



การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) และอนุพันธ์

โดย

นายภูธร ไกรสุริยวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เคมี)

สาขาวิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) และอนุพันธ์

โดย

นายภูธร ไกรสุริยวงศ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)

สาขาวิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

THE SYNTHESSES OF HUWENTOXIN-X (HWTX-X) AND DERIVATIVES

BY

MR. PUTHON KRAISURIYAWONG



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2017
COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นายภูธร ไกรสุริยวงศ์

เรื่อง

การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) และอนุพันธ์

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)

เมื่อ วันที่ 25 ธันวาคม พ.ศ. 2560

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์




(รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา ตั้งคนานนท์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปากนุมาศ ทองอยู่)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



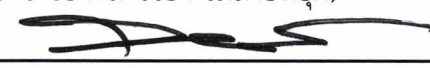
(อาจารย์ ดร. พีรดา ยิ่งवाद)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(อาจารย์ ดร. จิริยา ร่มสายหยุด)

คณบดี



(รองศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ชคตระการ)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) และอนุพันธ์
ชื่อผู้เขียน	นายภูธน ไกรสุริยวงศ์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุมาศ ทองอยู่
ปีการศึกษา	2560

บทคัดย่อ

การรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับอาการปวด (neuropathic pain) ถือเป็นเป้าหมายใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจ โดยการหาตัวยาที่สามารถระงับอาการปวดได้ดีมาแทนการใช้มอร์ฟีน (morphine) ซึ่งมีผลข้างเคียงในการรักษาสูง จากการศึกษาพบว่าตัวยาที่เป็นเพปไทด์หรือโปรตีนเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพิษที่ถูกสร้างจากสัตว์ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารดังกล่าวเป็นสารในกลุ่มโปรตีนที่มีความสามารถในการจับและยับยั้งการทำงานของไอออนซันแนล อาทิ โซเดียมซันแนล (Na^+ channel) และแคลเซียมซันแนล (Ca^{2+} channel) โดยในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาและสังเคราะห์โปรตีนที่มีชื่อว่า Huwentoxin-X (HWTX-X) ที่พบในพิษของแมงมุม Chinese bird สายพันธุ์ *Ornithoctonus huwena* ซึ่งโครงสร้างจะประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 28 ตัว และมีพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะภายในโครงสร้างซึ่งจัดตัวในลักษณะที่เหมาะสม โดยที่กรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine, C) สร้างพันธะไดซัลไฟด์ในรูปแบบ $\text{C}_1\text{-C}_4$, $\text{C}_2\text{-C}_5$ และ $\text{C}_3\text{-C}_6$ ตามลำดับ และยังสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจในการยับยั้ง Ca^{2+} channel โดยการสังเคราะห์โปรตีนจะใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีที่เรียกว่าการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวิถีภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis) นอกจากนี้ยังได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว (mutated Huwentoxins) ด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนกรดอะมิโน (mutagenesis) โดยทำการแทนที่กรดอะมิโนไลซีน (lysine, K) เป็นกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine, R) และทำการสังเคราะห์โปรตีน HWTX-X ให้อยู่ในลักษณะเป็นวง (cyclic Huwentoxin) ทำให้เพิ่มเสถียรของโปรตีน โดยความบริสุทธิ์ของ native Huwentoxin, mutated Huwentoxin และ cyclic Huwentoxin จะอาศัย

เทคนิคการแยกของเหลวด้วยเครื่องแยกสารสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) และการยืนยันมวลโมเลกุลโดยใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) ทั้ง ESI-MS และ MALDI-TOF

คำสำคัญ: โปรตีน Huwentoxin-X, ไอออนซินแนล, การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวิถีภาคของแข็ง



Thesis Title	The syntheses of Huwentoxin-X (HWTX-X) and derivatives
Author	Mr. Puthon Kraisureyawong
Degree	Master of Science (Chemistry)
Major Field/Faculty/University	Chemistry Faculty of Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Assistant Professor Panumart Thongyoo, Ph.D.
Academic Years	2017

ABSTRACT

Neuropathic pain is an important disease causing a health problem. In the exploration of new drugs is necessary for substitution of morphine, which caused a number of side effects. To date, peptides or proteins are interestingly an alternative way, especially the toxins founded from venomous animals. It has been reported that the lead compound as proteins effectively binded and blocked ion channel such Na⁺ channel and Ca²⁺ channel. In this research, we aimed to study and synthesize the protein named Huwentoxin-X (HWTX-X), which can be isolated from the venom of Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. This HWTX-X protein is comprised of 28 amino acids with three disulfide bridges (C₁-C₄, C₂-C₅, and C₃-C₆). In addition, HWTX-X displayed a promising biological activity on blocking Ca²⁺ channel. The chemical synthesis of protein was carried out by using solid phase peptide synthesis strategy. We also focused on chemical synthesis of mutated Huwentoxins by mutagenesis, in which lysine was replaced by arginine. The synthesis of cyclic HWTX-X was successfully synthesized in order to improve the protein stability. The purity of native Huwentoxin, mutated Huwentoxin and cyclic Huwentoxin were confirmed by high performance

(4)

liquid chromatography and molecular weight were characterized by mass spectrometry such as ESI-MS and MALDI-TOF spectrometer.

Keywords: Huwentoxin-X, ion channel, solid phase peptide synthesis



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ประสบความสำเร็จเรียบร้อยได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ ความช่วยเหลือ และน้ำใจจากบุคคลหลายฝ่ายด้วยกันที่ได้ให้การสนับสนุนจนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี ทางผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณทุกท่านมาในโอกาสนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุมาศ ทองอยู่ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้มอบความรู้ คำแนะนำ และประสบการณ์อันมีค่าในการทำวิจัย ตลอดจนการให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นจนทำให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จไปด้วยดี ขอขอบพระคุณคณะกรรมการทุกท่านอันประกอบด้วย รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา ตังคนานนท์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ อาจารย์ ดร. พิรดา ยิ่งยวด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และอาจารย์ ดร. จริญญา ร่มสายหยุด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำที่ดีในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำที่ดี ตลอดจนการให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกทางด้านห้องปฏิบัติการวิจัย เครื่องมือต่างๆ รวมทั้งสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็นต่อการวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์เพื่อการวิจัยขั้นสูง (Center of Scientific Equipment for Advanced Research, TUCSEAR) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือด้านเครื่องมือขั้นสูงที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (Science Achievement Scholarship of Thailand, SAST) ที่ช่วยสนับสนุนและพัฒนาองค์ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวอันเป็นที่รักยิ่ง ที่เป็นส่วนสำคัญในการให้กำลังใจสำหรับการศึกษาต่อในระดับนี้ และขอขอบคุณเพื่อนๆ สาขาวิชาเคมีทุกคนสำหรับความช่วยเหลือและมิตรภาพที่ดีเสมอมา

นายภูธน ไกรสุริยวงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	(15)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	5
1.3 ขอบเขตการวิจัย	5
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 โพรตีน Huwentoxin (HWTX)	6
2.2 การพัฒนาเปปไทด์เป็นยา (peptide to drugs)	10
2.3 การสังเคราะห์สารเปปไทด์ที่เป็นวง (cyclic peptides)	15
2.4 Voltage-gated ion channels (VGICs)	20

2.4.1 โซเดียมชันแนล (sodium channels)	20
2.4.2 แคลเซียมชันแนล (calcium channels)	21
2.5 การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวิธภาคของแข็ง	23
2.5.1 ชนิดของเรซินที่ใช้ในการสังเคราะห์สารเพปไทด์	25
2.5.2 ตัวช่วยทำปฏิกิริยา (coupling agents)	27
2.5.3 หมู่ปกป้องที่สายโซ่ของกรดอะมิโน	29
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	31
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	31
3.1.1 สารเคมี	31
3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	34
3.2 วิธีการทดลอง	35
3.2.1 การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X)	35
3.2.1.1 การโหลดกรดอะมิโนตัวแรก	35
3.2.1.2 การหาปริมาณของกรดอะมิโนที่ถูกโหลดบนเรซิน	36
3.2.1.3 การทำปฏิกิริยาป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงบนพื้นผิวเรซิน	36
3.2.1.4 การกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection step)	37
3.2.1.5 การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain synthesis)	37
3.2.1.6 การตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซิน	39
3.2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของโปรตีน Huwentoxin-X	39
3.2.3 การสังเคราะห์ cyclic HWTX-X	41
3.2.3.1 การโหลดกรดอะมิโนตัวแรก	41
3.2.3.2 การทำปฏิกิริยาป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงบนพื้นผิวเรซิน	42
3.2.3.3 การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain synthesis)	42
3.2.3.4 การตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซิน	43
3.2.3.5 การปิดวง (cyclization) ของสายโซ่เพปไทด์	43
3.2.3.6 การแยกและทำให้บริสุทธิ์	44
3.2.3.7 การกำจัดหมู่ปกป้องทั้งหมด	44

3.2.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) การแยกและการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของสาร	
เปปไทด์	44
3.2.5 การปรับหาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมในการทำ protein folding	45
3.2.6 การติดสารเรืองแสง (fluorescent labeling) กับโปรตีน Huwentoxin-X	46
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	48
4.1 การสังเคราะห์เปปไทด์ด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis)	48
4.1.1 การสังเคราะห์เปปไทด์โดยใช้ wang resin (วิธีการ A)	49
4.1.1.1 การโหลดกรดอะมิโนตัวแรก (Fmoc-Thr(^t Bu)-OH) ลงบน wang resin	49
4.1.1.2 การทำปฏิกิริยาป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงบนพื้นผิวเรซิน	50
4.1.1.3 การสังเคราะห์เปปไทด์ด้วยวิธี solid phase peptide synthesis	51
4.1.1.4 การตัดสายโซ่เปปไทด์ออกจากเรซิน	52
4.1.2 การสังเคราะห์เปปไทด์โดยใช้ 2Cl-Trityl chloride resin (วิธีการ B)	52
4.1.2.1 การโหลดกรดอะมิโนตัวแรก (Fmoc-Thr(^t Bu)-OH) ลงบน 2Cl-Trityl chloride resin	52
4.1.2.2 การทำปฏิกิริยาป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงบนพื้นผิวเรซิน	53
4.1.2.3 การสังเคราะห์เปปไทด์ด้วยวิธี solid phase peptide synthesis	54
4.1.2.4 การตัดสายโซ่เปปไทด์ออกจากเรซิน	54
4.2 การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) และอนุพันธ์	55
4.2.1 การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X)	55
4.2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของโปรตีน HWTX-X	57
4.2.2.1 Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 1)	59
4.2.2.2 Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 2)	59
4.2.2.3 Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ตัวที่ 3)	60
4.2.3 การตรวจวัดความบริสุทธิ์ (purity) และการยืนยันมวลโมเลกุลเปปไทด์	61
4.3 การสังเคราะห์ cyclic HWTX-X	64

4.3.1 การตรวจวัดความบริสุทธิ์และการยืนยันมวลโมเลกุลเพปไทด์	66
4.3.2 การปิดวง (cyclization) และการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี	67
4.3.3 การเอาหมู่ปกป้องทั้งหมดออก (global deprotection)	68
4.4 การแยกให้บริสุทธิ์และการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน	68
4.5 การปรับสภาวะ (condition) ของการทำ protein folding	73
4.6 การติดสารเรืองแสง (fluorescent labeling) กับโปรตีน Huwentoxin-X	76
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	78
5.1 การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X และอนุพันธ์	78
5.2 การสังเคราะห์ cyclic HWTX-X	79
5.3 การปรับสภาวะที่เหมาะสมในการทำ protein folding และการติดสารเรืองแสง	80
5.4 ข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	81
รายการอ้างอิง	82
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก การเรียกชื่อกรดอะมิโนและการเตรียมสาร	88
ภาคผนวก ข ผลสเปกตรัมของสาร	90
ประวัติผู้เขียน	96

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตารางแสดงเรซินชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์และสภาวะที่ใช้ตัดเรซิน (cleavage condition)	26
2.2 ตารางแสดงกรดอะมิโนที่มีหมู่ปกป้องสายโซ่ (protecting group) ชนิดต่างๆ	29
3.1 ตารางแสดงการปรับสภาวะ (condition) ที่มีการใช้ additive ที่แตกต่างกันในการทำ protein folding	45
4.1 ตารางแสดงการปรับสภาวะ (condition) ที่มีการใช้ additive ที่แตกต่างกันในการทำ protein folding	73



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 ภาพแสดงลักษณะโดยทั่วไปของไอออนชั้นแนลในร่างกาย	2
1.2 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดต่างๆที่จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน Huwentoxin	3
1.3 ภาพแสดงโครงสร้างสามมิติของโปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X)	3
1.4 ภาพแสดงโครงสร้างของ linear และ cyclic RGD peptides	4
2.1 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-I	6
2.2 ภาพแสดงแมงมุม Chinese bird spider สายพันธุ์ <i>Ornithoctonus huwena</i>	6
2.3 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-II	7
2.4 ภาพแสดงโครงสร้างเปรียบเทียบกันระหว่าง HWTX-II และ HWTX-I	7
2.5 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-IV	8
2.6 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-V	8
2.7 ภาพแสดงให้เห็นถึงการจัดเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง receptor site 4 ของ Na ⁺ channel	9
2.8 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-IV และอนุพันธ์ที่ทำการสังเคราะห์อีก 3 ตัว	9
2.9 ภาพแสดงให้เห็นว่าเพปไทด์สามารถเติมเต็มช่องว่าง (space) ตรงกลางได้ทำให้สามารถมีข้อดีของตัวยาทั้ง 2 กลุ่มได้	10
2.10 ภาพแสดงโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SFTI-1 และการทำ grafting	11
2.11 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของ MCoTI-II peptides และการทำ grafting	12
2.12 ภาพแสดงความเสถียรที่เพิ่มขึ้นของ grafted MCoTI-II peptides	12
2.13 ภาพแสดงการศึกษา SAR ของโมเลกุล ω -Conotoxin ซึ่งแสดงให้เห็นชนิดของกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะต่อการจับกับ Ca ²⁺ channel	13
2.14 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของ Ziconotide (ω -conopeptide MVIIA)	14
2.15 ภาพแสดงโครงสร้างของ peptide macrocycle drugs ทั้ง 3 ชนิด	15
2.16 ภาพแสดงการลักษณะจัดเรียงตัวของสารเพปไทด์ในรูปแบบ inhibitory cystine knot ที่พบในธรรมชาติ	16
2.17 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน RglA และการปิดวง (cyclization) ด้วย linker ที่แตกต่างกัน	16

2.18 ภาพแสดงผลของการศึกษาความเสถียรใน human serum	17
2.19 ภาพแสดงการสังเคราะห์ cyclic α -conotoxin MII โดยใช้กรดอะมิโน 7 ตัว ทำหน้าที่เป็น ตัวเชื่อม (linker)	17
2.20 ภาพแสดงการสังเคราะห์ cyclic chlorotoxin และการติด (conjugation) สารเรืองแสง Cy5.5	18
2.21 ภาพแสดง A คือหลักการของการเกิด native chemical ligation ของโปรตีน และ B คือ การปิดวง (cyclization) ของโปรตีนโดยอาศัยหลักการ native chemical ligation	19
2.22 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของ linear α -conotoxin และ cyclic α -conotoxin ที่ใช้ จำนวนกรดอะมิโนที่แตกต่างกันทำหน้าที่เป็น linker	19
2.23 ภาพแสดงให้เห็นว่า cyclic α -conotoxin มีความเสถียรต่อเอนไซม์ protease Endo- GluC มากกว่า linear α -conotoxin	19
2.24 ภาพแสดงโครงสร้างของ Na ⁺ channels	21
2.25 ภาพแสดง HVA channels และ LVA channels	22
2.26 ภาพแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวัฏภาคของแข็ง	23
2.27 ภาพแสดงโครงสร้างของหมู่ Fmoc (fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl) และหมู่ Boc (tert-butoxycarbonyl) ที่ใช้ในการเป็นหมู่ปกป้องของหมู่อะมิโน	25
2.28 ภาพแสดงกลไกปฏิกิริยาในการการกำจัดหมู่ปกป้อง	25
2.29 ภาพแสดงตัวช่วยทำปฏิกิริยา (coupling agents) ชนิดต่างๆ	28
2.30 ภาพแสดงกลไกปฏิกิริยาเคมีของทำ activation ที่หมู่ carboxyl ของกรดอะมิโน	28
3.1 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีระหว่าง Fmoc-Thr(^t Bu)-OH กับ wang resin	36
3.2 ภาพแสดงสมการของการทำ deprotection เพื่อกำจัดหมู่ปกป้อง (Fmoc)	37
3.3 ภาพแสดงภาพรวมของการสังเคราะห์โปรตีน HWTX-X ด้วยวิธี SPPS	38
3.4 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HWTX-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ชนิด	39
3.5 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีระหว่าง Fmoc-Thr(^t Bu)-OH กับ 2-Chlorotriyl chloride resin	42
4.1 ภาพแสดงโครงสร้างของหมู่ปกป้องสายโซ่ชนิดต่างๆและโครงสร้างของพิเพอริดีน	49
4.2 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีระหว่าง Fmoc-Thr(^t Bu)-OH กับ wang resin	50
4.3 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีระหว่างโพรพานอิกแอนไฮไดรด์ (propanoic anhydride) กับ หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อิสระของ wang resin	51
4.4 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีระหว่าง Fmoc-Thr(^t Bu)-OH กับ 2Cl-Triyl chloride resin	53
4.5 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีของการทำ capping resin ของ 2Cl-Triyl chloride resin	53

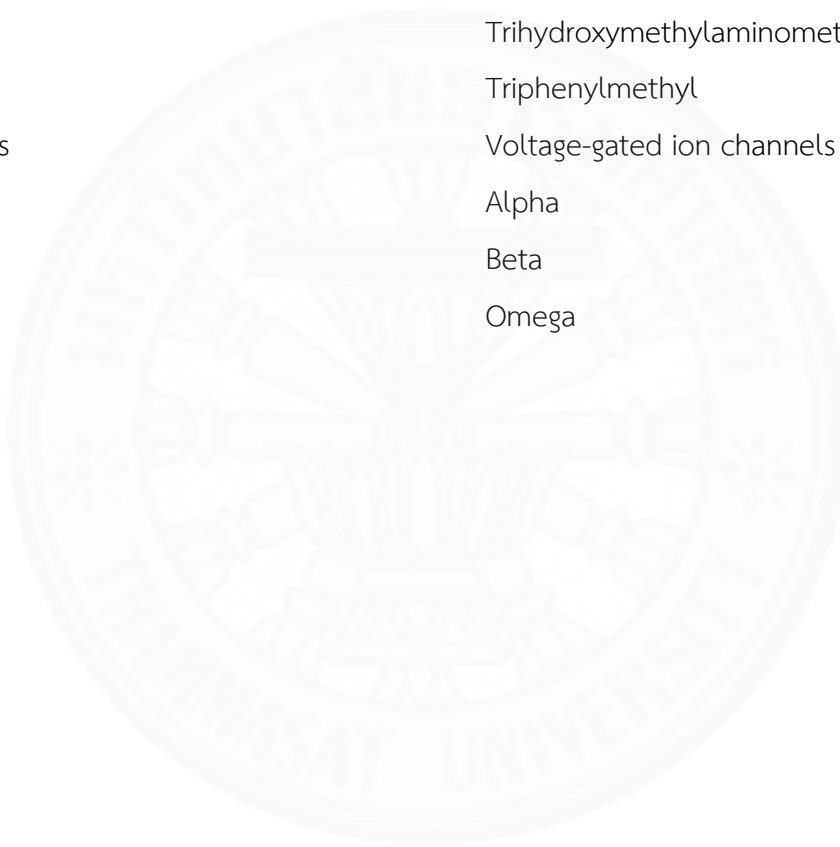
4.6 ภาพแสดงลำดับอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X)	55
4.7 ภาพแสดงการสังเคราะห์โปรตีน HWTX-X ด้วยวิธีการ SPPS	55
4.8 ภาพแสดงโครงสร้างทางพื้นผิว (surface) ของโปรตีน Huwentoxin-X	57
4.9 ภาพแสดงโครงสร้างของกรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) และกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R)	58
4.10 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว ที่ทำการสังเคราะห์	58
4.11 ภาพแสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ด้วยวิธีการ SPPS โดยทำการปรับเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน (mutagenesis)	59
4.12 ภาพแสดง HPLC chromatogram และ mass spectrum ของโปรตีน Huwentoxin-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัวที่สังเคราะห์ได้	62
4.13 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของ cyclic HWTX-X	65
4.14 ภาพแสดงการสังเคราะห์โปรตีน cyclic HWTX-X ด้วยวิธีการ SPPS โดยใช้ 2Cl-Trityl chloride resin	65
4.15 ภาพแสดง HPLC chromatogram และ mass spectrum ของ linear HWTX-X ที่ สังเคราะห์ได้จาก 2Cl-Trityl chloride resin	66
4.16 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของโปรตีนที่ทำการ fold แล้ว โดยที่ภาพบนขวาแสดง โปรตีนที่บริสุทธิ์แล้ว และภาพบนซ้ายแสดง MALDI-TOF spectrum ของโปรตีนที่ทำการ fold แล้ว	70
4.17 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของ linear HWTX-X ที่ทำการปรับสภาวะต่างๆโดยที่ เส้นสีดำคือ สภาวะที่ไม่ใช้สารเติมแต่ง (no additive)	74
4.18 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของ cyclic HWTX-X ที่ทำการปรับสภาวะต่างๆโดยที่ เส้นสีดำคือ สภาวะที่ไม่ใช้สารเติมแต่ง (no additive)	75
4.19 ภาพแสดงสมการของการติดสารเรืองแสง (FITC) เข้ากับโปรตีน HWTX-X	76
4.20 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของ native HWTX-X ที่ได้ทำการติดด้วยสารเรืองแสง (FITC)	77
5.1 ภาพแสดงการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X)	78
ข1 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของ linear Huwentoxin-X ที่สังเคราะห์ได้	90
ข2 ภาพแสดง ESI mass spectrum ของ linear Huwentoxin-X ที่สังเคราะห์ได้	90
ข3 ภาพแสดง HPLC chromatogram และ MALDI-TOF mass spectrum ของ Huwentoxin- X[K1,7,15,26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 1) ที่สังเคราะห์ได้	91

ข4 ภาพแสดง HPLC chromatogram และ MALDI-TOF mass spectrum ของ Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 2) ที่สังเคราะห์ได้	91
ข5 ภาพแสดง HPLC chromatogram และ MALDI-TOF mass spectrum ของ Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ตัวที่ 3) ที่สังเคราะห์ได้	92
ข6 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของ linear Huwentoxin-X ที่สังเคราะห์ได้จาก 2Cl-Trityl chloride resin	92
ข7 ภาพแสดง ESI mass spectrum ของ linear Huwentoxin-X ที่สังเคราะห์ได้จาก 2Cl-Trityl chloride resin	93
ข8 ภาพแสดง MALDI-TOF mass spectrum ของโปรตีน Huwentoxin-X ที่ fold แล้ว	93
ข9 ภาพแสดง MALDI-TOF mass spectrum ของ Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 2) ที่ fold แล้ว	94
ข10 ภาพแสดง MALDI-TOF mass spectrum ของ Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ตัวที่ 3) ที่ fold แล้ว	94
ข11 ภาพแสดง MALDI-TOF mass spectrum ของโปรตีน cyclic HWTX-X ที่ fold แล้ว	95

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	คำเต็ม/คำจำกัดความ
ACN	Acetonitrile
Boc	Tert-butoxycarbonyl
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichloromethane
DIPEA	Diisopropylethylamine
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
DMF	Dimethylformamide
EDT	Ethanedithiol
EtOAc	Ethylacetate
Fmoc	N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl
GSH	L-glutathione (reduced form)
GSSG	L-glutathione (oxidized form)
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium3-oxide hexafluorophosphate
HCTU	2-(6-Chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	High performance liquid chromatography
HWTX-X	Huwentoxin-X
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight
MS	Mass spectrometry
MeOH	Methanol
mM	Milimolar

nm	Nanometer
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
SPPS	Solid phase peptide synthesis
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoroacetic acid
TIPS	Triisopropylsilane
Tris	Trihydroxymethylaminomethane
Trt	Triphenylmethyl
VGICs	Voltage-gated ion channels
α	Alpha
β	Beta
ω	Omega



บทที่ 1

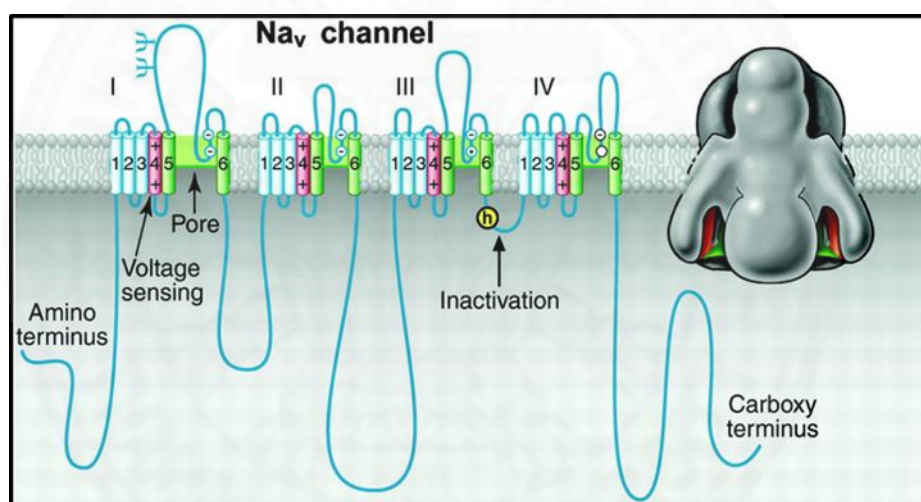
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันองค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และการแพทย์มีความก้าวหน้าและได้รับการพัฒนาเป็นอย่างมาก และถือได้ว่ามีบทบาทที่สำคัญต่อการพัฒนาวิธีการรักษาโรคชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นสำหรับการคิดค้นหาตัวยาชนิดใหม่มาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดขึ้นนั้นถือได้ว่าเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้การรักษาโรคเกิดประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งพบว่าตัวยาส่วนใหญ่ที่ใช้ในการรักษากันอยู่ในปัจจุบันนั้นมีองค์ประกอบที่เป็นสารเคมีที่มีขนาดเล็ก (small molecule) ซึ่งหากมีการใช้ตัวยาดังกล่าวเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดผลเสียบางประการได้ อาทิ การเกิดผลข้างเคียงต่อร่างกาย (side effect) และปัญหาของการดื้อยาของโรคนั้นๆได้ โดยจากการศึกษาวิจัยพบว่าสารเพปไทด์ (peptides) หรือโปรตีน (proteins) เป็นทางเลือกที่มีความน่าสนใจต่อการพัฒนาไปเป็นยารักษาโรค เนื่องจากมีข้อดีคือ มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมาย (targeting) ได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง มีประสิทธิภาพที่สูงและที่สำคัญคือมีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อยมาก¹ จึงส่งผลให้การศึกษาวิจัยโปรตีนเพื่อใช้พัฒนาต่อเป็นยารักษาโรคต่างๆได้รับความสนใจอย่างสูงในปัจจุบันจากนักวิจัยทางด้าน drug discovery และบริษัทต่างๆ ในการพัฒนาและใช้โปรตีนเป็นยารักษาโรคชนิดต่างๆ อาทิ โรคมะเร็ง (cancer disease) โรคที่เกี่ยวข้องกับอาการปวดเรื้อรัง (chronic pain) เป็นต้น โดยเพปไทด์หรือโปรตีนที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptides) สามารถพบได้ในธรรมชาติทั้งในสัตว์ที่มีพิษและในพืชบางชนิด²⁻³ อาทิ งู แมงมุม แมงป่อง และเมล็ดของผลพริกขี้หนู เป็นต้น โดยพิษของสัตว์เหล่านี้จะถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการล่าเหยื่อและใช้ป้องกันตนเองจากสัตว์นักล่าต่างๆ⁴ ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่ที่พบในสารพิษคือ สารโปรตีนที่เป็น cysteine-rich bioactive protein หรือโปรตีนที่มีองค์ประกอบของซัลเฟอร์ (sulfur) อันสืบเนื่องมาจากมีกรดอะมิโนที่เรียกว่า ซีสเตอีน (cysteine) อยู่ภายในโมเลกุล ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะมีความสามารถในการจับกับไอออนชั้นแนล (ion channels) ได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง (selective) หรือสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่เป็นตัวกลางสำคัญในกระบวนการทางชีวเคมี (biochemical process) ได้⁵⁻⁶ นอกจากนี้สารเพปไทด์ (peptide) ที่พบยังมีขนาดที่พอเหมาะและมีโครงสร้างที่เสถียรแข็งแรง (compact structure) เนื่องจากถูก stabilize ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide-rich scaffolds) ทำให้คงทนต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ได้ และสิ่งที่มีความพิเศษคือ มีโครงสร้างและหน้าที่การทำงาน (function) ได้หลากหลาย อาทิ มีโครงสร้างที่เป็นได้ทั้งเส้นตรง (linear) และที่เป็นวง (cyclic) รวมถึงการมีหมู่ฟังก์ชัน (functional

group) ของกรดอะมิโนที่หลากหลาย จึงทำให้เหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรค (therapeutic agents)⁷

ไอออนชันแนล (Voltage-gated ion channels หรือ VGICs) คือ transmembrane โปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณทางไฟฟ้าของเซลล์ (electrical signal) โดยหลักการทำงานคือการเปิดและปิดชันแนล (channels) ให้เกิดการเคลื่อนที่ของชนิดไอออนต่างๆ (electrochemical gradient) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cellular membranes) **แสดงได้ดังภาพที่ 1.1** โดย VGICs สามารถแบ่งออกได้เป็นชันแนล (channels) ชนิดต่างๆดังนี้ โซเดียม (Na^+), โพแทสเซียม (K^+), แคลเซียม (Ca^{2+}) และคลอไรด์ (Cl^-) โดยโครงสร้างทั่วไปเกิดจากหน่วยย่อย (subunits) หลายหน่วยมาเรียงต่อกันทำให้เกิดเป็นช่องตรงกลาง (channels) ซึ่งในแต่ละไอออนชันแนลจะมีความจำเพาะกับไอออนชนิดนั้นๆ⁸



ภาพที่ 1.1 ภาพแสดงลักษณะโดยทั่วไปของไอออนชันแนลในร่างกาย

นอกจากนี้ไอออนชันแนล (ion channel) แต่ละชนิดยังสามารถแบ่งแยกย่อย (subtypes) ได้อีก อาทิ โซเดียมชันแนล (Na^+ channel) สามารถแบ่งออกได้เป็น ($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$), ในส่วนแคลเซียมชันแนล (Ca^{2+} channel) สามารถแบ่งออกได้เป็น T, L, N, P/Q, และ R ซึ่งในแต่ละ subtype จะมีความจำเพาะต่อการรักษาโรคที่มีความแตกต่างกัน⁹⁻¹⁰ จึงถือว่าเป็นข้อดีในการที่จะหาตัวยาหรือสารเพปไทด์ (peptide drugs) ที่มีความเหมาะสมและมีความจำเพาะเจาะจงต่อ subtype ของไอออนชันแนลชนิดนั้นๆ ซึ่งเป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อให้การรักษาโรคเกิดประสิทธิภาพที่ดีมากยิ่งขึ้น ด้วยเหตุนี้ผู้ทำวิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาและทำการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin ที่สามารถแยกได้จากพิษของแมงมุม Chinese bird สายพันธุ์ *Ornithoctonus huwena* ซึ่งโปรตีนตัวใหม่ชนิดนี้มีชื่อว่า

โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X)¹¹ ซึ่งมีความสามารถในการจับกับ Ca^{2+} channel ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยโปรตีนชนิดนี้จะจัดอยู่ในกลุ่มของ Huwentoxin (HWTX family) ซึ่งเป็น neurotoxic peptides ที่พบในพิษแมงมุม Chinese bird¹² โดยโปรตีนชนิดอื่นๆที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้จะมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกันออกไปรวมถึงลำดับจำนวนของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันซึ่งแสดงได้ดังภาพที่ 1.2

Toxins	Amino acid sequences
HWTX-I	ACKGVFDACTP-GKNE-CCPNR--VCS DKHKWCKWKL
HWTX-III	DCAGYMREC---KEKL-CCSGY--VCSSRWKWCVLPAPW
HWTX-IV	ECLEIFKACNP-SNDQ-CCKSSKLVCSRKTRWCKYQI *
HWTX-V	ECRWYLGGSQ-DGD--CCKHL--QCHSNYEWCVWDGTF S
HWTX-X	KCLPPGKPCYGATQKIPCCG----VCSH--NKCT
HWTX-II	LFECFSFSCIEIEKEGDKPCKKKKCKGGWKCKFNM CVKV
HWTX-VII	-FECFSFSCIEIEKEGDKPCKKKKCKGGWKCKFNM CVKV
HWTX-VIII	-FECSISFSCIEIEKKGE-SCKPKKCKGGWKCKFNM CVKV

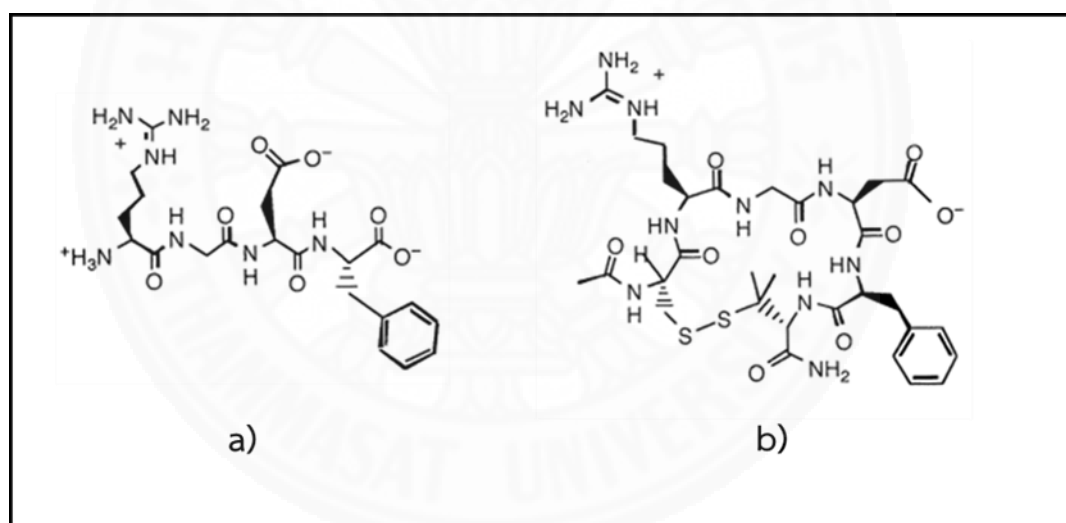
ภาพที่ 1.2 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดต่างๆที่จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน

Huwentoxin



ภาพที่ 1.3 ภาพแสดงโครงสร้างสามมิติของโปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X)¹¹

