รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG4980009
(รหัสโครงการ)

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

Investigator : ชื่อนักวิจัย และสถาบัน
(ชื่อนักวิจัย) อ. ภก. ดร. สันทัด 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 เป็นโปรตีนที่มีใช่ส่วนประกอบทางโครงสร้างของเชื้อไวรัสเดงกี้ซึ่งมีขนาดประมาณ 69 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยส่วนที่มีหน้าที่เป็นเอนไซม์ชนิดต่างๆรวมถึงเอนไซม์เซอรรีนโปรตีเอสซึ่งอยู่บริเวณปลายด้านอะมิโน และเอนไซม์โปรตีเอสจะตัดส่วนของโปรตีนตั้งต้นของเชื้อไวรัสในบริเวณที่มีกรดอะมิโนชนิดที่เป็นด่างซึ่งเรียงต่อกัน 2 ตัวที่อยู่ภายในบริเวณที่เป็นโปรตีนที่มีใช่ส่วนประกอบทางโครงสร้าง ดังนั้นเอนไซม์โปรตีเอสจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญสำหรับการออกแบบยาต้านเชื้อไวรัส จากการศึกษาที่ผ่านมา ข้อมูลทั้ง docked energy และ binding geometries ที่ได้จากการทำ molecular docking ระหว่างสารทดสอบกับแบบจำลองของเอนไซม์สายเดี่ยวเชิงซ้อน NS2B(H)-NS3p ของเชื้อไวรัสเดงกี้ โดยใช้โปรแกรม AutoDock เสนอแนะว่าการจับกับเอนไซม์จะดีขึ้นเมื่อมี NS2B cofactor และการจับของเปปไตท์ที่ได้จากการตัดคล้ายกับการจับของซับสเตรทซึ่งสัมพันธ์กัน ในการศึกษานี้แสดงผลที่สอดคล้องกับการวิจัยที่ผ่านมาว่าเปปไตท์ที่ประกอบด้วย 6 อะมิโนแอซิดที่พัฒนามาจากขอบเขตด้าน P1-P6 ของตำแหน่งที่มีการตัดทั้ง 4 ตำแหน่ง มีความสามารถจะเป็นตัวยับยั้งได้ รวมถึงเปปไตท์ FAAGRK, EVKKQR, RTSKKR และ RTSKKR ยิ่งไปกว่านั้น เปปไตท์ที่ประกอบด้วย 5 อะมิโนแอซิดที่พัฒนามาจากขอบเขตด้าน P1-P5 รวมถึงเปปไตท์ AAGRK, VKKQR, TSKKR และ TSKKR ก็มีความสามารถที่จะเป็นตัวยับยั้งได้ด้วย สำหรับเปปไตท์ที่สายสั้นลง เช่น เปปไตท์ SKKR, GKR, GRR, KKR, GKR, KRR, RRK, KRK, RKR, RKK, KR, RK และ RR เปปไตท์เหล่านี้ก็มีความสามารถที่จะเป็นตัวยับยั้งได้เช่นเดียวกัน ในขณะที่เปปไตท์ AGRR มีความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งที่น้อยกว่า โปรแกรม Derek ที่ใช้สำหรับทำนายความเป็นพิษของเปปไตท์ที่ใช้ในการศึกษา Molecular docking แสดงถึงความเป็นพิษที่น้อยสำหรับเปปไตท์ทุกตัว โดยสรุป ผลการทดลองเหล่านี้สามารถนำมาใช้สำหรับการพัฒนาตัวยับยั้งที่มีความแรงต่อเอนไซม์โปรตีเอส NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี้ โดยการทำ combinatorial optimization ร่วมกับการออกแบบตัวยับยั้งประเภท peptidomimetic โดยอยู่บนพื้นฐานของตำแหน่งที่เกิดการตัดตามธรรมชาติของโปรตีนสายยาวเพื่อเพิ่มฤทธิ์และลดความเป็นพิษของตัวยับยั้ง

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

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

ในปัจจุบันโรคไข้เลือดออกที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสเดงกี้ จัดได้ว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ร้ายแรงโรคหนึ่งของประเทศไทย และนับวันจะทวีความรุนแรงมากขึ้นเรื่อยๆ การที่โรคไข้เลือดออกส่งผลกระทบโดยรวมต่อสุขภาพของประชากร จึงทำให้เกิดความสนใจมากขึ้นในการที่จะดำเนินการวิจัยและพัฒนาเพื่อที่จะผลิตวัคซีน หรือยามาใช้ในการป้องกัน บำบัด บรรเทา และรักษาโรคนี้ สำหรับวัคซีนป้องกันไข้เลือดออกนั้นกำลังอยู่ในระหว่างการวิจัยและพัฒนามาระยะหนึ่งแล้ว ดังนั้นการวิจัยและพัฒนายา จึงเป็นอีกช่องทางหนึ่งที่สามารถทำได้ในระหว่างที่ประเทศไทยกำลังรอวัคซีนสำหรับป้องกันไข้เลือดออกดังกล่าว เป้าหมายหนึ่งในการออกแบบยาต้านเชื้อไวรัสเดงกี้ที่เฉพาะเจาะจง คือเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ ซึ่งอยู่ในรูปเชิงซ้อนกับโปรตีน NS2B โดยโปรตีน NS2B ทำหน้าที่ในการกระตุ้นเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสให้มีฤทธิ์ เอนไซม์ NS3 โปรตีเอส จะทำหน้าที่ตัดส่วนของโปรตีนตั้งต้นของเชื้อไวรัสเดงกี้ในบริเวณที่มีกรดอะมิโนชนิดที่เป็นเบสเรียงต่อกัน 2 ตัว (dibasic residues) ที่อยู่ภายในบริเวณที่เป็นโปรตีนที่มิใช่ส่วนประกอบทางโครงสร้าง (nonstructural protein) ด้วยเหตุนี้เอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้จึงเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างยิ่งในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี้ จึงอาจกล่าวได้ว่าการยับยั้งเอนไซม์นี้เป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อไวรัสเดงกี้เพิ่มจำนวนขึ้นตลอดจนไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเชื้อไวรัสที่มีความสามารถในการติดเชื้อเซลล์เป้าหมายได้

ในช่วงเวลาก่อนหน้านี้ ได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มจำนวนของเชื้อฟลาวิไวรัส ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ทางด้านของพันธุศาสตร์ของเชื้อฟลาวิไวรัสมากมาย ดังนั้นในการศึกษาเมื่อเร็วๆนี้ ส่วนใหญ่จึงให้ความสำคัญทางด้านชีวเคมี ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการตัดส่วนของโปรตีนที่มิใช่ส่วนประกอบทางโครงสร้าง รวมถึงโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อฟลาวิไวรัส กลไกของการที่โปรตีนขนาดเล็กซึ่งทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์กระตุ้นเอนไซม์โปรตีเอสให้มีฤทธิ์ วิธีวิเคราะห์ที่มีความไวสูงซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของซับสเตรท และการพัฒนาวิธีการคัดกรองตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูง

กระบวนการศึกษาวิจัยทั้งหมดที่กล่าวมานั้น เป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยและพัฒนายา (Drug Research and Development Process) ตามขั้นตอนมาตรฐาน หากแต่ว่าค่าใช้จ่ายในการวิจัยและพัฒนายังอยู่ในระดับที่สูงสำหรับเชื้อไวรัสเดงกี้ และเป็นค่าใช้จ่ายที่สูงสำหรับประเทศไทยด้วยเช่นกัน ในขณะนี้ด้วยเทคโนโลยีทางด้านคอมพิวเตอร์ (Molecular Modelling) ที่ก้าวหน้าขึ้น ทำให้มีความเป็นไปได้ที่สามารถจะพัฒนาและคัดกรองยาต้านเชื้อไวรัสเดงกี้ได้เร็วขึ้นและใช้ต้นทุนที่ถูกลง อีกทั้งเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ๆในการวิจัยและพัฒนายาโดยใช้คอมพิวเตอร์ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนายาอื่นๆที่ทราบเป้าหมายเช่นเดียวกับเชื้อไวรัสเดงกี้ที่มีเอนไซม์โปรตีเอสเป็นหนึ่งในเป้าหมายที่สำคัญ

