ว.วิทย. มข. 40(3) 689-707 (2555) KKU Sci. J. 40(3) 689-707 (2012)

เปปไทด์ต้านจุลชีพและความก้าวหน้าในการดัดแปลงโครงสร้าง

Antimicrobial Peptides and Recent Advance in Structural Modifications

สาวิณี นาสมภักดี[1] และ รินา ภัทรมานนท์[1]*

บทคัดย่อ

การดื้อต่อสารต้านจุลชีพเป็นปัญหาในปัจจุบัน เพราะการใช้สารต้านจุลชีพในโรคติดเชื้อต่าง ๆ มีมากขึ้น ทางเลือกหนึ่งคือการใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพ การดัดแปลงโมเลกุลของเปปไทด์ เช่น การเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโน การสลับตำแหน่งกรดอะมิโนภายในโมเลกุล จะเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพ อย่างไรก็ตาม ยังมีการพัฒนาโครงสร้างเปปไทด์ที่น่าสนใจ ได้แก่ การดัดแปลงโครงสร้างให้มีลักษณะเป็นวง การเชื่อมต่อกับน้ำตาล ไขมัน หรือกรดนิวคลีอิก การดัดแปลงในบางกรณีเพิ่มประสิทธิภาพมากกว่า 100 เท่า และลดความเป็นพิษต่อเซลล์ ในการออกแบบหรือคัดเลือกเปปไทด์ต้นแบบเพื่อนำมาดัดแปลงต้องคำนึงถึงโครงสร้างและการทำงานของเปปไทด์ โครงสร้างที่เหมาะสมอาศัยสมบัติแอมฟิพาติก และความเป็นพิษต่อเซลล์ในสิ่งมีชีวิตด้วย

ABSTRACT

Antibiotics resistance has increasingly been a concern as more antibiotics are prescribed for infectious diseases. Alternatives to classical antibiotics are in needed and peptide antibiotics are promising as one of the choices. Generally, modifying peptides like changing amino acid sequence or alternating the order within the sequence could increase antimicrobial activity. However, other peptide modifications are interesting as well. Those are cyclization, linking with sugar, lipids, or nucleic acids. Some of these modifications could yield more than 100 folds of activity and reduce cytotoxicity comparing with the parent peptides. In order to design or choose parent peptide for modification, peptide structure and activity have to be in concern. Suitable structure depends on some factors like amphipathicity and toxicity of peptides.

[1]กลุ่มวิจัยโปรตีนและโปรติโอมิกส์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

*Corresponding Author, E-mail: narin@kku.ac.th

คำสำคัญ : การดื้อสารต้านจุลชีพ ลิโปเปปไทด์ ไซคลิกเปปไทด์ แอมฟิพาติก
Keywords: Antimicrobial resistance, Lipopeptide, Cyclic peptide, Amphipathic

ความสำคัญของการเลือกใช้เปปไทด์

เนื่องจากสิ่งมีชีวิตจำพวก “จุลินทรีย์ก่อโรค” มีการพัฒนาการดื้อต่อสารต้านจุลชีพตามปริมาณการเพิ่มขึ้นของการใช้ยาต้านจุลชีพใหม่ ๆ การดื้อยาเกิดจากเชื้อมีการปรับตัวต่อยาโดยวิธีการต่าง ๆ โดยปกติเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีเชื้อที่มียีนดื้อยาปะปนในธรรมชาติอยู่แล้ว แต่เมื่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ๆ มีการสัมผัสกับยาต้านจุลชีพในปริมาณมากและนานขึ้น ยาจะทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ดื้อยาให้หมดไป แต่ยังคงเหลือส่วนเชื้อจุลินทรีย์ที่ดื้อต่อยาไว้ ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะมีการเจริญเพิ่มจำนวนและแสดงออกเป็นจุลินทรีย์ดื้อยาอย่างสมบูรณ์ต่อไป หรือเชื้อจุลินทรีย์อาจเกิดเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ซึ่งประกอบไปด้วยยีนที่แสดงลักษณะต่างๆ ของเชื้อรวมไปถึงลักษณะการดื้อยาของเชื้อ โดยยีนที่ควบคุมการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ จึงทำให้เกิดการแพร่กระจายการดื้อยาได้รวดเร็ว ดังนั้นจึงเป็นปัญหาก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเชื้อที่ดื้อยา และเมื่อเชื้อก่อโรคดื้อยาต่อยาชนิดหนึ่งแล้วอาจมีการดื้อต่อยาหลาย ๆ กลุ่มด้วย จึงทำให้ทางเลือกของการใช้ยาต้านจุลินทรีย์น้อยลง เช่น การดื้อยา Beta-lactams ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร การดื้อยา fluconazole ในเชื้อ *Candida albicans* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในช่องปากในกลุ่มคนที่เป็นเอดส์ การดื้อยา artemisinin ในเชื้อ *Plasmodium. falciparum* ซึ่งก่อให้เกิดโรคไข้มาลาเรีย (Arjen et al., 2009; Saralamba et al., 2011) อีกทั้งผู้ป่วยบางรายอาจเกิดอาการแพ้ยาต้านจุลชีพได้ แม้ว่านักวิจัยได้คิดค้นสารต้านจุลชีพต่าง ๆ มากมาย แต่ยังมีจำนวนไม่เพียงพอกับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการพัฒนาการดื้อยาที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้นนักวิจัยจึงจำเป็นต้องหาทางเลือกใหม่ที่สามารถช่วยต้านเชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้น และอีกทางเลือกหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสำคัญนั้นคือ การเลือกเอา “เปปไทด์” ที่มีอยู่ในระบบภูมิคุ้มกันของคน สัตว์หรือพืช มาใช้ประโยชน์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเปปไทด์เหล่านี้จัด เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด มีหน้าที่ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่บุกรุกเข้าสู่ร่างกาย กลไกการทำงานหลัก ๆ ของเปปไทด์ที่จะเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ คือ การเข้าทำลายเมมเบรน ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยในการทำให้เมมเบรนเสียสภาพเกิดการซึมผ่านได้ (permeability) แล้วเชื้อจุลินทรีย์จะตายในที่สุด ตัวอย่างของเปปไทด์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตที่สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น เปปไทด์ Hepcidin มีคุณสมบัติต้านเชื้อ *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* และ *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในคน (Park et al., 2001) เปปไทด์ cathelicidin มีคุณสมบัติต้านเชื้อที่ก่อโรคในท่อกระเพาะปัสสาวะ (Chromek et al., 2006) และต้านเชื้อที่ก่อโรคในกระเพาะอาหาร (Wehkemp et al., 2007) เปปไทด์ LL-37 มีคุณสมบัติต้านเชื้อที่ก่อโรคทางผิวหนัง (Ballardini et al., 2009) เปปไทด์ human β-defensin 2-4 (hBD-2,3,4) มีสมบัติต้านเชื้อที่ก่อโรคระบบทางเดินอาหาร (Rahman et al., 2007) เปปไทด์ LL-37 และ β-defensins มีสมบัติต้านเชื้อที่ก่อโรคระบบทางเดินหายใจ (Erles and Brownlie, 2010) เปปไทด์ oligoacyllysines (OAKs) และ tyrocidine A มีสมบัติต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคไข้มาลาเรีย (Radzishevsky et al., 2007; Mogi and Kita, 2009) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดอื่นๆมากมาย แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างของสารต้านจุลชีพ (เปปไทด์) ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

