในตำแหน่งที่สามารถเกิด Hydrogen Bonding กับหมู่ carboxylate ของ Sidechain Asp54 ของ PfDHFR ในลักษณะ Bidentate Hydrogen Bonding อันตรกิริยา Hydrogen Bonding อื่นๆ ที่สามารถระบุได้ว่าโครงสร้าง PfDHFR คือ ระหว่าง HN ของ 4-amino group ของ PYR และ CYC กับ Backbone Oxygen ของ Ile14 และ Ile164 ซึ่งอันตรกิริยาประเภทมีลักษณะคล้ายกับ Methotrexate ซึ่งเป็น Antifolate กับ *L casei* DHFR นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณจับยึดของยานี้จะเป็นบริเวณเดียวกับ Active site ซึ่งเป็นบริเวณที่ซับสเตรทจะเข้ามาจับกับเอนไซม์และเกิดปฏิกิริยา

คำถามที่น่าสนใจในงานวิจัยนี้อีกคำถามหนึ่ง คือ โครงสร้างสามารถอธิบายประเด็นเรื่อง Mutation ของเอ็นไซม์มีอิทธิพลต่อการจับยึดของยาหรือไม่อย่างไร ตำแหน่งของ Residue ที่เกิด Mutation ในโครงสร้างของ PfDHFR ซึ่งได้แก่ Ala16, Asn51, Cys59, Ser108 และ Ile164 พบว่าอยู่ไม่ห่างจาก CYC และ PYR (< 5 Å) จึงเป็นไปได้อย่างยิ่งว่ากรดอะมิโนเหล่านี้น่าจะมีอันตรกิริยาบางอย่างกับยาทั้งสอง หรือการเกิด Mutation ของกรดอะมิโนตำแหน่งเหล่านี้น่าจะเกี่ยวข้องกับยาทั้งสอง ตำแหน่งกรดอะมิโนที่สามารถวิเคราะห์จากโครงสร้าง PfDHFR ได้ชัดเจนที่สุดถึงอิทธิพล Mutation ต่อการจับยึดของยา ได้แก่ ตำแหน่ง Ala16 และ Ser108 กล่าวคือ Sidechain ของ Ala16 เกิด Contact ได้พอดีกับทางด้านใดด้านหนึ่งของ 2,2-dimethyl group ของ CYC ซึ่ง Mutation จาก Ala16 เป็น Val16 จะทำให้เกิด Steric Conflict ขึ้นที่บริเวณดังกล่าว ส่งผลให้ CYC จับกับเอนไซม์ที่เป็น A16V ได้ไม่ดีนัก ซึ่งอันตรกิริยาแบบนี้ไม่น่าจะเกิดขึ้นกับ Pyrimethamine เพราะที่บริเวณ Ethyl group ของ PYR นั้น ในวง Pyrimidine จะแบนราบกว่า การ Contact จึงน้อยกว่า การเกิด Mutation จาก Ala16 เป็น Val16 จึงไม่ได้รับผลกระทบเท่าใดนัก จากการศึกษาด้วยวิธี Molecular Dynamics และผลการทดลองพบว่าสอดคล้องกัน (Rastelli 2000) และสนับสนุนรายงานที่ระบุว่า Mutant ชนิด A16V จะดื้อต่อ CYC แต่ยังใช้ได้กับ PYR

สำหรับ Ser108 ซึ่งอยู่ใกล้กับหมู่ *p*-chlorophenyl substituent ของ CYC และของ PYR เมื่อพิจารณา Mutation จาก Ser108 เป็น Asn108 ขนาดของ Binding Pocket น่าจะเล็กลง และการที่โครงสร้างโมเลกุลของ CYC และ PYR ค่อนข้าง Rigid การปรับโมเลกุลทำได้ยาก จึงส่งผลต่อการจับยึดของยา ดังนั้น จากรายงานการทดสอบค่า K_i ของอนุพันธ์ของสารยับยั้งโฟเลตที่มีความยืดหยุ่นกว่า เช่น กลุ่ม Trimethoprim และ WR99210 พบว่าสามารถเพิ่มระดับความสามารถในการยับยั้ง Mutant ในกลุ่ม S108N ได้ดีกว่า CYC และ PYR (Rastelli 2000; Tarnchompoo 2002; Yuvaniyama 2003)

ผลการสืบค้นหมู่แทนที่ปรากฏว่าได้อนุพันธ์ของสารยับยั้งจำนวน 7 อนุพันธ์ ในจำนวนนี้มีเพียง 1 อนุพันธ์คือหมู่เฟนิลโพรพิลที่สามารถทดสอบได้ และพบว่าค่าคงที่ของการยับยั้งของอนุพันธ์นี้ต่อเอนไซม์ชนิดไวด์ไทปใกล้เคียงกับค่าคงที่ของการยับยั้งของไพริเมทามีน

โครงสร้างของเอนไซม์จากเชื้อมาลาเรียทำให้เข้าใจในระดับโมเลกุลถึงลักษณะการจับยึดที่สำคัญของยากับเอนไซม์ สามารถอธิบายสาเหตุของการดื้อยาของเอนไซม์กลายพันธ์บางชนิดได้ เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่ค้นพบไม่นานมานี้จากเทคนิครังสีเอ็กซ์พบว่าโครงสร้างทั้งสองคล้ายคลึงกัน

การออกแบบโมเลกุลของยาด้วยเทคนิค Structure-Based Drug Design สามารถแสดงผลได้อย่างรวดเร็วและการทำนายให้ผลเป็นที่น่าพอใจ แม้ว่า โครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมายซึ่งเป็นข้อมูลหลักในการออกแบบจะเป็น Homology Model ซึ่งปัจจุบันเราทราบโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่ได้จากเทคนิครังสีเอ็กซ์ ดังนั้นการออกแบบสารยับยั้งโดยใช้โครงสร้างรังสีเอ็กซ์จึงเป็นแนวทางการวิจัยในลำดับถัดไป

10. สรุป

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคการออกแบบโมเลกุลของยารักษาโรคมาลาเรียโดยอาศัยข้อมูลโครงสร้างสามมิติของโมเลกุลเป้าหมาย โดยเลือก เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส จาก *Plasmodium falciparum* อาศัยเทคนิค Comparative Structural Modeling เพื่อสร้างโครงสร้างของเอนไซม์ แล้วจึงออกแบบโมเลกุลโดยวิธีการสืบค้น Fragment ที่มีอันตรกิริยาที่เหมาะสม โครงสร้างของเอนไซม์ทำให้เข้าใจอย่างลึกซึ้งถึงลักษณะการจับยึดที่สำคัญของยากับเอนไซม์ สามารถอธิบายสาเหตุของการดื้อยาของเอนไซม์กลายพันธ์บางชนิดได้ และผลจากการสืบค้นและคัดกรองทำให้ได้อนุพันธ์ของ Pyrimethamine จำนวน 7 ชนิด และในจำนวนนี้ 1 ชนิดได้ทำการทดสอบซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับ Pyrimethamine ที่ทดสอบกับ PfDHFR ชนิดไวด์ไทป์

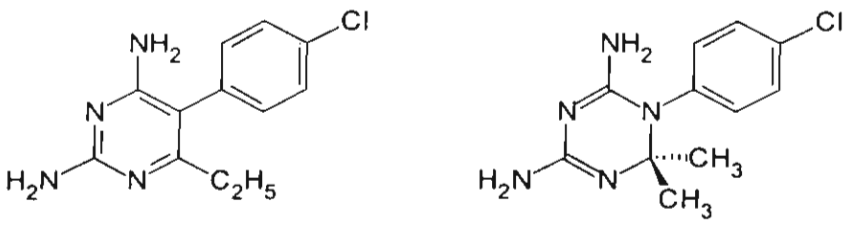
เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

โรคมาลาเรียเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญประการหนึ่งของประชากรโลกในเขตร้อนชื้น ซึ่งรวมถึงประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โรคมาลาเรียเกิดจากเชื้อปรสิตเซลล์เดียวในสกุลพลาสโมเดียม (Plasmodium) ซึ่งเข้าสู่มนุษย์ได้โดยมียุงก้นปล่อง (Anopheles mosquito) เป็นพาหะของโรค เชื้อมาลาเรียมีหลายสายพันธุ์ แต่การศึกษาวิจัยโรคมาลาเรียที่เกิดขึ้นกับมนุษย์ส่วนใหญ่จะมุ่งศึกษาเชื้อมาลาเรียกตระกูลพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) เนื่องจากเป็นเชื้อที่ทำให้มีอาการของโรครุนแรงมากถึงขั้นเสียชีวิต และยังเกี่ยวข้องกับการเกิดอาการแทรกซ้อนอื่นๆ อีกหลายชนิด

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มียาหลายชนิดที่ใช้รักษาโรคมาลาเรีย เช่น อาร์ทีมิซินิน (Artemisinin) หรือชิงเฮาซู ควินิน ยาซัลฟา และยาในกลุ่มสารต้านการสร้างโฟเลต (antifolates) เป็นต้น ซึ่งสามารถจัดหมวดหมู่ของยาตามชนิดของเป้าหมายที่ยาจะไปออกฤทธิ์ อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญที่พบในการรักษาโรคมาลาเรีย คือ เชื้อมาลาเรียดื้อยา ทำให้การรักษาไม่ได้ผล และโชคร้ายไปกว่านั้น ก็คือ โรคมาลาเรียระบาดในประเทศที่ยากจน ปัญหาจึงไม่ค่อยได้รับความสนใจจากบริษัทยา หรือองค์กรที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนายาซึ่งส่วนใหญ่จะให้ความสำคัญกับโรคที่เกิดในประเทศที่ร่ำรวย ดังนั้นการพัฒนายาต่อสู้กับเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาจึงดำเนินไปอย่างช้าๆ อย่างไรก็ดี ยังมีหลายองค์กรที่สนับสนุนการวิจัยเพื่อพัฒนายารักษาโรคมาลาเรีย เช่น องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO)

สำหรับงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษายาที่อยู่ในกลุ่มสารต้านการสร้างโฟเลต (antifolates) ซึ่งได้แก่ ไพริเมทามีน (Pyrimethamine, PYR) และ ไซโคลกวานิล (Cycloguanil, CYC) (รูปที่ 1) PYR และ CYC มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ มีส่วนที่เป็น diamino groups ในวง Pyrimidine สำหรับ PYR หรือ Triazine สำหรับ CYC ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารต้านการสร้างโฟเลต นอกจากนี้สารทั้งสองยังมีหมู่ *p*-chlorophenyl เหมือนกัน ส่วนที่แตกต่างกันชัดเจนที่สุดคือ PYR จะมีหมู่ $-C_2H_5$ ในขณะที่ตำแหน่งดังกล่าวใน CYC จะเป็น Dimethyl group เนื่องจากในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีรายงานระบุว่าเชื้อมาลาเรียดื้อต่อยาทั้งสองชนิด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาและพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

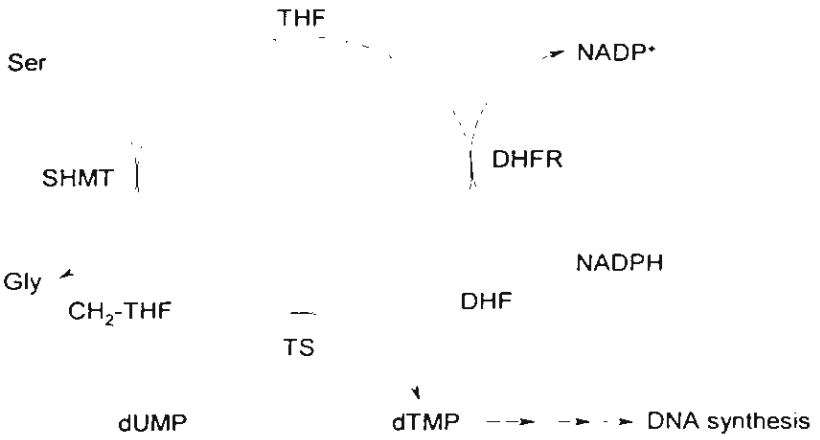


PYR **CYC**

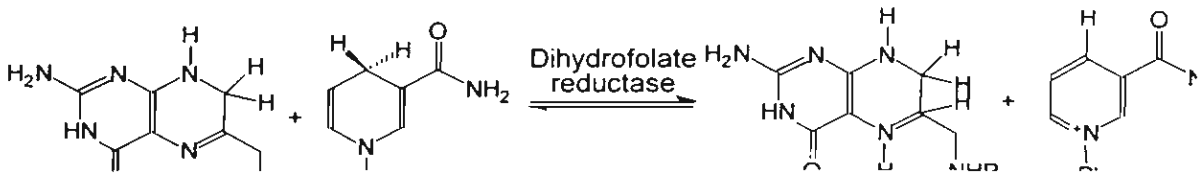
รูปที่ 1 Pyrimethamine (PYR) และ Cycloguanil (CYC)

การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไพริเมทามีนและไซโคลกวานิลต่อเชื้อมาลาเรีย อาศัยหลักการการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดหนึ่ง ชื่อ **เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส** (Dihydrofolate Reductase) หรือ DHFR เอนไซม์ DHFR นี้มีความสำคัญในกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิกบางชนิดซึ่งมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย (รูปที่ 2) โดยเอนไซม์ DHFR จะช่วยในการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนจากโฟเลต หรือไดไฮโดรโฟเลต (DHF) ให้เป็นเตตระไฮโดรโฟเลต (THF) โดยมีโคเอนไซม์ NADPH ช่วยในการเกิดปฏิกิริยา (รูปที่ 2B) จากนั้น THF จะถูกเปลี่ยนให้เป็น Methylene-THF โดยมีเอนไซม์ Serine Hydroxymethyl Transferase (SHMT) และกรดอะมิโน Serine เกี่ยวข้องในการเกิดปฏิกิริยา และจากนั้น Methylene-THF จะถูกเปลี่ยนกลับให้เป็น DHF อีกครั้งหนึ่งด้วยเอนไซม์ Thymidylate Syntase ซึ่งการเกิดปฏิกิริยานี้ dUMP จะถูกเปลี่ยนไปเป็น dTMP ซึ่งเป็นสารที่สำคัญในการสังเคราะห์ DNA

A



B



รูปที่ 2 วงจรการสร้างกรดนิวคลีอิกบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ DHFR

จากข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น ลำดับกรดอะมิโน การทำงาน การกลายพันธุ์ เป็นต้น เอนไซม์ *Plasmodium falciparum* DHFR (PfDHFR) ประกอบกรดอะมิโนจำนวน 231 กรดอะมิโน และอยู่ร่วมกับเอนไซม์ Thymidylate Synthase (PfTS) เรียกว่า Bifunctional enzyme ในลักษณะที่