การติดเชื้อไวรัสเดงกี้

เชื้อไวรัสเดงกี้เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคซึ่งมีอัตราการติดเชื้อต่อปีสูงเกินกว่า 50 ล้านราย ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะไม่ปรากฏอาการทางคลินิก แม้กระนั้นก็ยังมีส่วนน้อยที่เป็นไข้ต่ำๆ เป็นไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี้ (dengue fever, DF) จากนั้นพัฒนาไปสู่การเป็นไข้เลือดออก (dengue haemorrhagic fever, DHF) และหากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและทันเวลา ผู้ป่วยก็จะเสียชีวิตด้วยอาการช็อค (dengue shock syndrome, DSS) ในที่สุด ย้อนกลับไปเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2322-2323 ซึ่งมีรายงานเป็นครั้งแรกว่าพบการเกิดไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี้ (DF) ในทวีปเอเชีย แอฟริกา และอเมริกาเหนือ ในช่วงเวลานั้น การเกิดไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี้ (DF) ถือว่าเป็นแบบอ่อน ไม่ถึงกับทำให้เสียชีวิต และโรคก็จำกัดอยู่เพียงบางบริเวณของพื้นที่โลกเท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อไวรัสเดงกี้ทั้ง 4 สายพันธุ์ยังคงแยกกันอยู่ แต่ในปัจจุบันนี้สถานการณ์ได้เปลี่ยนไปโดยสิ้นเชิง เชื้อไวรัสเดงกี้ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้เกิดการแพร่กระจายไปทั่วโลก และการระบาดของการเกิดไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี้ (DF) มีความรุนแรงขึ้นเนื่องมากจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี้ที่ต่างสายพันธุ์กัน (Hyperendipity) อีกทั้งอุบัติการณ์ของการเกิดไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี้ (DF) ก็สูงมากขึ้นด้วย

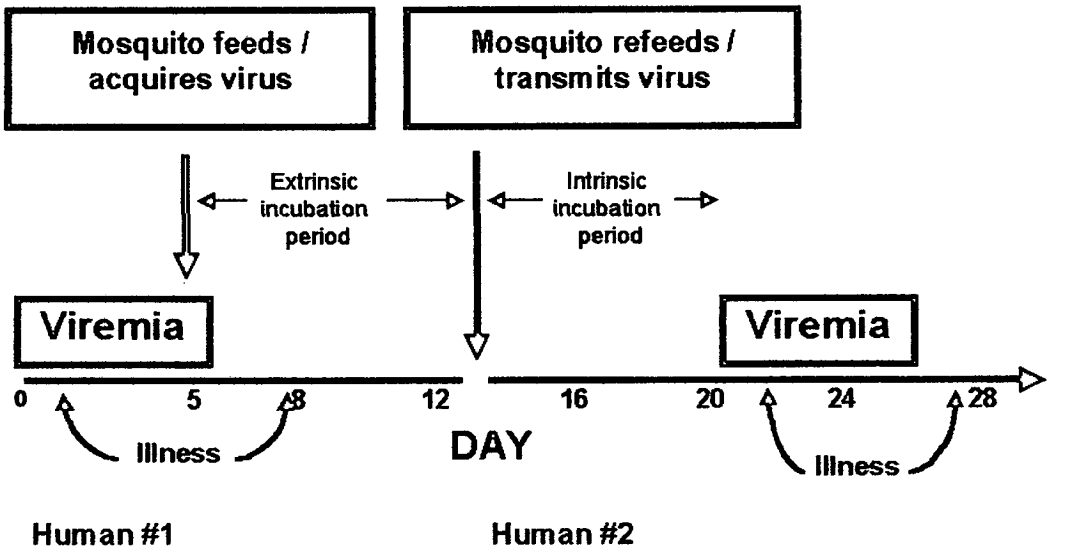
ถึงแม้ว่าโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี้จะเป็นโรคที่เกิดขึ้นมานานแล้วก็ตาม ในขณะนี้ยังคงไม่มีวัคซีนหรือยาใดๆที่นำมาใช้รักษาได้ นักวิจัยได้ใช้ความพยายามอย่างมากมายในการที่จะพัฒนาวัคซีนมาเป็นเวลานานกว่าทศวรรษ แต่ก็ไม่ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เหตุผลอันหนึ่งก็คือวัคซีนที่มีประสิทธิภาพจะต้องป้องกันเชื้อไวรัสเดงกี้ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้พร้อมกัน ถ้าหากวัคซีนที่ผลิตขึ้นมาไม่สามารถป้องกันได้ทั้ง 4 สายพันธุ์พร้อมกันแล้ว ผู้ที่ได้รับการฉีดวัคซีนไปจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการที่จะเกิดไข้เลือดออก (DHF) สูงกว่าผู้ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน ดังนั้นในตอนนี้ความพยายามต่างๆจึงมุ่งมาที่การพัฒนาสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเดงกี้ (dengue viral inhibitors) เป็นส่วนใหญ่

การถ่ายทอดเชื้อไวรัสเดงกี้ ความชุกและผลที่เกิดขึ้น

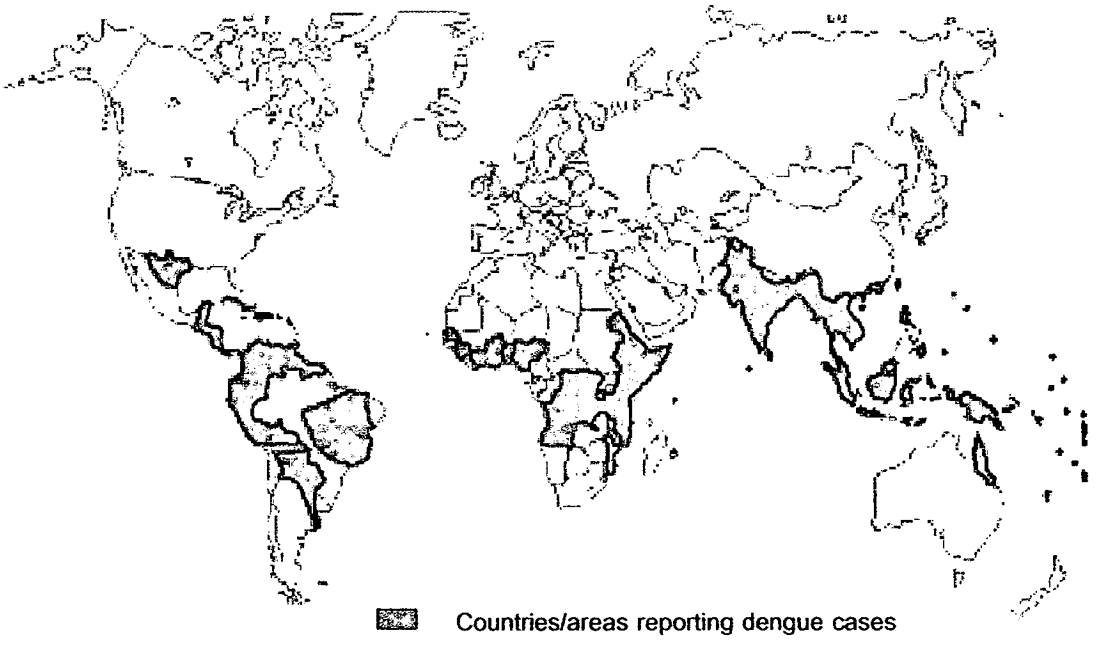
เชื้อไวรัสเดงกี้ถ่ายทอดไปสู่มนุษย์โดยการถูกยุงลายตัวเมียกัด ไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์ *Aedes aegypti* หรือ *Aedes albopitus* ในตอนกลางวัน (รูป 1) มนุษย์ ลิงชิมแปนซี ลิงกิบบอน และลิงมาคิวส์เป็นแหล่งอาศัยพักพิงของเชื้อไวรัสเดงกี้ตามธรรมชาติ สายพันธุ์ที่แตกต่างกันของมันเป็นสาเหตุที่สำคัญของความรุนแรงของโรคที่พบในมนุษย์ เชื้อไวรัสเดงกี้อยู่ในแฟมิลี่ *Flaviviridae* เช่นเดียวกับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไข้เหลือง (yellow fever) สมองอักเสบ (St. Louis encephalitis) และไข้จากเชื้อไวรัสเวสไนล์ (West Nile fever) เป็นต้น เชื้อไวรัสเดงกี้มี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 1 (DEN 1) สายพันธุ์ที่ 2 (DEN 2) สายพันธุ์ที่ 3 (DEN 3) และสายพันธุ์ที่ 4 (DEN 4) แต่ละสายพันธุ์จะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันที่มีอายุอยู่นานตลอดชีวิต สำหรับตัวมันเอง แต่จะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันที่มีอายุสั้นหรือมีอายุอยู่เพียงชั่วคราวกับสายพันธุ์อื่นอีก 3 สายพันธุ์ที่ไม่ใช่ตัวมันเอง