Peptides	Sequence	Source	Activity	Mechanism	Reference
Magainin II	GIGKFLHSAKKFGKAF VGEIMNS	Frog skin	*G+, **G- , *Plasmodium*, pathogenic plant	Permeabilization (flip-flop)	(Speranza et al. 2007; Mor, 2009; Thwaite et al., 2009)
F5W-magainin	GIGKWLHSAKKFGKAFVGE IMNS	Frog skin	G+, G-, *Plasmodium* , *Leishmania*	Permeabilization (flip-flop)	(Guerrero et al., 2004; Imura et al., 2008; Mor, 2009)
Buforin 2	TRSSRAGLQFPVGRVHRLL RK	Toad	G+, G-, *Candida parvum* , Cancer	Entering cells and binding nucleic acids	(Kobayashi et al., 2002; Lee et al., 2004; Uyterhoeven et al., 2008; Mor, 2009)
Cecropin	RWKIFKKIEKVGQNIRDGIV KAGPAVAVVGQAATI	Insect	G+, G-,fungi	Permeabilization	(Xu et al., 2007; Mor, 2009)
Cecropin A	RWKVFKKIEKVGRNIRDGVI KAAPAIEVLGQAKAL	Insect	G+, G- , fungi, *Plasmodium*, cancer	Permeabilization	(Merrifield et al., 1982; Gregory et al., 2008; Suttman et al., 2008; Kokoza et al., 2010)
Cecropin B	KWKIFKKIEKVGRNIRNGIIK AGPAVAVLGEAKAL	Insect	G+,G-, cancer cell , pathogenic plant	Permeabilization	(Alan and Earle, 2002; Xu et al., 2007; Jan et al., 2009)
Dermaseptin O1	GLWSTIKQKGKEAAIAAAK AAGQAALGAL	Skin frog	*Leishmania Schistosoma*, *Trypanosoma cruzi*	Permeabilization	(Mor, 2009; Nicolas and El Amri, 2009; de Moraes, 2011)

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างของสารต้านจุลชีพ (เปปไทด์) ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

Peptides	Sequence	Source	Activity	Mechanism	Reference
Dermaseptin-S4 (DRS-S4)	ALWMTLLKKVLKAAAKAA LNAVLVGANA	Skin frog	bacteria, fungi, *Plasmodium*	Permeabilization	(Dagan et al., 2002; Mor, 2009; Zampa et al., 2009)
Dermaseptin-H3 (DRS-H3)	GLWSTIKNVGKEAAIAAGK AALGAL	Skin frog	G+, G- *Leishmania*	Permeabilization	(Thompson et al., 2007; Nicolas and El Amri, 2009)
Oligoacrllysines (OAKs)	LKLKLKLK LKLKLK	Dermaseptin Dermaseptin	G+, G- *Plasmodium*	Permeabilization	(Radzishevsky et al., 2007; Rotem et al., 2008, Mor, 2009; Epand et al., 2011; Zaknoon et al., 2011)
Bombinin H2/H4	IIGPVLGLVGSALGGLLKKI	Skin frog	G+, G-, *Leishmania, Plasmodium*	Inhibition of cell proliferation	(Mangoni et al., 2006; Mor, 2009; Coccoa et al., 2011)
Temporin A Temporin B	FLPLIGRVLSGIL LLPIVGNLLKSLL	Amphibian skin	G+, G-, *Leishmania*	Inhibition of cell proliferation	(Mangino et al., 2005; Mor, 2009; Chadbourne et al., 2011)
D-HALO-rev	AKKLOHALHOALLALOHL AHOLLAKK	Halo	G+, G-, fungi, *Plasmodium*	Permeabilization	(Mason et al., 2009; Mor, 2009)
NK-2	KILRGVCKKIMRTFLRRISK DILTGKK		G+, G- *Plasmodium*	Permeabilization	(Gelhaus et al., 2008; Mor, 2009; Brandenburg et al., 2010; Hammer et al., 2010)

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างของสารต้านจุลชีพ (เปปไทด์) ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

Peptides	Sequence	Source	Activity	Mechanism	Reference
Drosomycin	DCLSGRYKGPCAVWDNETCRRVCKEEGRSSGHCSPSLKCWCEGC	Insect	fungi, *Plasmodium*	Binds to target surface	(Tian et al., 2008; Mor, 2009; Zhang and Zhu, 2010)
Pyrrhocoricin	VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN	Insect	G+, G-	Inhibition of chaperone-assisted protein folding	(Chesnokova et al., 2004; Markossian et al., 2004; Rosengren et al., 2004)
Histatin 5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY	Human	G+, *Candida, Leishmania*	Receptor-mediated endocytosis	(De Smet and Contreras, 2005; Peter et al., 2010; Huo et al., 2011)
Gramicidin S	Cyclic VOLFPVOLFP	Bac soil	G+, G- *Plasmodium*	Permeabilization	(Rautenbach et al., 2007; Ashrafuzzaman et al., 2008; Jelokhani-Niaraki et al., 2008; Mogi and Kita, 2009)
Tyrothricin A	Cyclic VOLFPFFNQY	*Bacillus brevis*	G+, G- *Plasmodium*	Permeabilization	(Aranda and de Kruijff., 1988; Nakano and Zuber, 1990; Rautenbach et al., 2007)

*G+: gram-positive bacteria, **G-: gram-negative bacteria

อย่างไรก็ตามเชื้อจุลินทรีย์มีพัฒนาการในการดื้อต่อเปปไทด์ ด้วยวิธีการสร้าง proteolytic enzyme มีผลทำให้เอนไซม์ย่อยเปปไทด์ได้ จึงทำให้เปปไทด์ถูกสลายก่อนไปทำลายเชื้อจุลินทรีย์ หรือแม้การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบบางอย่างของเมมเบรนเพื่อลดความเป็นประจุของผิวเมมเบรน มีผลทำให้โอกาส

ของเปปไทด์ที่มีประจุบวกเข้าจับเมมเบรนได้ยากขึ้น ซึ่งเป็นการลดอันตรกิริยา (interaction) ของการจับกันระหว่างเปปไทด์กับ เมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์จึงทำให้เปปไทด์มีความสามารถเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ลดลง ดังนั้นนักวิจัยจึงพยายามคิดค้นหรือดัดแปลงเปปไทด์ให้มีประสิทธิภาพมากพอต่อการต้านเชื้อที่ดื้อต่อเปปไทด์ ซึ่งเปปไทด์ตัวใหม่หรือเปปไทด์ที่จะสามารถทำงานได้มีประสิทธิภาพมากขึ้นนั้นต้องอาศัยคุณสมบัติหลายด้านของเปปไทด์ เช่น ความเป็นประจุของเปปไทด์ ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ความยาวของเปปไทด์ และลักษณะโครงสร้างของเปปไทด์ เป็นต้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเปปไทด์

ขณะที่การค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพยังคงมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น พบว่ามีบางเปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านเชื้อที่ไม่สูงมากนัก หรือบางชนิดมีความสามารถในการต้านเชื้อสูงมากแม้จะใช้ปริมาณความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ต่ำ ๆ นอกจากนี้เปปไทด์บางชนิดมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์เยื่อหุ้มต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตซึ่งถือว่าเป็นอุปสรรคต่อการนำไปพัฒนาหรือประยุกต์ใช้ในทางคลินิก เห็นได้จากค่าการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงในงานวิจัยต่าง ๆ (Huang and Chen, 2010) โดยแสดงเป็นค่าความเข้มข้นสูงสุดของเปปไทด์ที่ไม่ทำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (maximum haemolytic concentration; MHC) ขณะที่ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์จะต้องใช้เปปไทด์ในความเข้มข้นต่ำที่สุด ที่สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงที่สุด (minimum inhibitory concentration; MIC) นอกจากนี้สิ่งที่นำมาใช้เป็นดัชนีในการเลือกเปปไทด์มาใช้ในทางคลินิก คือ ดัชนีการรักษา (therapeutic index) ซึ่งเป็นค่าอัตราส่วนของ MHC และ MIC ถ้าพบว่าค่าดัชนีการรักษามีค่าที่ต่ำ จึงถือได้ว่าสามารถนำมาใช้ในงานคลินิกได้ โดยทั่วไปฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของเปปไทด์จะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ของเปปไทด์ที่สรุปได้ดังตารางที่ 2 ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ ดังนั้นนักวิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของปัจจัยต่าง ๆ ที่จะมีผลต่อการพัฒนาประสิทธิภาพของเปปไทด์ ทั้งในแง่ของการสังเคราะห์เปปไทด์ขึ้นใหม่หรือการดัดแปลงเปปไทด์ดั้งเดิม