โมเลกุลของ PfDHFR จะติดอยู่กับโมเลกุลของ PfTS โดยมีสายโพลีเปปไทด์เชื่อมต่อระหว่างสายโปรตีนทั้งสอง และโปรตีนจะอยู่สภาพ Dimer สาเหตุสำคัญที่เชื้อมาลาเรียดื้อต่อยา PYR และ CYC คือ การกลายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งในที่นี้จะหมายถึงการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในสายโปรตีน PfDHFR ในบางตำแหน่ง PfDHFR ที่กลายพันธุ์มีหลายชนิด แต่ที่พบในห้องปฏิบัติการและพบบ่อยในประเทศไทยจะมีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง Ala16, Asn51, Cys59, Ser108 และ Ile64 PfDHFR ที่กลายพันธุ์แต่ละชนิดมีระดับการดื้อยา PYR และ CYC ที่แตกต่างกัน บางชนิดระดับการดื้อยาสูงมากอย่างน่าเป็นห่วง

การออกแบบโมเลกุลของยาด้วยวิธีทางเคมีคอมพิวเตอร์กำลังมีบทบาทอย่างยิ่งในกระบวนการการพัฒนายา การคำนวณด้วยทฤษฎีควอนตัม กลศาสตร์เชิงโมเลกุล พลวัติเชิงโมเลกุลของระบบ ต้องอาศัยคอมพิวเตอร์ เพื่อประเมินการอันตรกิริยาของยากับโปรตีน และทำนายประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยา ซึ่งจะช่วยจำกัดขอบเขตการทดลอง ลดต้นทุน ลดมลพิษของเสียที่เกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการ ประหยัดทรัพยากรและเวลา ปัจจุบันเทคนิคการออกแบบโมเลกุลยาทางเคมีคอมพิวเตอร์สามารถแบ่งออกเป็น 2 แนววิธี คือ การออกแบบยาโดยอาศัยเทคนิคแสดงความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของยา หรือ QSAR (Quantitative-Structure Activity Relationship) และ การออกแบบตามโครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมายที่ยาจะไปออกฤทธิ์ หรือ Structure-Based Drug Design วิธี QSAR เป็นวิธีที่สามารถคำนวณฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้ง โดยอาศัยการสร้างสมการเชิงเส้นหลายตัวแปร ซึ่งในการสร้างสมการจะต้องมีชุดข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพจากกลุ่มอนุพันธ์ของสารยับยั้งที่สนใจเสียก่อน แล้วสร้างแบบความสัมพันธ์กับสมบัติทางโครงสร้างของอนุพันธ์สารยับยั้งเหล่านั้นที่คำนวณทางเคมีทฤษฎี ข้อบกพร่องที่สำคัญของวิธีนี้ คือ ประการแรก จะต้องมีชุดข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นจำนวนที่มากพอ และประการที่สอง การทำนายฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค QSAR จะอยู่บนพื้นฐานของชุดข้อมูลของสารยับยั้งเพียงด้านเดียวแต่จะขาดข้อมูลของโมเลกุลเป้าหมายของสารยับยั้ง หรือ แม้เทคนิค QSAR จะพยายามปรับปรุงโดยใช้ Probe Atoms แทนอะตอมของโมเลกุลเป้าหมายที่สารยับยั้งจะเข้าไปจับยึด อย่างไรก็ดี การใช้ Probe ยังทำได้เพียงบางส่วนและยังห่างจากภาพความเป็นจริงอยู่

วิธี Structure-Based Drug Design ใช้ในการออกแบบยาหรือสารยับยั้งโดยอาศัยความเหมาะสมทางโครงสร้าง เช่น รูปร่างและขนาด และอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลเป้าหมายและสารยับยั้ง วิธีต้องอาศัยข้อมูลคือโครงสร้างสามมิติของโมเลกุลเป้าหมายเป็นหลัก การออกแบบจะทำได้โดยการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่อยู่ภายในบริเวณที่กำหนด เช่น Binding Site ว่าชอบที่จะสร้างอันตรกิริยาแบบใด เช่น Sidechain ของ Aspartic ชอบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนโดยทำหน้าที่เป็น Hydrogen Acceptor เป็นต้น การออกแบบโมเลกุลสารยับยั้งด้วยวิธีนี้จะให้ผลที่น่าเชื่อถือมากกว่า แต่ข้อเสียก็คือ ต้องทราบโครงสร้างสามมิติของโมเลกุลเป้าหมายเสียก่อน อย่างไรก็ดี ปัจจุบันข้อมูลโครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของโปรตีนมีมากขึ้น หรือเทคนิคการจำลองโครงสร้างด้วยวิธี Homology Modeling สามารถสร้างโครงสร้างที่ให้ผลที่น่าเชื่อได้ในระดับหนึ่ง

ดังนั้น วิธี Structure-Based Drug Design จึงเป็นเทคนิคที่ใช้ในกระบวนการออกแบบยาที่น่าสนใจอีกเทคนิคหนึ่ง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ คือ ออกแบบโมเลกุลในกลุ่มของสารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสจากเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม โดยใช้เทคนิคการออกแบบยาตามโครงสร้างของเอนไซม์เป้าหมาย ในขณะที่ศึกษาอยู่นี้ เรายังไม่ทราบโครงสร้างสามมิติของ PfDHFR ซึ่งเป็นโครงสร้างเป้าหมายของยา การศึกษาจึงได้ทำการจำลองโครงสร้างของเอนไซม์ PfDHFR โดยอาศัยเทคนิคการเทียบลำดับกรดอะมิโนหรือ Homology Modeling การจำลองโครงสร้างจะต้องพึ่งโครงสร้างแม่แบบซึ่งได้นำจากโครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส จาก *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, human, chicken liver และ *Pneumocystic carinii* โครงสร้างที่ได้นำมาคำนวณด้วยวิธีพลวัติระดับโมเลกุล (Molecular Dynamics) แล้วออกแบบอนุพันธ์ของสารยับยั้งตามข้อมูลโครงสร้างของเอนไซม์ บทเรียนที่ได้จากการศึกษาลักษณะการจับยึดระหว่างยาและเอนไซม์จะช่วยในการวิเคราะห์การออกแบบยาเพื่อใช้กับเอนไซม์ที่มีระดับการดื้อยาสูงขึ้นต่อไปได้

