



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ของยาไอโซไนอาซิด และกลุ่มสารอนุพันธ์ ซึ่งเป็นยาที่มีความจำเพาะสูงในการรักษาโรควัณโรค และเอนไซม์ *Mycobacterium tuberculosis* InhA ด้วยวิธีการออกแบบ โมเลกุลโดยใช้คอมพิวเตอร์และการคำนวณเคมีควอนตัม

โดย

ผศ.ดร.พรพรรณ พึ่งโพธิ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ

30 พฤษภาคม 2553

สัญญาเลขที่ DBG5180022

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ของยาไอโซไนอาซิดและกลุ่มสารอนุพันธ์ ซึ่งเป็นยาที่มีความจำเพาะสูงในการรักษาโรควัณโรคและเอนไซม์ *Mycobacterium tuberculosis* InhA ด้วยวิธีการออกแบบโมเลกุลโดยใช้คอมพิวเตอร์และการคำนวณเคมีควอนตัม

ผศ.ดร.พรพรรณ พิงโพธิ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : DBG5180022

ชื่อโครงการ : การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ของยาไอโซไนอาซิดและกลุ่มสารอนุพันธ์ ซึ่งเป็นยาที่มีความจำเพาะสูงในการรักษาโรควัณโรคและเอนไซม์ *Mycobacterium tuberculosis* InhA ด้วยวิธีการออกแบบโมเลกุลโดยใช้คอมพิวเตอร์และการคำนวณเคมีควอนตัม

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : ผศ.ดร.พรพรรณ พึ่งโพธิ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

E-mail address : pornpan_ubu@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 มิถุนายน 2551-31 พฤษภาคม 2553

วัณโรคยังเป็นปัญหาหลักทางด้านสุขภาพที่เป็นสาเหตุหลักของการตายของประชากรโลกเนื่องจากปัญหาการดื้อยา เอนไซม์ enoyl-ACP reductase (InhA) ของแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* เป็นเอนไซม์ที่น่าสนใจในการพัฒนายาต้านวัณโรค อีกทั้งเอนไซม์นี้ยังเป็นเอนไซม์เป้าหมายของตัวยาไอโซไนอาซิด (INH) ซึ่งเป็นตัวยาหลักที่ใช้รักษาโรควัณโรคในปัจจุบัน แต่เนื่องจากตัวยาไอโซไนอาซิด มีคุณสมบัติเป็น prodrug จึงจำเป็นต้องมีการกระตุ้นจากเอนไซม์ KatG เพื่อให้อยู่ในรูป INH-NAD ซึ่งเป็นรูปแบบที่ออกฤทธิ์ได้ของตัวยานี้ ดังนั้นการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA และ katG จึงเป็นปัญหาใหญ่ในการรักษาโรควัณโรคด้วยตัวยาไอโซไนอาซิด สารยับยั้งวัณโรคในกลุ่มสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อแก้ไขปัญหาการดื้อยาของไอโซไนอาซิดอันเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ katG เพื่อเป็นการแก้ปัญหาเหล่านี้ ควรมีการศึกษาข้อมูลในระดับโมเลกุลเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งวัณโรค ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างเอนไซม์ InhA กับสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ด้วยวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้งและการคำนวณทางเคมีควอนตัม นอกจากนี้ยังทำการศึกษาพื้นฐานทางโครงสร้างที่สำคัญต่อค่ากัมมันตภาพการยับยั้งของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ด้วยระเบียบวิธี QSAR ดังนั้นข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจากโครงการวิจัยนี้ทำให้เข้าใจถึงอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ และยังรวมถึงความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปใช้ในการออกแบบสารยับยั้งวัณโรคตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่สูงขึ้น

คำหลัก: QSAR, CoMFA, CoMSIA, anti-tb agents, isoniazid, arylamide

Abstract

Project Code : DBG5180022

Project Title: Investigation of inhibitor-enzyme interaction between isoniazid and its derivatives as a highly selective anti-Tuberculosis agent and Mycobacterium tuberculosis InhA, based on computer-aided molecular design and quantum chemical calculations

Investigator : Asst.Prof.Dr.Pornpan Pungpo, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University

E-mail address : pornpan_ubu@yahoo.com

Project Period: 1 June 2008 - 31 May 2010

Abstract

The tuberculosis treatment still remains the worldwide medical problem because of the drug resistance. The enoyl-ACP reductase (InhA) from *M. tuberculosis* is an attractive target for developing new antibiotic agents and has been identified as the target of isoniazid (INH), a first-line antibiotic for tuberculosis treatment. As the prodrug, INH must be activated by katG enzyme to generate the bioactive form of INH-NAD adduct. The major problems of tuberculosis treatment with INH are resulted from the mutations in InhA and katG enzymes. To overcome the drug-resistant problem of INH associated with katG mutation, arylamides as the direct InhA inhibitor have been identified. In this study, molecular modeling approaches were employed to elucidate inhibitor-enzyme interactions and structural basis for improving the affinity and potency of anti-tuberculosis agents in class of isoniazid derivatives and arylamide derivatives. Molecular docking calculations and QSAR methods were applied on series of isoniazid and arylamide derivatives to gain an insight into the structural basis for improving anti-tuberculosis activity. The integrated results from this study provide coincident information about the inhibitor-enzyme interaction and structural requirement thus offering guidelines for the synthesis of novel anti-tuberculosis agent with highly antibiotic activity.

KEYWORDS: QSAR, CoMFA, CoMSIA, anti-tb agents, isoniazid, arylamide

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สามารถดำเนินการได้ด้วยดีด้วยความเอื้อเฟื้อและช่วยเหลือจากหน่วยงานต่างๆ และผู้ร่วมงานหลายท่าน ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยภายใต้ การวิจัยแบบมุ่งเป้า ทางด้านสมุนไพร ยารักษาโรค และสารเสริมสุขภาพ ปี 2551(DBG5180022) ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยและขอขอบคุณ รศ. ดร.สุภา หารหนองบัว ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ Professor Dr.Peter Wolschann มหาวิทยาลัยเวียนนา ประเทศออสเตรีย ที่ได้ให้การสนับสนุนความร่วมมือทางวิชาการและการวิจัยอย่างดียิ่งตลอดโครงการ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ขอขอบคุณ ดร.พัชรินารถ ทรัพย์อาภากร ที่ได้ให้ความร่วมมือทางการวิจัยมาโดยตลอด ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยคือนางสาวอรดี พันธุ์กว้าง ที่ได้ช่วยทำงานวิจัยในโครงการนี้อย่างเต็มกำลังและความสามารถ

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้การสนับสนุนในด้านห้องปฏิบัติการเคมีคอมพิวเตอร์ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการคอมพิวเตอร์สมรรถนะสูง สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (HPCC/NECTEC) ที่ได้เอื้อเฟื้อการคำนวณโดยโปรแกรม Sybyl และขอขอบคุณศูนย์คอมพิวเตอร์แห่งมหาวิทยาลัยเวียนนา ในการเอื้อเฟื้อการคำนวณโดย การคำนวณโดยโปรแกรม Sybyl และคำนวณบนเครื่องคลัสเตอร์คอมพิวเตอร์

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
ระเบียบและวิธีวิจัย	7
ผลการศึกษา	15
สรุปผลและวิจารณ์	28
เอกสารอ้างอิง	30
ผลงานวิจัย	33
ภาคผนวก	36

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของหัวข้อการวิจัย

ในปัจจุบันวัณโรค (tuberculosis) ยังคงเป็นโรคติดเชื้อสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุขที่คุกคามประชากรทั่วโลก วัณโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุขที่คุกคามประชากรทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา โดยยาที่ใช้ในการรักษาโรควัณโรคแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม ยาในกลุ่มแรกคือ ยากลุ่ม first line ซึ่งได้แก่ isoniazid, rifampin, rifapentine, ethambutal และ pyrazinamide ซึ่งยาในกลุ่มนี้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง ดูดซึมได้ดีจากทางเดินอาหารเข้าสู่เนื้อเยื่อของร่างกาย มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำและราคาถูก ส่วนยาในกลุ่มที่สองคือ ยากลุ่ม second line ได้แก่ ethionamide, cycloserine, capreomycin และ para-aminosalicylic acid ในการรักษาโรควัณโรคทำได้โดยการใช้ยาหลายขนานร่วมกัน แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาในการรักษาโรควัณโรคยังมีปัญหาเนื่องจากเกิดการดื้อยาหลายขนานของโรควัณโรค (multi-drug resistant, MDR) และการเกิดร่วมกันระหว่างโรคเอดส์และโรควัณโรค นอกจากนี้ในปัจจุบันนี้ยังเจอปัญหาการดื้อยาที่ถือว่ารุนแรงคือการดื้อยาแบบ extensively drug-resistant (XDR)

ไอโซไนอาซิด (isoniazid หรือ INH) เป็นยารักษาโรควัณโรคที่ใช้กันในปัจจุบัน ทำให้มีความสนใจในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์และเอนไซม์เป้าหมายของตัวยาในการยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เป็นจำนวนมาก ตัวยาไอโซไนอาซิดมีคุณสมบัติเป็น prodrug ดังนั้นกระบวนการออกฤทธิ์ของตัวยานี้ค่อนข้างซับซ้อน เบื้องต้นตัวยาไอโซไนอาซิดต้องถูกกระตุ้นจากเอนไซม์ mycobacterial catalase-peroxidase (katG) เพื่อให้ได้สารอนุผลอิสระของไอโซไนอาซิดที่มีความว่องไวสูง จากนั้นสารอนุผลอิสระนี้จะเข้าสร้างพันธะโควาเลนต์กับโคแฟกเตอร์ NAD⁺ เพื่อให้ได้สารประกอบ INH-NAD ซึ่งเป็นรูปแบบที่สามารถออกฤทธิ์ได้ของตัวยาไอโซไนอาซิด จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์เป้าหมายของ INH-NAD คือ เอนไซม์ enoyl-acp reductase (InhA) โดยเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา beta-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-specific reduction ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการขยายสายโซ่ของกรดไขมันใน FAS II pathway ในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของกรดไขมัน (fatty acid biosynthesis) อย่างไรก็ตามการใช้ยาไอโซไนอาซิด ยังมีปัญหาสำคัญเนื่องจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยาของยาไอโซไนอาซิด โดยผลจากวิเคราะห์โครงสร้างของผลึกของเอนไซม์ InhA พบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องโดยตรงกับการรบกวนพันธะไฮโดรเจนที่ช่วย stabilizes การจับของ NADH และจากการศึกษาในเวลาต่อมายังพบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของ katG ด้วย

ต่อมาได้มีการวิเคราะห์โครงสร้างของผลึกของเอนไซม์ InhA จำนวนมากทั้งแบบที่เป็นโครงสร้างของเอนไซม์อิสระและโครงสร้างของเอนไซม์ที่จับกับ INH-NAD ทั้งชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่าง ๆ จากข้อมูลทางโครงสร้างผลึกเหล่านี้ทำให้ได้

ข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์และการดื้อยาของยาไอโซไนอาซิดในการยับยั้งแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* มากขึ้น และมีการศึกษาและสังเคราะห์สารเพื่อพัฒนาสารยับยั้งให้มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ InhA มากขึ้น อย่างไรก็ตามปัญหาการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA ก็ยังคงอยู่

สารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ได้ถูกพัฒนาขึ้นมา เพื่อแก้ไขปัญหาการดื้อยาของไอโซไนอาซิด อันเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ mycobacterial catalase-peroxidase (KatG) สารอนุพันธ์เอริลเอไมด์สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้โดยตรง โดยไม่ต้องอาศัยการกระตุ้นจากเอนไซม์ KatG ดังนั้นสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ จึงถูกเรียกว่าเป็น สารยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยตรง (direct InhA inhibitor) สารยับยั้งในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ InhA แต่อย่างไรก็ตามสารในกลุ่มนี้ยังมีประสิทธิภาพต่ำในการฆ่าเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ในการศึกษาคุณสมบัติในระดับโมเลกุลของสารยับยั้งเหล่านี้ เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่ที่ประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าการศึกษาวิจัยสมบัติทางโครงสร้างในระดับโมเลกุลของสารยับยั้ง ในกลุ่มสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์มีน้อยมาก ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาสมบัติทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ โดยอาศัยระเบียบวิธี Computer-Aided Molecular Design บนพื้นฐานของการคำนวณเคมีควอนตัม (Quantum chemistry) และการจำลองแบบ (Molecular Modeling)

ในเบื้องต้นผู้วิจัยจะทำการศึกษาทางด้าน Ligand based drug design คือ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้ง (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR) ของสารยับยั้ง ในกลุ่มสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์โดยใช้ระเบียบวิธี 2D- และ 3D-QSAR ผลจากการศึกษาคาดว่าจะสามารถชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของอันตรกิริยาสเตอริก อิเล็กโตรสแตติกและไฮโดรโฟบิก รวมถึงอิทธิพลของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของโมเลกุลที่มีต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากนั้นจะดำเนินการต่อเนื่องโดยมีเป้าหมายหลักในการศึกษาศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ กับเอนไซม์ InhA ด้วยวิธี molecular docking ซึ่งถือว่าเป็นการศึกษาทางด้าน Structure-based drug design และจะทำการคำนวณค่าพลังงานอันตรกิริยาโดยวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัมระหว่างตัวยับยั้งและ กรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับ โดยทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่ากัมมันตภาพการยับยั้งของสารยับยั้งและพลังงานอันตรกิริยาที่มีต่อกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับ โดยคาดหวังว่าเมื่อนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์จากทั้งสามระเบียบวิธี คือ ผลที่ได้จากการศึกษาทางด้าน Ligand based drug design, Structure-based drug design การศึกษาพลศาสตร์เชิงโมเลกุล มาพิจารณาร่วมกันจะได้ข้อมูลสำคัญที่เป็นพื้นฐานช่วยเพิ่มความเข้าใจในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์ (inhibitor-enzyme interaction) ตลอดจนอธิบายกลไกที่เกิดการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ซึ่งเป็น

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบของสารยับยั้ง และจะเป็นแนวทางในการออกแบบโครงสร้าง (molecular design) ของสารยับยั้งชนิดใหม่ที่มีให้มีศักยภาพสูงขึ้นในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ทั้งชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ กับโปรรงการจับของเอนไซม์ InhA โดยการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิง (molecular docking calculations)
2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ โดยใช้ระเบียบวิธี 2D-QSAR และ 3D-QSAR
3. เพื่อคำนวณพลังงานอันตรกิริยาที่มีต่อกรดอะมิโนโปรรงการจับของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิด กับเอนไซม์ InhA ด้วยการคำนวณเคมีควอนตัม
4. ผลจากการศึกษาที่ได้จะนำไปพิจารณาร่วมกัน เพื่อใช้ในการออกแบบสารประกอบในกลุ่มสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้ดียิ่งขึ้น

3. ขอบเขตของการวิจัย

เป็นงานด้านการออกแบบโครงสร้างโดยวิธีทางคอมพิวเตอร์ (computer-aided molecular design) บนพื้นฐานการคำนวณทางเคมีควอนตัม และการจำลองแบบโมเลกุล ของสารยับยั้งโรควัณโรคในกลุ่มสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิด โดยวิธีการศึกษาที่ใช้คือ วิธี ligand-based drug design และ structure-based drug design สำหรับวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพในการยับยั้ง (Quantitative structure activity relationship, QSAR) ในโครงการวิจัยนี้ได้ใช้วิธี 3D – QSAR คือ วิธีวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามโมเลกุล (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) และวิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (Comparative Similarity Index Analysis, CoMSIA) นอกจากนี้ยังทำการศึกษารูปแบบการจับและอันตรกิริยาที่สำคัญ ของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิง

นอกจากนี้ผู้วิจัยศึกษาสมบัติเชิงโมเลกุลของสารในกลุ่มสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ซึ่งเป็นสารยับยั้งกลุ่มใหม่ของเอนไซม์ InhA ที่มีกลไกการยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้โดยตรง โดยไม่ต้องการกระบวนการกระตุ้นของเอนไซม์ KatG ซึ่งสามารถแก้ปัญหาการดื้อยาของตัวยาไอโซในอาซิดได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษารูปแบบการจับของสารยับยั้งเอริลเอไมด์ในโปรรงการจับของเอนไซม์ InhA ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิง และได้หาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพของสารเหล่านี้ด้วยระเบียบวิธี CoMFA CoMSIA และ HQSAR โดยแบบจำลอง QSAR ที่ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของสนามสเตอริก สนามอิเล็กโตร

รสแต่ติก และสนามไฮโดรโฟบิก ที่ตำแหน่งต่างๆ ของโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารยับยั้ง ผลการวิจัยสำคัญที่ได้จากการวิเคราะห์ร่วมกันของผลงานที่ได้จากระเบียบวิธี Computer-Aided Molecular Design ในแต่ละส่วนทำให้ได้ข้อมูลทางโครงสร้างที่สำคัญในการทำนายการการเกิดอันตรกิริยาสำคัญของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ กับเอนไซม์ InhA ในระดับโมเลกุลได้อย่างลึกซึ้ง รวมถึงได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางด้านสมบัติต่างๆ ในระดับโมเลกุลเป็นพื้นฐานสำคัญต่อความเข้าใจในกลไกการออกฤทธิ์ของยาไอโซในอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางสำคัญในการออกแบบตัวยา (drug design) เพื่อหายาตัวใหม่ที่มีกัมมันตรภาพสูงในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แบบดั้งเดิมและแบบกลายพันธุ์เพื่อแก้ปัญหาการดื้อยาของโรควัณโรคต่อไป

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัณโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุขที่คุกคามประชากรทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา โดยยาที่ใช้ในการรักษาโรควัณโรคแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม โดยยาในกลุ่มแรกคือ ยากลุ่ม first line ซึ่งได้แก่ isoniazid rifampin rifapentine ethambutol และ pyrazinamide และยาในกลุ่มที่สองคือ ยากลุ่ม second line ได้แก่ ethionamide cycloserine capreomycin และ para-aminosalicylic acid และการรักษาโรควัณโรคทำได้โดยการใช้ยาหลายขนานร่วมกัน แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาในการรักษาโรควัณโรคยังมีปัญหาเนื่องจากการดื้อยาหลายขนานของโรควัณโรค (multidrug resistant, MDR) และการเกิดร่วมกันระหว่างโรคเอดส์และโรควัณโรค นอกจากนี้ในปัจจุบันนี้ยังเจอปัญหาการดื้อยาที่ถือว่ารุนแรงคือการดื้อยาแบบ extensively drug-resistant (XDR) [1-2] ไอโซในอาซิดถูกใช้เป็นยารักษาโรควัณโรคอย่างกว้างขวางและมีประสิทธิภาพสูง ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์และเอนไซม์เป้าหมายในการยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ของตัวยาไอโซในอาซิดจึงได้รับความสนใจสูง เอนไซม์ enoyl-ACP reductase (InhA) ได้ถูกค้นพบว่าเป็นเอนไซม์เป้าหมายของตัวยาไอโซในอาซิด [3-4] ในปี 1994 Banerjee และคณะ [5] พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน InhA จะทำให้เกิดการดื้อยาของไอโซในอาซิดและอีแธมบิวตอล ต่อมาในปี 1995 Dessen และคณะ [6] ได้วิเคราะห์โครงสร้างของผลึกของเอนไซม์ InhA ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ได้เป็นครั้งแรก โดยวิธีผลึกเอกซเรย์ (X-ray Crystallography) โดยมีค่า resolution เป็น 2.2 และ 2.7 อังสตรอมตามลำดับ และจากโครงสร้างผลึกที่ได้พบว่าการดื้อยาของไอโซในอาซิดเกี่ยวข้องโดยตรงกับการรบกวนพันธะไฮโดรเจนที่ช่วย stabilizes การจับของ NADH นอกจากการศึกษาทางโครงสร้างผลึกแล้วยังทำการศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ InhA ซึ่งพบว่าเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา beta-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-specific reduction ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการขยายสายโซ่ของกรดไขมัน เนื่องจากตัวยาไอโซในอาซิดมีคุณสมบัติเป็น prodrug ซึ่งในการออกฤทธิ์ต้องอาศัยการกระตุ้นจากเอนไซม์ mycobacterial catalaseperoxidase (KatG) [7-8] และจากการศึกษาในเวลาต่อมาพบว่าการดื้อ

