



วารสาร ไทยไกลชยนิพนธ์

ปีที่ 3 ฉบับเดือนเมษายน พ.ศ. 2549 (หน้า 1-15)

บทความพิเศษวิชาการ สำหรับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์ (on-line)



โฟเลต: จากวิตามินสู่การพัฒนา

(Folate: from vitamin to drug development)

รหัส 1-000-SPU-000-0604-01

จำนวน 2.5 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง

วันที่รับรอง: 1 เมษายน พ.ศ. 2549

วันที่หมดอายุ: 1 เมษายน พ.ศ. 2551

ภก.ดร.ธีรศักดิ์ โรจนราชา

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เพื่อให้ผู้อ่านได้ทราบถึงคุณสมบัติ ที่มา แหล่งที่พบและความสำคัญของโฟเลตในการดำรงชีวิต
2. เพื่อให้ผู้อ่านได้ทราบถึงบทบาทของโฟเลตในการเป็นวิตามิน และการเสริมโฟเลตในผลิตภัณฑ์อาหาร
3. เพื่อให้ผู้อ่านได้ทราบถึงบทบาทของโฟเลตในการพัฒนา ได้แก่ การพัฒนาต้านโฟเลต และระบบนำส่งเภสัชภัณฑ์รังสีและยาโดยผ่านตัวรับโฟเลตสำหรับตรวจวินิจฉัยและบำบัดมะเร็ง

บทคัดย่อ

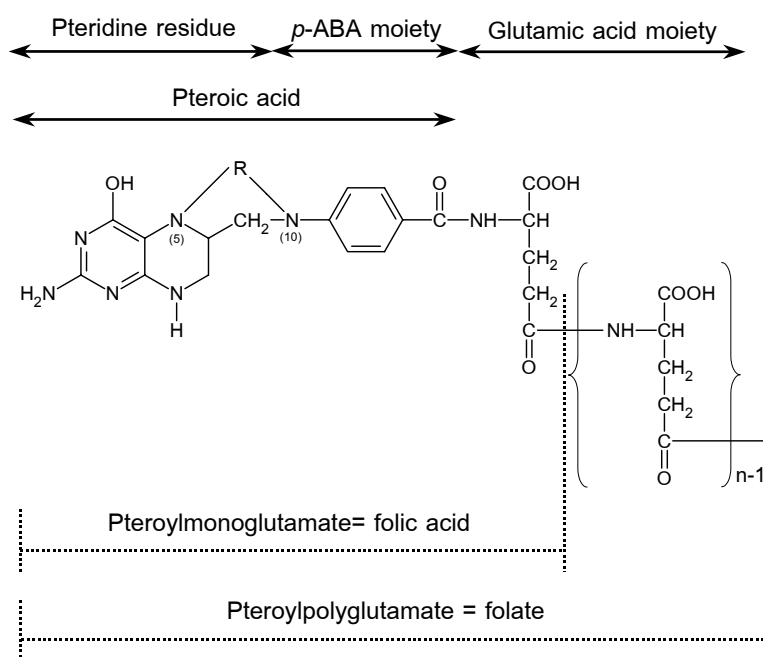
โฟเลตเป็นวิตามินที่มีความสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์บอนหนึ่งอะตอมในเซลล์และชีวสังเคราะห์ของกรดนิวคลีอิกซึ่งเป็นสารพันธุกรรมและใช้ในกระบวนการแบ่งเซลล์ เมื่อร่างกายขาดโฟเลตอาจทำให้เกิดความผิดปกติ เช่น โลหิตจาง พัฒนาการที่ผิดปกติของหลอดประสาท (neural tube) ในทารก โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด ความจำเสื่อม โรคอัลไซเมอร์ รวมไปถึงโรคมะเร็ง ในปัจจุบันบางประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกาจึงบังคับให้มีการเติมกรดโฟลิกลงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้ผู้บริโภคได้รับโฟเลตเพียงพอ ในอีกแง่มุมหนึ่งด้วยความจำเป็นของโฟเลตในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างหรือเมแทบอลิซึมของโฟเลตอาจมีประโยชน์สำหรับเป็นยาต้านจุลชีพหรือ

ปรสิติ หรือยาต้านมะเร็งได้ นอกจากนี้การที่เซลล์ของมนุษย์โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งมีตัวรับโฟเลตอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่นำโฟเลตเข้าสู่เซลล์ ทำให้เกิดการพัฒนาระบบนำส่งเภสัชภัณฑ์รังสีและยาโดยผ่านตัวรับนี้เพื่อการตรวจวินิจฉัยและบำบัดรักษาโรคมะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจง

คำสำคัญ: โฟเลต การเสริมวิตามินในอาหาร ยาต้านโฟเลต ตัวรับโฟเลต ระบบนำส่งยา

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโฟเลต

โฟเลตหรือวิตามินบี 9 เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1930 เมื่อ Lucy Wills รายงานว่าสารสกัดจากยีสต์สามารถรักษาภาวะโลหิตจางชนิดเมกาโลบลาสติก (megaloblastic anemia) ในหญิงตั้งครรภ์ได้ ต่อมาสารนี้ได้ถูกพบในพืชผักอีกหลายชนิด เช่น ผักขม อัลฟาฟา จึงถูกเรียกว่า “โฟเลต” ซึ่งมาจากคำในภาษาละตินว่า “folium” หมายถึงใบไม้ โครงสร้างของกรดโฟลิกประกอบด้วย pteridine, *p*-aminobenzoic acid (*p*-ABA) และ glutamic acid (รูปที่ 1) จึงมีชื่อเรียกทางเคมีอีกชื่อหนึ่งว่า pteroylglutamic acid (PteGlu_(n)) โดยโฟเลตที่พบในธรรมชาติเช่น ในเซลล์ ในอาหารจำพวกพืชใบเขียว ส้ม ตับ ถั่ว มักเป็น pteroylpolylglutamate ซึ่งมี glutamyl 2-7 หมู่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ติดอยู่กับส่วน pteric acid ส่วนโฟเลตในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จำหน่ายในท้องตลาดได้จากการสังเคราะห์และอยู่ในรูป pteroylmonoglutamic acid (PteGlu₁) ซึ่งมี glutamyl เพียงหนึ่งหมู่



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของโฟเลตประกอบด้วย pteridine, *p*-aminobenzoic acid (*p*-ABA) และ glutamic acid ตำแหน่ง N5 และ N10 ของ pteric acid เป็นตำแหน่งที่มีหมู่แทนที่มาต่อ

