



สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร
Naresuan University Publishing House

ชีวเภสัชภัณฑ์

การออกแบบและพัฒนา

Biopharmaceuticals: Design & Development



พัฒนา ศรีพลากิจ



ชีวเภสัชภัณฑ์

การออกแบบและพัฒนา

Biopharmaceuticals: Design & Development

พัฒนา ศรีพลากิจ



สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร
Naresuan University Publishing House
www.nupress.grad.nu.ac.th

ข้อมูลทางบรรณานุกรมของสำนักหอสมุดแห่งชาติ

National Library of Thailand Cataloging in Publication Data

พัฒนา ศรีพลากิจ.

ชีวเภสัชภัณฑ์: การออกแบบและพัฒนา = Biopharmaceuticals: Design & Development. -- พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2558.

284 หน้า.

1. เวชภัณฑ์. I. ชื่อเรื่อง.

610.28

ISBN (e-book) 978-616-790-267-8

สพน. 7

ราคา 240 บาท

พิมพ์ครั้งที่ 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558



สงวนลิขสิทธิ์ ตามพระราชบัญญัติลิขสิทธิ์ พ.ศ. 2537 โดยสำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร ห้ามการลอกเลียนไม่ว่าส่วนใดส่วนหนึ่งของหนังสือเล่มนี้
ไม่ว่าในรูปแบบใด ๆ นอกจากจะได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากสำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร เท่านั้น

จัดพิมพ์โดย สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร

มีวางจำหน่ายที่ 1. บริษัท เมพ คอร์ปอเรชั่น จำกัด

99/27 อาคารซอฟต์แวร์ปาร์ค ชั้นที่ 8 หมู่ที่ 4 ถนนแจ้งวัฒนะ แขวงคลองเกลือ เขตปากเกร็ด นนทบุรี 11120

โทร : 08 4090 3148 อีเมล : support@mebmarket.com

2. บริษัท บุกส์เคซ่ จำกัด

2529/48 ตรอกนอกเขต แขวงบางโคล่ เขตบางคอแหลม กรุงเทพมหานคร 10120

อีเมล : booksale@bookkaze.com

3. บริษัท อีบี จำกัด

หมู่บ้านโนเบิลพัฒนาการ 1104/207-209 ถนนพัฒนาการ แขวงสวนหลวง เขตสวนหลวง กรุงเทพมหานคร 10250

โทร : 0 2187 2222 อีเมล : member@ookbee.com

4. บริษัท ซีเอ็ดดูเคชั่น จำกัด

อาคารอินเตอร์ลิงคท์ทาวเวอร์ ทาวเวอร์ ชั้น 19 เลขที่ 1858/87-90 ถนนเพชรตัด แขวงบางนาใต้ เขตบางนา กรุงเทพฯ 10260

โทร : 0 2826 8953 อีเมล : DigitalBusiness@se-ed.com

กองบรรณาธิการ กองบรรณาธิการจัดทำเอกสารสิ่งพิมพ์ทางวิชาการของสำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร
ออกแบบปก สรญา แสงเย็นพันธ์



สำนักพิมพ์นี้เป็นสมาชิกสมาคมผู้จัดพิมพ์
และผู้จำหน่ายหนังสือแห่งประเทศไทย
<http://www.thaibooksociety.com>



พิมพ์บน
กระดาษคุณภาพ เพื่อผลงานคุณภาพ
กระดาษชอนใยสาหร่ายรีไซเคิล

กรณีต้องการสั่งซื้อหนังสือปริมาณมาก หรือเข้าชั้นเรียนติดต่อได้ที่
ฝ่ายจัดจำหน่ายสำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร

☎ nuph@nu.ac.th

📍 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร

☎ 0 5596 8833-8836

📧 nu_publishing



LINE @nuph



Facebook สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร



คำนำ

ปัจจุบันยากลุ่มชีวเภสัชภัณฑ์มีบทบาท และความสำคัญเพิ่มมากขึ้นในด้านเภสัชศาสตร์ รวมทั้งคาดว่าในอนาคตข้างหน้ายาในกลุ่มดังกล่าวจะมีการพัฒนาเพิ่มจำนวนมากขึ้น ดังนั้นหนังสือนี้จึงมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ความรู้เรื่องการออกแบบและพัฒนาชีวเภสัชภัณฑ์ โดยเนื้อหาของหนังสือครอบคลุมความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับโครงสร้างและกระบวนการผลิตชีวเภสัชภัณฑ์ รวมทั้งรายละเอียดการออกแบบ การพัฒนา และการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคของชีวเภสัชภัณฑ์ นอกจากนี้ผู้แต่งยังได้ไล่เรียงลำดับชีวเภสัชภัณฑ์ที่ได้รับการขึ้นทะเบียนยาจากอดีตจนถึงปัจจุบัน ชีวเภสัชภัณฑ์กลุ่มต่างๆ ที่น่าสนใจมีดังนี้ ไฮโดรโคโรทแฟคเตอร์ โมโนโคลนอลแอนติบอดี เปปไทด์ฮอร์โมน โปรตีนเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดและโปรตีนในเลือด และเอนไซม์เพื่อการรักษา รวมทั้งยาที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มชีวเภสัชภัณฑ์ดังกล่าว ซึ่งได้รวบรวมข้อมูล และประมวลความรู้จากหนังสือและตำราต่างๆ รวมทั้งเพิ่มเติมเนื้อหาให้ทันสมัยจากวารสารต่างๆ ของต่างประเทศ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแหล่ง ข้อมูลและความรู้ รวมทั้งใช้เพื่อการค้นคว้าและอ้างอิงสำหรับนิสิต นักศึกษา นักวิจัย และผู้สนใจในสาขาเภสัชศาสตร์และสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพที่เกี่ยวข้อง

พัฒนา ศรีพลากิจ



สารบัญ

คำนำ	ก
สารบัญ	ข

บทที่ 1	บทนำชีวเภสัชภัณฑ์	1
	(Introduction to Biopharmaceuticals)	
	1.1 บทนำ	1
	1.2 โปรตีน	6
	1.3 กรดนิวคลีอิก	17
	1.4 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตชีวเภสัชภัณฑ์	22
	1.5 บทสรุป	37
	เอกสารอ้างอิง	37
บทที่ 2	ไซโตไคน์	39
	(Cytokines)	
	2.1 บทนำไซโตไคน์	39
	2.2 อินเตอร์เฟียร์รอน	44
	2.3 อินเตอร์ลิวคิน	61
	2.4 ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์	71
	2.5 บทสรุป	74
	เอกสารอ้างอิง	74

บทที่ 3	โกรทแฟคเตอร์ (Growth Factors)	77
	3.1 บทนำโกรทแฟคเตอร์	77
	3.2 ฮีมาโตพอยอีติกโกรทแฟคเตอร์	78
	3.3 โกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสมานแผลและโรคมะเร็ง	95
	3.4 บทสรุป	107
	เอกสารอ้างอิง	107
บทที่ 4	โมนโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibodies)	113
	4.1 บทนำโมนโนโคลนอลแอนติบอดี	113
	4.2 โมนโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับโรคมะเร็ง	125
	4.3 โมนโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับการปลูกถ่ายอวัยวะ	135
	4.4 โมนโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับต้านการอักเสบ	141
	4.5 บทสรุป	151
	เอกสารอ้างอิง	152
บทที่ 5	เปปไทด์ฮอร์โมน (Peptide Hormones)	157
	5.1 บทนำเปปไทด์ฮอร์โมน	157
	5.2 อินซูลิน	164
	5.3 กลูคากอน	175
	5.4 โกรทฮอร์โมน	178
	5.5 โกนาโดโทรปิน	183
	5.6 ฮอร์โมนชนิดอื่นๆ	189
	5.7 บทสรุป	196
	เอกสารอ้างอิง	197

บทที่ 6	โปรตีนเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดและโปรตีนในเลือด	201
	(Blood Coagulation Proteins and Blood Proteins)	
6.1	บทนำโปรตีนเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด	201
6.2	แฟคเตอร์การแข็งตัวของเลือด	206
6.3	ยาต้านการแข็งตัวของเลือด	216
6.4	ยาละลายลิ่มเลือด	229
6.5	ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับเลือด	246
6.6	บทสรุป	248
	เอกสารอ้างอิง	248
บทที่ 7	เอนไซม์เพื่อการรักษา	255
	(Therapeutic Enzymes)	
7.1	บทนำเอนไซม์	255
7.2	การใช้เอนไซม์เป็นยารักษาโรค	255
7.3	การรักษาด้วยเอนไซม์ทดแทน	258
7.4	บทสรุป	264
	เอกสารอ้างอิง	264
	ดัชนีชื่อยาและชีวเภสัชภัณฑ์	267

1

บทนำชีวเภสัชภัณฑ์

(Introduction to Biopharmaceuticals)

1.1 บทนำ

ยาส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก น้ำหนักโมเลกุลต่ำ โครงสร้างไม่ซับซ้อน และผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี ตัวอย่างยาที่ผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical-based drug) แสดงดังตาราง 1.1 ถึงแม้ว่ายาหลายชนิดจะค้นพบครั้งแรกจากแหล่งชีวภาพ เช่น ยาต้านการอักเสบสเตียรอยด์ ฮอร์โมนเพศ เป็นต้น แต่เนื่องจากการผลิตยาจำเป็นต้องใช้วัตถุดิบเพื่อการสกัดในปริมาณสูง ทำให้ไม่สามารถแยกสกัดยาจากแหล่งชีวภาพได้อย่างเพียงพอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนำวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีมาใช้ในการผลิตแทน รวมทั้งในกระบวนการผลิตของยาหลายชนิดยังมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) มาใช้ร่วมกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น สเตียรอยด์ฮอร์โมน ยาลดคอเลสเตอรอล ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น (ตาราง 1.2) โดยสารตั้งต้นอาจได้จากพืชหรือกระบวนการหมัก (fermentation) ของเชื้อราและแบคทีเรีย หลังจากนั้นแล้วจึงใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีหรือกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชัน (biotransformation) ของเชื้อราและแบคทีเรีย เพื่อปรับปรุงโครงสร้างให้ได้ตามเป้าหมายที่ต้องการต่อไป นอกจากยาจะผลิตจากวิธีที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยาบางชนิดยังผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ (modern biotechnology) ซึ่งในอดีตยากกลุ่มดังกล่าวผลิตได้จากการสกัดจากแหล่งชีวภาพ [1-3] ตัวอย่างยาที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่แสดงดังตาราง 1.3

ตาราง 1.1 ยาที่ผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี

Drug	Molecular formula	Molecular weight (Da)	Indication
Aspirin	$C_9H_8O_4$	180.157	Anti-platelet
Atorvastatin	$C_{33}H_{35}FN_2O_5$	558.640	Cholesterol-lowering drug
Cilostazol	$C_{20}H_{27}N_5O_2$	369.460	Anti-platelet
Diclofenac	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	296.148	Anti-inflammatory agent
Esomeprazole	$C_{17}H_{19}N_3O_3S$	345.417	Anti-ulcer agent
Hydrocortisone	$C_{21}H_{30}O_5$	362.460	Anti-inflammatory agent
Testosterone	$C_{19}H_{28}O_2$	288.420	Male sex hormone
Warfarin	$C_{19}H_{16}O_4$	308.330	Anti-coagulant
Zidovudine	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.242	Anti-viral agent

ตาราง 1.2 ยาที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพร่วมกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี			
Drug	Molecular formula	Molecular weight (Da)	Indication
Prednisolone	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360.444	Anti-inflammatory agent
Lovastatin	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	404.540	Cholesterol-lowering drug
Amoxicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	365.400	Antibiotic

ตาราง 1.3 ยาที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่			
Drug	Molecular formula	Molecular weight (Da)	Indication
Interferon alpha-2b	C ₈₆₀ H ₁₃₅₃ N ₂₂₉ O ₂₅₅ S ₉	19,271.000	Anti-viral agent
Erythropoietin	C ₈₁₅ H ₁₃₁₇ N ₂₃₃ O ₂₄₁ S ₅	18,396.100	Treatment of anemia
Insulin	C ₂₅₇ H ₃₈₃ N ₆₅ O ₇₇ S ₆	5,808.000	Treatment of diabetes mellitus
Clotting factor VII	C ₁₉₇₂ H ₃₀₇₆ N ₅₆₀ O ₅₉₇ S ₂₈	45,079.100	Blood clotting factor
Hepatitis B vaccine	-	-	Vaccine

การผลิตยาจากวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีมักได้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ในขณะที่การผลิตยาจากเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มักเป็นได้เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ความแตกต่างในด้านของขนาด (size) น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ลักษณะโครงสร้าง (structure) วิธีการผลิต (manufacturing) ความคงตัว (stability) และความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ของกลุ่มยาที่ใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและกลุ่มยาที่ผลิตด้วยเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่แสดงดังตาราง 1.4

ตาราง 1.4 ความแตกต่างระหว่างยาที่ผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีกับยาที่ผลิตด้วยเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่		
	Drugs produced by chemical synthesis	Drugs produced by biotechnology
Size	Small / single molecule	Large / mixture of molecules
Molecular weight	Low	High
Structure	Simple	Complex
Manufacturing	Chemical synthesis	Living cell culture
Stability	Stable	Unstable
Immunogenicity	Non-immunogenic	Immunogenic

ยาหรือเภสัชภัณฑ์ที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพมีหลายชื่อเรียก ซึ่งแต่ละชื่อมีคำจำกัดความและความหมายแตกต่างกันดังนี้ (1) *ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ (biologic หรือ biological product)* หมายถึงเภสัชภัณฑ์ใดก็ตามที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งชื่อเรียกดังกล่าวในทางเภสัชศาสตร์มีความหมายจำกัดเฉพาะเภสัชภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดจากเลือด เช่น วัคซีน (vaccine) ท็อกซิน (toxin) สารก่อภูมิแพ้ (allergen) เป็นต้น ดังนั้นจึงทำให้เภสัชภัณฑ์บางชนิดที่ผลิตด้วยเทคโนโลยีชีวภาพดั้งเดิม (classical biotechnology) เช่น ฮอร์โมน

ยาปฏิชีวนะ เมตาบอไลต์จากพืช (plant metabolite) เป็นต้น ไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ (2) ยาจากเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology medicine) หมายถึง เกล็ดซัณฑิที่ได้กัตามที่ผลิตจากระบบชีวภาพ (เช่น เซลล์ เนื้อเยื่อ เป็นต้น) หรือชีวโมเลกุล (เช่น เอนไซม์ แอนติบอดี เป็นต้น) โดยอาจใช้เทคโนโลยีชีวภาพดั้งเดิมหรือสมัยใหม่ในกระบวนการผลิตบางส่วนหรือทั้งหมด เช่น ยาปฏิชีวนะที่สกัดจากเชื้อรา อินซูลินที่สกัดจากตับอ่อนหมู อินซูลินที่ผลิตจากเทคนิคพันธุวิศวกรรม เป็นต้น ดังนั้นคำจำกัดความของยาจากเทคโนโลยีชีวภาพจึงมีความหมายกว้างกว่าผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ (3) *ชีวเภสัชภัณฑ์* (biopharmaceutical) หมายถึง โปรตีนเพื่อการรักษา (therapeutic protein) ซึ่งผลิตจเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ โดยเฉพาะการใช้พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เช่น เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA technology) เทคโนโลยีไฮบริโดมา (hybridoma technology) และสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม (gene modified organism) นอกจากโปรตีนแล้วชีวเภสัชภัณฑ์ยังหมายถึง กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ได้แก่ deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) ที่ใช้สำหรับการบำบัดด้วยยีน (gene therapy) และเทคโนโลยีแอนติเซนส์ (antisense technology) รวมทั้งวัคซีนที่ผลิตด้วยพันธุวิศวกรรม [1-3] การจัดจำแนกกลุ่มยาและเภสัชภัณฑ์ที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพ และกลุ่มที่เกี่ยวข้องโดยอาศัยคำจำกัดความที่กล่าวมาต่างๆ ข้างต้นแสดงดังตาราง 1.5