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของโปรตีน Huwentoxin-X เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกด้วย โดยในงานวิจัยนี้จะทำการสังเคราะห์ cyclic HWTX-X เนื่องจากโดยธรรมชาติแล้วโปรตีน Huwentoxin-X ที่พบในธรรมชาติจะมีลักษณะที่เป็นเส้นตรง (linear) ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 28 ตัว และมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) อยู่ 3 พันธะจัดเรียงตัวในลักษณะที่เหมาะสม และมีโครงสร้างภายในเป็นแบบ β -sheet อยู่ 3 ส่วน ซึ่งในงานวิจัยนี้ทางผู้วิจัยมีความสนใจที่จะพัฒนาและสังเคราะห์สารให้อยู่ในรูปที่เป็นวง (cyclic) เพื่อช่วยเพิ่มความเสถียรของโครงสร้าง (stability) และความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivity) ของสารเปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยตัวอย่างของงานวิจัยที่เห็นได้ชัดเจนคือ ในงานวิจัยของ Bogdanowich-Knipp และคณะ¹³ ที่ได้ทำการศึกษาความเสถียรของเปปไทด์ระหว่าง linear และ cyclic RGD peptides ในพีเอช (pH) และบัฟเฟอร์ (buffer) ช่วง 1-12 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แสดงได้ดังภาพที่ 1.4



ภาพที่ 1.4 ภาพแสดงโครงสร้างของ linear และ cyclic RGD peptides โดยที่ a) คือ linear RGD peptides (Arg-Gly-Asp-Phe-OH) และ b) คือ cyclic RGD peptides ((cyclo)-1,6-acetylated-Cys-Arg-Gly-Asp-Phe-penicillamine-NH₂)

โดยจากผลการศึกษาพบว่าเพปไทด์ที่เป็นวง (cyclic) จะมีความเสถียรที่มากกว่าเพปไทด์ที่เป็นเส้นตรง (linear) ถึง 30 เท่า ที่ pH เท่ากับ 7 เป็นผลเนื่องมาจากโครงสร้างที่เป็นวงมีความเป็น rigid ทำให้ยากต่อการเกิด hydrolysis ของเพปไทด์ โดยองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยทางด้านเพปไทด์จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการศึกษาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคต่อไปในอนาคตได้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) ที่พบในพิษของแมงมุม Chinese bird สายพันธุ์ *Ornithoctonus huwena* โดยใช้วิธีทางเคมีที่เรียกว่า solid phase peptide synthesis
2. เพื่อศึกษาและทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของโปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) โดยใช้วิธี mutagenesis เพื่อพัฒนาความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีน
3. เพื่อทำการสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้าง (re-engineering) ของโปรตีน Huwentoxin-X เพื่อเพิ่มความเสถียรของโปรตีนและพัฒนาความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อไป

1.3 ขอบเขตการวิจัย

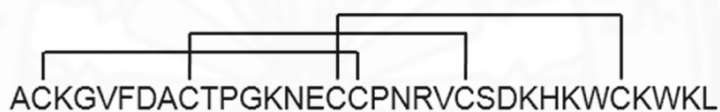
ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะทำการศึกษาและสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) ซึ่งมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจในการยับยั้งแคลเซียมชันแนล (Ca^{2+} channel) นอกจากนี้ยังทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ (derivative) ของโปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) ด้วยวิธีการ mutagenesis เพื่อค้นหาความสามารถในการออกฤทธิ์ชนิดใหม่และทำการ re-engineering ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีน Huwentoxin-X เพื่อนำสารที่สังเคราะห์ได้นั้นไปทำการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรตีน Huwentoxin (HWTX)

โปรตีนหรือท็อกซิน (toxin) ในกลุ่มนี้สามารถพบได้ในพิษของแมงมุมทารันทูล่า (tarantula) สายพันธุ์หนึ่งที่มีชื่อเรียกว่า Chinese bird spider จัดอยู่ในกลุ่มชนิด (species) *Ornithoctonus huwena* โดยในปี ค.ศ. 1993 Liang และคณะ¹⁴ ได้ทำการแยกเปปไทด์ชนิดหนึ่งมีชื่อว่า Huwentoxin-I จากพิษของแมงมุมชนิดนี้ โดยโปรตีน HWTX-I นี้จะประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 33 ตัว โดยมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) 3 พันธะจัดเรียงตัวภายในโครงสร้าง จัดเป็นเปปไทด์ในกลุ่มที่เรียกว่า neurotoxic peptides โดยแสดงความสามารถในการยับยั้ง neuromuscular transmission ในเซลล์ประสาทสมองของหนู (13.4 ± 1.3 นาที)



ภาพที่ 2.1 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-I



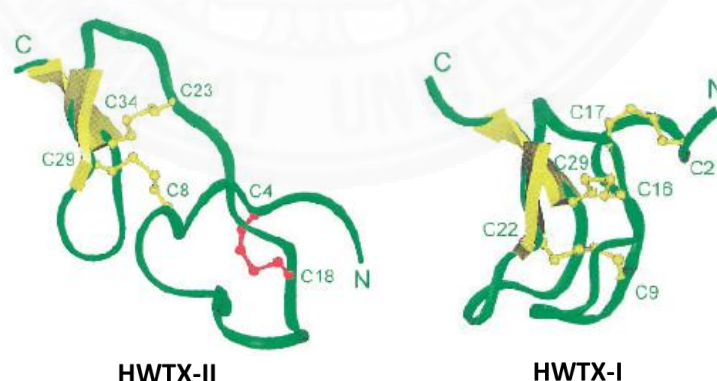
ภาพที่ 2.2 ภาพแสดงแมงมุม Chinese bird spider สายพันธุ์ *Ornithoctonus huwena*¹²

ถัดมาในปี ค.ศ. 1998 Shu และ Liang¹⁵ ได้รายงานการแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ (characterization) ของสารเพปไทด์ที่ชื่อว่า Huwentoxin-II โดยเพปไทด์ชนิดนี้มีกรดอะมิโนทั้งหมด 37 ตัว และมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) 3 พันธะภายในโครงสร้าง มีมวลโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 4285.6 Da และแสดงความสามารถในการออกฤทธิ์ทำให้แมลงสาบ (cockroaches) เป็นอัมพาต (paralyze) หลายชั่วโมงและยังสามารถยับยั้ง neuromuscular transmission ได้เช่นเดียวกับ Huwentoxin-I



ภาพที่ 2.3 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-II

ในปี ค.ศ. 2001 Peng และคณะ¹⁶ ได้รายงานความสามารถในการออกฤทธิ์ของ HWTX-I ในการยับยั้งแคลเซียมช่อง (Ca²⁺ channel) โดยใช้ patch clamp technique ในการศึกษา differentiated NG108-15 cells โดยพบว่า HWTX-I มีความสามารถในการออกฤทธิ์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง (selective) ต่อแคลเซียมช่อง (Ca²⁺ channel) ชนิดที่เป็น N-type และในปีเดียวกัน Shu และคณะ¹⁷ ได้ทำการศึกษาโครงสร้างของ HWTX-II โดยใช้ 2D ¹H-NMR technique ซึ่งจากการศึกษาพบว่า HWTX-II มีการจัดเรียงตัวของพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide linkage) ที่มีความพิเศษ คือ I-III, II-V, และ IV-VI ซึ่งมีความแตกต่างกับโมเลกุลแบบ ICK (inhibitor cystine knot motif)



ภาพที่ 2.4 ภาพแสดงโครงสร้างเปรียบเทียบกันระหว่าง HWTX-II และ HWTX-I โดยที่ HWTX-II จะมีการจัดเรียงตัวของ 3 พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) ในรูปแบบที่เป็น I-III, II-V, และ IV-VI (C₄-C₁₈, C₈-C₂₉, และ C₂₃-C₃₄) ซึ่งมีความแตกต่างจาก HWTX-I ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของ 3 พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) ในรูปแบบ ICK motif คือ I-IV, II-V, และ III-VI (C₂-C₁₇, C₉-C₂₂, และ C₁₆-C₂₉)

ถัดมาในปี ค.ศ. 2002 Peng และคณะ¹⁸ ได้รายงานการการแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ (characterization) ของสารเพปไทด์ที่พบในพิษแมงมุม Chinese bird spider ที่ชื่อว่า Huwentoxin-IV (HWTX-IV) ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 35 ตัว และมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) จำนวน 3 พันธะภายในโครงสร้าง โดยเพปไทด์ชนิดนี้สามารถยับยั้ง tetrodotoxin-sensitive (TTX-S) sodium channel ใน dorsal root ganglion (DRG) neurons ของหนูโตเต็มวัย (adult rat) ซึ่งมีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 30 nM



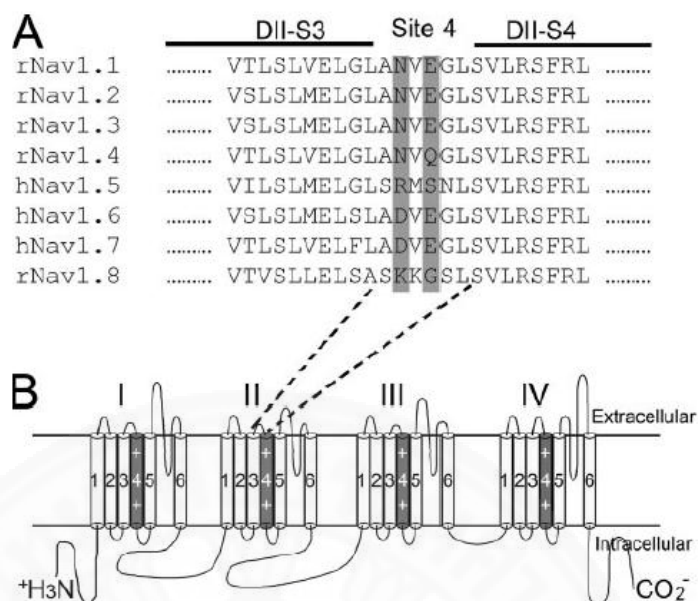
ภาพที่ 2.5 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-IV

ในปี ค.ศ. 2003 Zhang และคณะ¹⁹ ได้รายงานการแยกเพปไทด์ที่ชื่อว่า Huwentoxin-V ซึ่งเป็น insecticidal peptides จากพิษของแมงมุมชนิดนี้ โดยที่ออกซิน (toxin) ชนิดนี้จะประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 35 ตัว และมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) จำนวน 3 พันธะภายในโครงสร้าง โดยที่มีมวลโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 4111.4 Da และแสดงฤทธิ์ในการทำให้แมลงสาบและตั๊กแตนเป็นอัมพาต (paralyze) หลายชั่วโมง



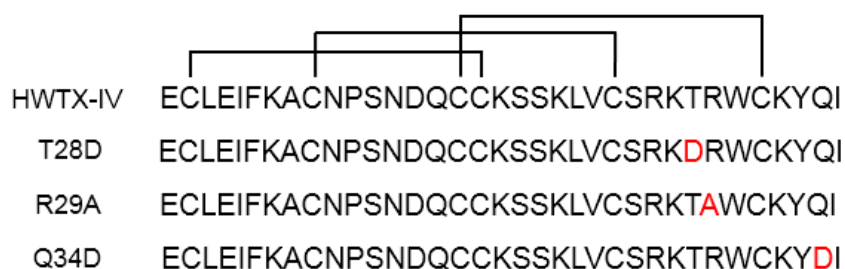
ภาพที่ 2.6 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-V

ในปี ค.ศ. 2008 Xiao และคณะ²⁰ ได้รายงานการจับของ Huwentoxin-IV (HWTX-IV) ต่อ voltage-gated sodium channels (VGSCs) subtypes ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของ neuronal Na^+ channel ได้ โดยแสดงการเข้าจับที่บริเวณตำแหน่ง 4 (site 4) ของ receptor ที่ domain II ใน Na^+ channel



ภาพที่ 2.7 ภาพแสดงให้เห็นถึงการจัดเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง receptor site 4 ของ Na^+ channel โดยรูป A แสดงให้เห็นตำแหน่งที่สำคัญของกรดอะมิโน (สีเทา) ที่เป็น neurotoxin receptor โดยที่ $\text{Na}_v1.1$ - 1.4 และ $\text{Na}_v1.8$ channels มาจากหนู (rat) และ $\text{Na}_v1.5$ - 1.7 channel มาจากคน (human) ส่วนในรูป B แสดง α subunit ของ Na^+ channel ในภาพรวม

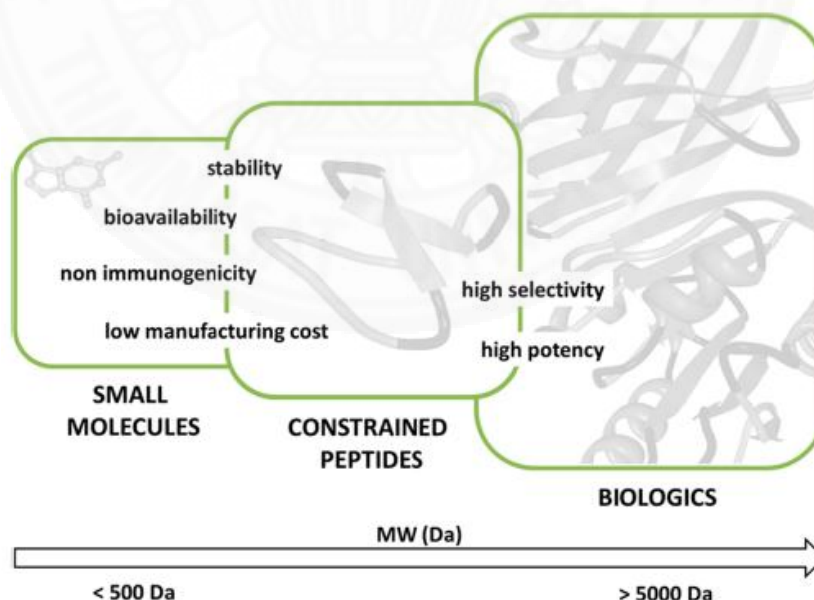
ในปี ค.ศ. 2013 Deng และคณะ²¹ ได้รายงานการสังเคราะห์ Huwentoxin-IV analogs โดยทำการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์กับ tetrodotoxin-sensitive (TTX-S) sodium channels ใน DRG neurons ของหนูโตเต็มวัย ซึ่งพบว่าสารอนุพันธ์ (mutants) ทั้ง 3 ตัว แสดงความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (activity) ได้เช่นเดียวกับ native HWTX-IV



ภาพที่ 2.8 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-IV และอนุพันธ์ที่ทำการสังเคราะห์อีก 3 ตัว โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง (mutagenesis)

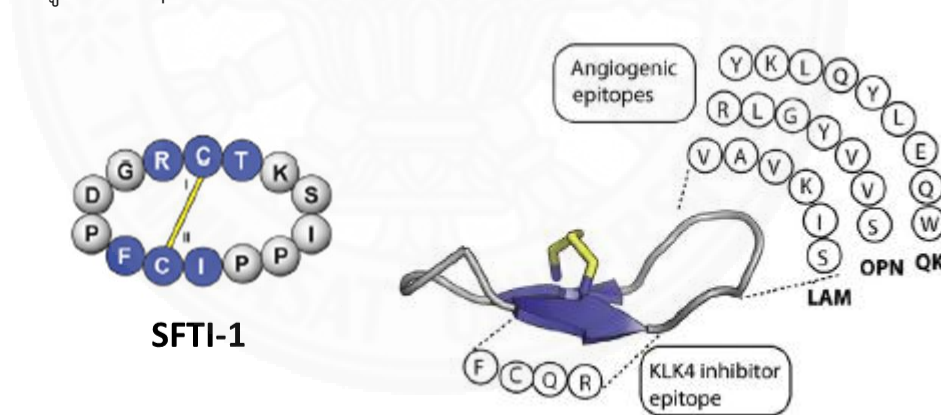
2.2 การพัฒนาเปปไทด์เป็นยา (Peptide to drugs)

การพัฒนาตัวยาชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์เป็นเรื่องที่มีความท้าทายเป็นอย่างมากในปัจจุบัน โดยเปปไทด์หรือโปรตีนเป็นตัวเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจมากในขณะนี้ เนื่องจากเปปไทด์มีจุดเด่นที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง (selectivity) และจับกับเป้าหมายได้หลากหลาย (broad range of bioactivity) อีกทั้งมีขนาดเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้ (therapeutic agents) โดยในปัจจุบันตัวยาที่ผลิตจากอุตสาหกรรมทางยาสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มด้วยกัน คือ small molecules (<500 Da) และ biologics (>5000 Da) ซึ่งสารพวก biologics มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อเป้าหมาย (target) และมีความจำเพาะมากกว่าสารพวก small molecules แต่ยังมีข้อเสียในเรื่องของความเสถียร (metabolic stability) มีความสามารถในการผ่าน membrane ได้ต่ำ (poor membrane permeability) และมี bioavailability ต่ำ และในส่วนของพวก small molecules มีค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์ที่ไม่แพงและมีขั้นตอนที่ไม่สลับซับซ้อน แต่มีข้อเสียคือมีความจำเพาะต่อเป้าหมายที่ต่ำซึ่งนำไปสู่การเกิดผลข้างเคียง (side effect) ซึ่งพบว่าสารเปปไทด์มีขนาดของมวลโมเลกุลที่อยู่ในช่วงระหว่าง 500 Da (small molecule) ถึง 5000 Da (biologics) แสดงได้ดังภาพที่ 2.9 ดังนั้นจึงเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการพัฒนาไปเป็นยา (peptide-based drugs)²²



ภาพที่ 2.9 ภาพแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์สามารถเติมเต็มช่องว่าง (space) ตรงกลางได้ทำให้สามารถมีข้อดีของตัวยาทั้ง 2 กลุ่มได้และมีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นยา²²

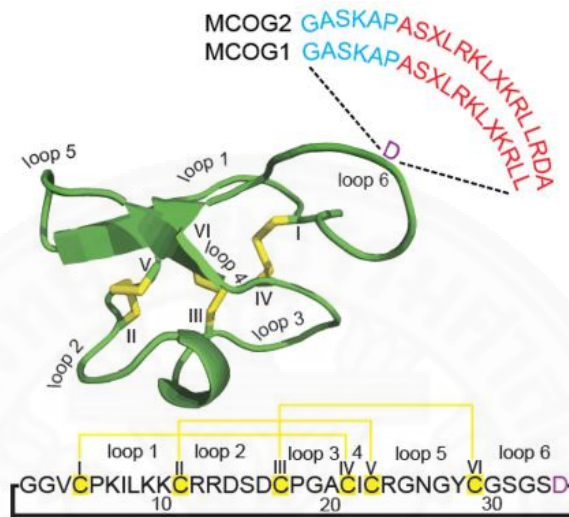
การนำเปปไทด์มาใช้ในการรักษา (peptide-based therapeutics) สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย เนื่องจากเปปไทด์สามารถปรับเปลี่ยน (modification) ได้หลายรูปแบบ อาทิ การทำการปิดวง (cyclization) การต่อกับ unnatural amino acid (β -amino acid) การใส่สารที่ทำหน้าที่เชื่อมต่อ (linker) ชนิดต่างๆ เป็นต้น โดยมีการรายงานการนำเปปไทด์ที่พบได้ในธรรมชาติมาทำการปรับปรุงโครงสร้างเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สังเคราะห์ขึ้น อาทิ ในงานวิจัยของ Northfield และคณะ²³ ได้ทำการศึกษาสารเปปไทด์ที่เป็น disulfide-rich macrocyclic peptides เช่น sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1) ซึ่งเป็นสารเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นวง (cyclic peptide) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 14 ตัว ซึ่งมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อาทิ มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) และมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory properties) เป็นต้น โดยได้ทำการกราฟท์ (grafting) โดยทำการใส่ peptide epitopes ลงบนโครงสร้างของ SFTI-1 โดยที่ Angiogenic epitopes ประกอบด้วย laminin α 1 chain (LAM), osteopontin (OPN) และ VEGF peptide mimic (QK) ซึ่งมีประโยชน์ในการรักษาหลายโรค อาทิ โรคที่เกี่ยวข้องกับการเต้นของหัวใจ (cardiac ischaemia) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) เป็นต้น อีกทั้งยังใส่ KLK4 inhibitor epitope ซึ่งใช้ประโยชน์ในการรักษา มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer)



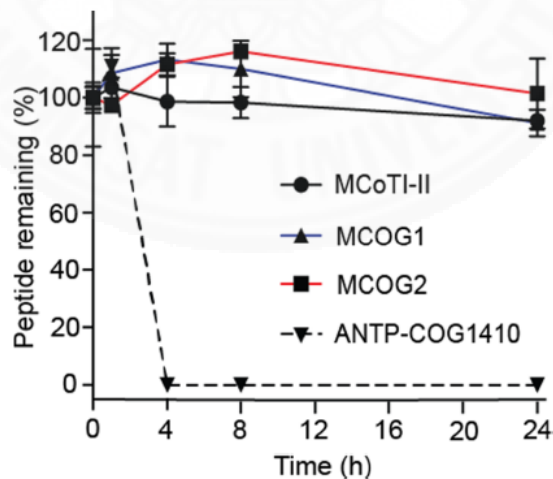
ภาพที่ 2.10 ภาพแสดงโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SFTI-1 และการทำ grafting

ในงานวิจัยของ D'Souza และคณะ²⁴ ได้รายงานการใช้ MCoTI-II Cyclotide ในการออกแบบ (design) เพื่อเป็น cyclic peptide antagonist สำหรับโปรตีนที่ชื่อว่า SET ซึ่งเป็นเป้าหมาย (drug target) ในการรักษาโรคมะเร็ง (cancer therapy) เนื่องจากสารเปปไทด์ที่ชื่อว่า COG peptides ที่ได้จาก apolipoprotein E (apoE) และเป็น antagonist ที่ดีในการรักษาแต่มีข้อจำกัดในเรื่องความเสถียร (proteolytic stability) และมี bioavailability ที่ต่ำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำ

การกราฟท์ (grafting) COG peptides ลงบน Momordica Cochinchinensis Trypsin Inhibitor-II (MCoTI-II) ซึ่งเป็น ultrastable cyclic peptide scaffold โดยจากผลที่ได้พบว่า grafted MCoTI-II peptides มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี (cytotoxicity) และมีความเสถียรสูงใน human serum แสดงได้ดังนี้



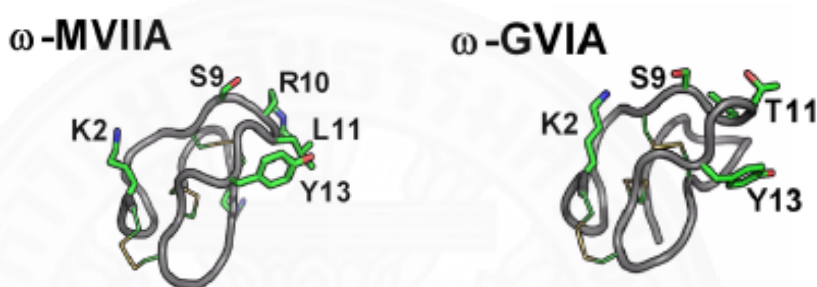
ภาพที่ 2.11 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของ MCoTI-II peptides และการทำ grafting



ภาพที่ 2.12 ภาพแสดงความเสถียรที่เพิ่มขึ้นของ grafted MCoTI-II peptides

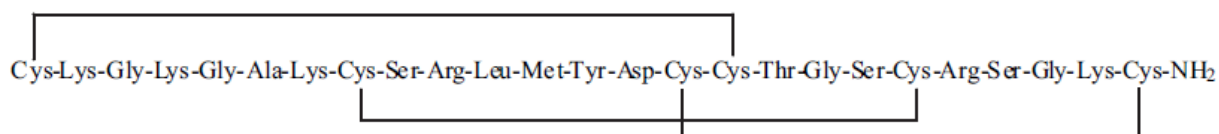
นอกจากนี้เพปไทด์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีความน่าสนใจคือ เพปไทด์หรือโปรตีนที่พบได้ในสัตว์ที่มีพิษ (animal venom) อาทิ แมงมุม แมงป่อง งู และหอยเต้าปูน (cone snail) เป็นต้น โดยในงานวิจัย

ของ Akondi และคณะ²⁵ ได้รายงานการศึกษาเพปไทด์ที่ชื่อว่า conotoxins ซึ่งเป็นสารเพปไทด์ที่พบในพิษของหอยเต้าปูน (cone snail) ซึ่งสาร conotoxins มีความสามารถในการจับกับ receptor และ ion channel ได้อย่างหลากหลาย (wide range) โดยมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity) จึงมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นยา โดยงานวิจัยนี้ทำศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างและความสามารถในการออกฤทธิ์ (Structure-Activity Relationships) อาทิ ในตัวอย่างของ ω -Conotoxin ซึ่งเป็น antagonist สำหรับ voltage-gated calcium channels (VGCCs)²⁶



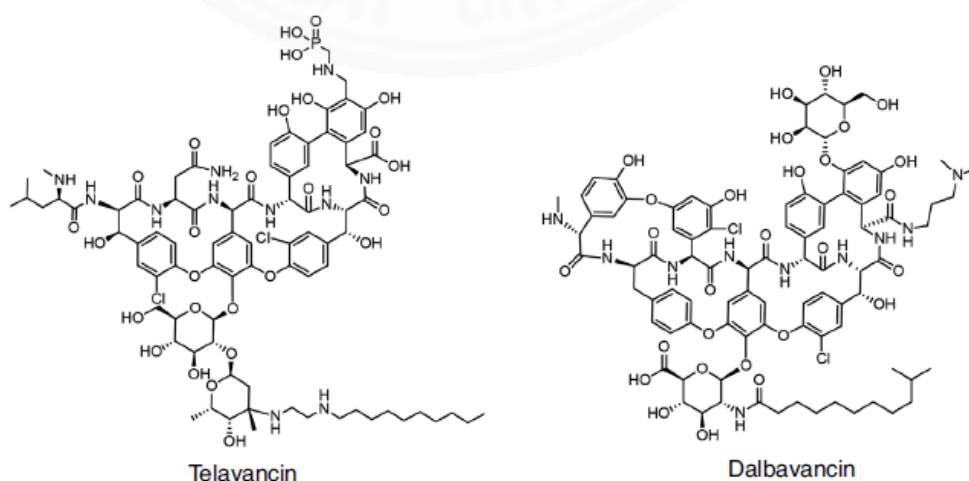
ภาพที่ 2.13 ภาพแสดงการศึกษา SAR ของโมเลกุล ω -Conotoxin ซึ่งแสดงให้เห็นชนิดของกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะต่อการจับกับ Ca^{2+} channel

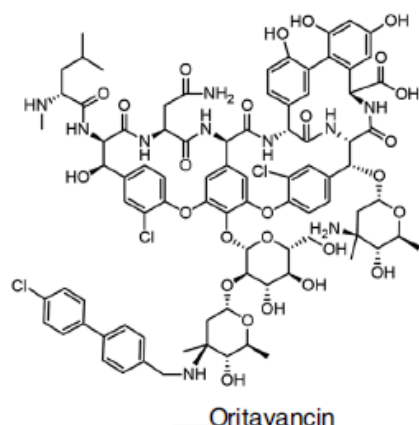
โดยจากการศึกษาพบว่า ω -Conotoxin ทั้งสองชนิดมี backbone conformation ที่เหมือนกัน โดยส่วนของวงอะโรมาติก (aromatic moiety) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของ Tyr13 เป็นส่วนที่สำคัญในการจับกับ $\text{Ca}_v2.2$ ซึ่งความเข้าใจถึงกลไกของการออกฤทธิ์ของ ω -Conotoxin จึงนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาแก้ปวดชนิดใหม่ (analgesic drug) ที่มีชื่อว่า Ziconotide (Prialt)²⁷ ซึ่งได้รับการยอมรับ (approved) จาก FDA โดย Ziconotide จัดเป็น neuroactive peptide ที่ใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับอาการปวดเรื้อรัง (severe chronic pain) ซึ่งสามารถทำการสังเคราะห์ ω -MVIIA ได้จากพิษของ marine snail สายพันธุ์ *Conus magus* โดยกลไกของการออกฤทธิ์ (mechanism of action) ของ Ziconotide จะเกิดขึ้นโดยการจับ (blockade) อย่างมีความจำเพาะเจาะจง (selective) กับ neuronal N-type ของ voltage-sensitive Ca^{2+} channels (NVSCCs) ซึ่งจะไปยับยั้งการส่งสัญญาณของการปวดได้ (pain-sensing primary nociceptors)



ภาพที่ 2.14 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของ Ziconotide (ω -conopeptide MVIIA)

และเนื่องจากเพปไทด์กำลังได้รับความสนใจในการศึกษาและพัฒนาการรักษาโรคที่หลากหลายมากขึ้น จึงทำให้ได้มีการพัฒนาตัวยาเพปไทด์ที่มีลักษณะเป็นวง (peptide macrocycle drugs) มาใช้ในการรักษาโรค เนื่องจากสารเพปไทด์ที่เป็นวง (cyclic) จะมีจุดเด่นคือ มีความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายได้สูงและมีความจำเพาะเจาะจง อีกทั้งยังมีโครงสร้างที่เป็นแบบ rigid จึงทำให้มีการจับตัวในทิศทางที่เหมาะสม และยังสามารถปรับเปลี่ยน (modify) โครงสร้างได้ง่าย โดยในงานวิจัยของ Zorzi และคณะ²⁸ ได้รายงาน cyclic peptide drug ที่ได้รับการยอมรับจาก FDA อาทิ Telavancin, Dalbavancin และ Oritavancin ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของยาปฏิชีวนะ (antibiotics) โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial drug) ซึ่งการสังเคราะห์สารเพปไทด์เหล่านี้จะเป็นแบบ semi-synthesis²⁹ โดยโครงสร้างจะประกอบด้วย heptapeptidic core กับ 5 สายโซ่ที่ยึดติด (fixed residues) เพื่อใช้ในการจับกับ main binding site (D-Ala-D-Ala target) โดยที่ตัวยาจะเข้าไปจับและยับยั้ง (block) กระบวนการ transpeptidation ของ peptidoglycan precursors ในการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (bacterial cell wall)³⁰ นอกจากนี้ยังมีส่วนของ lipophilic side chain ทำให้สามารถยึดเกาะ (anchoring) อยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ (cell membrane) และทำให้ผนังเซลล์อ่อนแอลงได้ (destabilize) โดยโครงสร้างของ peptide drug แสดงได้ดังนี้

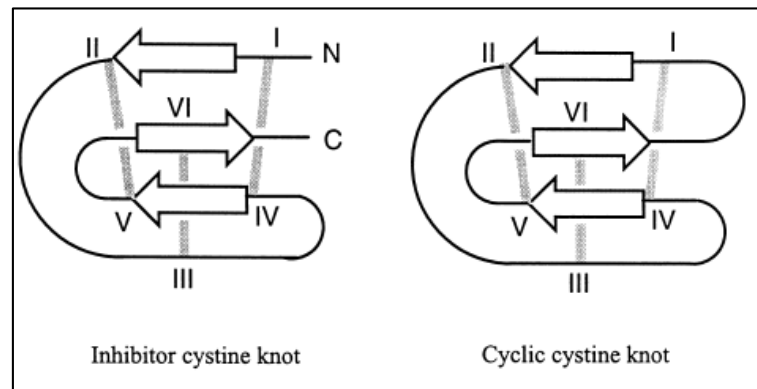




ภาพที่ 2.15 ภาพแสดงโครงสร้างของ peptide macrocycle drugs ทั้ง 3 ชนิด

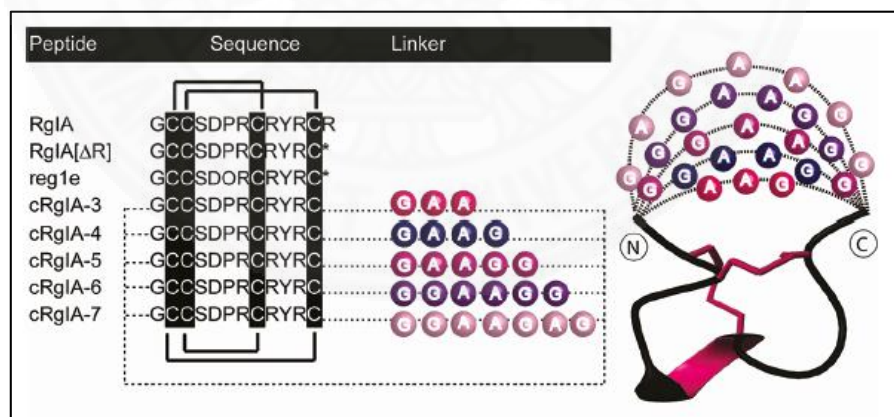
2.3 การสังเคราะห์สารเพปไทด์ที่เป็นวง (cyclic peptides)

เพปไทด์ที่ได้พบในธรรมชาติมีความสามารถที่จะนำมาพัฒนาต่อไปเพื่อใช้เป็นยาได้ (drug leads) เนื่องจากมีความสามารถในการจับกับเป้าหมาย (targets) ได้หลากหลายและมีประสิทธิภาพสูง (high potency) แต่เนื่องจากข้อจำกัดบางประการ อาทิ มี bioavailability และความเสถียร (stability) ที่ต่ำในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) อีกทั้งยังมีราคาสูงเมื่อเทียบกับตัวยาที่มีขนาดเล็ก (small molecule drugs) โดยเพปไทด์ที่มีลักษณะเป็นวง (cyclic peptide) สามารถลดข้อจำกัดบางประการของ linear peptide ได้ ซึ่งมีความทนทานต่อเอนไซม์สูง (protease resistance) และมีความเสถียรมากกว่า (more stable) อีกทั้งสามารถปรับปรุง biopharmaceutical properties ได้ โดย cyclic peptide กลุ่มใหญ่ที่สุดในพืชคือ cyclotides ซึ่งเพปไทด์ชนิดนี้จะมีกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) 6 ตัวเชื่อมกันทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ (disulfide bonds) ในรูปแบบ cyclic cystine knot³¹⁻³² แสดงได้ดังภาพที่ 2.16 และมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (activity) ที่น่าสนใจ อาทิ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ HIV (anti-HIV) และการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin inhibition) เป็นต้น³³⁻³⁵



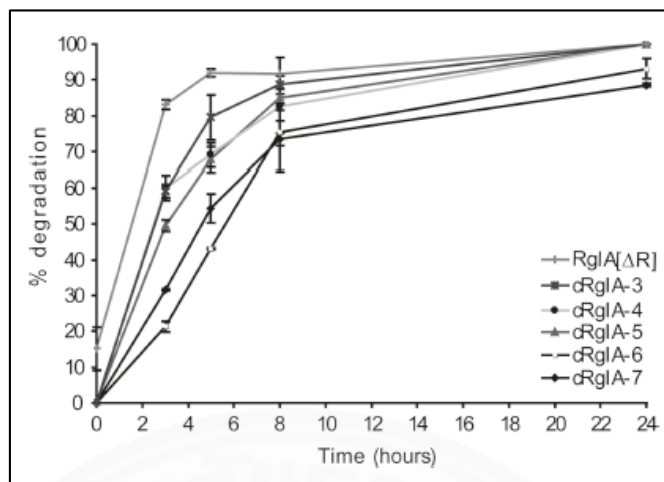
ภาพที่ 2.16 ภาพแสดงการลักษณะจัดเรียงตัวของสารเพปไทด์ในรูปแบบ inhibitory cystine knot ที่พบในธรรมชาติ³²