1. สมบัติความเป็น amphipathicity เปปไทด์ควรมีคุณสมบัติที่เป็นได้ทั้ง hydrophilic (เป็นประจุบวก) และ hydrophobic เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน คุณสมบัติเหล่านี้มีความสำคัญต่อการทำงานของเปปไทด์ ในแง่ของการเข้าจับบนเมมเบรนและการเคลื่อนเข้าไปภายในเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์ ถ้าหากเปปไทด์มีความเป็นประจุบวกมาก (highly cationic) จะมีผลทำให้ฤทธิ์การเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ลดลงและการเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะรวมกลุ่ม แต่ถ้าหากเปปไทด์มีความไม่ชอบน้ำมาก (highly hydrophobic) จะมีผลทำให้เปปไทด์ไม่สามารถละลายน้ำได้ จึงทำให้เปปไทด์เกิดการรวมกลุ่มกันเอง (aggregation) และยังมีผลทำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ อีกทั้งอาจจะทำให้เกิด ความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Jiang et al., 2008)

2. สมบัติความเป็นประจุ โดยทั่วไปเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติทำลายเชื้อมักจะเป็นประจุบวก ซึ่งคุณสมบัตินี้มีความสำคัญเป็นอย่างมากในขั้นตอนการเข้าจับกันระหว่างเมมเบรนกับเปปไทด์ โดยที่เปปไทด์นั้นจะใช้ส่วนที่มีคุณสมบัติเป็นประจุบวก (cationic) ทำหน้าที่จับบนเมมเบรน (membrane docking) ซึ่งจะมีคุณสมบัติเป็นประจุลบของส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่มีหมู่ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) จากนั้นเปปไทด์จะใช้ส่วนที่มี

คุณสมบัติไม่ชอบน้ำ เคลื่อนตัวเข้าไปภายในชั้นเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์ จนทำให้เมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์เกิดการเสียสภาพ นอกจากนี้ยังสำคัญต่อการควบคุมการเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง ซึ่งก่อนหน้านี้มีการศึกษาผลของประจุที่มีต่อการทำงานทางชีวภาพของเปปไทด์ L-V13K ที่มีขนาด 26 ลำดับกรดอะมิโน ด้วยการศึกษาค่าประจุที่ -5 ถึง +10 พบว่าที่ประจุบวกมีความสำคัญต่อการทำงานของเปปไทด์และการควบคุมการเกิดการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเพิ่มขึ้นถึง 32 เท่า (Jiang et al., 2008) ดังรูปที่ 1

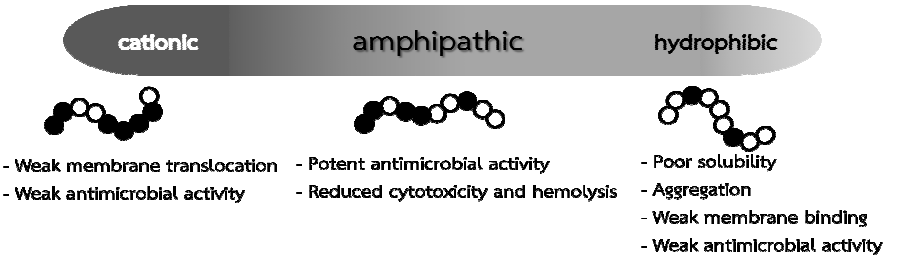
3. สมบัติความเป็น hydrophobicity เป็นปัจจัยสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activities) (Jiang et al., 2008) โดยคุณสมบัตินี้จะทำงานร่วมกับคุณสมบัติของความเป็นประจุบวก กล่าวคือ เมื่อเปปไทด์ใช้ด้านที่เป็นประจุบวกจับบนเมมเบรน จากนั้นส่วนของเปปไทด์ด้านไม่ชอบน้ำจะทำหน้าที่เคลื่อนเข้าไปภายในเมมเบรน ซึ่งจะทำให้เปปไทด์อยู่ภายในส่วนหางของฟอสฟอลิพิดเมมเบรน จนในที่สุดเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์จะเกิดการเสียสภาพไป

4. ลำดับกรดอะมิโน ซึ่งถือได้ว่าเป็นส่วนสำคัญอย่างหนึ่ง โดยเปปไทด์ควรประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic residue มากกว่า 50% ของกรดอะมิโนทั้งหมด (Tossi et al., 2000) เพื่อให้สอดคล้องกับคุณสมบัติของการเป็น amphipathic peptide

5. สมบัติการเกิดโครงสร้างเกลียว α-helix (helicity) มีผลต่อการเกิด toxicity ของ neutral membrane ของเซลล์ยูคาริโอต และถ้าหากลดความเป็น helicity ลงจะทำให้การเข้าทำลายเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์ลดลง (Gregory et al., 2008)

6. สมบัติ self-association เกี่ยวข้องกับการม้วนพับโปรตีน ขณะที่อยู่ในเมมเบรน เปปไทด์จะเกิดม้วนพับ (folding) ให้ถูกต้องเพื่อที่จะทำให้เกิดการวางตัวบนเมมเบรนอย่างเหมาะสมและสามารถทำลายเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้เกิดการเสียสภาพได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบความสามารถของการรวมตัวของเปปไทด์ (self-association ability) ด้วย reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ได้ โดยจะอาศัยคุณสมบัติ hydrophobicity ชะด้วยสารละลายที่มีขั้วมากกว่า (Huang et al., 2010)

7. ลักษณะ D-form ของเปปไทด์ เปปไทด์ควรอยู่ในรูปของ D-form เพื่อคงความเสถียรของเปปไทด์ โดยปกติเปปไทด์จะอยู่ในโครงสร้าง L-form แต่เมื่อ L-form peptide เข้าไปภายในร่างกายมักจะถูกทำลายจาก protease ที่มีภายในร่างกาย เนื่องจากร่างกายถือว่า L-form peptide จัดเป็นสิ่งแปลกปลอม ร่างกายจึงจำเป็นต้องกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้น ๆ ออกไป ดังนั้นการเลือกใช้เปปไทด์ควรเลือกใช้เปปไทด์ที่อยู่ในรูป D-form เมื่อเปปไทด์ (D-form peptide) เข้าสู่ร่างกายแล้วจะไม่ถูกทำลายจาก protease ภายในร่างกาย เนื่องจากมีโครงสร้างของ binding site ที่ต่างกัน จึงทำให้ไม่ถูกทำลายจาก protease ของร่างกาย แม้ว่าการทำงานของเปปไทด์ที่มีโครงสร้าง L-form และ D-form มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักก็ตาม เปปไทด์ที่อยู่ในรูป D-form จะมีช่วงชีวิต (half life) นานกว่าเปปไทด์ที่อยู่ในรูป L-form ทั้งนี้เพื่อให้เปปไทด์สามารถเข้าไปทำลายเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์ให้เกิดการเสียสภาพได้



รูปที่ 1 แสดงคุณสมบัติ amphipathicity ของเปปไทด์

นอกจากนี้ความสำคัญในแง่ของลักษณะโครงสร้างของเปปไทด์ ทั้งเปปไทด์ลักษณะสายตรงและเป็นวง (linear และ cyclic peptides) ได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวกำหนดเบื้องต้นเพื่อตัดสินใจเลือกเปปไทด์ และนำมาใช้ประยุกต์ในงานต่าง ๆ ซึ่งนักวิจัยค้นพบว่าโครงสร้างเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นวง (cyclic peptide) จะช่วยเพิ่มคุณสมบัติในการเลือกจับเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีมากขึ้น เนื่องจากช่วยเพิ่มความหนาแน่นของประจุและสามารถเข้าจับบนเมมเบรนของเชื้อได้ดี เช่น งานวิจัยของ Mika และคณะมีการทำ cyclization ในเปปไทด์ BPC194 พบว่ามีความสามารถในการต้านเชื้อก่อโรคในพืชมากขึ้น อีกทั้งลดการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์สายตรง BPC193 (Mika et al., 2011) และนอกจากนี้ในงานวิจัยอื่น เช่น เปปไทด์ gramicidin S และเปปไทด์ tyrocidin A ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างของเปปไทด์ลักษณะเป็นวง มีคุณสมบัติต้านเชื้อก่อโรค (*P. falciparum)* ในระดับไมโครโมลาร์ (micromaloar) (Mor, 2009) และยังช่วยลดการแตกของเม็ดเลือดแดง เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ลักษณะสายตรง (Jelokhani-Niaraki et al., 2008; Aranda and De Kruijff, 2008)