ตาราง 1.5 การจัดจำแนกกลุ่มยาและเภสัชภัณฑ์ที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพและกลุ่มที่เกี่ยวข้อง

Pharmaceutical product	Chemical-based drug	Biologic	Biotechnology medicine	Biopharmaceutical
Vaccine, toxin and allergen derived from blood		✓		
Antibiotic obtained by extraction from native source or semi-synthesis	✓		✓	
Plant product obtained by extraction from native source or semi-synthesis	✓		✓	
Fermentation and biotransformation product or semi-synthesis	✓		✓	
Protein obtained by extraction from native source		✓*	✓	
Peptide manufactured by chemical synthesis	✓			
Peptide obtained by extraction from native source			✓	
Cell/tissue-based therapeutic agents			✓	
Recombinant protein			✓	✓
Monoclonal antibody			✓	✓
Gene therapy product			✓	✓
Antisense oligonucleotide produced by chemical synthesis				✓
Antisense oligonucleotide produced by enzymatic synthesis			✓	✓
Vaccine produced by genetic engineering			✓	✓

*Some (clotting factor and polyclonal antibody derived from blood)

การพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตยา และเภสัชภัณฑ์เพื่อการจัดจำหน่ายสำหรับรักษาอย่างจำเพาะโรค เริ่มต้นจากการรักษาโรคแบบิวีชีวานัน ตัวอย่าง เช่น digitalis เป็นสารสกัดจากพืช foxglove (*Digitalis purpurea*) สำหรับการรักษาโรคหัวใจ quinine เป็นสารสกัดจากเปลือกหรือรากของพืชสกุล *Cinchona* สำหรับการรักษาโรคมาลาเรีย pecacuanha เป็นสารสกัดจากเปลือกหรือรากของพืชสกุล *Cephaelis* สำหรับการรักษาโรคบิด และปรอทเป็นยาสำหรับการรักษาโรคซิฟิลิส เป็นต้น อย่างไรก็ตามในช่วงเวลานั้น ยายังไม่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยที่แน่นอนและเพียงพอ ต่อมาเมื่อมีการพัฒนาศาสตร์ด้านอินทรีย์ เคมีตลอดจนมีความรู้ด้านจุลชีววิทยามากขึ้น จึงส่งผลให้อุตสาหกรรมการผลิตยา มีการพัฒนายิ่งขึ้น โดยเริ่มต้นจากความสำเร็จของการสังเคราะห์สีย้อม (dye) ซึ่งได้ถูกพิสูจน์ว่าสามารถใช้เป็นยารักษาโรคได้ มีผลให้เกิดการก่อตั้งบริษัทผลิตยา ได้แก่ ไบเออร์ (Bayer) และเฮิร์สต์ (Hoechst) ขึ้นในปลายปีทศวรรษที่ 1800 ต่อมาบริษัทดังกล่าวก็สามารถสังเคราะห์แอสไพริน (aspirin) ในปี ค.ศ. 1895 อุตสาหกรรมการผลิตยา มีการพัฒนาอย่างจริงจัง เมื่อมีการค้นพบและวิธีการสังเคราะห์ของกลุ่มยาซัลฟา (sulfa drugs) เช่น prontosil rubrum (หรือ sulfamidochrysoidine) ซึ่งเป็นยาที่ได้มาจากสีย้อมสีแดงสำหรับรักษาภาวะ การติดเชื้อแบคทีเรีย ยาดังกล่าวได้เริ่มใช้รักษาโรคตั้งแต่ต้นปีทศวรรษที่ 1920 ในขณะที่อุตสาหกรรม การผลิตอินซูลินได้เริ่มขึ้นในปีทศวรรษที่ 1930 การประสบความสำเร็จของการผลิตยาดังกล่าวเป็นการเน้นย้ำ ให้อุตสาหกรรมการผลิตยาเติบโตมากขึ้น ซึ่งต่อมาได้จึงเกิดอุตสาหกรรมการผลิตเพนิซิลลิน (penicillin) ในต้นปีทศวรรษที่ 1940 และในเวลานั้นบริษัทผลิตยาเกิดขึ้นมากมาย เช่น ซิบบ้า-ไกกี้ (Ciba-Geigy) อีไล ลิลลี่ (Eli Lilly) เวลล์คัม (Wellcome) แกล็กโซ (Glaxo) โรช (Roche) เป็นต้น ซึ่งอยู่ในประเทศสหรัฐอเมริกา หรือประเทศในสหภาพยุโรป ในเวลาต่อมาบริษัทต่างๆ เหล่านี้ได้พัฒนายาขึ้นมาอีกหลาย ชนิด เช่น กลุ่มยาเตตราไซคลีน (tetracyclines) กลุ่มยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroids) กลุ่มยาคุมกำเนิด (contraceptives) เป็นต้น ยาที่กล่าวมาทั้งหมดผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี [1]

จากความก้าวหน้าของการวิจัยด้านชีวการแพทย์ทำให้ทราบถึงหลักการ และกลไกในระดับ โมเลกุลของการเกิดโรค การวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพเริ่มต้นในปีทศวรรษที่ 1950 โดยนักโปรตีน ในธรรมชาติที่ผลิตได้จากร่างกายมนุษย์มาประยุกต์ใช้สำหรับการรักษาโรค ตัวอย่างเช่น อินเตอร์เฟียรอน (interferon) อินเตอร์ลิวคิน (interleukin) อินซูลิน (insulin) อีริโทรพอยอีติน (erythropoietin) เป็นต้น ถึงแม้ว่าโปรตีนข้างต้นจะมีประสิทธิภาพในการรักษาจึงทำให้มีความต้องการอย่างแพร่หลาย แต่ไม่สามารถ ใช้งานได้จริง เนื่องจากโปรตีนที่ผลิตจากธรรมชาติมีปริมาณน้อยมากและมีอย่างจำกัด การค้นพบ และการพัฒนาเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอและเทคโนโลยีไฮบริโดมาทำให้สามารถแก้ปัญหาต่างๆ ในอดีตได้ ซึ่งนับเป็นการเริ่มต้นยุคใหม่ของการผลิตยา [1]

เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ หมายถึง เทคนิคการนำสารพันธุกรรมจากเซลล์ผู้ให้ (donor cell) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งเป็นได้ทั้งเซลล์ของแบคทีเรีย รา พืช หรือสัตว์ เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ ดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับการผลิตโปรตีนมีข้อดีและข้อได้เปรียบดังนี้ (1) โปรตีนที่ผลิตได้มีปริมาณสูงตามความต้องการ เนื่องจากโปรตีนที่ผลิตจากธรรมชาติส่วนใหญ่มีปริมาณน้อยมาก ตลอดจนการใช้วิธีการสกัดโดยตรงจากแหล่ง ชีวภาพได้ปริมาณโปรตีนไม่เพียงพอต่อความต้องการ (2) โปรตีนที่ผลิตได้ปราศจากเชื้อโรค เนื่องจากวิธีการ

สกัดโดยตรงจากแหล่งชีวภาพอาจทำให้เกิดการแพร่ของโรคโดยไม่ได้ตั้งใจ เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี (hepatitis B virus) ไวรัสตับอักเสบชนิดซี (hepatitis C virus) ไวรัสเอชไอวี (HIV หรือ human immunodeficiency virus) เป็นต้น จากการใช้ผลิตภัณฑ์จากเลือดที่ปนเปื้อนเชื้อโรค และการแพร่ของโรค Creutzfeldt-Jakob disease จากการได้รับผลิตภัณฑ์ growth hormone (GH) ที่สกัดได้จากต่อมใต้สมองของมนุษย์ (3) โปรตีนที่ผลิตได้มาจากแหล่งชีวภาพที่มีความปลอดภัย เนื่องจากในอดีตโปรตีนที่ใช้สำหรับการรักษาโรคหลายชนิดได้จากการสกัดจากปัสสาวะของมนุษย์ เช่น follicle stimulating hormone (FSH) สกัดจากปัสสาวะของหญิงวัยหมดประจำเดือน และ human chorionic gonadotrophin (hCG) สกัดจากปัสสาวะของหญิงตั้งครรภ์ (4) โปรตีนที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพดีกว่าโปรตีนในธรรมชาติ การปรับปรุงลักษณะโครงสร้างของโปรตีน โดยอาศัยหลักการจากการให้โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด แต่ยังคงประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์อยู่ ตัวอย่างเช่น วิธีการเติม (insertion) การตัด (deletion) หรือการปรับเปลี่ยน (alteration) บางเรซิดิวของกรดอะมิโน หรือวิธีการการตัดหรือการปรับเปลี่ยนทั้งโดเมน (domain) ของโครงสร้างโปรตีน หรือวิธีการเตรียมอยู่ในรูปโปรตีนลูกผสม (hybrid protein) เป็นต้น [1] ตัวอย่างชีวเภสัชภัณฑ์ที่มีการปรับปรุงโครงสร้างโปรตีนให้มีประสิทธิภาพดีกว่าโปรตีนของมนุษย์ในธรรมชาติแสดงดังตาราง 1.6

ตาราง 1.6 ชีวเภสัชภัณฑ์ที่ได้จากการปรับปรุงโครงสร้างโปรตีน		
Biopharmaceutical	Alteration	Objective
Tissue plasminogen activator	Deleted some domain	Longer half-life
Blood clotting factor	Deleted some domain	Lower molecular mass
Hybrid protein	Fused protein to another one	Targeted protein
Insulin	Modified amino acid sequence	Generation of fast / slow action
Monoclonal antibody	Replacement of amino acid sequence	Reduced immunogenicity
Somatostatin	Optimized amino acid sequence	Longer half-life & specificity

ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ที่ได้จากแหล่งชีวภาพแสดงดังตาราง 1.7 ในปัจจุบันเภสัชภัณฑ์ที่เป็นโปรตีนดังกล่าวส่วนใหญ่นิยมผลิตด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ ถึงแม้ว่าเภสัชภัณฑ์ที่ผลิตจากวิธีดังกล่าวจะมีประโยชน์มากมาย แต่ในบางกรณีเภสัชภัณฑ์ที่ผลิตได้จากแหล่งชีวภาพโดยตรงยังคงมีการใช้อยู่เหตุผลอาจเพราะเนื่องมาจากปัจจัยด้านเศรษฐกิจ โดยที่โปรตีนดังกล่าวสามารถผลิตจากแหล่งชีวภาพได้ในปริมาณสูง ตลอดจนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ทำได้ง่าย ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ดังกล่าว เช่น อัลบูมิน (albumin) แฟค-เตอร์การแข็งตัวของเลือด (blood clotting factor) บางชนิด เป็นต้น ส่วนในกรณีของยาที่ไม่เป็นโปรตีนและในอดีตผลิตได้จากแหล่งชีวภาพธรรมชาติ เช่น สเตียรอยด์ฮอร์โมน ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น ปัจจุบันยาดังกล่าวผลิตได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีการสกัดโดยตรงจากพืช เชื้อรา หรือแบคทีเรีย หรือวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (semisynthesis) โดยใช้สารตั้งต้นที่สกัดได้จากพืช เชื้อรา หรือแบคทีเรีย หรือวิธีการสังเคราะห์ทั้งหมดทางเคมี (total synthesis) [3]

ตาราง 1.7 เภสัชภัณฑ์ที่ผลิตได้จากแหล่งชีวภาพ

Pharmaceutical product	Biological source	Indication
Adrenaline	Adrenal gland (human)	Management of anaphylaxis
Blood clotting factors	Blood (human)	Haemophilia
Corticosteroids	Adrenal cortex (human)	Anti-inflammatory agent
Follicle stimulating hormone	Urine (post-menopausal women)	Infertility
Glucagon	Pancreatic tissue (porcine / bovine)	Diabetes insipidus
Glucocerebrosidase	Placenta (human)	Gaucher's disease
Human chorionic gonadotropin	Urine (pregnant women)	Infertility
Human growth hormone	Pituitary gland (human)	Treatment of short stature
Insulin	Pancreatic tissue (porcine / bovine)	Diabetes mellitus
Peptide hormone (e.g. oxytocin)	Pituitary gland (human)	Various
Prostaglandins	Tissues (human)	Various
Steroid sex hormones	Gonads (human)	Subfertility
Urokinase	Urine (human)	Thrombolytic agent

1.2 โปรตีน

โปรตีนเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptide) จำนวน 1 สายหรือมากกว่า โดยที่โพลีเปปไทด์ประกอบด้วยหน่วยของกรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) โดยทั่วไปแล้วโปรตีนมักประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโนมากกว่า 50 เรซิดิว (residue) แต่ถ้าโพลีเปปไทด์มีจำนวนกรดอะมิโนน้อยกว่า 50 เรซิดิว เรียกสารดังกล่าวว่าเปปไทด์ (peptide) ในขณะที่โอลิโกเปปไทด์ (oligopeptide) มีจำนวนกรดอะมิโน 2-20 เรซิดิว ตัวอย่างโปรตีนที่มีโครงสร้างโพลีเปปไทด์ที่ต่างกันแสดงดังตาราง 1.8 ชนิดและลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างโพลีเปปไทด์ถูกกำหนดโดยรหัสของยีน เมื่อโปรตีนถูกสร้างขึ้น สายโพลีเปปไทด์จะมีการขดพับ (folding) ทำให้เกิดรูปร่างสามมิติแบบเฉพาะตัว การจัดรูปร่าง (conformation) ของสายโพลีเปปไทด์ขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดแบบไม่ใช่โควาเลนต์ (non-covalent interaction) ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นแรงดึงดูดแบบอ่อนที่สามารถถูกทำลายได้ง่ายด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น สารเคมี ความร้อน เป็นต้น ทำให้รูปร่างของสายโพลีเปปไทด์เกิดการแปรสภาพไปจากธรรมชาติ ส่งผลให้สูญเสียประสิทธิภาพในการทำงาน [4-6]

โปรตีนสามารถจำแนกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีนอย่างง่าย (simple protein) และโปรตีนคอนจูเกต (conjugated protein) โปรตีนอย่างง่ายประกอบด้วยโพลีเปปไทด์เพียงอย่างเดียวซึ่งไม่มีส่วนประกอบทางเคมีอื่นที่จำเป็นต่อการทำงาน ตัวอย่างเช่น อัลบูมิน (albumin) โกลบูลิน (globulin) เป็นต้น โปรตีนคอนจูเกตประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์และส่วนประกอบทางเคมีอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน ซึ่งเรียกว่า หมู่พ羅斯ติติก (prosthetic group) ตัวอย่างเช่น นิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) ลิโปโปรตีน (lipoprotein) เมทัลโลโปรตีน (metalloprotein) ซึ่งมีหมู่พ羅斯ติติกเป็นกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ฟอสเฟต (phosphate) ไขมัน (lipid) และโลหะ (metal) ตามลำดับ [4]

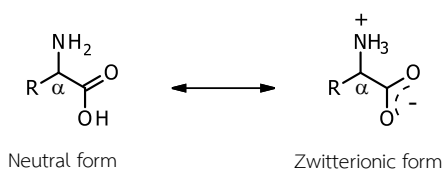
ตาราง 1.8 ตัวอย่างโปรตีนที่มีจำนวนของสายโพลีเปปไทด์ จำนวนกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน

Protein	Number of polypeptide chain	Number of amino acid residue	Molecular weight
Insulin (human)	2	51	5,800
Interleukin-2 (human)	1	133	15,400
Erythropoietin (human)	1	165	36,000
Tumor necrosis factor- α (human)	3	471	52,000
Hemoglobin (human)	4	574	64,500

1.2.1 โครงสร้างเคมี

(1) โครงสร้างปฐมภูมิ

โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของโปรตีนมีลักษณะเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เรียงต่อกันและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) โพลีเปปไทด์เป็นโพลิเมอร์ที่มีการจัดเรียงตัวเป็นแบบเส้นตรง และไม่แตกแขนง โดยทั่วไปกรดอะมิโนที่พบมี 20 ชนิด กรดอะมิโนทุกชนิดเป็นกรดอะมิโนชนิดอัลฟา (α -amino acid) โครงสร้างหลักประกอบด้วยอะตอมคาร์บอนที่ตำแหน่งอัลฟา (α -carbon atom) เชื่อมต่อกับอะตอมไฮโดรเจน หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่โซ่ข้าง (side chain group) หรือเรียกว่าหมู่ R ซึ่งหมู่ R ดังกล่าวนี้นำให้กรดอะมิโนแต่ละชนิดมีโครงสร้างแตกต่างกัน กรดอะมิโนมีคุณสมบัติเป็นแอมฟิโพรติก (amphiprotic) คือ เป็นสารที่สามารถให้และรับโปรตอนได้ โดยที่หมู่อะมิโนสามารถถูกโปรตอนเตต (protonated) ได้เป็นหมู่แอมโมเนียมไอออน (ammonium ion) ที่มีประจุบวก ในขณะที่หมู่คาร์บอกซิลสามารถถูกดีโปรตอนเตต (deprotonated) ได้เป็นหมู่คาร์บอกซิเลตไอออน (carboxylate ion) ที่มีประจุลบ เมื่อค่า pH มากกว่าค่า pKa ของหมู่คาร์บอกซิล (ค่า pKa ของหมู่คาร์บอกซิลเฉลี่ยของกรดอะมิโนเท่ากับ 2.2) ทำให้หมู่คาร์บอกซิลแตกตัวเป็นประจุลบ และเมื่อค่า pH น้อยกว่าค่า pKa ของหมู่อะมิโน (ค่า pKa ของหมู่อะมิโนเฉลี่ยของกรดอะมิโนเท่ากับ 9.4) ทำให้หมู่อะมิโนแตกตัวเป็นประจุบวก ดังนั้นเมื่อค่า pH อยู่ระหว่าง 2.2-9.4 จะทำให้กรดอะมิโนอยู่ในรูปประจุลบและประจุบวก (zwitterion form) ดังรูป 1.1 โดยมีปริมาณกรดอะมิโนในรูปไม่มีประจุ (neutral form) เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย [4, 7]



รูป 1.1 กรดอะมิโนในรูปไม่มีประจุและกรดอะมิโนในรูปมีประจุลบและประจุบวก

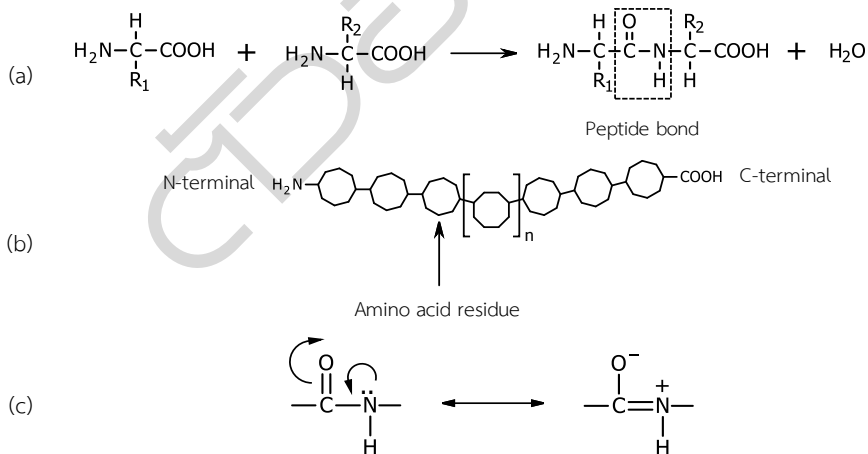
พันธะเปปไทด์เกิดขึ้นจากการเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโนหลายเรซิดิว ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่อะมิโนที่อยู่ติดกับอะตอมคาร์บอนในตำแหน่งอัลฟาของกรดอะมิโนโมเลกุลหนึ่งกับหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ติดกับอะตอมคาร์บอนในตำแหน่งอัลฟาของกรดอะมิโนอีกโมเลกุลหนึ่ง ดังนั้นหมู่ R จึงเป็นหมู่อิสระในสายโพลีเปปไทด์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ได้ รวมทั้งเป็นตัวกำหนดการจัดรูปร่างของสายโพลีเปปไทด์ กรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิด สามารถจัดจำแนกเป็น 6 กลุ่ม (รูป 1.2) ตามลักษณะโครงสร้างเคมีของหมู่ R ดังนี้ (1) *กรดอะมิโนที่มีหมู่ R ไม่มีขั้ว (non-polar) และเป็นอะลิฟาติก (aliphatic)* ได้แก่ glycine (Gly) alanine (Ala) valine (Val) leucine (Leu) และ isoleucine (Ile) ซึ่งเป็นหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาเคมีน้อย แต่สามารถเกิดแรงดึงดูดกันแบบไม่ใช่โควาเลนต์ เช่น แรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) เป็นต้น ซึ่งเป็นแรงที่มีอิทธิพลต่อความคงตัวของรูปร่างโปรตีน Gly มีหมู่ R เป็นอะตอมไฮโดรเจน ซึ่งทำให้อะตอมคาร์บอนในตำแหน่งอัลฟาไม่เป็น chiral center ดังนั้น Gly จึงไม่มีสเตอริโอไอโซเมอร์ (stereoisomer) ในขณะที่กรดอะมิโนชนิดอื่นสามารถมีไอโซเมอร์เป็น D-isomer หรือ L-isomer แต่โดยปกติในมนุษย์สายโพลีเปปไทด์จะพบกรดอะมิโนเป็น L-isomer เท่านั้น (2) *กรดอะมิโนที่มีหมู่ R ไม่มีขั้วและเป็นไซคลิก (cyclic)* ได้แก่ proline (Pro) ซึ่งมีการเชื่อมต่อเป็นวงภายในโมเลกุลด้วยพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ R กับหมู่อะมิโน (3) *กรดอะมิโนที่มีหมู่ R เป็นอะโรมาติก (aromatic)* ได้แก่ phenylalanine (Phe) tyrosine (Tyr) และ tryptophan (Trp) ซึ่งเป็นหมู่ที่ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเคมี แต่หมู่ดังกล่าวสามารถดูดกลืนแสงในย่านอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร คุณสมบัตินี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของโปรตีนทั้งโมเลกุลได้ (4) *กรดอะมิโนที่มีหมู่ R ไม่มีประจุ* ได้แก่ cysteine (Cys) methionine (Met) serine (Ser) และ threonine (Thr) ซึ่งหมู่ R ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) หรือหมู่ที่มีอะตอมซัลเฟอร์ โดยเฉพาะ Cys มีหมู่ไธออล (thiol) หรือหมู่ซัลไฟไฮดริล (sulfhydryl) ซึ่งเป็นหมู่ที่มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีสูง จึงทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complex) กับอออนโลหะ และยังสามารถถูกออกซิไดซ์ได้เป็นพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่าง Cys กับ Cys ที่อยู่ในสายโพลีเปปไทด์เดียวกันหรือต่างกัน พันธะดังกล่าวมีส่วนช่วยทำให้เกิดความคงตัวของโครงสร้างสายโพลีเปปไทด์ และทำให้สายโพลีเปปไทด์แต่ละสายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ส่วน Met Ser และ Thr มีหมู่ R ที่มีขั้วและไม่ไวต่อปฏิกิริยาเคมี (5) *กรดอะมิโนที่มีหมู่ R มีประจุลบหรือมีหมู่เอไมด์ (amide)* ได้แก่ aspartate (Asp) glutamate (Glu) asparagine (Asn) และ glutamine (Gln) กรดอะมิโนดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นกรด หมู่ R ของ Asp และ Glu เป็นหมู่ที่มีประจุลบ ซึ่งสามารถคีเลต (chelate) กับอออนโลหะ ส่งผลต่อการจัดรูปร่างของสายโพลีเปปไทด์ ส่วนในกรณีของหมู่ R ของ Asn และ Gln เป็นหมู่เอไมด์ ซึ่งถ้าอยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงหรือ pH ไม่เหมาะสมอาจเกิดการเปลี่ยนรูปโดยปฏิกิริยาดีเอมีเดชัน (deamidation) กลายเป็นหมู่คาร์บอกซิเลทอออนของ Asp และ Glu ตามลำดับ (6) *กรดอะมิโนที่มีหมู่ R มีประจุบวก* ได้แก่ lysine (Lys) arginine (Arg) histidine (His) กรดอะมิโนดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นด่าง Lys มีสายโซ่ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic chain) และมีหมู่อะมิโนบนสายโซ่ที่สามารถอยู่ในรูปอออน (ionized form) ได้ แต่โดยปกติ Lys ในสายโพลีเปปไทด์จะอยู่ในรูปไม่แตกตัวเป็นอออน (unionized form) ในขณะที่ Arg มีสายโซ่ที่ไม่ชอบน้ำ และมีหมู่อะมิโนและหมู่กวานิดิโด (guanido) ที่สามารถอยู่ในรูปแตกตัวเป็นอออนได้

ส่วนในกรณีของ His มีหมู่อิมิดาโซล (imidazole) ซึ่งเป็นเอมีนตติยภูมิ (tertiary amine) จึงมีคุณสมบัติเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ได้ [4, 7]

(1) กรดอะมิโนที่หมู่ R ไม่มีขั้วและเป็นอะลิฟาติก				
Glycine (Gly หรือ G)	Alanine (Ala หรือ A)	Valine (Val หรือ V)	Leucine (Leu หรือ L)	Isoleucine (Ile หรือ I)
(2) กรดอะมิโนที่หมู่ R ไม่มีขั้วและเป็นไซคลิก				
Proline (Pro หรือ P)				
(3) กรดอะมิโนที่หมู่ R เป็นอะโรมาติก				
Phenylalanine (Phe หรือ F)	Tyrosine (Tyr หรือ Y)	Tryptophan (Trp หรือ W)		
(4) กรดอะมิโนที่หมู่ R ไม่มีประจุ				
Cysteine (Cys หรือ C)	Methionine (Met หรือ M)	Serine (Ser หรือ S)	Threonine (Thr หรือ T)	
(5) กรดอะมิโนที่หมู่ R มีประจุลบหรือเป็นมีหมู่เอไมด์				
Aspartate (Asp หรือ D)	Glutamate (Glu หรือ E)	Asparagine (Asn หรือ N)	Glutamine (Gln หรือ Q)	
(6) กรดอะมิโนที่หมู่ R มีประจุบวก				
Lysine (Lys หรือ K)	Arginine (Arg หรือ R)	Histidine (His หรือ H)		

รูป 1.2 การจัดจำแนกรดอะมิโนตามคุณสมบัติและลักษณะหมู่ R

ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน กรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation reaction) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโพลีเปปไทด์และน้ำ (รูป 1.3a) พันธะที่มีการเชื่อมต่อกันระหว่างกรดอะมิโนแต่ละเรซิดิวเป็นพันธะเปปไทด์หรือพันธะเอไมด์ (amide bond) โดยเรียกชื่อแต่ละหน่วยของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์ว่าเรซิดิว สายโพลีเปปไทด์ที่เกิดขึ้นมีหมู่เอมิโนอิสระอยู่ที่ปลายสุดของสายและหมู่คาร์บอกซิลอิสระอยู่ที่ปลายสุดของสายอีกด้านหนึ่ง เรียกปลายของสายโพลีเปปไทด์ทั้งสองดังกล่าวว่า amino terminal (N-terminal) และ carboxyl terminal (C-terminal) ตามลำดับ (รูป 1.3b) พันธะเปปไทด์เป็นโครงสร้างมีความแข็ง (rigid) และมีลักษณะราบ (planar) ในขณะที่ยพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนที่ตำแหน่งอัลฟาเชื่อมต่อกับอะตอมไนโตรเจน ($C\alpha-N$) หรืออะตอมคาร์บอน ($C\alpha-C$) ของพันธะเปปไทด์สามารถหมุนได้อย่างอิสระ ดังนั้นจึงทำให้สายโพลีเปปไทด์มีรูปร่างแตกต่างกัน พันธะ C-N ที่ไม่ใช่พันธะเปปไทด์มีความยาวเท่ากับ 1.47°A ในขณะที่พันธะเปปไทด์มีความยาวของพันธะเท่ากับ 1.32°A ทั้งนี้เนื่องจากอิเล็กตรอนคูโดดเดี่ยว (lone pair of electrons) ของอะตอมไนโตรเจนของหมู่เอไมด์สามารถเคลื่อนย้ายไปยังอะตอมคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลได้ ซึ่งเรียกว่าปรากฏการณ์เรโซแนนซ์ (resonance effect) (รูป 1.3c) ส่งผลให้พันธะมีความคงตัวสูง รวมทั้งช่วยลดการหมุนของพันธะภายในโครงสร้าง เนื่องจากพันธะเปปไทด์มีลักษณะคล้ายพันธะคู่ ดังนั้นจึงทำให้เกิดไอโซเมอร์ในรูปแบบ *cis* และ *trans* configuration แต่โดยปกติแล้วพันธะเปปไทด์อยู่ในรูปแบบ *trans* configuration ทั้งนี้เพื่อให้ผลของการกีดขวาง (steric effect) ของหมู่ R ของแต่ละเรซิดิวเกิดน้อยที่สุด [4]

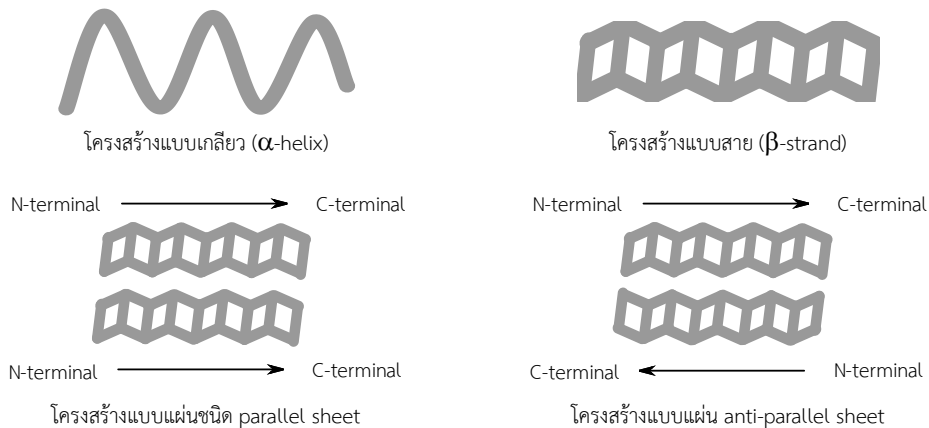


รูป 1.3 (a) ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนกับกรดอะมิโนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีพันธะเปปไทด์ (b) การจัดเรียงเรซิดิวบนสายโพลีเปปไทด์ (c) ปรากฏการณ์เรโซแนนซ์ของพันธะเปปไทด์