จากความรู้ด้านเพปไทด์ที่พบในพืช (plants) นำไปสู่การศึกษาเพปไทด์ในสัตว์มีพิษ (animal venom) โดยในปี ค.ศ. 2011 Halai และคณะ³⁶ ได้การศึกษาผลของความเสถียร (stability) และความสามารถในการออกฤทธิ์ (activity) จากการทำให้ cyclization ของโปรตีน α -Conotoxin RglA ที่มีต่อนิโคตินิกอะซีทิลโคลีน (nicotinic acetylcholine receptor) และ GABA_B receptor โดยการสังเคราะห์ปิดวงจะใช้กรดอะมิโนทำหน้าที่เป็น linker อยู่ 3-7 ตัว



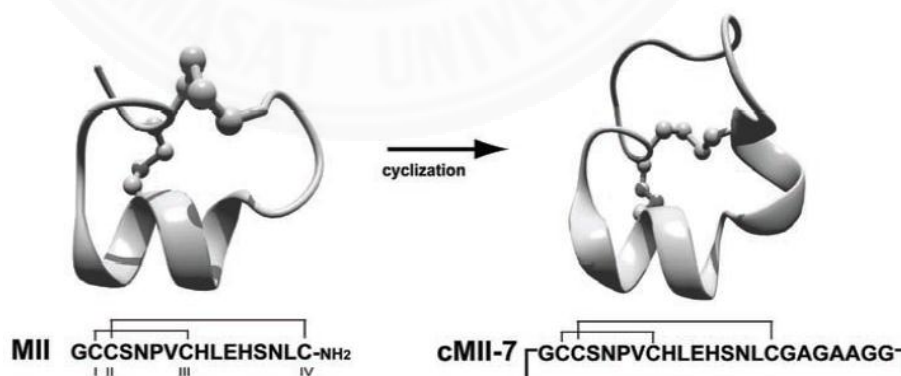
ภาพที่ 2.17 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน RglA และการปิดวง (cyclization) ด้วย linker ที่แตกต่างกัน

และจากการศึกษาพบว่า cyclic RglA (cRglA-7) แสดงความสามารถในการออกฤทธิ์ (activity) ที่ดีใกล้เคียงกับ linear RglA แต่มีความเสถียรที่มากกว่า linear RglA

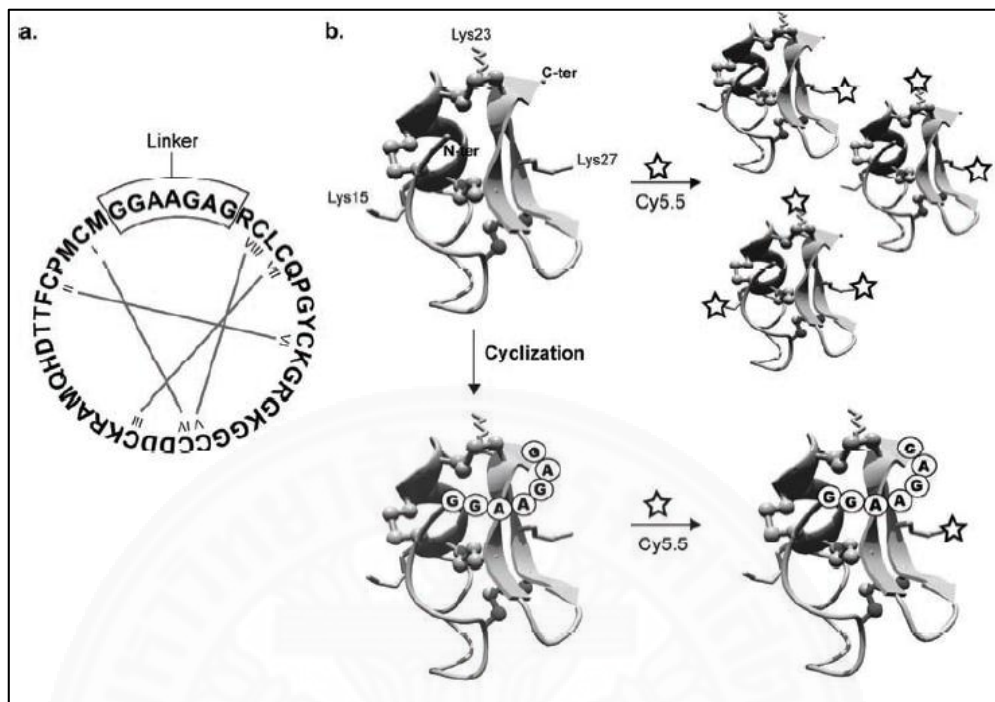


ภาพที่ 2.18 ภาพแสดงผลของการศึกษาความเสถียรใน human serum โดยที่ cyclic RglA จะมีความเสถียรมากกว่า linear RglA นอกจากนี้ขนาดความยาวของ linker ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้มีความเสถียรที่มากขึ้นด้วย

ในปี ค.ศ. 2012 Cemazar และคณะ³⁷ ได้ รายงานการสังเคราะห์ cyclic peptide ของโปรตีน conotoxin (α -conotoxin MII) ที่พบในพิษของ marine cone snails เพื่อใช้ในการเป็น orally active peptide ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับ neuropathic pain และ chlorotoxin ที่พบในพิษของแมงป่องสายพันธุ์ *Leiurus quinquestriatus* เพื่อใช้เป็น tumour imaging agent โดยผลจากการปิดวง (cyclization) ทำให้สารมีความเสถียรมากขึ้น (higher stability) และยังคงมีฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดิม (no loss of bioactivity)

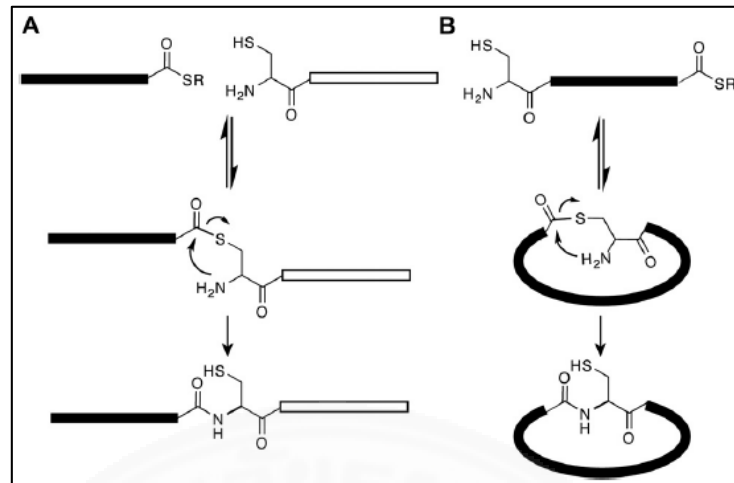


ภาพที่ 2.19 ภาพแสดงการสังเคราะห์ cyclic α -conotoxin MII โดยใช้กรดอะมิโน 7 ตัว ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อม (linker)

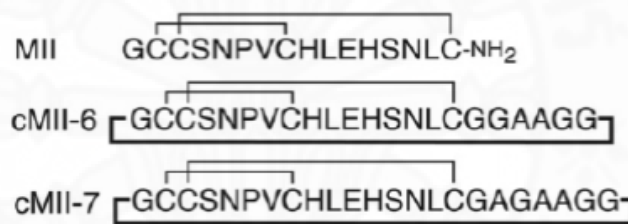


ภาพที่ 2.20 ภาพแสดงการสังเคราะห์ cyclic chlorotoxin และการติด (conjugation) สารเรืองแสง Cy5.5 โดยที่ a) คือ ลำดับกรดอะมิโนของ chlorotoxin ที่ปิดวงโดยใช้กรดอะมิโน 6 ตัว ทำหน้าที่เป็น linker และ b) แสดงการ labeled-product โดยพบว่า linear chlorotoxin จะมีผลิตภัณฑ์หลายตัว ขณะที่ cyclic chlorotoxin จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น mono-labeled เท่านั้น

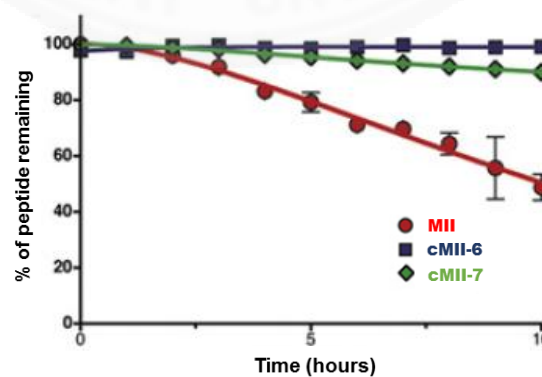
และในปีเดียวกัน Clark และคณะ³⁸ ได้ทำการศึกษาการ cyclization ของโปรตีน conotoxin เพื่อปรับปรุง biopharmaceutical properties โดยใช้วิธีการสังเคราะห์ α -conotoxin MII ด้วย native chemical ligation (NCL) ร่วมกับการใช้ตัวเชื่อม (linker)



ภาพที่ 2.21 ภาพแสดง A คือหลักการของการเกิด native chemical ligation ของโปรตีน และ B คือ การปิดวง (cyclization) ของโปรตีนโดยอาศัยหลักการ native chemical ligation



ภาพที่ 2.22 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของ linear α -conotoxin และ cyclic α -conotoxin ที่ใช้จำนวนกรดอะมิโนที่แตกต่างกันทำหน้าที่เป็น linker



ภาพที่ 2.23 ภาพแสดงให้เห็นว่า cyclic α -conotoxin มีความเสถียรต่อเอนไซม์ protease Endo-GluC มากกว่า linear α -conotoxin

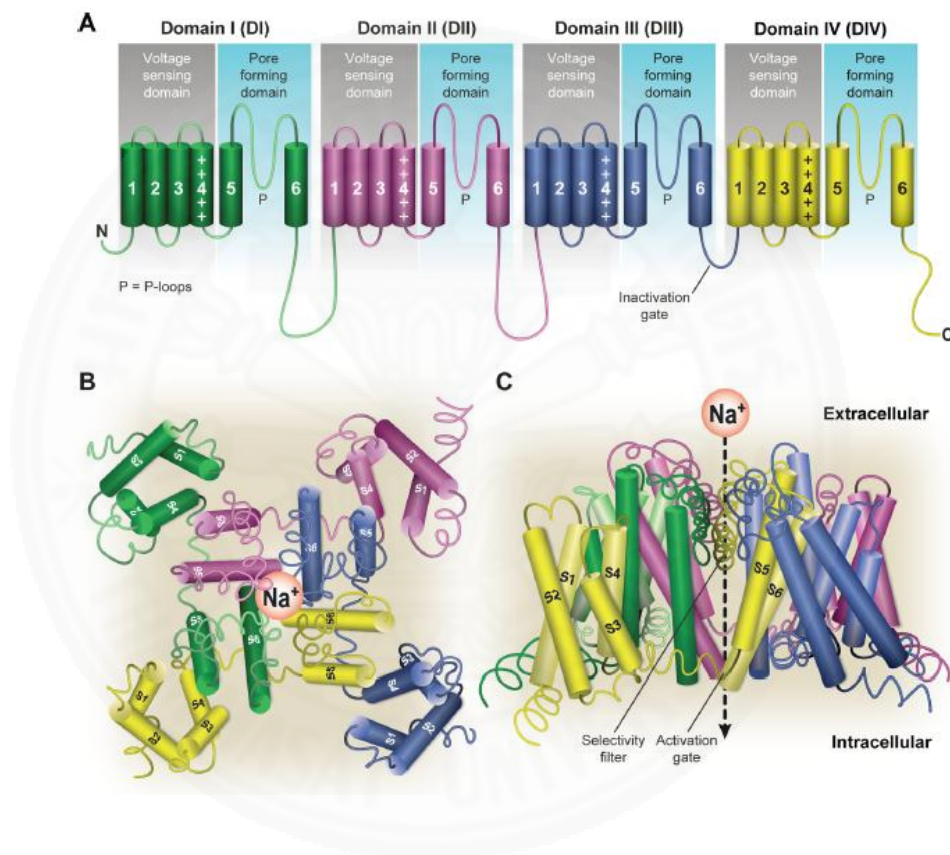
2.4 Voltage-gated ion channels (VGICs)

ไอออนช่องแคบ (ion channels) ถือว่าเป็นเป้าหมายใหม่ที่น่าสนใจในการพัฒนาตัวยามารักษา โดยไอออนช่องแคบมีบทบาทหน้าที่สำคัญ (critical role) ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทและกล้ามเนื้อ (nerve and muscle relaxation) การรับรู้ (cognition) และการส่งสัญญาณทางประสาทสัมผัส (sensory transduction) เป็นต้น ซึ่งมีความเชื่อมโยงกับการเกิดโรคชนิดต่างๆ อาทิ โรคหัวใจ (cardiac disorders) โรคทางระบบประสาท (neurological indications) และโรคที่เกี่ยวข้องกับอาการปวด (perception of pain) ดังนั้นการหาตัวยาที่เหมาะสมนั้นจึงเป็นสิ่งที่จะต้องพิจารณาในการพัฒนาการรักษาโรค³⁹ และเนื่องจากไอออนช่องแคบ (ion channel) สามารถแบ่งแยกย่อยได้เป็น subtypes ต่างๆ ซึ่งแต่ละ subtypes จะมีความจำเพาะต่อการเกิดโรคนั้นๆ ดังนั้นการหาตัวยาที่มีความจำเพาะต่อ subtype นั้นๆจึงเป็นสิ่งที่จะต้องพิจารณาเพื่อให้การรักษาเกิดผลได้ดีที่สุด ซึ่งการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับอาการปวด (chronic pain) จะมีความเกี่ยวข้องกับ ion channel ที่สำคัญอยู่ 2 ชนิดด้วยกัน

2.4.1 โซเดียมช่องแคบ (Sodium channels)

Voltage-gated sodium channels (VGSCs) คือ ทรานส์เมมเบรนโปรตีน (transmembrane protein) ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อขึ้น initiation และ propagation action potentials ใน excitable cells โดยที่ ion channel ชนิดนี้ประกอบด้วยหน่วยแอลฟา (α subunit) ที่ทำหน้าที่ในการสร้างช่องว่างกลางไอออนช่องแคบ กับ 1 หรือ 2 หน่วยเบต้า (β subunits) โดย VGSCs สามารถแบ่งแยกย่อยออกได้เป็น 9 subtypes ($Na_v1.1$ - $Na_v1.9$) ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของหน่วยแอลฟา⁹ โดยที่ Na_v channel subtypes จะแสดงออกอยู่ที่ชนิดของเนื้อเยื่อที่ตำแหน่งเฉพาะ กล่าวคือ $Na_v1.1$ - 1.3 subtypes สามารถพบที่ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system, CNS) ในส่วนของ $Na_v1.4$ subtype จะพบได้ที่กล้ามเนื้อที่มีกระดูกหรือกล้ามเนื้อยึดติด (skeletal muscles) ในขณะที่ $Na_v1.5$ subtype พบได้มากที่กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscles) สำหรับ $Na_v1.6$ subtype จะพบได้มากทั้งระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) และระบบประสาทส่วนหลัง (peripheral nervous system, PNS) และ $Na_v1.7$ - 1.9 subtypes จะพบได้มากที่ระบบประสาทส่วนหลังเท่านั้น⁴⁰ และเมื่อศึกษาโครงสร้างทางด้านโมเลกุล (molecular architecture) จะพบว่า Na_v channels เกิดจากหน่วยแอลฟาและหน่วยเบต้า (1 หรือ 2 หน่วย) รวมตัวเข้าด้วยกัน โดยทั้ง 9 subtypes ($Na_v1.1$ - $Na_v1.9$) ของโซเดียมช่องแคบจะถูก encode ด้วยยีน (gene) ที่มีชื่อว่า SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A, SCN8A, SCN9A, SCN10A, และ SCN11A ตามลำดับ ซึ่งความต่างของหน่วยแอลฟานี้ชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างของ Na_v channel subtype ซึ่งเกี่ยวข้องกับ

receptor site ในการจับกับตัวยา (drugs) และทีอกซิน (toxins)⁴¹ โดยหน่วยแอลฟาคือสายโซ่พอลิเพปไทด์ (polypeptides chain) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวเป็น four homologous domains (DI-DIV) นอกจากนี้ในแต่ละ domain ยังประกอบด้วย 6 transmembrane segments (S1-S6) และสำหรับในส่วนของหน่วยเบต้า จะมีทั้งหมด 4 ยีน ที่มีชื่อว่า SCN1B ถึง SCN4B ซึ่งทำให้เกิดเป็น 5 หน่วยเบต้า ดังนี้ $\beta 1$, $\beta 1B$, $\beta 2$, $\beta 3$, และ $\beta 4$ subunits⁸

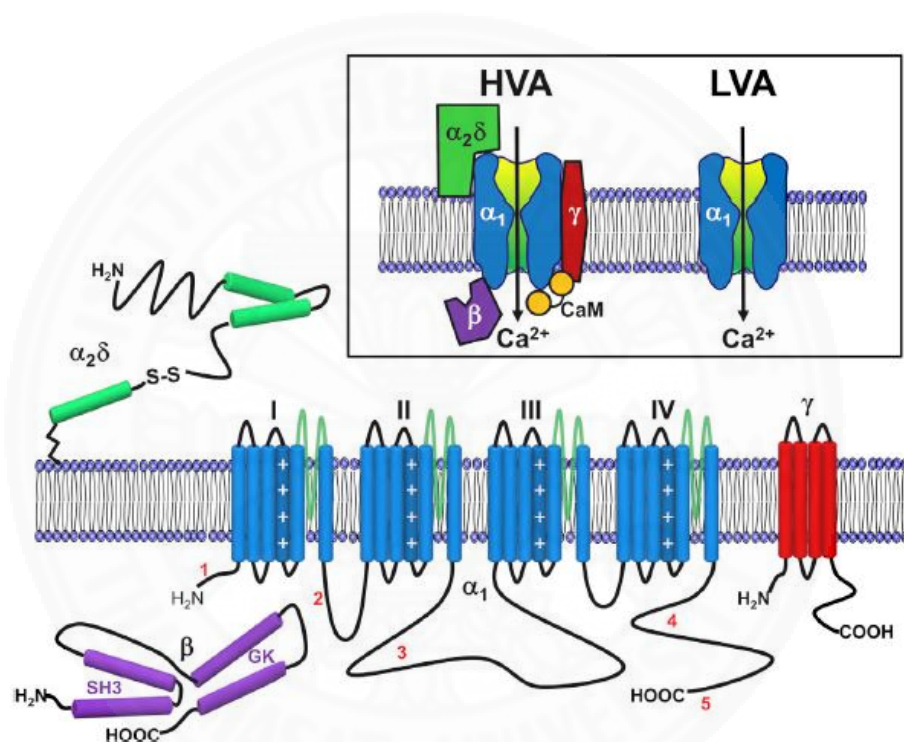


ภาพที่ 2.24 ภาพแสดงโครงสร้างของ Na⁺channels โดยที่รูป A แสดงหน่วยแอลฟา (α subunit) ที่ประกอบด้วย 4 domain ส่วนรูป B และ C แสดงการเคลื่อนที่ของไอออน Na⁺ ผ่านไอออนชั้นแนล โดยแสดงจากภาพมุมบนและด้านข้างตามลำดับ⁸

2.4.2 แคลเซียมชั้นแนล (Calcium channels)

Voltage-gated calcium channels (VGCCs) มีบทบาทที่สำคัญต่อการปลดปล่อยสารสื่อประสาทของร่างกายในการติดต่อสื่อสารกัน (neurotransmitter release and neuronal

communication) โดยแคลเซียมช่องแคตไอออน (Ca^{2+} channels) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (two families) ด้วยกันโดยขึ้นอยู่กับ voltage entrance สำหรับการ activation ซึ่งแบ่งออกเป็น high voltage-activated (HVA) channels และ low voltage-activated (LVA) channels โดยที่ HVA จะประกอบด้วย L-, N-, P/Q-, and R-types ในขณะที่ LVA เป็น T-type Ca^{2+} channels⁴² ซึ่ง HVA channels คือ heteromeric protein ที่ประกอบด้วย $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunit ติดกันกับ $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ และ $\text{Ca}_v\beta$ subunits แต่ใน LVA จะมีแค่ $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunit เท่านั้น



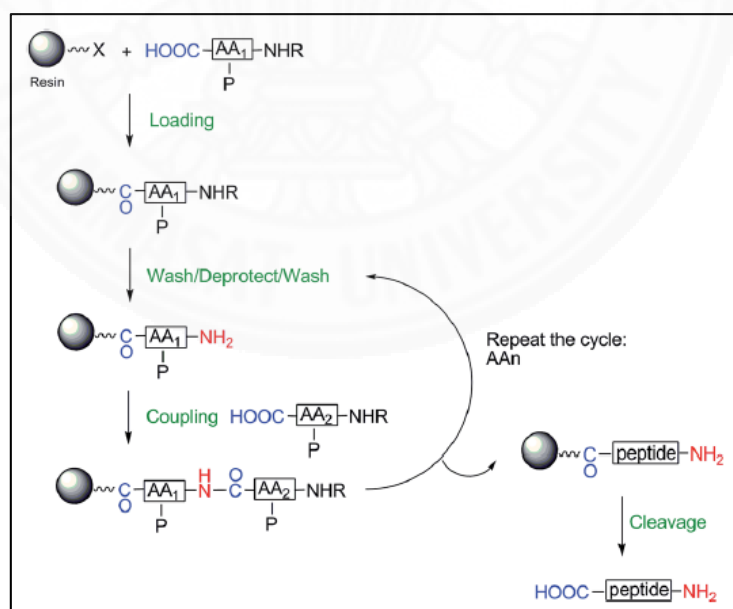
ภาพที่ 2.25 ภาพแสดง HVA channels และ LVA channels และแสดงให้เห็นว่า $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunit ยังประกอบด้วย 4 transmembrane domains (I-IV) ซึ่งในแต่ละ domain ยังแบ่งออกเป็น 6 membrane segments

ดังนั้น $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunit จึงเป็นตัวสำคัญในการกำหนด Ca^{2+} channels subtypes โดยที่สามารถแบ่งออกเป็น L-types ($\text{Ca}_v1.1$ – $\text{Ca}_v1.4$ channels) T-types ($\text{Ca}_v3.1$ – $\text{Ca}_v3.3$ channels) และ P/Q-, N-, R-types คือ $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$, และ $\text{Ca}_v2.3$ channels ตามลำดับ⁴³ ซึ่งในแต่ละ subtype จะมีหน้าที่และความเกี่ยวข้องแตกต่างกันออกไปดังนี้ โดยพบว่า Ca_v1 subtype จะเกี่ยวข้องกับการสัมผัส (contraction) การหลั่งสาร (secretion) รวมไปถึงการแสดงออกของยีน (gene expression) และ

การส่งสัญญาณประสาท (synaptic transmission) ไปยังบางเซลล์ (sensory cell) ในส่วนของ Ca_v2 subtype จะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของการส่งสัญญาณประสาท (synaptic transmission) ที่รวดเร็ว และ Ca_v3 subtype เกี่ยวข้องกับเซลล์ที่มีการทำงานเป็นจังหวะซ้ำๆ (rhythmically firing cells) ได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac myocytes) และเซลล์ประสาททาลามิก (thalamic neurons) โดยในแต่ละ subtypes จะมีความจำเพาะในการรักษาโรคที่แตกต่างกัน อาทิ การรักษาอาการปวด (pain treatment) นั้นจะเกี่ยวข้องกับการเชื่อมชั้นแนลชนิดที่เป็น N-types เป็นต้น⁴⁴

2.5 การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวิถีของแข็ง (solid phase peptide synthesis)

ในปัจจุบันการศึกษาค้นคว้าทางด้านโปรตีนหรือเพปไทด์กำลังได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์มากมาย ซึ่งวิธีการสังเคราะห์สารเพปไทด์ (peptide synthesis) ที่กำลังได้รับความนิยมอย่างมากและมีการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง คือ การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวิถีของแข็ง (solid phase peptide synthesis) เนื่องจากมีข้อดีคือ เป็นวิธีการที่มีความสะดวก รวดเร็ว มีความง่ายในการสังเคราะห์ และสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้นั้นค่อนข้างมีความบริสุทธิ์สูง โดยขั้นตอนทั่วไปของการสังเคราะห์แสดงได้ดังนี้



ภาพที่ 2.26 ภาพแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวิถีของแข็ง (solid phase peptide synthesis) โดยที่ AA คือ กรดอะมิโนชนิดต่างๆ (amino acids) และ P คือ หมู่ปกป้อง (protecting group)⁴⁵

โดยการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) จะประกอบไปด้วยขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

1. การต่อกรดอะมิโนตัวแรก (first amino acid) ลงบนเรซิน

การต่อกรดอะมิโนตัวแรกเข้ากับเรซินที่เหมาะสม โดยมีการใช้ตัวช่วยทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม (coupling agent) ในการสร้างพันธะทางเคมีระหว่างกรดอะมิโนกับเรซิน อาทิ พันธะเอสเทอร์ (ester bond) และพันธะเอไมด์ (amide bond) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเรซินที่เลือกใช้

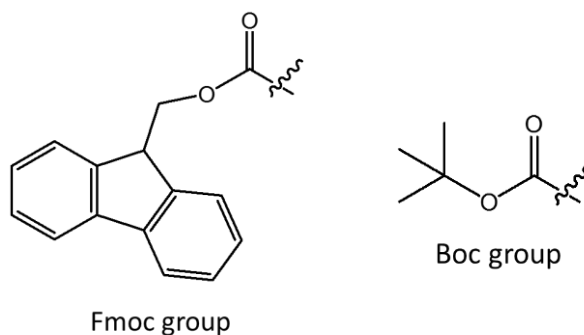
2. การต่อกรดอะมิโนตัวถัดไปและการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์

หลังจากที่ทำการโหลดกรดอะมิโนตัวแรกแล้ว จะทำการกำจัดการปกป้องทางด้าน N (Fmoc หรือ Boc) โดยการใช้สภาวะที่เหมาะสม อาทิ การกำจัดการ Fmoc ด้วยสภาวะเบส (piperidine) หรือ การกำจัดการ Boc ด้วยสภาวะกรด (trifluoroacetic acid, TFA) จากนั้นจะทำการต่อกรดอะมิโนตัวถัดไป และใช้ตัวช่วยทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม (coupling agent) ซึ่งในการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์จะทำการต่อกรดอะมิโนชนิดอื่นไปเรื่อยๆจนได้ความยาวหรือมีจำนวนกรดอะมิโนที่ต้องการ

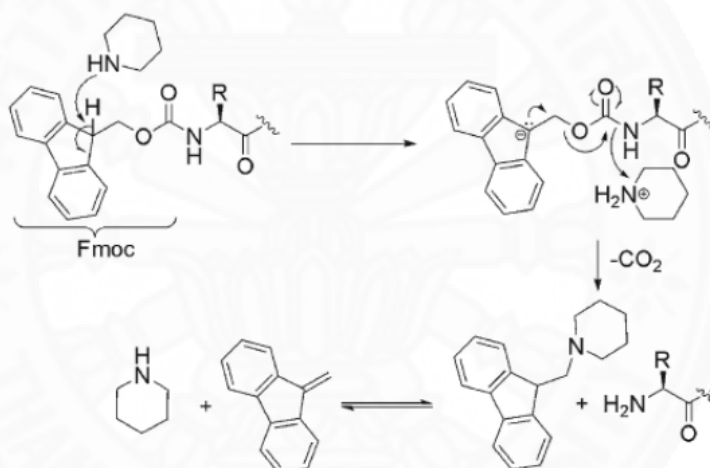
3. การตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซิน

หลังจากที่ทำการต่อสายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) เสร็จเรียบร้อยแล้ว จะทำการตัดสายโซ่เพปไทด์ด้วยการใช้สภาวะที่เหมาะสม (cleavage condition) ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนในสายโซ่เพปไทด์ และชนิดของเรซินที่เลือกใช้ ซึ่งจะใช้เวลาในการตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซินแตกต่างกันออกไป อาทิ การตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจาก wang resin โดยการใช้ 90-95% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) เป็นระยะเวลา 2-3 ชั่วโมง ในขณะที่ 2Cl-Triptyl chloride resin จะใช้ 1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) และใช้เวลาเพียง 5 นาทีเท่านั้น

นอกจากนี้การสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยวิธี solid phase peptide synthesis สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ด้วยกัน คือ Fmoc และ Boc strategy โดยวิธีการ Fmoc chemistry จะได้รับความนิยมใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์มากกว่า เนื่องจากมีการใช้สภาวะในการกำจัดการปกป้องทางด้านหมู่อะมิโน (Fmoc) ที่เป็นแบบ mild condition โดยการใช้เบส ซึ่งเป็นข้อดีเพราะว่าหมู่ปกป้องสายโซ่ (side chain protecting groups) ของกรดอะมิโนและ linker ของเรซินส่วนใหญ่จะง่ายต่อการตัดด้วยในสภาวะที่เป็นกรด (acidic condition) ในส่วนของการสังเคราะห์ด้วย Boc chemistry นั้นจะมีความยุ่งยากกว่า เนื่องจากมีการใช้กรดในการกำจัดการปกป้องทางด้านหมู่อะมิโน (Boc) อีกทั้งในขั้นตอนของการตัดสายโซ่ออกจากเรซินมีการใช้สภาวะที่รุนแรง (strong condition)⁴⁶ โดยมีการใช้กรด (hydrofluoric acid, HF) ซึ่งมีความอันตรายสูง



ภาพที่ 2.27 ภาพแสดงโครงสร้างของหมู่ Fmoc (fluorenylmethyloxycarbonyl) และหมู่ Boc (*tert*-butoxycarbonyl) ที่ใช้ในการเป็นหมู่ปกป้องของหมู่อะมิโน

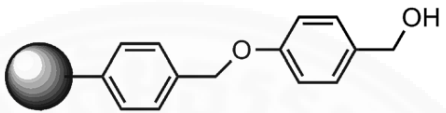
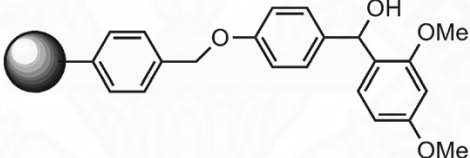
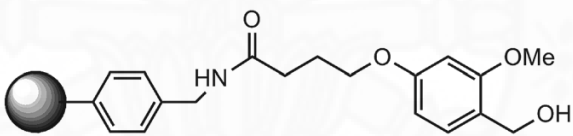
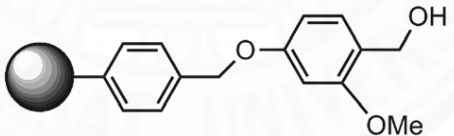
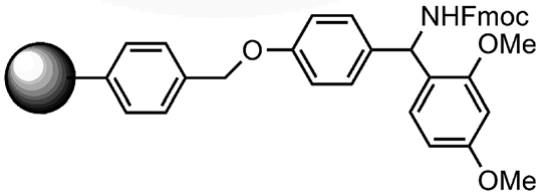


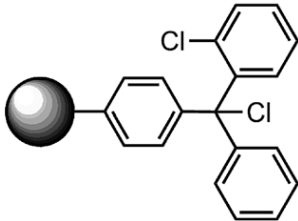
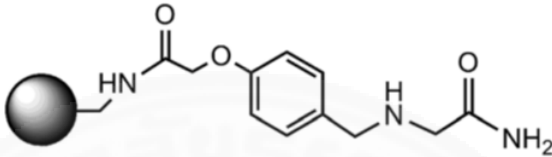
ภาพที่ 2.28 ภาพแสดงกลไกปฏิกิริยาในการกำจัดหมู่ปกป้อง (Fmoc deprotection)⁴⁷

2.5.1 ชนิดของเรซินที่ใช้ในการสังเคราะห์สารเพปไทด์

ชนิดของเรซินถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องพิจารณาเนื่องจากถูกใช้ในการเป็น solid support สำหรับการสังเคราะห์สารเพปไทด์และเป็นตัวกำหนดชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการตัดสายโซ่อาทิ กรณีของสารเพปไทด์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล (carboxylic acid) ที่ด้าน C (C-terminal) เหมาะกับเรซินที่ใช้คือ wang resin เป็นต้น โดยเรซินชนิดต่างๆที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ด้วยวิธี solid phase peptide synthesis มีดังนี้⁴⁸⁻⁴⁹

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงเรซินชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์และสภาวะที่ใช้ตัดเรซิน (cleavage condition)

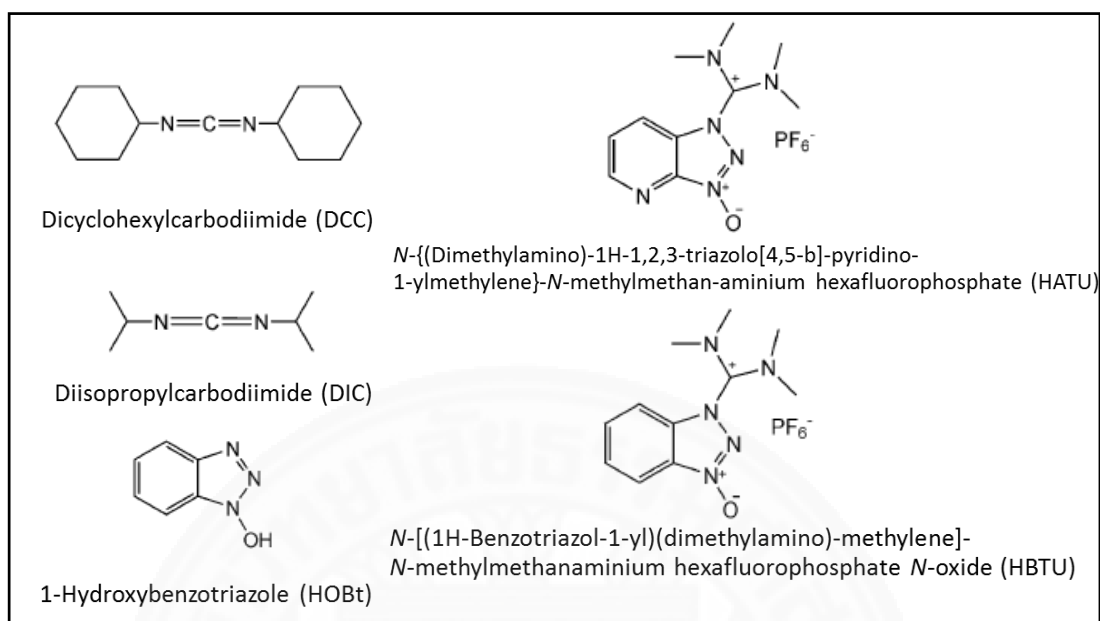
ชื่อของเรซิน (resin name)	โครงสร้าง (structure)	สภาวะที่ใช้ในการ ตัดเรซิน (cleavage condition)
Wang resin		90–95% TFA in CH ₂ Cl ₂ 1–2 h
Rink acid resin		1–5% TFA in CH ₂ Cl ₂ 5–15 min or 10% AcOH in CH ₂ Cl ₂ , 2 h
HMPB resin		1% TFA in CH ₂ Cl ₂ 2–5 min
SASRIN resin		1% TFA in CH ₂ Cl ₂ 5–10 min
Rink amide resin		50% TFA in CH ₂ Cl ₂ 1 h

2-Chlorotrityl chloride resin		1–5% TFA in CH_2Cl_2 1 min
PEGA–BAL resin		TFA–TFMSA (19 : 1)