ในปัจจุบันนี้มีประชากรประมาณ 2500 ล้านคนที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี้ และเชื้อไวรัสเดงกี้ก็แพร่ระบาดอยู่ในถิ่นต่างๆกว่า 100 ประเทศ ทั้งในทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแปซิฟิกตะวันตก (รูป 2) ความชุกของเชื้อไวรัสเดงกี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีสาเหตุมา

จากประชากรในเมืองเพิ่มจำนวนขึ้น การผสมพันธุ์ของยุงมีแพร่ขยายกว้างขวางขึ้น และมีการอพยพของผู้คนที่ได้รับเชื้อไวรัสเดงกี้



รูป 1 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสเดงดี้โดยยุงลาย *Aedes aegypti* หรือ *Aedes albopitus*



รูป 2 การแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อไวรัสเดงกี้และ/หรือไข้เลือดออก

ผลที่ตามมาก็คือ การระบาดของโรคไข้เลือดออกที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี้หลายสายพันธุ์มีอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นและไข้เลือดออก (DHF) ได้กลายมาเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของเด็กๆในหลายประเทศทั่วโลก

โดยทั่วไป ผู้ป่วยที่เป็นไข้จากเชื้อไวรัสเดงกี้ (DF) จะจำกัดอาการอยู่ ไม่เป็นมากขึ้นจนถึงกับเป็นอันตรายถึงขั้นเสียชีวิตจากการเกิดไข้เลือดออก (DHF) อย่างไรก็ตาม มีปัจจัยเสี่ยงหลายปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเกิดไข้เลือดออก เช่น สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกี้ ชนิดของแอนติบอดี้ต่อเชื้อไวรัสเดงกี้ที่มีอยู่ในร่างกายก่อนแล้ว พันธุกรรมของเจ้าบ้าน อายุ ความเสี่ยงจะสูงขึ้นหากเป็นการติดเชื้อครั้งที่สอง ความเสี่ยงจะสูงขึ้นหากอยู่อาศัยในพื้นที่ที่มีเชื้อไวรัสเดงกี้ตั้งแต่ 2 สายพันธุ์ขึ้นไป ทฤษฎีหนึ่งที่ใช้อธิบายถึงความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการถูกยุงลายที่มีเชื้อไวรัสเดงกี้สายพันธุ์หนึ่งกัดในครั้งที่หนึ่ง และถูกกัดในครั้งต่อมาโดยยุงลายที่มีเชื้อไวรัสเดงกี้คนละสายพันธุ์ เรียกว่า "antibody-dependent enhancement" กล่าวคือ ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อไวรัสเดงกี้สายพันธุ์หนึ่งจะถูกกระตุ้นให้สร้าง non-neutralizing antibody ที่จะเพิ่มความสามารถในการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสเดงกี้สายพันธุ์อื่นที่เหลือ ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเดงกี้อย่างมากและเกิดการติดเชื้อที่รุนแรงขึ้น เซลล์ที่ติดเชื้อก็จะมีการปลดปล่อยสารที่ทำให้เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือดและเกิดเลือดออกขึ้น นอกจากนั้นเนื้อเยื่อที่เป็นเป้าหมายของเชื้อไวรัสเดงกี้อาจเป็นได้ทั้งโมโนนิวเคลียร์เซลล์ และเมกกะคารีโอไซต์ในไขกระดูก

การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี้

ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีวิธีการรักษาที่เฉพาะสำหรับการติดเชื้อไวรัสเดงกี้ ไม่ว่าจะเป็นวัคซีนหรือยาต้านเชื้อไวรัสเดงกี้ การรักษาที่กระทำกันโดยทั่วไปคือการรักษาตามอาการของผู้ป่วยโดยแพทย์และพยาบาล เช่น หากพบว่ามีไข้ ก็ให้ยาพาราเซตามอลสำหรับลดไข้ เป็นต้น แต่จะไม่ใช้แอสไพริน หรือไอบรูโพรเฟน เนื่องจากจะทำให้เกิดอันตรายแก่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี้และอาจทำให้เสียชีวิตได้ สำหรับการรักษาตามอาการดังกล่าวสามารถช่วยชีวิตผู้ป่วยไข้เลือดออกได้เป็นจำนวนมาก ดังนั้นอัตราการตายจึงลดลง

สำหรับการพัฒนาวัคซีนนั้น ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในตอนต้นว่าเชื้อไวรัสเดงกี้ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดโรคได้ และแต่ละสายพันธุ์ยังมีความแตกต่างในด้านของพันธุกรรมที่ทำให้เชื้อสามารถก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคและการแพร่ระบาดของโลกที่ต่างกันด้วย ดังนั้นวัคซีนที่มีประสิทธิภาพกับเชื้อไวรัสเดงกี้สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งหรือเพียงสองสายพันธุ์ ยิ่งจะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคไข้เลือดออกที่มีความรุนแรงมากขึ้น ในขณะนี้ได้มีการดำเนินการศึกษาวิจัยทางคลินิกโดยการใช้วัคซีนที่พัฒนามาจากเชื้อไวรัสเดงกี้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งจะส่งผลให้ร่างกายสามารถสร้างแอนติบอดี้ต่อเชื้อไวรัสเดงกี้ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตาม คงต้องใช้เวลานานอีกหลายปีกว่าที่จะมีวัคซีนสำหรับเชื้อไวรัสเดงกี้ใช้กัน ดังนั้นในช่วงเวลานี้ สิ่งที่เราสามารถทำได้ดีที่สุดคือการป้องกันโรคและการควบคุมยุงลายที่เป็นพาหะนำโรคโดย

1. กางมุ้งนอนโดยเฉพาะในเวลากลางวันเพื่อป้องกันไม่ให้ยุงกัด ไม่เล่นในที่อับและมืด

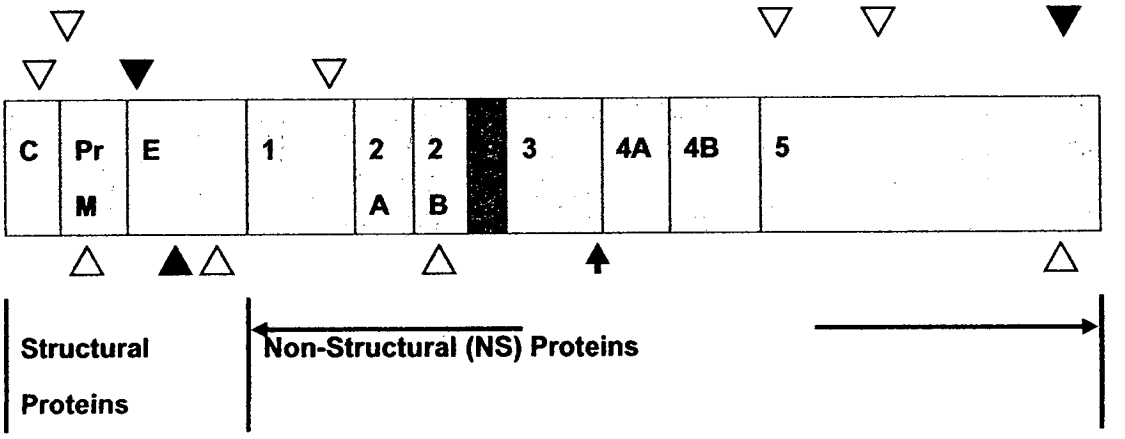
2. ปราบ และทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ซึ่งชอบวางไข่ในน้ำสะอาดที่อยู่นิ่ง ๆ ตามภาชนะต่าง ๆ ที่มีน้ำขัง
3. ในกรณีที่เป็นไข้เลือดออกแล้ว ผู้ป่วยไม่ควรให้ถูกยุงกัดภายใน 5 วันแรกของโรค เพราะผู้ป่วยยังมีไวรัสอยู่ในเลือด ทำให้แพร่เชื้อไปให้คนอื่นได้
4. รายงานคนไข้ไปที่โรงพยาบาล หรืออนามัยจังหวัด เพื่อส่งเจ้าหน้าที่ไปทำการกำจัดยุงบริเวณนั้น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