(2) โครงสร้างระดับสูง

โครงสร้างระดับสูงของโปรตีนแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) และโครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ โดยปกติโครงสร้างสายโพลีเปปไทด์จะไม่ยึดเป็นแบบเส้นตรง แต่มีจัดเรียงตัวในแบบโครงสร้างทุติยภูมิ ส่วนใหญ่

จะพบที่มีลักษณะเป็นแบบเกลียว (α -helix) และแบบแผ่น (β -sheet) ดังรูป 1.4 เนื่องจากการจัดเรียงตัวที่ทำให้โครงสร้างมีความคงตัวในการเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intra-molecular hydrogen bond) ได้มากที่สุด รวมทั้งทำให้ผลของการกีดขวางหรือการผลักกันระหว่างหมู่ R ของกรดอะมิโนที่อยู่ติดกันเกิดน้อยที่สุด โครงสร้าง α -helix มีเรขาคณิตเรียงต่อกันเป็นเกลียววนขวาและมีหมู่ R ยื่นออกมานอกแกนหลัก (backbone) แต่ละเกลียวประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโน 3.6 เรขาคณิต และมีความยาว 0.56 นาโนเมตร กรดอะมิโนที่ทำให้โครงสร้างเป็นเกลียว เช่น Ala Leu Met Glu เป็นต้น ส่วนในกรณีของ Pro เป็นกรดอะมิโนที่ทำให้โครงสร้างไม่เป็นเกลียว เนื่องจากการเป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่อะมิโนทุติยภูมิ (secondary amino group) ซึ่งมีลักษณะรูปร่างไม่เข้ากับเกลียว Glu Asp His Lys และ Arg เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุ เมื่ออยู่ใกล้กันสามารถเกิดพันธะไอออนิกหรือเกิดการผลักกันระหว่างหมู่ R ได้ ในขณะที่ Trp Val และ Ile เป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่ R ขนาดใหญ่ ซึ่งเมื่ออยู่ใกล้กันทำให้เกิดการกีดขวางต่อโครงสร้างได้ โครงสร้างแบบ α -helix มีความคงตัว เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนซึ่งเกิดขึ้นระหว่างพันธะเปปไทด์มีทิศทางของพันธะขนานกับโครงสร้างแกนหลัก โดยอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิล 1 หมู่ สามารถเกิดแรงดึงดูดกับอะตอมไฮโดรเจนของหมู่อะมิโน 4 เรขาคณิต โครงสร้างแบบ α -helix พบจำนวนมากบริเวณผิวหน้าของโปรตีนก้อนกลม (globular protein) โดยด้านหนึ่งของโครงสร้างอยู่ติดกับส่วนภายในที่ไม่ชอบน้ำ และอีกด้านหนึ่งของโครงสร้างดังกล่าวอยู่ติดกับส่วนภายนอกที่ถูกล้อมรอบด้วยน้ำ ดังนั้นด้านหนึ่งของโครงสร้างจึงเป็นเรขาคณิตที่ไม่ชอบน้ำ และอีกด้านหนึ่งของโครงสร้างเป็นเรขาคณิตที่ชอบน้ำ ในขณะที่โครงสร้างแบบสาย (β -strand) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 5-10 เรขาคณิต และจัดเรียงตัวรูปฟันปลา (zigzag) โดยปกติจะพบโครงสร้างแบบ β -strand สายเดียวน้อยมาก แต่มักอยู่รวมกันมากกว่า 2 สาย เรียกโครงสร้างดังกล่าวว่าโครงสร้างแบบแผ่น β -sheet (หรือแบบแผ่นพับ β -pleated sheet) โดยที่แต่ละสายยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและทิศทางของพันธะไฮโดรเจนตั้งฉากกับแกนหลัก โครงสร้างแบบ β -sheet มีหลายแบบขึ้นอยู่กับการจัดเรียงตัวของแต่ละสายของ β -strand โครงสร้างแบบ parallel sheet หมายถึงแต่ละสายของ β -strand จัดเรียงตัวในทิศทางจาก N-terminal ไปยัง C-terminal เหมือนกัน ในขณะที่โครงสร้างแบบ anti-parallel sheet หมายถึง แต่ละสายของ β -strand จัดเรียงตัวในทิศทางจาก N-terminal ไปยัง C-terminal ต่างกัน ในกรณีที่แต่ละสายของ β -strand จัดเรียงตัวในทิศทางทั้งเหมือนและต่างกัน เรียกว่าโครงสร้างแบบ mixed sheet โดยทั่วไปโครงสร้างทุติยภูมิของโพลีเปปไทด์ประกอบด้วยทั้งส่วนของ α -helix และ β -strand หรือแบบใดแบบหนึ่ง โดยจัดเรียงตัวซ้ำๆ กันตลอดทั้งสายโพลีเปปไทด์ ส่วนที่เหลือของสายโพลีเปปไทด์เรียกว่าลูป (loop) ลูปมีหน้าที่เชื่อมต่อกับส่วนของ α -helix และ β -strand ซึ่งส่งผลให้สายโพลีเปปไทด์มีการขดพับเป็นโครงสร้างตติยภูมิที่อัดแน่น ลูปมีความยาวและรูปร่างที่แตกต่างกันหลายแบบ ตัวอย่างรูปร่างของลูป เช่น โครงสร้างแบบ β -bend (หรือ β -turn) มีหน้าที่กลับทิศทางของสายโพลีเปปไทด์และช่วยให้โปรตีนมีรูปร่างอัดแน่น ซึ่งพบในบริเวณที่มีการเชื่อมต่อ β -strand ของโครงสร้างแบบ anti-parallel sheet โครงสร้างแบบ β -bend ประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโน 4 เรขาคณิต โดยกรดอะมิโนที่พบมากบริเวณลูป เช่น Pro ซึ่งมีหมู่อะมิโนทุติยภูมิ ซึ่งทำให้เกิดการโค้งงอของสาย และ Gly ซึ่งมีหมู่ R ขนาดเล็กสุด เป็นต้น โครงสร้างของลูปมีความคงตัวเกิดจากพันธะไฮโดรเจนและไอออนิก [4, 8]



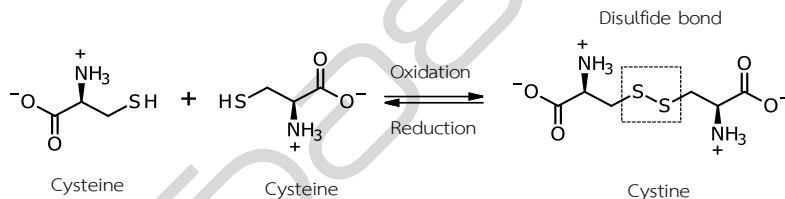
รูป 1.4 โครงสร้างทุติยภูมิแบบต่างๆ ของโพลีเปปไทด์

โครงสร้างทุติยภูมิ หมายถึง โครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่มีการรวมโครงสร้างทุติยภูมิทั้งหมดของสายโพลีเปปไทด์ 1 เส้น โครงสร้างทุติยภูมิของสายโพลีเปปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโนน้อยกว่า 200 เรซิดิว มักมีการจัดเรียงตัวเพียงเป็นหน่วยเดียวอย่างชัดเจน ซึ่งเรียกหน่วยดังกล่าวว่า โดเมน (domain) แต่ในกรณีที่ เป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโนมากกว่า 200 เรซิดิว ภายในโครงสร้างดังกล่าวอาจพบจำนวน 2 โดเมน หรือมากกว่า โดยปกติโดเมนมีลักษณะรูปร่างชัดเจนอย่างอัดแน่น โดยแต่ละหน่วยของโดเมนเชื่อมต่อกันด้วยสายโพลีเปปไทด์ที่มีความยาวและความยืดหยุ่นสูง รูปร่างของโดเมนมีความคงตัวเกิดจากแรง และพันธะเคมีต่างๆ ส่วนในกรณีของโครงสร้างจตุรภูมิของโปรตีนเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนมากขึ้น ซึ่งเกิดจากการเกาะกลุ่มกันของสายโพลีเปปไทด์มากกว่า 1 เส้น แต่ละสายของโพลีเปปไทด์เรียกว่าหน่วยย่อย (subunit) โดยแต่ละสายอาจมีโครงสร้างทุติยภูมิที่เหมือนกันหรือแตกต่างกัน รวมทั้งยึดเหนี่ยวกันด้วยแรง และพันธะเคมีที่เหมือน กับโครงสร้างทุติยภูมิและโครงสร้างตติยภูมิ [4, 8, 9]

(3) ความคงตัวและการขาดของโครงสร้าง

เมื่อเกิดการสังเคราะห์โปรตีนขึ้น สายโพลีเปปไทด์มีการขาดพับเป็นไปตามธรรมชาติ ส่งผลให้ โครงสร้างมีความคงตัวและสามารถทำงานได้ รูปร่างของโปรตีนขึ้นอยู่กับลำดับกรดอะมิโนบนสายโพลีเปปไทด์ เพราะฉะนั้นโพลีเปปไทด์ต่างชนิดกันจะมีรูปร่างแตกต่างกันเสมอ แรงและพันธะที่มีความสำคัญต่อโครงสร้างโปรตีน ได้แก่ แรงดึงดูดอิเล็กโตรสตาติก (electrostatic attraction) แรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) พันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ซึ่งทำให้โปรตีนมีรูปร่างแตกต่างกัน แรงดึงดูดอิเล็กโตรสตาติก ได้แก่ แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals force) แรงยึดเหนี่ยวไอออนิก (ionic interaction) และพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเป็นแรงที่มีพลังงานน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับพันธะโควาเลนต์ แต่ภายในสายโพลีเปปไทด์ มีแรงดึงดูดอิเล็กโตรสตาติกจำนวนมากก็ทำให้โครงสร้างโปรตีนมีความแข็งแรงเช่นกัน แรงแวนเดอร์วาลส์ เป็นแรงที่มีพลังงานน้อยและเกิดขึ้นแบบชั่วคราว โดยเกิดขึ้นเมื่อโครงสร้างของโปรตีนถูกจัดเรียงแบบอัดแน่น ทำให้อะตอมหรือหมู่ R ต่างๆ อยู่ใกล้ชิดกันมากจึงสามารถดึงดูดซึ่งกันและกันได้ แรงยึดเหนี่ยวไอออนิก เป็นแรงที่เกิดขึ้นกับกรดอะมิโน 2 เรซิดิวที่มีหมู่ R ประจุตรงข้าม ซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นบริเวณผิวหน้า

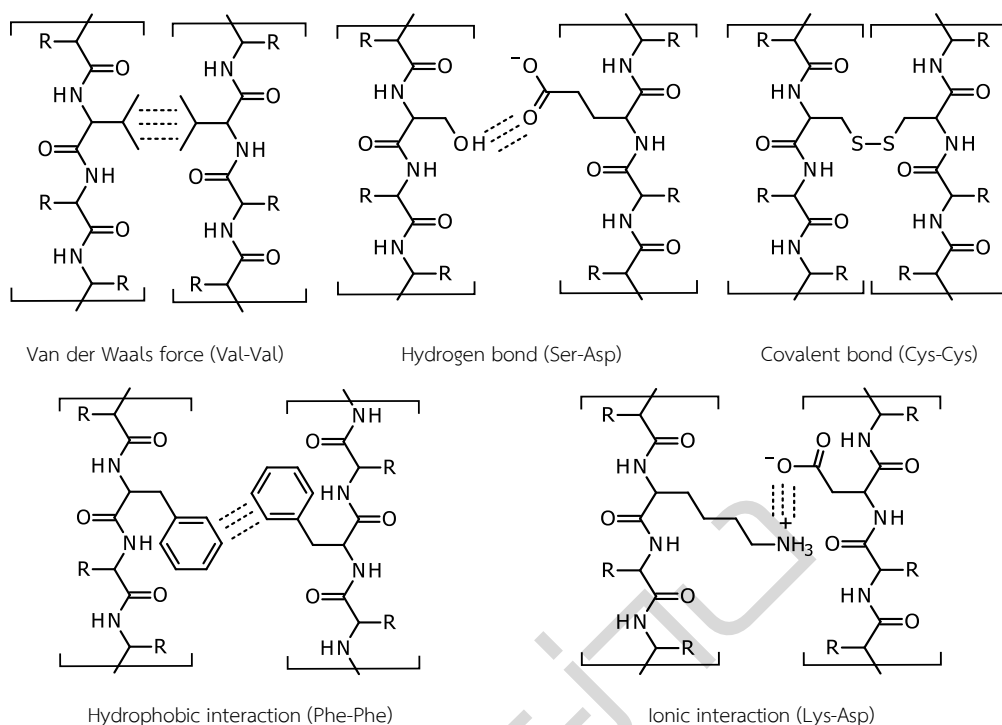
ของสายโพลีเปปไทด์ อาจเรียกแรงดึงดูดดังกล่าวว่าสะพานเกลือ (salt bridge) พันธะไฮโดรเจนที่เกิดภายในโมเลกุล (intra molecular hydrogen bond) เป็นแรงที่พบจำนวนมากในโมเลกุลของโปรตีน แต่ไม่มีอิทธิพลต่อการคงรูปทรงของโปรตีนมากนัก เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนอาจเปลี่ยนแปลงได้ เพราะหมู่ R ของเรซิดิวสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลน้ำได้เช่นกัน แรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิกเป็นแรงเกิดขึ้นกับเรซิดิวที่มีหมู่ R ไม่มีขั้ว ซึ่งพยายามขจัดพบตัวอยู่ภายในของสายโพลีเปปไทด์ เพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับน้ำซึ่งมีขั้วที่อยู่ล้อมรอบภายนอกของโปรตีน พันธะไดซัลไฟด์เป็นพันธะโควาเลนต์หลักที่เกิดขึ้นกับโครงสร้างของโปรตีน พันธะนี้ช่วยให้สายโพลีเปปไทด์คงตัวในรูปทรงสามมิติของโครงสร้างตติยภูมิและโดเมนอยู่ได้ โปรตีนที่อยู่ในเซลล์มักเกิดพันธะไดซัลไฟด์ได้น้อย เนื่องจากหมู่ไรโอของ Cys มักอยู่ในรูปรีดิวซ์ (reduced form) หรือ -SH ในขณะที่โปรตีนที่อยู่ภายนอกเซลล์สามารถเกิดพันธะไดซัลไฟด์ได้ เนื่องจากหมู่ไรโออยู่ในรูปออกซิไดซ์ (oxidized form) หรือ -SR เมื่อหมู่ R คือ อะตอมที่ไม่ใช่ไฮโดรเจน ซึ่งส่วนใหญ่มักเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ หรือ -S-S- โดยมีการใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันระหว่าง Cys กับ Cys เรียกไดเมอร์ดังกล่าวว่าซิสทีน (cystine) ดังรูป 1.5 พันธะไดซัลไฟด์มีความแข็งแรงน้อยกว่าพันธะเปปไทด์ แต่มีความแข็งแรงกว่าแรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิกและแรงดึงดูดอิเล็กโตรสตาติก [4, 8] ตัวอย่างแรงและพันธะของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์แสดงดังรูป 1.6



รูป 1.5 ปฏิกิริยาการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่าง Cys 2 เรซิดิว