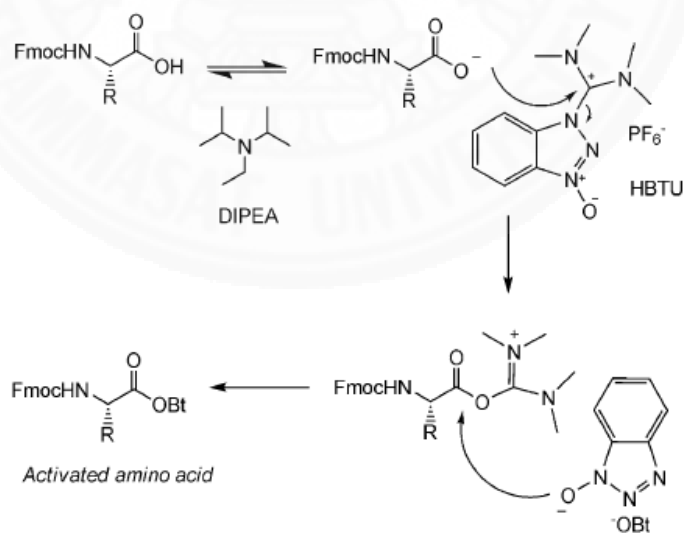
2.5.2 ตัวช่วยทำปฏิกิริยา (coupling agents)

ในการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) นั้นตัวช่วยในการทำปฏิกิริยา หรือ coupling agent ถือได้ว่ามีบทบาทที่สำคัญในการช่วยสร้างพันธะทางเคมี อาทิ พันธะเอสเทอร์ (ester bond) และพันธะเอไมด์ (amide bond) ที่เกิดขึ้นระหว่างเรซินกับกรดอะมิโน หรือระหว่างกรดอะมิโนด้วยกันเอง ซึ่งตัวช่วยทำปฏิกิริยา (coupling agents) ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมีดังนี้⁵⁰⁻

51



ภาพที่ 2.29 ภาพแสดงตัวช่วยทำปฏิกิริยา (coupling agents) ชนิดต่างๆที่ใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์

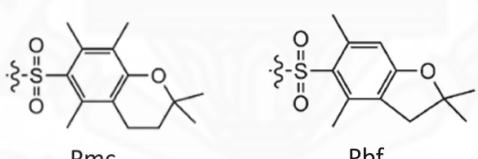
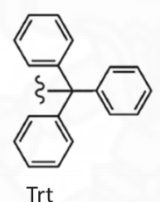
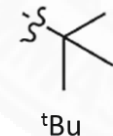
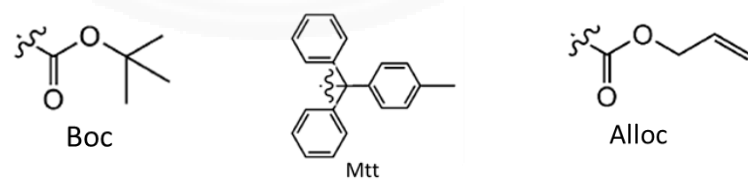
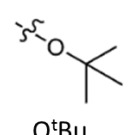


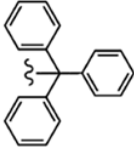
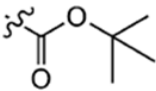
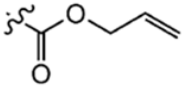
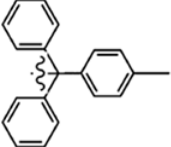
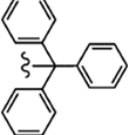
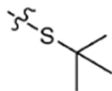
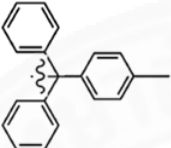
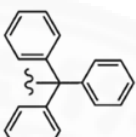
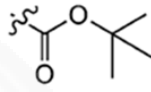
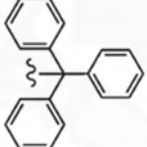

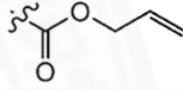
ภาพที่ 2.30 ภาพแสดงกลไกปฏิกิริยาเคมีของทำ activation ที่หมู่ carboxyl ของกรดอะมิโนด้วย HBTU/HOBT

2.5.3 หมู่ปกป้องที่สายโซ่ของกรดอะมิโน (protecting group of amino acid)

การเลือกหมู่ปกป้องที่สายโซ่ (protecting groups) ของกรดอะมิโนนั้นถือได้ว่าเป็นสิ่งที่จำเป็นก่อนที่จะมีการเริ่มต้นสังเคราะห์เพปไทด์ อาทิ หมู่ปกป้องที่สายโซ่ (protecting groups) ที่ง่ายต่อการเอาออกด้วยกรด (acidic labile) จะถูกใช้ในการสังเคราะห์เพปไทด์ที่เป็น Fmoc chemistry เป็นต้น ซึ่งในกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีหมู่ปกป้องที่แตกต่างกันและมีการใช้สภาวะที่ใช้ในการตัดออก (deprotection condition) ที่ต่างกันออกไป⁵² โดยกรดอะมิโนชนิดเดียวกันสามารถมีหมู่ปกป้องได้หลายแบบแสดงได้ดังนี้

ตารางที่ 2.2 ตารางแสดงกรดอะมิโนที่มีหมู่ปกป้องสายโซ่ (protecting group) ชนิดต่างๆ

Amino acids	Protecting groups
Arg	 Pmc Pbf
Asn/Gln	 Trt
Ser/Thr	 tBu
Lys	 Boc Mtt Alloc
Asp/Glu	 OtBu

Trp	 Trt	 Boc	 Alloc
Cys	 Mtt	 Trt	 S ^t Bu
His	 Mtt	 Trt	 Boc
Tyr	 Trt	 tBu	 Alloc

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

1. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-แอล-โพรลีน (*N*-alpha-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-proline, Fmoc-Pro-OH), Aapptec, USA
2. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-แอล-ไกลซีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-glycine, Fmoc-Gly-OH), Aapptec, USA
3. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-โอ-เทิร์ต-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-*O*-tert-L-threonine, Fmoc-Thr(^tBu)-OH), Aapptec, USA
4. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-แกมมา-ทริทิล-ไทรทิล-แอล-แอสพาราจีน (*N*-alpha-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*N*-gamma-trityl-L-asparagine, Fmoc-Asn(Trt)-OH), Aapptec, USA
5. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอส-ไทรทิล-แอล-ซิสเทอีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-*S*-trityl-L-cysteine, Fmoc-Cys(Trt)-OH), Aapptec, USA
6. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-โอ-เทิร์ต-บิวทิล-แอล-ซีรีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-*O*-tert-butyl-L-serine, Fmoc-Ser(^tBu)-OH), Aapptec, USA
7. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-แอล-วาเลอีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-valine, Fmoc-Val-OH), Aapptec, USA
8. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-เดลต้า-ทริทิล-แอล-กลูตามีน (*N*-alpha-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*N*-delta-trityl-L-glutamine, Fmoc-Gln(Trt)-OH), Aapptec, USA
9. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-แอล-ไอโซลิวซีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-isoleucine, Fmoc-Ile-OH), Aapptec, USA

10. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-แอฟซิลอน-เทิร์ต-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-*N*-epsilon-tert-butyltoxycarbonyl-L-lysine, Fmoc-Lys(Boc)-OH), Aapptec, USA
11. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-ไทรทิล-แอล-ฮิสติดีน (*N*-alpha-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*N*-trityl-L-histidine, Fmoc-His(Trt)-OH), Aapptec, USA
12. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-แอล-ลิวซีน (*N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucine, Fmoc-Leu-OH), Aapptec, USA
13. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-โอ-เทิร์ต-บิวทิล-แอล-ไทโรซีน (*N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*O*-tert-butyl-L-tyrosine, Fmoc-Tyr(^tBu)-OH), Aapptec, USA
14. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-แอล-อะลานีน (*N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-alanine, Fmoc-Ala-OH), Aapptec, USA
15. เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-2,2,4,6,7-เพนตะเมทิลไดไฮโดรเบนโซฟuran-5-ซัลโฟนิล-แอล-อาร์จินีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-*N*'-2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-L-arginine, Fmoc-Arg(Pbf)-OH), Aapptec, USA
16. 1-(บิสไดเมทิลอะมิโนเมทิลีน)-1-ไฮโดรเจน-1,2,3-ไตรเอโซล(4,5-ปี)พริดีนีนียม 3-ออกไซด์เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate, HATU), Aapptec, USA
17. 2-(6-คลอโร-1-ไฮโดรเจน-เบนโซไตรเอโซล-1-อิล)-1,1,3,3-เตตระเมทิลลามิเนียม เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต (2-(6-Chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiium hexafluorophosphate, HCTU), Aapptec, USA
18. 1-ไฮดรอกซีเบนโซไตรเอโซล (1-Hydroxybenzotriazole, HOBT), Aapptec, USA
19. ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมไมด์ (Dicyclohexylcarbodiimide, DCC), Aapptec, USA
20. 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (4-dimethylaminopyridine, DMAP), Aapptec, USA

21. ไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (Diisopropylethylamine, DIPEA),
Merck, Germany
22. ไพเพอริดีน (Piperidine), Merck, Germany
23. ไตรฟลูอออโรอะซิติกแอซิด (Trifluoroacetic acid), Fisher
chemical, UK
24. ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (Dimethylformamide), RCI Labscan,
Thailand
25. แอล-กลูต้าไธโอน รีดิวซ์และออกซิไดซ์ฟอร์ม (L-glutathione
reduced and oxidized form), Carbosynth, UK
26. อีเทนไดไทออล (Ethanedithiol, EDT), Sigma-Aldrich, USA
27. ไตรไอโซโพรพิลไซเลน (Triisopropylsilane, TIPS), Sigma-Aldrich,
USA
28. แวงเรซิน (wang resin), Aapptec, USA
29. 2-คลอโรไทรทิล คลอไรด์เรซิน (2Cl-Triptyl chloride resin),
Aapptec, USA
30. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane), RCI Labscan, Thailand
31. เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate), RCI Labscan, Thailand
32. เมทานอล (Methanol), RCI Labscan, Thailand
33. อะซิโตรไนไตรล์ (Acetonitrile), RCI Labscan, Thailand
34. เฮกเซน (Hexane), RCI Labscan, Thailand
35. ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether), RCI Labscan, Thailand
36. เทอเชียรี่บิวทิล เมทิล อีเทอร์ (*tert*-Butyl methyl ether), RCI
Labscan, Thailand
37. ซิลิกาเจล (Silica gel), RANKEM, India
38. เซฟาเดกซ์ LH-20 (Sephadex LH-20), GE-Healthcare, Swenden
39. 5-ฟลูออเรซีนไอโซไทโอไซยาเนต (5-Fluorescein isothocyanate),
Carbosynth, UK
40. ทริสเบส (Tris-base), Sigma-Aldrich, USA
41. อะซิโตน (Acetone), RCI Labscan, Thailand
42. กลีเซอรอล (Glycerol), Sigma-Aldrich, USA

43. เอทานอล (Ethanol), RCI Labscan, Thailand
44. เอทาลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), Sigma-Aldrich, USA
45. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH), Ajax Finechem Pty, Australia
46. น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water), Elga, England
47. กรดฟอร์มิก (Formic acid), Merck, Germany

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC), Shimadzu, Japan
2. เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer), Shimadzu, Japan
3. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer), Thermo Finigan, UK
4. เครื่องนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance spectrometer), Bruker-ultrashield (400 MHz), USA
5. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer), FTSR SYSTEM. INC, US
6. เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง (Balance 4 digit), Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (Rotary evaporator), BUCHI, Switzerland
8. เครื่องเขย่าสาร (Orbital shaker), Stuart, UK
9. เครื่องกวนสาร (Hot plate and magnetic stirrer), Clifton Cerastir, UK
10. คอลัมน์โครมาโตกราฟี (ชนิดแก้ว) (Glass columns), Thailand

11. โครมาโตกราฟีแบบผิวนาง (Thin layer chromatography, TLC), MAEHEREY-NAGEL, Germany)
12. หลอดส่งตัวอย่างเอ็นเอ็มอาร์ (NMR tubes), SCHOTT DURAN, Germany
13. คิวเวต (Cuvette), Starna Scientefic, UK
14. คอลัมน์ (HPLC column), ACE C18 column (4.6 mm x 250 mm), (10 mm x 250 mm)
15. ไมโครปิเปต (Micropipette), Thermo scientific, Germany
16. พีเอชมิเตอร์ (pH meter), Metrohm Siam Ltd, Switzerland
17. เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ (Laboratory glassware)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X)

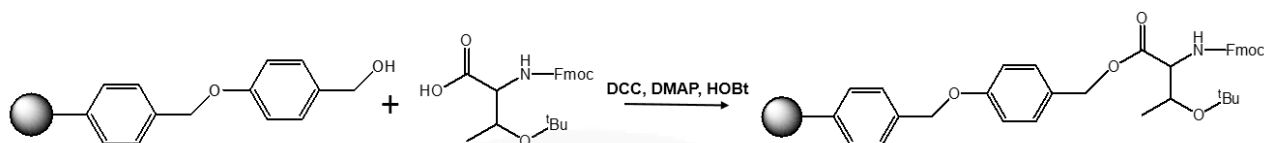
มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้

H-KCLPPGKPCYGATQKIPCCGVCSHNKCT-OH

3.2.1.1 การโหลดกรดอะมิโนตัวแรก

ทำการแช่ (swell) แวงเรซิน (wang resin) (0.29 มิลลิโมล, 500 มิลลิกรัม,) ด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) 4 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่า (shake) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมกรดอะมิโนตัวแรกคือเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-โอ-เทอร์ต-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-O-tert-L-threonine) หรือ Fmoc-Thr(^tBu)-OH (0.87 มิลลิโมล, 345 มิลลิกรัม) ซึ่งละลายในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) 4 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยการเติมไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมิด (dicyclohexylcarbodiimide) หรือ DCC (0.87 มิลลิโมล, 179 มิลลิกรัม), 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (4-dimethylaminopyridine) หรือ DMAP (0.87 มิลลิโมล, 106 มิลลิกรัม), และ 1-ไฮดรอกซีเบนโซโทริอาโซล (1-Hydroxybenzotriazole) หรือ HOBt (0.87

มิลลิโมล, 147 มิลลิกรัม) ซึ่งเป็นตัวช่วยในการทำปฏิกิริยา (coupling agents) จากนั้นทำการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide, DMF), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) และไดเอทิล อีเทอร์ (diethyl ether) ตามลำดับ แล้วทำให้เรซินแห้งในสภาวะสุญญากาศ (vacuum)



ภาพที่ 3.1 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีระหว่าง Fmoc-Thr(^tBu)-OH กับ wang resin

3.2.1.2 การหาปริมาณของกรดอะมิโนที่ถูกโหลดบนเรซินด้วยวิธี Fmoc

test

ทำการชั่ง Fmoc-Thr(^tBu)-wang resin 2 มิลลิกรัม ใส่ในขวดแก้ว (vial) จากนั้นทำการเติมสารละลาย 20% ไพเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide, DMF) ลงในขวดแก้ว 3 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนสารละลายไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 301 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า % amino acid loading ดังสมการ

$$\text{amino acid loading (mmol/g)} = \frac{\text{Abs}}{1.65 \times \text{mg sample}}$$

$$\% \text{amino acid loading} = \frac{\text{amino acid loading (mmol/g)}}{\text{resin (mmol/g)}} \times 100$$

3.2.1.3 การทำปฏิกิริยาป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงบนพื้นผิวเรซิน

(capping step)

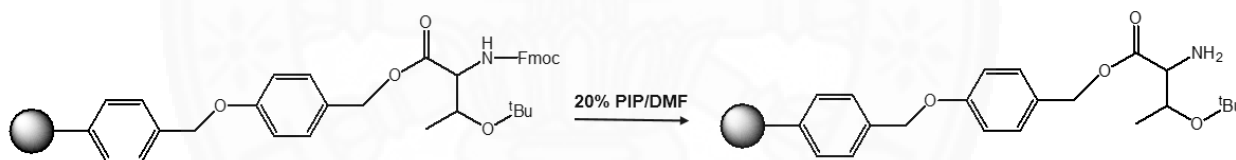
หลังจากที่ทำการโหลดกรดอะมิโนตัวแรกลงบนเรซินเรียบร้อยแล้ว จะทำการ capping resin เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) โดยการนำ Fmoc-Thr(^tBu)-wang resin (0.06 มิลลิโมล, 150 มิลลิกรัม) มาแช่ด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide, DMF) 4 มิลลิลิตร และทำการเขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการล้างด้วยได

เมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติมโพรพาโนอิกแอนไฮไดรด์ (propanoic anhydride) (2.8 มิลลิโมล, 3.59 มิลลิลิตร) และไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (diisopropylethylamine) หรือ DIPEA (0.08 มิลลิโมล, 0.143 มิลลิลิตร) แล้วทำการเขย่าต่ออีกเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) จำนวน 3 ครั้ง

3.2.1.4 การกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection step) เพื่อเอาหมู่

Fmoc ออก

หลังจากทำการปกป้อง (capping) ของ Fmoc-Thr(^tBu)-wang resin เรียบร้อยแล้ว จะทำการเอาหมู่ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล (fluorenylmethyloxycarbonyl group) หรือ Fmoc ออก เพื่อให้พร้อมสำหรับการใส่กรดอะมิโนตัวถัดไป (next amino acid coupling step) โดยทำการเติมสารละลาย 20% ไพเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) ลงไป และเขย่าเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) จำนวน 3 ครั้ง

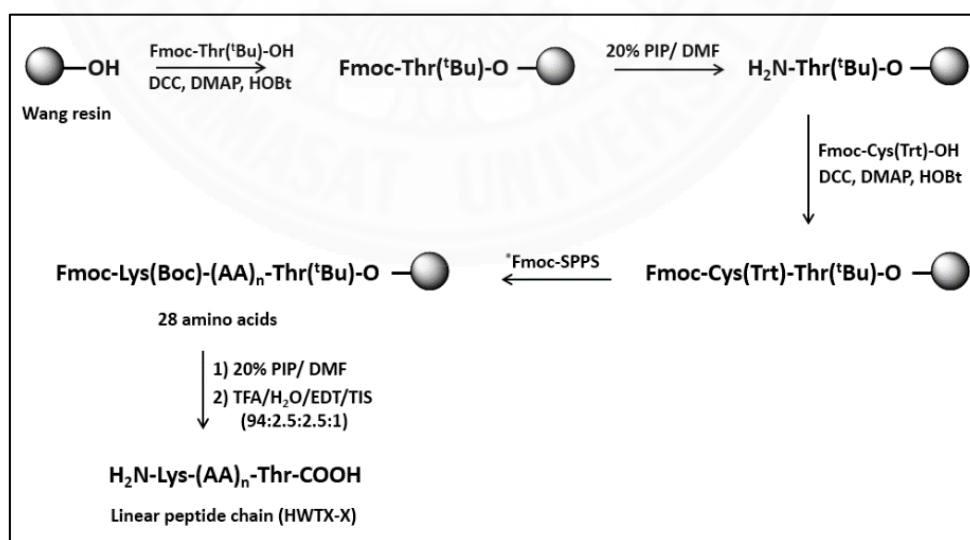


ภาพที่ 3.2 ภาพแสดงสมการของการทำ deprotection เพื่อกำจัดหมู่ปกป้อง (Fmoc)

3.2.1.5 การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain synthesis) โดยอาศัยวิธีการสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยวิธภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis, SPPS)

นำ H₂N-Thr(^tBu)-wang resin (0.06 มิลลิโมล, 150 มิลลิกรัม) มาทำการต่อกับกรดอะมิโนตัวที่สองคือเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอส-ไทรทิล-แอล-ซิสเทอีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-*S*-trityl-L-cysteine หรือ Fmoc-Cys(Trt)-OH (0.2 มิลลิโมล, 121 มิลลิกรัม) โดยใช้ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมิด (dicyclohexylcarbodiimide) หรือ DCC (0.2 มิลลิโมล, 42 มิลลิกรัม), 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (4-dimethylaminopyridine) หรือ DMAP (0.2 มิลลิโมล, 25 มิลลิกรัม), และ 1-ไฮดรอกซีเบนโซโทรเอ

โซล (1-Hydroxybenzotriazole) หรือ HOBt (0.2 มิลลิโมล, 35 มิลลิกรัม) เป็น coupling agents โดยมีปริมาตรของไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) รวมทั้งสิ้น 4 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection step) โดยเติมสารละลาย 20% พิเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) แล้วเขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์โดยการเติมกรดอะมิโนลำดับอื่นๆต่อไป (coupling step) และทำการกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection step) จนกระทั่งทำการต่อสายโซ่ถึงกรดอะมิโนตัวสุดท้ายคือเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-เอพซิลอน-เทิร์ต-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-*N*-epsilon-tert-butyltoxycarbonyl-L-lysine หรือ Fmoc-Lys(Boc)-OH จากนั้นจะทำการกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection) ด้วยสารละลาย 20% พิเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) อีกครั้ง แล้วล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) และไดเอทิล อีเทอร์ (diethyl ether) ตามลำดับ แล้วนำเรซินไปทำให้แห้งในสภาวะสุญญากาศ (vacuum) เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) ด้วยวิธี SPPS แสดงได้ดังภาพที่ 3.3



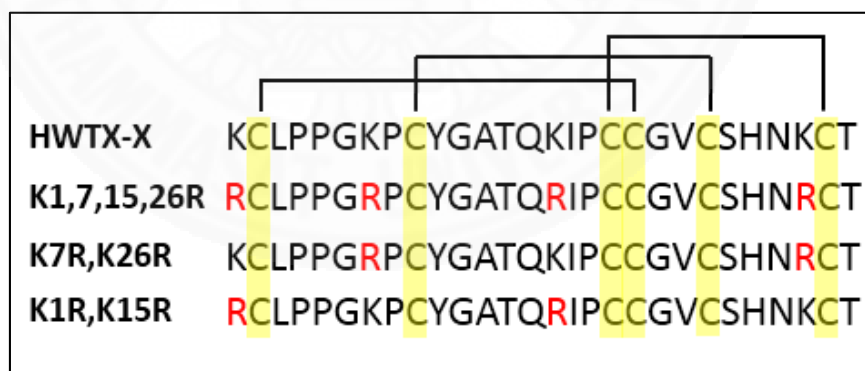
ภาพที่ 3.3 ภาพแสดงภาพรวมของการสังเคราะห์โปรตีน HWTX-X ด้วยวิธี SPPS

3.2.1.6 การตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซิน (cleavage step)

หลังจากที่เรซินถูกทำให้แห้งในสภาวะสุญญากาศ (vacuum) เรียบร้อยแล้ว จะทำการตัดสายโซ่เพปไทด์ด้วยการเติมสารละลายผสม (deprotection cocktail) ระหว่างไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) น้ำกลั่น (distilled water) อีเทนไดโทล (ethanedithiol, EDT) และไตรไอโซโพรพิลไซเลน (triisopropylsilane, TIPS) ในอัตราส่วน 94:2.5:2.5:1 แล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรองเก็บส่วนสารละลายไว้ แล้วนำไปทำการระเหยสารละลายออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจน (N₂) จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเทอเชียรีบิวทิล เมทิล อีเทอร์ (*tert-butyl methyl ether*) เย็น แล้วนำตะกอนไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) จะได้เป็นตะกอนสีขาวของโปรตีน

3.2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของโปรตีน Huwentoxin-X

ในงานวิจัยนี้จะทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ (derivatives) ของโปรตีน HWTX-X ทั้งหมด 3 ตัวด้วยกัน โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) เป็นกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R) แสดงดังนี้



ภาพที่ 3.4 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HWTX-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ชนิด

ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ (derivatives) จะใช้วิธีการสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยวิธีของแข็ง (solid phase peptide synthesis, SPPS) เช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (native HWTX-X) โดยใช้ wang resin เป็นเรซินในการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) แต่จะทำการเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนในบางตำแหน่ง (mutagenesis)

โดยยังใช้อัตราส่วนของการสังเคราะห์เป็นดังนี้ Fmoc-Thr(^tBu)-wang resin (0.06 มิลลิโมล, 150 มิลลิกรัม) เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ (0.2 มิลลิโมล) และใช้ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมไมด์ (dicyclohexylcarbodiimide) หรือ DCC (0.2 มิลลิโมล, 42 มิลลิกรัม), 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (4-dimethylaminopyridine) หรือ DMAP (0.2 มิลลิโมล, 25 มิลลิกรัม), และ 1-ไฮดรอกซีเบนโซโทรอาโซล (1-Hydroxybenzotriazole) หรือ HOBt (0.2 มิลลิโมล, 35 มิลลิกรัม) ทำหน้าที่เป็น coupling agents ในส่วนขั้นตอนของการเติมกรดอะมิโน (coupling step) ใช้เวลาเขย่าสารเป็นเวลา 60 นาที และในขั้นตอนการกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection step) ด้วยสารละลาย 20% ไพเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) ใช้เวลา 30 นาที เมื่อทำการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ (linear peptide chain) จนถึงการเติมกรดอะมิโนตัวสุดท้ายคือเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-แอฟซิลอน-เทิร์ต-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-*N*-epsilon-tert-butyltoxycarbonyl-L-lysine หรือ Fmoc-Lys(Boc)-OH เสร็จเรียบร้อยแล้ว จะทำการกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection) ด้วยสารละลาย 20% ไพเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) อีกครั้ง แล้วล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) และไดเอทิล อีเทอร์ (diethyl ether) ตามลำดับ แล้วนำเรซินไปทำให้แห้งในสภาวะสุญญากาศ (vacuum)

Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 1)

H-RCLPPGRPCYGATQRIPCCGVCSHNRCT-OH

โดยการสังเคราะห์จะทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) ในตำแหน่งที่ 1, 7, 15, และ 26 ไปเป็นกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R) ทั้งหมด

Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 2)

H-KCLPPGRPCYGATQKIPCCGVCSHNRCT-OH

โดยการสังเคราะห์จะทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) ในตำแหน่งที่ 7 และ 26 ไปเป็นกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R)

Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ตัวที่ 3)

H-RCLPPGKPCYGATQRIPCCGVCSHNKCT-OH

โดยการสังเคราะห์จะทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) ในตำแหน่งที่ 1 และ 15 ไปเป็นกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R)

เมื่อทำการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) ทั้งหมดเสร็จเรียบร้อยแล้ว จะนำมาทำการตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซิน (cleavage step) เช่นเดียวกับวิธีการ 3.2.1.6 แล้วนำสารเพปไทด์ที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) จะได้เป็นตะกอนสีขาวของโปรตีน

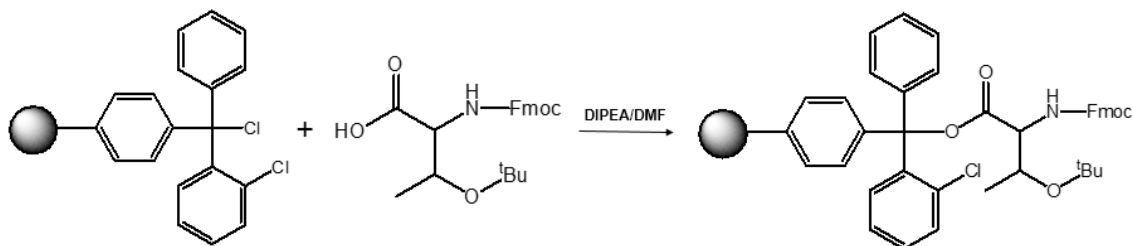
3.2.3 การสังเคราะห์ cyclic HWTX-X

มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้

KCLPPGKPCYGATQKIPCCGVCSHNKCT

3.2.3.1 การโหลตกรดอะมิโนตัวแรก

ทำการชั่ง 2-คลอโรไตรทิล คลอไรด์เรซิน (2-Chlorotriethyl chloride resin) (1.6 มิลลิโมล, 2 กรัม) ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) แล้วทำการเติมเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-โอ-เทิร์ต-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-O-tert-L-threonine) หรือ Fmoc-Thr(^tBu)-OH (2.5 มิลลิโมล, 1 กรัม) ซึ่งละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) 5 มิลลิลิตร แล้วเติมไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (diisopropylethylamine) หรือ DIPEA (2.5 มิลลิโมล, 0.43 มิลลิลิตร) ลงไป จากนั้นทำการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลาแล้วจะทำการล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) และไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเรซินไปทำให้แห้งในสภาวะสุญญากาศ (vacuum) จากนั้นจะนำไปทำ Fmoc test ต่อไปเพื่อหาปริมาณของกรดอะมิโนที่ถูกโหลตบนเรซินเช่นเดียวกับวิธีการ 3.2.1.2



ภาพที่ 3.5 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีระหว่าง Fmoc-Thr^{(t}Bu)-OH กับ 2-Chlorotrityl chloride resin

3.2.3.2 การทำปฏิกิริยาป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงบนผิวเรซิน

(capping step)

หลังจากที่ทำการโหลดกรดอะมิโนตัวแรกลงบนเรซินเรียบร้อยแล้ว จะทำการ capping resin เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) โดยการนำ Fmoc-Thr^{(t}Bu)-trityl resin (0.06 มิลลิโมล, 150 มิลลิกรัม) มาล้างด้วยไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการเติมสารละลายผสม (capping solution) ระหว่างเมทานอล (methanol, MeOH), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) และไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (diisopropylethylamine) หรือ DIPEA ในอัตราส่วนคือ 17:2:1 ลงไปแล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) จำนวน 4 ครั้ง

3.2.3.3 การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain

synthesis) โดยอาศัยวิธีการสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยวัสดุภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis, SPPS)

นำ capped Fmoc-Thr^{(t}Bu)-trityl resin (0.06 มิลลิโมล, 150 มิลลิกรัม) มาทำการกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection) โดยการเติมสารละลาย 20% พิเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) ลงไป และเขย่าเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการต่อกับกรดอะมิโนตัวที่สอง (coupling step) โดยการเติมเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอส-ไทรทิล-แอล-ซิสเทอีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethylloxycarbonyl)-*S*-trityl-L-cysteine หรือ Fmoc-Cys(Trt)-OH (0.2 มิลลิโมล, 121 มิลลิกรัม), ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมไมด์ (dicyclohexylcarbodiimide) หรือ DCC (0.2 มิลลิโมล, 42 มิลลิกรัม), 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (4-

dimethylaminopyridine) หรือ DMAP (0.2 มิลลิโมล, 25 มิลลิกรัม), และ 1-ไฮดรอกซีเบนโซไตรออล (1-Hydroxybenzotriazole) หรือ HOBt (0.2 มิลลิโมล, 35 มิลลิกรัม) โดยมีปริมาตรรวมของไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) ทั้งสิ้น 4 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำการสังเคราะห์ต่อสายโซ่เพปไทด์ด้วยวิธี SPPS เช่นเดียวกันกับวิธีการ 3.2.1.5 ซึ่งเมื่อต่อกรดอะมิโนตัวสุดท้ายคือเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-เอพซิลอน-เทิร์ต-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethylloxycarbonyl)-*N*-epsilon-tert-butyltoxycarbonyl-L-lysine หรือ Fmoc-Lys(Boc)-OH แล้วจะทำการกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection) ด้วยสารละลาย 20% ไพเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) อีกครั้ง แล้วล้างเรซินด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) และไดเอทิล อีเทอร์ (diethyl ether) ตามลำดับ แล้วนำเรซินไปทำให้แห้งในสภาวะสุญญากาศ (vacuum)

3.2.3.4 การตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซิน (Cleavage step)

ทำการเติมสารละลาย 1% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ในไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) ลงในเรซินที่แห้งแล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการกรองเก็บส่วนสารละลายไว้แล้วนำไปทำการระเหยสารละลายออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจน (N₂) และตกตะกอนโปรตีนด้วยน้ำ แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) จะได้เป็นตะกอนสีขาวของโปรตีน

3.2.3.5 การปิดวง (cyclization) ของสายโซ่เพปไทด์

เมื่อทำการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ได้แล้วจะนำมาทำการสังเคราะห์ให้อยู่ในรูปที่เป็นวง (cyclic peptide) โดยการละลายสายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) (3.4 ไมโครโมล, 10 มิลลิกรัม) ด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) ปริมาตร 19 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมแล้วทำการเติมไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (diisopropylethylamine) หรือ DIPEA (42 ไมโครโมล, 8 ไมโครลิตร) ลงไป หลังจากนั้นค่อยๆหยดสารละลาย 1-(บิสไดเมทิลอะมิโนเมทิลีน)-1-ไฮโดรเจน-1,2,3-ไตรเอโซ(4,5-บี)ไพริดีเนียม 3-ออกไซด์เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต (1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate หรือ HATU (21 ไมโครโมล, 8 มิลลิกรัม) ที่ละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์

(dimethylformamide, DMF) 1 มิลลิลิตร ลงไปในขวดก้นกลมแล้วทำการกวนสารละลาย (stir) ต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.3.6 การแยกและทำให้บริสุทธิ์ (purification) ด้วย column

chromatography

หลังจากที่ทำการปิดวง (cyclization) ของสายโซ่เพปไทด์เสร็จสิ้นแล้ว จะนำสารที่ได้จากปฏิกิริยามาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel) เป็นเฟสหยุดนิ่ง (stationary phase) และใช้เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (MeOH:EtOAc) ในอัตราส่วน 6:4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวชะ (eluent) ในการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์

3.2.3.7 การกำจัดหมู่ปกป้องทั้งหมด (global deprotection) ของ

cyclic peptide

โดยการนำสาร cyclic peptide ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้ว มาทำการกำจัดหมู่ปกป้องทั้งหมดออก (global deprotection) โดยเติมสารละลายผสม (deprotection cocktail) ระหว่างไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) น้ำกลั่น (distilled water) อีเทนไดโทล (ethanedithiol, EDT) และไตรไอโซโพรพิลไซเลน (triisopropylsilane, TIPS) ในอัตราส่วน 94:2.5:2.5:1 แล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรองเก็บส่วนสารละลายไว้ แล้วนำไปทำการระเหยสารละลายออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจน (N₂) แล้วตกตะกอนด้วยเทอเชียรีบิวทิล เมทิล อีเทอร์ (*tert*-butyl methyl ether) เย็น

3.2.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) ของสารเพปไทด์ที่สังเคราะห์และการแยกสารเพปไทด์ให้บริสุทธิ์ (purification) และการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน (protein folding)