ในธรรมชาติโฟเลตถูกสร้างขึ้นโดยพืชและจุลินทรีย์ มนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์โฟเลตได้เองจึงต้องได้รับจากการรับประทานอาหาร อาหารที่มีโฟเลตสูงได้แก่ ผักใบเขียว ตับ ถั่ว ยีสต์ ไข่แดง ส้ม เป็นต้น ส่วนผลไม้ชนิดอื่น ๆ และเนื้อสัตว์มีโฟเลตในปริมาณต่ำ ความต้องการโฟเลตของแต่ละบุคคลแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอายุและสภาวะของร่างกาย (ตารางที่ 1) เช่น ขณะตั้งครรภ์ ให้นมบุตร หรือได้รับยาบางชนิด เช่น ยาท้านมะเร็ง ยาแก้นชัก ยาท้านมาลาเรีย หรือยาปฏิชีวนะบางชนิด ร่างกายจะมีความต้องการโฟเลตเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ความผิดปกติในการดูดซึมและโรคพิษสุรา (alcoholism) ก็เป็นสาเหตุที่ทำให้ร่างกายขาดโฟเลตได้²

ตารางที่ 1 ความต้องการโฟเลตในแต่ละวัน ตามคำแนะนำของประเทศอังกฤษและอเมริกา²

วัย/เพศ	อังกฤษ (ไมโครกรัม)	อเมริกา (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม)
0-1 ปี	50	3.6
1-12 ปี	50-200	3.3
12 ปี-ผู้ใหญ่	200	3.0
หญิงระหว่างตั้งครรภ์	200 + 100	3.0 (+ 200 ไมโครกรัม)
หญิงให้นมบุตร	200 + 60	3.0 (+ 100 ไมโครกรัม)

บทบาทและความสำคัญของโฟเลต

ในสิ่งมีชีวิตพบโฟเลตได้หลายแบบ ซึ่งแตกต่างกันที่จำนวนหมู่ glutamyl และชนิดของหมู่แทนที่ซึ่งต่ออยู่กับโครงสร้าง pteridine อย่างไรก็ตามโฟเลตที่อยู่ในรูปเตตระไฮโดรโฟเลตมีความสำคัญในทางชีวภาพมากที่สุดเนื่องจากไนโตรเจนตำแหน่งที่ 5 และ 10 ในโครงสร้าง pteridine (รูปที่ 1) สามารถรับและให้หมู่ที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอมที่มีระดับออกซิเดชัน (oxidation state) ต่างๆ ได้ เช่น methyl (-CH₃) methylene (-CH₂-) formimino (-CH=NH) หรือ formyl (-CH=O) เป็นต้น โฟเลตจึงมีบทบาทในเมแทบอลิซึมของคาร์บอนหนึ่งอะตอมในเซลล์ กล่าวคือโฟเลตทำหน้าที่เป็นสารประกอบแกนกลางที่สามารถเพิ่มหน่วยคาร์บอนได้อีกหนึ่งหน่วยแก่สารที่มารับ เช่น ในปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิล (methylation) ซึ่งสังเคราะห์ของเบส adenine guanine และ thymine ซึ่งเป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก การสังเคราะห์กรดอะมิโน methionine และการเปลี่ยนกรดอะมิโนชนิดหนึ่งไปเป็นกรดอะมิโนอีกชนิดหนึ่ง เช่น serine ↔ glycine หรือ histidine ↔ glutamate เป็นต้น การที่ร่างกายขาดโฟเลตมักทำให้เกิดความผิดปกติที่สัมพันธ์กับกระบวนการข้างต้น เช่น ทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเม็ดเลือดแดงในระยะแรกผิดปกติแล้วทำให้เกิดภาวะโลหิตจางชนิดเมกาลอ بلاสติก ดังนั้นการได้รับโฟเลตในปริมาณที่เพียงพอจึงช่วยในการป้องกันและรักษาภาวะโลหิตจางชนิดดังกล่าวได้

ปัจจุบันข้อมูลทางคลินิกและจากการวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าโฟเลตยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันภาวะผิดปกติหรือโรคอื่น ๆ อีก เช่น การขาดโฟเลตในช่วง 18-30 วันแรกของการตั้งครรภ์ทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอไม่เพียงพอต่อการสร้างเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างเซลล์ประสาทในระยะที่เอ็มบริโอกำลังมีพัฒนาการ อาจทำให้ทารกมีความผิดปกติของสมองและไขสันหลัง (neural tube defects)³ นอกจากนี้คาดว่าความผิดปกติของสมองและไขสันหลังยังอาจเกิดจากความเป็นพิษอันเนื่องมาจาก homocysteine ในพลาสมาที่เพิ่มขึ้นอย่างสัมพันธ์กับระดับโฟเลตที่ต่ำด้วย⁴ การเพิ่มขึ้นของระดับ homocysteine เนื่องมาจากความบกพร่องของเอนไซม์ cystathionine-β-synthase และ 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase นี้ยังเป็นประเด็นที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น arteriosclerosis และ coronary disease⁶ และอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดภาวะความจำเสื่อม โรคอัลไซเมอร์^{7,8} และโรคทางจิตและอารมณ์ด้วย⁹

ผลที่ตามมาจากการขาดโฟเลตอีกประการหนึ่งคือการเพิ่มขึ้นของระดับ dUMP ภายในเซลล์ เนื่องจากปกติ 5,10-methylenetetrahydrofolate ทำหน้าที่ให้หมู่เมทิลแก่ dUMP เพื่อสร้างเป็น dTMP เมื่ออัตราส่วนระหว่าง dUMP ต่อ dTMP ในเซลล์เพิ่มขึ้นอาจทำให้มีการต่อ dUMP เข้าไปในสายดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งที่ไม่ถูกต้อง ทำให้ดีเอ็นเอกลายพันธุ์และโครโมโซมแตกหักในที่สุด¹⁰ นอกจากนี้ 5,10-methylenetetrahydrofolate ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมหมู่เมทิลให้กับ cytosine การขาดโฟเลตจึงอาจทำให้มีการเติมหมู่เมทิลให้กับลำดับเบส CpG ในบริเวณโปรโมเตอร์น้อยลงและทำให้ยีนมีการแสดงออกผิดปกติ¹¹ ซึ่งทั้งสองเหตุการณ์นี้อาจนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (colorectal cancer) มะเร็งเต้านม มะเร็งตับอ่อน มะเร็งปากมดลูก รวมไปถึงมะเร็งเม็ดเลือดขาว¹² นอกจากนี้ยังพบว่าการต่อ uracil โดยผิดตำแหน่งเข้าไปในสายดีเอ็นเอใน erythroblast ยังอาจทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกิด apoptosis ได้โดยผ่านกลไก DNA mismatch repair¹³ จึงอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการขาดโฟเลตกับการเกิดภาวะโลหิตจางได้