ยาของไอโซในอะซิดเกี่ยวข้องกับกลายพันธุ์ของเอนไซม์ katG และ InhA protein [9-10] ในปี 1999 Rozwarski และคณะ [11] ได้วิเคราะห์โครงสร้างผลึกของเอนไซม์ InhA ที่จับกับ NAD⁺ และซับสเตรต C16 fatty acyl จากโครงสร้างผลึกพบว่า ซับสเตรตจะจับกับเอนไซม์ในลักษณะ U-shaped โดยพันธะคู่ของซับสเตรตจะอยู่ใกล้กับวงในโคตินาไมด์ของ NAD⁺ และวงอะโรมาติกของ Tyr158 จะเกิดอันตรกิริยาโดยตรงกับไทโอเอสเทอร์คาบอร์นิลออกซิเจนของซับสเตรตซึ่งจะช่วยให้อินเตอร์มีเดียตีมีความเสถียร หลังจากนั้นได้มีผู้ศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ InhA ทั้งชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ที่จับอยู่กับ NADH ที่เป็นโคเอนไซม์ [12] และโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ชนิดนี้ที่จับอยู่กับตัวยาไอโซในอะซิดทั้งที่เป็นชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์แบบ I21V และ S94A [13] และจากข้อมูลทางโครงสร้างผลึกเหล่านี้ทำให้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์และการดื้อยาของไอโซในอะซิดในการยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากการศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ InhA ด้วยเทคนิคเอ็กซ์เรย์ดิฟแฟกชันแล้วยังได้มีการศึกษาทางด้านการจำลองโครงสร้างโดยคอมพิวเตอร์ (Computer aided molecular design) ของเอนไซม์ชนิดนี้อีกด้วย ในปี 2002 Pantano และคณะ [14] ได้ศึกษาการจับกันระหว่างเอนไซม์ InhA ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ (S94A) และ isonicotinic acid hydrazide-NADH โดยใช้วิธี ab initio molecular dynamics จากการคำนวณพบว่าอันตรกิริยาของ Ser94 และ NADH ซึ่งพบในโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ InhA แบบดั้งเดิมจะหายไป ซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวของ Gly14 นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณของเอนไซม์แบบดั้งเดิมค่อนข้างที่เหมือนกันกับโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ S94A และในปี 2005 Schroeder และคณะ [15] ศึกษาเปรียบเทียบ affinity ของ NADH ในการจับกับเอนไซม์ InhA ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์แบบ I21V และ I16T โดยใช้เทคนิค molecular dynamics simulation เมื่อเทียบคอนฟอร์เมชันของ NADH ที่จับอยู่กับเอนไซม์ InhA ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ พบว่าคอนฟอร์เมชันของ NADH ในส่วน pyrophosphate ที่จับอยู่กับเอนไซม์ InhA ชนิดกลายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งทำให้การเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบลดลง ส่งผลให้ affinity ของ NADH ในการจับกับเอนไซม์ InhA ชนิดกลายพันธุ์ลดลง จากข้อมูลที่ได้เหล่านี้ทำให้เข้าใจถึงกลไกการดื้อยาซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการออกแบบตัวยามีศักยภาพสูงในการรักษาโรควัณโรคเพื่อพัฒนาตัวยายังให้มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ InhA ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพการยับยั้งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยในปี 2004 Pasqualoto และคณะ [16] ใช้เทคนิค 4D-QSAR ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของสารในกลุ่ม hydrazides จำนวน 37 โมเลกุล โดยสารในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกับไอโซในอะซิด จากการศึกษาพบว่าโมเลกุลของสารที่มีหมู่แทนที่ที่ไม่มีขั้วในส่วน of acyl moiety จะทำให้ค่าการยับยั้งลดลง นอกจากนี้การปรับเปลี่ยนโมเลกุลของสารในส่วน NAD moiety ให้มีหมู่แทนที่ที่ไม่มีขั้วและเป็นมีสมบัติเป็น hydrogen bond donor and acceptor จะช่วยปรับปรุงอันตรกิริยาของสารยับยั้งกับกรดอะมิโนใน active site ของเอนไซม์ InhA นอกจากการศึกษาความสัมพันธ์

ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของสารในกลุ่มนี้แล้วยังได้มีการศึกษาในกลุ่มของสารอนุพันธ์ benzoxazines และ phenylquinazoline และสารในกลุ่ม isonicotinic acid hydrazides [18] เมื่อเร็วนี้เพื่อเป็นการพัฒนาตัวยาในกลุ่มสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิด ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิด [19-20]

ตั้งแต่มีการรายงานการดื้อยาของไอโซไนอาซิด ที่เกี่ยวเนื่องกับการกลายพันธุ์ของ เอนไซม์ KatG ทำให้มีการสังเคราะห์สารกลุ่มใหม่ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้โดยตรง โดยไม่ต้องอาศัยการกระตุ้นจากเอนไซม์ KatG [21-26] สารยับยั้งในกลุ่มสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ได้นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ สารในกลุ่มนี้มีความสามารถสูงในการยับยั้งเอนไซม์ InhA [26] สารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ $0.09 \mu M$ แต่อย่างไรก็ตามสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ยังให้ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียที่ต่ำ โดยให้ค่า minimum inhibitory concentrations (MIC) มากกว่า $125 \mu M$ ดังนั้นการศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงพื้นฐานทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ที่จำเป็นต่อค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ระเบียบและวิธีวิจัย

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย

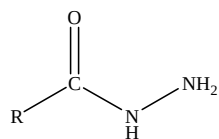
- 1.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ PCs (Intel Quad Core)
- 1.2 เครื่องพิมพ์ (Laser Printer)
- 1.3 เครื่องพิมพ์ (Color Printer)
- 1.4 โปรแกรมการคำนวณทางเคมีควอนตัม (Gaussian 03)
- 1.5 โปรแกรมการคำนวณทางโมเลคิวลาร์โมเดลลิง (Discovery studio, Gausview และ ChemDraw)
- 1.6 โปรแกรมส่งข้อมูล (winscp, putty)

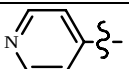
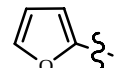
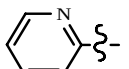
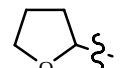
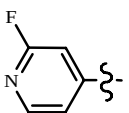
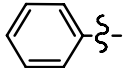
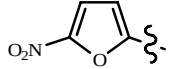
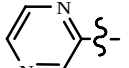
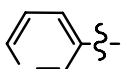
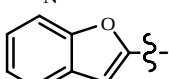
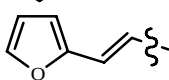
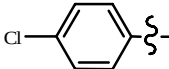
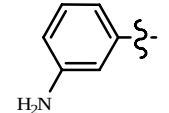
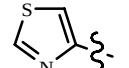
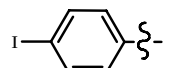
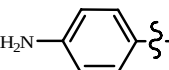
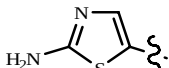
2. ข้อมูลทางโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA ของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์

2.1 โครงสร้างและค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA ของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิด

รวบรวมข้อมูลทางโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิด จำนวน 36 โครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 1 เนื่องจากตัวยาไอโซไนอาซิดและสารอนุพันธ์มีคุณสมบัติเป็น prodrug ดังนั้นในงานวิจัยจึงใช้โครงสร้างที่ออกฤทธิ์ได้ของสารเหล่านี้ในการศึกษา โดยโครงสร้างที่ออกฤทธิ์ได้ของสารเหล่านี้จะอยู่ในรูปที่สร้างพันธะโคเวเลนต์กับ NADH โคแฟกเตอร์ คือ R-NADH โดยทุกโครงสร้างของสารอนุพันธ์จะแตกต่างกันที่หมู่ R ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. โครงสร้างและค่าค่ากัมมันตภาพการยับยั้งของสารอนุพันธ์ไฮโซไนอไซด์



สาร	โครงสร้างของหมู่แทนที่ R	ค่ากัมมันตภาพการยับยั้ง (log 1/MIC)
INH		7.70
1		7.22
2*		6.82
3		6.52
4		6.40
5		6.22
6		6.10
7		5.82
8		5.70
9*		5.70
10*		5.52
11		5.52
12		5.52
13		5.52
14		5.22
15		5.22
16		5.22

17		5.10
18		5.10
19*		5.10
20		4.92
21*		4.92
22		4.92
23		4.82
24		4.70
25		4.52
26*		4.52
27		4.40
28		4.10
29		4.00
30		4.00
31		3.65
32		3.52
33		3.22
34		3.22
35		3.22

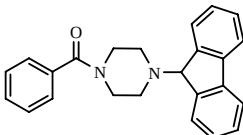
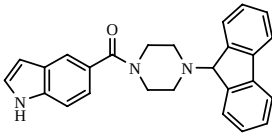
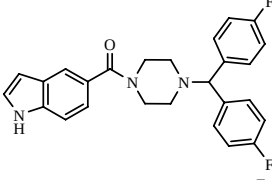
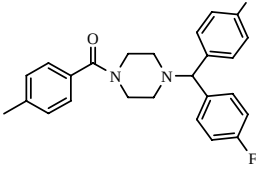
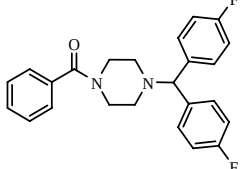
* Test set compound

2.2 โครงสร้างและค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA ของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์

ข้อมูลทางโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ จำนวน 28 โครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. โครงสร้างและค่ากัมมันตภาพการยับยั้งของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์

สาร	X	n	R ₁	R ₂	ค่ากัมมันตภาพการยับยั้ง log (1/IC ₅₀)
a1*	N	0	H	H	4.41
a2	N	0	4-CH ₃	H	4.78
a3	N	0	4-CH ₃	3-CF ₃	5.20
a4	N	0	4-CH ₃	3-Cl	5.51
a5	N	0	3-CH ₃	3-Cl	5.03
a6	N	0	3-CH ₃	4-NO ₂	4.81
a7	N	0	3,4-Me ₂	3-Cl	6.00
a8	N	0	3,4-Me ₂	3-CF ₃	5.73
a9	N	0	4-i-Pr	3-Cl	<4.00
a10	N	0	4-t-Bu	3-Cl	<4.00
a11	N	0	4-t-Bu	3-CF ₃	<4.00
a12	N	0	4-t-Bu	4-CH ₃ , 3-Cl	<4.00
a13	N	0	2-F	3-Cl	4.86
a14*	N	0	4-F	3-Cl	5.01
a15	N	0	3-Cl	3-Cl	5.17
a16	N	0	3,4-Cl ₂	3-Cl	5.22
a17	N	0	3,4-Cl ₂	H	4.75
a18	N	1	H	H	4.50
b1	C	1	3-Cl	H	5.11
b2	C	1	2-F	H	4.85
b3*	C	1	4-CH ₃	H	5.29
b4	C	1	3-CH ₃	H	5.13
p1					6.40

p2		7.05
p3*		6.70
p4		5.98
p5		5.72
p6		5.69

*The test set compound for QSAR studies

3. การสร้างและคำนวณโครงสร้างของโมเลกุลตัวยับยั้ง

โครงสร้างเริ่มต้นของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดได้จากข้อมูลทาง x-ray crystallography ของโครงสร้างที่ออกฤทธิ์ได้ของตัวยาไอโซไนอาซิด (INH-NAD) และสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA (2IDZ, 2NSD) จากนั้นโครงสร้างของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดจำนวน 36 โครงสร้าง และสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์จำนวน 28 โครงสร้าง ถูกสร้างโดยใช้โปรแกรมโมเลคิวลาร์โมเดลลิ่ง Gausview โดยใช้โครงสร้างตั้งต้นจากโครงสร้างของตัวยาไอโซไนอาซิด ซึ่งโครงสร้างทั้งหมดนี้จะทำการคำนวณปรับโครงสร้างที่เสถียรที่สุด (full geometrical optimization) ด้วยระเบียบวิธีแอบอินิซิโอ (HF/3-21G) เมื่อทำการคำนวณในขั้นตอนนี้เสร็จแล้ว จะได้โครงสร้างที่เสถียรแต่ละโมเลกุล จากนั้นนำโครงสร้างเหล่านี้ไปใช้ในการคำนวณด้วยวิธีการโมเลกูลาร์ไดคกิ้ง การคำนวณทางเคมีควอนตัม และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบ 3D-QSAR

4. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพ

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งโดยวิธี Quantitative structure activity relationship (QSAR) ดังนี้

4.1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสามมิติ (Three Dimensional Quantitative structure activity relationship, 3D-QSAR)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบ 3D-QSAR ในโครงสร้างนี้จะใช้วิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามของโมเลกุล (Comparative Molecular Fields Analysis, CoMFA) และวิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (Comparative Similarity Index Analysis, CoMSIA) ซึ่งเป็นวิธีด้าน Computer-Aided Molecular Design ขั้นตอนสำคัญในการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีนั้นอาจแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนคือ

1. การวางโมเลกุล (Alignment rule)

ในวิธีการวิเคราะห์นั้นจะวางโมเลกุลทุก ๆ โครงสร้างภายในกล่องซึ่งมีขนาดที่กำหนด ทั้งนี้ขั้นตอนนี้จัดว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เนื่องจากผลการวิเคราะห์ของวิธี CoMFA จะได้จากการเปรียบเทียบสนามของโมเลกุลสองแบบคือ อันตรกิริยาสเตอริก (steric interaction) และอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic interaction) ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ของวิธี CoMSIA จะได้จากการเปรียบเทียบสนามของโมเลกุลห้าแบบคือ อันตรกิริยาสเตอริก (steric interaction) อันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic interaction) อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) การให้โปรตอน (H donor) และการรับโปรตอน (H acceptor) โดยในการศึกษานี้จะใช้วิธีการวางโมเลกุลด้วยวิธีการนำเอารูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิง

2. การวิเคราะห์โดยวิธีคอมฟาและคอมเซีย (CoMFA and CoMSIA Analysis)

โมเลกุลที่ได้วางทับไปในขั้นตอนที่ 1 และจะถูกสร้างบริเวณใน 3 มิติ รอบ ๆ โมเลกุลเป็นโครงผลึกลูกบาศก์ซึ่งจะทำให้ได้จุดตัด (grid point) รอบโมเลกุลจำนวนมาก ซึ่งจุดตัดดังกล่าวนี้จะเป็นโพรบอะตอม (probe atom) ซึ่งการวิเคราะห์จะคำนวณอันตรกิริยาระหว่างโพรบอะตอมกับโมเลกุลของตัวยับยั้งสองแบบคือ อันตรกิริยาสเตอริก อันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก การให้โปรตอน (H donor) และการรับโปรตอน (H acceptor) จากนั้นค่าอันตรกิริยาดังกล่าวจะถูกบันทึกไว้ในตาราง เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยระเบียบวิธี cross-validation และการถดถอยพหุคูณแบบพาร์เชียล (Partial Least Squares)

3. การแปลผล (Interpretation)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากวิธีวิเคราะห์ทั้งสองแบบนั้น จะไม่สามารถแสดงได้เป็นสมการทั่วไป แต่การประเมินผลว่าแบบจำลองใดที่ให้ผลการทำนายค่ากัมมันตภาพดีที่สุดนั้นจะอาศัยค่าความสามารถในการทำนาย (Predictive ability, q^2) เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาโดยค่า q^2 ควรมีค่าสูงกว่า 0.6 และการแปลผลจะแสดงในรูปของภาพคอนทัวร์ของสัมประสิทธิ์ (coefficient contour map) ทั้งนี้ คอนทัวร์แบบสเตอริกจะแสดงโดยสีเขียว (positive) และสีเหลือง (negative) ซึ่งหมายความว่าควรเพิ่มหมู่เกาะในโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบสเตอริกบริเวณที่แสดงโดยสีเขียว คอนทัวร์แบบอิเล็กโตรสแตติกจะแสดง

โดยสีแดง (positive) และสีน้ำเงิน (negative) โดยความหมายคือควรเพิ่มหมู่แทนที่ในโครงสร้างโมเลกุลที่มีประจุอิเล็กตรอนสูงขึ้นเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติกบริเวณที่แสดงโดยสีแดง สำหรับคอนทัวร์แบบไฮโดรโฟบิกจะแสดงโดยสีชมพู (positive) และสีขาว (negative) หมายความว่าควรเพิ่มหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการละลายในชั้นไขมันเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิกในบริเวณที่แสดงสีชมพู ในการพิจารณาอิทธิพลของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของตัวยับยั้งและเอนไซม์โดยพิจารณาจากคอนทัวร์ของการให้โปรตอน (H donor) โดยจะแสดงสีฟ้า (positive) และสีม่วง (negative) หมายถึงควรเพิ่มหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการให้โปรตอนในบริเวณที่แสดงสีฟ้า และคอนทัวร์ของการรับโปรตอน (H acceptor) โดยจะแสดงเป็นสีส้ม (positive) และสีขาว (negative) หมายถึงควรเพิ่มหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการรับโปรตอนเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาระหว่างบริเวณที่แสดงสีขาวนั้น

4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งโดยวิธี 2D-QSAR

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบ 2D-QSAR ได้ใช้วิธี Hologram QSAR ตัวอย่างของโมเลกุล คือ molecular hologram ซึ่งได้จากการนับทุก ๆ fragment ที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลแล้วแปลงเป็นตัวเลขจำนวนเต็มใส่ลงในแถวข้อมูล ดังนั้นแต่ละโมเลกุลจะมี molecular hologram เฉพาะตัว จากนั้นทำการหาความสัมพันธ์ระหว่าง molecular hologram และ กัมมันตภาพในการยับยั้งโดยใช้ระเบียบวิธีการถดถอยพหุคูณแบบพาร์เชียล (Partial Least Squares) การแปรผลของแบบจำลอง HQSAR ซึ่งให้เห็นถึงองค์ประกอบที่สำคัญของโมเลกุลในการแสดงกัมมันตภาพในการยับยั้งโดยแผนภาพคอนทัวร์สีเขียว-เหลืองซึ่งให้เห็นว่า fragment นั้นส่งผลทำให้กัมมันตภาพในการยับยั้งสูงขึ้น ในขณะที่แผนภาพคอนทัวร์สีแดง-ส้ม ซึ่งให้เห็นว่า fragment นั้นส่งผลทำให้กัมมันตภาพในการยับยั้งต่ำลง

5. การศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกูลาร์ด็อกกิ้ง

โครงสร้างผลึก (X-ray crystallography) ของยาไอโซในอาซิดที่จับอยู่กับเอนไซม์ InhA รหัส 2IDZ และโครงสร้างผลึกของสารยับยั้งเอริลเอไมด์ที่จับอยู่กับเอนไซม์ InhA รหัส 2NSD ได้นำมาใช้ในการคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลกูลาร์ด็อกกิ้ง ขั้นแรกทำการทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณโมเลกูลาร์ด็อกกิ้ง โดยเบื้องต้นจากโครงสร้าง X-ray ทำการแยกโครงสร้างของตัวยาออกจากเอนไซม์ จากนั้นคำนวณรูปแบบการวางตัวของตัวยาไอโซในอาซิดในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA โดยใช้วิธีการคำนวณโมเลกูลาร์ด็อกกิ้ง ด้วยโปรแกรม AutoDock3.05 และโปรแกรม Glide ทำการเปรียบเทียบระหว่างรูปแบบการจับที่ได้จาก X-ray และ รูปแบบการจับที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธีการคำนวณโมเลกูลาร์ด็อกกิ้ง ถ้าค่า RMSD มีค่าน้อยกว่า 1 อังสตรอม แสดงให้เห็นว่าโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณโมเลกูลาร์ด็อกกิ้ง

อกก็มีความน่าเชื่อถือ และสามารถนำมาใช้ในการคำนวณรูปแบบการวางตัวของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ได้

6. การคำนวณพลังงานการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนโพรงการจับของเอนไซม์ InhA และสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดด้วยการคำนวณเคมีควอนตัม

นำโครงสร้างของสารอนุพันธ์ในกลุ่มไอโซในอาซิดที่วางตัวในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ที่ได้จากการศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง มาคำนวณหาพลังงานอันตรกิริยาระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนแต่ละตัวที่อยู่ในโพรงการจับด้วยระเบียบวิธีการคำนวณเคมีควอนตัม MP2/6-31G(d) โดยค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาคำนวณได้ดังสมการ

$$IE = E_{\text{complex}} - (E_{\text{amino}} + E_{\text{inhibitor}})$$

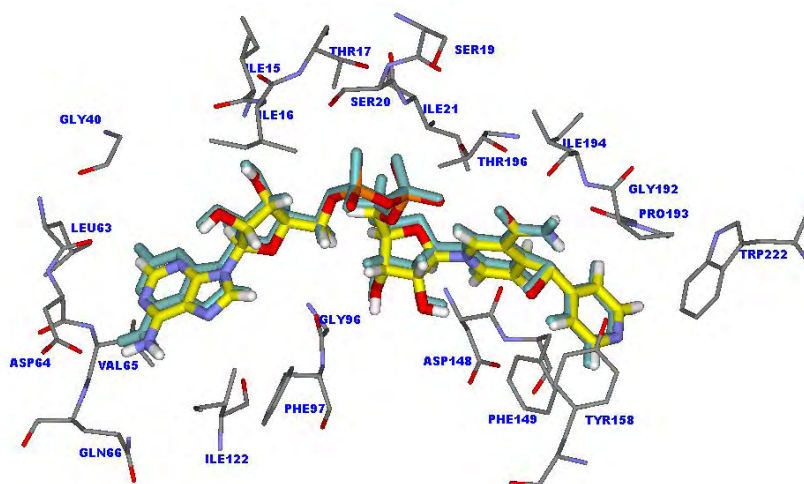
เมื่อ	IE	= ค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนและสารยับยั้ง
	E_{complex}	= พลังงานระหว่างสารยับยั้งและแต่ละกรดอะมิโน
	E_{amino}	= พลังงานของแต่ละกรดอะมิโน
	$E_{\text{inhibitor}}$	= พลังงานของสารยับยั้ง

1. ผลการศึกษาด้วยระเบียบวิธีคำนวณของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิด

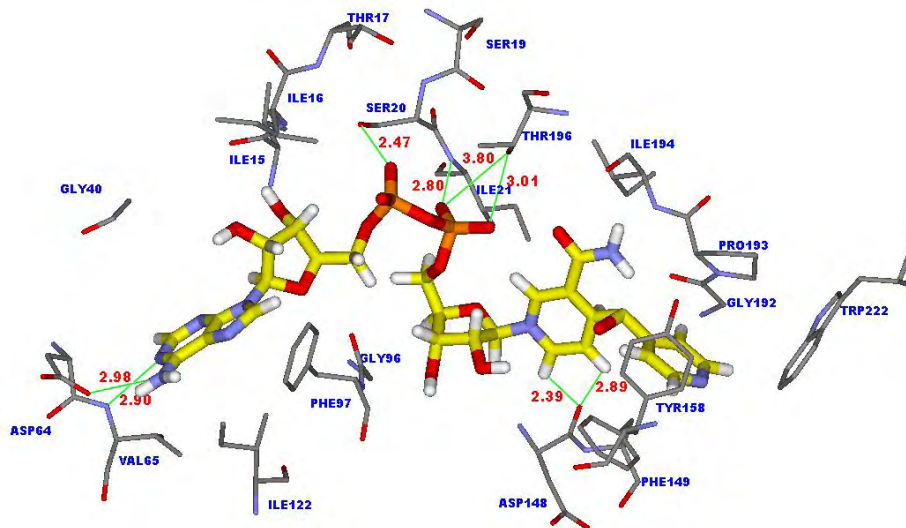
1.1 การศึกษารูปแบบการจัดวางตัวของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ด้วยวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาแบบการจัดวางตัวของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดในโพรงการจับของเอนไซม์เป้าหมายด้วยวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง จากการศึกษาพบว่ารูปแบบการจัดวางตัวของไอโซไนอาซิดในโพรงการจับของเอนไซม์เป้าหมายที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งมีความน่าเชื่อถือ โดยให้ค่า RMSD เท่ากับ 0.4 อังสตรอม รูปที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างรูปแบบการวางตัวของไอโซไนอาซิดที่ได้จากโครงสร้างทางเอ็กเซย์และโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณ

จากการวิเคราะห์รูปแบบการวางตัวของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งทำให้ทราบถึงอันตรกิริยาที่สำคัญของสารกลุ่มนี้ได้ โดยส่วนของ NAD สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Asp148, Thr196, Ile21, Ser20 และ Asp48 ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งพันธะไฮโดรเจนนี้เป็นอันตรกิริยาที่สำคัญในการจับกับเอนไซม์ของไอโซไนอาซิด นอกจากนี้หมู่แทนที่ R ยังสามารถเกิดอันตรกิริยาแบบไพ-ไพ และ ไฮโดรเจน-ไพ กับกรดอะมิโน Phe149 และ Phe149 ตามลำดับ



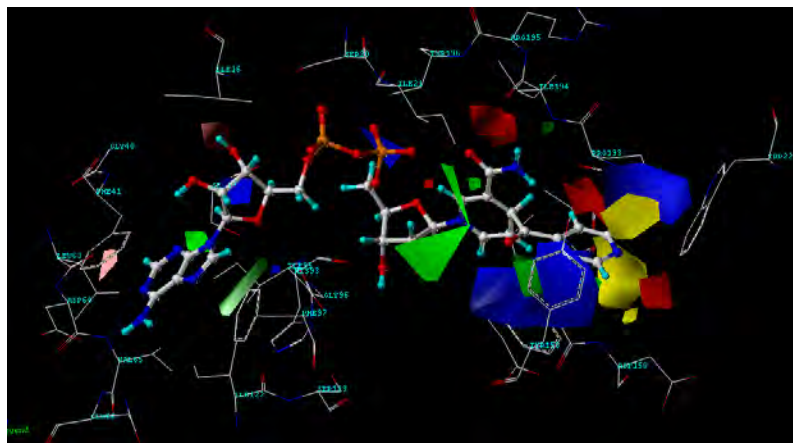
รูปที่ 1. เปรียบเทียบระหว่างรูปแบบการวางตัวของไอโซไนอาซิด (INH-NAD) ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ที่ได้จากโครงสร้างทางเอ็กเซย์ (สีเหลือง) และโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณ (สีเขียว)



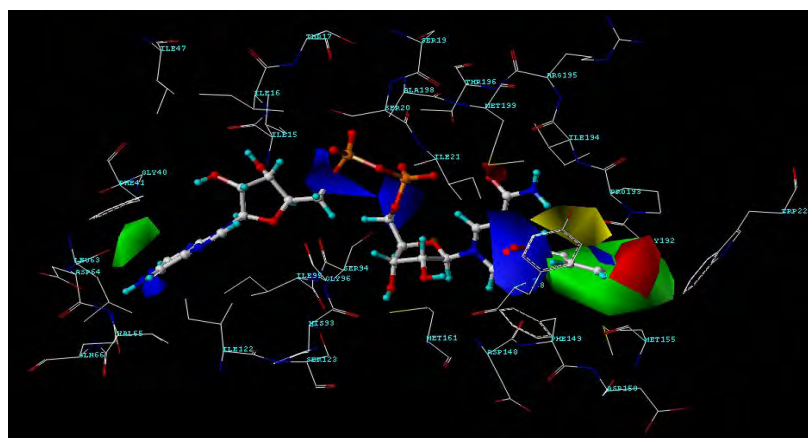
รูปที่ 2. รูปแบบการวางตัวของไอโซอาซิด (INH-NAD) ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ที่ได้จากโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณ ซึ่งแสดงอัตรากิริยาที่สำคัญในการจับของสารยับยั้ง

1.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติ (3D-QSAR)

งานวิจัยได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติ (3D-QSAR) ของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิด ด้วยระเบียบวิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามของโมเลกุล (CoMFA) และวิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (CoMSIA) โดยใช้การวางซ้อนทับกันของโมเลกุลที่ได้จากวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง จากการศึกษาพบว่าแบบจำลองที่ดีที่สุดที่ได้จากวิธี CoMFA และ CoMSIA สามารถทำนายกัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดได้สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลอง โดยให้ค่าความสามารถในการทำนาย (r^2_{cv}) เท่ากับ 0.67 และ 0.74 ตามลำดับ นอกจากนี้แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากวิธี CoMFA และ CoMSIA สามารถชี้แนะถึงความต้องการทางโครงสร้างที่สำคัญของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดได้ ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4 จากแผนภาพคอนทัวร์เหล่านี้ชี้แนะความต้องการทางโครงสร้างของหมู่แทนที่ R ดังนี้ หมู่แทนที่ R ควรเป็นหมู่แทนที่ขนาดใหญ่แต่อย่างไรก็ตามขนาดของหมู่แทนที่นี้ไม่ควรมีขนาดใหญ่มากเกินไป และนอกจากนี้ทั้งสองข้างของหมู่แทนที่ R ควรมีหมู่ที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนสูง CoMSIA ดังนั้นข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการศึกษานี้สามารถช่วยชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงโครงสร้างของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้นในการรักษาโรคได้



รูปที่ 3. แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากวิธี CoMFA แสดงสนามสเตอริก และสนามอิเล็กโตรสแตติก (สีเขียวและสีเหลืองบ่งบอกบริเวณที่ต้องการและไม่ต้องการสเตอริก ตามลำดับ, สีแดงและสีน้ำเงินบ่งบอกบริเวณที่ต้องการและไม่ต้องการอิเล็กตรอน ตามลำดับ)



รูปที่ 4. แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากวิธี CoMSIA แสดงสนามสเตอริก และสนามอิเล็กโตรสแตติก (สีเขียวและสีเหลืองบ่งบอกบริเวณที่ต้องการและไม่ต้องการสเตอริก ตามลำดับ, สีแดงและสีน้ำเงินบ่งบอกบริเวณที่ต้องการและไม่ต้องการอิเล็กตรอน ตามลำดับ)

1.3 การคำนวณพลังงานการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนโพรงการจับของเอนไซม์ InhA และสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดด้วยการคำนวณเคมีควอนตัม

ในการคำนวณพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาได้ทำการตัดโครงสร้างของสารยับยั้งออกเป็นส่วนต่าง ๆ ดังนี้ อะดีนีน (adenine) อะดีนีนไรโบส (adenine ribose) ไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate) นิโคตินาไมด์ไรโบส (nicotinamide ribose) นิโคตินาไมด์ และ หมู่แทนที่ R (R substituent) พลังงานในการเกิดอันตรกิริยาที่ได้จากการคำนวณของไอโซไนอาซิด (INH) และสารยับยั้งที่มีค่ากัมมันตภาพต่ำสุด (Cpd.35) แสดงดังในตารางที่ 3 สำหรับไอโซไนอาซิดมีค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาอยู่ในช่วง -33.01 to 13.20 kcal/mol โดยที่หมู่แทนที่ R (4-

pyridyl ring) ให้ค่าพลังงานของการเกิดอันตรกิริยาแบบดึงดูดกับอะมิโน Phe149 และ Tyr158 เท่ากับ 1.21 และ 2.09 kcal/mol ตามลำดับ ซึ่งพลังงานเหล่านี้สอดคล้องกับอันตรกิริยาไพ-ไพ และ อันตรกิริยาไฮโดรเจน-ไพ กับอะมิโน Phe149 และ Tyr158 เมื่อพิจารณานิโคตินาไมด์ไรโบสพบว่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยากับอะมิโน Lys165 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 11.15 kcal/mol ซึ่งสอดคล้องกับอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติก สำหรับไพโรฟอสเฟตจะให้พลังงานในการเกิดอันตรกิริยาแบบดึงดูดสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่น ๆ ของโครงสร้าง ซึ่งค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยานี้จะสอดคล้องกับพันธะไฮโดรเจนระหว่างไพโรฟอสเฟตกับอะมิโน Ser20 Thr196 และ Ile21 ดังนั้นผลจากการศึกษานี้สามารถบ่งบอกว่า พันธะไฮโดรเจนเป็นอันตรกิริยาที่สำคัญของไอโซไนอาซิดต่อการยับยั้งเอนไซม์

เมื่อพิจารณาค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาของสารยับยั้งที่ค่ากัมมันตภาพต่ำสุดพบว่าหมู่แทนที่ R ของสารนี้ให้พลังงานการเกิดอันตรกิริยาแบบผลักรที่มีค่าสูงกับอะมิโน Phe149 Tyr158 Ala191 Pro193 และ Trp222 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งพลังงานเหล่านี้สอดคล้องกับ steric effect ของหมู่แทนที่ R กับอะมิโนเหล่านั้น และนอกจากนี้ยังพบว่าค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาแบบดึงดูดกับอะมิโน Ser20 ลดลงประมาณ 20 kcal/mol เมื่อเปรียบเทียบกับค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาของไอโซไนอาซิด มากไปกว่านั้นยังพบว่าสารยับยั้งนี้ มีค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาแบบผลักรกับอะมิโน Val65 ประมาณ 14 kcal/mol โดยอาศัยค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาที่ได้จากการคำนวณจึงสามารถทำให้อธิบายถึงค่ากัมมันตภาพต่ำสุดของสารยับยั้งนี้ได้

ตารางที่ 3 พลังงานการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนโพรงการจับของเอนไซม์ InhA และ สารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดด้วยการคำนวณเคมีควอนตัม

ส่วนของโครงสร้าง	อะมิโน	พลังงานในการเกิดอันตรกิริยา (kcal/mol)	
		INH	Cpd. 35
R substituent	Phe149	-1.21	2.64
	Tyr158	-2.09	-0.07
	Ala191	0.78	4.01
	Gly192	1.61	5.13
	Pro193	0.23	6.72
	Trp222	0.03	-0.21
Nicotinamide	Ile21	-0.62	-0.39
	Met147	-0.58	-0.32
	Asp148	-4.31	-5.75

	Phe149	6.95	4.55
	Lys165	1.56	2.64
	Ala191	-2.41	-1.90
	Gly192	-0.12	-0.35
	Pro193	0.52	-0.22
	Ile194	13.20	3.74
	Thr196	-1.88	-2.09
Nicotinamide Ribose	Gly14	-0.18	-0.20
	Ser20	0.01	0.01
	Ile21	-0.54	-0.19
	Ala22	-0.02	-0.03
	Ser94	-1.30	-1.15
	Ile95	0.22	-0.17
	Gly96	-1.19	-1.24
	Met147	0.54	0.99
	Asp148	-0.29	-0.39
	Phe149	-0.26	-0.24
	Met161	-0.18	-0.16
	Lys165	-11.15	-12.00
	Ala191	-0.30	-0.30
pyrophosphate	Gly14	8.87	9.34
	Ile16	-10.17	-10.12
	Thr17	-7.32	-7.83
	Ser19	-1.09	-1.24
	Ser20	-33.01	-32.08
	Ile21	-23.92	-23.87
	Ala22	-10.86	-10.84
	Ser94	6.63	8.70
	Ile95	-4.14	-4.16
	Gly96	3.27	3.41
	Met147	-3.63	-3.49
	Thr196	-24.48	-24.94
Adenine Ribose	Gly14	2.62	6.42

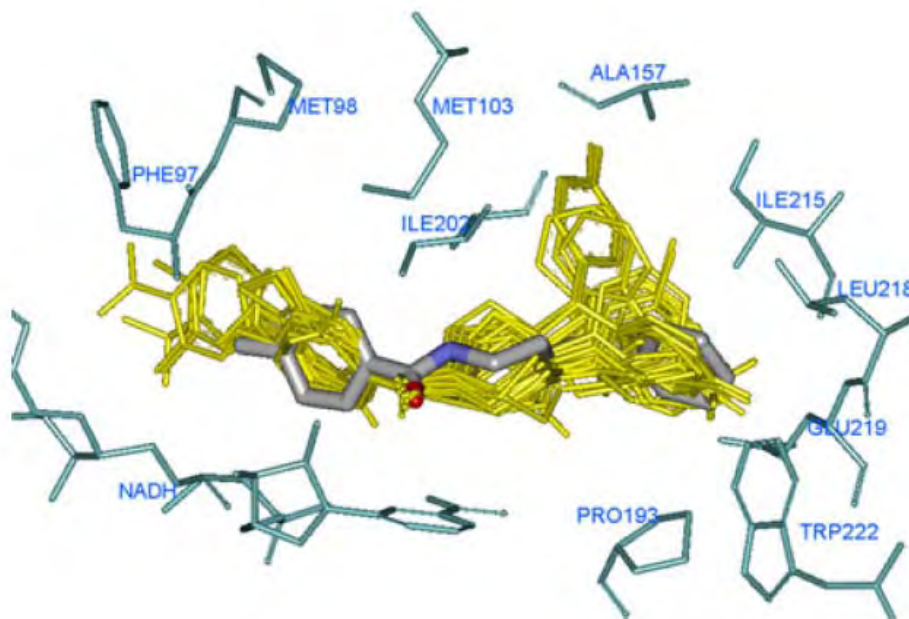
	Ile15	-1.36	-1.37
	Ile16	3.17	2.96
	Ser20	-0.09	-0.04
	Phe41	0.10	0.65
	Val65	0.04	0.06
	Ser94	-0.15	0.07
	Ile95	-2.08	-1.64
	Gly96	-1.74	-1.70
	Phe97	-0.50	-0.36
	Ile122	0.11	0.12
Adenine	Gly14	-0.65	-0.76
	Gly40	-1.36	-0.18
	Phe41	-2.03	-2.45
	Leu63	0.18	1.67
	Asp64	-9.11	-8.80
	Val65	-2.67	5.76
	Gln66	0.85	1.45
	Ile95	-0.95	0.15
	Gly96	-1.31	-1.08
	Phe97	-0.03	0.05
	Ile122	-0.94	-0.70

2. ผลการศึกษาด้วยระเบียบวิธีคำนวณของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์

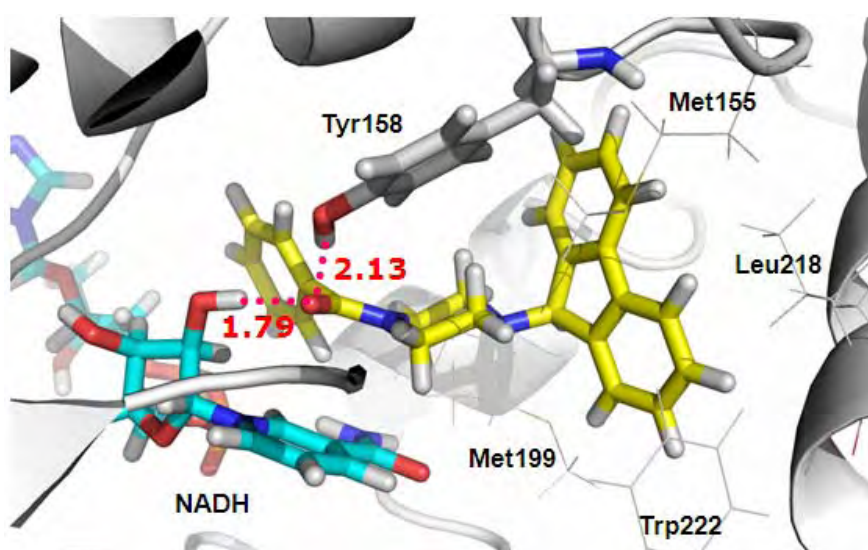
2.1 การศึกษารูปแบบการวางตัวของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ด้วยวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษารูปแบบการจัดวางตัวของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ด้วยวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง จากการศึกษาพบว่ารูปแบบการจัดวางตัวของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้งมีความน่าเชื่อถือ โดยให้ค่า RMSD เท่ากับ 0.7 อังสตรอม จากการศึกษาพบว่า สารอนุพันธ์เอริลเอไมด์มีรูปแบบการจับที่คล้ายคลึงกันดังแสดงในรูปที่ 5 จากการวิเคราะห์รูปแบบการวางตัวของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง ทำให้ทราบถึงอันตรกิริยาที่สำคัญของสารกลุ่มนี้ได้ สารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ส่วนใหญ่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้กับหมู่ไฮดรอกซิลของ Tyr158 และ NADH ดังแสดงในรูปที่ 6 ดังนั้น

อันตรกิริยานี้ถือเป็นอันตรกิริยาที่สำคัญของสารยับยั้งในกลุ่มนี้ นอกจากนี้อันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างหมู่แทนที่ B กับ Ala157, Met199, Pro193, Val203, Ile215, Leu218, Ile202, Trp222 and Met232 ยังเป็นอีกหนึ่งอันตรกิริยาที่สำคัญในการจับของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ดังแสดงในรูปที่ 4 สารอนุพันธ์ที่มีหมู่แทนที่ B ขนาดใหญ่ สามารถเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกได้ดีกว่าสารที่มีหมู่แทนที่ B ขนาดเล็ก และยังทำให้มีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ดีขึ้นด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2 สาร **p1-p6** ที่มีหมู่แทนที่ B ขนาดใหญ่ ให้มีค่ากัมมันตภาพที่สูงกว่าในกลุ่ม **a** และ **b**



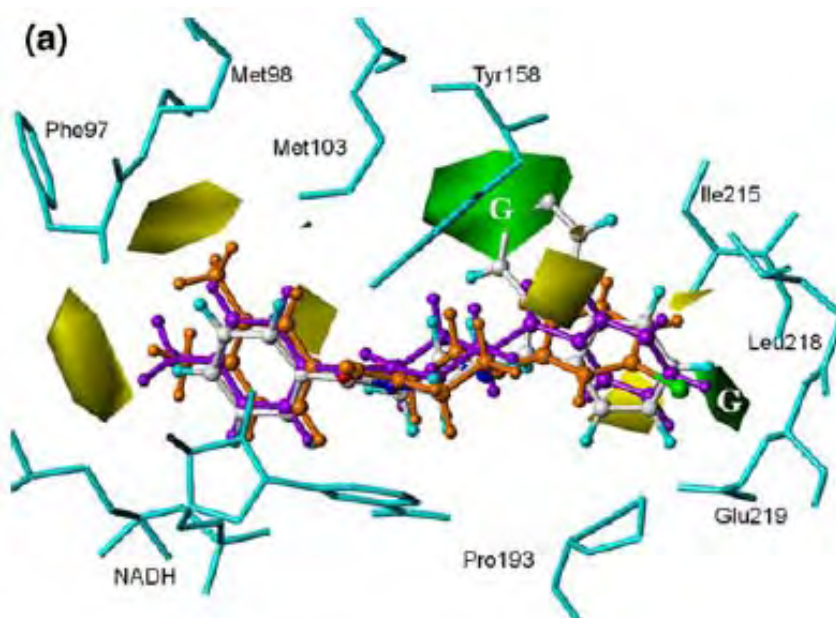
รูปที่ 5. รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA



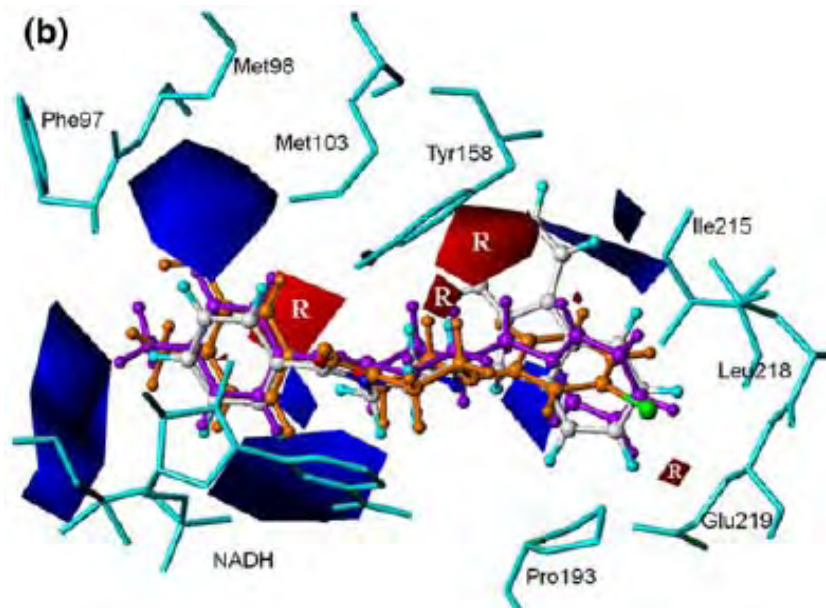
รูปที่ 6. รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA

2.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติ (3D-QSAR)