หลังจากที่ทำการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) ทั้งที่เป็น native HWTX-X และอนุพันธ์ (derivatives) ทั้ง 3 ตัวได้แล้ว จะทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเพปไทด์ด้วย analytical HPLC (high performance liquid chromatography) โดยใช้ C18 column (4.6 mm x 250 mm) ที่มีการแยกเป็นแบบ gradient mode โดยใช้สัดส่วนของอะซิโตรไนไตรล์ (ACN) คือ 3-100% อะซิโตรไนไตรล์ (ACN) ที่มี 0.1% กรดฟอร์มิก (formic acid) และใช้อัตราการไหล (flow

rate) เป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น (wavelength) 215 และ 280 นาโนเมตร หลังจากนั้นจะนำสารเปปไทด์ไปทำการแยกทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค preparative HPLC โดยใช้ C18 column (10 mm x 250 mm) ที่มีการแยกเป็นแบบ gradient mode โดยใช้สัดส่วนของอะซิโตรไนไตรล์ (ACN) คือ 15-70% อะซิโตรไนไตรล์ (ACN) ที่มี 0.1% กรดฟอร์มิก (formic acid) และใช้อัตราการไหล (flow rate) เป็น 3 มิลลิลิตรต่อนาที โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น (wavelength) 215 และ 280 นาโนเมตร และทำการเก็บ peptide fraction ที่ต้องการแล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) เพื่อให้ได้ตะกอนบริสุทธิ์ของเปปไทด์ออกมา หลังจากนั้นทำ protein folding เพื่อสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ต่อไป โดยนำตะกอนของเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ได้มาละลายด้วยสารละลาย 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) ที่มี 5 mM แอล-กลูต้าไธโอน รีดิวซ์ฟอร์ม (L-glutathione reduced form, GSH) และ 0.5 mM แอล-กลูต้าไธโอน ออกซิไดซ์ฟอร์ม (L-glutathione oxidized form, GSSG) หลังจากนั้นทำการกวน (stir) สารละลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบปฏิกิริยา (reaction) โดยทำการหยุดปฏิกิริยา (quenching) ด้วย 0.1% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) จากนั้นนำสารไปตรวจสอบด้วยเทคนิค analytical HPLC อีกครั้ง โดยในส่วนของ cyclic peptide เมื่อทำการกำจัดหมู่ปกป้องทั้งหมดออกแล้วจะนำมาทำการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (protein folding) โดยใช้สภาวะ (condition) เดียวกันกับสารเปปไทด์ที่เป็นเส้นตรง (linear peptide) และหลังจากที่ได้ทำการ folding protein เรียบร้อยแล้วจะนำไปแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative HPLC

3.2.5 การปรับสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมในการทำ protein folding

การปรับหา condition ที่เหมาะสมจะทำโดยใช้ native และ cyclic HWTX-X ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ folding ซึ่งแสดงได้ดังตารางนี้

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงการปรับสภาวะ (condition) ที่มีการใช้ additive ที่แตกต่างกันในการทำ protein folding

Condition	Buffer condition ^a	Additive	Temperature (°C)
1	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	-	4
2	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	1M GdnHCl	4
3	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	10% Glycerol	4
4	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	20% EtOH	4
5	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	10% ACN	4
6	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	20% ACN	4
7	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	40% ACN	4

^afolding condition ยังประกอบไปด้วย 1 mM EDTA, 2.5 mM GSH และ 0.25 mM GSSG

เริ่มต้นโดยการนำ native และ cyclic HWTX-X หนัก 0.5 มิลลิกรัม มาละลายด้วย 0.4 M Tris-HCl (pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร แล้วทำการปิเปต (pipette) สารละลายโปรตีนออกมา 20 ไมโครลิตร ลงใน eppendorf tube ที่มีการปรับสถานะ (adjust condition) ตามที่ได้แสดงดังตาราง (80 ไมโครลิตร) แล้วทำการกวน (stir) ให้สารละลายผสมกัน จากนั้นตั้งปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) จำนวน 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย analytical HPLC ที่ความยาวคลื่น (wavelength) 215 และ 280 นาโนเมตร

3.2.6 การติดสารเรืองแสง (Fluorescent labeling) กับโปรตีน Huwentoxin-X

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการติดสารเรืองแสง (fluorescent labeling) เข้ากับโปรตีน HWTX-X เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางด้าน bio-imaging application ต่อไปในอนาคต โดยการเอาสาร native HWTX-X ที่มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มาทำการติดสารเรืองแสง ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ 5-ฟลูออเรซินไอโซไทโอไซยาเนต (5-fluorescein isothiocyanate) หรือ FITC ทำหน้าที่เป็น fluorescent reporter มาทำการติด (labeling) ในอัตราส่วนที่เป็น FITC:HWTX-X เท่ากับ 2:1 เริ่มต้นโดยการปิเปต (pipette) สารละลายโปรตีน 10 ไมโครลิตร ลงใน eppendorf tube ตามด้วยการปิเปตสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogencarbonate) หรือ NaHCO₃ (pH 9) 2 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายสารเรืองแสง 5-ฟลูออเรซินไอโซไทโอไซยาเนต (5-fluorescein isothiocyanate) หรือ FITC (ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) 2.6 ไมโครลิตร และสุดท้ายเติมน้ำ (DI) 5.4 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการกวนสารละลาย (stir) ให้ผสมเข้าด้วยกัน

และตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) จำนวน 2 ไมโครลิตร แล้วนำสารละลายไปทำการตรวจสอบ (monitor) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย analytical HPLC ที่ความยาวคลื่น (wavelength) 215 และ 280 นาโนเมตร



บทที่ 4

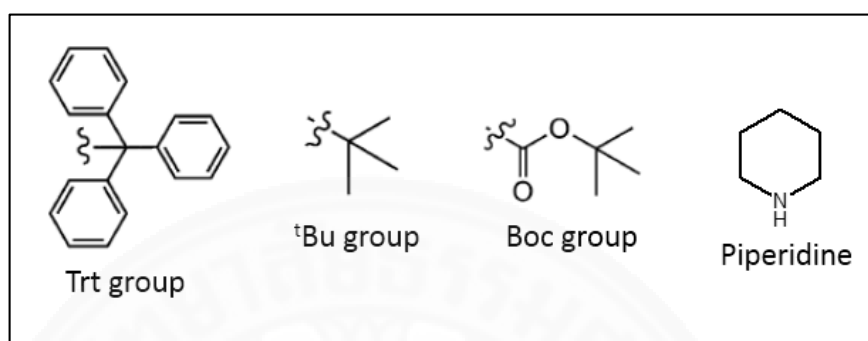
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis)

การสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) เพื่อใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นยาเป็นสิ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก โดยวิธีการหรือเทคนิคทางเคมีที่เป็นที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน คือ การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีข้อดีคือ เป็นวิธีการที่สามารถสังเคราะห์เพปไทด์ได้ในปริมาณที่มากและสามารถลดขั้นตอนในการแยกสาร (purification) ในแต่ละขั้นตอนลงจึงทำให้สามารถสังเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับการสังเคราะห์แบบธรรมดาหรือที่เรียกว่า solution phase peptide synthesis นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังเลือกใช้การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวัฏภาคของแข็งที่เป็นแบบ Fmoc strategy หรือการใช้หมู่ปกป้อง (protecting group) เป็นหมู่ Fmoc ทำหน้าที่ในการปกป้องหมู่อะมิโน (Fmoc-protected amino acid) เหตุผลที่เลือกใช้วิธีดังกล่าวเนื่องจากมีข้อดีในเรื่องของการใช้สภาวะในการกำจัดหมู่ปกป้องทางด้านหมู่อะมิโน (Fmoc) ที่มีการใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง (mild condition) โดยการใช้พิเพอริดีน (piperidine) ในการทำหน้าที่เป็นเบส ซึ่งถือได้ว่าเป็นข้อดีเพราะว่าหมู่ปกป้องสายโซ่ (side chain protecting groups) ของกรดอะมิโนต่างๆ และ linker ของเรซินส่วนใหญ่จะง่ายต่อการตัดออกในสภาวะที่เป็นกรด (acidic condition) โดยกรดที่ใช้คือไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) แต่ในขณะที่ Boc strategy นั้นจะมีความยุ่งยากกว่าเนื่องจากมีการใช้กรดที่รุนแรง (strong condition) ซึ่งใช้กรดไฮโดรฟลูออริก (hydrofluoric acid, HF) ในการตัดเรซิน ทำให้จำเป็นต้องเปลี่ยนไปใช้วัสดุชนิดอื่นที่ไม่ใช่แก้วในการทำปฏิกิริยา

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้กรดอะมิโนที่ถูกปกป้องหมู่อะมิโน (NH_2) ด้วยหมู่ Fmoc โดยที่กรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีหมู่ปกป้องสายโซ่ (side chain protecting group) ที่แตกต่างกันดังนี้ กรดอะมิโนทรีโอนีน (Thr, T), กรดอะมิโนซีรีน (Ser, S) และกรดอะมิโนไทโรซีน (Tyr, Y) จะมีหมู่ปกป้องสายโซ่ (side chain) คือ หมู่เทิร์ต-บิวทิล (*tert*-butyl, ^tBu) ในส่วนของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys, C), กรดอะมิโนแอสพาราจีน (Asn, N), กรดอะมิโนกลูตามีน (Gln, Q) และกรดอะมิโนฮิสติดีน (His, H) จะมีหมู่ปกป้องสายโซ่ (side chain) คือ หมู่เทรทิล (Trityl, Trt) และกรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) จะมีหมู่ปกป้องสายโซ่ (side chain) คือ หมู่เทิร์ต-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล (*tert*-butyltoxicarbonyl, Boc) ดังนั้นหมู่ปกป้องสายโซ่ที่ได้กล่าวมานั้นจะไม่ถูกรบกวนในสภาวะที่เป็นเบส (basic condition) ที่มีการใช้ piperidine ในการถอดหมู่ Fmoc ออก แต่จะสามารถถอดออกได้ง่ายในสภาวะที่เป็นกรด

(acidic condition) อาทิ การใช้ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ในขั้นตอนของการตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซินที่ใช้ในการสังเคราะห์ทั้งแวงเรซิน (wang resin) และ 2-คลอโรไทรทิล คลอไรด์เรซิน (2Cl-Trityl chloride resin)



ภาพที่ 4.1 ภาพแสดงโครงสร้างของหมู่ปกป้องสายโซ่ชนิดต่างๆและโครงสร้างของพิเพอริดีน

โดยวิธีการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) ในงานวิจัยนี้จะแบ่งออกเป็น 2 วิธีการ (method) ด้วยกัน ซึ่งมีการใช้เรซินชนิดที่แตกต่างกันคือ แวงเรซิน (wang resin) และ 2-คลอโรไทรทิล คลอไรด์เรซิน (2Cl-Trityl chloride resin) เป็นวิถุภาคของแข็งในการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) และอนุพันธ์ (derivative) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นกรดอะมิโน (amino acid) เรียงต่อกันเป็นเส้นตรงยาว 28 กรดอะมิโน ซึ่งลำดับของกรดอะมิโนสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 4.6

4.1.1 การสังเคราะห์เพปไทด์โดยใช้ wang resin (วิธีการ A)

4.1.1.1 การโหลดกรดอะมิโนตัวแรก (Fmoc-Thr(^tBu)-OH) ลงบน wang resin

การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X ในขั้นเริ่มต้นจะทำการโหลดกรดอะมิโนตัวแรกคือเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-โอ-เทิร์ต-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-O-tert-L-threonine) หรือ Fmoc-Thr(^tBu)-OH ลงบนแวงเรซิน โดยมีการใช้ coupling agents คือ ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบดิอิมไมด์ (dicyclohexylcarbodiimide) หรือ DCC, 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (4-dimethylaminopyridine) หรือ DMAP และ 1-ไฮดรอกซีเบนโซทริอาโซล (1-Hydroxybenzotriazole) หรือ HOBt ซึ่งทำหน้าที่ในการช่วยสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างเรซินกับกรดอะมิโน ซึ่งการใช้ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบดิอิมไมด์

(DCC) จะให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (side product) คือ 1,3-dicyclohexylurea (DHU) ซึ่งมีลักษณะเป็น ตะกอนสีขาวแต่สามารถถูกกำจัดออกไปได้ในขั้นตอนของการล้างด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) โดยการไหลตกรดอะมีโนสามารถแสดงได้ดังนี้

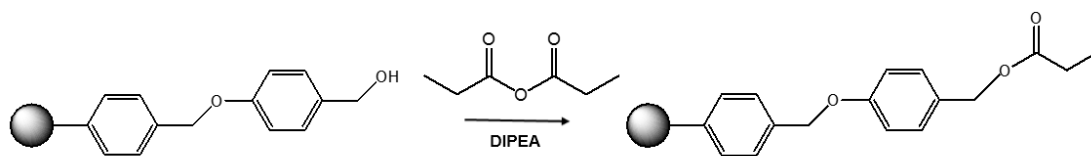


ภาพที่ 4.2 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีระหว่าง Fmoc-Thr(^tBu)-OH กับ wang resin

โดยหลังจากที่ทำการไหลตกรดอะมีโนตัวแรกลงบน wang resin แล้ว โดยในขั้นตอนนี้ทางผู้วิจัยจะทำการไหลซ้ำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการไหลตให้สูงขึ้น ก่อนจะทำการเพิ่มกรดอะมีโนตัวถัดไปในสายโซ่จะต้องการหาปริมาณของกรดอะมีโนตัวแรก (Fmoc-Thr(^tBu)-OH) ที่ถูกไหลตลงเรซินด้วยวิธี Fmoc test ซึ่งสามารถคำนวณออกมาในรูปของ % amino acid loading โดยค่าที่ได้จะถูกนำไปแทนในสมการ [amino acid loading (mmol/g) = $\frac{\text{Abs.}}{1.65 \times \text{mg}}$] เพื่อคำนวณค่าประสิทธิภาพของการไหลต (% amino acid loading) ได้ ซึ่งจากค่าดังกล่าวจะทำให้สามารถทราบถึงปริมาณของกรดอะมีโน (Fmoc-Thr(^tBu)-OH) ที่ติดอยู่กับเรซิน

4.1.1.2 การทำปฏิกิริยาป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงบนพื้นผิวเรซิน

หลังจากที่กรดอะมีโนตัวแรกถูกไหลตบนเรซินแล้ว Fmoc-Thr(^tBu)-wang resin จะนำมาทำปฏิกิริยาป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงบนพื้นผิวเรซินกับโพรพาโนอิกแอนไฮไดรด์ (propanoic anhydride) โดยที่ไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (diisopropylethylamine) หรือ DIPEA ทำหน้าที่เป็นเบส ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า “การทำ capping” ซึ่งกระบวนการนี้มีข้อดีคือจะช่วยให้หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อิสระของเรซินที่ไม่ได้เข้าทำปฏิกิริยากับกรดอะมีโนตัวแรก (Fmoc-Thr(^tBu)-OH) นั้นถูกปกป้องไว้ (protection) ทำให้ไม่เหลือหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อิสระบนพื้นผิวของเรซิน ดังนั้นในการทำปฏิกิริยากับอะมีโนตัวถัดไปในการต่อสายโซ่เพปไทด์ (coupling step) จะทำให้สามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) ได้ ซึ่งจะทำให้ได้เพปไทด์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเท่านั้น



ภาพที่ 4.3 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีระหว่างโพรพานอิกแอนไฮไดรด์ (propanoic anhydride) กับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อิสระของ wang resin

4.1.1.3 การสังเคราะห์เพปไทด์ด้วยวิธี solid phase peptide synthesis

หลังจากที่กรดอะมิโนตัวแรกได้ทำการโหลดลงบนเรซินและได้ทำการ capping resin เรียบร้อยแล้ว จากนั้นทำการกำจัดหมู่ปกป้อง (Fmoc) ด้วยสารละลาย 20% พิเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) ในการปลดปล่อยหมู่ $-NH_2$ เพื่อให้พร้อมในการทำปฏิกิริยาสำหรับการต่อกรดอะมิโนตัวต่อไป จากนั้นเติมกรดอะมิโนตัวที่สองคือ เอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอส-ไทรทิล-แอล-ซิสเทอีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-*S*-trityl-L-cysteine หรือ Fmoc-Cys(Trt)-OH โดยใช้ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมิด (dicyclohexylcarbodiimide) หรือ DCC, 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (4-dimethylaminopyridine) หรือ DMAP, และ 1-ไฮดรอกซีเบนโซโทรอาโซล (1-Hydroxybenzotriazole) หรือ HOBT เป็น coupling agents แล้วเติมกรดอะมิโนตัวอื่นๆที่เหลือไปเรื่อยๆถึงกรดอะมิโนตัวสุดท้ายคือเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-เอ็น-เอพิลลอน-เทิร์ต-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล-แอล-ไลซีน (*N*-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-*N*-epsilon-tert-butyltoxycarbonyl-L-lysine หรือ Fmoc-Lys(Boc)-OH) หลังจากนั้นทำการกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection) ด้วยสารละลาย 20% พิเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) เพื่อเอาหมู่ฟลูออรีนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล (fluorenylmethyloxycarbonyl group) หรือ Fmoc ออก เพื่อให้ปลายสายโซ่เพปไทด์เป็นหมู่อะมิโนอิสระ ($-NH_2$) หลังจากนั้นทำเรซินให้แห้งในสภาวะสุญญากาศเพื่อให้พร้อมสำหรับการนำไปตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซินต่อไป

4.1.1.4 การตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซิน

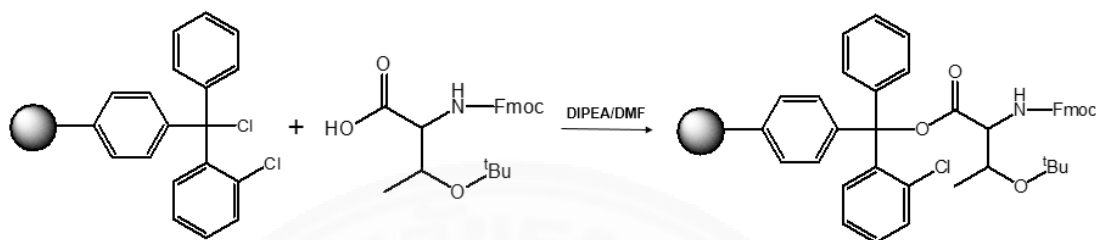
การตัดสายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) ออกจากเรซินหรือ solid support ทำโดยเติมสารละลายผสม (deprotection cocktail) ระหว่างไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) น้ำกลั่น (distilled water) อีเทนไดไทโธล (ethanedithiol, EDT) และ ไตรไอโซโพรพิลไซเลน (triisopropylsilane, TIPS) ในอัตราส่วน 94:2.5:2.5:1 ซึ่งในการทำละลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างสายโซ่เพปไทด์กับเรซินด้วยการใช้สภาวะ (condition) นี้จะทำให้หมู่ปกป้องสายโซ่ทั้งหมด (protecting group) อาทิ หมู่เทิร์ต-บิวทิล (*tert*-butyl, ^tBu) หมู่ไทรทิล (Trityl, Trt) และหมู่เทิร์ต-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล (*tert*-butyloxycarbonyl, Boc) หลุดออกจากสายโซ่เพปไทด์ด้วย จากนั้นจะทำการตกตะกอนเพปไทด์ด้วยเทอเชียรีบิวทิล เมทิล อีเทอร์ (*tert*-butyl methyl ether) เย็น เพื่อให้ตะกอนของเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยที่หมู่ปกป้องสายโซ่ (protecting group side chain) ที่หลุดออกและสิ่งเจือปนอื่นๆจะละลายได้ดีในอีเทอร์ซึ่งจะถูกกำจัดออกไปบางส่วน ดังนั้นการตกตะกอนโปรตีนในอีเทอร์จึงมีส่วนช่วยทำให้สารมีความบริสุทธิ์ขึ้น และหลังจากนั้นนำสารที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) จะได้เป็นตะกอนสีขาวของโปรตีนออกมา

4.1.2 การสังเคราะห์เพปไทด์โดยใช้ 2Cl-Trityl chloride resin (วิธีการ B)

4.1.2.1 การโหลดกรดอะมิโนตัวแรก (Fmoc-Thr(^tBu)-OH) ลงบน 2Cl-Trityl chloride resin

การโหลดกรดอะมิโนตัวแรกคือเอ็น-แอลฟา-(9-ฟลูออรีนเมทิลออกซีคาร์บอนิล)-โอ-เทิร์ต-บิวทิล-แอล-ทรีโอนีน (N-alpha-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-O-*tert*-L-threonine) หรือ Fmoc-Thr(^tBu)-OH ลงบนเรซิน (2Cl-Trityl chloride resin) โดยการใช้ไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (diisopropylethylamine) หรือ DIPEA เป็นเบส โดยปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นโดยง่ายในสภาวะที่เป็นเบสแสดงดังภาพที่ 4.4 ซึ่งข้อควรหลีกเลี่ยงในการทำปฏิกิริยา คือ ความชื้นในอากาศซึ่งอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ (substitution) ด้วยโมเลกุลของน้ำได้ ดังนั้นจึงควรทำปฏิกิริยาภายใต้แก๊สไนโตรเจน โดยหลังจากที่ทำการโหลดกรดอะมิโนตัวแรก (Fmoc-Thr(^tBu)-OH) ลงบนเรซินแล้ว จะทำการหาปริมาณของกรดอะมิโนที่ถูกโหลดด้วยวิธี Fmoc test ซึ่งจะถูกคำนวณออกมาในรูปของ % amino acid loading โดยนำค่าที่ได้ไปแทนในสมการ [amino acid loading

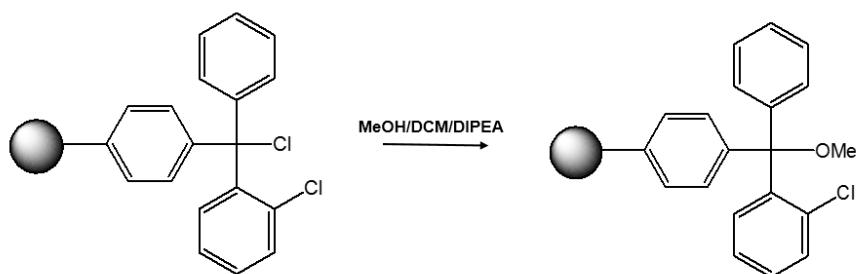
$(\text{mmol/g}) = \frac{\text{Abs.}}{1.65 \times \text{mg}}$] เช่นเดียวกับวิธีการ 4.1.1.1 ซึ่งสามารถคำนวณค่าของการโหลด (% amino acid loading) ได้ จะทำให้สามารถทราบถึงปริมาณของกรดอะมิโน (Fmoc-Thr(^tBu)-OH) ที่ติดอยู่กับเรซินได้



ภาพที่ 4.4 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีระหว่าง Fmoc-Thr(^tBu)-OH กับ 2Cl-Trityl chloride resin

4.1.2.2 การทำปฏิกิริยาป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงบนพื้นผิวเรซินของ 2Cl-Trityl chloride resin

หลังจากที่ทำการโหลดกรดอะมิโนตัวแรกลงบนเรซินเรียบร้อยแล้วจะทำการ capping resin เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) โดยในกรณีนี้นำ Fmoc-Thr(^tBu)-trityl resin มาเติมสารละลายผสม (capping solution) ซึ่งเป็นสารผสมระหว่างเมทานอล (methanol, MeOH), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) และไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (diisopropylethylamine) หรือ DIPEA ในอัตราส่วนคือ 17:2:1 ซึ่งเรซินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาจากการโหลดขั้นตอนแรกจะถูกปกป้อง (protection) โดยการเกิดปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยหมู่เมทอกซี (methoxy, -OMe) ซึ่งสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงอื่นๆ ในขั้นตอนของการ coupling ขั้นตอนต่อไปได้



ภาพที่ 4.5 ภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีของการทำ capping resin ของ 2Cl-Trityl chloride resin

4.1.2.3 การสังเคราะห์เปปไทด์ด้วยวิธี solid phase peptide synthesis

หลังจากที่ทำการโหลดกรดอะมิโนตัวแรกลงบนเรซินและได้ทำการ capping resin เรียบร้อยแล้ว จะทำการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ (linear peptide chain) เช่นเดียวกันกับ **วิธีการ 4.1.1.3** กล่าวคือ ในขั้นตอนการเติมกรดอะมิโน (coupling step) ยังคงใช้ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมไมด์ (dicyclohexylcarbodiimide) หรือ DCC, 4-ไดเมทิลอะมิโนไพริดีน (4-dimethylaminopyridine) หรือ DMAP, และ 1-ไฮดรอกซีเบนโซโทรเอโซล (1-Hydroxybenzotriazole) หรือ HOBt ทำหน้าที่เป็น coupling agents และในขั้นตอนการกำจัดหมู่ปกป้อง (deprotection step) จะใช้สารละลาย 20% ไพเพอริดีน (piperidine) ในไดเมทิลฟอร์มามิด (dimethylformamide, DMF) เพื่อเอาหมู่ Fmoc ออก และเมื่อทำการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์เสร็จแล้วทำให้เรซินแห้งในสภาวะสุญญากาศเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการตัดสายโซ่เปปไทด์ต่อไป

4.1.2.4 การตัดสายโซ่เปปไทด์ออกจากเรซิน

หลังจากที่สังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ (linear peptide chain) เสร็จแล้วจะทำการตัดสายโซ่เปปไทด์ออกจากเรซินด้วยสารละลาย 1% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ในไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) ซึ่งการใช้สภาวะ (condition) นี้จะยังคงทำให้หมู่ปกป้องสายโซ่ชนิดต่างๆ (side chain protecting group) ของสายโซ่เปปไทด์อยู่ครบ เนื่องจากมีการใช้ปริมาณของไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ที่ต่ำมากจึงไม่ส่งผลต่อการหลุดออกของหมู่ปกป้องสายโซ่ จากนั้นทำการตกตะกอนสายโซ่เปปไทด์ด้วยน้ำ เนื่องจากเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้มีความเป็น hydrophobic สูง เพราะมีหมู่ปกป้องสายโซ่ อาทิ หมู่ไทรทิล (Trityl, Trt) และหมู่เทิร์ต-บิวทิล (*tert*-butyl, ^tBu) ซึ่งมีความเป็น hydrophobic group หลังจากนั้นนำสารไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) จะได้เป็นตะกอนสีขาวของโปรตีนออกมา

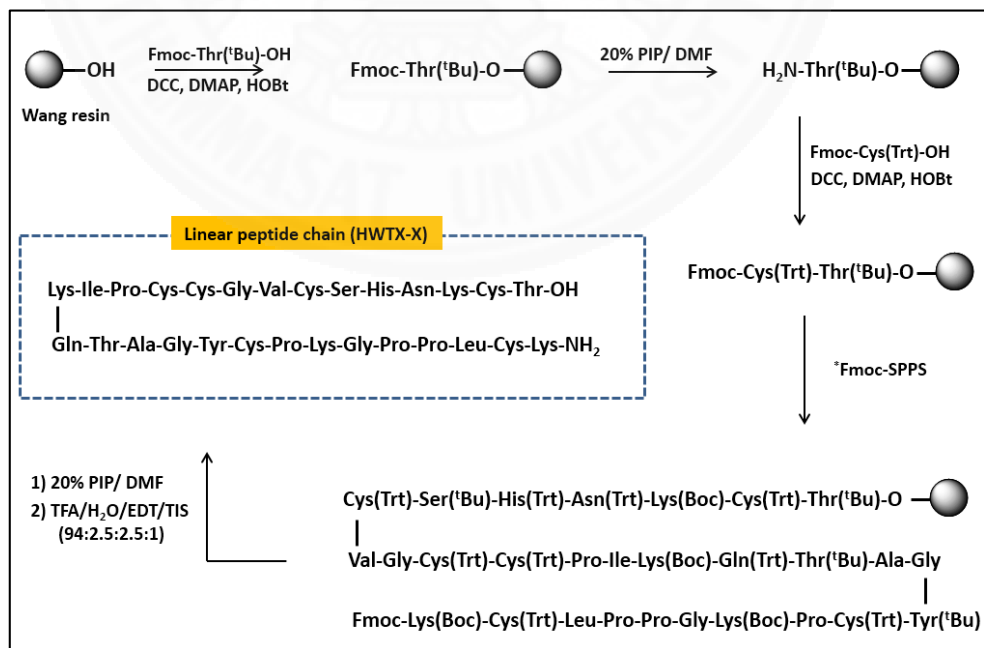
4.2 การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) และอนุพันธ์

4.2.1 การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X)

ในงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นทำการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถพบได้ในพืชของแมงมุม Chinese bird สายพันธุ์ *Ornithoctonus huwena* ซึ่งโครงสร้างจะมีลักษณะเป็นเส้นตรง (linear) ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 28 ตัว และมีพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะภายในโครงสร้างซึ่งจัดตัวในลักษณะที่เหมาะสมโดยที่กรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys, C) ตัวที่ 1 สร้างพันธะไดซัลไฟด์กับกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys, C) ตัวที่ 4 (C₁-C₄) กรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys, C) ตัวที่ 2 สร้างพันธะไดซัลไฟด์กับกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys, C) ตัวที่ 5 (C₂-C₅) และกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys, C) ตัวที่ 3 สร้างพันธะไดซัลไฟด์กับกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys, C) ตัวที่ 6 (C₃-C₆) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจในการยับยั้ง Ca²⁺ channel¹¹



ภาพที่ 4.6 ภาพแสดงลำดับอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) โดยใช้อักษรโรมัน (I-VI) แทนการระบุตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys, C) ภายในสายโซ่



ภาพที่ 4.7 ภาพแสดงการสังเคราะห์โปรตีน HWTX-X ด้วยวิธีการ SPPS

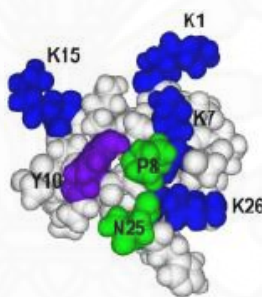
การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้แวงเรซิน (wang resin) ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคของแข็งในการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ (linear HWTX-X) โดยวิธีการสังเคราะห์จะทำตาม**วิธีการ 4.1.1 (วิธีการ A)** โดยแสดงภาพรวมของการสังเคราะห์**ดังภาพที่ 4.7** ซึ่งหลังจากการโพลีเมอไรเซชันแล้วสามารถคำนวณค่าของการโหลด (% amino acid loading) ได้มีค่าเท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็น 0.37 mmol/g resin กล่าวคือใน wang resin 1 กรัม จะมีปริมาณของ Fmoc-Thr(^tBu)-OH ที่ถูกโพลีเมอไรเซชันเท่ากับ 0.37 มิลลิโมล ซึ่งในขั้นตอนแรกของการโพลีเมอไรเซชันลงบนเรซินถือได้ว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยหากว่ามีค่าของการโพลีเมอไรเซชัน (% amino acid loading) ที่ต่ำแล้วจะต้องทำการโพลีเมอไรเซชันซ้ำอีกครั้ง (double coupling) เพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์ของการโพลีเมอไรเซชันที่สูงขึ้น และเมื่อทำการตัดสายโซ่เพปไทด์ออกจากเรซินหลังจากการสังเคราะห์ด้วยวิธี solid phase peptide synthesis (SPPS) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว พบว่าจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นตะกอนสีขาวหนัก 136.7 มิลลิกรัม หรือคิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 42 ซึ่งถือได้ว่าการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X โดยใช้ wang resin เป็นวัฏภาคของแข็ง และให้ผลร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้ประมาณนี้ถือเป็นที่น่าพอใจ เพราะการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโนมากหรือมีสายที่ยาว (long peptide chain) จะมีปัญหาของการเกิดการรวมตัวของสายโซ่เพปไทด์ (peptide aggregation) และการเกิดการหลุดหายของกรดอะมิโนภายในสายโซ่เพปไทด์ (deletion product) เนื่องจากสายโซ่เพปไทด์ที่ยาวจะมีความเกะกะที่สูง (steric hindrance) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการเกิดผลิตภัณฑ์ได้

นอกจากนี้เมื่อทำการพิจารณาโครงสร้างของโปรตีน HWTX-X จะพบว่ามีกรดอะมิโนโพรลีน (Pro) ซึ่งจัดเป็น 2° amine ที่มีโครงสร้างเป็นวง ซึ่งในขั้นตอนของการสร้างพันธะเพปไทด์ของกรดอะมิโนชนิดนี้ (coupling step) อาจทำให้การต่อกรดอะมิโนชนิดนี้มีความยากขึ้นหรือสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากความเกะกะทางโครงสร้างของกรดอะมิโนโพรลีน ซึ่งส่งผลให้ได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ลดลง โดยทางผู้วิจัยจึงทำการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นโดยทำการเติมกรดอะมิโนโพรลีนซ้ำอีกครั้ง (double coupling) เพื่อให้มั่นใจว่าการเติมกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้ของสายโซ่เพปไทด์เกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุดแล้วก่อนทำการต่อกรดอะมิโนชนิดอื่นต่อไป โดยหลังจากที่ได้สายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) แล้วควรเก็บไว้ในภาชนะปิดอย่างดีเพื่อป้องกันการสัมผัสกับอากาศ เพราะว่าแก๊สออกซิเจน (O₂) ที่อยู่ในอากาศสามารถเกิดปฏิกิริยากับอากาศทำให้หมู่ thiol (-SH) บนกรดอะมิโนซิสเตอีนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) นอกจากนี้แล้วยังสามารถเกิดปฏิกิริยาการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ได้ ซึ่งอาจทำให้มีการสร้างพันธะที่ผิดรูปแบบได้ (misfolded peptide formation) โดยทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค analytical HPLC จะทำให้ทราบได้ว่าเกิด

ปัญหาดังกล่าวหรือไม่ ซึ่งการแก้ไขปัญหามารถใช้ reducing agent อาทิ dithiothreitol (DTT) มาทำหน้าที่ในการรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ให้สลายออกและกลับกลายเป็นหมู่ thiol (-SH) อิสระดั้งเดิม ซึ่งวิธีการนี้จะช่วยทำให้ได้สายโซ่เปปไทด์ปกติขึ้นมาในบางส่วนเท่านั้น และอาจทำให้เปปไทด์บางส่วนที่มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์แล้วและไม่เปลี่ยนรูปคืนมานั้นหายไปได้ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับมีปริมาณน้อยลงซึ่งส่งผลโดยตรงต่อ % yield ที่ได้รับ

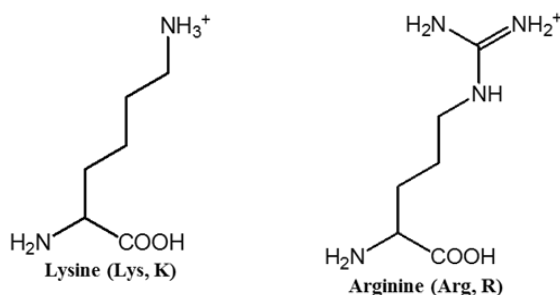
4.2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของโปรตีน HWTX-X

การสังเคราะห์อนุพันธ์ (derivative) ของโปรตีน Huwentoxin-X นั้นถือได้ว่ามีความสำคัญอย่างมากในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivity) ของโปรตีนดังกล่าวที่ทำการศึกษา โดยเมื่อทำการพิจารณาลักษณะโครงสร้างทางพื้นผิว (surface) ของโปรตีน Huwentoxin-X ดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 ภาพแสดงโครงสร้างทางพื้นผิว (surface) ของโปรตีน Huwentoxin-X¹¹

โดยจะพบว่ากรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดเบส (basic residue) เป็นส่วนที่มีความสำคัญในการจับ (binding) กับเป้าหมายได้ดี โดยจะสังเกตเห็นได้ว่ากรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) มีลักษณะที่ยื่นออกมาจากพื้นผิวโมเลกุลของโปรตีน Huwentoxin-X โดยโมเลกุลของโปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) ถึง 4 ตำแหน่งด้วยกัน ดังนั้นการสังเคราะห์อนุพันธ์ของโปรตีน Huwentoxin-X จะทำการสังเคราะห์โดยการปรับเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน (mutagenesis) โดยทำการแทนที่กรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) ด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R) เนื่องจากกรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) และกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R) ต่างจัดเป็น positively charged amino acid ที่เหมือนกัน อีกทั้งยังมีโครงสร้างที่คล้ายกันอีกด้วย ดังนั้นจึงน่าจะเป็นข้อดีในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Huwentoxin-X เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อไป