ตารางที่ 2 คุณสมบัติด้านต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของ peptide

Parameters	Properties
สมบัติความเป็น amphipathic	เปปไทด์ควรมีคุณสมบัติที่เป็นทั้ง hydrophobic และ hydrophilic
สมบัติความเป็น hydrophilicity	มีความสำคัญต่อการทำงานในส่วนการเข้าจับบนเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์
สมบัติความเป็น hydrophobicity	มีความสำคัญต่อการเคลื่อนเปปไทด์เข้าผ่านชั้นเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์
ลำดับกรดอะมิโน	เปปไทด์ควรประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic residue มากกว่า 50% ของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด
สมบัติ helicity	มีความสำคัญต่อการเกิด toxicity ของ neutral membrane และการลดความเป็น helicity ลงจะทำให้ลดการเข้าทำลายเมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์
สมบัติ self-association	สำคัญต่อการม้วนพับเปปไทด์ เพื่อให้อยู่ในโครงสร้างที่สามารถทำงานได้ และเกิดการวางตัวบนเมมเบรนอย่างเหมาะสม
ลักษณะโครงสร้างของเปปไทด์	ควรจะมีโครงสร้างที่เป็น D-form

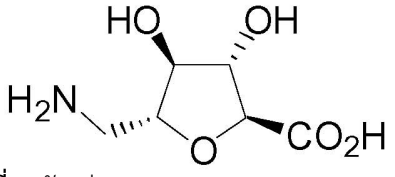
ถ้าหากเปปไทด์ชนิดหนึ่งถูกออกแบบมาให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมแล้ว เปปไทด์ชนิดนั้นก็สามารถทำหน้าที่ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์ต่างๆ ด้วย อย่างไรก็ตามคงไม่มีเปปไทด์ชนิดใดที่มีประสิทธิภาพในทุกด้าน และสามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้เพียงปริมาณที่เล็กน้อยมากหรือไม่เป็นพิษต่อเซลล์อื่น ๆ หรือที่เรียกว่าเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติดีครบทุกประการ แต่อาจมีส่วนดีบ้าง ส่วนเสียบ้าง หรืออาจจะเป็นไปได้ที่เชื้อจุลินทรีย์มีการพัฒนาการดื้อต่อเปปไทด์มากขึ้นเรื่อย ๆ จนทำให้เปปไทด์ชนิดที่ถูกออกแบบหรือสังเคราะห์ขึ้นมานั้นไม่สามารถต้านเชื้อที่ดื้อต่อเปปไทด์ได้ แม้ว่าเปปไทด์เหล่านั้นจะถูกออกแบบมาอย่างดีแล้วก็ตาม นอกจากนี้ในแง่ของการนำไปใช้จริงในชั้นคลินิกพบว่า บางเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นสายตรงที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นเกลียว (helical structure) หรือ เบต้า (beta structure) ให้ผลการทำงานที่ไม่น่าพอใจนัก เนื่องจากบางเปปไทด์ยังมีผลกระทบต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง หรือเซลล์ต่าง ๆ เช่น เปปไทด์ BP series ของ Mika และคณะมีการวิจัยในช่วงแรก ด้วยการสร้างเปปไทด์ในกลุ่ม BP ให้มีคุณสมบัติเป็นประจุและ amphipathicity แล้วอีกทั้งมีโครงสร้างเป็นแบบ α-helix (linear peptide) ซึ่งจากการทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่ามีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในระดับไมโครโมลาร์ (2.5-7.5 μM) แต่เมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงพบว่า เปปไทด์บางตัวนั้นยังมีผลทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ (Jiang et al., 2008) แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของ α-helix นั้นไม่เป็นตัวที่จะสามารถนำมาใช้ได้จริง หรืออาจจะเป็นไปได้ที่โครงสร้างของเปปไทด์สายตรงเหล่านั้นไม่เหมาะกับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ต้องมีการพัฒนาการออกแบบเปปไทด์หรือสารต้านจุลชีพมากขึ้นเรื่อย ๆ และในปัจจุบันนักวิจัยมีการคิดค้นดัดแปลงเปปไทด์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ด้วยการนำเอาเปปไทด์ไปเชื่อมกับโมเลกุลอื่น ๆ อย่างเช่น อนุพันธ์น้ำตาล ไขมัน กรดนิวคลีอิค เป็นต้น รวมไปถึงการค้นพบเปปไทด์ลักษณะใหม่ ๆ จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ซึ่งมีส่วนประกอบที่เป็นกรดอะมิโนและโมเลกุลอื่น ๆ เช่น lipopeptide ดังนั้นการออกแบบโมเลกุลของเปปไทด์ที่ดัดแปลงด้วยการเชื่อมต่อกับโมเลกุลต่าง ๆ จึงมีส่วนที่ช่วยในการพัฒนาประสิทธิภาพและเพิ่มจำนวนของเปปไทด์ดัดแปลงมากยิ่งขึ้น เพื่อจะสามารถนำเอาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะในทางคลินิก

ทางเลือกใหม่ของการดัดแปลงเปปไทด์

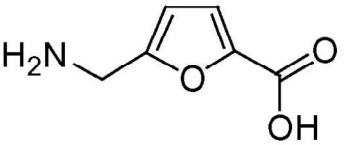
1. เปปไทด์เชื่อมต่อกับน้ำตาล (Peptide linked with sugar)

ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสนใจเกี่ยวกับการออกแบบโมเลกุลของสารต้านจุลชีพด้วยการนำเอาเปปไทด์เชื่อมต่อกับโมเลกุลของน้ำตาล หรือที่เรียกว่าน้ำตาลกรดอะมิโน (sugar amino acid) ซึ่งเป็นการนำเอาคุณสมบัติเด่นของแต่ละโมเลกุลทั้งของเปปไทด์และน้ำตาลมาดัดแปลงและเชื่อมต่อกัน เพื่อหวังให้ได้สารต้านจุลชีพมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่ง sugar amino acids (SAAs) เป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างน้ำตาลประกอบด้วยเอมีน (amine) และคาร์บอกซิเลต (carboxylate) จึงทำให้โครงสร้างเหมือนมีทั้งคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโน (Chakraborty et al., 2005) ซึ่งน้ำตาลอะมิโนมีทั้งอนุพันธ์ของมอโนแซ็คคาไรด์ ซึ่งจะมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C2 ถูกแทนที่ด้วยหมู่อะมิโน ($-NH_2$) อนุพันธ์ที่สำคัญได้แก่ กลูโคซามีน (glucosamine) และกาแลกโทซามีน (galactomanine) ซึ่งในหลายงานวิจัยมีการ

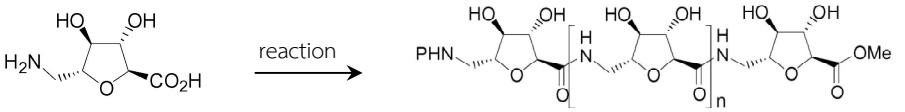
นำเอาน้ำตาลในโครงรูปของไพแรนโนส (pyranose sugar) และน้ำตาลในโครงรูปฟูแรนโนส (furanose sugar) นำมาดัดแปลงด้วยการเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งคาร์บอนของวงแหวน ดังรูปที่ 2 และ 3 ซึ่งนักวิจัยให้ความสนใจเกี่ยวกับน้ำตาลกรดอะมิโน โดยนำมาใช้ในการออกแบบโครงสร้างเป็น oligermeric ที่มีลักษณะคล้ายคลึง oligosaccharide หรือ oligopeptide ซึ่งสามารถทำได้ทั้งในส่วนที่เป็นโครงสร้างเชิงเส้นและโครงสร้างแบบวง โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี เพื่อให้ได้โครงสร้างที่เป็น oligosaccharide หรือ oligopeptide เช่น การเกิดเป็นโครงสร้างเชิงเส้นของ 6-amino-2,5-anhydro-6-deoxy-D-mannonic acid และการเกิดเป็นโครงสร้าง Cyclooligomer ของ furan amino acid ดังรูปที่ 4 และ 5 ตามลำดับ (Chakraborty et al., 2005) การสร้างโครงสร้างของน้ำตาลกรดอะมิโนเหล่านี้สามารถนำไปสร้างเป็นสารชีวโมเลกุลใหม่หรือสารปฏิชีวนะ เช่น Erythromycin และ Cobalmycin ที่มีน้ำตาลกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ โดยนำไปใช้เป็นยาสำหรับต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ หู ตา คอ เยื่อบุอ่อน และผิวหนัง