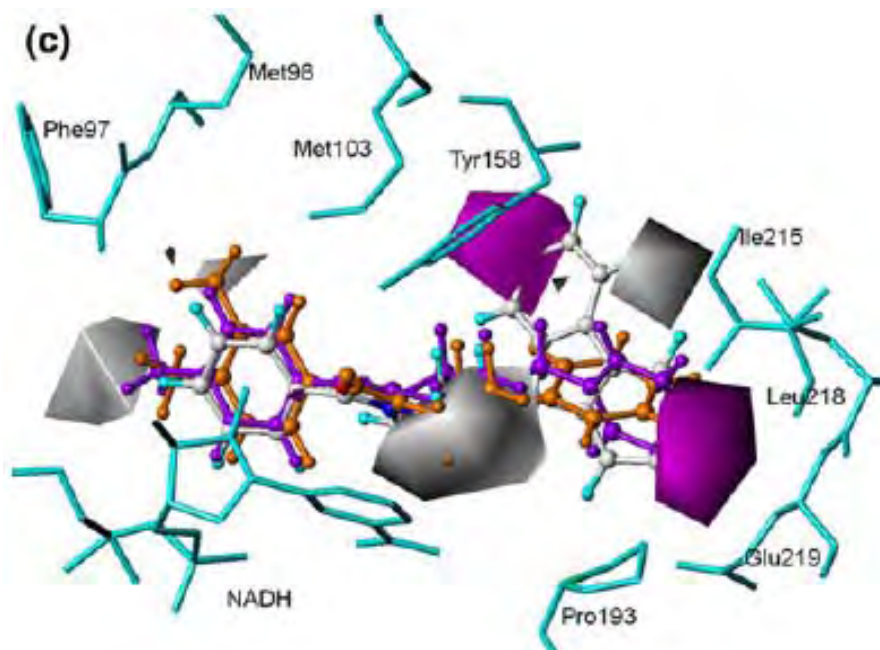
งานวิจัยได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติ (3D-QSAR) ของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ด้วยระเบียบวิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามของโมเลกุล (CoMFA) และวิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (CoMSIA) โดยใช้การวางซ้อนทับกันของโมเลกุลที่ได้จากวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ่ง จากการศึกษาพบว่าแบบจำลองที่ดีที่สุดที่ได้จากวิธี CoMFA และ CoMSIA สามารถทำนายกัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ได้สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลอง โดยให้ค่าความสามารถในการทำนาย (r^2_{cv}) เท่ากับ 0.68 และ 0.64 ตามลำดับ นอกจากนี้แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากวิธี CoMFA และ CoMSIA สามารถชี้แนะถึงความต้องการทางโครงสร้างที่สำคัญของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ได้ ดังแสดงในรูปที่ 7 8 และ 9 จากแผนภาพคอนทัวร์ พบว่าคอนทัวร์สีเหลือง สีน้ำเงิน และ สีขาว ปรากฏใกล้กับหมู่แทนที่ของวงอะโรมาติก A ดังนั้นหมู่แทนที่ของวงอะโรมาติก A ควรจะมีขนาดเล็กและเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอน (electron donating group) และต้องมีคุณสมบัติไฮโดรฟิลิก จึงจะทำให้สารอนุพันธ์เอริลเอไมด์มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่ดีขึ้น เมื่อพิจารณาที่หมู่แทนที่ B พบว่ามีคอนทัวร์สีเทาและคอนทัวร์สีม่วงขนาดใหญ่อยู่ใกล้กับหมู่แทนที่นี้ ดังนั้นเพื่อเพิ่มค่ากัมมันตภาพการยับยั้ง หมู่แทนที่ B ควรจะมีขนาดใหญ่และมีความเป็นไฮโดรโฟบิก ดังนั้นแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA สามารถช่วยชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงโครงสร้างของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ให้มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคผิวหนังที่รุนแรงขึ้นได้



รูปที่ 7. แผนภาพคอนทัวร์ CoMFA ที่แสดงสนามสเตอริก โดยสีเขียวและสีเหลืองบ่งบอกบริเวณที่ต้องการและไม่ต้องการสเตอริก ตามลำดับ



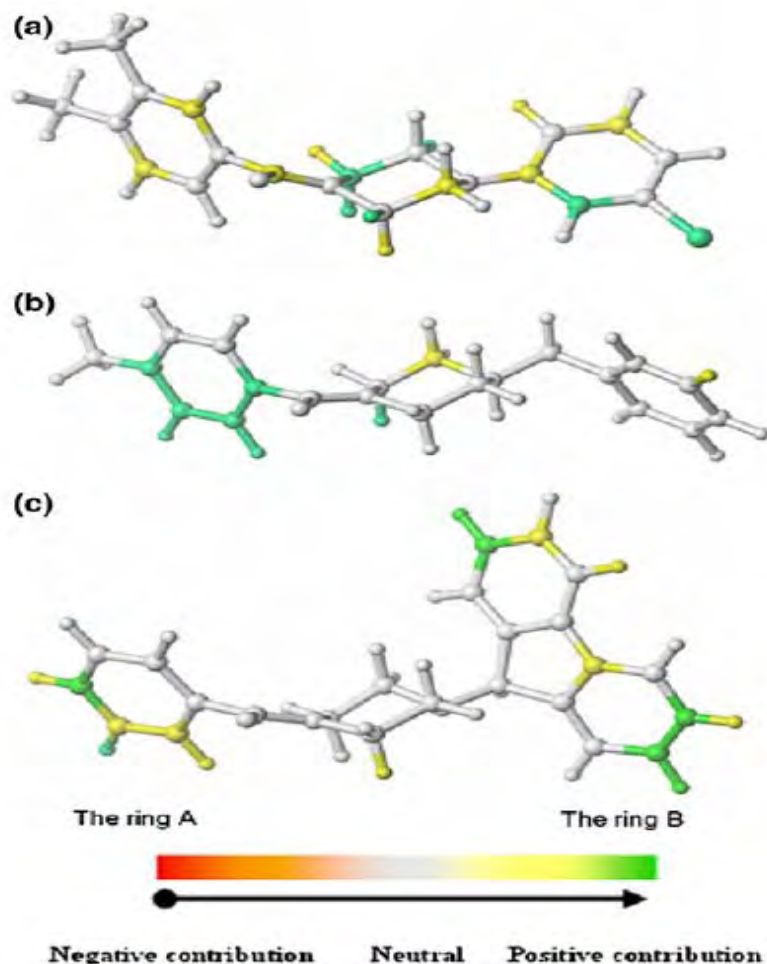
รูปที่ 8. แผนภาพคอนทัวร์ CoMFA แสดงนามอิเล็กโตรสแตติก โดยสีแดงและสีน้ำเงินบ่งบอกบริเวณที่ต้องการและไม่ต้องการอิเล็กตรอน ตามลำดับ



รูปที่ 9. แผนภาพคอนทัวร์ CoMSIA แสดงนามไฮโดรโฟบิก โดยสีเทาและสีม่วงบ่งบอกบริเวณที่ต้องการความเป็นไฮโดรฟิลิกและบริเวณที่ต้องการความเป็นไฮโดรโฟบิก ตามลำดับ

2.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพในเชิงสองมิติ (2D-QSAR)

แบบจำลอง HQSAR ซึ่งให้เห็นถึงองค์ประกอบ (fragment) ที่สำคัญของโมเลกุลที่มีต่อการแสดงกัมมันตภาพในการยับยั้ง ดังแสดงในรูปที่ 10 โดย fragment ที่มีสีเขียว-เหลือง เป็น fragment ที่ส่งผลทำให้ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งสูงขึ้น ในขณะที่ fragment ที่มีสีแดง-ส้ม เป็น fragment ที่ส่งผลทำให้ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งต่ำลง ผลที่ได้จากแบบจำลอง HQSAR สอดคล้องอย่างดีมากกับผลที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA โดยจะพบ fragment ที่มีสีเขียวในหมู่แทนที่ B ขนาดใหญ่ ซึ่งบ่งบอกว่าหมู่แทนที่ B ที่มีขนาดใหญ่จะทำให้ค่ากัมมันตภาพที่สูงขึ้น ในขณะที่หมู่แทนที่ขนาดใหญ่ของวงอะโรมาติก A เป็น fragment สีเทา ซึ่งชี้แนะว่าหมู่แทนที่ขนาดใหญ่ของวงอะโรมาติก A ไม่มีผลต่อค่ากัมมันตภาพ ดังนั้นตำแหน่งนี้ควรมีการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่



รูปที่ 10. แผนภาพแสดงแบบจำลอง HQSAR โดยสีเขียว-เหลืองชี้ให้เห็นว่า fragment นั้นส่งผลทำให้กัมมันตภาพในการยับยั้งสูงขึ้น ในขณะที่สีแดง-ส้ม ชี้ให้เห็นว่า fragment นั้นส่งผลทำให้กัมมันตภาพในการยับยั้งลดลง

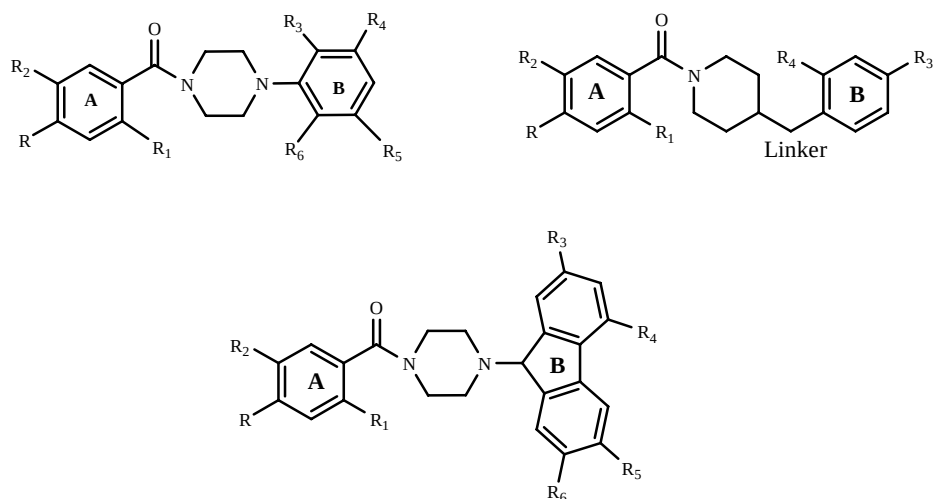
3. การออกแบบโมเลกุลของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA

3.1 การออกแบบโมเลกุลของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ในกลุ่มสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิด

แบบจำลองที่ได้จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพด้วยวิธี COMFA และ COMSIA มีความน่าเชื่อถือในทางสถิติ และมีประสิทธิภาพในการทำนายสูง และแต่ละแบบจำลองให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน จึงนับว่าเป็นแบบจำลองที่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวอธิบายโครงสร้างกับกัมมันตภาพได้เป็นอย่างดี แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากแบบจำลองจากวิธี COMFA และ COMSIA ซึ่งให้เห็นถึงความสำคัญของอันตรกิริยาสเตอริกและอิเล็กทรอนิกส์ของโมเลกุลที่มีต่อกัมมันตภาพ เมื่อพิจารณาแผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาทุกวิธีร่วมกับโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA ทำให้เข้าใจถึงข้อมูลทางโครงสร้างที่สำคัญ ที่ช่วยในการชี้แนะแนวทางการออกแบบโมเลกุลสารยับยั้งในกลุ่มสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดตัวใหม่ที่มีกัมมันตภาพสูงขึ้นในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ในการออกแบบโมเลกุลชนิดใหม่นั้น เริ่มจากการทำการพิจารณาปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ตำแหน่ง R ของตัวยาไอโซในอาซิด จากตารางที่ 1 (สารที่มีค่ากัมมันตภาพสูงที่สุด) โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA แต่เมื่อพิจารณาค่ากัมมันตภาพที่ได้จากการทำนายของสารยับยั้งที่ได้ออกแบบขึ้นมาใหม่ พบว่าสารยับยั้งที่ออกแบบขึ้นมาใหม่ทุกตัว ให้ค่ากัมมันตภาพที่ได้จากการทำนายต่ำกว่าตัวยาไอโซในอาซิด

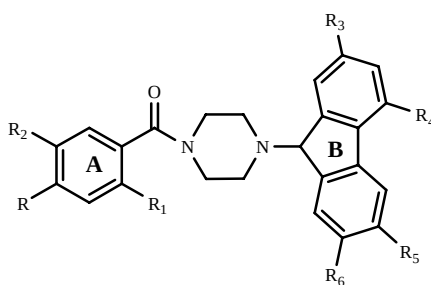
3.2 การออกแบบโมเลกุลของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ในกลุ่มสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์

แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากแบบจำลองจากวิธี CoMFA CoMSIA และ HQSAR ซึ่งให้เห็นถึงความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ที่ช่วยในการชี้แนะแนวทางการออกแบบโมเลกุลสารยับยั้งในกลุ่มสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ตัวใหม่ที่มีกัมมันตภาพสูงขึ้นในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ในการออกแบบโมเลกุลชนิดใหม่นั้น เริ่มจากการทำการพิจารณาปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ของสารยับยั้งเอริลเอไมด์ที่มีค่ากัมมันตภาพที่ดี ดังแสดงในรูปที่ 14 โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA CoMSIA และ HQSAR จากโครงสร้างต้นแบบทั้งสาม สามารถออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่ได้ทั้งหมดจำนวน 254 โครงสร้าง แต่เมื่อพิจารณาค่ากัมมันตภาพที่ได้จากการทำนายของสารยับยั้งที่ได้ออกแบบขึ้นมาใหม่ทั้งหมด พบว่ามีเพียงสารยับยั้งที่ออกแบบขึ้นมาใหม่จำนวน 17 โครงสร้าง ที่ให้ค่ากัมมันตภาพที่สูงกว่าสารต้นแบบ ดังแสดงในตารางที่ 4

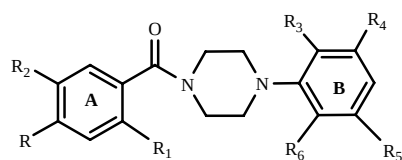


รูปที่ 14 สารต้นแบบที่ใช้ในการออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่ในกลุ่มสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์

ตารางที่ 4 โครงสร้างและค่ากัมมันตภาพที่ได้จากการทำนายของสารยับยั้งที่ออกแบบขึ้นมาใหม่



Compound	Substituent							Predicted activity (log 1/IC ₅₀)		
	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	CoMFA	CoMSIA	HQSAR
p2	H	H	H	H	H	H	H	6.96	6.77	6.68
PD31	NH ₂	H	NH ₂	H	H	H	H	6.95	6.78	6.99
PD33	tran C=CNH ₂	H	NH ₂	H	H	H	H	6.91	6.85	7.10
PD35	H	H	H	CH ₃	H	H	H	6.77	7.02	6.75
PD39	H	H	H	OCH ₃	H	H	H	7.04	6.58	6.82
PD73	H	H	H	H	NH ₂	H	F	6.71	6.89	6.80
PD74	tran C=CNH ₂	H	H	CH ₃	H	H	H	6.76	6.83	6.96
PD75	tran C=CNH ₂	H	H	H	NH ₂	H	H	7.00	6.98	7.01
PD76	tran C=CNH ₂	H	H	H	H	H	F	6.74	6.88	6.90
PD77	tran C=CNH ₂	H	NH ₂	CH ₃	H	H	H	7.00	7.02	7.16
PD78	tran C=CNH ₂	H	NH ₂	H	NH ₂	H	H	6.83	6.86	7.21
PD79	tran C=CNH ₂	H	NH ₂	H	H	H	F	6.70	6.91	7.10



Compound	Substituent							Predicted activity (log 1/IC ₅₀)		
	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	CoMFA	CoMSIA	HQSAR
AD42	H	H	H	CN	H	Cl	H	6.87	9.14	5.51
AD79	COH	NH ₂	H	CN	H	CN	H	6.18	10.18	5.21
AD80	CH ₂ CONH ₂	NH ₂	H	CN	H	CN	H	6.19	10.43	5.38
AD81	CH ₃	NH ₂	H	CN	H	Cl	H	6.63	8.99	5.24
AD82	CH ₃	NH ₂	H	CN	H	CN	H	6.75	10.54	5.20
AD84	CH ₂ CONH ₂	CH ₃	H	CN	H	CN	H	6.45	10.65	5.57
AD85	H	H	H	CN	H	H	H	6.28	9.00	4.92

สรุปผลและวิจารณ์

จากการศึกษาพบว่าวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง มีความน่าเชื่อถือในการทำนายรูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดที่อยู่ในรูปแบบที่สามารถออกฤทธิ์ได้ (INH-NAD adduct) โดยให้ค่า rmsd น้อยกว่า 0.4 อังสตรอม นอกจากนี้ยังได้คำนวณพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดกับแต่ละกรดอะมิโน ด้วยการคำนวณทางเคมีควอนตัมโดยใช้ระเบียบวิธี MP2/6-31G(d) จากการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งและการคำนวณทางเคมีควอนตัม พบว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิด ในการจับกับเอนไซม์ InhA โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไพโรฟอสเฟต นอกจากนี้เพื่อป้องกันความสับสนระหว่างโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพของสารเหล่านี้ ระเบียบวิธีการศึกษา CoMFA และ CoMSIA ได้นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ จากการศึกษพบว่าแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA ให้ค่าทางสถิติที่ดี โดยมีค่า r^2_{cv} เท่ากับ 0.67 และ 0.74 ตามลำดับ นอกจากนี้แบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA ยังสามารถบ่งบอกถึงความต้องการโครงสร้างของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิด ที่จะทำให้อาซิดกลุ่มนี้มีค่ากัมมันตภาพที่สูงขึ้นได้ โดยหมู่แทนที่ R ของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิด ควรมีขนาดใหญ่และมีหมู่ที่ให้อิเล็กตรอน แต่อย่างไรก็ตามหมู่ที่แทนที่ R ไม่ควรมีขนาดใหญ่จนเกินไป เนื่องจากสามารถทำให้เกิดสเตอริกได้

สำหรับสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ซึ่งเป็นสารยับยั้งกลุ่มใหม่ของเอนไซม์ InhA ที่มีกลไกการยับยั้งเอนไซม์ InhA ที่แตกต่างจากยาไอโซในอาซิด โดยสารยับยั้งในกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้โดยตรง โดยไม่ต้องการกระบวนการกระตุ้น ซึ่งสามารถแก้ปัญหาการดื้อยาของตัวยาไอโซในอาซิดได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษารูปแบบการจับของสารยับยั้งเอริลเอไมด์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง จากการศึกษพบว่าวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งมีความสามารถสูงในการทำนายรูปแบบการจับของสารยับยั้งเอริลเอไมด์ โดยให้ค่า rmsd ระหว่างโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณและโครงสร้างทางเอ็กซ์เรย์ เท่ากับ 0.73 อังสตรอม จากการศึกษพบว่า สารยับยั้งเอริลเอไมด์สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ NADH และ Tyr158 นอกจากนี้อันตรกิริยาที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คืออันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิกของหมู่แทนที่ B เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพของสารเหล่านี้ ระเบียบวิธี CoMFA CoMSIA และ HQSAR ได้นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ด้วย จากแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA พบว่าสนามสเตอริก สนามอิเล็กโตรสแตติก และสนามไฮโดรโฟบิก มีความสำคัญต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารเหล่านี้ และผลจากระเบียบวิธี CoMFA และ CoMSIA ยังสอดคล้องกับผลที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง โดยหมู่แทนที่ B ที่มีขนาดใหญ่และมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก สามารถทำให้ค่ากัมมันตภาพของสารเอริลเอไมด์สูงขึ้นได้ สำหรับผลที่ได้จากระเบียบวิธี HQSAR ยังให้ผลที่สอดคล้องกับผลจากระเบียบวิธี CoMFA และ CoMSIA ดังนั้นเมื่อนำผลจากการศึกษาที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ร่วมกัน ทำให้ได้ข้อมูลทางโครงสร้างที่สำคัญของสารยับยั้งไอโซในอาซิดและสาร

อนุพันธ์เอริลเอไมด์ สามารถทำนายการจับกันของสารยับยั้งดังกล่าวกับเอนไซม์ InhA ได้ รวมถึงสมบัติพลวัต พลังงานเสถียร และสมบัติต่าง ๆ ในระดับโมเลกุลที่ได้จากการศึกษานี้เป็น พื้นฐานสำคัญช่วยเพิ่มความเข้าใจในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์ได้ชัดเจน ทำให้เข้าใจในกลไกการออกฤทธิ์ของยาไอโซไนอาซิดและสารยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยตรงมากขึ้น และข้อมูลที่ได้ถูกใช้เป็นแนวทางสำคัญในการออกแบบโครงสร้างของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ตัวใหม่ที่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA สูงกว่าสารต้นแบบ จำนวน 17 ตัว ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการพัฒนาให้ได้สารต้นแบบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้นและมี ศักยภาพสูงในการพัฒนาต่อเป็นยาใหม่สำหรับการรักษาโรควัณโรคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Perason ML, Jereb JA, Frieden TR, et al. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a risk to patients and health care workers. *Ann Intern Med* 1992; 117:191–96.
2. Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 2006.
3. Parikh S, Moynihan DP, Xiao G, Tonge PJ. Roles of tyrosine 158 and lysine 165 in the catalytic mechanism of InhA, the enoyl-ACP reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*. 1999, 38(41):13623-34.
4. Marrakchi H, Lan  elle G, Quémard A. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology*. 2000, 146 (Pt 2):289-96.
5. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR Jr. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1994, 263(5144):227-30.
6. Dessen A, Quémard A, Blanchard JS, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1995, 267(5204):1638-41.
7. Saint-Joanis B, Souchon H, Wilming M, Johnsson K, Alzari PM, Cole ST. Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J*. 1999, 338 (Pt 3):753-60.
8. Lei B, Wei CJ, Tu SC. Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of inhA inhibitor. *J Biol Chem*. 2000, 275(4):2520-6.
9. Rouse DA, Li Z, Bai GH, Morris SL. Characterization of the katG and inhA genes of isoniazidresistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995, 39(11):2472-7.
10. Barry CE 3rd, Slayden RA, Mdluli K. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Resist Updat*. 1998;1(2):128-34.
11. Rozwarski DA, Vilchèze C, Sugantino M, Bittman R, Sacchettini JC, Marrakchi H, Lan  elle G, Quémard A. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-

- ACP reductase, InhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate. *J Biol Chem.* 1999, ;274(22):15582-9.
12. Oliveira JS, Pereira JH, Canduri F, Rodrigues NC, de Souza ON, de Azevedo WF Jr, Basso LA, Santos DS. Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wildtype and isoniazid-resistant enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol.* 2006, 359(3):646-66.
 13. Dias MV, Vasconcelos IB, Prado AM, Fadel V, Basso LA, de Azevedo WF Jr, Santos DS. Crystallographic studies on the binding of isonicotinyl-NAD adduct to wild-type and isoniazid resistant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Struct Biol.* 2007, 159(3):369-80.
 14. Pantano S, Alber F, Lamba D, Carloni P. NADH interactions with WT- and S94A-acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*: an ab initio study. *Proteins.* 2002, 47(1):62-8.
 15. Schroeder EK, Basso LA, Santos DS, de Souza ON. Molecular dynamics simulation studies of the wild-type, I21V, and I16T mutants of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase (InhA) in complex with NADH: toward the understanding of NADH-InhA different affinities. *Biophys J.* 2005, 89(2):876-84.
 16. Pasqualoto KF, Ferreira EI, Santos-Filho OA, Hopfinger AJ. Rational design of new antituberculosis agents: receptor-independent four-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of a set of isoniazid derivatives. *J Med Chem.* 2004, 47(15):3755-64.
 17. Besalú E, Ponec R, de Julián-Ortiz JV. Virtual generation of agents against *Mycobacterium tuberculosis*. A QSAR study. *Mol Divers.* 2003;6(2):107-20.
 18. Bagchi MC, Maiti BC, Mills D, Basak SC. Usefulness of graphical invariants in quantitative structure-activity correlations of tuberculostatic drugs of the isonicotinic acid hydrazide type. *J Mol Model.* 2004, 10(2):102-11.
 19. Pasqualoto KFM, Ferreira MMC. Molecular Modeling and Receptor-Dependent (RD) 3D-QSAR Approach to a Set of Antituberculosis Derivatives. *Qsar & Combinatorial Science* 2009, 28(11-12): 1455-64.
 20. Raparti V, Chitre T, Bothara K, Kumar V, Dangre S, Khachane C, Gore S, Deshmane B. Novel 4-(morpholin-4-yl)-N'-(arylidene)benzohydrazides: synthesis, antimycobacterial activity and QSAR investigations. *Eur J Med Chem.* 2009, 44(10):3954-60.