ในตอนนี้งานวิจัยและพัฒนาส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปยังการหาสารประกอบที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี้ได้อย่างจำเพาะเจาะจง

เชื้อไวรัสเดงกี้และการตัดโปรตีนตั้งต้น

เชื้อไวรัสเดงกี้เป็นสมาชิกของแฟมมิลี่ *Flaviviridae* มียีโนมเป็น RNA สายเดี่ยวแบบ positive ซึ่งสามารถทอดระหัสได้เป็นโปรตีนของไวรัสที่สามารถทำหน้าที่ได้เมื่อผ่านกระบวนการตัดส่วนของโปรตีนตั้งต้น ของเชื้อไวรัส การตัดดังกล่าวเกิดขึ้นในทั้ง 2 ขั้นตอน คือในระหว่างที่กำลังถอดระหัสและหลังจากที่ถอดระหัสเรียบร้อยแล้ว โดยเอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ในการตัดประกอบด้วยเอนไซม์ของเจ้าบ้าน (host protease) และเอนไซม์ของเชื้อไวรัสเดงกี้ (viral protease) ยีโนมของเชื้อไวรัสเดงกี้สายพันธุ์ที่ 2 ประกอบด้วย 10,723 นิวคลีโอไทด์และสามารถทอดระหัสได้เป็นกรดอะมิโนที่ต่อกันเป็นโปรตีนตั้งต้น 3,391ตัว โปรตีนแต่ละชนิดของเชื้อไวรัสจัดเรียงตามลำดับดังนี้ **C-prM-E-NS1-NS2ANS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5** โดย C คือ nucleocapsid, prM คือ โปรตีนตั้งต้นของ membrane protein, E คือ envelope protein และ NS คือ โปรตีนที่มีใช่ส่วนประกอบทางโครงสร้าง กระบวนการตัดจะทำให้ได้โปรตีนที่เป็นโครงสร้าง 3 โปรตีนคือ C, prM และ E และได้โปรตีนที่มีใช่ส่วนประกอบทางโครงสร้างอีก 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 ของเชื้อไวรัสเดงกี้ที่อยู่ในรูปเชิงซ้อนระหว่าง 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 (NA4B-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

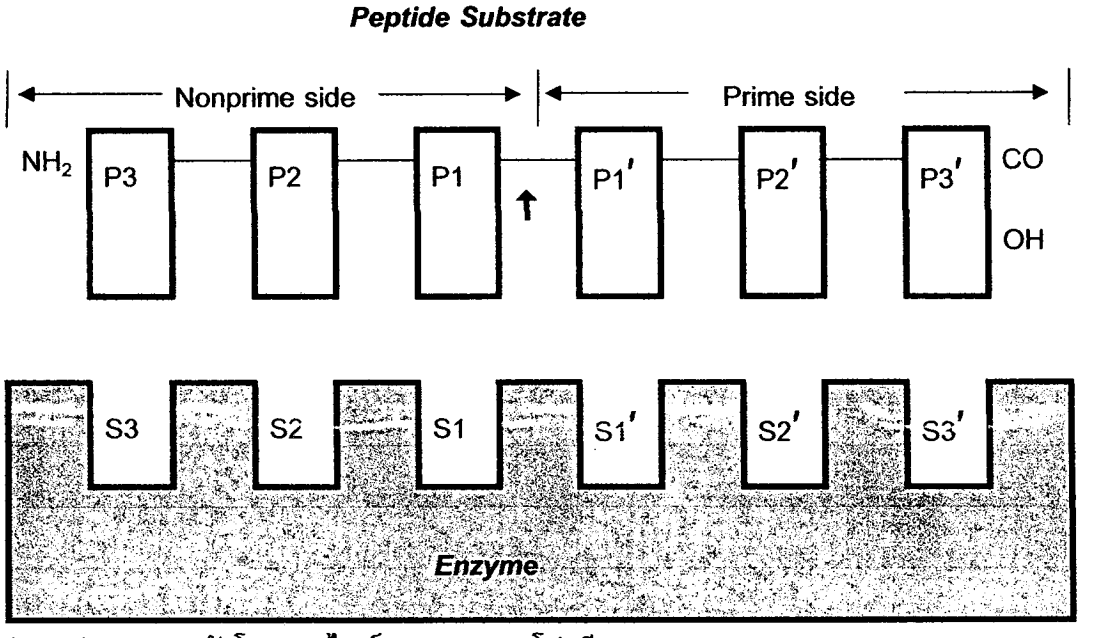
△ ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์ signalase

▲ ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์ furin

↟ ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์โปรตีเอสซนิดที่ไม่ทราบชัดเจน

▼ ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอส

▽ ตำแหน่งอื่นๆของการตัดโดยเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอส



↟ ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอส

รูป 4 วิธีการกำหนดตำแหน่งบนเอนไซม์และซับสเตรทโดย Schechter and Berger

รูปแสดงให้เห็นถึงกรดอะมิโนบนซับสเตรทที่เป็นเปปไตท์เรียกว่าตำแหน่ง P1-Pn จากตำแหน่งของพันธะเปปไตท์ที่ถูกตัดไปปลายด้านที่เป็นกลุ่มอะมิโน และเรียกว่าตำแหน่ง P1′-Pn′ จากตำแหน่งของพันธะเปปไตท์ที่ถูกตัดไปปลายด้านที่เป็นกลุ่มคาร์บอกซิลิก สำหรับตำแหน่งบนเอนไซม์ที่ตรงกันกับตำแหน่งบนซับสเตรทซึ่งจะจับกันพอดีเรียกว่าตำแหน่ง S1-Sn และ S1′-Sn′

เอนไซม์ NS3 โปรตีเอส

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

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

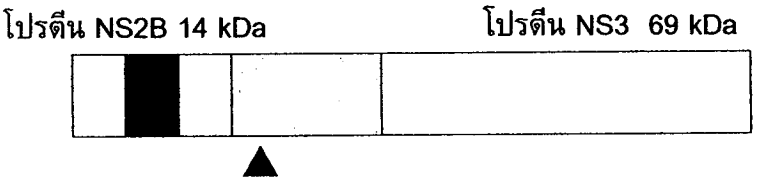
จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ที่ไม่มี NS2B มาจับในรูปเชิงซ้อนเทียบกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ NS3-NS4A โปรตีเอสของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี พบว่าใกล้เคียงกันมาก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีกลไกการกระตุ้นโดยโปรตีนที่เป็นโคแฟคเตอร์ (NS2B: โคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ NS4A: โคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี) ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าตำแหน่งที่มีการจับของซับสเตรทบนเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ค่อนข้างตื้น และไม่พบปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสกับซับสเตรทในตำแหน่งที่ไกลกว่า P2 และ P2′ บนสับสเตรทเมื่อไม่มี NS2B โปรตีนจับกับอยู่กับเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสในรูปเชิงซ้อน

NS2B โคแฟคเตอร์

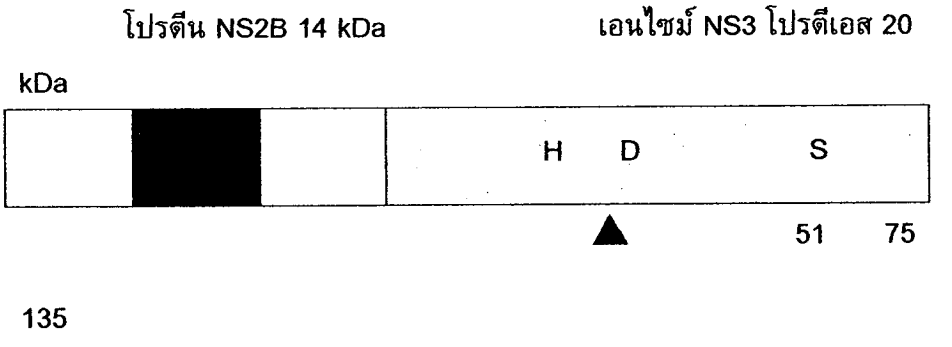
โดยปกติเอนไซม์โปรตีเอสของฟลาวิไวรัส จะสามารถทำหน้าที่ในการตัดซับสเตรทตามธรรมชาติของมันได้ มีความจำเป็นที่จะต้องมีโปรตีนขนาดเล็กหรือที่เรียกว่าโคแฟคเตอร์ ในการทำ