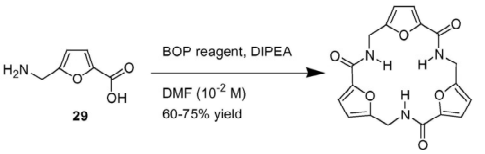
รูปที่ 2 ตัวอย่างของ pyran amino acid; 6-amino-2,5-anhydro-6-deoxy-D-mannonic acid (Chakraborty et al., 2005)



รูปที่ 3 ตัวอย่างของ furan amino acid (Chakraborty et al., 2005)



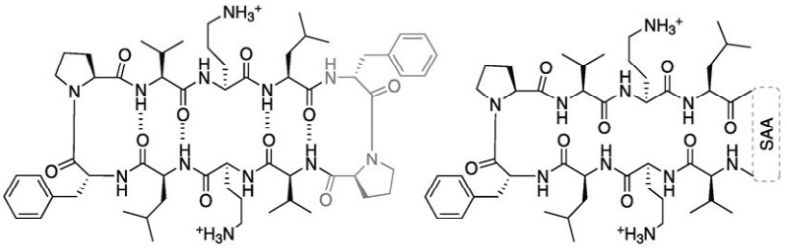
รูปที่ 4 การเกิด Oligomerization ของ 6-amino-2,5-anhydro-6-deoxy-D-mannonic acid (ดัดแปลงจาก Chakraborty et al., 2005)



รูปที่ 5 การเกิด Cyclooligomerization ของ furan amino acid (Chakraborty et al., 2005)

ปัจจุบันมีการดัดแปลงนำเอาเปปไทด์มาเชื่อมต่อด้วยน้ำตาล เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเปปไทด์นั้น ๆ โดยอาศัยคุณสมบัติของความชอบน้ำ (hydrophilic) ของคาร์โบไฮเดรต (หน่วยน้ำตาล) ในการออกแบบเปปไทด์เพื่อปรับปรุงหรือเพิ่มคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีวเคมีเมื่อ

เปรียบเทียบกับเปปไทด์ต้นแบบ จะเห็นได้ว่าน้ำตาลกรดอะมิโนนั้นมีความสำคัญในแง่ของการนำหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลมาใช้ประโยชน์ในวงกว้าง โดยเฉพาะในงาน peptidomimetics ซึ่งเป็นการทำเปปไทด์เลียนแบบและมีส่วนของหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ของน้ำตาลกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยปลายที่เป็นหมู่อะมิโน (amino termimi) และหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl termimi) ซึ่งสามารถจะใช้เป็นตัวเชื่อม (adaptor) ในขั้นตอนของการสังเคราะห์ด้วยวิธีการ solid-phase method จึงทำให้สามารถสร้างได้หลาย ๆ โมเลกุล ซึ่งอาจจะใช้สร้างเป็นกลุ่มอนุพันธ์ของ biopolymer ได้ ด้วยคุณสมบัติ nonproteinogenic ของน้ำตาลกรดอะมิโนจะช่วยทำให้คุณสมบัติทางกายภาพมีความเสถียรมากขึ้น (Jensen and Brask, 2005) เช่น การนำเปปไทด์ Gramicidin S ซึ่งมีลักษณะเป็นวง มาดัดแปลงด้วยการเชื่อมด้วยโมเลกุลน้ำตาลชนิดต่างๆในบริเวณ β-turn ของเปปไทด์ ดังรูปที่ 6 เปปไทด์ที่ถูกดัดแปลงด้วยการเชื่อมต่อกับน้ำตาลไพรานอยด์ (pyranoid) มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีเทียบเท่ากับเปปไทด์ต้นแบบ และที่สำคัญยังสามารถลดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ถึง 10 เท่าของเปปไทด์ต้นแบบ (Knijnenburg et al., 2011) ซึ่งชี้ให้ว่าการดัดแปลงเปปไทด์โดยอาศัยน้ำตาลกรดอะมิโน มีส่วนช่วยพัฒนาคุณสมบัติในการลดผลกระทบที่มีต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง และคาดว่า น้ำตาลกรดอะมิโนซึ่งเป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรตมีความสำคัญในกระบวนการจดจำระหว่างเซลล์ (cell-cell recognition process) โอลิโกแซคคาไรด์และโมเลกุลของน้ำตาลสามารถรักษาหรือต้านโรคต่าง ๆ ได้ (Chakraborty et al., 2005) การดัดแปลงนี้สามารถเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาเปปไทด์หรือยาต่อไป

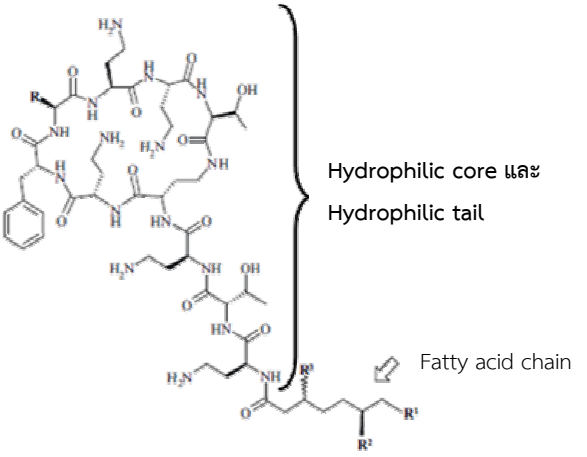


Gramicidin S (GS) Modified Gramicidin S

รูปที่ 6 การดัดแปลง Gramicidin S ด้วยการเชื่อมน้ำตาลกรดอะมิโน (SAA) ที่บริเวณ β-turn (Erle and Brownlie, 2010)

2. เปปไทด์เชื่อมต่อกับไขมัน (Peptide linked with lipid)

ลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ มีลักษณะเป็นสายเปปไทด์เชื่อมต่อด้วยไขมัน พบได้ใน secondary metabolites ของแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของ *Bacillus* ซึ่งจะมีการหลั่งลิโปเปปไทด์ออกมาพร้อมกับสารคัดหลั่ง มีรายงานว่า ลิโปเปปไทด์มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ในกลุ่มของ cyclic lipopeptide เช่น polymyxins จัดเป็น cationic cyclic peptide เป็นสาร secondary metabolites ที่ได้จากเชื้อ *Bacillus polymyxa* ซึ่งได้แก่ polymyxin B และ polymyxin E ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* ที่เป็นสาเหตุก่อโรคปอดบวม และทางเดินปัสสาวะอักเสบ (Gupta et al., 2009)



รูปที่ 7 โครงสร้างของลิโปเปปไทด์ polymyxin B ที่ ประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophilic core และ ส่วนที่เป็น hydrophilic tail (Pirri et al., 2009)