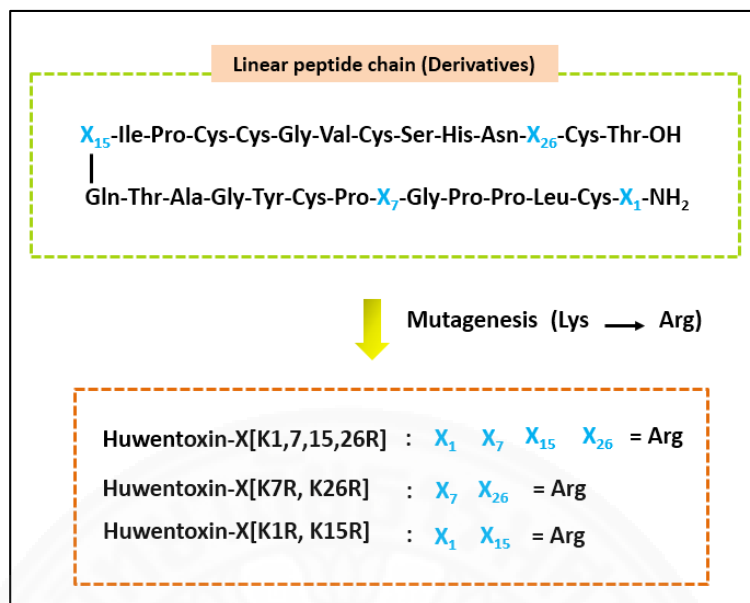


ภาพที่ 4.9 ภาพแสดงโครงสร้างของกรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) และกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของโปรตีน HWTX-X ทั้งหมด 3 ตัว ด้วยกันคือ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 1) Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 2) และ Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ตัวที่ 3) โดยการปรับเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในสายโซ่ (mutagenesis) ของโปรตีน HWTX-X จะใช้วิธีการสังเคราะห์ในลักษณะเดียวกันกับการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) คือใช้การสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวิธีการของแข็ง (solid phase peptide synthesis) โดยยังคงใช้เรซินเป็น wang resin ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคของแข็งซึ่งวิธีการสังเคราะห์แสดงตามวิธีการ 4.1.1 (วิธีการ A) และแสดงภาพรวมในการสังเคราะห์ดังภาพที่ 4.11

HWTX-X	K	L	P	P	G	K	P	C	Y	G	A	T	Q	K	I	P	C	C	G	V	C	S	H	N	K	C	T
K1,7,15,26R	R	L	P	P	G	R	P	C	Y	G	A	T	Q	R	I	P	C	C	G	V	C	S	H	N	R	C	T
K7R,K26R	K	L	P	P	G	R	P	C	Y	G	A	T	Q	K	I	P	C	C	G	V	C	S	H	N	R	C	T
K1R,K15R	R	L	P	P	G	K	P	C	Y	G	A	T	Q	R	I	P	C	C	G	V	C	S	H	N	K	C	T

ภาพที่ 4.10 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว ที่ทำการสังเคราะห์



ภาพที่ 4.11 ภาพแสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ด้วยวิธีการ SPPS โดยทำการปรับเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน (mutagenesis)

4.2.2.1 Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 1)

การสังเคราะห์ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] นั้นจะทำการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวิธีการของแข็ง (solid phase peptide synthesis) โดยสิ่งที่แตกต่างคือจะทำการแทนที่กรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) ในทุกตำแหน่งด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R) ซึ่งเมื่อทำการสังเคราะห์ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] เสร็จเรียบร้อยแล้ว จะทำการตัดสายโซ่เพปไทด์ (linear peptide chain) ด้วยไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ซึ่งจะได้เป็นตะกอนสีขาวหนัก 130.4 มิลลิกรัม หรือคิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 38

4.2.2.2 Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 2)

ในการสังเคราะห์ Huwentoxin-X[K7R, K26R] นั้นจะทำการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ด้วยวิธีการของแข็ง (solid phase peptide synthesis) เช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] แต่สิ่งที่แตกต่างคือจะทำการแทนที่กรดอะมิโนเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้น กล่าวคือจะทำการแทนที่กรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) ในตำแหน่งที่ 7 และ 26 ด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R) ซึ่งเมื่อทำการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ของ Huwentoxin-X[K7R, K26R] เสร็จเรียบร้อยแล้ว

แล้ว จากนั้นจะทำการตัดสายโซ่เปปไทด์ (linear peptide chain) ออกจากเรซินด้วยไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ซึ่งจะได้เป็นตะกอนสีขาวหนัก 122.6 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิตเท่ากับ 37

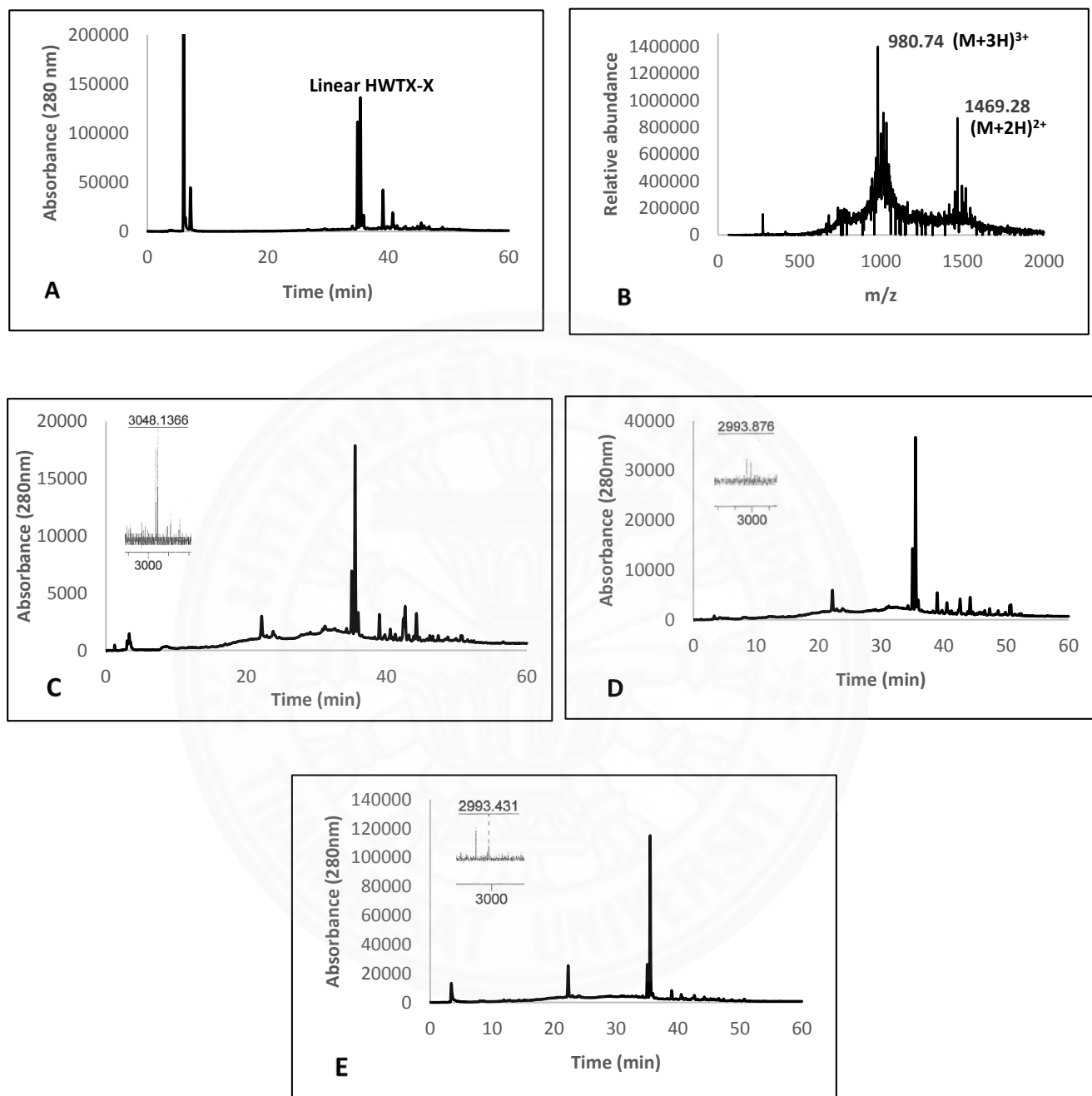
4.2.2.3 Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ตัวที่ 3)

การสังเคราะห์ Huwentoxin-X[K1R, K15R] นั้นจะทำการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ด้วยวิธภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis) เช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์ Huwentoxin-X[K7R, K26R] โดยมีการแทนที่กรดอะมิโน 2 ตำแหน่งเท่านั้น แต่สิ่งที่แตกต่างคือจะทำการแทนที่กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ต่างกันโดยจะทำการแทนที่กรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) ในตำแหน่งที่ 1 และ 15 ด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R) ซึ่งเมื่อทำการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ของ Huwentoxin-X[K1R, K15R] เสร็จแล้ว หลังจากนั้นจะทำการตัดสายโซ่เปปไทด์ (linear peptide chain) ออกจากเรซินด้วยไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) จะได้เป็นตะกอนสีขาวหนัก 127.2 มิลลิกรัม โดยคิดเป็นร้อยละผลผลิตเท่ากับ 38

โดยการสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว นี้จะให้ร้อยละของผลผลิตที่ได้ใกล้เคียงกับการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) เนื่องจากมีการใช้เรซิน (wang resin) ทำหน้าที่เป็นวิธภาคของแข็งในการสังเคราะห์เปปไทด์ที่เหมือนกัน ซึ่งถือได้ว่าผลผลิตที่เปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ดี

4.2.3 การตรวจวัดความบริสุทธิ์ (purity) และการยืนยันมวลโมเลกุลเปปไทด์

หลังจากการสังเคราะห์เสร็จสิ้น การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้เป็นสิ่งสำคัญ โดยเทคนิคที่มีส่วนช่วยอย่างมากคือ high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเปปไทด์ทั้งที่เป็น linear HWTX-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว มาทำการละลายด้วยเมทานอล (methanol) ซึ่งสายโซ่เปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายดังกล่าว โดยในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ทางผู้วิจัยจะทำการใช้ analytical HPLC โดยใช้ C18 column (4.6 mm x 250 mm) ที่มีการแยกเป็นแบบ gradient mode ซึ่งใช้สัดส่วนของอะซิโตรไนไตรล์ (ACN) คือ 3-100% อะซิโตรไนไตรล์ (ACN) ที่มี 0.1% กรดฟอร์มิก (formic acid) และใช้อัตราการไหล (flow rate) เป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น (wavelength) 215 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร จะใช้ตรวจวัดพันธะเอไมด์ (amide bond) ของเปปไทด์ และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จะใช้ในการตรวจวัดสารที่มีวงอะโรมาติก (aromatic ring) อยู่ในโครงสร้าง ซึ่งสายโซ่เปปไทด์ที่สังเคราะห์นั้นภายในโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนไทโรซีน (Tyr, Y) ซึ่งจะมีวงอะโรมาติกอยู่ในโครงสร้างจึงสามารถตรวจสอบได้ที่ความยาวคลื่นดังกล่าว



ภาพที่ 4.12 ภาพแสดง HPLC chromatogram และ mass spectrum ของโปรตีน Huwentoxin-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัวที่สังเคราะห์ได้ โดยที่ภาพ A และ B คือ linear HWTX-X ขณะที่ C, D, E คือ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R], Huwentoxin-X[K7R, K26R] และ Huwentoxin-X[K1R, K15R] ตามลำดับ

จากผลข้างต้นพบว่าพีคของเพปไทด์ (peptide peak) ที่ทำการสังเคราะห์ได้จากการใช้ wang resin เป็นวัฏภาคของแข็งทั้งที่เป็นโปรตีน HWTX-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว คือ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R], Huwentoxin-X[K7R, K26R] และ Huwentoxin-X[K1R, K15R] พบว่าเมื่อตรวจวัดความบริสุทธิ์แล้ว เพปไทด์ดังกล่าวจะใช้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ที่มีเวลา (retention time) ที่เท่ากันคือ 35 นาที แสดงได้ว่าโปรตีน HWTX-X ซึ่งเป็น native protein และอนุพันธ์ทั้งหมดที่มีการปรับเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในบางตำแหน่งเป็นกรดอาร์จินีน (Arg, R) มีสภาพขั้ว (polarity) ที่ใกล้เคียงกัน **แสดงดังภาพที่ 4.12** และนอกจากนี้จาก HPLC chromatogram ของเพปไทด์ทั้งหมดที่สังเคราะห์ได้ยังพบอีกว่ามีพีคของสิ่งเจือปนอื่นๆ (impurity peak) เกิดขึ้นอีกด้วย เนื่องจากว่าการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์ที่มีขนาดยาว (long chain) จะทำให้เกิดสารอื่นที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นได้ด้วย (by product) อาทิ การเกิดการหลุดหายของกรดอะมิโนภายในสายโซ่เพปไทด์ (deletion product) หรือสิ่งเจือปนต่างๆที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถเป็นหมู่ปกป้องสายโซ่ชนิดอื่นๆ (protecting group) ที่หลุดออกจากหลังจกขั้นตอนของการตัดเรซินก็เป็นไปได้ และเมื่อทำการยืนยันมวลโมเลกุลของโปรตีน HWTX-X ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS) ชนิด ESI-MS ซึ่งพบว่ามี molecular mass อยู่ที่ $1469.28 (M+2H)^{2+}$ และ $980.74 (M+3H)^{3+}$ ตามลำดับ ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับมวลโมเลกุล (molecular weight) ของโปรตีน HWTX-X ที่คำนวณได้เท่ากับ 2937 Da **โดยแสดงได้ดังภาพที่ 4.12B**

สำหรับ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 1) ที่ทำการแทนที่กรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) ในทุกตำแหน่งด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R) พบว่าเมื่อทำการยืนยันมวลโมเลกุล (molecular weight) ของสารด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS) ชนิด ESI-MS ผลที่ได้คือปรากฏว่าสารเพปไทด์ไม่สามารถแตกตัว (ionized) ได้ เนื่องจากอาจมีปัญหาจากเกลือ (salt) ที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์เพปไทด์ทำให้เกิดการบดบังหรือรบกวนการวิเคราะห์ซึ่งส่งผลทำให้ได้ผลแมสที่ไม่ชัดเจน จึงได้ทำการแก้ไขปัญหาด้วยการยืนยันผลจาก MALDI-TOF-MS แทนซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถทำให้เพปไทด์หรือโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่สามารถแตกตัวได้ดีมากขึ้น เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีการใช้พลังงาน (energy) ที่สูงในการทำให้เพปไทด์หรือโปรตีนเกิดการแตกตัว (ionized) **โดยแสดงผลดังภาพที่ 4.12C** ซึ่งจากผลที่ได้พบ molecular mass ของเพปไทด์อยู่ที่ 3048.1 Da ซึ่งสอดคล้องกับ molecular mass ที่คำนวณได้ของมวลโมเลกุล Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] คือ 3049.6 Da

และเมื่อทำการยืนยันมวลโมเลกุลของ Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 2) และ Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ตัวที่ 3) ที่ทำการสังเคราะห์ได้จากการแทนที่กรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) เพียง 2 ตำแหน่งด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg, R) ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass

spectrometry) ชนิด ESI-MS ก็ให้ผลเช่นเดียวกันคือ สารเปปไทด์ไม่สามารถแตกตัว (ionized) ได้ เนื่องจากมีปัญหาของการรบกวนจากเกลือ (salt) ดังนั้นจึงทำการยืนยันด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) ชนิด MALDI-TOF-MS ซึ่งพบว่า Huwentoxin-X[K7R, K26R] จะมี molecular mass อยู่ที่ 2993.8 Da ซึ่งสอดคล้องกับ molecular mass ที่คำนวณได้ของมวลโมเลกุล Huwentoxin-X[K7R, K26R] คือ 2993.6 Da แสดงได้ดังภาพที่ 4.12D และในขณะที่ Huwentoxin-X[K1R, K15R] ที่สังเคราะห์ได้จะพบว่ามี molecular mass อยู่ที่ 2993.4 Da ซึ่งสอดคล้องกับ molecular mass ที่คำนวณได้ของมวลโมเลกุล Huwentoxin-X[K1R, K15R] คือ 2993.6 Da ดังภาพที่ 4.12E

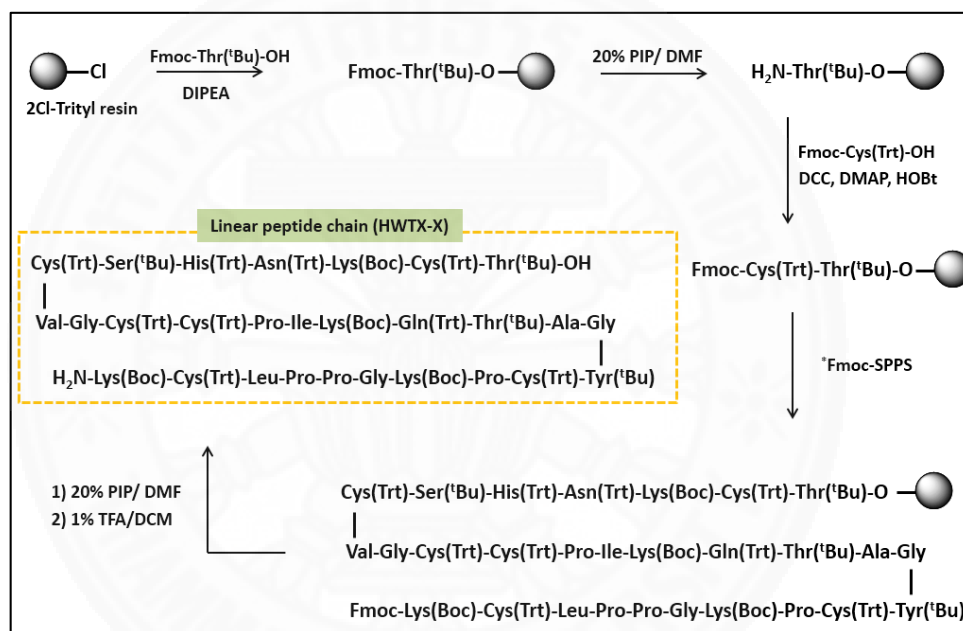
4.3 การสังเคราะห์ cyclic HWTX-X

โดยโปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) ที่พบในพิษของแมงมุม Chinese bird สายพันธุ์ *Ornithoctonus huwena* จะมีโครงสร้างที่เป็นเส้นตรง (linear peptide) ซึ่งจากการศึกษาจากงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง พบว่าโปรตีนที่มีลักษณะเป็นวง (cyclic peptide) จะมีความเสถียรที่มากกว่าโปรตีนที่เป็นเส้นตรง (linear peptide) อาทิ ความเสถียรทางความร้อน (thermal stability) และความเสถียรต่อเอนไซม์ (enzyme resistance) เป็นต้น³⁷⁻³⁸ ซึ่งจากความรู้ดังกล่าวในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง (protein re-engineering) ของโปรตีน Huwentoxin-X ที่เดิมมีลักษณะเป็นเส้นตรงให้อยู่ในรูปที่เป็นวง (cyclic HWTX-X) เพื่อจุดประสงค์ในการเพิ่มขีดความสามารถในการออกฤทธิ์และเพิ่มความเสถียร (stability) ของโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น โดยในการสังเคราะห์เปปไทด์ที่เป็นวง (cyclic HWTX-X) สามารถทำการสังเคราะห์ได้โดยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ที่เป็นเส้นตรง (linear peptide) ขึ้นมาก่อน ซึ่งจะใช้วิธีการสังเคราะห์เปปไทด์ด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis, SPPS) เช่นเดียวกับการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X แต่มีความแตกต่างกันในเรื่องชนิดของเรซินที่ใช้ในการสังเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ 2-คลอโรไทรทิล คลอไรด์เรซิน (2Cl-Triptyl chloride resin) เป็นเรซินที่ใช้ในการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ เนื่องจากมีข้อดีคือในขั้นตอนของการตัดสายโซ่เปปไทด์ออกจากเรซิน (cleavage step) สามารถใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงได้ (mild condition) อาทิ 1% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ในไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) ซึ่งจะส่งผลให้หมู่ปกป้องสายโซ่ (protecting

groups) ต่างๆยังคงอยู่ครบ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อขั้นตอนของการปิดวง (cyclization) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและไม่เกิดผลิตภัณฑ์อื่นๆ (side product)



ภาพที่ 4.13 ภาพแสดงลำดับกรดอะมิโนของ cyclic HWTX-X



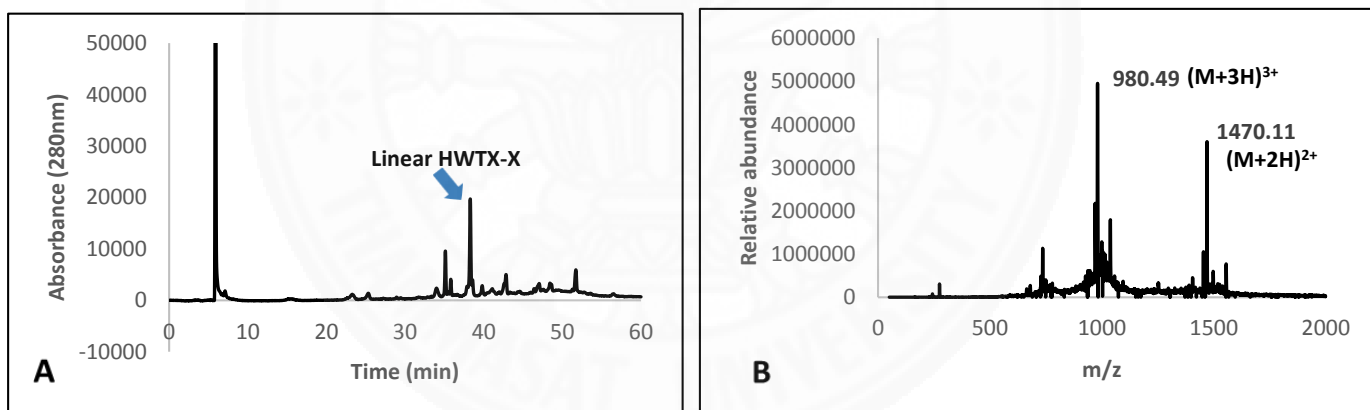
ภาพที่ 4.14 ภาพแสดงการสังเคราะห์โพรตีน cyclic HWTX-X ด้วยวิธีการ SPPS โดยใช้ 2Cl-Trityl chloride resin

โดยการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์จะตามวิธีการ 4.1.2 (วิธีการ B) ซึ่งแสดงภาพรวมของการสังเคราะห์ได้ดังภาพที่ 4.14 หลังจากทำการโหลดกรดอะมิโนตัวแรกแล้วสามารถคำนวณค่าของการโหลด (% amino acid loading) ได้มีค่าเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็น 0.46 mmol/g resin กล่าวคือใน 2Cl-Trityl chloride resin 1 กรัม จะมีปริมาณของ Fmoc-Thr(^tBu)-OH ที่ถูกโหลดลงบนเรซินเท่ากับ 0.46 มิลลิโมล โดยหลังจากการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์เสร็จสิ้น สายโซ่เพปไทด์จะถูกทำการตัดออกจากเรซินโดยใช้ 1% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ในไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, DCM) แล้วทำการตกตะกอนด้วยน้ำ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมี

ลักษณะเป็นตะกอนสีขาวหนัก 149.5 มิลลิกรัม หรือคิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 64 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์โดยการใช้ 2Cl-Trityl chloride resin เป็นวัฏภาคของแข็งจะให้ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ wang resin แสดงได้ว่าเรซินชนิดนี้มีประสิทธิภาพของในการทำปฏิกิริยาหรือมีความสามารถในการต่อกรดอะมิโน (amino acid assembly) ได้ดีกว่า

4.3.1 การตรวจวัดความบริสุทธิ์และการยืนยันมวลโมเลกุลเพปไทด์

หลังจากที่ทำการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์เสร็จแล้ว จะทำการตรวจวัดความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี analytical HPLC โดยนำตะกอนเพปไทด์มาละลายด้วยเมทานอล (methanol) แล้วนำไปเช็คความบริสุทธิ์ ซึ่งแสดงได้ดังภาพที่ 4.15 โดยจาก HPLC chromatogram ที่ได้พบว่ามีพีคของสารหลายพีคด้วยกัน เนื่องมาจากสายโซ่เพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้นั้นยังมีหมู่ปกป้องสายโซ่ (protecting group) ชนิดต่างๆอยู่บางส่วน จึงสามารถปรากฏเห็นได้เป็นหลายพีคดังกล่าว



ภาพที่ 4.15 ภาพแสดง HPLC chromatogram และ mass spectrum ของ linear HWTX-X ที่สังเคราะห์ได้จาก 2Cl-Trityl chloride resin โดยที่มี molecular mass หลังจากที่ได้ทำการกำจัดหมู่ปกป้องทั้งหมดออกแล้วเท่ากับ 2937 Da

นอกจากนี้เมื่อทำการยืนยันมวลโมเลกุลของเปปไทด์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS) ชนิด ESI-MS จะพบว่าสารเปปไทด์ไม่สามารถแตกตัวได้ (ionized) เนื่องจากสารเปปไทด์มีมวลโมเลกุลที่สูงมากและยังมีหมู่ปกป้องสายโซ่ (fully protecting group) อีกด้วย ดังนั้นจึงแก้ปัญหาด้วยการลองแบ่งสารมาทำการเอาหมู่ปกป้องทั้งหมดออก (deprotection) ด้วยการเติมสารละลายผสม (deprotection cocktail) ระหว่างไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) น้ำกลั่น (distilled water) อีเทนไดไทออล (ethanedithiol, EDT) และไตรไอโซโพรพิลไซเลน (triisopropylsilane, TIPS) ในอัตราส่วน 94:2.5:2.5:1 ซึ่งการใช้สภาวะดังกล่าวนี้จะสามารถทำให้หมู่ปกป้องทั้งหมดหลุดออกได้เนื่องจากการใช้ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ในปริมาณที่มาก จากนั้นนำตะกอนสีขาวของเปปไทด์ที่ได้นำไปเข้าแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) ชนิด ESI-MS อีกครั้ง โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับ linear HWTX-X ที่ทำการสังเคราะห์ในหัวข้อ 4.2 ซึ่งจากผลที่ได้พบว่ามี molecular mass อยู่ที่ 1470.11 (M+2H)²⁺ และ 980.49 (M+3H)³⁺ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.15B) ซึ่งพบว่ามีมวลสอดคล้องกับมวลโมเลกุล (molecular weight) ของโปรตีน HWTX-X ที่คำนวณได้เท่ากับ 2937 Da แสดงได้ว่าสายโซ่เปปไทด์ที่ทำการสังเคราะห์นั้นมีจำนวนของกรดอะมิโนภายในสายโซ่ครบตามที่ได้สังเคราะห์

4.3.2 การปิดวง (cyclization) และการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสายโซ่เปปไทด์ (linear peptide) ที่สังเคราะห์ได้ 10 มิลลิกรัม มาทำการปิดวง (cyclization) โดยที่สายโซ่เปปไทด์สามารถทำการปิดวงได้เลย กล่าวคือ ปลายสายโซ่ด้าน C เป็นหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl, -COOH) ซึ่งเป็นของกรดอะมิโนทรีโอนีน (Thr, T) และอีกปลายสายโซ่ด้าน N เป็นหมู่อะมิโน (amino, -NH₂) ซึ่งเป็นของกรดอะมิโนไลซีน (Lys, K) โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทางผู้วิจัยจะใช้สภาวะที่เป็น high dilution กล่าวคือ จะค่อยๆหยดสารละลาย HATU ครั้งละ 2 หยดในทุกๆเวลา 30 นาที ลงในปฏิกิริยา เพื่อป้องกันการเกิด intermolecular cyclization ของเปปไทด์ โดยเริ่มต้นด้วยการละลายเปปไทด์ด้วยไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide, DMF) แล้วเติมไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (diisopropylethylamine) หรือ DIPEA ลงไปแล้วทำการกวน (stir) สารละลาย ตามด้วยการค่อยๆหยดสารละลาย 1-(บิสไดเมทิลอะมิโนเมทิลีน)-1-ไฮโดรเจน-1,2,3-ไตรเอโซ(4,5-บี)พริดีเนียม-3-ออกไซด์เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต (1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate หรือ HATU จนหมด ซึ่งเป็นการทำการกระตุ้น (activation) ที่หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl, -COOH) จากนั้นจะเกิด intramolecular cyclization ทำให้ได้เป็น cyclic peptide

โดยทำการกวนปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารมาทำแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel) เป็นเฟสหยุดนิ่ง (stationary phase) และใช้เมทานอล:เอทิลอะซิเตต (MeOH:EtOAc) ในอัตราส่วน 6:4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งหลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วได้สารผลิตภัณฑ์ (cyclic peptide) เท่ากับ 7 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 70

4.3.3 การเอาหมู่ปกป้องทั้งหมดออก (global deprotection)

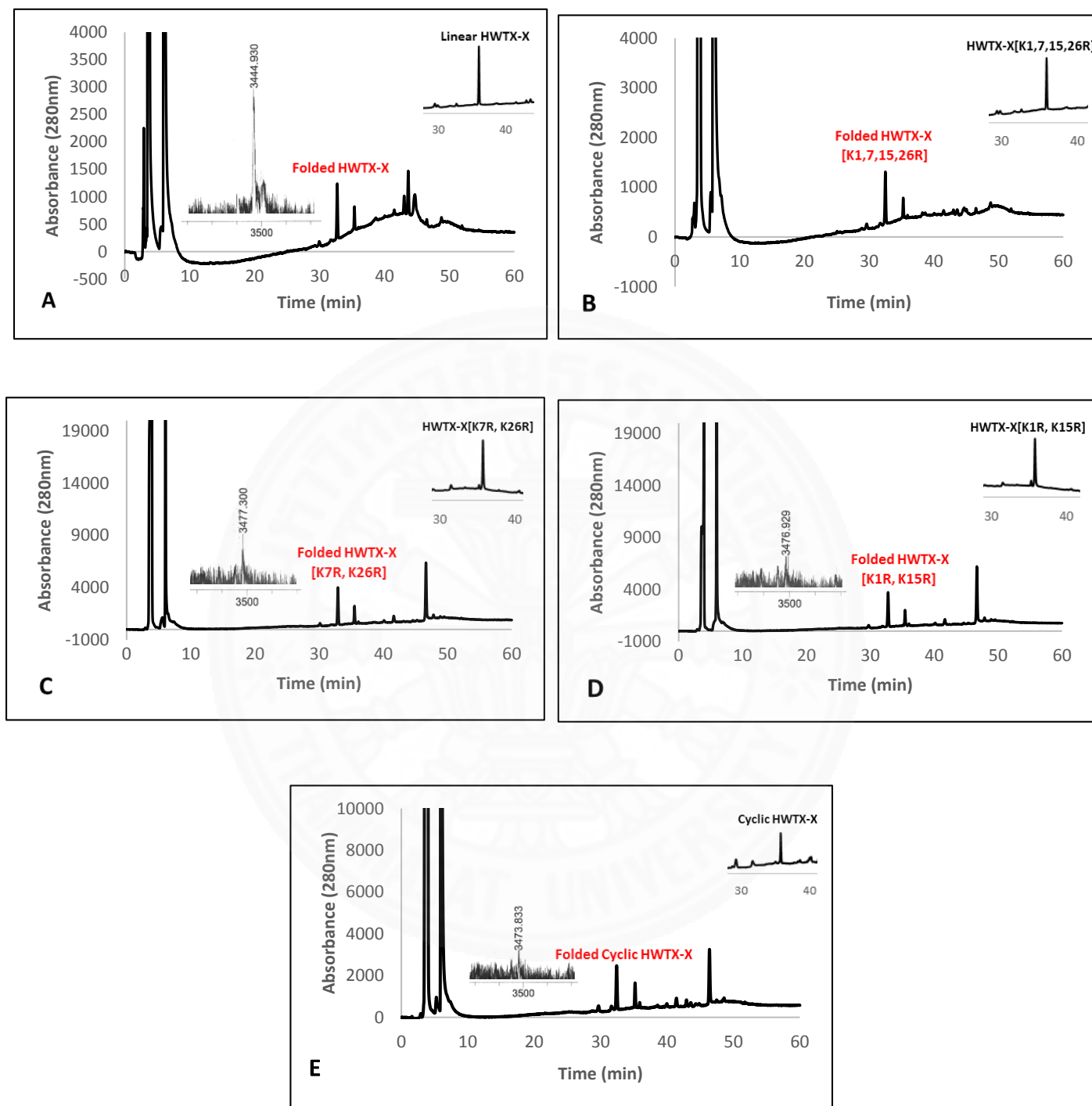
นำเปปไทด์ที่ผ่านการปิดวง (cyclic peptide) แล้วไปทำการเอาหมู่ปกป้องทั้งหมดออก (global deprotection) โดยเติมสารละลายผสม (deprotection cocktail) ระหว่างไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) น้ำกลั่น (distilled water) อีเทนไดไทโธล (ethanedithiol, EDT) และไตรไอโซโพรพิลไซเลน (triisopropylsilane, TIPS) ในอัตราส่วน 94:2.5:2.5:1 ซึ่งการใช้สภาวะที่เป็นกรด (acidic condition) นี้จะทำให้หมู่ปกป้องสายโซ่ อาทิ หมู่เทิร์ต-บิวทิล (*tert*-butyl, ^tBu) หมู่ไตรทิล (Trityl, Trt) และหมู่เทิร์ต-บิวทิลทอกซีคาร์บอนิล (*tert*-butyltoxicarbonyl, Boc) หลุดออกได้ง่าย หลังจากนั้นทำการตกตะกอนด้วยเทอเชียรีบิวทิล เมทิล อีเทอร์ (*tert*-butyl methyl ether) เย็นเพื่อกำจัดสิ่งเจือปน (impurity) ต่างๆออกทำให้เปปไทด์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งในขั้นต่อไปจะนำ cyclic HWTX-X ที่ทำการเอาหมู่ปกป้องออกแล้วทำ protein folding ต่อไป

4.4 การแยกให้บริสุทธิ์และการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน

โดยหลังจากที่ได้ทำการเช็คความบริสุทธิ์ของเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดแล้ว ในขั้นต่อไปคือการแยกเปปไทด์ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น (purification) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ถือได้ว่ามีความสำคัญมากเพราะว่าในขั้นตอนของการตัดสายโซ่เปปไทด์นั้นจะมีหมู่ปกป้องสายโซ่ชนิดต่างๆ (protecting group) หลุดออกมาด้วย รวมทั้งสารบางตัวที่ใช้ในการตัดสายโซ่เปปไทด์ อาทิ อีเทนไดไทโธล (ethanedithiol, EDT) ซึ่งสารชนิดนี้จะมีหมู่ไทโธล (thiol, -SH) ซึ่งสามารถเกิดพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ได้ โดยสิ่งเจือปนต่างๆเหล่านี้อาจส่งผลต่อการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนได้ ดังนั้นสารเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้จะต้องทำให้มีความบริสุทธิ์สูงก่อนการนำไปทำ protein folding เพื่อป้องกันการรบกวนจากสิ่งเจือปนอื่นๆ (impurity) ซึ่งในการแยกเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ไม่สามารถทำได้เนื่องจากสายโซ่