วิธีทดลอง

สร้างโครงสร้าง Plasmodium falciparum DHFR **ด้วยวิธี** Homology Modeling

โมเดลของ PfDHFR สร้างขึ้น เริ่มจากเทคนิค Sequence Alignment โดยนำ Primary Sequence ของ PfDHFR ซึ่งมี 231 กรดอะมิโนมาเทียบเคียงกับ Primary Sequence ของ DHFR อื่นๆ ที่ทราบโครงสร้างสามมิติ ในที่นี้ได้แก่ DHFR จาก *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, human, chicken liver และ *Pneumocystic carinii* โปรแกรมที่ใช้ในขั้น Sequence Alignment นี้คือ Insight II โดยใช้โมดูล Homology ตรวจสอบผล Sequence Alignment ที่ได้โดยพิจารณาจาก %identity และ %similarity ระหว่าง PfDHFR sequence และ DHFR sequence ที่กล่าวไว้ข้างต้น ผลที่ได้จาก Sequence Alignment นี้สามารถระบุบริเวณที่เป็น Structurally Conserved Regions ในกลุ่มของ DHFR ได้ หลังจากนั้นจึงทำการสร้างโมเดล PfDHFR บริเวณ Structurally Conserved Regions ก่อนโดยนำโครงสร้างจาก DHFRs ในส่วน Structurally Conserved Regions หลังจากนั้นจึงสร้างโครงสร้างบริเวณที่เป็น Structurally Variable Regions ซึ่งมี 2 บริเวณที่เป็น Insertion Loops คือ residues 22-38 และ 64-98 การสร้างอาศัยการเทียบเคียงกับ Primary Sequence ของโปรตีนที่ทราบโครงสร้างสามมิติที่อยู่ในฐานข้อมูล Protein Data Bank โดยเลือก Sequence ของ Fragment ของโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกับ Loop Sequence ทั้งสองของ PfDHFR มากที่สุดและ Fragment นี้สามารถเชื่อมต่อกับโครงสร้าง PfDHFR ที่ยังไม่สมบูรณ์ ได้สนิทมากที่สุด (พิจารณาจาก Fragment อันดับที่หนึ่งซึ่งมีค่า Root Mean Square น้อยที่สุด) ในขั้นนี้ยังคงใช้ Homology module โดยเลือกเมนู Loops ซึ่งอยู่ภายใต้ Homology module หลังจากนั้นจึงทำปรับโครงสร้างด้วยวิธี Energy Minimization โดยเริ่มแบ่งเป็นสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกจะ Energy Minimization เฉพาะบริเวณรอยต่อ ในขั้นตอนที่สองจึง Energy Minimization ทั้งโครงสร้างของเอนไซม์ ตรวจสอบคุณภาพทางโครงสร้าง เช่น Stereochemistry, Peptide Planarity, Ramachandran diagram ด้วยโปรแกรม PROCHECK แล้วเก็บโครงสร้างไว้สำหรับการศึกษาพลวัติเชิงโมเลกุล (Molecular Dynamics) ต่อไป

พลวัติเชิงโมเลกุลของ Apo-DHFR **จาก** *Plasmodium falciparum*

เทคนิคการคำนวณทางพลวัติเชิงโมเลกุล หรือ Molecular Dynamics (MD) Calculations ถูกนำมาใช้เพื่อ Refine โมเดลของ PfDHFR ที่สร้างในขั้น Homology model การตั้งพารามิเตอร์สำหรับการจำลองด้วยวิธี MD มีดังต่อไปนี้

- สร้างระบบที่ประกอบด้วยโมเลกุล PfDHFR น้ำ และ Counterion โดยนำโครงสร้าง PfDHFR ที่สร้างในขั้น Homology model แล้วเติมโมเลกุลของน้ำชนิด TIP3P [ref] จำนวนมากพอที่จะรอบล้อมเอนไซม์ (อาจกำหนดให้ชั้นของน้ำมีความหนาอยู่ระหว่างขนาด 7-15 Å นับจาก

อะตอมที่อยู่บนพื้นผิวภายนอกของเอนไซม์) ในขั้นนี้จำนวนน้ำอยู่ระหว่าง 2000-7000 โมเลกุล การจัดเรียงของน้ำล้อมรอบกำหนดให้มีลักษณะเป็นลูกบาศก์ หลังจากนั้นทำการสะเทินประจุรวมของระบบเพื่อปรับสภาพให้เป็นกลาง การสะเทินประจุทำได้โดยการเติม Na^+ หรือ Cl^- หลังจากนั้นปรับสภาพของระบบอีกครั้งด้วยวิธี Energy Minimization เป็นจำนวน 5000 step

- พลังงานศักย์ใช้ Potential Functions ในระดับ Molecular Mechanics ซึ่งเลือกใช้ Cornell's All-atom Force Fields (Cheatham 1999)
- อุณหภูมิเท่ากับ 300K
- กำหนดค่า Dielectric Constant เท่ากับ 1
- Cut-off สำหรับ Non-bonding Interactions เท่ากับ 10 Å
- ใช้ SHAKE algorithm สำหรับ Constraint อะตอมที่มีพันธะกับอะตอมไฮโดรเจน
- กำหนดให้ Lysine และ Arginine อยู่ในสภาพ Protonation .ในขณะที่ Glutamic และ Aspartic acid อยู่ในสภาพ Deprotonation
- จะจำลองระบบด้วยเวลาทั้งสิ้น (MD Simulation Time) เท่ากับ 250ps การจำลองกำหนด Time step เท่ากับ 2 femtosecond แบ่งการคำนวณของเป็น 2 ช่วง ช่วงที่หนึ่งเป็นช่วงที่ระบบจะปรับเข้าสู่สมดุลโดยอาศัยการเปลี่ยนอุณหภูมิ และช่วงที่สองระบบเข้าสู่สมดุลแล้ว เลือกช่วงที่สอง (ระบบอยู่ในสภาวะสมดุล) บันทึกข้อมูลการจำลองทุกๆ 0.1ps

เมื่อการคำนวณเสร็จสิ้น นำข้อมูลการจำลอง หรือ Molecular Dynamics Trajectory มาวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการจำลองและประเมินหาสมบัติที่สนใจ นอกจากนี้ นำ MD Trajectory ในส่วนที่เป็นโครงสร้างของระบบมาเฉลี่ย (Ensemble average) แล้วจึงทำ Energy Minimization อีกครั้งเพื่อหาโครงสร้างเฉลี่ย โครงสร้างที่ได้ในขั้นนี้ใช้แทนโครงสร้างของเอนไซม์ Apo-DHFR ในสารละลายตามนิยาม Ergodicity ของ Statistical Mechanics การคำนวณด้วยวิธี Molecular Dynamics ใช้โปรแกรม Amber 4.0

นอกจากสร้างแบบจำลองทางพลวัติของระบบที่มีเอนไซม์ Apo-PfDHFR ในสภาพสารละลายแล้ว ยังได้ทำการสร้างแบบจำลองทางพลวัติของระบบที่มีเอนไซม์ Apo-DHFR ของ Human ในสภาพสารละลายเพื่อวัตถุประสงค์ในการเปรียบเทียบ โดยวิธีการจำลองเป็นวิธีเดียวกันกับวิธีการสร้างแบบจำลองทางพลวัติของระบบที่มีเอนไซม์ Apo-PfDHFR ที่กล่าวไว้ข้างต้น แต่โครงสร้างเริ่มต้นของ Apo-HumanDHFR จะมาจากโครงสร้างเอ็กซเรย์ ไม่ได้มาจากวิธี Homology modeling เหมือนกับ PfDHFR