21. Freundlich JS, Wang F, Vilchèze C, Gulten G, Langley R, Schiehser GA, Jacobus DP, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC. Triclosan derivatives: Towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, ChemMedChem. 4 (2009) 241-248.
22. He X, Alian A, Stroud R, Ortiz de Montellano PR. Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Med. Chem. 49 (2006) 6308-6323.
23. am Ende CW, Knudson SE, Liu N, Childs J, Sullivan TJ, Boyne M, Xu H, Gegina Y, Knudson DL, Johnson F, Peloquin CA, Slayden RA, Tonge PJ. Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of B-ring modified diaryl ether InhA inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 3029-3033.
24. Tonge PJ, Kisker C, Slayden RA. Development of modern InhA inhibitors to combat drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*, Curr. Top. Med. Chem. 7 (2007) 489-498.
25. Boyne ME, Sullivan TJ, am Ende CW, Lu H, Gruppo V, Heaslip D, Amin AG, Chatterjee D, Lenaerts A, Tonge PJ, Slayden RA. Targeting fatty acid biosynthesis for the development of novel chemotherapeutics against *Mycobacterium tuberculosis*: evaluation of A-ring-modified diphenyl ethers as high-affinity InhA inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother. 51 (2007) 3562-3567.
26. He X, Alian A, Ortiz de Montellano PR. Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides. Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 6649–6658.

ผลงานวิจัย

1. บทความตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua, Peter Wolschann, Heinz Berner and Pornpan Pungpo. Insight into crucial inhibitor–enzyme interaction of arylamides as novel direct inhibitors of the enoyl ACP reductase (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*: computer-aided molecular design. *Monatshefte for Chemie*, 2010, 141, 1029-1041
2. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua, Peter Wolschann and Pornpan Pungpo. Elucidating Drug-Enzyme Interactions and Their Structural Basis for Improving the Affinity and Potency of Isoniazid and Its Derivatives Based on Computer Modeling Approaches. *Molecules*, 2010, 15, 2791-2813

2. บทความตีพิมพ์ในวารสารวิชาการสืบเนื่องจากงานประชุมวิชาการระดับชาติ/นานาชาติ

1. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua, Peter Wolschann, Heinz Berner and Pornpan Pungpo. Computer-aided molecular design of arylamide as the novel direct inhibitors of the enoyl acp reductase (InhA) from *M. tuberculosis* based on molecular docking calculations and QSAR studies. *The Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2010)*, January 21 - 23, 2010, Ubonratchathani, Thailand.
2. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua and Pornpan Pungpo. Investigation of the Important Interactions of Direct InhA Inhibitors in the Class of Arylamide in InhA Binding Pocket Based on Quantum Chemical Calculations. *The Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2009)*, January 14 - 16, 2009, Phitsanulok, Thailand.
3. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Songwut Suramitr, Supa Hannongbua and Pornpan Pungpo. Molecular Modeling and Quantum Chemical Calculations of Antituberculosis Agents in a Series of Isoniazid Derivatives. *The 12th Annual Symposium on Computational Science and Engineering*. March 27-29, 2008, Ubonratchathani, Thailand.

4. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Songwut Suramitr, Supa Hannongbua and Pornpan Pungpo. Understanding in the Binding of Isonicotinyl-NAD Adduct to Wild-Type and Isoniazid Resistant Enoyl-ACP Reductase from Mycobacterium Tuberculosis Using Molecular Docking and Quantum Chemical Calculations. *Pure and Applied Chemistry International Conference, January 30-February 1, 2008, Bangkok, Thailand.*
5. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua and Pornpan Pungpo. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship (3D-QSAR) Study of Antituberculosis Agents in a Series of Isoniazid Derivatives. *The 2nd UBU Research Conference. (UBRC II), July 28-29, 2008, Ubonratchathani, Thailand.*

3. เสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua and Pornpan Pungpo. Insight into the Binding Interactions Based on Molecular Docking and Quantum Chemical Calculations and 3D-QSAR of Arylamides as the Direct Inhibitors of Enoyl ACP Reductase from Mycobacterium Tuberculosis. *The 13th Annual Symposium on Computational Science and Engineering (13th ANSCSE), March 25-27, 2009, Bangkok, Thailand.*
2. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua and Pornpan Pungpo. Investigation of the Important Interactions of Direct InhA Inhibitors in the Class of Arylamide in InhA Binding Pocket Based on Quantum Chemical Calculations. *The Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2009), January 14 - 16, 2009, Phitsanulok, Thailand.*
3. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Songwut Suramitr, Supa Hannongbua and Pornpan Pungpo. Molecular Modeling and Quantum Chemical Calculations of Antituberculosis Agents in a Series of Isoniazid Derivatives. *The 12th Annual Symposium on Computational Science and Engineering. March 27-29, 2008, Ubonratchathani, Thailand.*
4. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua, Peter Wolschann and Pornpan Pungpo. Insight into the Binding Interaction of Highly Potent Mycobacterium Tuberculosis Enoyl ACP Reductase Inhibitors in the Class of Arylamides. *Keystone Symposia Conference: Pathogenesis and Control of Emerging Infections and Drug-Resistant Organisms. October 22-27, 2008, Bangkok, Thailand.*

5. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua and Pornpan Pungpo. Investigation of the I21V and S94A Mutation Influence on INH–NAD and NADH Binding to InhA Enzyme Based on Quantum Chemical Calculations. *World Association of Theoretical and Computational Chemists (WATOC 2008)*. September 14-19, 2008, Sydney, Australia.
6. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Songwut Suramitr, Supa Hannongbua and Pornpan Pungpo. Understanding in the Binding of Isonicotinyl-NAD Adduct to Wild-Type and Isoniazid Resistant Enoyl-ACP Reductase from Mycobacterium Tuberculosis Using Molecular Docking and Quantum Chemical Calculations. *Pure and Applied Chemistry International Conference, January 30-February 1, 2008, Bangkok, Thailand*.

4. เสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับชาติ

1. Pornpan Pungpo, Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn and Supa Hannongbua. Molecular Docking Studies of Direct Mycobacterium Tuberculosis Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase Inhibitors in Class of Arylamides. *Third Annual Symposium of Protein Society of Thailand: Frontiers in Protein Research*. August 28-29, 2008, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, Thailand.
2. Auradee Punkvang, Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua and Pornpan Pungpo. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship (3D-QSAR) Study of Anti-Tuberculosis Agents in a Series of Isoniazid Derivatives. *The 2nd UBU-Research Conference (UBRC II)*. July 28-29, 2008, Ubon Rajathanee University, Ubonratchathani, Thailand.

ภาคผนวก

Insight into crucial inhibitor–enzyme interaction of arylamides as novel direct inhibitors of the enoyl ACP reductase (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*: computer-aided molecular design

Auradee Punkvang · Patchreenart Saparpakorn · Supa Hannongbua · Peter Wolschann · Heinz Berner · Pornpan Pungpo

Received: 9 March 2010 / Accepted: 14 June 2010 / Published online: 6 August 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The enoyl ACP reductase enzyme (InhA) involved in the type II fatty acid biosynthesis pathway of *Mycobacterium tuberculosis* is an attractive target enzyme for antitubercular drug development. Arylamide derivatives are a novel class of InhA inhibitors used to overcome the drug-resistance problem of isoniazid, the frontline drug for tuberculosis treatment. Their remarkable property of inhibiting the InhA enzyme directly without requiring any coenzyme, makes them especially appropriate for the design of new antibacterials. In order to find a sound binding conformation for the different arylamide analogs, molecular docking experiments were performed with subsequent QSAR investigations. The X-ray conformation of one arylamide within its cocrystallized complex with InhA was used as a starting conformation for the docking experiments. The results thus obtained are perfectly consistent ($\text{rmsd} = 0.73 \text{ \AA}$) with the results from X-ray analysis. A thorough investigation of the arylamide binding modes with InhA provided ample information about structural requirements for appropriate inhibitor–enzyme interactions. Three different QSAR models were established using two three-dimensional (CoMFA and CoMSIA) and one two-dimensional (HQSAR) techniques. With statistically ensured models, the QSAR results obtained had

high correlation coefficients between molecular structure properties of 28 arylamide derivatives and their biological activity. Molecular fragment contributions to the biological activity of arylamides could be obtained from the HQSAR model. Finally, a graphic interpretation designed in different contour maps provided coincident information about the ligand–receptor interaction thus offering guidelines for syntheses of novel analogs with enhanced biological activity.

Keywords Molecular modeling · Molecular docking · CoMFA · CoMSIA · HQSAR

Introduction

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) remains a serious public health problem. Globally, there were estimated 9.27 million incident cases of TB in 2007. This is an increase from 9.24 million cases in 2006, compared with 8.3 million cases in 2000 and 6.6 million cases in 1990 [1]. Multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB), widespread extensive drug-resistance TB (XDR-TB), and co-infection between *M. tuberculosis* and HIV (TB/HIV) are rendering tuberculosis treatment complicated, and cause severe financial strain [2–11]. Accordingly, to address these problems the design of novel and more potent antitubercular agents has to be regarded as highly important.

The enzymes involved in the bacterial fatty acid biosynthetic pathway, the type II fatty acid synthase (FAS II) system, are attractive targets for designing novel antibacterial agents and improving existing antibacterial agents [12–17]. Bacterial FAS-II organization is distinct from its mammalian counterpart; thus, the FAS-II pathway offers

A. Punkvang · P. Pungpo (✉)
Faculty of Science, Ubonratchathani University,
Ubon Ratchathani, Thailand
e-mail: pornpan_ubu@yahoo.com

P. Saparpakorn · S. Hannongbua
Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

P. Wolschann · H. Berner
Institute for Theoretical Chemistry, University of Vienna,
Vienna, Austria

several targets for potential selective interactions with antibacterial agents [15]. One of these targets in the FAS-II pathway is enoyl-acyl ACP reductase (InhA). This enzyme, involved in mycolic acid biosynthesis, catalyzes the NADH-specific reduction of 2-*trans*-enoyl-ACP, which is essential for fatty acid elongation [18]. Subsequently, InhA has been identified as the primary target of isoniazid (INH), the frontline drug for tuberculosis chemotherapy [19–27]. Being a prodrug, INH does not inhibit InhA enzyme directly. It must first be activated by catalase-peroxidase (KatG) to generate the reactive acyl radical [28–34]. Thereupon, the reactive species binds covalently to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) to form the active adduct (INH-NAD adduct) that functions as a highly potent inhibitor of InhA [18–20, 23, 30, 35, 36]. However, the high potency of INH for tuberculosis treatment is diminished by drug resistance. High levels of resistance to INH are caused by mutations in KatG, commonly found in *M. tuberculosis* clinical isolates [37]. The predominant mutation of INH-resistant strains, KatG[S315G], has been found and examined in detail [38]. These results reveal that catalase and peroxidase activities of KatG were moderately reduced (50 and 35%, respectively). The INH binding affinity for the residuary enzyme was unchanged, whereas INH activation was reduced by 30% compared with WT KatG, which would be expected to correlate with a moderate increase of the minimum inhibitory concentrations (MIC) of INH. In order to reduce the resistance against INH associated with mutations in the KatG enzyme, compounds which directly inhibit the InhA enzyme without requiring activation by KatG are seen as very promising new agents against tuberculosis [39–43]. A series of arylamides have already been identified as a novel class of potent InhA inhibitors [44]. In addition some crystal structures of InhA–arylamine inhibitor complexes incubated with NADH are already available [44]. On the other hand it must be taken into account that most arylamides have high MIC values only against *M. tuberculosis* strain H37Rv. However, it can be reasonably assumed that these compounds are extruded from the bacterial cell by efflux pumps.

This information, especially the remarkable property of arylamides which directly inhibit the InhA enzyme—possibly the crucial point for new therapy—justifies more detailed examination of their structural requirements for suitable therapeutic activity against tuberculosis.

Molecular modeling and computer-aided molecular design approaches are powerful tools for developing new and more potent InhA inhibitors. Recently, structure-based and ligand-based approaches to drug design have been used to identify important features of InhA inhibitors [45–48]. In this study, molecular docking calculations were used to investigate the important drug–enzyme interactions of

arylamides in the InhA binding pocket. Additionally, the relationship between the structure and activity of these compounds was elucidated by the CoMFA, CoMSIA, and HQSAR methods [49–52] giving us new and more detailed information for the design of highly active antibacterials.

Results and discussion

Structural comparison of ligand-bound and ligand-free InhA

The X-ray structures of arylamide-bound (pdb code 2NSD) and arylamide-free (pdb code 1ENY) InhA were used for comparison. Because of this binding, the two structures are different within the region of residues Leu197–Arg225 including two α -helices and one loop labeled in red in Fig. 1. NADH in two complexes was held at the same position implying that ligand binding in these cases has no effect on the binding of NADH cofactor. The effect of arylamide binding on the surrounding residues is shown in Fig. 2. The positions of residues near the NADH binding site including Gly96, Phe97, Phe149, and Pro193 are insignificantly changed whereas the sidechain of Tyr158 flips away from the reference position to form a hydrogen bond with the amide carbonyl oxygen of the inhibitor. The altered position of the Tyr158 sidechain, in turn, also induces a sidechain shift of Met155 and Met161. Likewise

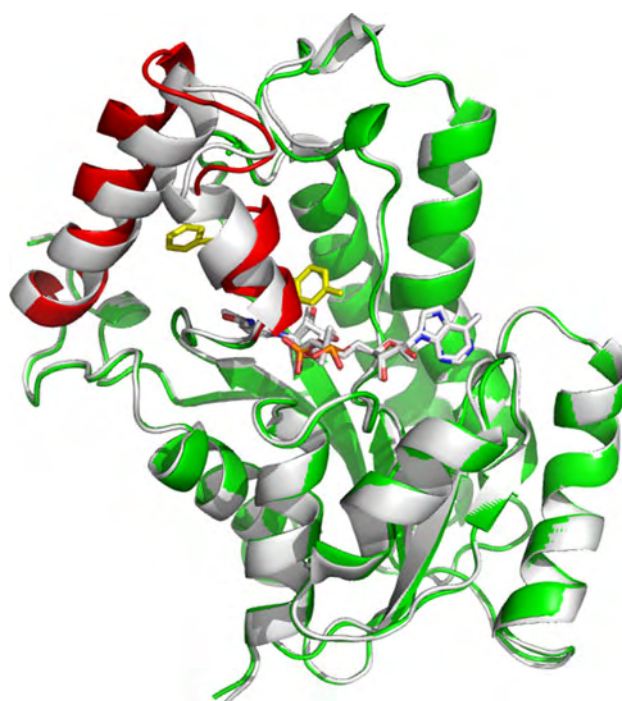


Fig. 1 Superimposition of InhA of pdb code 1ENY (green) and 2NSD (grey and red); arylamide is labeled in yellow

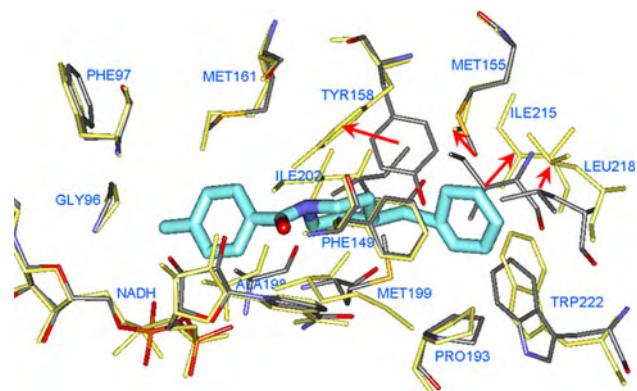


Fig. 2 Arylamide (blue) in the InhA binding site (yellow) and ligand-unbound InhA (colored by atom type). Red arrows show position shifts of residues

the hydrophobic residues of Met199, Ile202, Ile215, Leu218, and Trp222 shift their position. In another arylamide–InhA complex (pdb code IP44), the corresponding shifts of these hydrophobic residues are also observed. These results suggest that the hydrophobic pocket is a highly flexible region capable of binding arylamides most favorably. On the other hand, NADH, Gly96, Phe97, Phe149, and Pro193 are not involved in ligand binding.

Validation of the molecular docking calculations

As already mentioned, the potential binding modes of arylamide derivatives in the InhA binding pocket were carried out by molecular docking calculations with the software Glide (see the section “Data sets and calculation methods”). To assess the reliability of the binding modes obtained from molecular docking calculations, compound **b3** in the InhA X-ray crystal structure was extracted and docked back into the binding pocket. The root mean-square deviation (rmsd) between the docked and crystallographic conformation of compound **b3** is 0.73 Å, indicating that molecular docking calculations with the software Glide enable highly reliable reproduction of the binding mode of compound **b3** in the InhA binding pocket.

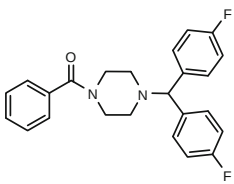
Molecular docking analysis of arylamide derivatives

All the arylamide derivatives in the data set have structural differences in ring moiety B. Accordingly, the arylamide derivatives were classified into three series, a, b, and p which are given in Table 1. The top ranking poses produced by Glide docking were selected as potential interaction modes of arylamide derivatives in the InhA binding pocket. All predicted binding modes of these compounds are consistent with the crystallographic conformation of compound **b3** as shown in Fig. 3.

Table 1 Chemical structures and experimental biological activities for InhA inhibition of arylamide derivatives

Compound	X	n	R ¹	R ²	log(1/IC ₅₀)
a1 ^a	N	0	H	H	4.41
a2	N	0	4-CH ₃	H	4.78
a3	N	0	4-CH ₃	3-CF ₃	5.20
a4	N	0	4-CH ₃	3-Cl	5.51
a5	N	0	3-CH ₃	3-Cl	5.03
a6	N	0	3-CH ₃	4-NO ₂	4.81
a7	N	0	3,4-Me ₂	3-Cl	6.00
a8	N	0	3,4-Me ₂	3-CF ₃	5.73
a9	N	0	4- <i>i</i> -Pr	3-Cl	<4.00
a10	N	0	4- <i>t</i> -Bu	3-Cl	<4.00
a11	N	0	4- <i>t</i> -Bu	3-CF ₃	<4.00
a12	N	0	4- <i>t</i> -Bu	4-CH ₃ , 3-Cl	<4.00
a13	N	0	2-F	3-Cl	4.86
a14 ^a	N	0	4-F	3-Cl	5.01
a15	N	0	3-Cl	3-Cl	5.17
a16	N	0	3,4-Cl ₂	3-Cl	5.22
a17	N	0	3,4-Cl ₂	H	4.75
a18	N	1	H	H	4.50
b1	C	1	3-Cl	H	5.11
b2	C	1	2-F	H	4.85
b3 ^a	C	1	4-CH ₃	H	5.29
b4	C	1	3-CH ₃	H	5.13
p1					6.40
p2					7.05
p3 ^a					6.70
p4					5.98
p5					5.72

Table 1 continued

Compound	X	n	R ¹	R ²	log(1/IC ₅₀)
p6					5.69

^a The test set compound for QSAR studies

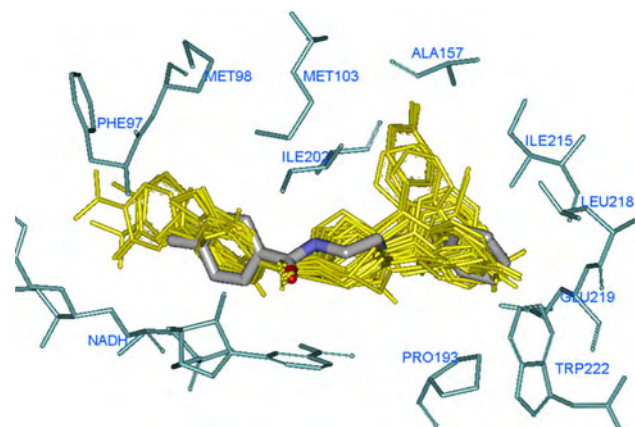


Fig. 3 Docked conformations of arylamide derivatives (yellow) and the crystallographic conformation of compound **b3** (colored by atom type) in the InhA binding pocket obtained from Glide docking

Molecular docking analysis of arylamide derivatives in the series a

Compound **a7** has the highest InhA inhibitory activity among compounds in the series a ($\log(1/IC_{50}) = 6.00$). The binding mode of this compound predicted by molecular docking calculations is shown in Fig. 4. The aryl ring B forms hydrophobic interactions with Phe149, Pro193, Val203, Leu218, and Ile215. The 3-Cl substituent on B forces the aliphatic sidechain of Ile215 and Leu218 to undergo hydrophobic interactions and the nearby located Glu219 forms van der Waals interactions. The ring C of this compound participates in van der Waals interactions with Phe149, Met199, Tyr158, Ile202, and the nicotinamide part of NADH. The amide carbonyl oxygen present in all arylamide derivatives has two hydrogen bond interactions with the hydroxyl groups of the nicotinamide ribose and Tyr158. The aryl ring A and its substituents can form van der Waals interactions with Gly96, Phe97, Met103, Tyr158, Met161, Thr196, Ala198, Met199, and Ile202. Additionally, hydrogen atoms at the ortho and meta positions of the aryl ring A are located near the pyrophosphate oxygen and the oxygen linker of NADH with short

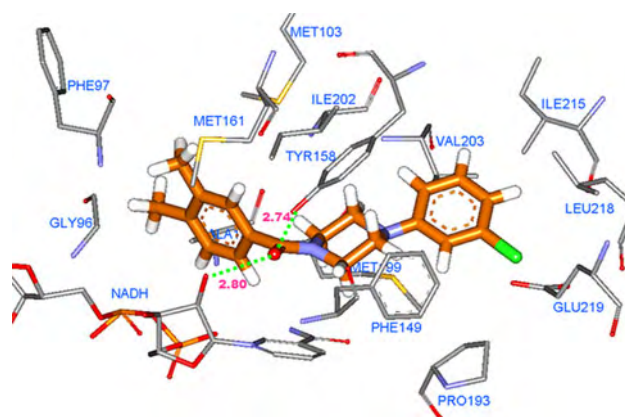


Fig. 4 The docked conformation of compound **a7** in the InhA binding pocket obtained from Glide docking

distances of 3.03 and 2.72 Å, respectively. Accordingly, hydrogen bond interactions may occur among them.