1.2.2 การเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัส

โครงสร้างโปรตีนที่สังเคราะห์จากโพรแคริโอต (prokaryote) สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัส (post-translational modification) หรือบางครั้งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการแปลรหัส (co-translational modification) โดยอาศัยเอนไซม์เฉพาะเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาการสร้างพันธะโควาเลนต์ขึ้น ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัสที่เกิดกับโปรตีนภายในเซลล์ (intracellular protein) ที่พบได้บ่อย คือ ฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) ในขณะที่ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัสที่เกิดกับโปรตีนภายนอกเซลล์ (extracellular protein) เช่น ไกลโคซิเลชัน (glycosylation) คาร์บอกซิเลชัน (carboxylation) แอมิเดชัน (amidation) ซัลเฟชัน (sulfation) พันธะไดซัลไฟด์ เป็นต้น ในปัจจุบันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับชีวเภสัชภัณฑ์หลายชนิด โดยใช้ปฏิกิริยาดังกล่าวหลังจากขั้นตอนการผลิตโปรตีนแล้ว การเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัสมีวัตถุประสงค์เพื่อให้โปรตีนที่สร้างขึ้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพ และเพิ่มความคงตัวของโครงสร้างโปรตีน ตัวอย่างของปฏิกิริยาของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหลังการแปลรหัสมีดังนี้



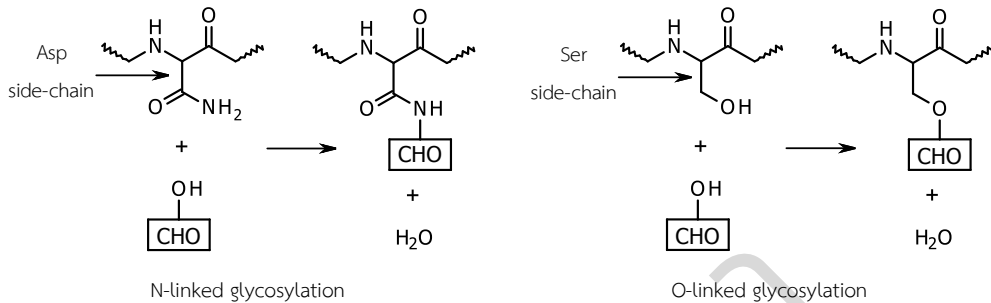
รูป 1.6 แรงและพันธะของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์

(1) ไกลโคซิเลชัน

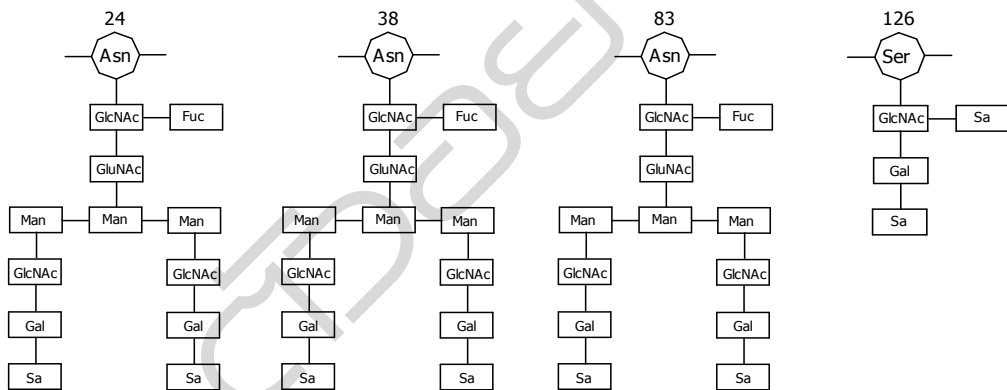
ไกลโคซิเลชันเป็นปฏิกิริยาที่พบมากของการเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเติมหมู่คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) หรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ให้กับสายโพลีเปปไทด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบไกลโคโปรตีน (glycoprotein) หมู่คาร์โบไฮเดรตที่เกิดพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยเอนไซม์กลุ่มเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (glycosyltransferase) ที่บริเวณเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) หมู่คาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบสำคัญของไกลโคโปรตีนบางชนิด เพราะการกำจัดหมู่คาร์โบไฮเดรตออกจะมีผลทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพหมดไป นอกจากหมู่คาร์โบไฮเดรตจะมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของไกลโคโปรตีนโดยตรงแล้ว หมู่คาร์โบไฮเดรตยังมีอิทธิพลต่อโปรตีนในด้านอื่นๆ เช่น การขจัดพิษของสายโพลีเปปไทด์ ให้เกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ การเพิ่มค่าครึ่งชีวิต (half-life) การเพิ่มความคงตัวของโครงสร้างโปรตีน การเพิ่มการละลาย การปกป้องต่อโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ การป้องกันการสลายโปรตีน (proteolysis) เป็นต้น [4, 10]

ปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันของสายโพลีเปปไทด์สามารถเกิดได้ 2 แบบ คือ N-linked และ O-linked โดยไกลโคซิเลชันแบบ N-linked หมู่คาร์โบไฮเดรตหรือโอลิโกแซ็กคาไรด์จะเกิดพันธะโควาเลนต์กับสายโพลีเปปไทด์ที่อะตอมไนโตรเจนของหมู่เอมิโน (ของหมู่ R) ของ Asn ในขณะที่ไกลโคซิเลชันแบบ O-linked หมู่คาร์โบไฮเดรตหรือโอลิโกแซ็กคาไรด์จะเกิดที่อะตอมออกซิเจนของหมู่ไฮดรอกซิล (ของหมู่ R) ของ Ser หรือ Thr (รูป 1.7) ชนิดของโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) ที่พบบ่อยบนหมู่คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ manose galactose glucose xylose sialic acid *N*-acetylgalactosamine และ *N*-acetylglucosamine

โมโนแซ็กคาไรด์ดังกล่าวสามารถจัดเรียงตัวได้หลายรูปแบบ รวมทั้งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) หลายแบบ ตัวอย่างโปรตีนที่พบการเกิดไกลโคซิเลชัน เช่น erythropoietin (EPO) ซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 165 เรซิดิว และเกิดไกลโคซิเลชันแบบ N-linked ที่เรซิดิวลำดับ 24 38 และ 83 และเกิดไกลโคซิเลชันแบบ O-linked ที่เรซิดิวลำดับ 126 [4, 10] การจัดเรียงตัวของน้ำตาลในหมู่คาร์โบไฮเดรตของ EPO แสดงดังรูป 1.8



รูป 1.7 ปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันแบบ N-linked และ O-linked ระหว่างกรดอะมิโนและหมู่คาร์โบไฮเดรตในสายโพลีเปปไทด์ (CHO=carbohydrate)

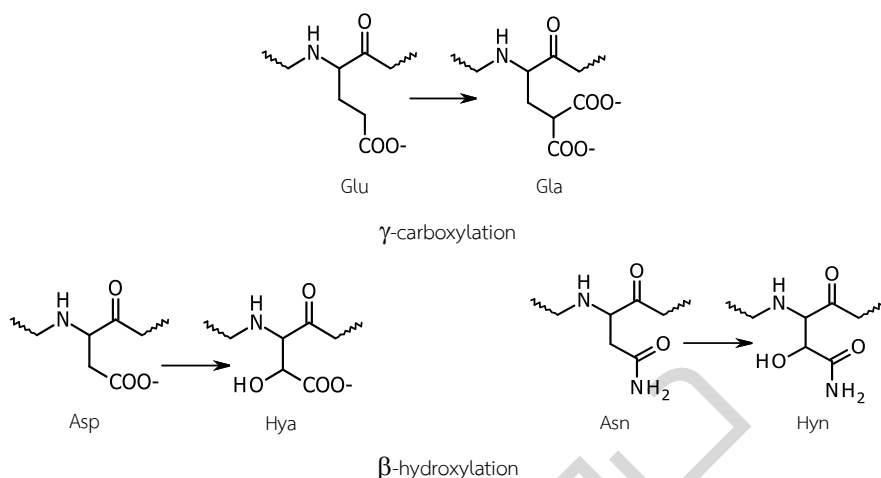


รูป 1.8 การจัดเรียงตัวของโมเลกุลน้ำตาลในหมู่คาร์โบไฮเดรตของ EPO (Man=mannose; Gal=galactose; Glc=glucose; Sa=sialic acid; GalNAc=N-acetyl galactosamine; GlcNAc=N-acetylglucosamine)

(2) แกมมาคาร์บอกซิเลชันและเบตาไฮดรอกซิเลชัน

แกมมาคาร์บอกซิเลชัน (γ -carboxylation) และเบตาไฮดรอกซิเลชัน (β -hydroxylation) ส่วนมากเป็นโปรตีนที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดบางชนิด แกมมาคาร์บอกซิเลชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหมู่ R ของ Gln กลายเป็น γ -carboxyglutamate (Gla) ส่วนในกรณีของเบตาไฮดรอกซิเลชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหมู่ R ของ Asp หรือ Asn ให้กลายเป็น β -hydroxyaspartate (Hya) และ β -hydroxyasparagine (Hyn) ตามลำดับ (รูป 1.9) การเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัสของ

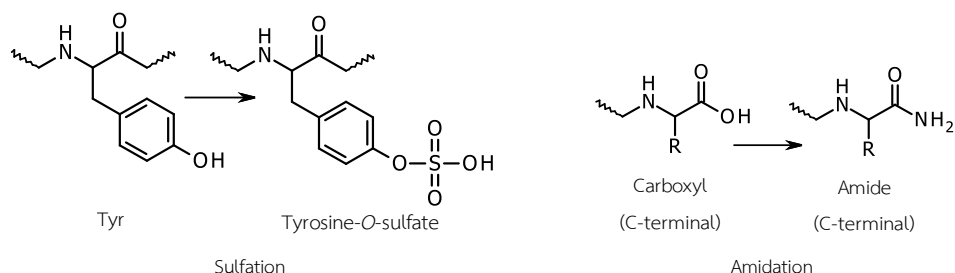
ทั้งสองปฏิกิริยานี้มีส่วนช่วยให้โปรตีนสามารถจับกับแคลเซียมไอออน ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของ factor VII factor IX และ factor X [4, 11]



รูป 1.9 ปฏิกิริยาแกมมาคาร์บอกซิเลชันและเบตาไฮดรอกซิเลชันของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์

(3) ซัลเฟชันและแอมิเดชัน

ซัลเฟชันและแอมิเดชันพบได้ในชีวเภสัชภัณฑ์บางชนิด โดยที่ซัลเฟชันเป็นปฏิกิริยาเคมีสำหรับการเติมหมู่ซัลเฟต (sulfate หรือ SO_4^{2-}) ในสายโพลีเปปไทด์ โดยเฉพาะ Tyr ซึ่งเป็นการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลบนวงฟีนิล (phenyl ring) ของหมู่ R ด้วยหมู่ซัลเฟต (รูป 1.10) ซัลเฟชันมีความสำคัญต่ออันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน และในกรณีที่ไม่มีหมู่ซัลเฟตอาจทำให้โปรตีนมีฤทธิ์ทางชีวภาพลดลงหรือหมดไป ตัวอย่างโปรตีนในธรรมชาติที่มีการเติมหมู่ซัลเฟต เช่น hirudin factor VIII และ factor IX เป็นต้น ส่วนในกรณีของแอมิเดชันเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ C-terminal ของสายโพลีเปปไทด์ โดยการเปลี่ยนแปลงหมู่คาร์บอกซิลให้เป็นหมู่เอไมด์ โดยทั่วไปการเกิดแอมิเดชันมักเกิดขึ้นเฉพาะโพลีเปปไทด์สายสั้น แต่ก็อาจพบได้ในโพลีเปปไทด์สายยาวบางชนิด ได้แก่ forcaltonin ปฏิกิริยาดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความคงตัวและฤทธิ์ทางชีวภาพของโพลีเปปไทด์ [4, 11]



รูป 1.10 ปฏิกิริยาซัลเฟชันและแอมิเดชันของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์

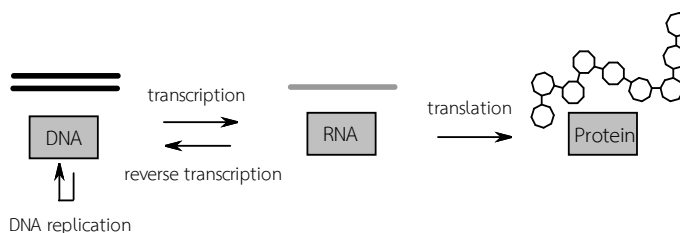
(4) พันธะไดซัลไฟด์

พันธะไดซัลไฟด์พบในโมเลกุลของทั้งโปรตีนที่อยู่ภายนอกเซลล์และชีวโมเลกุลหลายชนิด เช่น แพลกเตอร์การแข็งตัวของเลือด อินซูลิน แอนติบอดี อินเตอร์เฟอรอน เป็นต้น พันธะโควาเลนต์ดังกล่าวนี้ทำให้โครงสร้างโพลีเปปไทด์มีความคงตัว รวมทั้งช่วยรักษาสภาพโครงสร้างทุติภูมิและโครงสร้างตติภูมิของโปรตีน พันธะไดซัลไฟด์เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นจึงไม่สามารถเกิดในไซโทพลาซึม (cytoplasm) ของยูแคริโอตและโพรแคริโอตได้ เนื่องจากเป็นสภาวะที่เอื้อต่อการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ในกรณีของยูแคริโอต พันธะไดซัลไฟด์จะเกิดขึ้นที่เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แต่ถ้าในกรณีของโพรแคริโอตจะเกิดพันธะไดซัลไฟด์ที่เพอริพลาซึม (periplasm) ซึ่งเป็นบริเวณระหว่างไซโทพลาซึมกับเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ [11]