Modeling โมเลกุล Pyrimethamine และ Cycloguanil และอันตรกิริยากับ PfDHFR

โมเลกุลของสารยับยั้งเอนไซม์ซึ่งได้แก่ Pyrimethamine และ Cycloguanil มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับโมเลกุลของ PfDHFR ดังนั้นโครงสร้างของ PYR และ CYC จึงสร้างและปรับโครงสร้าง (Geometric Optimization) ด้วยวิธี *Ab initio* ในระดับ Hartree Fock 6-31G* ด้วยโปรแกรม Gaussian 94 หลังจากนั้นจึง Dock สารยับยั้งเข้าไปในบริเวณ Active Site ของ PfDHFR โดยเลือกโครงสร้างของ PfDHFR ที่ได้จากการคำนวณทาง Molecular Dynamics สำหรับโมเลกุลของสารยับยั้งจะอยู่ในสภาพ Protonation ที่ตำแหน่ง N1 ในวง Pyrimidine ของ PYR และวง Triazine ของ CYC ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทาง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (Roberts 1981) ตำแหน่งเริ่มต้นของโมเลกุลของสารยับยั้ง PYR และ CYC นี้จะถูกจัดวางให้ลักษณะคล้ายคลึงกับตำแหน่งของ Methotrexate และ Trimethoprim ที่พบในโครงสร้างเอ็กซเรย์ของ DHFRs ชนิด Binary และ Ternary Complexes โดยเฉพาะ 2,4-diamino groups และวง Protonated Pyrimidine หรือวง Protonated Triazine จะอยู่ในลักษณะที่สามารถเกิด Hydrogen Bonding กับ Carboxylate Sidechain ของ Asp54 การ Dock ในลักษณะนี้อาศัยข้อมูลจากโครงสร้างเอ็กซเรย์ของ DHFR กับ Antifolates ชนิดต่างๆ ซึ่งค่อนข้างชัดเจนว่า Binding Site Residue ณ ตำแหน่งนี้ มีลักษณะเป็น Conserved Amino Acid ซึ่งจะเป็นได้เฉพาะ Aspartic acid หรือ Glutamic Acid เท่านั้น หลังจากนั้นจึงทำการ Dock โครงสร้างโมเลกุลของโคแฟกเตอร์ NADPH ที่นำมาจากโครงสร้างเอ็กซเรย์ของ DHFR Complex เข้าบริเวณ Binding Site ของโคแฟกเตอร์ โดยใช้วิธีเดียวกับการ Dock โมเลกุลของสารยับยั้งเข้าไปในบริเวณ Active Site ของ PfDHFR ทำการปรับโครงสร้างด้วยวิธี Energy Minimization นำโครงสร้างที่ได้ไปใช้ในขั้นต่อไป สำหรับขั้นตอน Docking นี้ใช้โปรแกรม Insight II โดยมีโมดูล Discover สำหรับขั้นตอน Energy Minimization

การออกแบบยาตามโครงสร้างบริเวณ Active Site ของ PfDHFR

หลังจากที่ได้โครงสร้างของ PfDHFR-NADPH-Inhibitor แล้ว จึงนำมาใช้ในการออกแบบอนุพันธ์ของสารยับยั้งด้วยเทคนิค Structure-Based Drug Design วิธีทดลองในขั้นตอนนี้ ใช้ Receptor Mode ภายใต้โมดูล LuDi ของโปรแกรม Insight II กำหนดให้ PfDHFR-NADPH เป็น Target object ในขณะที่ PYR และ CYC เป็น Ligand object การออกแบบอนุพันธ์ของสารยับยั้งด้วยโปรแกรม LuDi จะอาศัยเทคนิคการสืบค้นโดยวิเคราะห์อันตรกิริยาที่บริเวณ Binding site ของ Target เสียก่อน แล้วหา Fragment ที่เหมาะสมตามเกณฑ์ที่กำหนด การสืบค้น Fragment จะพิจารณา Fragment ที่มีอยู่ใน Library เมื่อเชื่อมต่อ Fragment ที่ค้นได้กับโมเลกุลของสารยับยั้งแล้วคำนวณอันตรกิริยาระหว่าง Receptor-Ligand ซึ่งใช้ Scoring Function ตามสมการ

$$Score = \left[\sum_{hbonds} 100 f(\Delta R) f(\Delta \alpha) \right] + \frac{5}{3} A_{lipo}$$

โดยที่ $f(\Delta R)$ และ $f(\Delta\alpha)$ เป็น Scoring Function ที่เกี่ยวข้องกับ Geometric criteria ของระยะและมุมสำหรับ Hydrogen bonding และ A_{lipo} บอกถึง Hydrophobic contact surface ระหว่าง Receptor-Ligand (Bohm 1994) เมื่อได้ค่า Score จะบันทึกเก็บไว้แล้วก็ทำการสืบค้นต่อไป จนครบทุก Fragment ที่อยู่ใน Library การรายงานผลจะจัดเป็นอันดับ หรือ Rank ตามค่าที่ได้ กล่าวคือ โมเลกุลของอนุพันธ์ที่ดีจะมี Score สูง นอกจากนี้ค่า Score ที่ได้สามารถประมาณค่า K_i หรือ ΔG ของการ Bind ได้ (Bohm 1994)

ตำแหน่งของสารยับยั้งที่จะหาหมู่มาแทนที่ ได้แก่ ตำแหน่งที่จะแทนที่หมู่เอธิล ($-CH_2CH_3$) ของ PYR หรือ dimethyl carbon ของ CYC *m*-H และ *p*-Cl ใน p-chlorophenyl ของทั้ง PYR และ CYC (รูปที่ 1) ซึ่งทั้งสามตำแหน่งใช้สัญลักษณ์ R, R' และ R'' ตามลำดับ ตำแหน่งดังกล่าวกำหนดตามข้อมูลการทดลองการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารยับยั้งและพิจารณาจากลักษณะเฉพาะของโครงสร้างหลักซึ่งต้องประกอบด้วย 2,4-diamino groups และวง Protonated Pyrimidine เพื่อสามารถสร้าง Hydrogen Bonding กับ Active Site Residue Asp54 กำหนดให้ พิจารณาอะตอมของ Target ที่อยู่ห่างจาก Ligand ไม่เกิน 5-8 Å และบริเวณรอยเชื่อมต่อระหว่าง Fragment กับตำแหน่งที่มีการแทนที่ของสารยับยั้งมีค่า RMS < 0.3 Å

สำหรับขั้นถัดไป ให้ปฏิบัติซ้ำในขั้นตอนการออกแบบอนุพันธ์ของ PYR และ CYC ด้วยโปรแกรม LuDi แต่ใช้โครงสร้างของ Human DHFR ที่ได้จากการคำนวณทาง Molecular Dynamics เป็นโมเลกุลเป้าหมาย ซึ่งอนุพันธ์ที่ออกแบบจากเชื้อมาลาเรีย จะผ่านกระบวนการการคัดกรอง (Screening Process) โดยที่อนุพันธ์ที่ออกแบบด้วยเอนไซม์ของเชื้อมาลาเรียจะถูกคัดออกถ้าหากเหมือนอนุพันธ์ที่ออกแบบจากคน และการคัดกรองนี้ยังใช้เกณฑ์การจัดอันดับตาม Ludi Score Cutoff, Visual Screening และตาม Fragment ที่ทำนายได้สอดคล้องกันทั้ง CYC และ PYR ทั้งนี้เพื่อเลือกอนุพันธ์ที่จำเพาะกับเชื้อมาลาเรียและมีประสิทธิภาพ

ผลการทดลอง

Sequence Alignment

ผลของ Sequence Alignment ของ PfDHFR เทียบกับ Primary Sequence ของ DHFR อื่นๆ ที่นำมาพิจารณาแสดงดังรูปที่ 3 จากรูปจะเห็นได้ว่า Primary Sequence ของ PfDHFR มี 2 ช่วงที่ไม่สามารถเทียบเคียงกับ Primary Sequence ของ DHFR อื่นๆ ที่นำมาเปรียบเทียบกัน ช่วงบริเวณดังกล่าวคือ ช่วงตั้งแต่ 22-38 และ ช่วงตั้งแต่ 64-98 เมื่อพิจารณา % residue identity ของ PfDHFR เทียบกับ DHFR อื่นๆ ดังในตารางที่ 1 พบว่าใกล้เคียงกับ Human และ Chicken มากที่สุดถึง 36%