การเสริมโฟเลตในอาหาร (Food fortification of folate)

เนื่องจากร่างกายของคนเราไม่สามารถสังเคราะห์โฟเลตได้เอง อาหารจึงเป็นแหล่งที่สำคัญของวิตามินชนิดนี้ อย่างไรก็ตามอาหารแต่ละชนิดมักมีโฟเลตในปริมาณต่ำและแตกต่างกันไป เช่น ข้าวสาลี 100 กรัมมีโฟเลต 3 ไมโครกรัม หรือน้ำมันว้าว 100 กรัมมีโฟเลตเพียง 0.05-0.12 ไมโครกรัม¹⁴ ซึ่งต่ำกว่าปริมาณที่แนะนำให้บริโภคในแต่ละวันคือ 200 ไมโครกรัม การป้องกันการขาดโฟเลตจึงอาจทำได้โดยการบริโภคอาหารที่มีโฟเลตสูง การรับประทานวิตามินเสริมรวมถึงการเติมกรดโฟลิกในอาหารที่รับประทานในชีวิตประจำวัน ในเดือนมกราคม ค.ศ. 1998 สำนักงานอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาประกาศบังคับให้ผู้ผลิตอาหารเติมกรดโฟลิกลงในผลิตภัณฑ์อาหารจำพวกแป้ง (flour) ธัญพืช (cereals) และเมล็ดพืช (grains)

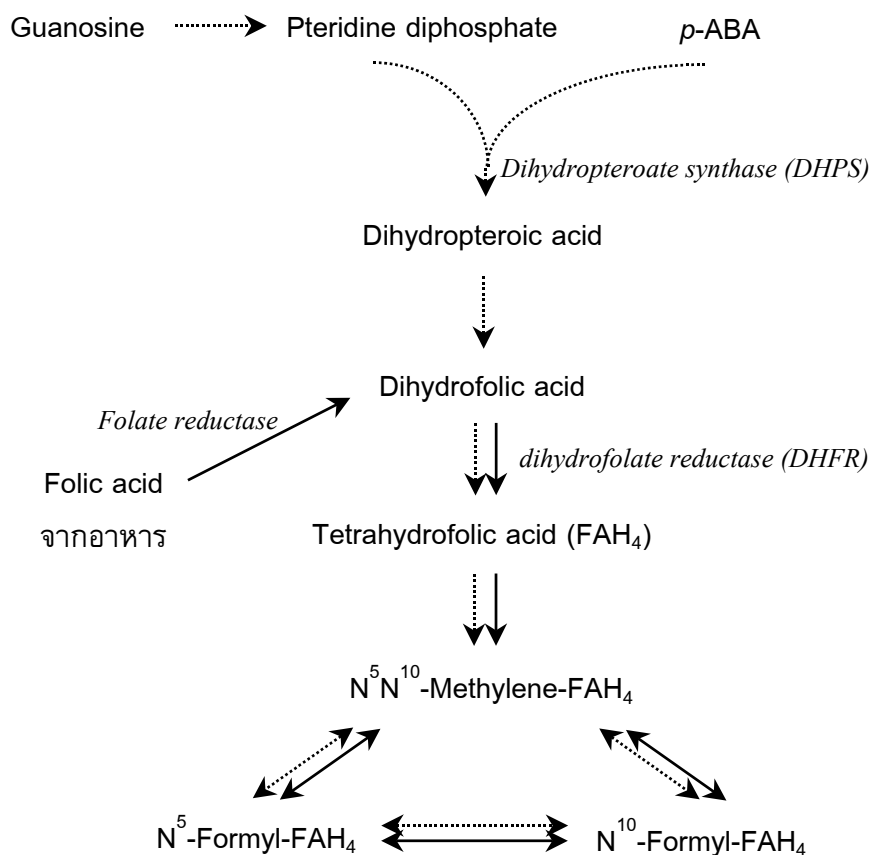
ทุกชนิด 0.43-1.4 มิลลิกรัมต่อผลิตภัณฑ์หนักหนึ่งปอนด์¹⁵ โดยมีกลุ่มเป้าหมายหลักคือหญิงตั้งครรภ์เพื่อป้องกันทารกมีความผิดปกติของหลอดประสาท กลยุทธ์นี้เน้นว่ามีประสิทธิภาพมากเนื่องจากกรดโฟลิกที่ใช้เติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารมีความคงตัวดี ราคาถูก อีกทั้งยังมีชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ที่ดีกว่าโฟเลตจากธรรมชาติเนื่องจากร่างกายดูดซึมโฟเลตที่มี glutamyl เพียงหนึ่งหมู่ได้ดีกว่า การได้รับกรดโฟลิกที่ได้จากการสังเคราะห์ 100 ไมโครกรัมเทียบเท่ากับโฟเลตในธรรมชาติ 170 ไมโครกรัม นอกจากนี้ยังไม่พบความเป็นพิษจากการได้รับกรดโฟลิกแม้ในปริมาณสูงกว่า 1 มิลลิกรัมต่อวัน อย่างไรก็ตามเชื่อว่าการได้รับกรดโฟลิกในปริมาณสูงเกินความต้องการอาจบ่งอาการและการวินิจฉัยภาวะขาดวิตามินบี 12 และโลหิตจางชนิด pernicious anemia โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้สูงอายุ ซึ่งอาจทำให้ระบบประสาทถูกทำลายได้¹⁶