หน้าที่กระตุ้นเอนไซม์โปรตีเอส สำหรับกรณีของเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ แม้จะพบว่าเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสเพียงลำพังมีฤทธิ์ในการตัดซับสเตรทที่มีกรดอะมิโนชนิดเบสสองตัวเรียงต่อกันที่ตำแหน่ง P1 และ P2 แบบที่ไม่ขึ้นกับ NS2B โคแฟคเตอร์ แต่ความสามารถในการตัดซับสเตรทดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอย่างมากเมื่อมี NS2B โคแฟคเตอร์อยู่ในรูปเชิงซ้อนกับเอนไซม์ NS3 โปรตีเอส จากการศึกษาพบว่าจำนวนของกรดอะมิโนเพียง 40 ตัวเท่านั้นที่จำเป็นสำหรับความสามารถของ NS2B โคแฟคเตอร์ในการกระตุ้นเอนไซม์ 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.

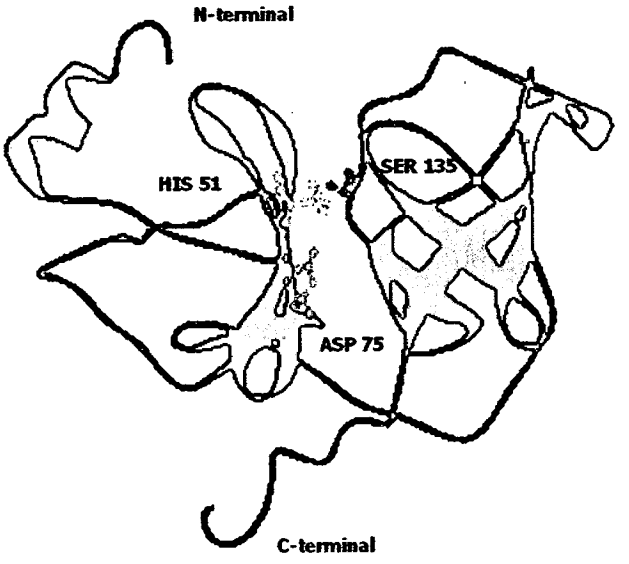


▲ ตำแหน่งของการตัดโดยเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอส

รูป 5 โครงสร้างของเอนไซม์ NS2B-NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้

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

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

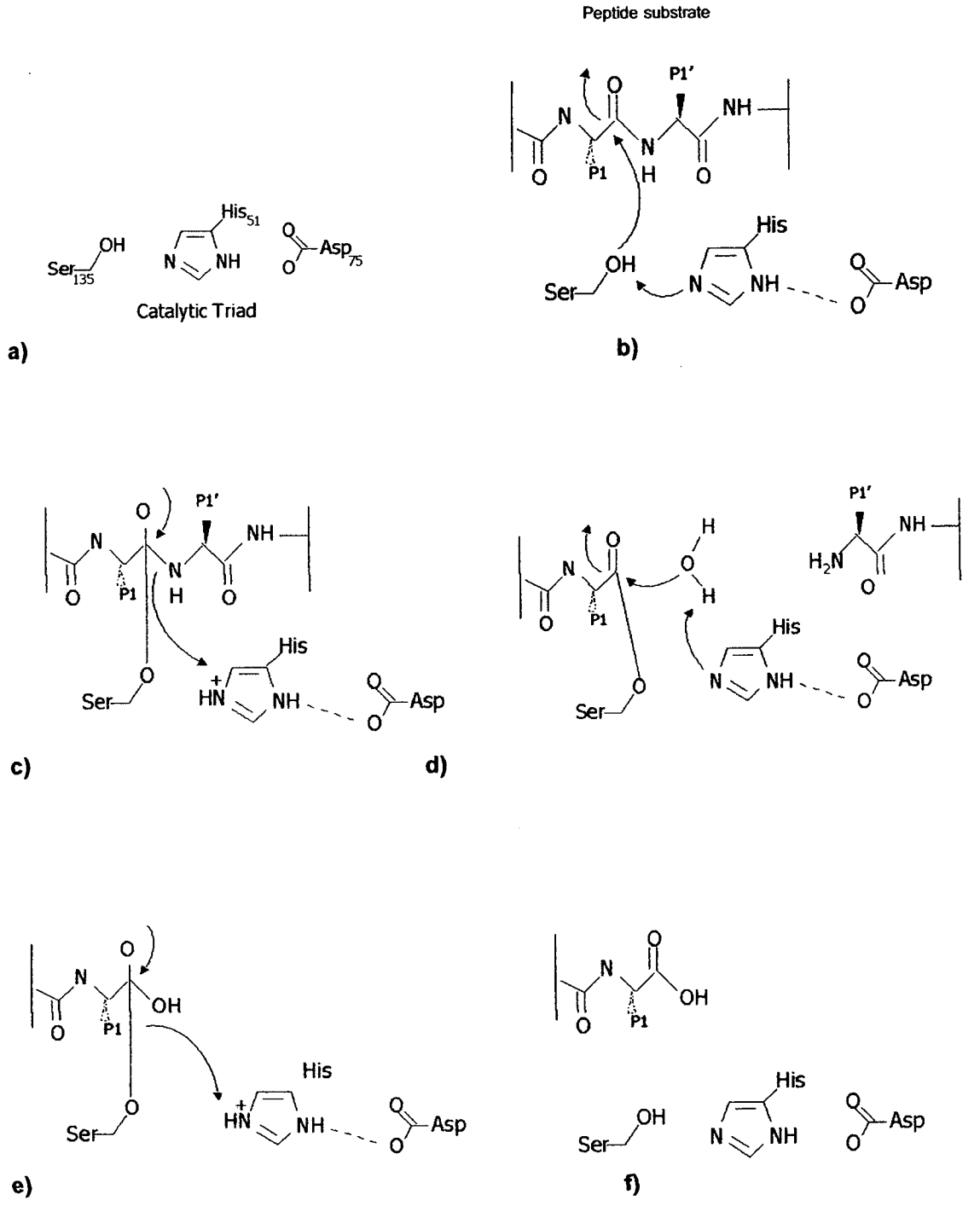


รูป 6 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้

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 ที่ตำแหน่งเชื่อมต่อระหว่าง NS2B(H) และ NS3 โปรตีเอสด้วย การนำตัวเชื่อม (linker) คือ Gly_4-Ser-Gly_4 ซึ่งเป็นกรดอะมิโน 9 ตัวมาเชื่อมต่อระหว่างส่วนของ NS2B(H) กับส่วนของ NS3 โปรตีเอสทำให้ตำแหน่งระหว่าง NS2B(H) และ NS3 โปรตีเอสมีความทนต่อการตัดโดยเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอส และมีความสามารถเพิ่มขึ้นในการตัดซับสเตรทซึ่งเป็นเปปไตท์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ตัวที่มาจากโปรตีนตั้งต้นในตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติ

ความจำเพาะเจาะจงของซับสเตรท

ปัจจุบันนี้ยังมีความพยายามอย่างจำกัดในการที่จะศึกษาวิเคราะห์ถึงคุณลักษณะ และคุณสมบัติของซับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ โดยทั่วไปในการพัฒนาเพื่อหาตัวยับยั้งสำหรับเอนไซม์โปรตีเอสกลุ่มเซอรีน มักจะเริ่มต้นจากเปปไตท์ซับสเตรทซึ่งได้มาจากลำดับของกรดอะมิโนทางฝั่งที่เป็น nonprime side จากตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติ (รูป 4) โดยมีการเปลี่ยนพันธะเอไมด์ให้เป็น electrophile ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโน Ser (ดูกลไกการออกฤทธิ์ของเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน รูป 7) ที่เป็นกรดอะมิโนตัวหนึ่งใน catalytic triad (รูป 5b, 6)