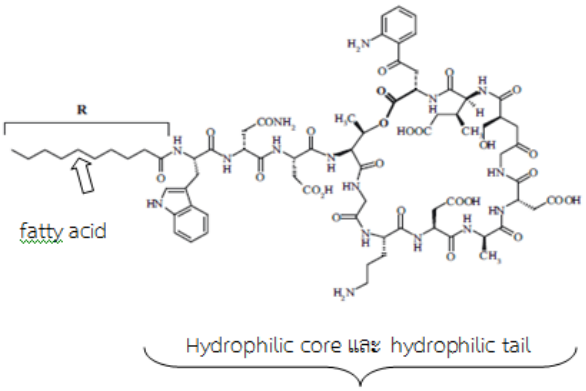
นอกจากนี้ยังมี polymyxin M (mattacin) ผลิตได้จากเชื้อ *Paenibacillus kobensis* ซึ่งมีการนำไปใช้ในทางคลินิกเช่นกัน

polymyxins มีโครงสร้างที่เป็นส่วน hydrophilic core และส่วนที่เป็น hydrophilic tail ซึ่งทางด้าน N-terminal ของกรดอะมิโนจะเชื่อมต่อด้วยหมู่เอซิล (acyl group) ขณะที่ด้าน C-terminal เชื่อมต่ออยู่กับโมเลกุลของกรดอะมิโนเอง ดังรูปที่ 7 ความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ จะอาศัยกลไกของลิโปเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติจับอย่างจำเพาะกับ lipopolysaccharide (LPS) ที่เป็นส่วนประกอบที่อยู่บนเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ของแบคทีเรียแกรมลบ นำไปสู่การแทนที่ของแคลเซียม (Ca^{2+}) และแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรของ LPS บนเมมเบรน และการเสียสภาพของเมมเบรนตามมา ทำให้เซลล์ตายไปในที่สุด (Gupta et al., 2009)

นอกจากนี้ยังมีลิโปเปปไทด์ daptomycin จัดเป็น cyclic peptide ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากในทางคลินิก โดยเฉพาะในการต้านเชื้อจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีประสิทธิภาพต้านเชื้อได้รวดเร็วมากเมื่อเทียบกับสารต้านจุลชีพอื่นๆ ที่ใช้ในปริมาณเท่ากันซึ่งเป็นเพียงเปปไทด์ธรรมดา (Silverman et al., 2003) เนื่องด้วยลักษณะโครงสร้างของลิโปเปปไทด์ daptomycin ที่มีส่วนที่เป็น hydrophilic core และส่วนที่เป็น hydrophiliic tail ซึ่งทางด้าน N-terminal จะเชื่อมด้วย decanoyl side chain ขณะที่ด้าน C-terminal จะเชื่อมต่ออยู่กับโมเลกุลของกรดอะมิโนเองเช่นเดียวกับลิโปเปปไทด์ polymyxins ดังรูปที่ 8 จึงทำให้มีกลไกในการออกฤทธิ์ต่างไปจากสารต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ เช่น methicillin-resistant *Staphylo-coccus aureus* และ vancomycin-resistant enterococci เป็นต้น (Silverman et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ไม่พบการดื้อยาข้ามกลุ่มของยาต้านจุลชีพด้วยและยังมีผลข้างเคียงต่อเซลล์อื่นน้อยมากหรือไม่มีเลย (Mangili et al., 2005) ลิโปเปปไทด์ daptomycin จะเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้โดย daptomycin เข้าจับบนเมมเบรนของแบคทีเรีย

และออกฤทธิ์อย่างรวดเร็ว ซึ่งไปรบกวนการทำหน้าที่ของเมมเบรนโดยอาศัย acyl tail ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำแทรกตัวเข้าไปในชั้นของ cytoplasmic membrane ซึ่งจะเกิดเป็นรูขึ้น จากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิด depolarization ของเมมเบรน อีกทั้งยังเกิดการไหลเข้า-ออกของอิออนหลาย ๆ ชนิด จนทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Silverman et al., 2003) กลไกดังกล่าวแสดงให้เห็นว่านอกจากความสำคัญของความเป็นประจุที่จะต้องทำหน้าเกี่ยวข้องกับการจับบนเมมเบรนหรือ membrane docking แล้ว การเคลื่อนตัวเพื่อสอดแทรกผ่านชั้นเมมเบรนก็มีส่วนสำคัญด้วย กล่าวคือ ลิโปเปปไทด์จะมีส่วนที่เป็น fatty acid ที่อยู่ตรงบริเวณหาง (tail) จะมีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนตัวสอดแทรกผ่านชั้นเมมเบรน โดยที่ให้ส่วนที่เป็น hydrophilic tail ทำหน้าที่จับบนเมมเบรนเสียก่อน เพื่อที่ส่วน fatty acid จะได้เคลื่อนสอดแทรกได้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น

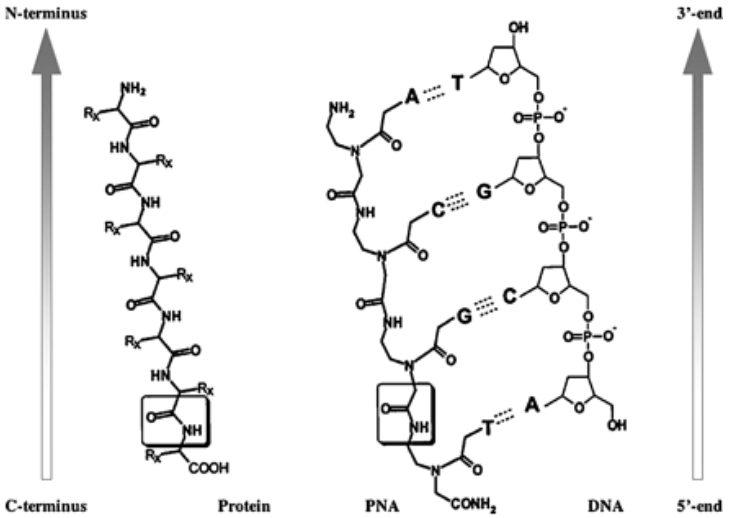
ด้วยคุณสมบัติพิเศษเหล่านี้จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์หันมาให้ความสนใจ และความสำคัญในการพัฒนาและดัดแปลงสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเชื่อมต่อเข้ากับไขมัน เพื่อให้ได้เป็นลิโปเปปไทด์ ซึ่งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ต่อไปในอนาคต



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของ daptomycin ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophilic core และส่วนที่เป็น hydrophilic tail (Pirri et al., 2009)

3. เปปไทด์เชื่อมต่อกับกรดนิวคลีอิก (Peptide linked with nucleic acid)

ในปี 1991 Peter E. Nielsen และคณะทำการสังเคราะห์เปปไทด์ที่เชื่อมต่อกับกรดนิวคลิอิก (nucleic acid) เรียกว่า “peptide nucleic acid (PNA)” ดังรูปที่ 9 การดัดแปลงนี้ทำขึ้นเพื่อพัฒนาและสร้างยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ อาศัยกลไกของการออกฤทธิ์ควบคุมการทำงานของยีนในมนุษย์ โดยอาศัยความรู้เกี่ยวกับการเข้าจับกับลำดับเบสที่จำเพาะของอาร์เอ็นเอ และมีผลต่อการรบกวนการสร้างโปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับโรคหรือความผิดปกติต่างๆ (Nielsen and Egholm, 1996) รวมไปถึงการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ จากงานวิจัยพบว่า การดัดแปลงของ PNA มีคุณสมบัติจับกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอได้ดีกว่าเปปไทด์ธรรมดา เนื่องจากมีพันธะที่แข็งแรงกว่า ที่ใช้จับกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ และที่สำคัญ PNA ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ที่อยู่ภายในร่างกาย ดังนั้นจึงทำให้มีความเสถียรมากกว่า (Pellestor et al., 2004)



รูปที่ 9 แสดงโครงสร้างของ deoxyribonucleic acid และ peptide nucleic acid (Pellestor et al., 2005)

สรุป

วัตถุประสงค์ของการออกแบบหรือดัดแปลงโมเลกุลของเปปไทด์แบบต่าง ๆ คือ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของโมเลกุล ให้มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าโมเลกุลต้นแบบ และเพื่อให้สามารถต้านจุลินทรีย์ที่ดื้อยา โมเลกุลที่ถูกออกแบบหรือดัดแปลงมาต้องมีประสิทธิภาพมากพอและไม่เป็นพิษต่อเซลล์เจ้าบ้านอื่น ๆ เมื่อมีการนำไปใช้ในทางคลินิก จึงถือว่าการพัฒนาหรือการดัดแปลงโมเลกุลเปปไทด์บรรลุวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

Alan, A. R., Blowers, A. and Earle, E. D. (2004). Expression of a magainin-type antimicrobial peptide gene (MSI-99) in tomato enhances resistance to bacterial speck disease. Plant Cell Reports 22(6): 388-396.