เพปไทด์ที่เป็น linear HWTX-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว จะมี polarity ที่สูงมากเนื่องจากมีหมู่ฟังก์ชันอิสระบนสายโซ่ (functional group) ของกรดอะมิโน อาทิ หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl, -OH) หมู่อะมิโน (-NH₂) รวมทั้งหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl, -COOH) เป็นต้น ซึ่งสามารถเกิดการสร้างพันธะกับหมู่ silanol, (-OH) บนซิลิกาเจล (silica gel) ได้ทำให้เกิดปัญหาของการติดเจลเกิดขึ้น อาจส่งผลให้เกิดการสูญหาย (loss) ของสารเพปไทด์ในระหว่างการแยกได้

ดังนั้นจึงได้เลือกใช้วิธีการแยกสารด้วยเทคนิค HPLC โดยนำเพปไทด์ทั้งที่เป็น linear HWTX-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว คือ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R], Huwentoxin-X[K7R, K26R] และ Huwentoxin-X[K1R, K15R] มาละลายด้วย 20% MeOH/H₂O แล้วนำไปแยกทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง preparative HPLC ซึ่งใช้หลักการของการแยกสารที่เหมือนกันกับ analytical HPLC แต่มีความแตกต่างในเรื่องของประสิทธิภาพที่สูงกว่า อาทิ สามารถแยกสารได้ในปริมาณที่มากกว่าเนื่องจากสามารถใช้คอลัมน์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (semi or preparative column) อีกทั้งยังมีอัตราการไหล (flow rate) ที่สามารถปรับได้สูงขึ้น ซึ่งจะช่วยให้การแยกสารมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น โดยการแยกจะใช้ C18 column (10 mm x 250 mm) ที่มีการแยกเป็นแบบ gradient mode โดยใช้สัดส่วนของอะซิโตรไนไตรล์ (ACN) คือ 15-70% อะซิโตรไนไตรล์ (ACN) ที่มี 0.1% กรดฟอร์มิก และใช้อัตราการไหล (flow rate) เป็น 3 มิลลิลิตรต่อนาที โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งการเติม 0.1% กรดฟอร์มิก (formic acid) ลงในสารละลาย mobile phase (ACN and H₂O) จะมีข้อดีคือจะช่วยให้โปรตอน (protonate) แก่หมู่ฟังก์ชันต่างๆบนสายโซ่เพปไทด์ ซึ่งบางหมู่ฟังก์ชันภายในสายโซ่อาจอยู่ในลักษณะที่เป็นประจุลบได้ อาทิ หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl, -COOH) ซึ่งการ protonate จะช่วยให้เกิดการแยกของเพปไทด์ได้ดีขึ้น เมื่อทำการแยกแล้วจะเก็บ peptide fraction ที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) จากนั้นเช็คความบริสุทธิ์ (purity) ของสารเพปไทด์ที่บริสุทธิ์แล้วด้วย analytical HPLC แสดงได้ดังภาพที่ 4.16 (ภาพบนขวา)



ภาพที่ 4.16 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของโปรตีนที่ทำการ fold แล้ว โดยที่ภาพบนขวา แสดงโปรตีนที่บริสุทธิ์แล้ว และภาพบนซ้ายแสดง MALDI-TOF spectrum ของโปรตีนที่ทำการ fold แล้ว ซึ่งภาพ A คือ linear HWTX-X ภาพ B, C, D คือ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R], Huwentoxin-X[K7R, K26R] และ Huwentoxin-X[K1R, K15R] ตามลำดับ ในขณะที่ภาพ E คือ cyclic HWTX-X

จากผลที่ได้จะพบว่าเมื่อทำการแยกเปปไทด์ที่สังเคราะห์ด้วย preparative HPLC แล้วจะทำให้สารเปปไทด์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น (ภาพบนขวา) โดยแสดงผลที่ได้เป็นพีกเดียว (single peak) ซึ่งในขั้นตอนต่อไปคือการนำเปปไทด์บริสุทธิ์ทั้งที่เป็นโปรตีน Huwentoxin-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว รวมถึง cyclic HWTX-X ที่ได้หลังจากการเอาหมู่ปกป้องทั้งหมดออก (global deprotection) ใน **ขั้นตอน 4.3.3** แล้ว ไปทำการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bridge) หรือทำ protein folding โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในสารละลาย 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 ที่มี 5 mM แอล-กลูต้าไธโอน รีดิวซ์ฟอร์ม (L-glutathione reduced form, GSH) และ 0.5 mM แอล-กลูต้าไธโอน ออกซิไดซ์ฟอร์ม (L-glutathione oxidized form, GSSG) ซึ่งการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เป็นเบสจะทำให้หมู่ thiol (-SH) บนกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys, C) ทั้ง 6 ตัวภายในโมเลกุลโปรตีนเกิดการแลกเปลี่ยนโปรตอน (H^+) โดยผ่านตัวกลางคือ แอล-กลูต้าไธโอน (L-glutathione) ทั้งสองฟอร์ม (reduced form (GSH) และ oxidized form (GSSG)) ทำให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในโมเลกุลโปรตีนในรูปแบบ C_1-C_4 , C_2-C_5 และ C_3-C_6 ตามลำดับ ซึ่งหากมีการสร้างพันธะพันธะไดซัลไฟด์ที่ผิดรูปแบบ (misfolding) จะสามารถสังเกตเห็นได้จากริ้วของตะกอนโปรตีนที่เกิดขึ้น โดยการตั้งปฏิกิริยาจะดำเนินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะทำการหยุดปฏิกิริยา (quenching) ด้วย 0.1% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ซึ่งจะทำให้ค่า pH ของสารละลายเปลี่ยนทำให้หยุดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนได้ จากนั้นจะทำการตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย analytical HPLC เพื่อสังเกตความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น **ดังภาพที่ 4.16**

จากผลของการทำ protein folding พบว่าเปปไทด์ที่สร้างพันธะไดซัลไฟด์แล้ว (folded peptide) จะใช้เวลาในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ (retention time) ที่เร็วขึ้น (32 นาที) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสายโซ่เปปไทด์ (linear peptide) ที่ยังไม่ได้ทำการ fold ซึ่งจะมีค่า retention time เท่ากับ 35 นาที เนื่องจาก folded protein จะมีความมีขั้ว (polarity) ที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจึงเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น ซึ่งจากรูปแบบพีกของการ fold พบว่าโปรตีน HWTX-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว จะมีรูปแบบของพีกที่มีการเคลื่อนที่ (shift) มาทางด้านหน้าที่เหมือนกัน และยังพบว่ามีสารตั้งต้นเปปไทด์ที่ยังไม่ได้ fold เหลืออยู่ด้วย ซึ่งอาจจะต้องเพิ่มระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาที่มากขึ้น อาทิ ใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้สมบูรณ์มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในกรณีของเปปไทด์ที่เป็นวง (cyclic HWTX-X) จะมีรูปแบบของการ fold ที่เหมือนกันกับโปรตีน HWTX-X ที่เป็นเส้นตรง (linear) อีกด้วย **แสดงได้ดังภาพที่ 4.16E**

และเมื่อทำการตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาแล้ว ในขั้นตอนต่อไปจะทำการแยกเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์แล้ว (folded protein) สำหรับนำไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป โดยการแยกนั้นจะใช้ preparative HPLC ที่มีการใช้สภาวะ

(condition) เดียวกันกับการแยกเพื่อทำให้เปปไทด์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แล้วทำการรวบเปปไทด์ที่แยกได้และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) หลังจากนั้นทำการยืนยันมวลโมเลกุล (molecular weight) ของโปรตีนที่ fold แล้ว ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS) ชนิด ESI-MS แต่ผลปรากฏว่าเปปไทด์ไม่สามารถแตกตัว (ionized) ได้ จึงทำให้เห็นผลไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงได้ทำการยืนยันมวลโมเลกุลด้วยเทคนิค MALDI-TOF-MS แทนโดยใช้ sinapic acid เป็น matrix

โดยจากการยืนยันมวลโมเลกุลของโปรตีน HWTX-X ที่ทำการ fold แล้วด้วยเทคนิค MALDI-TOF-MS จะพบว่ามี molecular mass ของ folded HWTX-X อยู่ที่ 3444.9 Da **แสดงได้ดังภาพที่ 4.16A** ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการคำนวณโดยที่มวลโมเลกุลของโปรตีน HWTX-X จะอยู่ในรูปของ adduct คือ 3445 Da ($M+GSH+H+sinapic\ acid-H_2O$) กล่าวคือ เมื่อโปรตีน HWTX-X ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 2937 Da เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) จะทำให้มวลโมเลกุลของโปรตีนลดลงไป 6 (จำนวนของโปรตอนที่หายไป 6 ตัว) ซึ่งเท่ากับ 2931 Da ซึ่งโปรตีนจะฟอร์มตัวอยู่ในรูปของ adduct กับกลูต้าไรโอน รีดิคัลฟอร์ม ซึ่งมาจากการทำ protein folding และฟอร์มตัวกับโปรตอนและกรดซินนาปิก (sinapic acid) ที่มาจากสาร matrix ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลด้วย MALDI-TOF-MS โดยพบว่าภายหลังจากการเกิด folding ได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 7 และในส่วนการยืนยันมวลโมเลกุลของ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 1) ที่ทำการ fold แล้วจะทำการยืนยันด้วยเทคนิค MALDI-TOF-MS ต่อไป

นอกจากนี้ในส่วนของการยืนยันมวลโมเลกุลของ Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 2) ที่ทำการ fold แล้ว จากผลที่ได้พบว่ามี molecular mass อยู่ที่ 3477.3 Da **แสดงได้ดังภาพที่ 4.16C** ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการคำนวณโดยที่มวลโมเลกุลของสาร Huwentoxin-X[K7R, K26R] จะอยู่ในรูปของ adduct คือ 3478 Da ($M+GSH+TFA+MeOH+K$) กล่าวคือ เมื่อโปรตีน Huwentoxin-X[K7R, K26R] ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 2993 Da เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) จะทำให้มวลโมเลกุลของโปรตีนลดลงไป 6 (จำนวนของโปรตอนที่หายไป 6 ตัว) ซึ่งเท่ากับ 2987 Da โดยโปรตีนจะฟอร์มตัวอยู่ในรูปของ adduct กับกลูต้าไรโอน รีดิคัลฟอร์ม ซึ่งมาจากขั้นตอนการทำ protein folding และฟอร์มตัวกับไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ซึ่งใช้ในการหยุดปฏิกิริยา (quenching) และเมทานอลซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายโปรตีน อีกทั้งยังมีโพแทสเซียม (K) ที่มาจากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF-MS โดยได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 5 และในส่วนของการยืนยันมวลโมเลกุลของ Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ตัวที่ 3) ที่ fold แล้ว จะพบว่ามี molecular mass อยู่ที่ 3476.9 Da **แสดงได้ดังภาพที่ 4.16D** โดยที่สาร Huwentoxin-X[K1R, K15R] จะมีการฟอร์มตัวอยู่ในรูปของ adduct คือ 3478 Da ($M+GSH+TFA+MeOH+K$) ที่มีลักษณะ

เดียวกันกับที่พบใน Huwentoxin-X[K7R, K26R] ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงเพราะว่าสาร Huwentoxin-X[K1R, K15R] และ Huwentoxin-X[K7R, K26R] มีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนที่เหมือนกันภายในโมเลกุลเพียงแต่มีความแตกต่างของตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine, R) เท่านั้น โดยได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 7

นอกจากนี้การยืนยันมวลโมเลกุลของ cyclic HWTX-X ที่ fold แล้ว ด้วยเทคนิค MALDI-TOF-MS จะพบว่า molecular mass อยู่ที่ 3473.8 Da แสดงได้ดังภาพที่ 4.16E ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการคำนวณโดยที่มวลโมเลกุลโปรตีนจะอยู่ในรูปของ adduct คือ 3476 Da (M+GSH+sinapic acid+MeOH+H) กล่าวคือ เมื่อโปรตีน cyclic HWTX-X ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 2919 Da เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) จะทำให้มวลโมเลกุลของโปรตีนลดลงไป 6 (จำนวนของโปรตอนที่หายไป 6 ตัว) ซึ่งเท่ากับ 2913 Da โดยโปรตีนจะสามารถฟอร์มตัวอยู่ในรูปของ adduct กับกลูต้าไธโอน ริติวซ์ฟอร์ม ซึ่งมาจากการทำ protein folding และฟอร์มตัวกรดซินนาปิก (sinapic acid) ที่มาจากสาร matrix ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลด้วย MALDI-TOF-MS และยังมีฟอร์มตัวกับเมทานอลซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายโปรตีนและโปรตอนอีกด้วย โดยได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 9

4.5 การปรับสภาวะ (condition) ของการทำ protein folding

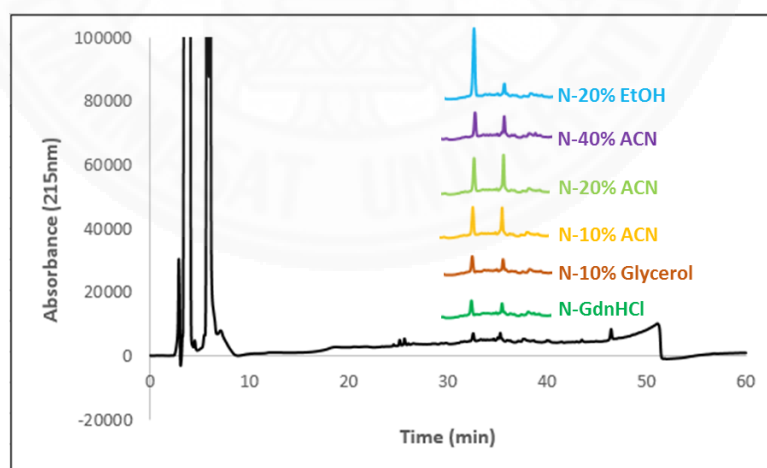
ในงานวิจัยนี้ได้ยังทำการศึกษาหาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมในการทำ protein folding เพื่อใช้ในการพัฒนาการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป เนื่องจาก condition เดิมที่ใช้นั้นพบว่า เมื่อทำการแยกสารเพปไทด์ด้วย preparative HPLC แล้ว ผลที่ได้คือจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (folded peptide) ในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ที่ผิดแบบ (misfolded peptide) ของโปรตีน ดังนั้นการปรับสภาวะ (adjust condition) จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องศึกษาเพิ่มเติม โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการปรับ condition เป็นดังนี้

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงการปรับสภาวะ (condition) ที่มีการใช้ additive ที่แตกต่างกันในการทำ protein folding

Condition	Buffer condition ^a	Additive	Temperature (°C)
1	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	-	4
2	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	1M GdnHCl	4
3	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	10% Glycerol	4
4	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	20% EtOH	4
5	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	10% ACN	4
6	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	20% ACN	4
7	0.4 M Tris-HCl (pH 8.0)	40% ACN	4

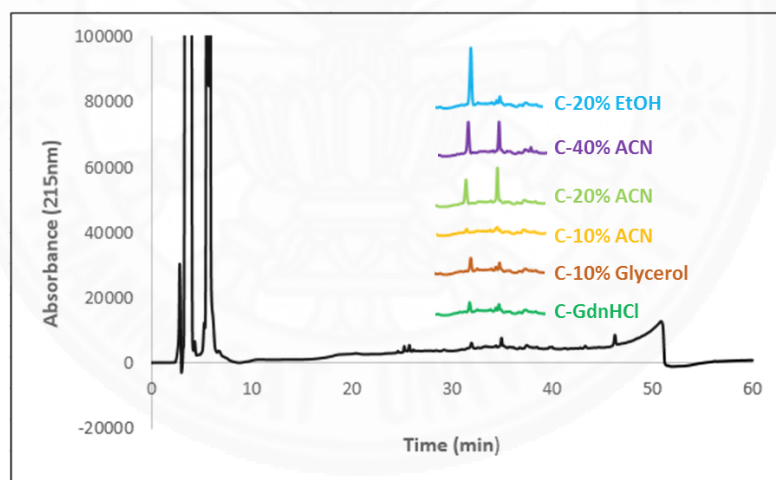
^afolding condition ยังประกอบไปด้วย 1 mM EDTA, 2.5 mM GSH และ 0.25 mM GSSG

ซึ่งการศึกษาการปรับสภาวะนั้นได้ศึกษาโปรตีนทั้งที่เป็น linear HWTX-X และ cyclic HWTX-X โดยทำการละลายโปรตีน HWTX-X ในสภาวะ (condition) ต่างๆดังกล่าวที่มีการเติมสารเติมแต่ง (additive) ที่แตกต่างกัน แล้วปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) แล้วนำไปตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย analytical HPLC ซึ่งแสดงผลได้ดังนี้



ภาพที่ 4.17 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของ linear HWTX-X ที่ทำการปรับสภาวะต่างๆ โดยที่เส้นสีดำคือ สภาวะที่ไม่ใช้สารเติมแต่ง (no additive)

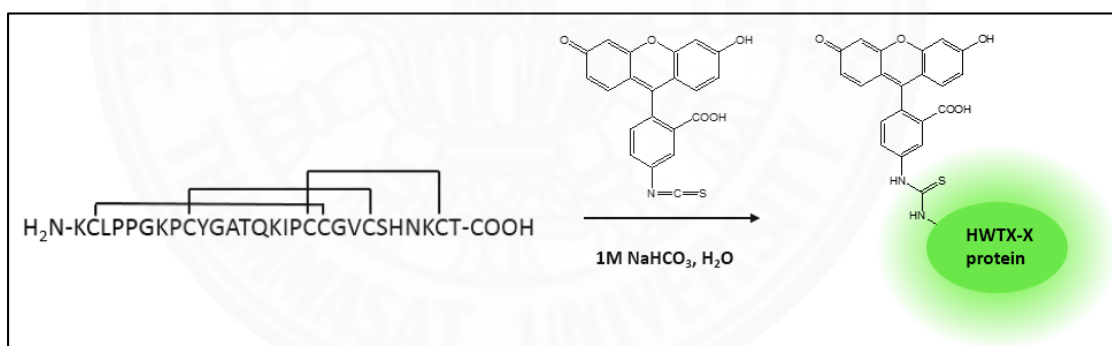
จากผลที่ได้พบว่าการปรับสภาวะ (condition) ของการทำ protein folding ใน linear HWTX-X จะได้สภาวะที่ดีที่สุดและเหมาะสมที่สุดคือ 0.4 M Tris-HCl (pH 8.0) ที่มี 1 mM เอทาลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid) หรือ EDTA, 2.5 mM แอล-กลูต้าไรโอน รีดิวซ์ฟอร์ม (L-glutathione reduced form, GSH), 0.25 mM แอล-กลูต้าไรโอน ออกซิไดซ์ฟอร์ม (L-glutathione oxidized form, GSSG) และใช้สารเติมแต่ง (additive) คือ 20% เอทานอล (EtOH) โดยจะเห็นได้จากความสูงของพีคของ folded peptide ในนาที่ที่ 32 ที่สูงที่สุดซึ่งแสดงได้ว่าเพปไทด์มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้ดีในสภาวะนี้ และสภาวะที่ตรงลงมาคือการใช้อะซิโตรไนไตรล์ (ACN) เป็น additive ในขณะที่การไม่ใช้สารเติมแต่ง (no additive) เลย (เส้นสีดำ) จะมีความสูงของพีคของการ folding ที่ต่ำมาก และในกรณีของการปรับสภาวะ (condition) ของสารเพปไทด์ที่เป็นวง (cyclic HWTX-X) พบว่าจะให้ผลของการทำ protein folding ที่คล้ายกันกับสารเพปไทด์ที่เป็นเส้นตรง (linear HWTX-X) กล่าวคือสภาวะที่ดีที่สุดและเหมาะสมมากที่สุดในการทำ protein folding คือการใช้สารเติมแต่ง (additive) เป็น 20% เอทานอล (EtOH) แสดงได้ดังภาพที่ 4.18



ภาพที่ 4.18 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของ cyclic HWTX-X ที่ทำการปรับสภาวะต่างๆ โดยที่เส้นสีดำคือ สภาวะที่ไม่ใช้สารเติมแต่ง (no additive)

4.6 การติดสารเรืองแสง (Fluorescent labeling) กับโปรตีน Huwentoxin-X

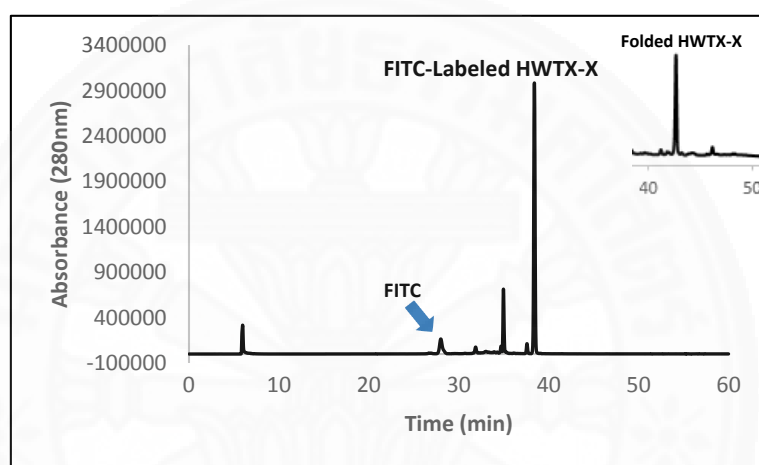
ในปัจจุบันนี้สารเรืองแสง (fluorescence) ถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลายด้วยกัน อาทิ การใช้ในการเป็นตัวตรวจจับ (sensor) ไอออนของโลหะหนัก และการใช้ในการติดตามความเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดขึ้นภายในเซลล์รวมถึงการใช้ประโยชน์ทางด้านการถ่ายภาพเชิงชีวภาพ (bio-imaging application) ด้วยข้อดีดังกล่าวในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการติดสารเรืองแสง (fluorescent labeling) เข้ากับโปรตีน HWTX-X เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษากลไกการจับตัว (mechanism of action) ระหว่างโปรตีน HWTX-X กับไอออนชั้นแนล (ion channel) ในอนาคต โดยจากโครงสร้างของโปรตีน HWTX-X พบว่าจะมีกรดอะมิโนที่มีชื่อว่า กรดอะมิโนไลซีน (Lysine, K) ที่มีสายโซ่ (side chain) เป็นหมู่อะมิโน (-NH₂) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาในการติด (labeling) กับสารเรืองแสงได้ โดยในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ 5-ฟลูออเรซินไอโซไทโอไซยาเนต (5-fluorescein isothocyanate) หรือ FITC มาทำการติดกับเพปไทด์ (labeling) เนื่องจากสารเรืองแสงชนิดนี้มีความสามารถในการเรืองแสงที่ดี (highly fluorescence intensity) และมีค่า quantum yield ที่สูง



ภาพที่ 4.19 ภาพแสดงสมการของการติดสารเรืองแสง (FITC) เข้ากับโปรตีน HWTX-X

โดยขั้นตอนในการติดสารเรืองแสงจะเริ่มต้นด้วยการปิเปต (pipette) สารละลายโปรตีน HWTX-X ลงใน eppendorf tube ตามด้วยการเติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogencarbonate) หรือ NaHCO₃ (pH 9) แล้วใส่สารละลาย 5-ฟลูออเรซินไอโซไทโอไซยาเนต (5-fluorescein isothocyanate) หรือ FITC และน้ำ (DI) ตามลำดับ หลังจากนั้นตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4.19 โดยในสภาวะที่เป็นเบสนั้นสายโซ่ (side chain) ที่เป็นหมู่อะมิโน (-NH₂) ของกรดอะมิโนไลซีนจะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไทโอไซยาเนต (-N=C=S) ของ

สารเรืองแสง FITC ทำให้เกิดการติดสารเรืองแสง (labeling) ลงบนโมเลกุลของโปรตีน HWTX-X ได้ และเมื่อครบเวลาแล้วจะทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ลงไปเพื่อปรับสถานะให้เป็นกลาง แล้วทำการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย analytical HPLC ที่ความยาวคลื่น 215 และ 280 นาโนเมตร เพื่อสังเกตความเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยทำการเปรียบเทียบพีคของโปรตีน HWTX-X ทั้งก่อนและหลังทำการติดสารเรืองแสง FITC โดยแสดงได้ดังภาพที่ 4.20



ภาพที่ 4.20 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของ native HWTX-X ที่ได้ทำการติดด้วยสารเรืองแสง (FITC)

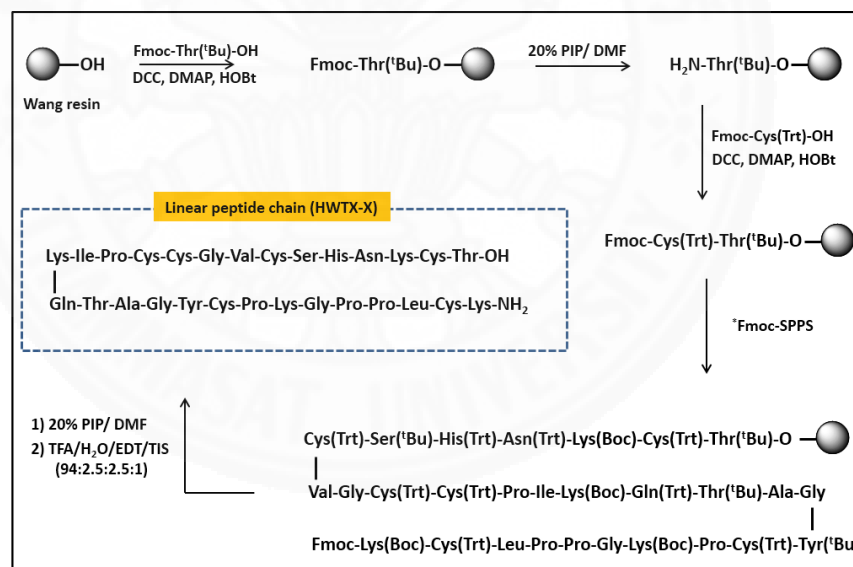
โดยจากผลพบว่าโปรตีน HWTX-X ที่ติดกับสารเรืองแสง (FITC) แล้วจะใช้เวลาในการเคลื่อนที่ (retention time) ออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้นที่เวลา 38 นาที เมื่อเทียบกับโปรตีน HWTX-X ที่ยังไม่ได้ติดสารเรืองแสง (42 นาที) ดังภาพที่ 4.20 ภาพบนขวา แสดงได้ว่าเมื่อโปรตีน HWTX-X ติดกับสารเรืองแสง FITC แล้วจะมี polarity ที่เพิ่มขึ้นทำให้สามารถเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น ซึ่งในการติดสารเรืองแสง (FITC) กับโปรตีน HWTX-X นี้จะพบว่าสามารถเกิดการติด (labeling) ได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีน HWTX-X จะประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีน (Lysine, K) ถึง 4 ตัว ดังนั้นจึงทำการเก็บพีคของเพปไทด์ที่ได้จากการแยกด้วย analytical HPLC ไปทำการยืนยันมวลโมเลกุล (molecular weight) ของโปรตีนที่ทำการติดสารเรืองแสงแล้ว (FITC-labeled HWTX-X) ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) ชนิด MALDI-TOF-MS เพื่อหาจำนวนของสารเรืองแสง (FITC) ที่ติดกับโปรตีน HWTX-X ต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 การสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X และอนุพันธ์

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนที่มีชื่อว่า Huwentoxin-X (HWTX-X) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้ในพิษของแมงมุม Chinese bird สายพันธุ์ *Ornithoctonus huwena* โดยโครงสร้างของโปรตีนจะประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 28 ตัว และมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) 3 พันธะ โดยจัดเรียงตัวในรูปแบบ C₁-C₄, C₂-C₅ และ C₃-C₆ ตามลำดับ และแสดงค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 2937 Da ในงานวิจัยชิ้นนี้ทำการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X) โดยใช้วิธีการสังเคราะห์สายโซ่เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง (solid phase peptide synthesis, SPPS) ซึ่งใช้ wang resin ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคของแข็ง และใช้วิธีการสังเคราะห์แบบ Fmoc strategy จากการสังเคราะห์ที่ได้อะยละของผลิตภัณฑ์ที่ประมาณ 42



ภาพที่ 5.1 ภาพแสดงการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X (HWTX-X)

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้ให้ความสนใจในการสังเคราะห์อนุพันธ์ (derivative) ของโปรตีน HWTX-X อีก 3 ตัว เพื่อพัฒนาและเปรียบเทียบความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนต่อไป โดยในขั้นตอนของการออกแบบการสังเคราะห์จะทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ อาทิ การเปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 28, 29 และ 34 ในโมเลกุลของโปรตีน Huwentoxin-IV ซึ่ง

มีการรายงานว่าการเปลี่ยนตำแหน่งดังกล่าวจะสามารถเพิ่มขีดความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้ง sodium channel ของหนูโตเต็มวัยได้²¹

ในขั้นตอนของการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ HWTX-X จะใช้วิธีการสังเคราะห์เช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์โปรตีน HWTX-X โดยใช้ wang resin ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคของแข็ง แต่สิ่งที่แตกต่างคือ จะทำการปรับเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนภายในโมเลกุล HWTX-X ด้วยวิธีการ mutagenesis โดยการแทนที่กรดอะมิโนไลซีน (Lys) ด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg) ในสายโซ่เพปไทด์ โดยที่อนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว ที่ทำการสังเคราะห์จะมีการแทนที่กรดอะมิโนในตำแหน่งที่แตกต่างกันออกไปดังนี้ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 1) จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg) ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ซึ่งแสดงค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 3049 Da ในขณะที่ Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 2) และ Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ตัวที่ 3) จะมีการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg) เพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้นซึ่งมีมวลโมเลกุลที่เท่ากันคือ 2993 Da โดยพบว่าการสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว มีร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ดีโดยแสดงค่าเท่ากับ 38, 37 และ 38 ตามลำดับ

โดยจากการยืนยันความบริสุทธิ์ของโปรตีน Huwentoxin-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัวที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้ analytical HPLC พบว่าโปรตีน Huwentoxin-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว จะใช้เวลาในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ (retention time) ที่เท่ากันคือ 35 นาที ซึ่งแสดงว่าโปรตีน Huwentoxin-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัว ที่สังเคราะห์นั้นมีความมีขั้ว (polarity) ที่เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบอีกว่าหลังจากการทำ protein folding พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า retention time เกิดขึ้น โดยพบว่า folded Huwentoxin-X และอนุพันธ์แสดงค่า retention time ที่ 32 นาที นอกจากนี้มวลโมเลกุล (molecular weight) ของ Huwentoxin-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัวถูกยืนยันโดยใช้เทคนิคทาง mass spectrometry ทั้ง MALDI-MS และ ESI-MS โดย Huwentoxin-X และอนุพันธ์ทั้ง 3 ตัวแสดงค่ามวลโมเลกุลที่สอดคล้อง

5.2 การสังเคราะห์ cyclic HWTX-X

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังสนใจในการศึกษาทางด้าน protein-engineering โดยทำการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X ให้อยู่ในลักษณะที่เป็นวง (cyclic HWTX-X) เนื่องจากสารที่เป็น cyclic จะมีข้อดีที่สามารถช่วยเพิ่มความเสถียรของเพปไทด์ได้ อาทิ การทนต่อความร้อน (thermal stability) และการทนต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ (enzyme resistance) ดังที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้า

นี้ โดยในการสังเคราะห์สายโซ่เปปไทด์ของ cyclic Huwentoxin ยังคงใช้วิธีการ Fmoc solid phase peptide synthesis เช่นเดียวกับวิธีแรกแต่สิ่งที่แตกต่างกันคือ มีการปรับเปลี่ยนการใช้ solid support จาก wang resin มาเป็น 2Cl-Trityl chloride resin เป็น solid support โดยพบว่าหลังจากการสังเคราะห์ที่ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์เท่ากับ 64 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ที่สูงกว่า โดยเมื่อทำการสังเคราะห์สารเปปไทด์ที่เป็นวงแล้ว (cyclic HWTX-X) จะผ่านกระบวนการ protein folding ซึ่ง cyclic Huwentoxin ที่ได้จะมีจำนวนพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ที่เท่ากับ native Huwentoxin X นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์แล้ว retention time ของ cyclic Huwentoxin X จะมีการเคลื่อนที่ (shift) ที่เร็วขึ้นที่เวลา 32 นาที ซึ่งเป็นแนวทางเดียวกันกับ native Huwentoxin โดยในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ native Huwentoxin และ cyclic Huwentoxin จะใช้เทคนิค high performance liquid chromatography และการยืนยันมวลโมเลกุล (molecular weight) โดยใช้เทคนิคทาง mass spectrometry อาทิ ESI-MS และ MALDI-TOF spectrometer

5.3 การปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ protein folding และการติดสารเรืองแสง

นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้มีการศึกษาการปรับเปลี่ยนสภาวะ (condition) ของการทำ protein folding หรือการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในโมเลกุลของทั้ง cyclic Huwentoxin และ native Huwentoxin ที่สังเคราะห์ขึ้น เพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุดและเหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดผลิตภัณฑ์ทั้ง cyclic Huwentoxin และ native Huwentoxin ที่สูงขึ้น โดยจากการศึกษาโปรตีน Huwentoxin-X ทั้งที่เป็นเส้นตรง (linear) และที่เป็นวง (cyclic) พบว่าสภาวะที่มีการเติมสารเติมแต่ง (additive) มีความสำคัญในการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) โดยพบว่าสารเติมแต่งที่ทำให้เปปไทด์เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้ดีที่สุดคือ 20% เอทานอล ใน 0.4 M Tris-HCl (pH 8.0) ที่มี 1 mM เอทาลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid) หรือ EDTA, 2.5 mM แอล-กลูต้าไธโอน รีดิวซ์ฟอร์ม (L-glutathione reduced form, GSH), 0.25 mM แอล-กลูต้าไธโอน ออกซิไดซ์ฟอร์ม (L-glutathione oxidized form, GSSG) และนอกจากนี้การติดสารเรืองแสง (fluorescently label) เข้ากับโปรตีน HWTX-X สามารถทำได้อย่างประสบความสำเร็จเพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางด้าน bio-imaging application ต่อไป

5.4 ข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ประสบผลสำเร็จในการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์โปรตีน Huwentoxin-X และอนุพันธ์ (derivatives) รวมทั้งการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีน (re-engineering HWTX-X) อาทิ การสังเคราะห์ cyclic Huwentoxin และการทำ mutagenesis เพื่อใช้ในการศึกษาและพัฒนาความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ อาทิ การออกฤทธิ์ยับยั้ง receptor ของ protease หรือ ion channel ชนิดต่างๆ เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ในการใช้ประโยชน์ทางด้านการพัฒนา ยาที่เป็นโปรตีน (peptide-based drugs) อาทิ การรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับอาการปวด (neurophatic pain) เป็นต้น โดยผลิตภัณฑ์ได้ทั้ง native Huwentoxin และ cyclic Huwentoxin รวมทั้ง mutated Huwentoxin จะถูกนำไปทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivity) ต่อไปในอนาคต



รายการอ้างอิง

1. Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D., The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des* 2013, 81 (1), 136-47.
2. Mouhat, S.; Jouirou, B.; Mosbah, A.; De Waard, M.; Sabatier, J. M., Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J* 2004, 378 (Pt 3), 717-26.
3. Daly, N. L.; Rosengren, K. J.; Craik, D. J., Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Adv Drug Deliv Rev* 2009, 61 (11), 918-30.
4. Durek, T.; Craik, D. J., Therapeutic conotoxins: a US patent literature survey. *Expert Opin Ther Pat* 2015, 25 (10), 1159-73.
5. King, G. F.; Hardy, M. C., Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. *Annu Rev Entomol* 2013, 58, 475-96.
6. Quintero-Hernandez, V.; Jimenez-Vargas, J. M.; Gurrola, G. B.; Valdivia, H. H.; Possani, L. D., Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* 2013, 76, 328-42.
7. King, G. F., Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2011, 11 (11), 1469-84.
8. de Lera Ruiz, M.; Kraus, R. L., Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem* 2015, 58 (18), 7093-118.
9. Murray, J. K.; Ligutti, J.; Liu, D.; Zou, A.; Poppe, L.; Li, H.; Andrews, K. L.; Moyer, B. D.; McDonough, S. I.; Favreau, P.; Stocklin, R.; Miranda, L. P., Engineering potent and selective analogues of GpTx-1, a tarantula venom peptide antagonist of the Na_v1.7 sodium channel. *J Med Chem* 2015, 58 (5), 2299-314.
10. Catterall, W. A., Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000, 16, 521-55.
11. Liu, Z.; Dai, J.; Dai, L.; Deng, M.; Hu, Z.; Hu, W.; Liang, S., Function and solution structure of Huwentoxin-X, a specific blocker of N-type calcium channels, from the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*. *J Biol Chem* 2006, 281 (13), 8628-35.