นอกจากการเติมกรดโฟลิกในผลิตภัณฑ์อาหารโดยตรงแล้ว ปัจจุบันมีความพยายามในการนำวิธีการทางชีวภาพมาใช้เพิ่มปริมาณโฟเลตในพืชที่ใช้เป็นอาหาร (biofortification) วิธีนี้อาศัยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลและพันธุวิศวกรรมมาควบคุมหรือดัดแปลงวิถีการเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) ของโฟเลตเพื่อให้พืชสามารถสร้างโฟเลตได้ปริมาณเพิ่มขึ้น เช่น โดยการปรับปรุงวิถีชีวสังเคราะห์ของ pteridine หรือ *p*-ABA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างโฟเลต มีการนำยีน GTP-cyclohydrolase I (GTPCHI) ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ pteridine จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมาถ่ายเข้าสู่มะเขือเทศ¹⁷ ข้อดีของเอนไซม์ GTPCHI จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือไม่ถูกควบคุมโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (negative feedback-insensitive) ทำให้การสร้าง pteridine ไม่ถูกยับยั้งและคงดำเนินต่อไป พบว่ามะเขือเทศที่ดัดแปลงพันธุกรรมนี้มีปริมาณ pteridine เพิ่มขึ้น 140 เท่า อย่างไรก็ตามระดับโฟเลตเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยสองเท่า นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มการแสดงออก (overexpression) ของยีนที่สร้างเอนไซม์ aminodeoxychorismate (ADC) synthase¹⁸ และ ADC lyase¹⁹ ในพืช เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสร้าง *p*-ABA จาก chorismate ในปัจจุบันงานวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชโฟเลตสูงนี้ยังคงดำเนินต่อไป

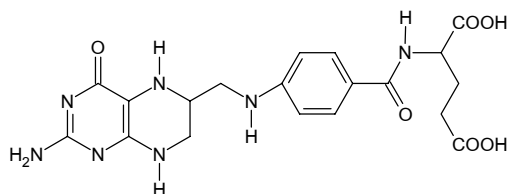
การพัฒนายาต้านโฟเลต

สิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดไม่ว่าแบคทีเรีย สัตว์เซลล์เดียว พืช หรือสัตว์ล้วนต้องการโฟเลตเพื่อดำรงชีวิตและสร้างดีเอ็นเอสำหรับการแบ่งเซลล์ ดังนั้นการยับยั้งชีวสังเคราะห์หรือเมแทบอลิซึมของโฟเลต (รูปที่ 2) จึงนำไปสู่การพัฒนายาต้านจุลชีพ ยาต้านมาลาเรีย หรือยาต้านมะเร็งได้ ยาที่ยับยั้งวิถีของโฟเลตเรียกว่ายาต้านโฟเลต (antifolate หรือ folate antagonist) ออกฤทธิ์โดยจับกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องแทนโฟเลตที่มีอยู่ในเซลล์ เช่น สำหรับจุลชีพที่สังเคราะห์โฟเลตได้เอง ซัลโฟนาไมด์สามารถยับยั้งเอนไซม์ dihydropteroate synthase (DHPS) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเติม *p*-ABA เข้ากับ pteridine diphosphate ในขั้นตอนการ

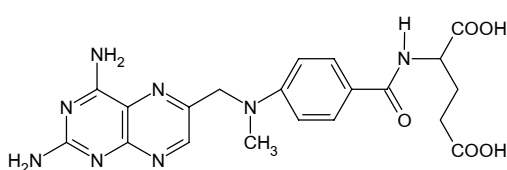
สังเคราะห์โฟเลต หรือ trimethoprim และ pyrimethamine สามารถยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน dihydrofolate ไปเป็น tetrahydrofolate ยาดังกล่าวใช้ต้านแบคทีเรียและต้านโพรโทซัวมาจนถึงปัจจุบัน สำหรับเซลล์สัตว์ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์โฟเลตได้เอง วิธีของโฟเลตเริ่มต้นจากการได้รับกรดโฟลิกหรือ dihydrofolate หรือ tetrahydrofolate จากอาหาร แต่ก็มีเอนไซม์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมแทบอลิซึมของโฟเลต เช่น DHFR ทำหน้าที่เดียวกันกับในจุลชีพ (รูปที่ 2) methotrexate (MTX) (รูปที่ 3) สามารถยับยั้งเอนไซม์ DHFR ของมนุษย์จึงยับยั้งการสร้างดีเอ็นเอและการแบ่งเซลล์ได้ MTX ถูกใช้เป็นยาด้านมะเร็งมารวมสี่สิบปี การที่มนุษย์และจุลชีพล้วนมีวิถีของโฟเลตอาจเป็นข้อดีเนื่องจากเมื่อมีการค้นพบยาด้านโฟเลตชนิดหนึ่งก็อาจนำไปทดสอบฤทธิ์ได้ทั้งในการเป็นยาด้านมะเร็งและต้านจุลชีพ มีรายงานว่า methotrexate (MTX) และ aminopterin ซึ่งใช้รักษาโรค มะเร็งหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาเลเรียได้ในสภาวะนอกร่างกาย²⁰ แต่การนำไปใช้จริงยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพราะยาดังกล่าวมีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ อย่างไรก็ตาม methotrexate และ aminopterin อาจเป็นสารต้นแบบที่ดีสำหรับใช้ดัดแปลงโครงสร้างเพื่อให้ได้ยาด้านมาเลเรียที่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ในลำดับต่อไป ในทางกลับกันความคล้ายคลึงกันของ



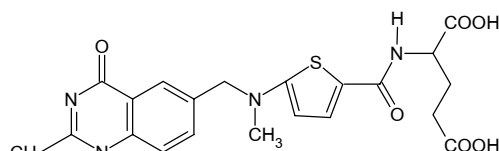
รูปที่ 2 วิถีของโฟเลตในมนุษย์ (-----) และในแบคทีเรีย (—) (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง 21)



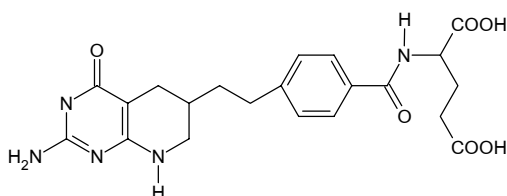
Tetrahydrofolate



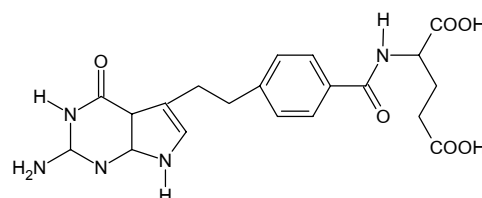
Methotrexate



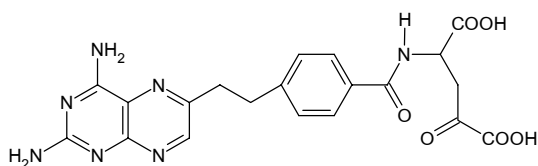
Raltitrexed



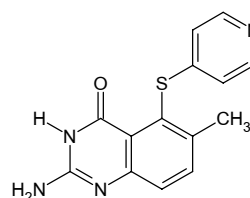
Lometrexol



Pemetrexed



4'-methylene-10-deazaaminopterin



Nolatrexed

รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของยาต้านโฟเลตบางชนิด เปรียบเทียบกับเตตระไฮโดรโฟเลต 4'-methylene-10-deazaaminopterin เป็นยาต้านโฟเลตชนิด classical ที่ไม่ถูกเติมกลูตาเมต ส่วน nolatrexed จัดเป็น non-classical antifolate เนื่องจากไม่มีกลูตาเมตอยู่ในโครงสร้างและไม่ถูกเติมหมู่ glutamyl