1.3 กรดนิวคลีอิก

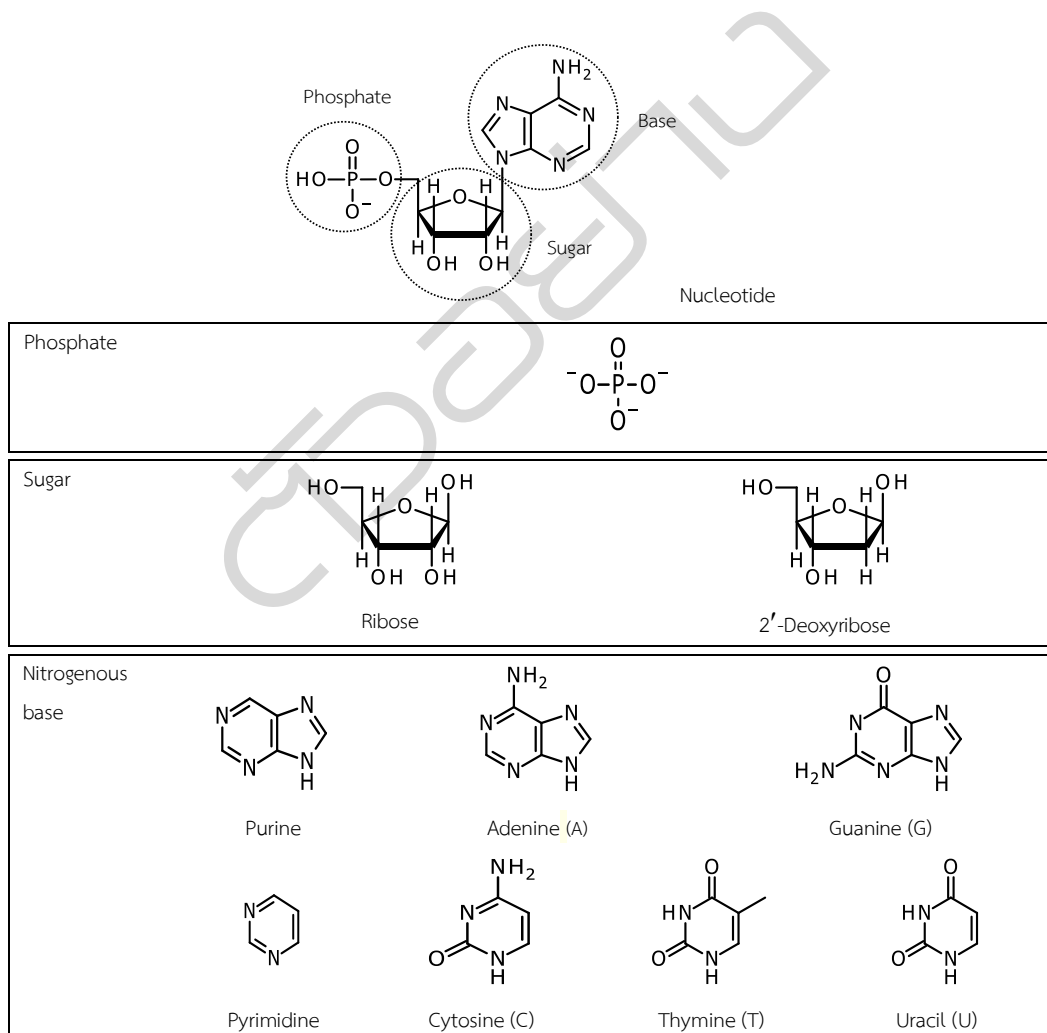
1.3.1 โครงสร้างเคมี

กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ดีเอ็นเอ (DNA หรือ deoxyribonucleic acid) และอาร์เอ็นเอ (RNA หรือ ribonucleic acid) โดยดีเอ็นเอพบบนโครโมโซม (chromosome) ในนิวเคลียสของเซลล์ ซึ่งมีหน้าที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ส่วนในกรณีของอาร์เอ็นเอมีหน้าที่เป็นสื่อกลางในการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมที่เก็บไว้ในลำดับของดีเอ็นเอให้กลายเป็นสายโพลีเปปไทด์ อาร์เอ็นเอจัดจำแนกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (messenger RNA หรือ mRNA) เป็นอาร์เอ็นเอที่ถูกจำลองจากสายใดสายหนึ่งของดีเอ็นเอโดยกระบวนการถอดรหัส (transcription) เพื่อเป็นรหัสพันธุกรรมเพื่อนำส่งจากยีนไปยังไรโบโซม (ribosome) สำหรับใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA หรือ rRNA) สร้างจากดีเอ็นเอ มีหน้าที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของไรโบโซมในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน และทรานสเฟอร์อาร์เอ็นเอ (transfer RNA หรือ tRNA) มีหน้าที่เป็นพาหะสำหรับนำส่งกรดอะมิโนมาต่อเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่ไรโบโซม ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมไปเป็นโปรตีนโดยกระบวนการแปลรหัส (translation) ดังรูป 1.11 เพราะฉะนั้นกรดนิวคลีอิกจึงมีความสำคัญในกระบวนการถอดรหัส และการแปลรหัสของการสังเคราะห์โปรตีน รวมทั้งกระบวนการจำลอง (replication) ของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ [12]



รูป 1.11 กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจากดีเอ็นเอ

กรดนิวคลีอิกเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ ซึ่งมีโมโนเมอร์เป็นนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ดังนั้นจึงอาจเรียกว่าโพลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) โครงสร้างเคมีของนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ หมู่ฟอสเฟต (phosphate group) น้ำตาลเพนโตส (pentose sugar) และเบสที่มีอะตอมไนโตรเจน (nitrogenous base) โดยที่น้ำตาลมีจำนวนคาร์บอน 5 อะตอม ชนิดของน้ำตาลในอาร์เอ็นเอเป็นไรโบส (ribose) ในขณะที่น้ำตาลในดีเอ็นเอเป็นดีออกซีไรโบส (deoxyribose) เบสมีโครงสร้างของวงและมีอะตอมไนโตรเจนอยู่ภายในวง และสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มพิวรีน (purines) ได้แก่ adenine (A) และ guanine (G) และกลุ่มไพริมิดีน (pyrimidines) ได้แก่ cytosine (C) thymine (T) และ uracil (U) โดยที่เบสชนิด adenine guanine และ cytosine พบได้ทั้งในโครงสร้างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ในขณะที่เบสชนิด thymine พบได้ในโครงสร้างดีเอ็นเอเท่านั้น และเบสชนิด uracil พบได้ในโครงสร้างอาร์เอ็นเอเท่านั้น [12] โครงสร้างเคมีและส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอแสดงดังรูป 1.12

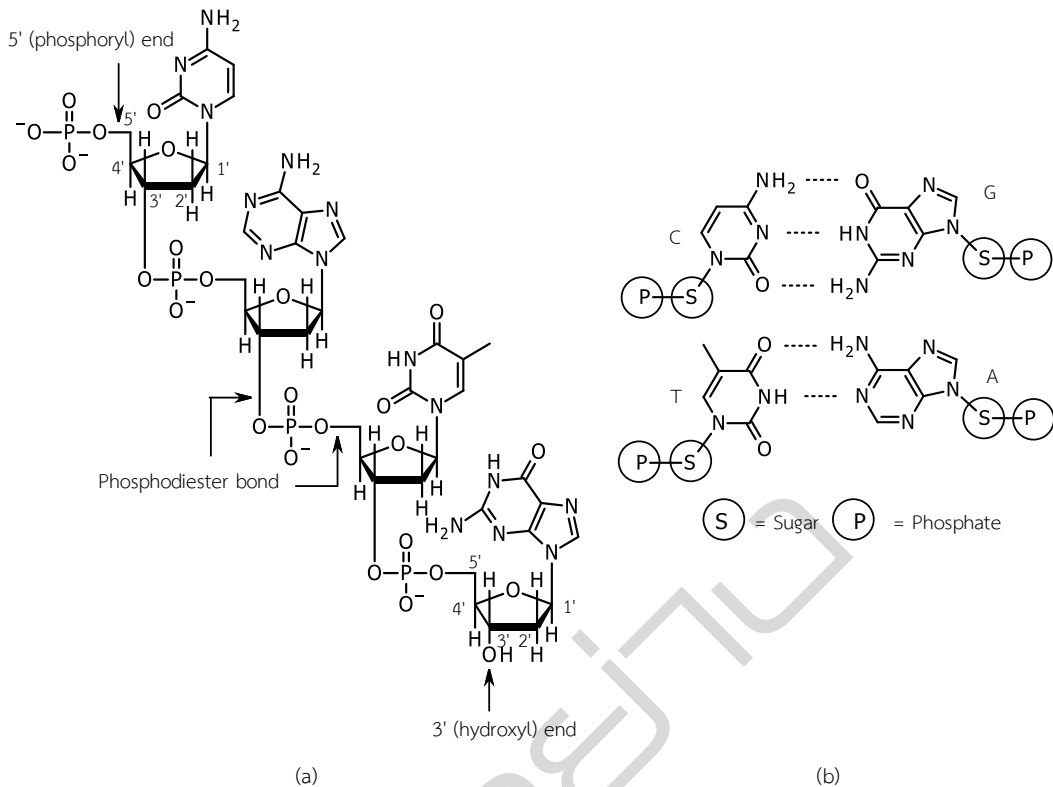


รูป 1.12 โครงสร้างเคมีและส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

นิวคลีโอไทด์แต่ละโมโนเมอร์เชื่อมต่อกันเป็นสายโพลิเมอร์ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) พันธะดังกล่าวเกิดขึ้นระหว่างหมู่ฟอสเฟตของนิวคลีโอไทด์โมเลกุลหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลในนิวคลีโอไทด์โมเลกุลถัดไป เมื่อนิวคลีโอไทด์หลายโมเลกุลมาเชื่อมต่อกันกลายเป็นสายโพลินิวคลีโอไทด์ โดยปลายสายด้านที่มีหมู่ฟอสเฟตเชื่อมต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของน้ำตาลว่า เรียกว่าปลายฟอสไฟริล 5' (5' phosphoryl end) ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเชื่อมต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เรียกว่าปลายไฮดรอกซิล 3' (3' hydroxyl end) ดังรูป 1.13a อาร์เอ็นเอเป็นโพลินิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว (single strand) ส่วนในกรณีของดีเอ็นเอเป็นเป็นโพลินิวคลีโอไทด์สายคู่ (double strand) พันกันเป็นเกลียวในทิศทางขนาบซึ่งกันและกัน หมู่ฟอสเฟตและน้ำตาล ซึ่งมีขั้วจัดเรียงตัวอยู่ด้านนอกของโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับให้หาล้อมรอบ ในขณะที่เบสซึ่งไม่มีขั้วอยู่ด้านในโมเลกุล คู่เบสของแต่ละสายของดีเอ็นเอต้องมีความสัมพันธ์กัน (complementary) ดังนี้ adenine สัมพันธ์กับ thymine (หรือ uracil ในกรณีของอาร์เอ็นเอ) และ guanine สัมพันธ์กับ cytosine ความสัมพันธ์ของเบสดังกล่าวยังพบในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอและกระบวนการถอดรหัส โครงสร้างของดีเอ็นเอสายเกลียวคงรูปอยู่ได้เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของแต่ละสายของดีเอ็นเอ โดยที่คู่เบส adenine และ thymine (หรือ uracil ในกรณีของอาร์เอ็นเอ) สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ ในขณะที่คู่เบส guanine และ cytosine สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ (รูป 1.13b) นอกจากนี้โครงสร้างของคู่เบสของแต่ละสายซึ่งมีรูปร่างแบนราบและไม่ชอบน้ำยังสามารถดึงดูดกันด้วยแรงไฮโดรโฟบิกตลอดทั้งความยาวของสายดีเอ็นเอ [12]

1.3.2 ส่วนประกอบของจีโนมและยีน

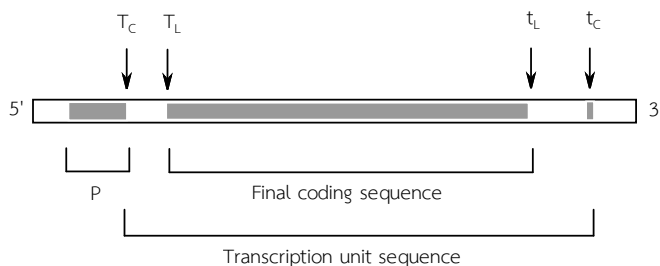
จีโนม (genome) คือ ข้อมูลของรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต จีโนมถูกบันทึกลงบนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั่วไป และลงบนอาร์เอ็นเอของไวรัส ทั้งนี้ดีเอ็นเอเป็นส่วนประกอบหลักของโครโมโซม (chromosome) โปรคาริโอต (prokaryote) ได้แก่ แบคทีเรีย มีโครโมโซมหนึ่งชุดที่มีรูปร่างเป็นวงอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดยังมีโครโมโซมเพิ่มเติมพิเศษในรูปของพลาสมิด (plasmid) ในกรณีของยูแคริโอต (eukaryote) ได้แก่ พืช สัตว์ และยีสต์ มีโครโมโซมหลายชุดที่มีรูปร่างเส้นตรงอยู่ภายในนิวเคลียส (nucleus) ของเซลล์ โครโมโซมดังกล่าวนี้รวมกลุ่มกับโปรตีนฮิสโตน (histone) ซึ่งเรียกรวมกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีนว่าโครมาติน (chromatin) พืชยังมีส่วนของดีเอ็นเอซึ่งมีรูปร่างเป็นวงอยู่ภายในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และคลอโรพลาสต์ (chloroplast) แต่ดีเอ็นเอดังกล่าวมีความยาวสั้นกว่าดีเอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซม ดีเอ็นเอนี้มีหน้าที่สำหรับการผลิตโปรตีนที่สำคัญต่อโครงสร้างขนาดเล็กภายในเซลล์ โครงสร้างของโครโมโซมประกอบด้วยบริเวณที่ใช้แปลรหัส (coding region) และบริเวณที่ไม่ใช่แปลรหัส (non-coding region) โดยที่บริเวณที่ใช้แปลรหัสเป็นส่วนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนมทั้งหมด บริเวณที่ใช้แปลรหัสเรียกว่ายีน (gene) เป็นดีเอ็นเอที่ยึดตัวออกและมีรหัสพันธุกรรมสำหรับใช้ในการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนบนสายโพลิเปปไทด์ หรือการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอและทรานสเฟอร์อาร์เอ็นเอ โครงสร้างของยีนประกอบด้วยบริเวณต่างๆ แต่ละบริเวณถูกกำหนดให้มีหน้าที่เฉพาะสำหรับกระบวนการนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมจากยีนไปสร้างเป็นโปรตีนหรืออาร์เอ็นเอ



รูป 1.13

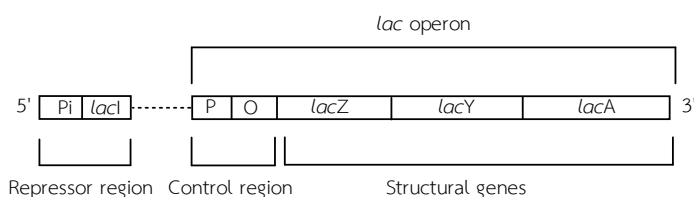
(a) โครงสร้างเคมีของโพลีนิวคลีโอไทด์ (b) การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของแต่ละสายของดีเอ็นเอ

ซึ่งเรียงตัวจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' ดังนี้ บริเวณส่งเสริม (promotor region หรือ P) เป็นส่วนของยีนสำหรับบ่งชี้ให้อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) มาจับแล้วเคลื่อนที่ไปยังบริเวณต่อไปเพื่อสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ เอนไซม์ดังกล่าวมีหน้าที่ถอดรหัสของยีนเพื่อสังเคราะห์เป็นอาร์เอ็นเอ ถัดจากบริเวณส่งเสริมเป็นตำแหน่งเริ่มต้นการถอดรหัส (transcription initiation site หรือ T_C) และตำแหน่งสิ้นสุดการถอดรหัส (transcription terminal site หรือ t_C) ตามลำดับ บริเวณของยีนตั้งแต่ตำแหน่ง T_C ถึง t_C ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกคัดลอกไปเป็นอาร์เอ็นเอ เรียกว่าหน่วยการถอดรหัส (transcription unit) ยีนที่อยู่ภายในหน่วยการถอดรหัสตั้งแต่ตำแหน่งสัญญาณเริ่มต้น (start signal หรือ T_L) จนถึงสัญญาณสิ้นสุด (stop signal หรือ t_L) เรียกว่า final coding sequence มีหน้าที่สั่งให้เกิดการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน (รูป 1.14) นอกจากนี้ยังมีบริเวณอื่นๆ ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งอาจอยู่บริเวณส่วนต้น (upstream region) หรือบริเวณส่วนปลาย (downstream region) หรือทั้งบริเวณส่วนต้นและบริเวณส่วนปลายของหน่วยการถอดรหัส ส่วนในกรณีของบริเวณที่ไม่ใช่แปลรหัสจะมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ หลายแบบ [12]



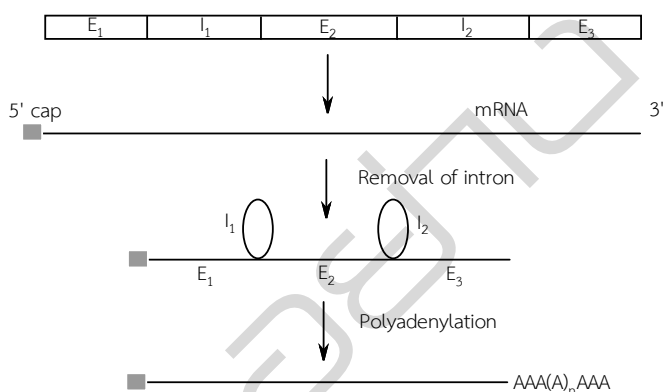
รูป 1.14 บริเวณและตำแหน่งต่างๆ บนโครงสร้างของยีน (T_C = transcription initiation site; T_L =start signal; t_L stop signal; t_C =transcription terminal site)