The replacement of both 3,4-Me₂ groups on ring A of compound **a7** by two chlorine atoms (3,4-Cl₂) results in complete loss of activity, as shown for compound **a16**. Because of the smaller chlorine substituents, the aryl ring A of compound **a16** forms less strong van der Waals interactions with Gly96, Phe97, Met103, Tyr158, Met161, Thr196, Ala198, Met199, and Ile202 than that in compound **a7**. Substituting the para position of the ring A with the bulkier 4-*t*-butyl group (compounds **a10**, **a11**, and **a12**) brings about severe loss of activity ($\log(1/IC_{50}) < 4$). The docking analysis reveals that these lowest activity compounds have very different binding modes compared with that of compound **a7** as presented in Fig. 5. Because of steric hindrance of the 4-*t*-butyl substituent, ring A of compounds **a10**, **a11**, and **a12** cannot occupy the same pocket region as occupied by ring A of compound **a7**. This result is in accordance with experimental data. Ring A surrounding residues, including Phe97, Gly96, and NADH, prove to be insufficiently flexible for ligand binding as described above. The 4-*t*-butyl groups of these compounds are placed at the same position as aryl moiety B of compound **a7**, because these sites are big enough to accommodate the ring A and its sterically demanding substituents. Even though these compounds can adapt their binding modes in the InhA binding pocket, the important hydrogen-bonding interactions with NADH and Tyr158 are not maintained at the same level as those of compound **a7**. Moreover, the 4-*t*-butyl group loses hydrophobic contact with the hydrophobic residues of Met199, Pro193, and Ile215 comparable with the aryl ring moiety B of compound **a7**. Accordingly, compounds **a10**, **a11**, and **a12** have the lowest activity.

The size of a substituent on B is to some extent related to the size of the substituent on ring A. If A contains a small substituent, a bulky group on B exerts its inhibitory activity without restriction, because of the hydrophobic interactions

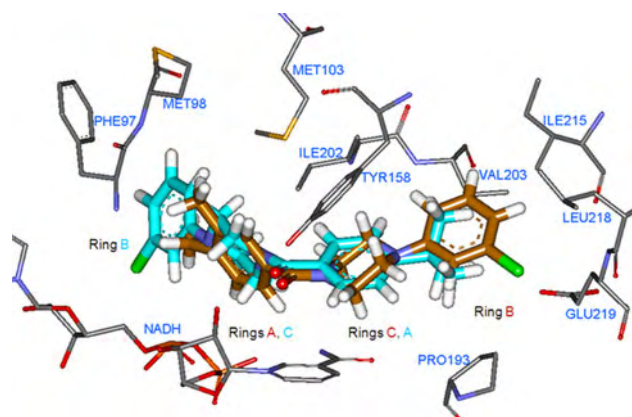


Fig. 5 The docked conformations of compound **a7** (carbon atoms colored *orange*) and compound **a10** (carbon atoms colored *blue*) in the InhA binding pocket

of B, as in compounds **a16** and **a17**. If, on the other hand, A bears a bulky substituent, the inhibitory activity of a bulky group on B is diminished, because of alteration of its alignment; this is shown for compounds **a7** and **a8**. The docking analysis reveals that the position of compound **a8** is slightly shifted compared with compound **a7**, because of the 3-CF₃ group on ring B. As mentioned above, both 3-Cl and 3-CF₃ substituents on ring B situated near Pro193 are not responsible for ligand binding. If compound **a8** lays in the same position as compound **a7**, a steric clash of the 3-CF₃ group with this residue may occur. The altered position of compound **a8** leads to a change of the hydrogen bond pattern of this compound compared with compound **a7**; this is shown in Table 2. Because the hydrogen bond distances of compound **a8** between the amide carbonyl oxygen and Tyr158, and the hydrogen atom at the meta position of ring A and the oxygen linker of NADH are increased, the activity of compound **a8** is lower. This situation is obviously responsible for the different activity of compounds **a3** and **a4**. Regarding compounds **a4** and **a5**, the main difference between these two compounds is the methyl group at para

and meta positions. The methyl group at the meta position reduces the inhibitory activity. If the methyl group at the para position is shifted to the meta position, the length of the structural moiety between A and B is reduced, which mainly affects the hydrogen bond interactions of compounds **a4** and **a5** with NADH and Tyr158, as presented in Table 2.

Molecular docking analysis of arylamide derivatives in series b

All compounds in series b have moderate activity, with log(1/IC₅₀) values ranging between 4.85 and 5.29. The binding modes of these compounds, evaluated by means of molecular docking calculations, are similar, as shown in Fig. 6. The ring B and the CH₂ linker are located in the neighborhood of the hydrophobic residues Met199, Pro193, Phe149, Ile215, Val203, Trp222, and Leu218. Moreover, van der Waals interactions with Glu219 are observed. The ring C of these compounds forms van der Waals interactions with Phe149, Met199, Tyr158, and Ile202, and nicotinamide of NADH. The important hydrogen bond interactions of the amide carbonyl oxygen found for compounds in series a are still maintained for all compounds of series b.

Aryl ring A of the compounds in series b is oriented similarly to that of the compounds in series a. Hydrogen bond interactions can occur between the hydrogen atoms at the ortho and meta positions of aryl ring A and the pyrophosphate oxygen and the oxygen linker of NADH. The substitution pattern of aryl ring A of the compounds in series b leads to altered compound extensions, which affect the lengths of the hydrogen bonds as shown in Table 3. Moreover, they also affect the van der Waals interactions of the aryl ring A. Compared with the most active compound of series b, compound **b3**, compound **b2**, the least active compound, has shorter hydrogen bond distances with the pyrophosphate oxygen and the oxygen linker of

Table 2 Hydrogen bond distances between compounds **a7**, **a8**, **a4**, **a5**, and NADH and Tyr158 in the InhA enzyme

Residue	Residue group	Ligand atom	Distance (Å)			
			a7	a8	a4	a5
Tyr158	OH	C=O	2.74	2.92	2.95	3.16
			159	163	161	158
NADH (nicotinamide ribose)	OH	C=O	2.80	2.75	2.69	2.72
			179	173	173	167
NADH (oxygen linker)	O	<i>meta</i> -H	2.72	2.91	3.64	2.90
			134	123	99	130
NADH (pyrophosphate oxygen)	P–O	<i>ortho</i> -H	3.03	2.98	3.34	2.93
			116	121	111	129

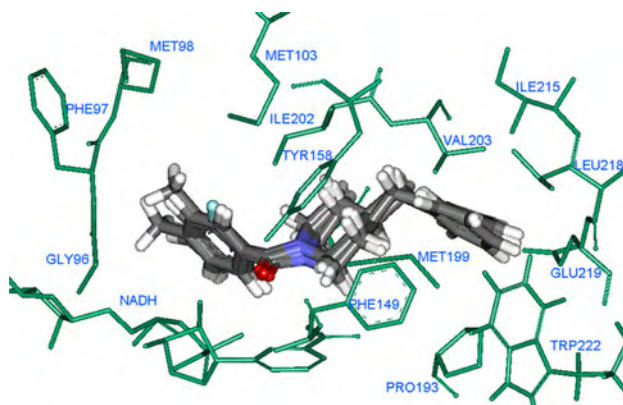


Fig. 6 The docked conformations of compounds **b1**, **b2**, **b3**, and **b4** in the InhA binding pocket

Table 3 Hydrogen bond distances between compounds **b1**, **b2**, **b3**, and **b4** and NADH and Tyr158 in InhA enzyme

Residue	Residue group	Ligand atom	Distance (Å)			
			b1	b2	b3	b4
Tyr158	OH	C=O	3.04	3.04	2.99	2.81
			162	166	162	161
NADH (nicotinamide ribose)	OH	C=O	2.95	2.73	2.72	2.81
			170	166	172	177
NADH (oxygen linker)	O	<i>meta</i> -H	2.63	2.39	2.45	2.47
			127	125	139	137
NADH (pyrophosphate oxygen)	P–O	<i>ortho</i> -H	2.86	2.84	2.87	2.79
			112	112	123	122

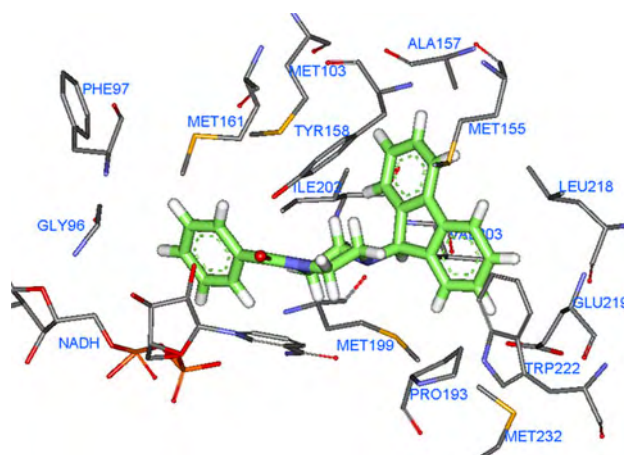
NADH. The distance to Tyr158 is also shifted. Moreover, compound **b2** loses van der Waals interactions with Gly96 and NADH.

Molecular docking analysis of the arylamide derivatives in series p

Among all the series of arylamide derivatives shown in Table 1, compounds in series p are highly active with $\log(1/IC_{50})$ values ranging from 5.69 to 7.05. Compound **p2** has the highest activity of all the compounds studied. The potential binding mode of this compound within the InhA binding pocket is obtained by flexible ligand docking simulations as presented in Fig. 7. The bulky ring B interacts with hydrophobic residues of Ala157, Met199, Pro193, Val203, Leu218, Ile202, Trp222, and Met232, also forming van der Waals interactions with Tyr158, Met103, Met155, and Glu219. The ring B moieties of the compounds in series p are bulkier than those of the compounds in series a and b, resulting in stronger hydrophobic and van der Waals interactions with the surrounding amino acids. These bulkier rings B are obviously responsible for the higher activity of the compounds in the series p. Hydrogen bond interactions with NADH and Tyr158 as are found for all compounds in series a and b are also observed in series p.

Substitution of the bulky group on ring A of compound **p2** reduces the compound's activity, as shown for compounds **p1** and **p3**. Because of the bulky group on ring A, the binding modes of compounds **p1** and **p3** are slightly shifted compared with the binding mode of compound **p2**, thus affecting the hydrogen bonding pattern of compounds **p1** and **p3**. Some hydrogen bond distances of these compounds are slightly increased compared with those of compound **p2**, as shown in Table 4. These differences obviously bring about the activity loss of compounds **p1** and **p3**.

In another case, compound **p6**, the fluorene ring B of compound **p2** is replaced by a bis(4-fluorophenyl)methyl

**Fig. 7** The docked conformation of compound **p2** in the InhA binding pocket**Table 4** Hydrogen bond distances between compounds **p1**, **p2**, **p3**, and **p6** and NADH and Tyr158 in InhA enzyme

Residue	Residue group	Ligand atom	Distance (Å)			
			p1	p2	p3	p6
Tyr158	OH	C=O	2.84	3.05	2.67	3.05
			162	161	170	165
NADH (nicotinamide ribose)	OH	C=O	2.8	2.74	2.93	2.84
			176	170	168	169
NADH (oxygen linker)	O	<i>meta</i> -H	2.44	2.38	2.30	2.77
			144	126	149	124
NADH (pyrophosphate oxygen)	P–O	<i>ortho</i> -H	2.7	2.79	3.06	2.93
			133	117	116	121

substituent. Because of the presence of a bis(4-fluorophenyl)methyl substituent, the interacting distances of compound **p6** with NADH are strongly increased compared with compound **p2**, as shown in Table 4. The lower activity of compound **p6** can thus be explained.

Structural conditions for favorable interaction of arylamide derivatives with the InhA binding pocket

1. Two hydrogen bonds between the amide carbonyl oxygen and the hydroxyl group of the nicotinamide ribose and the hydroxyl group of Tyr158.
2. Hydrogen bond-type interactions of ortho and meta hydrogens on aryl ring A with the pyrophosphate oxygen and oxygen linker of NADH.
3. Hydrophobic interactions of ring B with side chains of Ala157, Met199, Pro193, Val203, Ile215, Leu218, Ile202, Trp222, and Met232.
4. The size of substituents on ring A and ring B should be checked against one another to keep the optimum

distance for the required hydrogen bond interactions of arylamides with Tyr158 and NADH.

CoMFA and CoMSIA models

Results from use of CoMFA and CoMSIA methods, which use pharmacophore-based alignments, on 40 arylamide derivatives from two different laboratories have recently been reported [48]. To ensure that all experiments were performed under comparable conditions, only 28 arylamide derivatives taken from one laboratory were used in our work. This smaller data set gave statistically sound results indicating its adequate size for construction of reasonable QSAR models. Statistical data from PLS analyses of CoMFA and CoMSIA models are given in Table 5. The PLS procedure extracts from the steric and the electrostatic fields of CoMFA six relevant components with correlation coefficients $q^2 = 0.68$ and $r^2 = 0.99$. The contribution of steric and electrostatic fields is 67.6 and 32.4%, respectively. On the basis of the better statistical values and more field descriptors, a model including steric, electrostatic, and hydrophobic fields was selected as the best CoMSIA model. The PLS results for this model have correlation coefficients of $q^2 = 0.64$ and $r^2 = 0.95$. Compared with the CoMFA model, the predictive ability of the best CoMSIA model is insignificantly inferior. For the CoMSIA model, the contribution of steric, electrostatic, and hydrophobic fields is 19.0, 39.5, and 41.5%, respectively,

indicating that the additional hydrophobic field has greater effect on inhibitory activity than the others.

HQSAR models

Numerous HQSAR models with a default fragment size (4–7) were generated on the basis of various combinations of the different fragment types which constitute the hologram. Statistical data for all generated HQSAR models are shown in Table 6. Chirality plays a less important role in inhibitory activity of arylamide derivatives, because incorporation of a chirality fragment into molecular hologram models did not improve the q^2 and r^2 values of these models. On the basis of the better statistical values and more fragment distinction parameters, model 10, which includes atoms, bonds, connections, and hydrogen atoms (A/B/C/H) was chosen as the best HQSAR model with q^2 of 0.74, r^2 of 0.95, standard error of 0.48, hologram length 53, and an optimum number of components of six. These statistical results demonstrate the reliability and good predictive power of the best HQSAR model.

Validation of the QSAR models

The predicted activities of the training and test sets derived from the best CoMFA, CoMSIA, and HQSAR models are listed in Table 7. The graphs of correlations between experimental and predicted activities are depicted in Fig. 8.

Table 5 Summary of statistical results for the CoMFA model and various CoMSIA models with different combined fields

Models	Statistical data						Fraction
	q_{cv}^2	r^2	N	s	SEE	F	
CoMFA	0.68	0.99	6	0.53	0.09	287.88	67.6/32.4 (S/E)
CoMSIA							
S/E	0.65	0.91	3	0.51	0.26	60.78	36.7/63.3
S/H	0.61	0.96	5	0.57	0.17	88.60	31.2/68.8
S/HA	0.62	0.83	2	0.52	0.35	47.13	76.0/24.0
S/HD	0.62	0.88	4	0.54	0.31	31.68	94.3/5.7
S/E/H	0.64	0.95	4	0.53	0.20	85.44	19.0/39.5/41.5
S/E/HA	0.62	0.86	2	0.51	0.31	61.74	30.6/57.3/12.1
S/E/HD	0.62	0.92	4	0.54	0.24	53.61	36.8/59.5/3.7
S/H/HA	0.56	0.82	2	0.55	0.35	46.58	28.3/59.5/12.2
S/H/HD	0.61	0.97	6	0.58	0.16	85.05	29.9/67.0/3.1
S/HA/HD	0.63	0.83	3	0.52	0.35	31.34	74.2/23.3/2.5
S/E/H/HD	0.61	0.96	5	0.56	0.19	75.56	18.7/38.3/40.6/2.4
S/E/H/HA	0.57	0.91	3	0.56	0.25	65.23	17.8/35.3/38.1/8.8
S/E/H/HD/HA	0.57	0.89	3	0.56	0.29	48.53	18.5/35.1/38.0/0.8/7.6

Bold values indicate the best CoMSIA model

q_{cv}^2 , leave-one-out (LOO) cross-validated correlation coefficient; r^2 , non-cross-validated correlation coefficient; N , optimum number of components; s , standard error of prediction; SEE, standard error of estimate; F , F test value; S, steric field; E, electrostatic field; H, hydrophobic; HD, hydrogen donor field; HA, hydrogen acceptor field

Table 6 The statistical results of HQSAR models combined with various fragment distinction parameters

Model	Fragment type	q_{cv}^2	r^2	S	SEE	HL	N
1	A/B	0.76	0.93	0.44	0.24	199	5
2	A/C	0.76	0.93	0.46	0.24	83	6
3	A/DA	0.54	0.87	0.63	0.35	97	6
4	A/H	0.73	0.90	0.46	0.28	257	4
5	A/Ch	0.70	0.85	0.50	0.35	61	5
6	A/B/C	0.77	0.93	0.44	0.24	61	6
7	A/B/H	0.73	0.96	0.49	0.20	97	6
8	A/B/DA	0.72	0.92	0.50	0.28	307	6
9	A/B/Ch	0.76	0.89	0.42	0.28	83	3
10	A/B/C/H	0.74	0.95	0.48	0.20	53	6
11	A/B/C/DA	0.72	0.92	0.50	0.27	59	6
12	A/B/DA/H	0.69	0.94	0.52	0.24	97	6
13	A/B/C/Ch	0.77	0.93	0.44	0.24	61	6
14	A/B/DA/Ch	0.72	0.91	0.49	0.29	71	6
15	A/B/H/Ch	0.73	0.95	0.49	0.21	53	6
16	A/B/C/DA/H	0.68	0.92	0.51	0.26	97	5
17	A/B/C/DA/Ch	0.73	0.92	0.48	0.27	53	6
18	A/B/C/H/Ch	0.74	0.95	0.48	0.20	53	6
19	A/B/DA/H/Ch	0.66	0.93	0.54	0.25	97	6
20	A/B/C/DA/H/Ch	0.65	0.93	0.56	0.25	97	6

Bold font indicates the best HQSAR model

HL, hologram length; A, atoms; B, bonds; C, connections; H, hydrogen atoms; Ch, chirality; DA, donor and acceptor

The predicted activities of the training set are close to the experimental activities with deviation values <0.19, 0.37, and 0.37 logarithmic units for CoMFA, CoMSIA, and HQSAR models, respectively, in agreement with experimental and predicted activities. By examining the statistical results, **a6** could be identified as an outlier within the best CoMFA, CoMSIA, and HQSAR models. In order to assess the predictive ability of these QSAR models, the biological activities of the test set compounds were predicted. On the basis of the best QSAR models, all test set compounds have predicted values within one logarithmic unit of the experimental values presented in Table 7. The r^2 values from the best CoMFA, CoMSIA, and HQSAR models are 0.86, 0.81, and 0.92, respectively. These results reveal that all selected QSAR models are reliable, with high predictive power. Therefore, the best CoMFA, CoMSIA, and HQSAR models could be used to design new arylamide derivatives with improved properties.

CoMFA and CoMSIA contour maps

To easily visualize the importance of steric, electrostatic, and hydrophobic fields on the inhibitory activity of arylamide derivatives, CoMFA and CoMSIA contour maps were

established. Favorable and unfavorable steric regions are represented by green and yellow contours, respectively, whereas blue and red contours characterize regions which favor positive and negative charges, respectively. For CoMSIA magenta and white contours represent favorable and unfavorable hydrophobic regions, respectively. The predicted binding modes obtained from Glide docking of compounds **a7**, **b3**, and **p2**, the most active compounds in series a, b, and p, respectively, were used for the contour map interpretation.

From CoMFA steric contours as shown in Fig. 9a, two large yellow contours located near the meta and para substituents on the aryl ring A of compounds **a7**, **b3**, and **p2** indicate that these regions must not contain bulky substituents. These findings explain why compounds **a9**, **a10**, **a11**, and **a12** which bear bulky *i*-propyl and *t*-butyl substituents at the para position are less potent than compound **a7**. As described in the docking analysis, these bulky substituents change the binding modes of these inhibitors leading to loss of the main binding interactions. Another interesting large green contour is located near ring B of compounds **a7**, **b3**, and **p2**. As seen from Fig. 9a, only the bulky ring B of compound **p2** is buried in this green contour. This finding explains why compounds in series a and b containing the smaller ring B are less potent than compound **p2** bearing the bulkier ring B. These results agree well with docking results showing that a bulky ring B interacts with the hydrophobic residues of Ala157, Met199, Pro193, Val203, Leu218, Ile202, Trp222, and Met232 to a greater extent than a small ring B. Therefore, introducing a bulkier group to ring B of compounds **a7** and **b3** within the large green region would enhance the activity of these compounds.