เอนไซม์ในวิถีของโฟเลตระหว่างของมนุษย์กับจุลชีพก็มักสร้างปัญหาเกี่ยวกับความเป็นพิษจากยา เช่น แม้ว่า trimethoprim จะจับกับ DHFR ของแบคทีเรียได้ดีได้ดีกว่า DHFR ของมนุษย์เกือบ 50,000 เท่า แต่คนเราก็อาจได้รับผลข้างเคียง เช่น ทำให้เกิดโลหิตจางจากการขาดโฟเลตได้เมื่อใช้ยาต้านแบคทีเรียชนิดนี้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ซึ่งการแก้ไขทำได้โดยการให้กรดโฟลิกเสริม

ปัจจุบันการพัฒนายาต้านโฟเลตชนิดใหม่ๆ มีความจำเป็นเนื่องจากยาต้านโฟเลตรุ่นเก่าหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการรักษาลดลงซึ่งเป็นผลมาจากการดื้อยา สาเหตุของการดื้อยาต้านโฟเลตได้แก่การกลายพันธุ์ (mutation) ที่ตำแหน่งจับ (binding site) ของเอนไซม์เป้าหมาย ได้แก่ DHPS และ DHFR ทำให้ยาต้านโฟเลตไม่สามารถจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ รวมไปถึงการขับยาออกเซลล์หรือลดการซึมผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ ในกรณีที่เอนไซม์เกิดการกลายพันธุ์ อาจแก้ปัญหาโดยการพัฒนายาที่สามารถจับและยับยั้งเอนไซม์ที่กลายพันธุ์นั้นได้ แต่วิธีนี้อาจสิ้นเปลืองและต้องใช้เวลาอันยาวนาน การใช้ยามากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกันจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่อาจช่วยแก้ปัญหาได้ เช่น ยาต้านมาเลเรีย LapDapTM ประกอบด้วยตัวยา chlorproguanil (CPG) และ dapsone (DDS) ออกฤทธิ์เสริมกัน ยาชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่ดื้อยา sulfadoxine-pyrimethamine เช่น สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ DHFR ณ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 108, 51, 59 และการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ DHPS ณ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 437 และ 540²² นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การให้ probenecid ซึ่งยับยั้งการขับยาออกจากเซลล์ร่วมกับยาต้านโฟเลตทำให้เซลล์ที่ดื้อยา methotrexate กลับมามีการตอบสนองต่อยาต้านโฟเลตได้²³

การเติมหมู่ glutamyl หลายหมู่ (polyglutamylatation) เข้าไปในโครงสร้างของโฟเลตโดยเอนไซม์ folypolyglutamate synthase (FPGS) ที่มีอยู่ในเซลล์เป็นอีกประเด็นหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการพัฒนายาต้านโฟเลตโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับยาต้านมะเร็ง เนื่องจากพบว่ายาต้านโฟเลตที่เข้าสู่เซลล์และถูกเติมหมู่ glutamyl มีฤทธิ์เพิ่มขึ้นในการยับยั้งเอนไซม์ในวิถีของโฟเลตและเอนไซม์บางชนิดที่ต้องอาศัยโฟเลตในการทำงาน เช่น thymidylate synthase (TS), glycineamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT) หรือ aminoimidazole carboxamide ribonucleotide formyltransferase (AICARFT) นอกจากนี้ยังทำให้ยาสามารถคงอยู่ในเซลล์ได้นานขึ้นด้วยโดยการขัดขวางการถูกขับออก การพัฒนายาต้านโฟเลตจึงมักออกแบบให้โครงสร้างของยามี glutamyl เพื่อเป็นตำแหน่งให้มีการเติมหมู่ glutamyl อื่นๆ ต่อไปได้อีก เช่น raltitrexed, lometrexol และ pemetrexed (รูปที่ 3) ตารางที่ 2 แสดงให้เห็นความแรงที่เพิ่มขึ้นของยา pemetrexed ในการยับยั้งเอนไซม์บางชนิดที่อาศัยโฟเลตในการทำงาน หลังจากถูกเติม glutamyl เพิ่มขึ้นอีก 5 หมู่ (pemetrexed-glu5)²⁴ ในทางกลับกันการที่ยาต้านโฟเลตซึ่งถูกเติมหมู่ glutamyl สามารถคงอยู่ในเซลล์ได้เป็นระยะเวลานานขึ้นอาจทำให้เกิดพิษเพิ่มขึ้นด้วย มีข้อสังเกตว่ายาต้านโฟเลตหลายชนิดที่ถูกเติม glutamyl ได้ง่าย เช่น dideazatetrahydrofolate และ tomudex มีความเป็นพิษสูงในขณะที่ยาต้านโฟเลตชนิดที่ไม่มี glutamyl หรือไม่ถูกเติม glutamyl เช่น 4'-methylene-10-deazaaminopterin (รูปที่ 3) สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพและที่สำคัญคือเป็นพิษต่ำ²⁵ การพัฒนายาต้านโฟเลตจึงควรพิจารณาว่ายาควรถูกออกแบบให้มีโครงสร้างที่จะถูกเติมหมู่ glutamyl ได้หรือไม่

ตารางที่ 2 ความแรงของ pemetrexed และ pemetrexed pentaglutamate ในการยับยั้งเอนไซม์บางชนิด เมื่อทำการศึกษานอกร่างกาย (*in vitro*)²⁴

	K_i^* (nM)			
	rh [#] TS	rh [#] DHFR	rmGARFT	rh [#] AICARFT
Pemetrexed	109	7	9300	3580
Pemetrexed-glu5	1.3	7	65	265

* K_i คือค่าคงที่การแตกตัวของ enzyme-inhibitor complex การที่มีค่า K_i น้อยแสดงว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ดี