โปรแคริโอตและยูแคริโอตมีลักษณะการจัดเรียงตัวของโครงสร้างยีนแตกต่างกัน กรณีของโปรแคริโอต ยีนที่มีหน้าที่คล้ายกันอยู่รวมกลุ่มภายในโอเปอรอน (operon) โครงสร้างของโอเปอรอนประกอบด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene) ซึ่งมีชุดยีนสำหรับสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ และบริเวณส่งเสริมและควบคุม (promoter/regulator region) เพื่อควบคุมการทำงานของยีน ตัวอย่างของโอเปอรอน เช่น *lac* operon ประกอบด้วยยีนโครงสร้างซึ่งเป็นชุดของรหัสที่มีหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ β -galactosidase (*lacZ*) galactose permease (*lacY*) และ transacetylase (*lacA*) ซึ่งใช้สำหรับการเมตาบอริสมแล็กโตส (lactose) โดยที่บริเวณส่วนหน้าของยีนโครงสร้างประกอบด้วยบริเวณควบคุม (control region) โดยมีลำดับรหัสส่งเสริม (promoter sequence หรือ P) และลำดับรหัสดำเนินการ (operator sequence หรือ O) ซึ่งใช้เป็นตำแหน่งสำหรับจับกับอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสเพื่อการถอดรหัส นอกจากนี้ยังมีส่วนของยีนที่อยู่นอกโอเปอรอนซึ่งเป็นบริเวณบังคับ (repressor region) ประกอบด้วยลำดับรหัสบังคับ (repressor sequence หรือ P_i) และลำดับรหัสสำหรับสังเคราะห์โปรตีนบังคับ (lactose repressor หรือ *lacI*) (รูป 1.15) ในสถานะที่เซลล์ไม่มีแล็กโตส โปรตีนบังคับจะถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อจับกับลำดับรหัสดำเนินการส่งผลให้ป้องกันการจับของอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส ดังนั้นจึงยับยั้งการทำงานของโอเปอรอนและหยุดการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดต่างๆ แต่ถ้าในสถานะที่เซลล์มีแล็กโตส โอเปอรอนจะเกิดการถอดรหัสได้เอ็มอาร์เอ็นเอที่มีรหัสเพื่อนำไปสังเคราะห์เอนไซม์ต่อไป [12, 13]



รูป 1.15 โครงสร้างยีนของโปรแคริโอต (P_i =repressor region; P=promoter sequence; O=operator sequence; *lacZ*= β -galactosidase; *lacY* galactose permease; *lacA*=transacetylase; *lacI*=lactose repressor)

ส่วนในกรณีของยูแคริโอต ยีนสำหรับถอดรหัสเพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีนแต่ละชนิดอยู่แยกจากกัน โครงสร้างของยีนประกอบด้วยเอ็กซอน (exon หรือ E) ซึ่งหมายถึง ลำดับรหัสที่สามารถนำไปสังเคราะห์โปรตีน และอินทรอน (intron หรือ I) ซึ่งหมายถึง ลำดับรหัสที่ไม่สามารถนำไปสังเคราะห์โปรตีน เอ็กซอนและอินทรอนมักอยู่สลับกันไปมา ดังนั้นเอ็มอาร์เอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการถอดรหัสดังกล่าวต้องผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเติมหมวก (cap) หรือเติมหมู่ 7-methylguanosine ที่ปลาย 5' การตัดส่วนอินทรอนออก และเชื่อมต่อกันของเอ็กซอน และการเติมส่วนท้ายโพลีเอดีนีนนิวคลีโอไทด์ (polyadenine nucleotide tail หรือ poly A tail) ที่ปลาย 3' ตามลำดับ กระบวนการถอดรหัสของยีนแสดงดังรูป 1.16 การเติมหมวกและเติมหางให้กับเอ็มอาร์เอ็นเอเพื่อช่วยป้องกันการถูกย่อยสลายจากนิวคลีเอส (nuclease) ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างหน่วยย่อยนิวคลีโอไทด์ของเอ็มอาร์เอ็นเอ [12, 13]



รูป 1.16 กระบวนการถอดรหัสของยีนในยูแคริโอต (E=exon; I=intron; AAA(A)_nAAA=polyadenine nucleotide tail)

1.4 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตชีวเภสัชภัณฑ์

การผลิตชีวเภสัชภัณฑ์อาศัยองค์ความรู้ทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ แต่ละองค์ความรู้มีลักษณะแตกต่างกันดังนี้ ชีววิทยาโมเลกุลเป็นการศึกษาชีววิทยาในระดับโมเลกุล โดยเน้นศึกษาที่โครงสร้าง การทำงาน และปฏิสัมพันธ์ของดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และชีวสังเคราะห์ของโปรตีน พันธุวิศวกรรมเป็นการอธิบายกระบวนการจัดการยีนภายนอกเซลล์ เช่น การปรับเปลี่ยน การตัดแปลง การนำส่ง เป็นต้น เพื่อนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ในการผลิตชีวเภสัชภัณฑ์ เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเป็นวิธีเตรียมรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA หรือ rDNA) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นในหลอดทดลอง โดยส่วนประกอบของดีเอ็นเออาจได้จากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์ [12]

ในการประเมินโปรตีนชนิดต่างๆ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาชีวเภสัชภัณฑ์ที่มีศักยภาพและสามารถใช้เป็นยารักษาโรคได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถของการผลิตโปรตีนชนิดนั้นๆ วิธีการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณเพียงพอตามความต้องการนั้นจำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อดีและข้อได้เปรียบมากกว่าการสกัดโดยตรงจากแหล่งกำเนิดโปรตีนที่ผลิตในธรรมชาติ กระบวนการผลิตโปรตีนด้วยเทคโนโลยี

รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเริ่มต้นจากการค้นหา การพิสูจน์ และการแยกดีเอ็นเอที่มีการจัดเรียงลำดับรหัสพันธุกรรมตรงกับโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการผลิต ดีเอ็นเอที่ได้จากเซลล์ที่ผลิตโปรตีนโดยตรงเรียกว่า จีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) หรือได้จากเอ็มอาร์เอ็นเอแล้วนำไปถอดรหัสกลับ (reverse transcription) ได้เป็นดีเอ็นเอเรียกว่า คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ (complementary DNA หรือ cDNA) หลังการนั้นดีเอ็นเอจึงถูกคัดลอกเพื่อเพิ่มปริมาณ ตรวจสอบลำดับรหัส และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมโดยใช้พาหะ (vector) ในปัจจุบันโปรตีนที่ใช้เป็นชีวเภสัชภัณฑ์นิยมผลิตจากแบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli* (*E. coli*) *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) เป็นต้น หรือเซลล์ไลน์ (cell line) เช่น Chinese hamster ovary (CHO) baby hamster kidney (BHK) เป็นต้น เพื่อให้เซลล์เจ้าบ้านผลิตโปรตีนเป้าหมายตามต้องการต่อไป [12] การผลิตโปรตีนจากเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1.4.1 การค้นหาและการพิสูจน์ยืนยัน

การค้นหาแหล่งที่เหมาะสมสำหรับแยกยีนเป้าหมายเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากยีนอาจได้มาจากทั้งดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอของเนื้อเยื่อ เซลล์ แบคทีเรีย หรือไวรัส โดยปกติจะพบยีนเป้าหมายปริมาณมากในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่สามารถผลิตโปรตีนจากยีนชนิดนั้นๆ ในปริมาณสูง เอ็มอาร์เอ็นเอที่มีรหัสของโปรตีนเป้าหมายสามารถถูกแยกได้จากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการยีนเพื่อการผลิตโปรตีนที่มีหน้าที่กำจัดแบคทีเรียและไวรัส แหล่งที่มาของยีนเป้าหมายเพื่อใช้สำหรับการแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอควรได้มาจากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสดังกล่าว หรือถ้าต้องการยีนที่ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนภายในร่างกายสำหรับใช้เพื่อการรักษา แหล่งที่มาของยีนเป้าหมายที่เหมาะสมเพื่อนำมาแยกควรได้มากจากเนื้อเยื่อที่ผลิตโปรตีนดังกล่าวนั่นเอง นอกจากนี้ยังมีวิธีการเดิมสารชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการผลิตโปรตีนเป้าหมายลงในเนื้อเยื่อหรือเซลล์เพาะเลี้ยง ทั้งนี้เพื่อต้องการเพิ่มปริมาณการผลิตเอ็มอาร์เอ็นเอ เช่น การเติมโกรทฮอร์โมนและสเตียรอยด์บางชนิดซึ่งกระตุ้นให้เซลล์หลายชนิดเพิ่มการแสดงออกของยีนมากขึ้น ส่งผลให้เอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนมีปริมาณสูงขึ้น [14]

การแยกดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอออกจากเซลล์เป้าหมาย เป็นขั้นตอนหนึ่งของเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกใช้เทคนิคการทำการดนิวคลีอิกให้บริสุทธิ์ (nucleic acid purification) มีดังนี้ ชนิดของกรดนิวคลีอิกที่ต้องการเป็นดีเอ็นเอหรือเอ็มอาร์เอ็นเอ เซลล์เป้าหมายที่มีกรดนิวคลีอิกเป็นไวรัส แบคทีเรีย เซลล์พืช หรือเซลล์สัตว์ ตัวอย่างวัตถุชีวภาพเป็นเนื้อเยื่อ เซลล์เพาะเลี้ยง หรือเลือด รวมทั้งเทคนิคการแยกจากวัตถุชีวภาพซึ่งจำเป็นต้องทำให้เซลล์แตก วิธีการยับยั้งการทำงานของนิวคลีเอส และเทคนิคการแยกกรดนิวคลีอิกที่ต้องการออกจากเศษเซลล์ (cell debris) การทำให้เซลล์แตกต้องมีความรุนแรงเพียงพอที่จะทำให้ส่วนประกอบของเซลล์แตกเป็นชิ้น และต้องมีความอ่อนโยนเพียงพอที่จะป้องกันการสูญเสียสภาพของกรดนิวคลีอิก การทำการดนิวคลีอิกให้บริสุทธิ์มีหลายวิธีและบางวิธีอาจใช้ชุดการแยกสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายโดยทั่วไปการแยกกรดนิวคลีอิกจากวัตถุชีวภาพมี 2 วิธี ได้แก่ วิธีเชิงกล (mechanical method) เช่น การปั่นผสม (homogenization) การใช้คลื่นเสียง (sonication) เป็นต้น และวิธีเชิงเคมี (chemical method) เช่น การเติมสารลดแรงตึงผิว (detergent) การเติมตัวทำละลาย (solvent) เป็นต้น หลังจากนั้นแล้วจึงใช้เทคนิคการทำการดนิวคลีอิกให้บริสุทธิ์ ซึ่งต้องอาศัยการสกัด (extraction) และการตกตะกอน (precipitation) เพื่อการแยก

สิ่งปนเปื้อนออกจากกรดนิวคลีอิก ตัวอย่างเช่น การใช้สารผสมฟีนอล (phenol) และคลอโรฟอร์ม (chloroform) เพื่อแยกโปรตีน การใช้เกลือความเข้มข้นสูงเพื่อตกตะกอนโปรตีน เป็นต้น และเทคนิคโครมาโตกราฟี (chromatography) ที่มีหลักการแตกต่างกัน เช่น การกรองผ่านเจล (gel filtration) การแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) การดูดซับ (adsorption) แอฟฟินิตี (affinity) เป็นต้น นอกจากนี้ยังอาจใช้เทคนิคอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น การหมุนเหวี่ยง (centrifugation) อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นต้น ในกรณีที่ต้องการเฉพาะดีเอ็นเอต้องเติมไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) เพื่อทำลายอาร์เอ็นเอที่ปนอยู่กับดีเอ็นเอ แต่ถ้าต้องการเอ็มอาร์เอ็นเอจำเป็นต้องแยกด้วยคอลัมน์ชนิดพิเศษ เช่น oligo dT column ซึ่งบรรจุด้วยเม็ดลูกปัด (bead) ที่มีสายโซ่สั้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxythymidylate short chain) ตรึงอยู่ ซึ่งสามารถจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอไว้ในคอลัมน์ด้วยพันธะไฮโดรเจน เนื่องจากเอ็มอาร์เอ็นเอมีส่วนท้าย โพลีอะดีนีนนิวคลีโอไทด์ (poly A tail) ที่ปลาย 3' [12]

การตรวจหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) เป็นวิธีการพิสูจน์การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ Maxam-Gilbert sequencing method เป็นวิธีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาเคมีและแยกเป็นชิ้นส่วนตามนิวคลีโอไทด์ที่กำหนด โดยไม่มีการสร้างดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่ วิธีนี้ใช้ร่วมกับการติดฉลากด้วยสารรังสี การตรวจหาลำดับดีเอ็นเอโดยวิธีนี้ค่อนข้างซับซ้อนจึงไม่นิยม ในขณะที่ Sanger-Coulson sequencing method (หรือ chain termination method) เป็นวิธีทางเอนไซม์โดยสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขึ้นโดยใช้ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ชิ้นส่วนดังกล่าวมีสัมพันธ์กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจหาลำดับ หลังจากนั้นแยกชิ้นส่วนตามขนาดโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยแต่ละชิ้นส่วนจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 5' เหมือนกัน แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' แตกต่างกัน การตรวจหาลำดับดีเอ็นเอทำได้โดยอ่านแถบบนเจลด้วยเครื่องบันทึกภาพรังสี (autoradiography) ลำดับดีเอ็นเอของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นเริ่มจากปลาย 5' ไปยัง 3' จะมีความสัมพันธ์กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการพิสูจน์ ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาลำดับดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่มากมาย ทั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อลดเวลาและค่าใช้จ่าย รวมทั้งเพิ่มความถูกต้องและความยาวของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการพิสูจน์ [12, 15]

1.4.2 การคัดลอกยีน

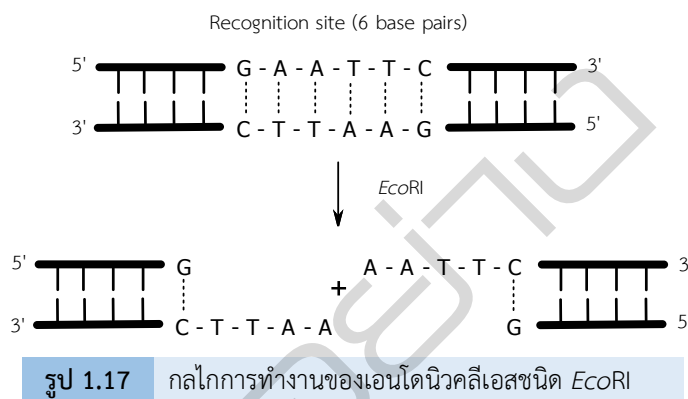
การคัดลอกยีน (gene cloning) เพื่อใช้การผลิตโปรตีนเพื่อการรักษาสามารถจำแนกเป็น 3 วิธี ได้แก่ การคัดลอกยีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอ การคัดลอกยีนจากซีดีเอ็นเอ และการคัดลอกยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ แต่ละวิธีมีรายละเอียดดังนี้

(1) การคัดลอกยีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอ

การคัดลอกยีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA cloning) เป็นวิธีการคัดลอกยีนแบบดั้งเดิม โดยเริ่มต้นจากดีเอ็นเอในโครโมโซมซึ่งมี 5 ขั้นตอนตามลำดับดังนี้