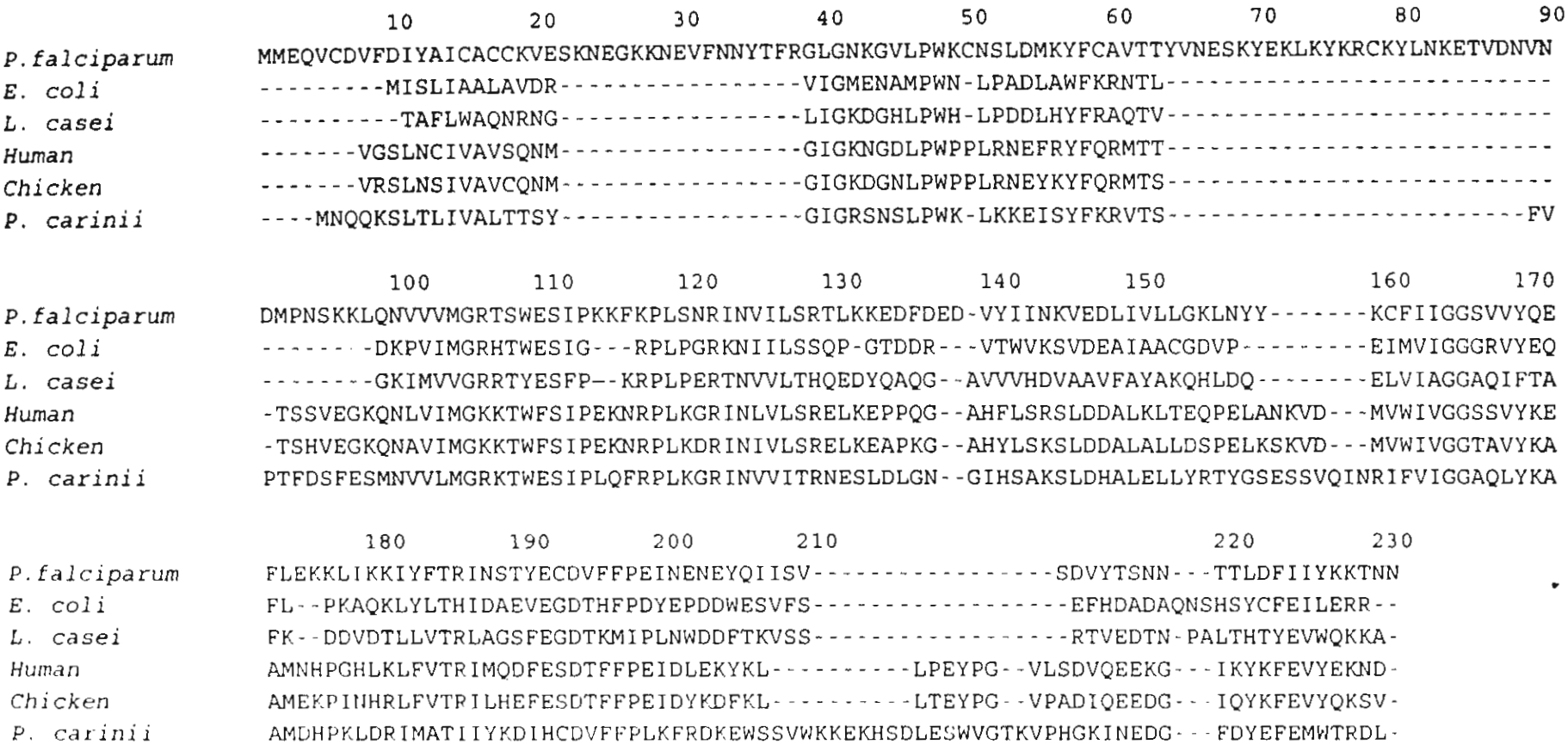
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบ % residue identity **ของ** PfDHFR **กับ** DHFR **อื่น ๆ**

	P. falciparum	*P. carinii*	*L.casei*	*E. coli*	Chicken	Human
P.falciparum (231,-)[a]	-					
P.carinii (206,1dyr)	27	-				
L.casei (162,3dfr)	25	33	-			
E. coli (159, 4dfr)	31	37	34	-		
Chicken (189, 1drl)	36	44	39	38	-	
Human (186, 1dhf)	36	44	36	36	74	-

หมายเหตุ [a] จำนวนกรดอะมิโนทั้งหมดของโปรตีนและ PDB ID Code

นอกจากนี้ Primary Sequence ของ PfDHFR กับ *L.casei* DHFR มี % residue identity น้อยที่สุด สำหรับคู่โปรตีนที่มี Primary Sequence ความใกล้เคียงมากที่สุดถึง 74% คือ คู่ของ Human DHFR กับ Chicken DHFR

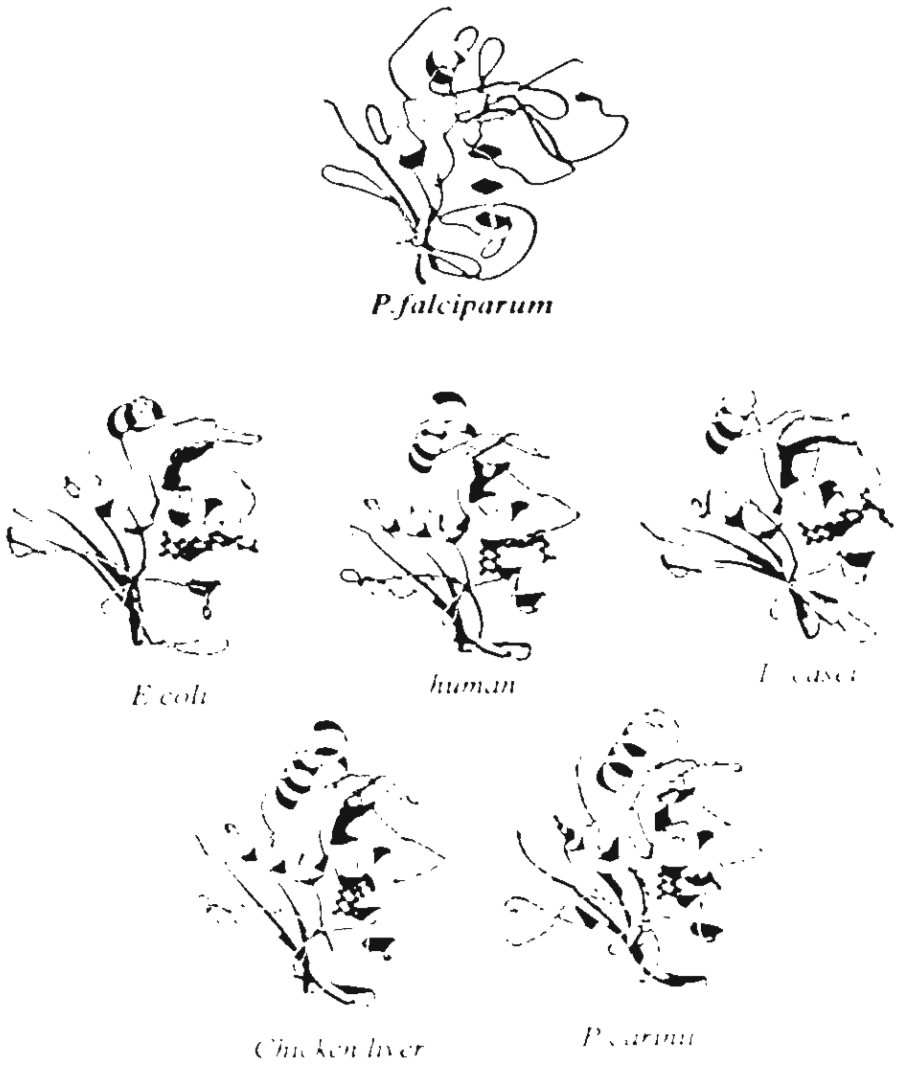
Multiple Sequence Alignment



รูปที่ 3 Sequence Alignment **ของไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสจาก** *Plasmodium falciparum, Escherichia coli Lactobacillus casei*, human, chicken liver **และ** *Pneumocystic carinii*