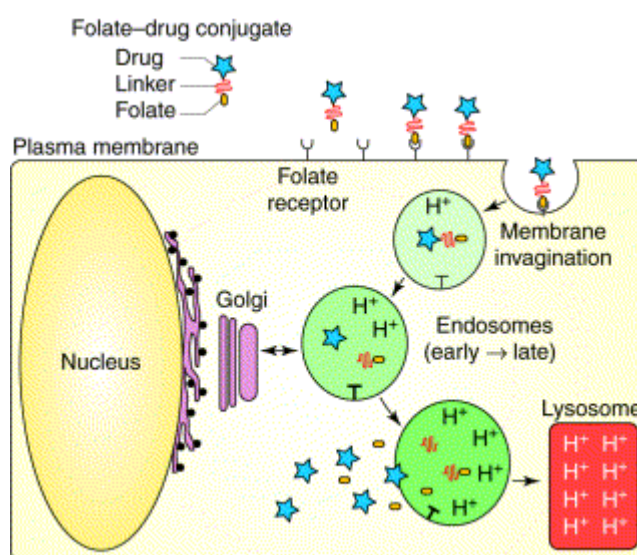
[#] rh และ rm หมายถึง recombinant human และ mouse proteins ตามลำดับ

อีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนายาต้านโฟเลตรุ่นใหม่คือการทำให้ยาให้สามารถยับยั้งเอนไซม์เป้าหมายได้หลายชนิด ซึ่งอาจเป็นเอนไซม์ในวิถีของการสังเคราะห์โฟเลตหรือเอนไซม์ที่ต้องอาศัยโฟเลตในการทำงาน การที่มีเป้าหมายหลายเป้าหมายทำให้ยาออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นและช่วยลดปัญหาการดื้อยาเมื่อเอนไซม์ชนิดหนึ่งกลายพันธุ์ไป ตัวอย่างของยารุ่นใหม่นี้ได้แก่ pemetrexed (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ Thymidylate synthase (ทำหน้าที่เปลี่ยน deoxyuridine monophosphate ไปเป็น deoxythymidine monophosphate ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ), GARFT และ AICARFT (ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เบสพิวรีนสำหรับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ) รวมทั้ง DHFR ด้วย ยานี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่แม้ว่าจะดื้อยาต้านโฟเลตหลายชนิดไม่ว่าด้วยกลไกการดื้อยาแบบใดก็ตาม ปัจจุบันยานี้กำลังอยู่ระหว่างการศึกษาในระยะที่ 3 และมีการทดลองใช้ทั้งในรูปยาเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับ cisplatin เพื่อใช้บำบัดมะเร็ง²⁴

การนำส่งยาโดยผ่านตัวรับโฟเลต (Targeted drug delivery via folate receptor)

เนื่องจากเซลล์สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์โฟเลตเองได้ จึงจำเป็นต้องมีกลไกอย่างน้อยสองกลไกในการนำโฟเลตเข้าสู่เซลล์ กลไกแรกได้แก่การใช้ตัวขนย้ายที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane transporter) ซึ่งมีความชอบจับกับโฟเลตต่ำ (K_D 1×10^{-6} - 5×10^{-6} M) ในการนำโฟเลตในรูปที่ถูกรีดิวซ์เข้าสู่เซลล์โดยตรง ส่วนอีกกลไกหนึ่งอาศัยตัวรับโฟเลต (folate receptor) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นโปรตีนที่มี glycosylphosphatidylinositol ติดอยู่และมีความชอบจับกับโฟเลตสูง (K_D 1×10^{-10} M) ในการนำโฟเลตในรูปที่ถูกรีดิวซ์ เช่น กรดโฟลิก เข้าสู่เซลล์โดยวิธีเอนโดไซโทซิส (endocytosis) (รูปที่ 4) โดยปกติจะพบตัวขนย้ายโฟเลตได้ในเซลล์เกือบ

ทุกชนิด ส่วนตัวรับโฟเลตนั้นพบได้น้อยมากในเซลล์ปกติ (ยกเว้น choroid plexus และรก) แต่จะมีเพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง เช่น มะเร็งของเยื่อบุผิว (epithelial cancers) ของรังไข่ ต่อมม้าม ลำไส้ใหญ่ ปอด ต่อมลูกหมาก เป็นต้น²⁶ ด้วยเหตุนี้เองตัวรับโฟเลตจึงเป็นโมเลกุลที่น่าสนใจสำหรับนำส่งสารจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและจำเพาะเจาะจง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อเข้าสู่เซลล์มะเร็ง จากการทดลองพบว่าในหนึ่งชั่วโมงเซลล์มะเร็งหนึ่งเซลล์สามารถนำสารเข้าสู่เซลล์โดยผ่านตัวรับโฟเลตได้ถึงหนึ่งล้านโมเลกุล²⁷ นอกจากนี้กรดโฟลิกยังไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย รวมถึงวิธีการเชื่อมต่อโมเลกุลต่างๆ เข้ากับกรดโฟลิกก็ทำได้สะดวก ปัจจุบันจึงได้มีการทดลองนำโมเลกุลต่างๆ มาเชื่อมต่อกับแอนติบอดีที่จำเพาะกับตัวรับโฟเลต หรือนำมาเชื่อมต่อกับกรดโฟลิกซึ่งเป็นลิแกนด์ของตัวรับโฟเลตเพื่อใช้ในการวินิจฉัยและบำบัดรักษาโรคมะเร็ง โมเลกุลดังกล่าวได้แก่ เภสัชภัณฑ์รังสี MRI contrast agents ยาเคมีบำบัด antisense nucleotide และ ribozyme โปรตีนและทอกซิน immunotherapeutic agent ลิโพโซม รวมถึงพลาสมิด



รูปที่ 4 เอนโดไซโทซิสเป็นกระบวนการที่ใช้ในการนำสารเข้าสู่เซลล์โดยผ่านตัวรับโฟเลต เริ่มต้นจากโฟเลตหรือโฟเลตที่มียาต่อเอาไว้จับกับตัวรับซึ่งปรากฏอยู่ที่ผิวเซลล์ จากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์จะเกิดการเว้าเป็นถุงห่อหุ้มสารเอาไว้เรียกว่าเอนโดโซมแล้วเคลื่อนที่สู่ภายในเซลล์ เมื่อความเป็นกรดภายในเอนโดโซมเพิ่มขึ้น (pH 5) ตัวรับโฟเลตจะปลดปล่อยโมเลกุลโฟเลตหรือยาออกจากเอนโดโซมเข้าสู่ไซโทพลาซึมต่อไป²⁶