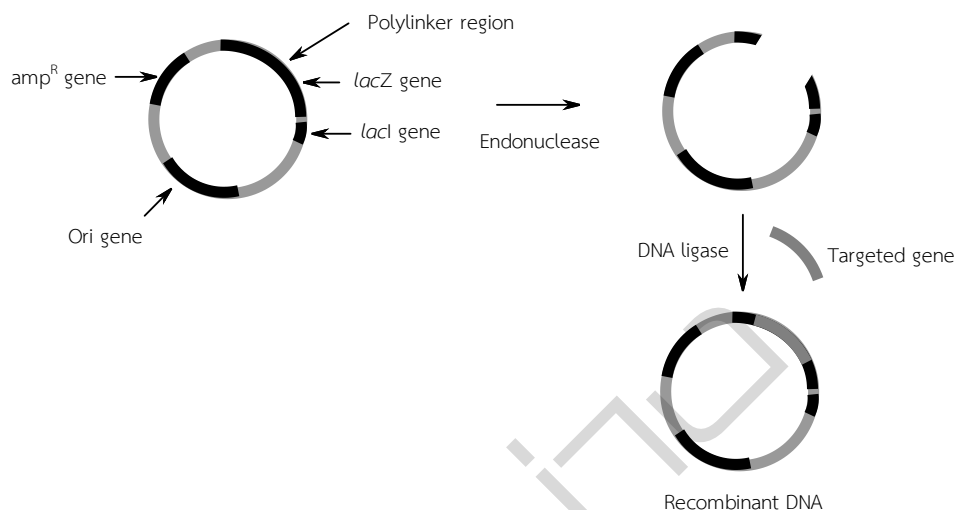
ขั้นตอนการแยกชิ้นส่วน (fragmentation step) เป็นการย่อยจีโนมิกดีเอ็นเอออกเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเป้าหมายโดยใช้เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) เอนโดนิวคลีเอสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียเพื่อทำลายดีเอ็นเอของไวรัส เอนโดนิวคลีเอสเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับและตัดลำดับของนิวคลีโอไทด์ในบริเวณจดจำ (recognition site) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีปลายสาย 2 แบบ คือ ปลายเหนียว (sticky end) เป็นปลายที่มีสายดีเอ็นเอยื่นออกมา และปลายเรียบ (blunt end) เป็นปลายที่ไม่มีสายดีเอ็นเอยื่นออกมา ตัวอย่างคือเอนไซม์ *EcoRI* แยกได้จาก *E. coli* สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณ 5'-G↓AATC-3' และ 3'-CTTA↑G-5' ของสายคู่ดีเอ็นเอ (ดังรูป 1.17) เอนไซม์ดังกล่าวที่แยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ มีความสามารถในการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยปกติเอนโดนิวคลีเอสชนิดต่างๆ มีบริเวณจดจำที่มีความยาว 4-8 คู่เบส ในกรณีถ้าใช้เอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำยาวมากจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวนน้อยชนิดที่แตกต่างกัน ชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวส่วนหนึ่งจะมีขนาดเหมาะสมและมียีนที่ต้องการคัดลอกอยู่ ตามทฤษฎีแล้วในชิ้นส่วนดีเอ็นเอต้องมียีนที่ต้องการคัดลอกเพียงหนึ่งยีนเท่านั้น [12-14]



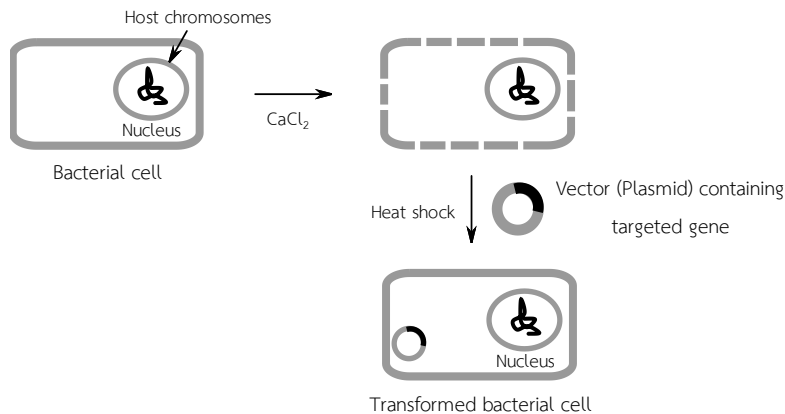
ขั้นตอนการรวมตัว (integration step) เป็นการนำชิ้นส่วนยีนเป้าหมายที่ได้จากขั้นตอนแรกมารวมตัวกับพาหะ พาหะที่ใช้สำหรับนำส่งยีนเป้าหมายเข้าเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ได้แก่ พลาสมิด (plasmid) หรือแบคทีริโอฟาจ (bacteriophage) พลาสมิดเป็นสายของดีเอ็นเอที่มีลักษณะต่อเป็นวงอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ส่วนในกรณีของแบคทีริโอฟาจ หรือเรียกว่า ฟาจ (phage) เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอและเป็นไวรัสที่มีความสามารถทำให้แบคทีเรียติดเชื้อ ทั้งพลาสมิดและฟาจมีคุณสมบัติพิเศษในการเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้ ดังนั้นพาหะจึงเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดเล็ก ซึ่งมีคุณสมบัติคงตัวเมื่อนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมาต่อเข้าหรือตัดออก พาหะประกอบด้วยยีนหลายชนิดอยู่ภายใน ตัวอย่างเช่น พลาสมิด pUC18 มีขนาดความยาว 2,686 คู่เบส แยกได้จาก *E. coli* DH5 α ซึ่งประกอบด้วยยีน 4 ชนิด ได้แก่ ยีนแสดงการดื้อต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) (*amp^R* gene) ยีนแสดงการสังเคราะห์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) (*lacZ* gene) ยีนแสดงการควบคุมการถอดรหัสของ *lacZ* (*lacI* gene) และยีนแสดงการถ่ายแบบของพลาสมิด (*ori* gene) (ดังรูป 1.18) ทั้งนี้พลาสมิดดังกล่าวมีบริเวณ polylinker อยู่ภายใน *lacZ* gene ซึ่งประกอบด้วยบริเวณจดจำมากมายของเอนโดนิวคลีเอสเพื่อใช้สำหรับการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อดีเอ็นเอของพาหะรวมตัวกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนเป้าหมายที่ต้องการคัดลอกโดยใช้ทั้งเอนโดนิวคลีเอสและดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) เริ่มต้นจากดีเอ็นเอของพาหะถูกตัดแยกด้วยเอนโดนิวคลีเอสก่อน ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เอนโดนิวคลีเอสชนิดเดียวกับขั้นตอนในการแตกดีเอ็นเอออกเป็น

ชิ้นส่วน ดังนั้นจึงทำให้ทั้งดีเอ็นเอของพาหะและชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีปลายเหนียวเหมือนกัน หลังจากนั้นจึงใช้ดีเอ็นเอไลเกสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์สำหรับการเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอของพาหะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เรียกโมเลกุลดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่ว่า รีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ [12-14]



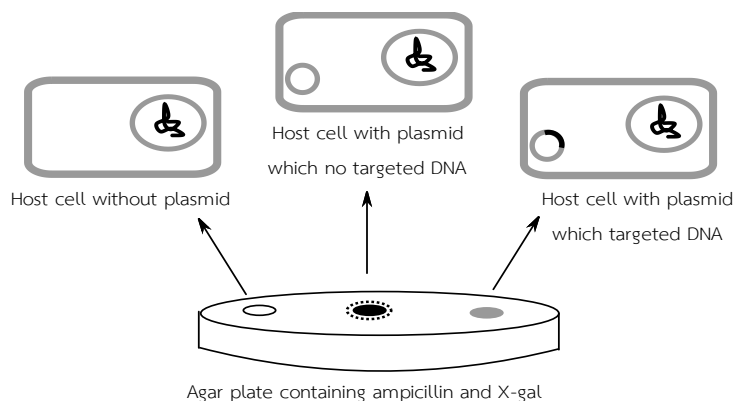
รูป 1.18 กลไกการรวมตัวดีเอ็นเอของพลาสมิด pUC18 และยีนเป้าหมายเพื่อการคัดลอก

ขั้นตอนทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation step) เป็นกระบวนการนำดีเอ็นเอจากภายนอกผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ การนำพาหะที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายใส่เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นแบคทีเรีย เรียกว่า ทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) แต่ถ้าในกรณีเซลล์เจ้าบ้านเป็นเซลล์สัตว์ชั้นสูง เรียกว่า ทรานส์เฟกชัน (transfection) กระบวนการดังกล่าวนี้มีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยม คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ร่วมกับพาหะในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) เมื่อคลอไรด์ไอออนเข้าสู่เซลล์ทำให้โมเลกุลของน้ำผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เซลล์บวมน้ำ จากนั้นจึงใช้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจาก 0 ไปเป็น 42 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว การช็อคด้วยความร้อนมีผลทำให้พาหะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน วิธีแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride method) เพื่อการนำพาหะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแสดงดังรูป 1.19 ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและมีราคาถูก [12-14]



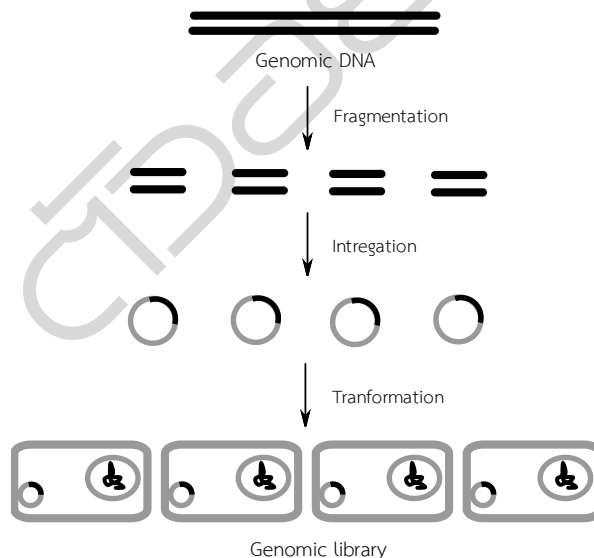
รูป 1.19 กระบวนการนำพาหะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยใช้วิธีแคลเซียมคลอไรด์

ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ (cultivation step) โดยปกติโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะแตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์เจ้าบ้านที่ไม่มีพาหะ เซลล์เจ้าบ้านที่มีพาหะแต่ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายและเซลล์เจ้าบ้านที่มีพาหะและชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้นหลักการของการเลี้ยงเซลล์บนจานอาหารจึงต้องมีการเติมสารต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สามารถแยกเซลล์ที่ต้องการออกจากเซลล์อื่นๆ ตัวอย่าง เช่น ในกรณีถ้าใช้พลาสมิด pUC18 เป็นพาหะ โดยที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการคัดลอกต่อเข้ากับบริเวณ polylinker ของพลาสมิด อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จำเป็นต้องเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สามารถถูกย่อยด้วยเบต้า-กาแลกโตซิเดสแล้วได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงิน ดังนั้นเซลล์เจ้าบ้านที่ไม่มีพาหะจะไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้ เนื่องจากไม่มียีนแสดงการดื้อต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และเซลล์เจ้าบ้านที่มีพาหะแต่ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายสามารถเจริญได้แต่ให้สีน้ำเงิน เนื่องจากเซลล์ผลิตเบต้า-กาแลกโตซิเดสทำให้สามารถย่อย X-gal ได้ผลิตภัณฑ์มีสีน้ำเงิน (รูป 1.20) ดังนั้นจึงสามารถจำแนกโคโลนีของเซลล์เจ้าบ้านที่มีพาหะและชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายได้จากนั้นจึงนำเซลล์จากโคโลนีดังกล่าวไปแยกเพาะเลี้ยงต่อไป [12-14]



รูป 1.20 ขั้นตอนการเลี้ยงและจำแนกเซลล์เจ้าบ้านชนิดต่างๆ

ขั้นตอนการคัดเลือกและการพิสูจน์ (screening and identification step) เนื่องจากตอนเริ่มต้นของกระบวนการคัดลอกยีนจากจีโนมิตีเอ็นเอได้มีการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนโดนิวคลีเอส ดังนั้นจึงได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวนมากที่มียีนต่างกัน เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวไปคัดลอกทำให้ได้ห้องสมุดจีโนมิก (genomic library) ดังรูป 1.21 การพิสูจน์โคลนของเซลล์เจ้าบ้านที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย เพื่อให้สามารถแยกจากเซลล์เจ้าบ้านที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนอื่นๆ จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง วิธีพื้นฐานที่นิยม คือ การใช้โพรบ (probe) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (radioactive) หรือสารเรืองแสง (fluorescent) โดยโพรบที่ถูกสังเคราะห์ให้ขึ้นต้องมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับยีนเป้าหมาย แต่การสังเคราะห์โพรบดังกล่าวขึ้นมาได้นั้น จำเป็นต้องทราบการจัดเรียง ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนที่ต้องการผลิต เทคนิคโคลนไฮบริไดเซชัน (colony hybridization) เป็นเทคนิคหนึ่งในการคัดเลือกและการพิสูจน์ วิธีการทำโดยการวางกระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose paper) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคลนต่างๆ อยู่ ซึ่งทำให้เซลล์บางส่วนของแต่ละโคลนเกาะติด กระดาษ จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้สารละลายต่าง ซึ่งทำให้ได้ดีเอ็นเอที่เสียดสีกลายเป็นสายเดี่ยวเกาะติดที่กระดาษ นำกระดาษสัมผัสกับสารละลายที่มีโพรบในสภาวะที่ทำให้เกิดการหลอมรวมกับยีนเป้าหมาย หลังจากนั้นล้างโพรบส่วนเกินที่ไม่ต้องการออก และตรวจหาตำแหน่งโพรบที่เกาะติดยีนบนกระดาษด้วยเครื่องบันทึกภาพรังสี ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สัมพันธ์กับโคลนที่มียีนเป้าหมายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ [12-14]



รูป 1.21 ห้องสมุดจีโนมิก

(2) การคัดลอกยีนจากซีดีเอ็นเอ

การคัดลอกยีนจากซีดีเอ็นเอ (cDNA cloning) หรือคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA) เป็นการคัดลอกยีนผ่านเอ็มอาร์เอ็นเอซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในกรณีที่ไม่มีจีโนมิตีเอ็นเอ การคัดลอกยีนเป้าหมายเริ่มต้นจากเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยไม่ต้องย่อยจีโนมิตีเอ็นเอออกเป็นชิ้นส่วน เทคนิคการคัดลอกยีนดังกล่าว

ชีวเภสัชภัณฑ์ การออกแบบและพัฒนา Biopharmaceuticals: Design & Development

ปัจจุบันมีชีวเภสัชภัณฑ์หลายชนิดได้รับการออกแบบและพัฒนาเพื่อใช้ในทางการแพทย์ ซึ่งบางส่วนได้รับการขึ้นทะเบียนยาแล้ว และอีกจำนวนมากยังอยู่ระหว่างขั้นตอนการวิจัยและพัฒนา ในอนาคตอันใกล้คาดว่าจะมีส่วนการเพิ่มขึ้นของจำนวนชีวเภสัชภัณฑ์ใหม่จะมีมากกว่ายาที่ผลิตโดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี กลุ่มชีวเภสัชภัณฑ์ที่อยู่ในความสนใจในปัจจุบัน ได้แก่ ไชโตไคน์ โกรทแฟคเตอร์ โมโนโคลนอลแอนติบอดี เปปไทด์ฮอร์โมน โปรตีนเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด และเอนไซม์เพื่อการรักษา



สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร
Naresuan University Publishing House



ISBN 978-616-7902-36-4



9 786167 902364

฿ ราคา 320 บาท