Overall Folding

เมื่อพิจารณา Overall Folding ของ PfDHFR กับ DHFR อื่นๆ พบว่าคล้ายคลึงกัน รูปที่ 4 จะเห็นโครงสร้าง conserved secondary ของเอนไซม์ DHFR โดยส่วนใหญ่จะประกอบด้วย 8 β-strands และ 4 α-helices ซึ่ง Pack กันเป็น Globular Protein และทุก β-strands จะเป็น parallel ยกเว้น β-strands ที่อยู่บริเวณ C-terminal จะเป็นแบบ antiparallel



รูปที่ 4 เปรียบเทียบ Homology Model **จาก** PfDHFR **กับ** X-ray Structure **ของ** DHFR **จาก** *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, human, chicken liver **และ** *Pneumocystic carinii*

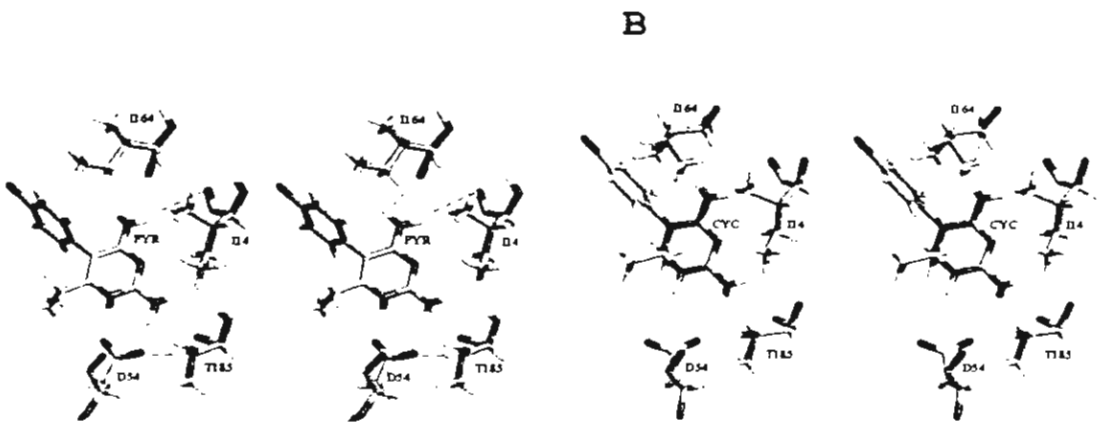
อันตรกิริยาของยาภายใน Active Site

อันตรกิริยาระหว่าง PfDHFR และยาแสดงดังรูปที่ 5 จะเห็นว่าการวางตัวของโมเลกุลของ CYC และ PYR จะมีความคล้ายคลึงกัน เมื่อวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างยาต้านโฟเลตกับกรดอะมิโนบริเวณ Active Site จาก PfDHFR Model พบว่า HN ของ 2-amino group และ Protonated Hydrogen ที่ตำแหน่ง N1 ของ PYR และ CYC อยู่ในตำแหน่งที่สามารถเกิด Hydrogen Bonding กับหมู่ carboxylate ของ Sidechain ของ Asp54 ใน PfDHFR ในลักษณะ Bidentate Hydrogen Bonding และอันตรกิริยานี้จะถูก Stabilize ด้วยพันธะไฮโดรเจนของหมู่ OH Sidechain ของ Thr185 อีกทอดหนึ่ง ในดังรูป 6B อย่างไรก็ตาม X-ray Structure ของ DHFR complex ต่างๆ จะมี Hydrogen Bonding ระหว่าง Active Site Residue Aspartic หรือ Glutamic กับ Antifolates ในลักษณะ Bidentate ด้วยกันทั้งสิ้น ตัวอย่างเช่น Methotrexate จับยึดกับ Sidechain ของ Asp26 ของ DHFR จาก *L.casei* ด้วย Bidentate Hydrogen Bonding (รูปที่ 6A) การค้นพบนี้จึงถือว่าเป็นเรื่องที่ไม่ใช่ประเด็นใหม่ของอันตรกิริยาที่มีอยู่ใน PfDHFR complex นอกจากนี้ยังมี Hydrogen Bonding ระหว่าง HN ของ 4-amino group ของ PYR และ CYC กับ Backbone Oxygen ของ Ile14 และ Ile164 ซึ่งอันตรกิริยาประเภทมีลักษณะคล้ายกับ Methotrexate ซึ่งเป็น Antifolate กับ *L casei* DHFR (รูปที่ 6A)

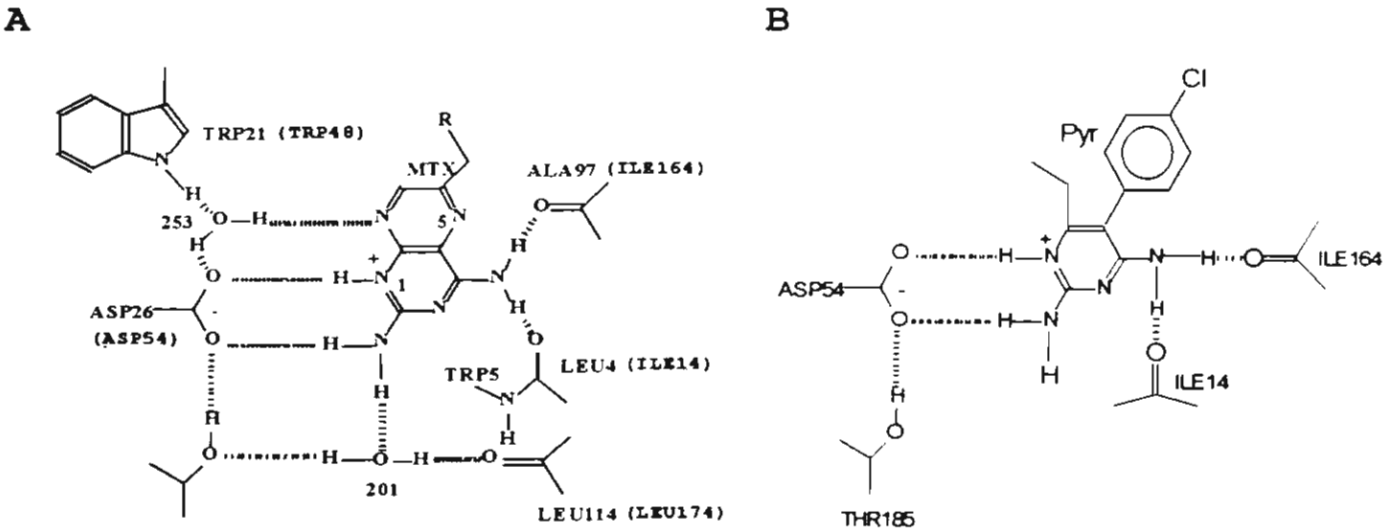
อันตรกิริยาระหว่าง Residues ที่เกิด Mutation กับยา