Figure 9b presents the electrostatic CoMFA contour map. A blue contour appears near the hydrogen atoms at the ortho position of aryl ring A of compounds **a7**, **b3**, and **p2** indicating that a more positively charged substituent is favored in this position for increased affinity. In good agreement with the docking results, the presence of positively charged substituents at this position favors hydrogen bonding interactions with the pyrophosphate oxygen of NADH. Additionally, two large blue contours situated near the meta and para substituents on aryl ring A of these compounds imply that electron-deficient substituents were preferred in these regions. In another area, CoMFA model shows that a large electronegatively favored region is located above the aromatic fluorene ring B of compound **p2**, implying that the aromatic ring at this position would enhance the inhibitory potency.

Steric and electrostatic CoMSIA contours (not shown) are similar to the corresponding CoMFA contours. Therefore, only the hydrophobic contour is discussed in this study. The CoMSIA model indicating hydrophobicity is

Table 7 Experimental and predicted activities of training and test sets from CoMFA, CoMSIA, and HQSAR models

Compound	Experimental	log 1/ <i>IC</i> ₅₀					
		CoMFA		CoMSIA		HQSAR	
		Predicted	Residue	Predicted	Residue	Predicted	Residue
a1 ^a	4.41	4.87	−0.46	5.05	−0.64	4.82	−0.01
a2	4.78	4.86	−0.07	4.73	0.05	5.03	−0.25
a3	5.20	5.26	−0.06	5.38	−0.18	5.15	0.05
a4	5.51	5.53	−0.02	5.30	0.21	5.14	0.37
a5	5.03	5.05	−0.02	4.95	0.08	5.19	−0.15
a7	6.00	5.91	0.09	5.63	0.37	5.76	0.24
a8	5.73	5.74	−0.01	5.57	0.16	5.77	−0.04
a9	4.00	3.97	0.04	3.98	0.02	3.95	0.05
a10	4.00	4.01	−0.01	3.99	0.01	3.97	0.03
a11	4.00	3.98	0.02	4.06	−0.06	3.97	0.03
a12	4.00	4.05	−0.05	3.99	0.01	4.07	−0.07
a13	4.86	4.86	0.00	4.87	−0.01	4.97	−0.09
a14 ^a	5.01	4.64	0.37	4.83	0.18	4.97	0.04
a15	5.17	5.29	−0.12	5.48	−0.31	5.18	−0.01
a16	5.22	5.18	0.04	5.36	−0.14	5.14	0.08
a17	4.75	4.65	0.10	4.64	0.11	5.04	−0.29
a18	4.50	4.51	−0.01	4.65	−0.15	4.39	0.11
b1	5.11	4.92	0.19	5.06	0.05	5.10	0.01
b2	4.85	4.83	0.02	4.94	−0.09	4.88	−0.03
b3 ^a	5.29	5.10	0.19	5.07	0.22	5.08	0.21
b4	5.13	5.29	−0.16	5.21	−0.08	5.10	0.03
p1	6.40	6.46	−0.06	6.67	−0.27	6.75	−0.35
p2	7.05	6.96	0.09	6.77	0.28	6.68	0.37
p3 ^a	6.70	6.61	0.09	6.11	0.59	7.06	−0.36
p4	5.98	6.03	−0.04	5.97	0.01	6.04	−0.06
p5	5.72	5.75	−0.03	5.51	0.21	5.74	−0.02
p6	5.69	5.64	0.06	5.99	−0.30	5.68	0.01

^a The test set compound

shown in Fig. 9c. Two hydrophobically unfavorable white contours appear near the meta and para substituents on aryl ring A of compounds **a7**, **b3**, and **p2**. The combined results from CoMFA and CoMSIA contour maps indicate that electron-donating groups with low steric demand and high hydrophilicity in these regions would be helpful to enhance the binding affinity of arylamide derivatives with the InhA pocket. Two hydrophobically favorable magenta contours are located near ring B of compounds **a7**, **b3**, and **p2**. Only the bulky fluorene substituent of compound **p2** is buried in both magenta contours. These findings clearly show that the bulky fluorene substituent of compound **p2** favors hydrophobic interactions to a greater extent than aryl ring B of compounds **a7** and **b3**. Therefore, compounds that contain the bulky fluorene ring as the B substituent have higher inhibitory activity than the others, as shown for compounds **p1**, **p2**, and **p3**. With regard to compounds **a7** and **b3**, the hydrophobic group matches two favorable

hydrophobic magenta contours of ring B and hence should enhance their activity.

HQSAR contribution maps

Molecular fragments of arylamides which contribute directly to biological activity can be visualized through HQSAR contribution maps. The different contributions of all atoms in a molecule to the biological activity are discriminated by a color code. Atoms with negative contributions are represented at the red end of the spectrum whereas atoms with positive contributions are presented by the colors at the green end of the spectrum. The white colored atoms make intermediate contributions. Figure 10 depicts the individual atomic contributions to the activity of the highly active compounds **a7**, **b3**, and **p2**.

As seen from Fig. 10, the fragments of the fluorene ring B of the most active compound **p2** are positively correlated

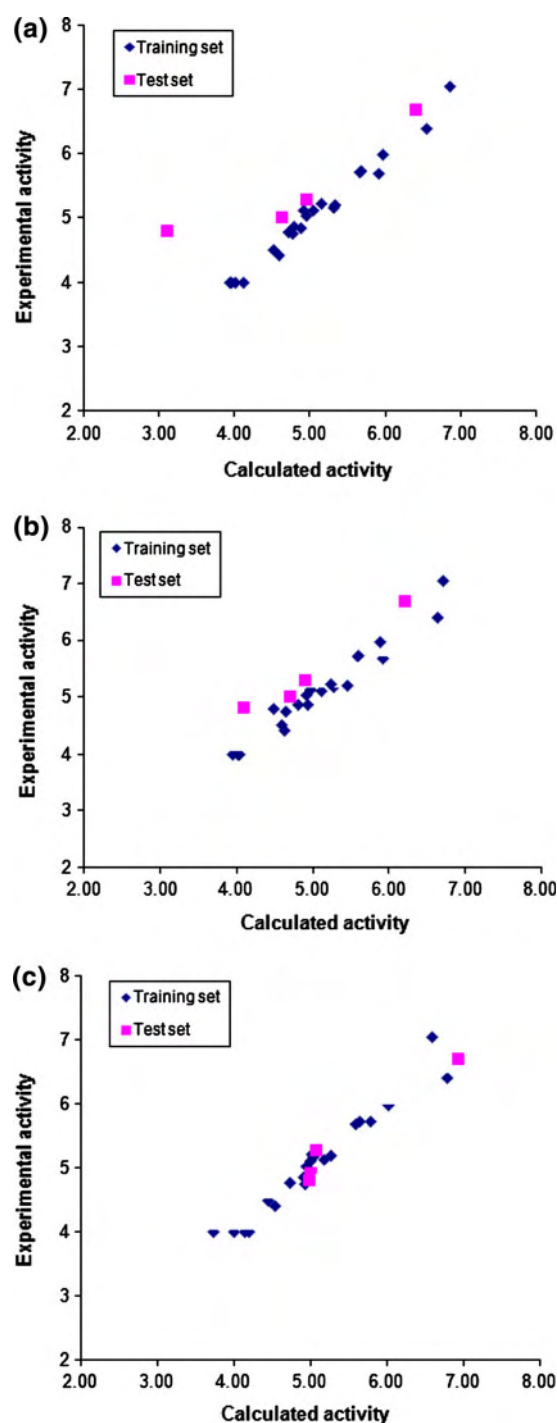


Fig. 8 Plots of experimental activity against predicted activity for the training and test sets derived from CoMFA (a), CoMSIA (b), and HQSAR (c) models

with the biological activity of this compound. Compounds **p1** and **p3** containing a fluorene ring also have high biological activity. If the fluorene ring of compound **p2** is replaced by the smaller aryl ring of compounds **a7** and **b3**,

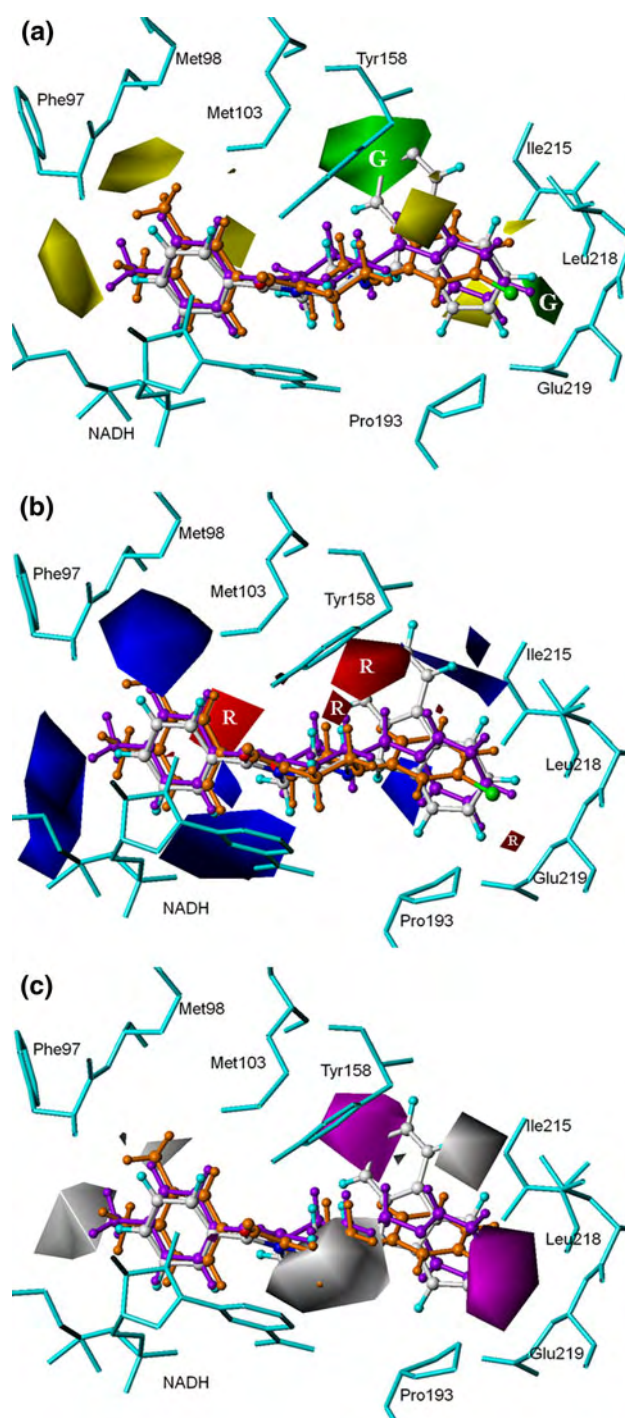


Fig. 9 CoMFA steric contour (a), CoMFA electrostatic contour (b), and CoMSIA hydrophobic contour (c) in combination with compounds **a7** (orange), **b3** (violet), and **p2** (colored by atom type) in the InhA binding pocket (cyan). Green and yellow contours represent favorable and unfavorable steric regions, respectively. Blue and red contours are favored for electron-positive groups and electron-negative groups, respectively. Magenta and white contours show favorable and unfavorable hydrophobic regions, respectively

the individual atoms of the aryl ring make less positive contributions than the individual atoms of the fluorene ring; particularly the aryl ring of compound **b3** as shown in Fig. 10. These observations confirm the previous CoMFA and CoMSIA results which suggest that the bulky volume of ring B would enhance the biological activity of arylamide derivatives. Consistent with the docking results also, a bulky ring B is favorable for hydrophobic interactions leading to increased binding affinity. With regard to the aryl ring A, this fragment of compounds **b3** and **p2** is positively related to the biological activity. As described in the docking analysis, yellow and green colored hydrogen atoms at the ortho and meta positions of aryl ring A favor the formation of hydrogen bond interactions with NADH. This HQSAR result corroborates the importance of these hydrogen bond interactions in the biological activity of the arylamide derivatives. In compound **a7**, all substituents on the aryl ring A make no contributions to the biological

activity of this compound, indicating that modification of these substituents based on CoMFA and CoMSIA suggestions should enhance the potency. Importantly, the 3-Cl substituent on the aryl ring B of compound **a7** is colored green, implying that this substituent is necessary for the binding affinity of this compound and others in series a.

Data sets and calculation methods

Data sets and biological activities

Some of the 28 arylamide derivatives were found in the literature [44]. Chemical structures and experimental biological activity of these compounds are listed in Table 1. All the arylamide derivatives in the data set are structurally different. Compounds bearing a nitrogen atom at position X and an aryl ring as the ring moiety B are defined as series a, whereas compounds that contain a carbon atom at position X are defined as series b. Another series of compounds bearing a fluorene or bis(4-fluorophenyl)methyl ring at position B are defined as series p. The biological activity of these compounds for InhA inhibition were expressed in terms of IC_{50} values. For QSAR studies, IC_{50} values were converted as usual to the corresponding $\log(1/IC_{50})$. All chemical structures of arylamide derivatives were constructed using the standard tools available in GaussView 3.07 software [52] and were then fully optimized using the HF/3-21G method implemented in the Gaussian 03 software [53].

Molecular docking calculations

The X-ray crystal structure of compound **b3** complexed with InhA (pdb code 2NSD) was used for molecular docking experiments. Docking of arylamide derivatives was carried out by use of the software Glide, version 5 [54]. The InhA protein for the docking study was prepared by using the Protein Preparation Wizard tool of Glide. All hydrogen atoms were added to the protein structure and all crystallographic water molecules were excluded. To keep the original X-ray crystal coordinates unaltered, the entire protein was not minimized; only the hydrogen bond network between the ligand and the protein was optimized. The receptor grid was generated using the receptor grid generation tool in the Glide software. The scaling of the van der Waals radius was set as default, a scaling factor of 1.0 and a partial charge cutoff of 0.25. The grid box with size of 14 Å was centered on the workspace ligand. For subsequent molecular docking of the ligand into the InhA binding site, standard precision (SP) with dock flexibly option was selected and ten distinct ligand poses per ligand were written out. No constraints were selected in the docking

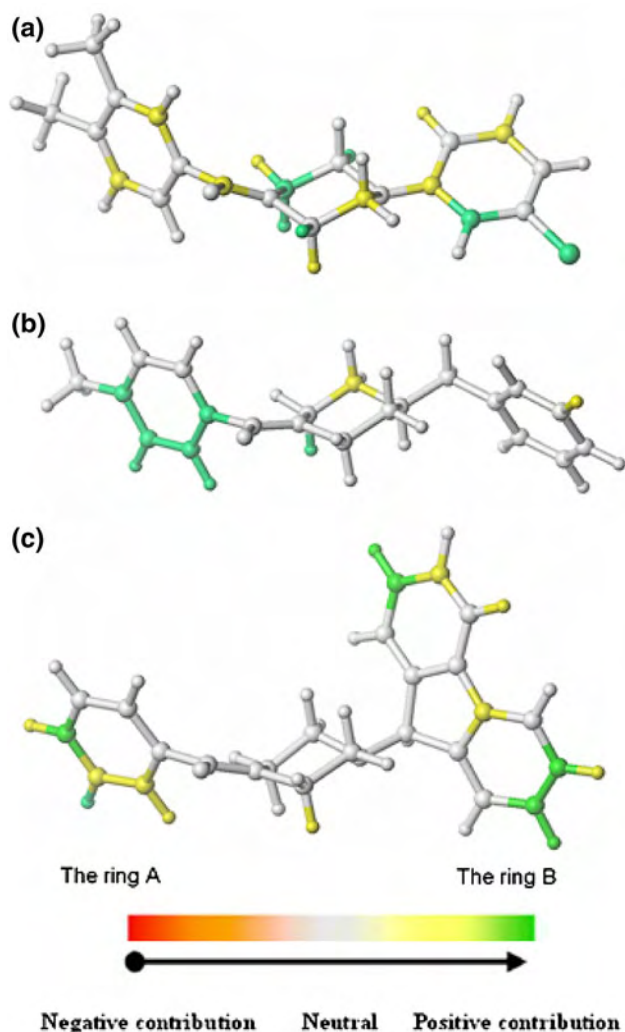


Fig. 10 The HQSAR contribution maps for compounds **a7** (a), **b3** (b), and **p2** (c)

runs. Post-docking minimization was performed with the default setting. Compound **b3** was docked back into the InhA binding pocket to validate the docking method, and subsequently all derivatives were docked. The ligand pose with highest G score was selected as the best binding mode of arylamide derivatives in the InhA binding pocket.

Training and test sets

The chemical structures and biological activities of arylamide derivatives used to set up CoMFA, CoMSIA, and HQSAR models are listed in Table 1. Experimental activities of these compounds are spread over a range of $3.05 \log(1/IC_{50})$ units thus providing a broad and homogeneous data set for CoMFA, CoMSIA, and HQSAR studies. The 28 arylamide derivatives were divided into a training set of 24 compounds and a test set of four compounds for final model development and model validation, respectively. The representatives of the test set were manually selected and cover the entire range of activity and structural diversity of the arylamides in the data set.

CoMFA and CoMSIA techniques

Structural alignment of compounds according to their bioactive conformations is an important prerequisite for the set up of appropriate CoMFA and CoMSIA models. In this study, the reasonable binding modes of compounds in the InhA binding pocket obtained from Glide docking were used for molecular alignment. SYBYL 8.0 molecular modeling software [55] was used to calculate the CoMFA and CoMSIA models. A sp^3 carbon atom with a formal charge of +1 was selected as the probe atom to generate the steric (Lennard–Jones potential) and the electrostatic (Coulomb potential) fields. The probe atom was placed at all intersections in a grid with spacing of 2 Å. The steric and electrostatic fields around the aligned compounds were all calculated with CoMFA standard scaling. The maximum steric and electrostatic energies were truncated at 125 kJ/mol.

Five CoMSIA similarity index descriptors of steric, electrostatic, hydrophobic, hydrogen bond donor, and hydrogen bond acceptor fields were derived with the same grid as used for the CoMFA field calculation. There are no energy cutoffs for CoMSIA calculations because a distance-dependent Gaussian type was used, differing from the procedure for CoMFA calculations. To generate a contour map with prominent molecular features in the CoMSIA study, an attenuation factor of 0.3 was used.

To derive a linear relationship between molecular descriptors and activities, the partial least square (PLS) approach was used, in which CoMFA and CoMSIA descriptors were set as independent variables and $\log(1/IC_{50})$

values were used as dependent variables. The cross-validation was performed using the leave-one-out method with an 8.4 kJ/mol column filter to minimize the influence of noisy columns. A final non-cross-validated analysis with the optimum number of components was sequentially performed and was then used to analyze the results. The r^2 and q^2 values were used to evaluate the predictive ability of the CoMFA and CoMSIA models.

HQSAR

Hologram QSAR (HQSAR) does not require information about the 3D structure of inhibitors, because this method uses only 2D structural information. Hence, in contrast with the CoMFA and CoMSIA methods, HQSAR needs no molecular alignment. For the HQSAR study, the HQSAR module of SYBYL 8.0 was used. The same training and test sets as for the CoMFA and CoMSIA studies were used in the HQSAR study. Each compound in the training set was converted into all possible molecular fragments including linear, branched, cyclic, and overlapping fragments in the size range 4–7 atoms. Molecular fragment generation utilizes fragment-distinction properties including atoms (A), bonds (B), connections (C), hydrogen atoms (H), chirality (Ch), and donor and acceptor (DA). The generated molecular fragments are counted in bins of a fixed length array to produce a molecular hologram. The hologram length was set with 12 as a default length ranging from 53 to 401. The PLS method was used to establish a correlation of the molecular hologram descriptors with the biological data. The best model was selected on the basis of the best cross-validated r^2 . To develop robust HQSAR models, numerous models with various combinations of the fragment-distinction properties were built.

Acknowledgments This research was supported by the Thailand Research Fund (DBG5180022, RTA5080005, and MRG5080267). A. Punkvang is grateful for a grant from under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral degree from the Office of the Higher Education. The Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, University of Vienna, and ASEA-Uninet are gratefully acknowledged for supporting this research.