Alan, A. R. and Earle, E. D. (2002). Sensitivity of bacterial and fungal plant pathogens to the lytic peptides, MSI-99, magainin II, and cecropin B. Molecular Plant Microbe Interactions 15(7): 701-708.

Aranda, F. J. and de Kruijff, B. (1988). Interrelationships between tyrocidine and gramicidin A' in their interaction with phospholipids in model membranes. Biochimica Et Biophysica Acta 937(1): 195-203.

Ashrafuzzaman, M., Andersen, O. S. and McElhaney, R. N. (2008). The antimicrobial peptide gramicidin S permeabilizes phospholipid bilayer membranes without forming discrete ion channels. Biochimica Et Biophysica Acta 1778(12): 2814-2822.

Ballardini, N., Johansson, C., Lilji, G., Lindh, M., Linde, Y., Scheynius, A. and Agerberth, B. (2009). Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema. British Journal of Dermatology 161(1): 40-47.

Brandenburg, K., Garidel, P., Fukuoka, S., Howe, J., Koch, M. H. J., Gutsmann, T. and Andrä, J. (2010). Molecular basis for endotoxin

neutralization by amphipathic peptides derived from the alpha-helical cationic core-region of NK-lysin. Biophysical Chemistry 150(1-3): 80-87.

Chakrabarti, A., Ganapathi, T. R., Mukherjee, P. K. and Bapat, V. A. (2003). MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. Planta 216(4): 587–596.

Chakraborty, T. K. (2004). Sugar amino acids and related molecules: Some recent developments. Available: http://cat. inist. fr/?aModele=afficheN&cpsidt=16184734. [Accessed: 23-May-2011].

Chakraborty, T. K., Srinivasu, P., Tapadar, S. and Mohan, B. K. (2005). Sugar amino acids in designing new molecules. Glycoconjugate Journal 22(3): 83-93.

Chesnokova, L. S., Slepenkov, S. V. and Witt, S. N. (2004). The insect antimicrobial peptide, L-pyrrhocoricin, binds to and stimulates the ATPase activity of both wild-type and lidless DnaK. FEBS Letters 565(1-3): 65-69.

Chromek, M., Slamova, Z., Berman, P., Kovacs, L., Podracka, L., Ehren, I., Hokfelt, T., Gudmundsson, G., Gallo, R. L., Agerberth, B. and Brauner, A. (2006). The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. Nat Med. 12(6): 636-641.

Coccia, C., Rinaldi, A. C., Luca, V., Barra, D., Di Giulio, A., Veerman, E. C. I. and Mangoni, M. L. (2011). Membrane interaction and antibacterial properties of two mildly cationic peptide diastereomers, bombinins H2 and H4, isolated from Bombina skin. European Biophysics Journal 40(4): 577-588.

Dagan, A., Efron, L., Gaidukov, L., Mor, A. and Ginsburg, H. (2002). In Vitro Antiplasmodium Effects of Dermaseptin S4 Derivatives. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46(4): 1059-1066.

De Smet, K. and Contreras, R. (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. Biotechnology Letters 27(18): 1337-1347.

Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A. P., Tarning, J., Lwin K. M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An S. S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day N. P.J., Lindegardh, N., Socheat, D. and White, N. J. (2009). Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. New England Journal of Medicine 361(5): 455-467.

Epand, R. F., Mor, A. and Epand, R. M. (2011). Lipid complexes with cationic peptides and OAKs; their role in antimicrobial action and in the delivery of antimicrobial agents. Cellular and Molecular Life Sciences 68(13): 2177-2188.

Erles, K. and Brownlie, J. (2010). Expression of [beta]-defensins in the canine respiratory tract and antimicrobial activity against Bordetella bronchi-septica. Veterinary Immunology and Immunopathology 135(1-2): 1331-1343.

Gelhaus, C., Jacobs, T., Andrä, J., and Leippe, M. (2008). The antimicrobial peptide NK-2, the core region of mammalian NK-lysin, kills intraerythrocytic Plas-modium falciparum. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 52(5): 1713-1720.

Gregory, S. M., Cavenaugh, A., Journigan, V., Pokorny, A. and Almeida, P. F. F. (2008). A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial

peptide cecropin A. Biophysical Journal 94(5): 1667-1680.

Guerrero, E., Saugar, J. M., Matsuzaki, K. and Rivas, L. (2004). Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48(8): 2980-2986.

Gupta, S., Govil, D., Kakar, P., Prakash, O., Arora, D., Das, S., Govil, P. and Malhotra, A. (2009). Colistin and polymyxin B: A re-emergence. Indian Journal of Critical Care Medicine 13(2): 49.

Hammer, M. U., Brauser, A., Olak, C., Brezensinski, G., Golamann, T., Gutsmann, T. and Andrä, J. (2010). Lipopolysaccharide interaction is decisive for the activity of the antimicrobial peptide NK-2 against Escherichia coli and Proteus mirabilis. The Biochemical Journal 427(3): 477-488.

Huang, Y., Huang, J. and Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. Protein & Cell 1(2): 143-152.

Huo, L., Zhang, K., Ling, J., Peng, Z., Liu, H. and Gu, L. (2011). Antimicrobial and DNA-binding activities of the peptide fragments of human lactoferrin and histatin 5 against Streptococcus mutans. Archives of Oral Biology 56(9): 869-876.

Imura, Y., Choda, N. and Matsuzaki, K. (2008). Magainin 2 in action: distinct modes of membrane permeabilization in living bacterial and mammalian cells. Biophysical Journal 95(12): 5757-5765.

Jan, P.-S., Huang, H.-Y. and Chen, H.-M. (2009). Expression of a Synthesized Gene Encoding Cationic Peptide Cecropin B in Transgenic Tomato Plants Protects against Bacterial Diseases. Applied and Environmental Microbiology 76(3): 769-775.

Jelokhani-Niaraki, M., Hodges, R. S., Meissner, J. E., Hassenstein, U. E. and Wheaton, L. (2008). Interaction of gramicidin S and its aromatic amino-acid analog with phospholipid membranes. Biophysical Journal 95(7): 3306-3321.

Jensen, K. J. and Brask, J. (2005). Carbo-hydrates in peptide and protein design. Peptide Science 80(6): 747-761.

Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L. and Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α-helical cationic antimicrobial peptides. Peptide Science 90(3): 369-383.

Knijnenburg, A. D., Tuin, A. W., Spalburg, E., de Neeling, A. J., Mars-Groen, R., Noort, D., Otero, J. M., Llamas-Saiz, A., van Raaij, M. J., van der Marel, G. A., Overkleeft, H. S. and Overhand, M. (2011). Exploring the conformational and Biological Versatility of β-Turn-Modified Gramicidin S by Using Sugar Amino Acid Homologues that Vary in Ring Size. Chemistry - A European Journal 17(14): 3995-4004.

Kobayashi, S. (2002). Bacteria-selective synergism between the antimicrobial peptides magainin 2 and tachyplesin I: toward cocktail therapy. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 122(11): 967-973.

Kobayashi, S., Chikushi, A., Tougu, S., Imusa, Y., Nishida, M., Yan, Y. and Matsuzaki, K. (2004). Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. Biochemistry 43(49): 15610-15616.

Kokoza, V., Ahmed, A., Woon Shin, S., Okafor, N., Zou, Z. and Raikhel, A. S. (2010). Blocking of Plasmodium transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic Aedes aegypti mosquitoes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(18): 8111-8116.

Lee, H. S., Park, C. B., Kim, J. M., Jang, S. A., Park, I. Y., Kim, M. S., Cho, J. H. and Kim, S. C. (2008). Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide. Cancer Letters 271(1): 47-55.

Mangili, A., Bica, I., Snydman, D. R. and Hamer, D. H. (2005). Daptomycin-Resistant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Clinical Infectious Diseases 40(7): 1058-1060.

Mangoni, M. L., Papo, N., Saugar, J. M., Barra, D., Shai, Y., Simmaco, M. and Rivas, L. (2006). Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. Biochemistry 45(13): 4266-4276.