รูป 7 กลไกการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสกลุ่มเซอรีน ของเชื้อไวรัสเดงกี้

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

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

เปปไตท์ที่ติดฉลาก (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 เปปไตท์ที่ติดฉลาก *p*-nitroanilide ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ตัว ที่ได้มาจากลำดับของกรดอะมิโนที่ nonprime side ของตำแหน่งที่มีการตัดของซับสเตรทตามธรรมชาติ พบว่าซับสเตรทที่ดีที่สุดคือ 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 $s^{-1}M^{-1}$ และเมื่อเร็วๆนี้ 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

การพัฒนายาต้านเชื้อไวรัสเดงกี้

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

ที่ผ่านมาได้มีการค้นพบยาที่ใช้ยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน ออกมามากมาย ทั้งที่ได้จากการคัดกรองผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ และการคัดกรองจากสารเคมีต่างๆ วิธีการออกแบบยาอย่างหนึ่งที่นิยมทำกันคือ การใช้ซับสเตรทของเอนไซม์โปรตีเอสในธรรมชาติที่เป็นสายเปปไตท์ มาเป็นโครงสร้างเริ่มต้นในการออกแบบตัวยับยั้ง และต่อด้วยกระบวนการปรับเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในแต่ละ

ตำแหน่งบนสายเปปไตท์ให้เหมาะสม โดยปกติแล้วเปปไตท์ที่ใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบยาเหล่านี้มักจะมีคุณสมบัติทางเภสัชพลศาสตร์ที่ดี เช่น การออกฤทธิ์ของยาเมื่อจับกับตัวรับ แม้กระนั้นก็ตาม จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าเปปไตท์เหล่านั้นไม่สามารถนำมาใช้เป็นยาได้เนื่องจากคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่ไม่ดี เช่น การดูดซึม การกระจายยา การเปลี่ยนแปลงยา และการกำจัดยาออกจากร่างกาย สิ่งเหล่านี้ส่งผลให้มีปริมาณความเข้มข้นของยา ณบริเวณที่ออกฤทธิ์ลดลง ดังนั้นเพื่อที่จะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าว จึงได้มีความพยายามที่จะทำการออกแบบยา โดยเปลี่ยนแปลงจากเปปไตท์ที่ค้นพบว่ามีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสมาเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับเปปไตท์ แต่ไม่ใช่เปปไตท์ที่เรียกว่า peptidomimatics หรือ nonpeptides

ข้อมูลต่างๆที่เป็นรายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติที่ได้จากการศึกษาผลึก หรือ การศึกษา NMR จะช่วยทำให้การออกแบบยาเป็นไปอย่างถูกต้องมีเหตุผลขึ้น การศึกษาถึงตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ (active site) หรือตำแหน่งบนเอนไซม์ที่ซับสเตรทไปจับ (binding site) สามารถทำได้โดยอาศัยการสร้างโมเดลในคอมพิวเตอร์ด้วยซอฟแวร์สำหรับการสร้างโมเดล สิ่งต่างๆเหล่านี้จะช่วยอย่างมากในการออกแบบยา ตัวอย่างของตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน เช่น ตัวยับยั้ง thrombin ตัวยับยั้งเชื้อไวรัส HIV ตัวยับยั้งเชื้อไวรัสตับอักเสบซี ตัวยับยั้งของ ACE (angiotensin-converting enzyme)

โดยทั่วไป ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน จะพัฒนามาจากซับสเตรทที่เป็นเปปไตท์จากด้าน nonprime side เนื่องมาจากข้อเท็จจริงที่ว่าเอนไซม์โปรตีเอสจับกับซับสเตรทได้ดีทางด้าน nonprime side (ดูรูป 5 เมื่อเกิดการตัดสายเปปไตท์ที่เป็นซับสเตรท 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 ที่เป็นกรดอะมิโนตัวหนึ่งที่รวมกันเป็น catalytic triad (Ser, His and Asp) เกิดเป็นสารระหว่างกลางที่มีพันธะโควาเลนท์และสามารถเปลี่ยนแปลงได้ การที่ elcetrophile เหล่านี้มีความสามารถที่จะเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสที่ดี ก็เนื่องจากมันสามารถจับกับกรดอะมิโน Ser ใน catalytic triad ได้ดีกว่าซับสเตรทตามธรรมชาติของเอนไซม์โปรตีเอส และเกิดเป็นสารระหว่างกลางที่มีพันธะโควาเลนท์ จึงเรียกตัวยับยั้งเหล่านี้ว่า serine-trap inhibitors

อย่างไรก็ตาม ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส กลุ่มเซอรีน ที่พัฒนามาจากกรดอะมิโนด้าน prime side ก็มีอยู่จำนวนมากเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาของกรดอะมิโนในด้าน prime side ก็สามารถเพิ่มความชอบในการจับของตัวยับยั้งกับเอนไซม์ ตัวอย่างของตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสกลุ่มเซอรีนที่พัฒนามาจากกรดอะมิโนด้าน prime side เช่น ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรีตีเอสของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี สำหรับการออกแบบและพัฒนายา สิ่งที่ต้องระวังคือ อาการอันไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้ยานั้น ดังนั้นตัวยับยั้งที่นำมาใช้ในมนุษย์ควรที่จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ของเชื้อไวรัสมากกว่าเอนไซม์ของมนุษย์

เมื่อเทียบกับโปรตีเอสของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษามากที่สุดในบรรดาเอนไซม์โปรตีเอสของฟลาวิไวรัส การออกแบบและพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้นับว่ายังจำกัดอยู่ในวงแคบ อย่างไรก็ตาม ในขั้นแรกได้มีการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้โดยใช้เปปไทท์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยเลียนแบบลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติระหว่างโปรตีน NS3 และ โปรตีน NS4A (NS3-NS4A) และระหว่างโปรตีน NS4B และ โปรตีน NS5 (NS4B-NS5) จากตำแหน่ง P6-P2′ (ตารางที่ 1) โดยมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่เกิดการตัดในสายเปปไทท์เป็น α-keto amide ซึ่งไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ พบว่าเปปไทท์ดังกล่าวมีฤทธิ์ในการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ มีค่า K_i อยู่ในช่วงไมโครโมลาร์ และเมื่อมีการแทนที่กรดอะมิโนในตำแหน่ง P1′-P2′ เป็น carboxy terminal aldehyde ในเปปไทท์ที่ได้จากลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติระหว่างโปรตีน NS3 และ โปรตีน NS4A (NS3-NS4A) (Ac-FAAGRR-CHO) ทำให้ได้ตัวยับยั้งที่มีค่า K_i 16 μM เมื่อเร็วๆนี้ เปปไทท์ที่ได้จากลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติระหว่างโปรตีน 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 ได้รับการทดสอบและพบว่ามีฤทธิ์ในการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ แบบแข่งขัน ในขณะที่เปปไทท์ที่ได้จากฝั่ง prime side ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ในความเข้มข้นที่มากกว่า 1 ไมโครโมลาร์ และตัวยับยั้งที่ดีที่สุดคือ เปปไทท์ที่ได้จากลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างตำแหน่งที่มีการตัดตามธรรมชาติระหว่างโปรตีน NS2A และ โปรตีน NS2B (NS2A-NS2B) (Ac-RTSKKR-$CONH_2$) มีค่า K_i 12 μM (ตารางที่ 2)

จากการค้นพบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าฝั่ง nonprime side มีความชอบที่จะจับกับเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ และทำให้สามารถพัฒนาตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อไปได้โดยวิธี combinatorial optimization ด้วยการแทนที่กรดอะมิโนในตำแหน่งต่างๆเพื่อดูว่ากรดอะมิโนตัวใดควรจะอยู่ในตำแหน่งใด จึงจะให้ฤทธิ์ของตัวยับยั้งที่ดีที่สุด นอกจากนั้นก็ยังสามารถทราบถึงขนาดของตัวยับยั้งที่เหมาะสมว่าควรมีขนาดเท่าไหร่ เช่น 2-mer (กรดอะมิโน 2 ตัว) 3-mer (กรดอะมิโน 3 ตัว) หรือ 10-mer (กรดอะมิโน 10 ตัว) เป็นต้น ผลที่ได้พบว่า ขนาดที่เล็กที่สุดของเปปไทท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คือ 2-mer (กรดอะมิโน 2 ตัว) ได้แก่ Ac-KR-$CONH_2$ มีค่า K_i ประมาณ 121 μM (ตารางที่ 2)