การวางตัวของ Residue ที่เกิด Mutation ในโครงสร้างของ PfDHFR ซึ่งได้แก่ Ala16, Asn51, Cys59, Ser108 และ Ile164 แสดงดังรูปที่ 7 เป็นที่น่าสนใจว่ากรดอะมิโนเหล่านี้อยู่ไม่ห่างจาก CYC และ PYR ตามที่ได้รายงานไว้ในหัวข้อข้างต้น Backbone C=O ของ Ile164 มีบทบาทในการจับยึดกับยาและซับสเตรทด้วย Hydrogen Bonding อันตรกิริยาที่สังเกตุได้จากโครงสร้าง PfDHFR และมีความน่าสนใจได้แก่ตำแหน่ง Ala16 และ Ser108 กล่าวคือ Sidechain ของ Ala16 น่าจะ Contact ได้พอดีกับ Methyl group ทางด้านใดด้านหนึ่งของ 2,2-dimethyl group ของ CYC (รูปที่ 7A) ซึ่งอันตรกิริยาแบบนี้ไม่น่าจะเกิดขึ้นกับ Pyrimethamine เพราะที่บริเวณ Ethyl group ของ PYR นั้น Hybridization ของ C-atom ในวง Pyrimidine ที่ Ethyl group ต่ออยู่ เป็นแบบ sp^2 hybrid orbital ทำให้วง Pyrimidine ของ PYR มีลักษณะแบนกว่าวง Triazine ของ CYC ดังนั้น Ethyl group ของ PYR จะอยู่ข้างห่างจาก Methyl Sidechain ของ Ala16 มากกว่า 2,2-dimethyl group ของ CYC (รูปที่ 7B) หรือจะกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า ถ้าเปรียบเทียบช่องว่างระหว่างโมเลกุลของยาและโมเลกุลของเอนไซม์บริเวณ Binding Pocket นี้ จะเห็นว่า CYC แทบไม่มีช่องว่างเลยในขณะที่ PYR ยังมีช่องให้เห็นมากกว่าการเกิด Mutation จาก Ala16 เป็น Val16 CYC น่าจะได้รับผลกระทบมากกว่า ซึ่งจากการศึกษา

ด้วยวิธี Molecular Dynamics และผลการทดลองพบว่าสอดคล้องกัน (Rastelli 2000) และสนับสนุนรายงานที่ระบุว่า Mutant ชนิด A16V จะดื้อต่อ CYC แต่ยังใช้ได้กับ PYR (Rastelli 2000)

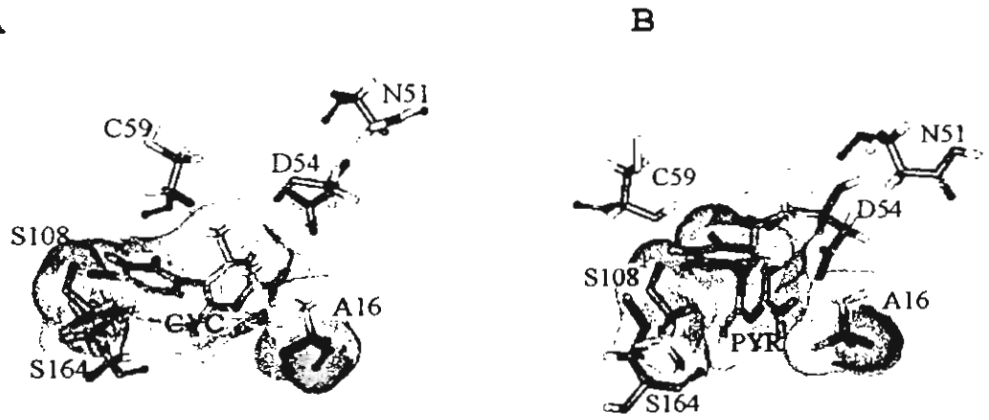


รูปที่ 5 ภาพสเตอริโอแสดงการวางตัวของโมเลกุลของ PYR (A) และ CYC (B) และอันตรกิริยาพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนต่าง ๆ ในบริเวณจับยึด (เส้นประ)



รูปที่ 6 ภาพแสดงการจับยึดด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (A) Methotrexate กับ Sidechain ของ Asp26 ของ DHFR จาก *L.casei* และ (B) Pyrimethamine กับ Sidechain ของ Asp54 ของ DHFR จาก *P .falciparum*

นอกจากอันตรกิริยาของยากับ Ala16 แล้ว ยังมีตำแหน่ง 3-chlorophenyl substituent ของ CYC และของ PYR ซึ่งอยู่ใกล้กับ Ser108 โดยที่ Cl-atom ของยาทั้งสองชี้ไปยัง Backbone C=O group ของ Ser108 อย่างไรก็ดี อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นดังกล่าวไม่ใช่ Hydrogen Bonding แต่น่าจะเป็นอันตรกิริยาอย่างอ่อน เช่น Van der Waal Interaction เมื่อพิจารณา Mutation จาก Ser108 เป็น Asn108 ทำให้ขนาดของ Binding Pocket เล็กลงและมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของยาค่อนข้าง Rigid เพราะเป็นชนิด Biphenyl ring ทำให้การจัดวางของ 3-chlorophenyl substituent ของยาไม่เหมือนเดิม ซึ่งส่งผลต่อลักษณะและความแข็งแรงของการจับยึดของ CYC และ PYR (Tarnchompoo 2002)

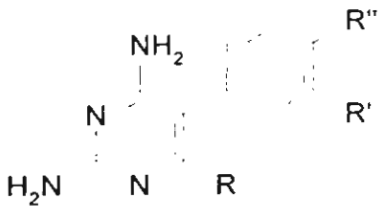


รูปที่ 7 Solvent Accessible Surface Areas **สำหรับ** Ala16, Ser108, Cycloguanil (A) **และ** Pyrimethamine (B) **เส้นประแสดงการเปรียบเทียบช่องว่าง**

การออกแบบอนุพันธ์ของสารยับยั้ง

Fragment ที่สืบค้นได้ พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 29 Fragments ตำแหน่งที่สามารถหา Fragment มาแทนที่ได้มากที่สุดคือที่หมู่แทนที่ R จำนวน 19 Fragments รองลงมาคือ R' จำนวน 6 Fragments และ R" จำนวน 4 Fragments และเมื่อผ่านการคัดกรองโดยใช้ LuDi Score Cutoff, Structural Similarity และ Virtual Screening ทำให้จำกัดจำนวน Candidate แคบลงเหลือเพียง 7 Fragments ซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Fragments ต่าง ๆจากการออกแบบอนุพันธ์ของ Pyrimethamine



No	R, (R' = H , R" = Cl)	Ludi Score
1.	-$(CH_2)_2COMe$	140
2.	-$(CH_2)_2Ph$	134
3	-$CH_2CH(CH_3)_2$	125
4.	-$(CH_2)_3Ph$	112

No	R' (R = H , R" = Cl)	Ludi Score
5.	*m* -$CH_2CH(CH_3)_2$	119

No	R" (R = H , R' = H)	Ludi Score
6.	*p*-CH_2NHMe	128
7.	*p*-CH_2CH_3	111