Mangoni, M. L., Saugar, J. M., Dellisanti, M., Barra, D., Simmaco, M. and Rivas, L. (2005). Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. The Journal of Biological Chemistry 280(2): 984-990.

Markossian, K. A., Zamyatnin, A. A. and Kurganov, B. I. (2004). Antibacterial proline-rich oligopeptides and their target proteins. Biochemistry 69(10): 1082-1091.

Mason, A. J., Moussaoui, W., Abdelrahman, T., Boukhari, A., Bertani, P., Marquette, A., Shooshtariza, P., Moulay, G., Boehm, N., Guerold, B., Sawers, R. J. H., Kchler, A., Metz-Boutigue, M., Candolfi, E., Prevost, G. and Bechinger, B. (2008). Structural determinants of antimicrobial and antiplasmodial activity and selectivity in histidine-rich amphi-pathic cationic peptides. The Journal of Biological Chemistry 284(1): 119-133.

Merrifield, R. B., Vizioli, L. D. andBoman, H. G. (1982). Synthesis of the antibacterial peptide cecropin A (1-33). Biochemistry 21(20): 5020-5031.

Mika, J. T., Moiset, G., Cirac, A. D., Feliu, L., BardajÃ, E., Planas, M., Sengupta, D., Marrink, S. J. and Poolman, B. (2011). Structural basis for the enhanced activity of cyclic antimicrobial pep-tides: The case of BPC194. Bio-chimica et biophysica acta 1808(2): 2197-2205.

Mogi, T. and Kita, K. (2009). Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. Cellular and Molecular Life Sciences 66(23): 3821-3826.

Mor, A. (2009). Multifunctional host defense peptides: antiparasitic activities. FEBS Journal. 276(22): 6474-6482.

Moraes, J. D., Nascimento, C., Miura, Miura, LM., Leite, J. R., Nakano, E. and Kawano, T. (2011). Evaluation of the in vitro Activity of Dermaseptin 01, a Cationic Antimicrobial Peptide, against Schistosoma mansoni. Chemistry & Biodiversity 8(3): 548-558.

Nakano, M. M. and Zuber, P. (1990). Molecular biology of antibiotic production in Bacillus. Critical Reviews in Biotechnology 10(3): 223-240.

Nicolas, P. and Amri, C. El (2009). The dermaseptin superfamily: a genebased combinatorial library of antimicrobial peptides. Biochimica Et Bio-physica Acta 1788(8): 1537-1550.

Nielsen, P. E. and Egholm, M. (1996). Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and

potential applications. Bioorganic & medicinal chemistry 4(1): 5-23.

Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J. and Ganz, T. (2001). Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. Journal of Biological Chemistry 276(11): 7806 -7810.

Pellestor, F., Paulasova, P., Macek, M. and Hamamah, S. (2005). The Use of Peptide Nucleic Acids for In Situ Identification of Human Chromosomes. Journal of histochemistry and cytochemistry 53(3): 395-400.

Peters, B. M., Zhu, J., Fidel Jr, P. L., Hackett, W., El Shaye, S. and Jabra-Rizk, M. A. (2010). Protection of the oral mucosa by salivary histatin-5 against Candida albicans in an ex vivo murine model of oral infection. FEMS Yeast Research 10(5): 597-604.

Pirri, G., Giuliani, A., Nicoletto, S. F., Pizzuto, L. and Rinaldi, A. C. (2009). Lipopeptides as anti-infectives: a practical perspective. Central European Journal of Biology 4(3): 258-273

Radzishevsky, I., Krugliak, M., Ginsburg H. and Mor A. (2007). Antiplasmodial Activity of Lauryl-Lysine Oligomers. Antimicrob. Agents Chemo-ther. 51(5): 1753-1759.

Rahman, A., Fahlgren, A., Sitohy, B., Baranov, V., Zirakzadeh, A., Hammarstrom, S., Danielsson, A. and Hammarstrom, M. (2007). β-Defensin production by human colonic plasma cells: A new look at plasma cells in ulcerative colitis. Inflammatory Bowel Diseases 13(7): 847-855.

Rautenbach, M., Vlok, N. M., Stander, M. and C. Hoppe, H. (2007). Inhibition of malaria parasite blood stages by tyrocidines, membrane-active cyclic peptide antibiotics from Bacillus brevis. Biochimica Et Biophysica Acta 1768(6): 1488-1497.

Rosengren, K. J., Göransson, U., Otvos Jr, L. and Craik, D. J. (2004). Cyclization of pyrrhocoricin retains structural elements crucial for the antimicrobial activity of the native peptide. Biopolymers 76(5): 446-458.

Rotem, S., Radzishevsky, I. S., Bourdetsky, D., Navon-Venezia, S., Carmeli, Y. and Mor, A. (2008). Analogous oligo-acyllysines with distinct antibacterial mechanisms. The FASEB Journal 22(8): 2652-2661.

Saralamba, S., Pan-Ngum, W., Maude R. J., Lee, S. J., Tarnining, J., Lindegardh, N., Chotivanich, K., Nosten, F., Day, N. P.J., Socheat, D., White, N. J., Dondrop, A. M. and White, L. J. (2011). Intrahost modeling of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(1): 397 -402.

Silverman, J. A., Perlmutter, N. G. and Shapiro, H. M. (2003). Correlation of Daptomycin Bactericidal Activity and Membrane Depolarization in Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47(8): 2538-2544.

Speranza, A. M., Taddei, A. R. and Ovidi, E. (2007). In Vitro Toxicity towards Kiwifruit Pollen of the Antimicrobial Peptides Magainins 1 and 2. Plant Biology 9(6): 800-806.

Suttmann, H.,Retz, M., Paulsen, F., Harder, J., Zwergel, U., Kamradt, J., Wullich, B., Unteregger, G., Stockle, M. and Lehmann, J. (2008). Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. BMC Urology 8(1): 5.

Thompson, A. H., Bjourson, A. J., Orr, D. F., Shaw, C. and McClean, S. (2007). A combined mass spectrometric and cDNA sequencing

approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of Phyllomedusa hypochondrialis azurea. Peptides 28(7)

Thwaite, J. E., Humphrey, S., Fox, M. A., Savage, V. L., Laws, T. R., Ulaeto, D. O., Titball, R. W. and Atkins, H. S. (2009). The cationic peptide magainin II is antimicrobial for Burkholderia cepacia-complex strains. Journal of Medical Microbiology 58(7): 923-929.

Tian, C., Gao, B., Rodriguez, M. D. C., Lanz-Mendoza, H., Ma, B., and Zhu, S. (2008). Gene expression, antiparasitic activity, and functional evolution of the drosomycin family. Molecular Immunology 45(15): 3909-3916.

Tossi, A., Sandri, L. and Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, α-helical antimicrobial peptides. Biopolymers 55(1): 4-30.

Uyterhoeven, E. T., Butler, C. H., Ko, D. and Elmore, D. E. (2008). Investigating the nucleic acid interactions and anti-microbial mechanism of buforin II. FEBS Letters 582(12): 1715-1718.

Wehkamp, J., Schauber, J. and Stange E. F. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. Current Opinion in Gastroenterology 23(1): 32-38.

Xu, X., Jin, F., Yu, X., Ji, S., Wang, J., Cheng, H., Wang,C. and Zhang, W. (2007). Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from Escherichia coli. Protein Expression and Purification 53(2): 293-301.

Zaknoon, F., Wein, S., Krugliak, M., Meir, O., Rotern, S., Ginsburg, H., Vial, H. and Mor, A. (2011). Antiplasmodial Properties of Acyl-Lysyl Oligomers in Culture and Animal Models of Malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55(8): 3803-3811.

Zampa, M. F., Araujo, I., Costa, V., Nery Costa, C. H., Zucolotto, V., Eiras, C. and Leite, J. R. S. A. (2009). Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 5(3): 352-358.

Zhang Z. and Zhu, S. (2010). Functional role of charged residues in drosomycin, a Drosophila antifungal peptide. Developmental and Comparative Immunology 34(9): 953-958.

Zucca, M. and Savoia, D. (2011). Current Developments in the Therapy of Protozoan Infections. The open medicinal chemistry journal 5: 4-10.

❑❑❑❑❑