12. Liang, S., An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. *Toxicon* 2004, 43 (5), 575-85.
13. Bogdanowich-Knipp, S. J.; Chakrabarti, S.; Williams, T. D.; Dillman, R. K.; Siahaan, T. J., Solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. *J Pept Res* 1999, 53 (5), 530-41.
14. Liang, S. P.; Zhang, D. Y.; Pan, X.; Chen, Q.; Zhou, P. A., Properties and amino acid sequence of huwentoxin-I, a neurotoxin purified from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *Toxicon* 1993, 31 (8), 969-78.
15. Shu, Q.; Liang, S. P., Purification and characterization of huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J Pept Res* 1999, 53 (5), 486-91.
16. Peng, K.; Chen, X. D.; Liang, S. P., The effect of Huwentoxin-I on Ca²⁺ channels in differentiated NG108-15 cells, a patch-clamp study. *Toxicon* 2001, 39 (4), 491-8.
17. Shu, Q.; Lu, S. Y.; Gu, X. C.; Liang, S. P., The structure of spider toxin huwentoxin-II with unique disulfide linkage: evidence for structural evolution. *Protein Sci* 2002, 11 (2), 245-52.
18. Peng, K.; Shu, Q.; Liu, Z.; Liang, S., Function and solution structure of huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium channel antagonist from Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J Biol Chem* 2002, 277 (49), 47564-71.
19. Zhang, P. F.; Chen, P.; Hu, W. J.; Liang, S. P., Huwentoxin-V, a novel insecticidal peptide toxin from the spider *Selenocosmia huwena*, and a natural mutant of the toxin: indicates the key amino acid residues related to the biological activity. *Toxicon* 2003, 42 (1), 15-20.
20. Xiao, Y.; Bingham, J. P.; Zhu, W.; Moczydlowski, E.; Liang, S.; Cummins, T. R., Tarantula huwentoxin-IV inhibits neuronal sodium channels by binding to receptor site 4 and trapping the domain ii voltage sensor in the closed configuration. *J Biol Chem* 2008, 283 (40), 27300-13.

21. Deng, M.; Luo, X.; Jiang, L.; Chen, H.; Wang, J.; He, H.; Liang, S., Synthesis and biological characterization of synthetic analogs of Huwentoxin-IV (Mu-theraphotoxin-Hh2a), a neuronal tetrodotoxin-sensitive sodium channel inhibitor. *Toxicon* 2013, 71, 57-65.
22. Gongora-Benitez, M.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F., Multifaceted roles of disulfide bonds. Peptides as therapeutics. *Chem Rev* 2014, 114 (2), 901-26.
23. Northfield, S. E.; Wang, C. K.; Schroeder, C. I.; Durek, T.; Kan, M. W.; Swedberg, J. E.; Craik, D. J., Disulfide-rich macrocyclic peptides as templates in drug design. *Eur J Med Chem* 2014, 77, 248-57.
24. D'Souza, C.; Henriques, S. T.; Wang, C. K.; Cheneval, O.; Chan, L. Y.; Bokil, N. J.; Sweet, M. J.; Craik, D. J., Using the MCoTI-II Cyclotide Scaffold To Design a Stable Cyclic Peptide Antagonist of SET, a Protein Overexpressed in Human Cancer. *Biochemistry* 2016, 55 (2), 396-405.
25. Akondi, K. B.; Muttenthaler, M.; Dutertre, S.; Kaas, Q.; Craik, D. J.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F., Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins. *Chem Rev* 2014, 114 (11), 5815-47.
26. Terlau, H.; Olivera, B. M., Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol Rev* 2004, 84 (1), 41-68.
27. Miljanich, G. P., Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem* 2004, 11 (23), 3029-40.
28. Zorzi, A.; Deyle, K.; Heinis, C., Cyclic peptide therapeutics: past, present and future. *Curr Opin Chem Biol* 2017, 38, 24-29.
29. Klinker, K. P.; Borgert, S. J., Beyond Vancomycin: The Tail of the Lipoglycopeptides. *Clin Ther* 2015, 37 (12), 2619-36.
30. Nicolaou, K. C.; Boddy, C. N.; Brase, S.; Winssinger, N., Chemistry, Biology, and Medicine of the Glycopeptide Antibiotics. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999, 38 (15), 2096-2152.
31. Craik, D. J.; Daly, N. L.; Bond, T.; Waine, C., Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J Mol Biol* 1999, 294 (5), 1327-36.

32. Craik, D. J.; Daly, N. L.; Waine, C., The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* 2001, 39 (1), 43-60.
33. Tam, J. P.; Lu, Y. A.; Yang, J. L.; Chiu, K. W., An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96 (16), 8913-8.
34. Wang, C. K.; Colgrave, M. L.; Gustafson, K. R.; Ireland, D. C.; Goransson, U.; Craik, D. J., Anti-HIV cyclotides from the Chinese medicinal herb *Viola yedoensis*. *J Nat Prod* 2008, 71 (1), 47-52.
35. Hernandez, J. F.; Gagnon, J.; Chiche, L.; Nguyen, T. M.; Andrieu, J. P.; Heitz, A.; Trinh Hong, T.; Pham, T. T.; Le Nguyen, D., Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochemistry* 2000, 39 (19), 5722-30.
36. Halai, R.; Callaghan, B.; Daly, N. L.; Clark, R. J.; Adams, D. J.; Craik, D. J., Effects of cyclization on stability, structure, and activity of alpha-conotoxin Rg1A at the alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor and GABA(B) receptor. *J Med Chem* 2011, 54 (19), 6984-92.
37. Cemazar, M.; Kwon, S.; Mahatmanto, T.; Ravipati, A. S.; Craik, D. J., Discovery and applications of disulfide-rich cyclic peptides. *Curr Top Med Chem* 2012, 12 (14), 1534-45.
38. Clark, R. J.; Akcan, M.; Kaas, Q.; Daly, N. L.; Craik, D. J., Cyclization of conotoxins to improve their biopharmaceutical properties. *Toxicon* 2012, 59 (4), 446-55.
39. Bagal, S. K.; Brown, A. D.; Cox, P. J.; Omoto, K.; Owen, R. M.; Pryde, D. C.; Sidders, B.; Skerratt, S. E.; Stevens, E. B.; Storer, R. I.; Swain, N. A., Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective. *J Med Chem* 2013, 56 (3), 593-624.
40. Catterall, W. A.; Goldin, A. L.; Waxman, S. G., International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005, 57 (4), 397-409.

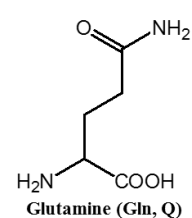
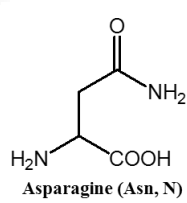
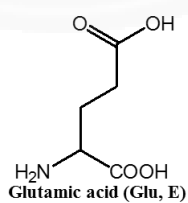
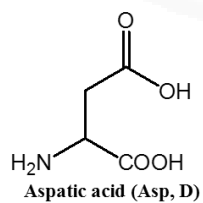
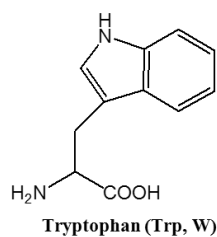
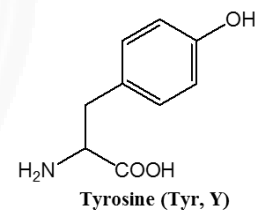
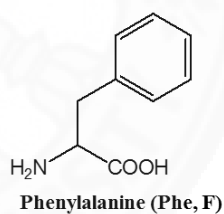
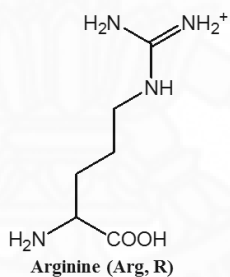
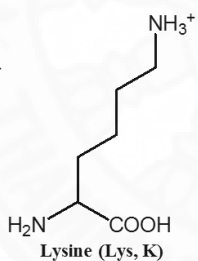
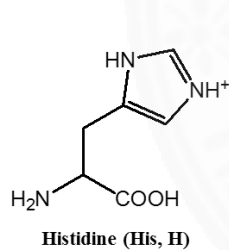
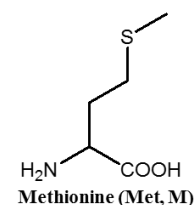
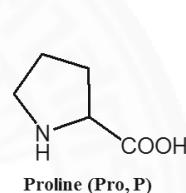
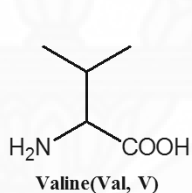
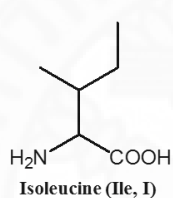
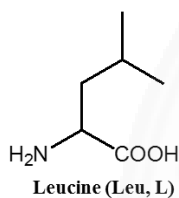
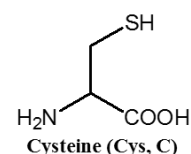
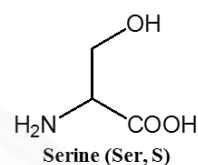
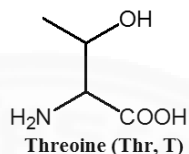
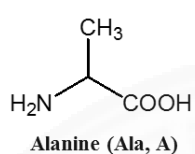
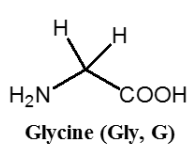
41. Park, J. H.; Carlin, K. P.; Wu, G.; Ilyin, V. I.; Musza, L. L.; Blake, P. R.; Kyle, D. J., Studies examining the relationship between the chemical structure of protoxin II and its activity on voltage gated sodium channels. *J Med Chem* 2014, 57 (15), 6623-31.
42. Catterall, W. A.; Perez-Reyes, E.; Snutch, T. P.; Striessnig, J., International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005, 57 (4), 411-25.
43. Simms, B. A.; Zamponi, G. W., Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron* 2014, 82 (1), 24-45.
44. Altier, C.; Zamponi, G. W., Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends Pharmacol Sci* 2004, 25 (9), 465-70.
45. Palomo, J. M., Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Advances* 2014, 4 (62), 32658-32672.
46. Schnolzer, M.; Alewood, P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S. B., In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. *Int J Pept Protein Res* 1992, 40 (3-4), 180-93.
47. Coin, I.; Beyermann, M.; Bienert, M., Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat Protoc* 2007, 2 (12), 3247-56.
48. Kragol, G.; Lumbierres, M.; Palomo, J. M.; Waldmann, H., Solid-phase synthesis of lipidated peptides. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004, 43 (43), 5839-42.
49. Wang, S. S., p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J Am Chem Soc* 1973, 95 (4), 1328-33.
50. Pedersen, S. L.; Tofteng, A. P.; Malik, L.; Jensen, K. J., Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem Soc Rev* 2012, 41 (5), 1826-44.
51. El-Faham, A.; Albericio, F., Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem Rev* 2011, 111 (11), 6557-602.
52. Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F., Amino acid-protecting groups. *Chem Rev* 2009, 109 (6), 2455-504.



ภาคผนวก ก

การเรียกชื่อกรดอะมิโนและการเตรียมสาร

1. การเรียกชื่อของกรดอะมิโน (Nomenclatures)



2. การเตรียมสารเคมี

2.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ทำการชั่ง Tris-base 3.03 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ (beaker) แล้วละลายสารด้วยน้ำ DI แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนมีปริมาตรครบ 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl)

2.2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) 0.4 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ทำการชั่ง Tris-base 4.85 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ (beaker) แล้วละลายสารด้วยน้ำ DI แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl)

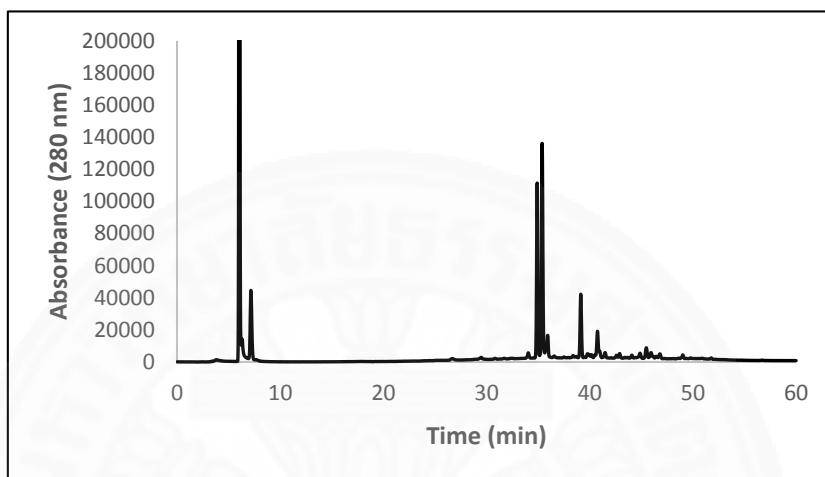
2.3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) 1 M NaHCO₃ pH 9.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

ทำการชั่งโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO₃) 1.58 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ (beaker) แล้วละลายสารด้วยน้ำ DI แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนมีปริมาตรครบ 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 9.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

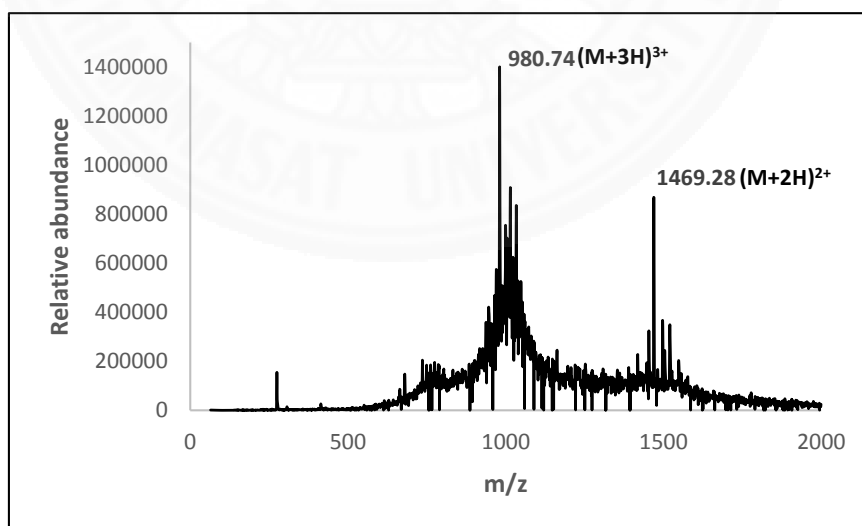
2.4 การเตรียมสารละลายผสมของ TFA/EDT/H₂O/TIPS ในอัตราส่วน 94:2.5:2.5:1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (deprotection cocktail)

ทำการปิเปต (pipette) ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (trifluoroacetic acid, TFA) ปริมาตร 9.4 มิลลิลิตร ลงในหลอดพลาสติก (centrifuge tube) ตามด้วยการเติมเอีเทนไดไทออล (ethanedithiol, EDT) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และสุดท้ายเติมไตรไอโซโพรพิลไซเลน (triisopropylsilane, TIPS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วทำการเขย่าให้สารละลายผสมกันเพื่อใช้สำหรับขั้นตอนของการตัดสายโซ่เพปไทด์

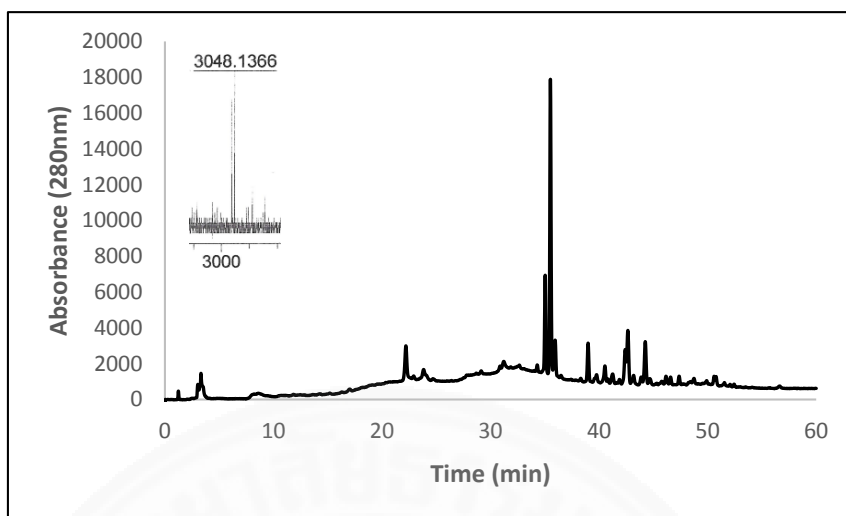
ภาคผนวก ข
ผลสเปกตรัมของสาร



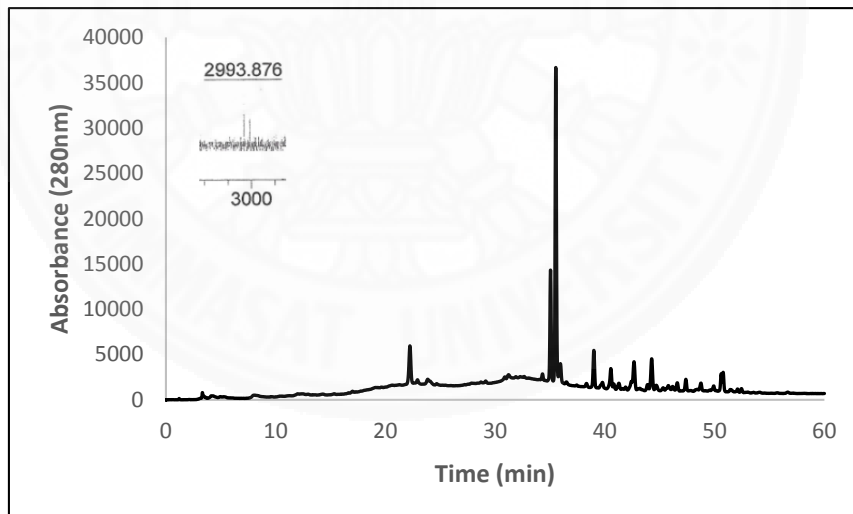
ภาพที่ ข1 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของ linear Huwentoxin-X ที่สังเคราะห์ได้



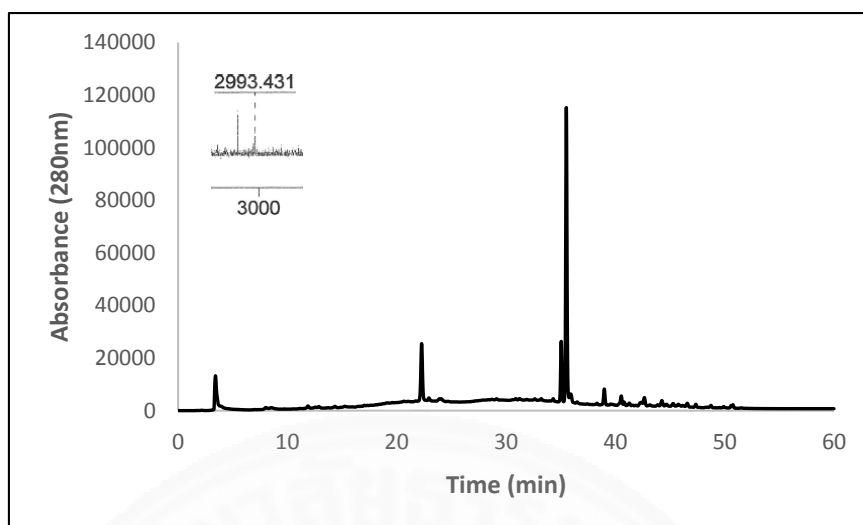
ภาพที่ ข2 ภาพแสดง ESI mass spectrum ของ linear Huwentoxin-X ที่สังเคราะห์ได้



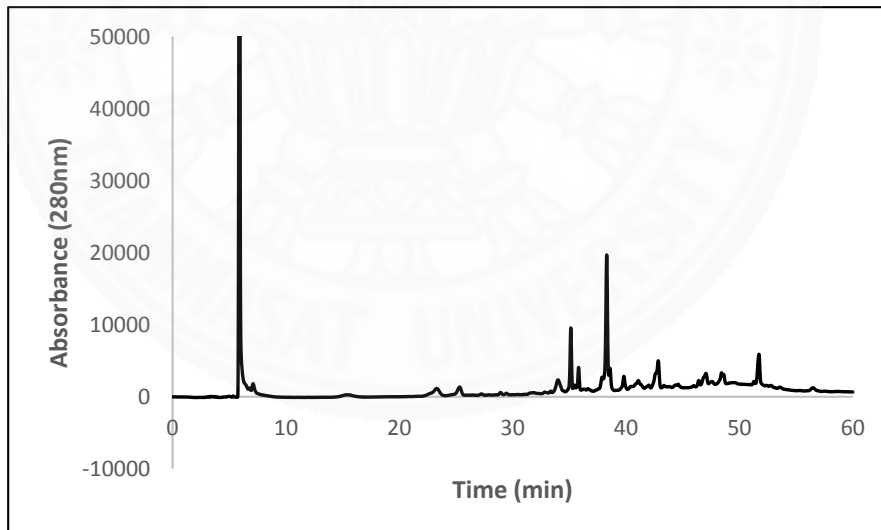
ภาพที่ ข3 ภาพแสดง HPLC chromatogram และ MALDI-TOF mass spectrum ของ Huwentoxin-X[K1,7,15,26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 1) ที่สังเคราะห์ได้



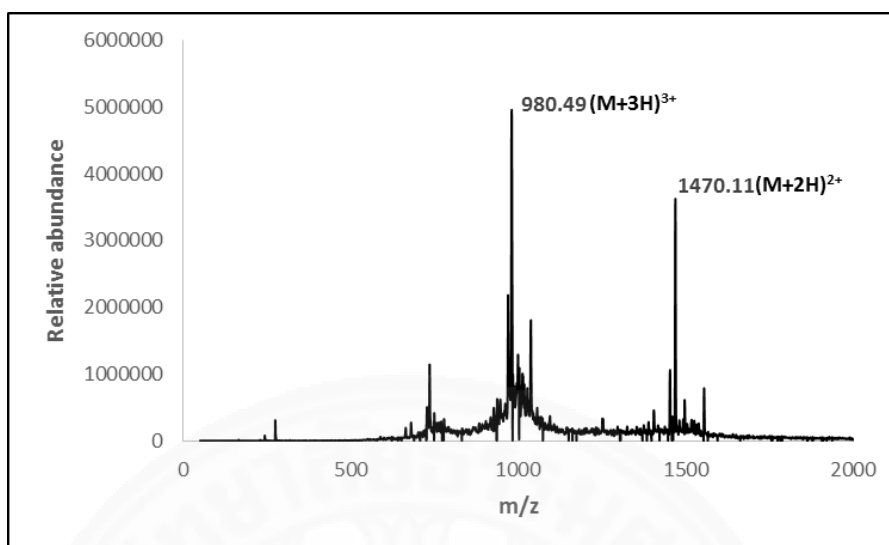
ภาพที่ ข4 ภาพแสดง HPLC chromatogram และ MALDI-TOF mass spectrum ของ Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ตัวที่ 2) ที่สังเคราะห์ได้



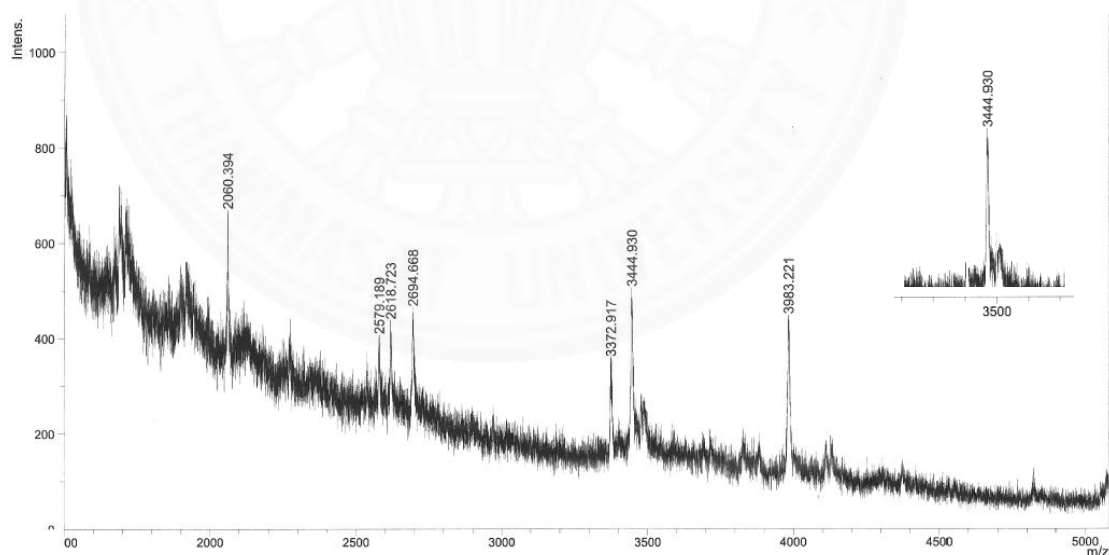
ภาพที่ ข5 ภาพแสดง HPLC chromatogram และ MALDI-TOF mass spectrum ของ Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ตัวที่ 3) ที่สังเคราะห์ได้



ภาพที่ ข6 ภาพแสดง HPLC chromatogram ของ linear Huwentoxin-X ที่สังเคราะห์ได้จาก 2Cl-Trityl chloride resin

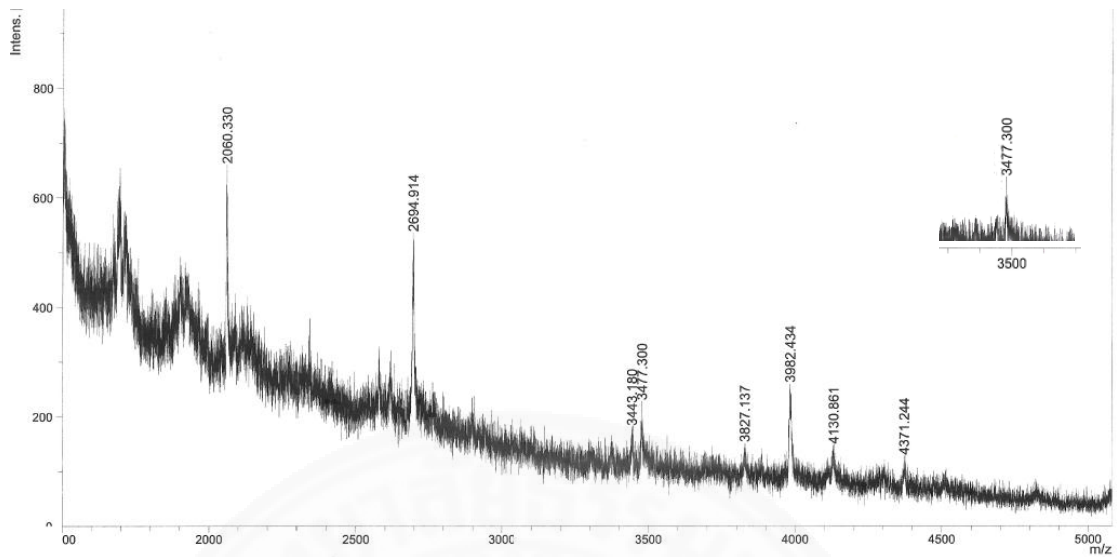


ภาพที่ ข7 ภาพแสดง ESI mass spectrum ของ linear Huwentoxin-X ที่สังเคราะห์ได้จาก 2Cl-Trityl chloride resin

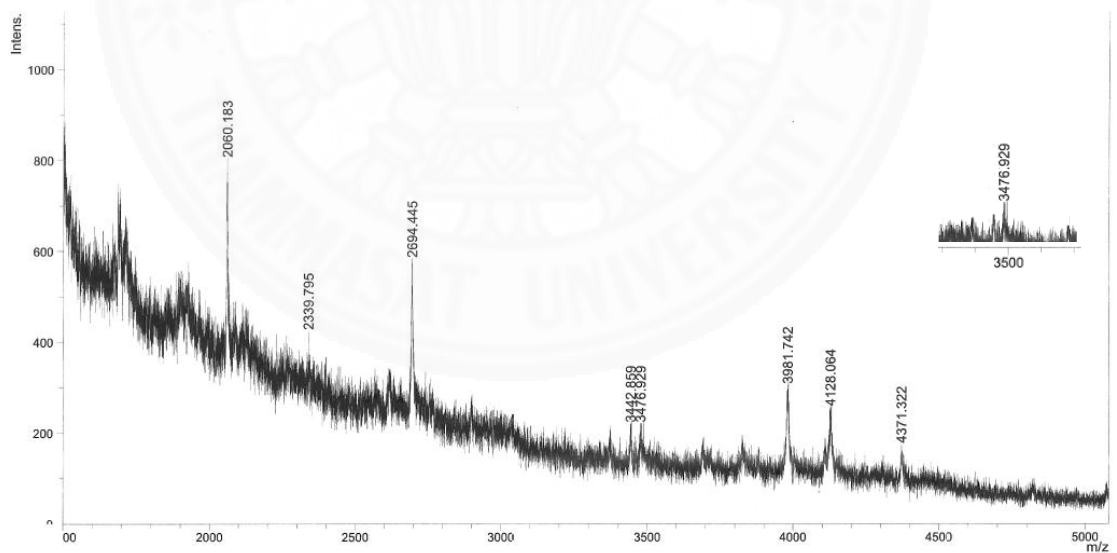


ภาพที่ ข8 ภาพแสดง MALDI-TOF mass spectrum ของโปรตีน Huwentoxin-X ที่ fold แล้ว

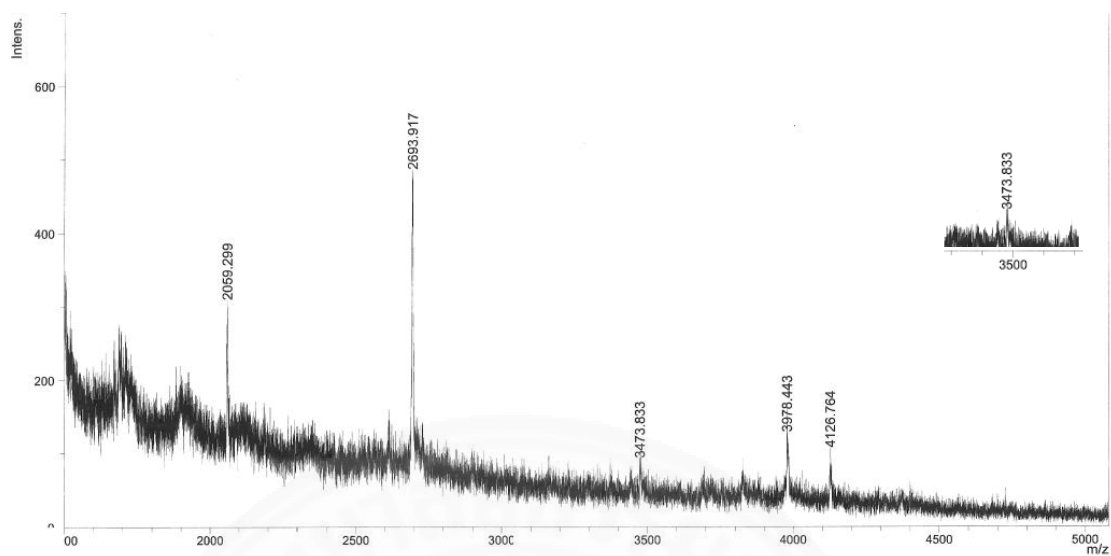
MALDI-TOF-MS: Found 3444.9 ; Calculated 3445 for [M+GSH+H+sinapic acid-H₂O]



ภาพที่ ข9 ภาพแสดง MALDI-TOF mass spectrum ของ Huwentoxin-X[K7R, K26R] (อนุพันธ์ ตัวที่ 2) ที่ fold แล้ว MALDI-TOF-MS: Found 3477.3 ; Calculated 3478 for [M+GSH+TFA+MeOH+K]



ภาพที่ ข10 ภาพแสดง MALDI-TOF mass spectrum ของ Huwentoxin-X[K1R, K15R] (อนุพันธ์ ตัวที่ 3) ที่ fold แล้ว MALDI-TOF-MS: Found 3476.9 ; Calculated 3478 for [M+GSH+TFA+MeOH+K]



ภาพที่ ข11 ภาพแสดง MALDI-TOF mass spectrum ของโปรตีน cyclic HWTX-X ที่ fold แล้ว

MALDI-TOF-MS: Found 3473.8 ; Calculated 3476 for [M+GSH+sinapic acid+MeOH+H]

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายภูธน ไกรสุริยวงศ์
วันเดือนปีเกิด	8 มิถุนายน 2534
ตำแหน่ง	-
ทุนการศึกษา	ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

ผลงานทางวิชาการ

Proceeding

Puthon Kraisuriyawong, Panumart Thongyoo. Synthesis of fluorescently labeled Huwentoxin-X (HWTX-X) microtoxin, The 1st International Conference on Natural Medicine (ICNM 2017) : From Local Wisdom to International Research; 5-6 August 2017; Bangkok, Thailand

Poster presentation

Puthon Kraisuriyawong, Panumart Thongyoo. The synthesis of fluorescently labeled Huwentoxin-X (HWTX-X) microtoxin, The RSU International Research Conference 2017; 28 April 2017; Pathum Thani, Thailand