ผลดังกล่าวได้รับการยืนยันโดยการทำ molecular docking ระหว่างเปปไทท์ซับสเตรทดังกล่าวกับเอนไซม์ NS3 โปรตีเอส (ไม่มี NS2B(H)) และระหว่างเปปไทท์ซับสเตรทดังกล่าวกับเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสที่ได้จากการทำ homology modeling โดยมีโครงสร้างของเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีเป็นต้นแบบ ซึ่งพบว่าเปปไทท์ซับสเตรทที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสสามารถจับกับตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ (active site) ได้ใกล้และมีค่าพลังงานของการจับที่เหมาะสมกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการจับของซับสเตรทกับเอนไซม์ NS3 โปรตีเอส (ไม่มี NS2B(H)) ซึ่งผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการจับของ NS2B(H) กับ เอนไซม์ NS3 โปรตีเอส น่าที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

comformation ของโปรตีน โดยเฉพาะที่ตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ (active site) จึงทำให้เกิดการจับของซับสเตรทกับตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ได้ใกล้และดีขึ้น

จากขั้นตอนในการพัฒนาตัวยับยั้งของเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ที่กล่าวมาแล้ว แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาตัวยามาเพื่อใช้บำบัด บรรเทา และรักษาการติดเชื้อไวรัสเดงกี้ แต่เนื่องจากโครงสร้าง 3 มิติของผลึกของเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสในรูปเชิงซ้อนของเชื้อไวรัสเดงกี้ยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นจึงอาจต้องใช้เวลาอีกระยะหนึ่งเพื่อให้มีการศึกษาผลึกของเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสในรูปเชิงซ้อน และการศึกษาทาง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ซึ่งจะให้ข้อมูลในรายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม ในขณะนี้ได้มีการศึกษาถึงความจำเพาะเจาะจงของซับสเตรทต่อเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ โดยอาศัย internally quenched peptides ซึ่งจะช่วยเพิ่มความไวในการทดสอบหาซับสเตรทที่สูงขึ้น ในเบื้องต้นพบว่าซับสเตรทที่ได้จาการการใช้เปปไตท์ดังกล่าวมีความชอบในการจับกับเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอส และ ให้ค่า k_{cat}/K_m ที่ดีกว่าซับสเตรทที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดขณะนี้คือ GRR-MCA หลายเท่า และในที่สุดแล้ว มีความเป็นไปได้ว่าจะได้ซับสเตรทที่มีขนาดความยาวที่พอเหมาะ ประกอบกับทราบถึงกรดอะมิโนที่มีความเหมาะสมในตำแหน่งต่างๆด้วย ซึ่งจะช่วยเพิ่มความชอบในการจับกับเอนไซม์ของซับสตรท และการได้มาซึ่งซับสเตรทที่ดีดังกล่าวนี้จะนำไปสู่การคัดกรองหาตัวยับยั้งเอนไซม์ NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ที่มีความแรงสูง 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) ของเชื้อไวรัสเดงกี้สายพันธุ์ที่ 2

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

NH_2-P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-COOH

ตารางที่ 2 ค่า K_i ของเปปไตท์ที่เป็นตัวยับยั้งสำหรับเอนไซม์ NS2B(H)-NS3 โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเดงกี้ สายพันธุ์ที่ 2

เปปไตท์สังเคราะห์	ค่า K_i ของเปปไตท์ (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-AGRR-$CONH_2$	> 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

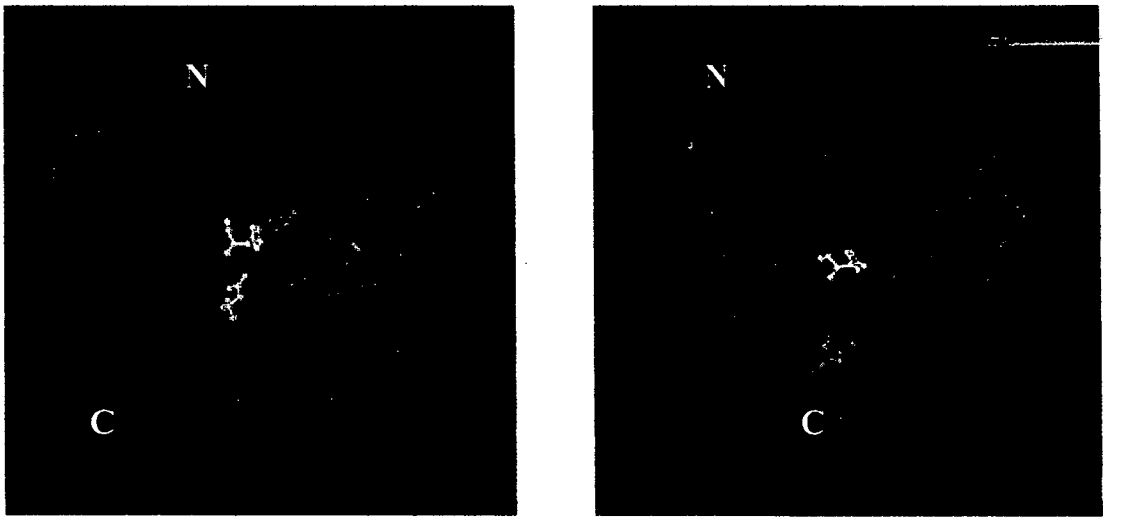
วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี้ 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 ฟ้า และเขียว ตามลำดับ ปลายอะมิโนและคาร์บอกซีระบุเป็น N และ C ตามลำดับ โครงสร้างต่างๆสรางจาก WebLab Viewer Pro 3.7

การสร้างเปปไตท์สำหรับการทำ molecular docking

ชุดของเปปไตท์สำหรับการทำ molecular docking สร้างจาก SYBYL 6.8. โดยแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้:

1. ชุดของเปปไตท์ที่มาจาก N-terminal cleavage site

a) dimer: KR (P_2-P_1), RK (P_2-P_1), RR (P_2-P_1)

b) trimer: GKR (P_3-P_2-P_1), GRR (P_3-P_2-P_1), KKR (P_3-P_2-P_1), **KRR (P_3-P_2-P_1), RRK (P_3-P_2-P_1), KRK (P_3-P_2-P_1), RKR (P_3-P_2-P_1), RKK (P_3-P_2-P_1)**

c) tetramer: AGRR (P_4-P_3-P_2-P_1), SKKR (P_4-P_3-P_2-P_1)

d) pentamer: VKKQR (P_5-P_4-P_3-P_2-P_1), AAGRK (P_5-P_4-P_3-P_2-P_1), AAGRR (P_5-P_4-P_3-P_2-P_1), TSKKR (P_5-P_4-P_3-P_2-P_1), TSTRR (P_5-P_4-P_3-P_2-P_1)

e) hexamer: EVKKQR (P_6-P_5-P_4-P_3-P_2-P_1), FAAGRK (P_6-P_5-P_4-P_3-P_2-P_1) FAAGRR (P_6-P_5-P_4-P_3-P_2-P_1), RTSKKR (P_6-P_5-P_4-P_3-P_2-P_1) TTSTRR (P_6-P_5-P_4-P_3-P_2-P_1)

2. ชุดของเปปไตท์ที่มาจาก C-terminal cleavage site

a) pentamer: AGVLW (P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'), GTGNI (P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'), SLTLN (P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5'), SWPLN (P_1'-P_2'-P_3'-P_4'-P_5')