ในการนำส่งเภสัชภัณฑ์รังสีเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคโดยวิธีเชื่อมโมเลกุลของสารรังสีไว้กับกรดโฟลิกนั้นมีข้อดีกว่าวิธีติดฉลากสารรังสีไว้กับแอนติบอดี เนื่องจากโมเลกุลที่ได้มีขนาดเล็กและถูกกำจัดออกจากร่างกายได้อย่างรวดเร็ว จึงช่วยลด background และทำให้ภาพ

ถ่ายของอวัยวะนั้นชัดเจนยิ่งขึ้น ปัจจุบันการติดฉลากสารรังสีเข้ากับกรดโพลีกลูตามิกทำได้โดยการเชื่อมโมเลกุลของกรดโพลีกลูตามิกเข้ากับโมเลกุลของสารที่มีความสามารถในการจับกับสารรังสีนั้นๆ (chelator) เช่น folate-deferoxamine (จับกับ ^{67}Ga) folate-diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) (จับกับ ^{67}Ga และ ^{111}In) หรือ folate-6-hydrazinonicitinamido (HYNIC) (จับกับ $^{99\text{m}}\text{Tc}$) EC20 (Endocyte) เป็นตัวอย่างของ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -folate ซึ่งใช้สำหรับการถ่ายภาพเนื้องอกที่โตและมดลูกกำลังอยู่ในขั้นตอนทดลองทางคลินิกระยะที่ 2²⁶

สำหรับการบำบัดรักษาโรคมะเร็งนั้น มีการเตรียมกรดโพลีกลูตามิกทั้งแบบที่ต่ออยู่กับชีวพิษ (toxin) และต่ออยู่กับยาต้านมะเร็ง ชีวพิษที่นำมาใช้เพื่อฆ่าเซลล์มะเร็งได้แก่ชีวพิษจากแบคทีเรีย โปรตีนจากพืชที่สามารถยับยั้งการทำงานของไรโบโซมและการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ เช่น momordin, saporin, ricin A ซึ่งพบว่าสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ ค่า IC_{50} ของ momordin ที่ต่อกับกรดโพลีกลูตามิกมีค่าเพียง 10^{-9} M ²⁸ นอกจากนี้ยังมีการต่อชีวพิษคายออก (exotoxin) ของ *Pseudomonas* spp. และ *Diphtheria* spp. เข้ากับกรดโพลีกลูตามิก ชีวพิษเหล่านี้มีความสามารถในการออกจากเอนโดโซมหลังจากที่ถูกเอนโดไซโทซิสจึงทำให้ออกฤทธิ์ได้เร็วและดีกว่าชีวพิษทั่วไป เช่น ชีวพิษคายออกของ *Pseudomonas* spp. ที่ต่ออยู่กับกรดโพลีกลูตามิกสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้เร็วกว่า momordin ที่ต่ออยู่กับกรดโพลีกลูตามิกถึง 6 เท่าและมีฤทธิ์แรงกว่าถึง 10 เท่า²⁹ ในกรณียาต้านมะเร็ง เท่าที่มีรายงานการศึกษาในปัจจุบันได้แก่ nitroheterocyclic bis(haloethyl) phosphoramidite (DNA alkylating agents), doxorubicin, platin, FdUMP (thymidylate synthase inhibitor), maytansinoid (microtubule disrupting agent) และ Taxol^{®26} โดยการนำยามาต่อเข้ากับกรดโพลีกลูตามิกหรือผ่านตัวเชื่อม (linker) ด้วยพันธะที่เหมาะสม เช่น ไดซัลไฟด์ หรือการต่อกรดโพลีกลูตามิกเข้ากับ polyethyleneglycol (PEG) ที่อยู่บนผิวด้านนอกของลิโปโซมซึ่งมียาเหล่านี้บรรจุอยู่ข้างใน การนำส่งยาโดยผ่านตัวรับโฟเลตนี้ยังมีข้อดีเนื่องจากอาจเชื่อมต่อยาต้านมะเร็งมากกว่าหนึ่งชนิดที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกันเข้ากับกรดโพลีกลูตามิกหนึ่งโมเลกุลเพื่อนำส่งยาเหล่านั้นไปออกฤทธิ์ยังเป้าหมายพร้อมกัน

ยีนบำบัด (gene therapy) เป็นอีกหนทางหนึ่งที่น่าสนใจในการรักษาโรคและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง แต่ปัญหาอย่างหนึ่งคือกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนหรือสายนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ (oligonucleotide) ไปยังเซลล์ โดยทั่วไปใช้วิธีทำให้ดีเอ็นเอซึ่งเป็นกรดนิวคลีอิกที่มีประจุลบเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับตัวพาซึ่งมีประจุบวก เช่น polycationic lipids, polylysine (pLys), polyethylenimine (PEI), cationic dendrimers หรือ protamine สารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาดเล็กและเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น เนื่องจากสายนิวคลีโอไทด์เกาะตัวกันแน่น นอกจากนี้ประจุบวกที่เหลืออยู่บนสารประกอบเชิงซ้อนยังช่วยให้เกิดการเกาะบนผิวเซลล์และการนำเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้นด้วย ปัจจุบันมีรายงานการนำส่งนิวคลีโอไทด์ไปยังเซลล์มะเร็งร่วมกับกรดโพลีกลูตามิกที่ต่อเข้ากับ pLys หรือ PEI โดยตรง หรือต่อ

ผ่าน PEG spacer ซึ่งช่วยย่นให้ลิแกนด์โฟเลตจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น การทดลองภายนอกร่างกายแสดงให้เห็นว่าพอลิเมอร์ pLys-PEG ซึ่งมีโฟเลตติดอยู่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้ 8-1400 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ที่มีเพียง pLys-PEG²⁶ นอกจากนี้ยังมีการเตรียมตำรับลิโฟโซมประจุบวกที่มีกรดโฟลิกสำหรับนำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอทางกระแสเลือดไปยัง squamous cell carcinoma ของศีรษะและคอ³⁰

จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าตัวรับโฟเลตเป็นโมเลกุลที่มีประโยชน์มากในการนำส่งสารเข้าสู่เซลล์ อย่างไรก็ตามสารที่จะถูกนำส่งนั้นต้องมีขนาดไม่ใหญ่จนเกินไป และติดอยู่ในตำแหน่งซึ่งไม่บดบังโมเลกุลของกรดโฟลิกในการเข้าจับกับตัวรับ อีกประเด็นหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงได้แก่หากกรดโฟลิกถูกต่อไว้กับยาซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic drugs) อาจทำให้เกิดพิษต่อไตได้ เนื่องจากปกริร่างกายมีการสะสมโฟเลตที่ proximal tubules เพื่อใช้ในกระบวนการดูดกลับ ในกรณีนี้อาจแก้ปัญหานี้ได้โดยใช้ตัวเชื่อมที่ถูกทำลายได้ที่ไตเพื่อตัดโมเลกุลของยาออกจากกรดโฟลิกแล้วถูกกำจัดออกจากร่างกายในที่สุด หรืออาจให้กรดโฟลิกอิสระตามหลังการให้ยาเพื่อให้กรดโฟลิกอิสระแทนที่ยาเหล่านั้น ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป

บทส่งท้าย

โฟเลตมิได้เป็นเพียงวิตามินที่มีบทบาทและความสำคัญในกระบวนการดำรงชีวิตเท่านั้น แต่ในปัจจุบันยังเป็นโมเลกุลที่น่าสนใจและมีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านโภชนาการ การอธิบายเกิดพยาธิสภาพ ไปจนถึงการพัฒนาายาต้านจุลชีพหรือยาต้านมะเร็ง และการพัฒนาระบบนำส่งเภสัชภัณฑ์รังสีและยาเพื่อการตรวจวินิจฉัยและบำบัดรักษาโรคมะเร็ง ความรู้และความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับโครงสร้างและคุณสมบัติของโฟเลต ชีวสังเคราะห์และเมแทบอลิซึม เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง รวมถึงการเข้าสู่เซลล์และตัวรับของโฟเลต เมื่อนำไปประกอบกับวิทยาการอันก้าวหน้า อาทิ เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล การสังเคราะห์สารแบบ combinatorial หรือ high throughput screening จะช่วยให้การศึกษาวิจัยประสบความสำเร็จได้ในที่สุด

เอกสารอ้างอิง

1. Wills L. Treatment of pernicious anaemia of pregnancy and tropical anaemia with special reference to yeast extract as curative agent. Br Med J 1931; 1:1059-64.
2. Busa TK, Dickerson JW. Pteroylglutamic acid (folic acid, folacin), In Busa TK, Dickerson JW (ed) Vitamins in human health and disease. Guildford: Biddles Ltd., 1996: 86-103.

3. Geisel J. Folic acid and neural tube defects in pregnancy—a review. *J Perinat Neonat Nurs* 2003; 17(4): 268–79.
4. Mills JL, Scott JM, Kirke PN, et al. Homocysteine and neural tube defects. *J Nutr* 1996; 126: 756–64.
5. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(5): 1295–303.
6. Quinlivan EP, Partlin JM, Nulty HM, et al. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *Lancet* 2002; 359(9302): 227–228.
7. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, et al. Folate, vitamin B12 and serum total homocysteine levels in confirmed alzheimers disease. *Arch Neurol* 1998; 55: 1449–55.
8. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346(7): 476–83.
9. Godfrey PSA, Toone BK, Carney MWP, et al. Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *Lancet* 1990; 336: 392–5.
10. Duthie SJ, Hawdon A. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes *in vitro*. *FASEB J* 1998; 12: 1491–7.
11. Hug M, Silke J, Georgiev O, et al. Transcriptional repression by methylation cooperativity between a CpG cluster in the promoter and remote CpGrich regions. *FEBS Lett* 1996; 379: 251–6.
12. Lucock M, Yates Z, Glanville T, et al. A critical role for B-vitamin nutrition in human developmental and evolutionary biology. *Nutr Res* 2003; 23(11): 1463–75.
13. Li GM, Presnell SR, Gu LY. Folate deficiency, mismatch repair-dependent apoptosis, and human disease. *J Nutr Biochem* 2003; 14(10): 568–75.
14. USDA USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Release 17 (online). Available at <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/> (Febuary 2006).
15. US Department of Health and Human Services, Food, and Drug Administration. Food standards: amendment of the standards of identity for enriched grain product to require addition of folic acid. *Fed Regist* 1996; 61: 8781.
16. Ray JG, Vermeulen MJ, Langman LJ, et al. Persistence of vitamin B12 insufficiency among elderly women after folic acid food fortification. *Clin Biochem* 2003; 36(5): 387–91.

17. de la Garza RD, Quinlivan EP, Klaus SM, et al. Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis. PNAS 2004; 101(38): 13720–5.
18. Basset G, Quinlivan EP, Ravanel S, et al. Folate synthesis in plants: The *p*-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. PNAS 2004; 101(6): 1496–1501.
19. Basset GJC, Ravanel S, Quinlivan EP, et al. Folate synthesis in plants: the last step of the *p*-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase. Plant J 2004; 40(4): 453–61.
20. Biagini GA, O'Neill PM, Nzila A, et al. Antimalarial chemotherapy: young guns or back to the future?. Trend Parasitol 2003; 19(11): 479-87.
21. Beale JM, Jr. Anti-infective agents. In Block JH, Beale JM, Jr. (ed) Willson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry-11th ed, Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2004: 272-3.
22. Mutabingwa T, Nzila A, Mberu E, et al. Chlorproguanil-dapsone for treatment of drug-resistant falciparum malaria in Tanzania. Lancet 2001; 358, 1218–23.
23. Banerjee D, Mayer-Kuckuka P, Capioux G, et al. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. Biochim Biophys Acta 2002; 1587: 164–173
24. Curtin NJ, Hughes AN. Pemetrexed disodium, a novel antifolate with multiple target. Lancet Oncology 2001; 2: 298-306.
25. Cao S, Abraham A, Nair MG, et. al. Polyglutamylation of the dihydrofolate reductase inhibitor gamma-methylene-10-deazaaminopterin is not essential for antitumor activity. Clin Cancer res 1996; 2: 707-12.
26. Leamon CP, Low PS. Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery. DDT 2001; 6(1): 44-51.
27. Leamon CP, Low PS. Membrane folate binding proteins are responsible for the folate-protein conjugate endocytosis into cultured cells. Biochem J 1993;291: 855-60.
28. Leamon CP, et al. Cytotoxicity of folate-pseudomonas exotoxin conjugates toward tumor cells. J Biol Chem 1993; 268: 24847-54.
29. Leamon CP, Low PS. Cytotoxicity of momordin-folate conjugates in cultured human cells. J Biol Chem 1992; 267: 24966–71.

30. Xu L, et al. Systematic p53 gene therapy in combination with radiation results in human tumor regression. *Tumor Targeting* 1999; 4: 92-104.