3. ชุดของเปปไตท์ที่มาจากทั้ง N และ C-terminal cleavage site

a) trimer: RR-S (P_2-P_1- P_1'), KK-S (P_2-P_1- P_1'), KR-S (P_2-P_1- P_1'), RK-S (P_2-P_1- P_1'), RR-G (P_2-P_1- P_1'), KK-G (P_2-P_1- P_1'), KR-G (P_2-P_1- P_1'), RK-G (P_2-P_1- P_1')

b) tetramer: GRR-G (P_3-P_2-P_1- P_1'), GKR-G (P_3-P_2-P_1- P_1'), GKK-G (P_3-P_2-P_1- P_1'), GRK-G (P_3-P_2-P_1- P_1'), KKR-G (P_3-P_2-P_1- P_1'), KRK-G (P_3-P_2-P_1- P_1'), GRR-S (P_3-P_2-P_1- P_1'), GKR-S (P_3-P_2-P_1- P_1'), GKK-S (P_3-P_2-P_1- P_1'), GRK-S (P_3-P_2-P_1- P_1'), KKR-S (P_3-P_2-P_1- P_1'), KRK-S (P_3-P_2-P_1- P_1'), RR-SW (P_2-P_1- P_1'-P_2')

c) pentamer: KKR-SW (P_3-P_2-P_1- P_1'-P_2'), AGRK-S (P_4-P_3-P_2-P_1- P_1')

d) heptamer: RTSKKR-S (P_6-P_5-P_4-P_3-P_2-P_1- P_1'), KKR-SWPL (P_3-P_2-P_1- P_1'-P_2'-P_3'-P_4')

e) octamer: RTSKKR-SW (P_6-P_5-P_4-P_3-P_2-P_1- P_1'-P_2'), FAAGRR-SL (P_6-P_5-P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'), AGRK-SLTL (P_4-P_3-P_2-P_1- P_1'-P_2'-P_3'-P_4')

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

ต่อผลของการจับกับตำแหน่งที่สารออกฤทธิ์และหาความยาวที่เหมาะสมของการเป็นตัวยับยั้งของเปปไตท์

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 โปนจีนถูกวางใน 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 A° เติม Kollman-united atomic charges เข้าไปในเอนไซม์โปรตีเอสและเปปไตท์ที่ทดสอบ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันระหว่างเอนไซม์และไลแกนคำนวณโดยอาศัย docked energies ค่า energies ที่ได้จากการคำนวณรวมถึง intermolecular และ intramolecular interaction energies AUTODOCK รายงาน final docked energies สำหรับการทดลองแต่ละครั้งตาม energy function สำหรับโครงสร้างที่ทำ docking

ผลการทดลอง

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

ตารางที่ 3 Molecular docking ของเปปไตท์ที่มาจากโพลีโปรตีนต่อเอนไซม์ dengue virus NS3pro และ NS2B(H)–NS3pro proteases

เปปไตท์	Docked energy (kcal/mol)		Binding distance (Å)	
	NS3p	NS2B(H)-NS3p	NS3p	NS2B(H)-NS3p
ชุดของเปปไตท์ที่มาจาก 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
ชุดของเปปไตท์ที่มาจาก 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
ชุดของเปปไตท์ที่มาจากทั้ง N และ C-terminal cleavage site				
a) trimer				
[illegible]	-5.62	-8.26	3.75	2.71
[illegible]	-5.91	-8.52	3.43	2.96
[illegible]	-5.84	-8.73	3.65	2.82
[illegible]	-5.42	-8.76	3.61	2.73
[illegible]	-5.51	-8.32	3.84	2.80
[illegible]	-5.72	-8.39	3.52	2.63
[illegible]	-5.86	-8.33	3.59	2.87
[illegible]	-5.72	-8.34	3.71	2.63
b) tetramer				
[illegible]	-5.80	-8.13	3.82	2.83
[illegible]	-5.93	-8.24	3.95	2.72
[illegible]	-5.83	-8.14	3.72	2.61
[illegible]	-5.48	-8.39	3.94	2.75
[illegible]	-5.86	-8.26	3.79	2.83
[illegible]	-5.73	-8.42	3.61	2.73
[illegible]	-5.47	-8.53	3.92	2.83
[illegible]	-5.83	-8.27	3.52	2.91
[illegible]	-5.89	-8.38	3.86	2.73
[illegible]	-5.65	-8.61	3.84	2.68
[illegible]	-5.28	-8.46	4.41	3.26
[illegible]	-5.18	-8.29	4.71	3.21
[illegible]	-7.33	-8.92	5.47	3.31
c) pentamer				
[illegible]	-6.38	-9.53	8.75	5.47

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

การทำนายความเป็นพิษของเปปไตท์ด้วยโปรแกรม DEREK for Windows

เพื่อทำนายความเป็นพิษของชุดเปปไตท์จากการศึกษา Molecular docking ข้างต้น ต้องทำการเตรียมตามขั้นตอนต่อไปนี้

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

ผลการทดลอง

โปรแกรม DEREK for Windows ได้ทำนายความเป็นพิษของชุดเปปไตท์จากการศึกษา Molecular docking โดยทำนายความเป็นพิษที่อาจเกิดในมนุษย์ ในหนู ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ 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

ความเป็นพิษของต่อมไธรอยด์ (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.

เนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุลที่ใช้ทดสอบทั้งหมดเป็นเปปไดท์และสายสั้น เมื่อโปรแกรมทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลความเป็นพิษต่างๆที่มีอยู่กับโครงสร้าง ไม่พบว่าเปปไดท์ทั้งหมดให้ผลพิษ อย่างไรก็ตาม อาจต้องทำการตรวจสอบกับฐานข้อมูล CCIS ต่อไปเพื่อยืนยัน

จากการศึกษาที่ผ่านมา ข้อมูลทั้ง docked energy และ binding geometries ที่ได้จากการทำ molecular docking ระหว่างสารทดสอบกับแบบจำลองของเอนไซม์สายเดี่ยวเชิงซ้อน NS2B(H)-NS3p ของเชื้อไวรัสเดงกี้ โดยใช้โปรแกรม AutoDock เสนอแนะว่าการจับกับเอนไซม์จะดีขึ้นเมื่อมี NS2B cofactor และการจับของเปปไทท์ที่ได้จากการตัดคล้ายกับการจับของซับสเตรทซึ่งสัมพันธ์กัน ในการศึกษานี้แสดงผลที่สอดคล้องกับการวิจัยที่ผ่านมาว่าเปปไทท์ที่ประกอบด้วย 6 อะมิโนแอซิดที่พัฒนามาจากขอบเขตด้าน P1-P6 ของตำแหน่งที่มีการตัดทั้ง 4 ตำแหน่ง มีความสามารถจะเป็นตัวยับยั้งได้ รวมถึงเปปไทท์ FAAGRK, EVKKQR, RTSKKR และ RTSKKR ยิ่งไปกว่านั้น เปปไทท์ที่ประกอบด้วย 5 อะมิโนแอซิดที่พัฒนามาจากขอบเขตด้าน P1-P5 รวมถึงเปปไทท์ AAGRK, VKKQR, TSKKR และ TSKKR ก็มีความสามารถที่จะเป็นตัวยับยั้งได้ด้วย สำหรับเปปไทท์ที่สายสั้นลง เช่น เปปไทท์ SKKR, GKR, GRR, KKR, GKR, KRR, RRK, KRK, RKR, RKK, KR, RK และ RR เปปไทท์เหล่านี้ก็มีความสามารถที่จะเป็นตัวยับยั้งได้เช่นเดียวกัน ในขณะที่เปปไทท์ AGRR มีความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งที่น้อยกว่า โปรแกรม Derek ที่ใช้สำหรับทำนายความเป็นพิษของเปปไทท์ที่ใช้ในการศึกษา Molecular docking แสดงถึงความเป็นพิษที่น้อยสำหรับเปปไทท์ทุกตัว โดยสรุป ผลการทดลองเหล่านี้สามารถนำมาใช้สำหรับการพัฒนาตัวยับยั้งที่มีความแรงต่อเอนไซม์โปรตีเอส NS3 ของเชื้อไวรัสเดงกี้ โดยการทำ combinatorial optimization ร่วมกับการออกแบบตัวยับยั้งประเภท peptidomimetic โดยอยู่บนพื้นฐานของตำแหน่งที่เกิดการตัดตามธรรมชาติของโปรตีนสายยาวเพื่อเพิ่มฤทธิ์และลดความเป็นพิษของตัวยับยั้ง