References

1. World Health Organization (WHO) (2009) Global tuberculosis control—epidemiology, strategy, financing. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html
2. Aziz MA, Wright A, Laszlo A, De Muynck A, Portaels F, Van Deun A, Wells C, Nunn P, Blanc L, Raviglione M (2006) Lancet 368:2142
3. Raviglione MC, Smith IM (2007) N Engl J Med 356:656
4. Morlock GP, Metchock B, Sikes D, Crawford JT, Cooksey RC (2003) Antimicrob Agents Chemother 47:3799

5. Ormerod LP (2008) *Thorax* 63:440
6. Ormerod LP (2005) *Br Med Bull* 73–74:17
7. Dravniec G, Cain KP, Holtz TH, Riekstina V, Leimane V, Zaleskis R (2009) *Eur Respir J* 34:180
8. Suchindran S, Brouwer ES, Van Rie A (2009) *PLoS One* 4:e5561
9. Chakaya J, Getahun H, Granich R, Havlir D (2008) *J Int AIDS Soc* 11:6
10. El-Sadr WM, Tsiouris SJ (2008) *Semin Respir Crit Care Med* 29:525
11. Nunn P, Reid A, De Cock KM (2007) *J Infect Dis* 196:S5
12. Campbell JW, Cronan JE Jr (2001) *Annu Rev Microbiol* 55:305
13. Heath RJ, Rock CO (2004) *Curr Opin Invest Drugs* 5:146
14. White SW, Zheng J, Zhang YM, Rock CO (2005) *Annu Rev Biochem* 74:791
15. Zhang YM, Lu YJ, Rock CO (2004) *Lipids* 39:1055
16. Wen L, Chmielowski JN, Bohn KC, Huang JK, Timsina YN, Kodali P, Pathak AK (2009) *Protein Expr Purif* 65:83
17. Wright HT, Reynolds KA (2007) *Curr Opin Microbiol* 10:447
18. Quémard A, Sacchettini JC, Dessen A, Vilcheze C, Bittman R, Jacobs WR Jr, Blanchard JS (1995) *Biochemistry* 34:8235
19. Rozwarski DA, Grant GA, Barton DH, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC (1998) *Science* 279:98
20. Vilchère C, Wang F, Arai M, Hazbón MH, Colangeli R, Kremer L, Weisbrod TR, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr (2006) *Nat Med* 12:1027
21. Dessen A, Quemard A, Blanchard JS, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC (1995) *Science* 267:1638
22. Johnsson K, Schultz PG (1994) *J Am Chem Soc* 116:7425
23. Lei B, Wei CJ, Tu SC (2000) *J Biol Chem* 275:2520
24. Johnsson K, King DS, Schultz PG (1995) *J Am Chem Soc* 117:5009
25. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S (1992) *Nature* 358:591
26. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR Jr (1994) *Science* 263:227
27. Quemard A, Dessen A, Sugantino M, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC, Blanchard JS (1996) *J Am Chem Soc* 118:1561
28. Lei B, Wei C, Tu SC (2000) *J Biol Chem* 275:2520
29. Saint-Joanis B, Souchon H, Wilming M, Johnsson K, Alzari PM, Cole ST (1999) *Biochem J* 338:753
30. Zhao X, Yu H, Yu S, Wang F, Sacchettini JC, Magliozzo RS (2006) *Biochemistry* 45:4131
31. Metcalfe C, Macdonald IK, Murphy EJ, Brown KA, Raven EL, Moody PC (2008) *J Biol Chem* 283:6193
32. Sinha BK (1983) *J Biol Chem* 258:796
33. Nguyen M, Claparols C, Bernadou J, Meunier B (2001) *Chem-BioChem* 2:877
34. Heym B, Zhang Y, Poulet S, Young D, Cole ST (1993) *J Bacteriol* 175:4255
35. Timmins GS, Deretic V (2006) *Mol Microbiol* 62:1220
36. Johnsson K, Froland WA, Schultz PG (1997) *J Biol Chem* 272:2834
37. De La Iglesia AI, Morbidoni HR (2006) *Rev Argent Microbiol* 38:97
38. Suarez J, Ranguelova K, Schelvis JP, Magliozzo RS (2009) *Biol Chem* 284:16146
39. Freundlich JS, Wang F, Vilchère C, Gulten G, Langley R, Schiehser GA, Jacobus DP, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC (2009) *ChemMedChem* 4:241
40. Ende CWA, Knudson SE, Liu N, Childs J, Sullivan TJ, Boyne M, Xu H, Gegina Y, Knudson DL, Johnson F, Peloquin CA, Slayden RA, Tonge PJ (2008) *Bioorg Med Chem Lett* 18:3029
41. Boyne ME, Sullivan TJ, am Ende CW, Lu H, Gruppo V, Heaslip D, Amin AG, Chatterjee D, Lenaerts A, Tonge PJ, Slayden RA (2007) *Antimicrob Agents Chemother* 51:3562
42. Tonge PJ, Kisker C, Slayden RA (2007) *Curr Top Med Chem* 7:489
43. He X, Alian A, Stroud R, Ortiz de Montellano PR (2006) *J Med Chem* 49:6308
44. He X, Alian A, Ortiz de Montellano PR (2007) *Bioorg Med Chem* 15:6649
45. Lu XY, Chen YD, Jiang YJ, You QD (2009) *Eur J Med Chem* 44:3718
46. Kumar A, Siddiqi MI (2008) *J Mol Model* 14:923
47. Andrade CH, Salum Lde B, Castilho MS, Pasqualoto KF, Ferreira EI, Andricopulo AD (2008) *Mol Divers* 12:47
48. Lu XU, Chen YD, You QD (2010) *Chem Bio Drug Des* 75:195
49. Cramer RD III, Patterson DE, Bunce JD (1988) *J Am Chem Soc* 110:5959
50. Klebe G, Abraham U, Mietzner T (1994) *J Med Chem* 37:4130
51. Tong W, Lowis DR, Perkins R, Chen Y, Welsh WJ, Goddette DW, Heritage TW, Sheehan DM (1998) *J Chem Inf Comput Sci* 38:669
52. GaussView 03, Revision 3.07 (2006) Gaussian, Inc., Wallingford
53. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JA Jr, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA (2004) *Gaussian 03*, Gaussian Inc., Wallingford
54. Glide, version 5.0 (2008) Schrödinger, LLC, New York, NY
55. SYBYL 8.0 (2007) Tripos, Inc

Article

Elucidating Drug-Enzyme Interactions and Their Structural Basis for Improving the Affinity and Potency of Isoniazid and Its Derivatives Based on Computer Modeling Approaches

Auradee Punkvang ¹, Patchreenart Saparpakorn ², Supa Hannongbua ², Peter Wolschann ³ and Pornpan Pungpo ^{1,*}

¹ Department of Chemistry, Ubon Ratchathani University, 85 Sthollmark Rd., Warinchamrap, Ubonratchathani, 34190, Thailand

² Department of Chemistry, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900, Thailand

³ Institute for Theoretical Chemistry, University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: pornpan_ubu@yahoo.com; Tel.: +66453534014124; Fax: +6645288379.

Received: 21 February 2010; in revised form: 31 March 2010 / Accepted: 7 April 2010 /

Published: 16 April 2010

Abstract: The enoyl-ACP reductase enzyme (InhA) from *M. tuberculosis* is recognized as the primary target of isoniazid (INH), a first-line antibiotic for tuberculosis treatment. To identify the specific interactions of INH-NAD adduct and its derivative adducts in InhA binding pocket, molecular docking calculations and quantum chemical calculations were performed on a set of INH derivative adducts. Reliable binding modes of INH derivative adducts in the InhA pocket were established using the Autodock 3.05 program, which shows a good ability to reproduce the X-ray bound conformation with rmsd of less than 1.0 Å. The interaction energies of the INH-NAD adduct and its derivative adducts with individual amino acids in the InhA binding pocket were computed based on quantum chemical calculations at the MP2/6-31G (d) level. The molecular docking and quantum chemical calculation results reveal that hydrogen bond interactions are the main interactions for adduct binding. To clearly delineate the linear relationship between structure and activity of these adducts, CoMFA and CoMSIA models were set up based on molecular docking alignment. The resulting CoMFA and CoMSIA models are in conformity with the best statistical qualities, in which r^2_{cv} is 0.67 and 0.74, respectively. Structural requirements of isoniazid derivatives that can be incorporated into the isoniazid framework to improve the activity have been identified through CoMFA and CoMSIA

steric and electrostatic contour maps. The integrated results from structure-based, ligand-based design approaches and quantum chemical calculations provide useful structural information facilitating the design of new and more potentially effective antitubercular agents as follow: the R substituents of isoniazid derivatives should contain a large plane and both sides of the plane should contain an electropositive group. Moreover, the steric and electrostatic fields of the 4-pyridyl ring are optimal for greater potency.

Keywords: isoniazid; CoMFA; CoMSIA; docking; quantum chemical calculations

1. Introduction

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) still remains a major cause of illness and death worldwide, especially in Asia and Africa. Globally, 9.2 million new cases and 1.7 million deaths from TB occurred in 2006. The number of new cases was still increasing between 2005 and 2006, from 9.1 to 9.2 million (an increase of 0.6%) [1]. Antibiotics for TB treatment are classified into two classes, first-line drugs and second-line drugs. First-line drugs are mainly bactericidal and combine a high degree of efficacy with a relatively low toxicity to the patient during treatment. These drugs include isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol, pyrazinamide, and fluoroquinolones. Second-line drugs are mainly bacteriostatic, which have a lower efficacy and are usually more toxic. These drugs include *para*-aminosalicylic acid, ethionamide, and cycloserine [2]. Drug-sensitive tuberculosis can be effectively treated with the combination of potent bactericidal agents including streptomycin or ethambutol, isoniazid, rifampin and pyrazinamide [2–5]. However, the successful treatment using drug combinations has been diminished by the outbreak of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB), defined as resistant to at least isoniazid and rifampicin. More recently, there is a new class of MDR, extensively drug-resistant TB (XDR-TB) defined as resistant to isoniazid and rifampicin and at least three of the six main classes of second-line drugs [6]. Furthermore, a more complex treatment of TB is associated with co-infection between *M. tuberculosis* and HIV (TB/HIV) [7–10]. Accordingly, the design of new and more potent antitubercular drugs for the management of drug-sensitive and drug-resistant TB is imperative.

Isoniazid (INH) has the greatest bactericidal activity and is used almost from the outset of tuberculosis chemotherapy [11–13]. This antibiotic inhibits a 2-*trans*-enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) displaying a long-chain fatty acid elongation activity. Inhibition of this activity by INH blocks the biosynthesis of mycolic acids, which are major lipids of the mycobacterial envelope [14–17]. INH is a prodrug requiring the activation function of catalase-peroxidase (KatG) to generate the active form [18–22]. The reactive species generated from the activation process forms a covalent adduct with NAD⁺ that is a potent inhibitor of InhA [20,23–24]. INH-NAD adduct is a slow tight-binding competitive inhibitor of InhA that binds with an overall dissociation constant of 0.75 nM [25]. To reveal a better understanding of the isoniazid drug mechanism, the crystal structures of InhA in complex with NADH cofactor and INH-NAD adduct were isolated [15,26–28]. Although INH-NAD is an extremely potent InhA inhibitor, its ability for inhibiting InhA is diminished by drug resistance [29–31]. Therefore, the basic research in molecular biology for developing new and more effective

InhA inhibitors is desirable. Recently, molecular docking and molecular dynamics simulations have been performed to study the binding of isoniazid onto the active site of InhA in an attempt to address the mycobacterial resistance against the drug [32]. Ligand-based drug design approaches have also been successfully employed to identify crucial features of INH derivative prodrugs as InhA inhibitors [33–36]. Based on the chemical structures of INH derivative prodrugs, they probably bind with NAD^+ to form covalent adducts like the parent INH. Therefore, insight into the nature of these bioactive forms of INH derivative prodrugs in the InhA binding pocket should provide more detailed information for designing agents that greatly inhibit InhA. In the present study, molecular docking and quantum chemical calculations were employed to elucidate the potential antitubercular binding modes and main interactions of INH derivative adducts. In order to understand the structural requirement of InhA inhibitors, the relationship between structure and activity of these compounds was elucidated by CoMFA and CoMSIA methods [37–38]. The integrated results should aid in the rational design of InhA inhibitors with high potential antitubercular activity.

2. Results and Discussion

2.1. Validation of the molecular docking calculations

Molecular docking calculations were employed to predict the potential binding mode of INH derivative adducts in the InhA binding pocket. To ensure that the binding modes of adduct inhibitors obtained from molecular docking calculations are reliable the docking parameters in Autodock 3.05 program were validated. The structure of the INH-NAD adduct in the X-ray crystal structure was extracted and docked back into the binding pocket. The superimposition between the docked conformation and the X-ray crystal structure of INH-NAD adduct is shown in Figure 1. The docked conformation of INH-NAD adduct is close to the binding mode found in the X-ray crystal structure with rmsd of 0.44 Å, indicating that the docking parameters are reasonable to generate the binding mode of INH-NAD adduct in the InhA binding pocket. Therefore, molecular docking calculations could be extended to search the binding modes of INH derivative adducts in the data set.

2.2. Molecular docking analysis of the highly active compounds

INH and its derivatives were used for molecular docking calculations. The chemical structures and experimental biological activities against the BCG strain of *M. tuberculosis* of these compounds are shown in Table 1. Among the data set, INH shows the highest activity against strains of *M. tuberculosis* with a $\log(1/\text{MIC})$ value of 7.70, where MIC is the *in vitro* minimum inhibitory concentration in $\mu\text{g/mL}$ unit. The docked conformation of the INH-NAD adduct into the active site of InhA is indeed similar to that observed in the X-ray crystal structure. The 4-pyridyl ring of the INH-NAD adduct is buried in the cavity formed by the Ala191, Gly192, Trp222, Tyr158, Phe149 and Pro193 residues, as shown in Figure 1. This ring forms a π - π interaction with the aromatic sidechain of Phe149 and a H- π interaction with the aromatic sidechain of Tyr158. For the nicotinamide part, two hydrogen bonds with the carbonyl oxygen backbone of Asp148 and van der Waals interactions with Ile21, Ala191, Gly192, Pro193, Thr196 and Met199 could be observed. The pyrophosphate part is held strongly by the hydrogen bonding interaction of surrounding amino acids in the InhA binding site.

Two oxygen atoms of the pyrophosphate form two hydrogen bonds with the OH group of Thr196. Moreover, two hydrogen bonds between the NH backbone of Ile21 and the OH sidechain of Ser20 with phosphate oxygens are also present. A hydrogen atom of NH₂ and a nitrogen atom of the adenine part interact with the carbonyl oxygen group of Asp64 and the NH backbone of Val65 to form two hydrogen bonds. According to the observed interactions of INH-NAD adduct, the main interactions found in the binding are hydrogen bond interactions, therefore they may play an important role in the binding of adduct inhibitors.

Figure 1. Superimposition of the X-ray crystal structure (carbon atoms colored by yellow) and docked conformation (green) of the INH-NAD adduct in the InhA binding pocket.

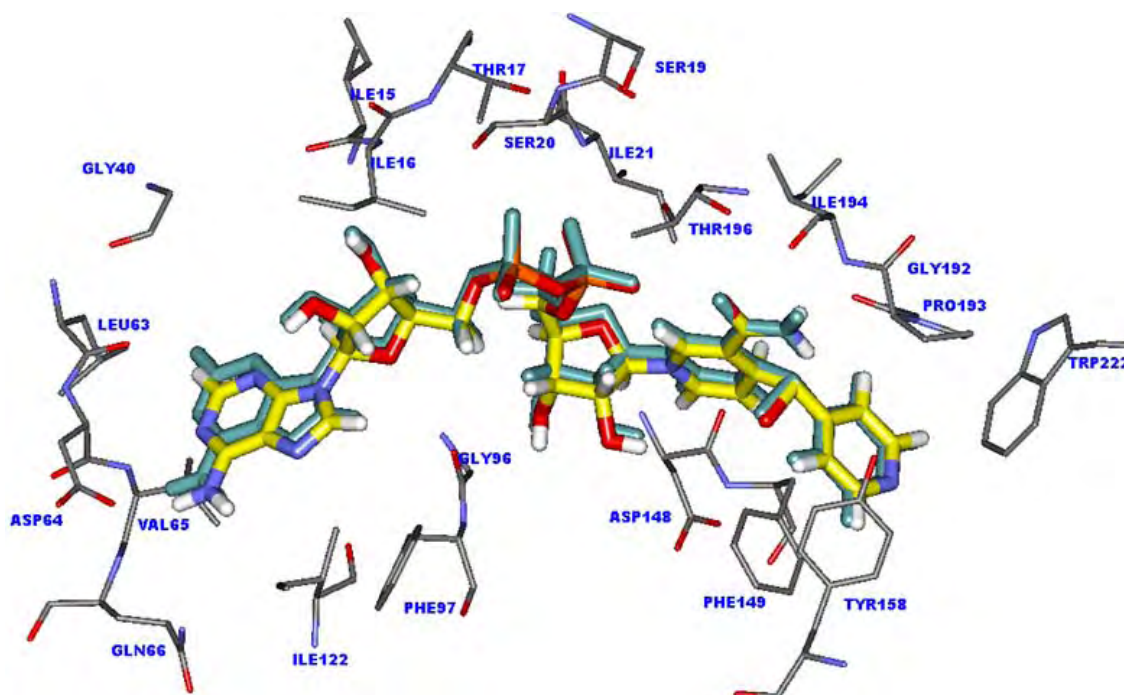


Table 1. The chemical structures and experimental biological activities against the BCG strain of *M. tuberculosis* of INH derivatives taken from literature [39].

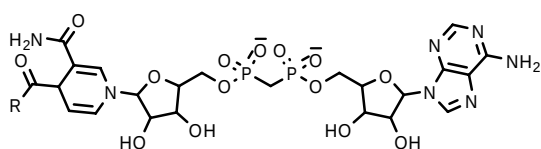
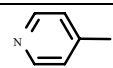
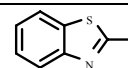
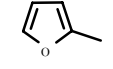
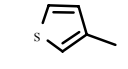
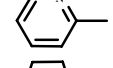
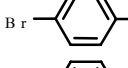
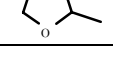
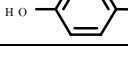
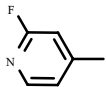
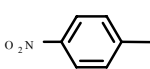
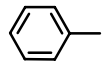
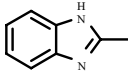
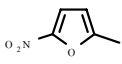
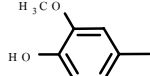
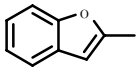
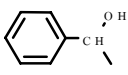
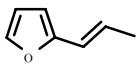
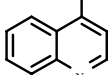
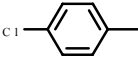
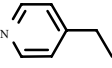
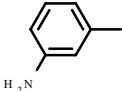
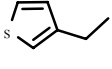
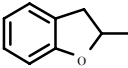
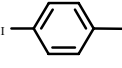
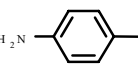
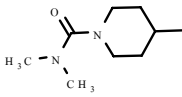
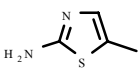
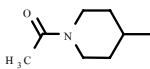
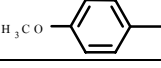
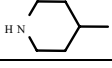
					
Compound	R	Log (1/MIC)	Compound	R	Log (1/MIC)
INH		7.70	18		5.10
1		7.22	19 ^[a]		5.10
2 ^[a]		6.82	20		4.92
3		6.52	21 ^[a]		4.92

Table 1. Cont.

Compound	R	Log (1/MIC)	Compound	R	Log (1/MIC)
4		6.40	22		4.92
5		6.22	23		4.82
6		6.10	24		4.70
7		5.82	25		4.52
8		5.70	26 ^[a]		4.52
9 ^[a]		5.70	27		4.40
10 ^[a]		5.52	28		4.10
11		5.52	29		4.00
12		5.52	30		4.00
13		5.52	31		3.65
14		5.22	32		3.52
15		5.22	33		3.22
16		5.22	34		3.22
17		5.10	35		3.22

^[a] The test set compounds for CoMFA and CoMSIA.

With regard to compound **1** possessing a furan ring at the R substituent position, the inhibitory activity differs slightly from the activity of INH, with log (1/MIC) of 7.22. The NAD part of compound **1** is aligned well with the NAD part of INH, as shown in Figure 2. The hydrogen bond distances of the NAD part of compound **1** are insignificantly changed ($< 0.1 \text{ \AA}$), compared with INH, as shown in Table 2. Because of the smaller R substituent of compound **1** as compared with the 4-pyridyl ring of the INH adduct, the π - π interaction with the aromatic sidechain of Phe149 is lost. However, a H- π interaction with the aromatic sidechain of Phe149 is formed to compensate for the lost interaction. These results reinforce the slight difference on the inhibitory activity of compound **1** as compared with INH.

Figure 2. Superimposition of the INH-NAD adduct (colored by yellow) and compound 1 (colored by atom type) in InhA binding pocket obtained from molecular docking calculations.

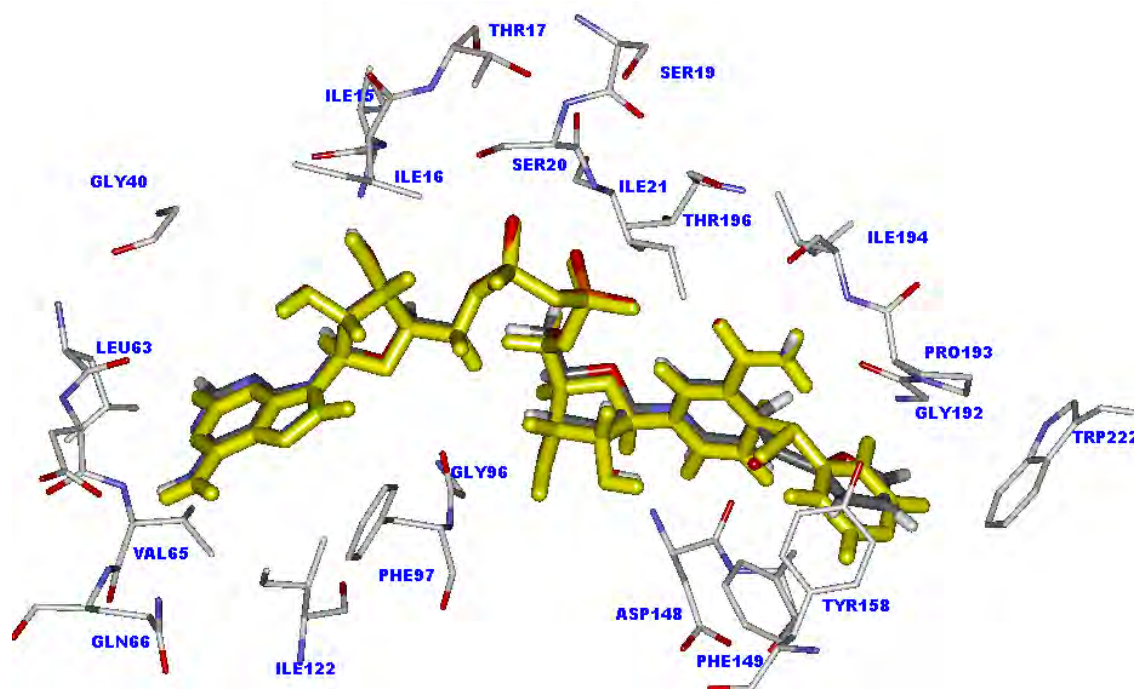


Table 2. The hydrogen bond distances (Å) between the NAD part of all adducts and amino acid residues.

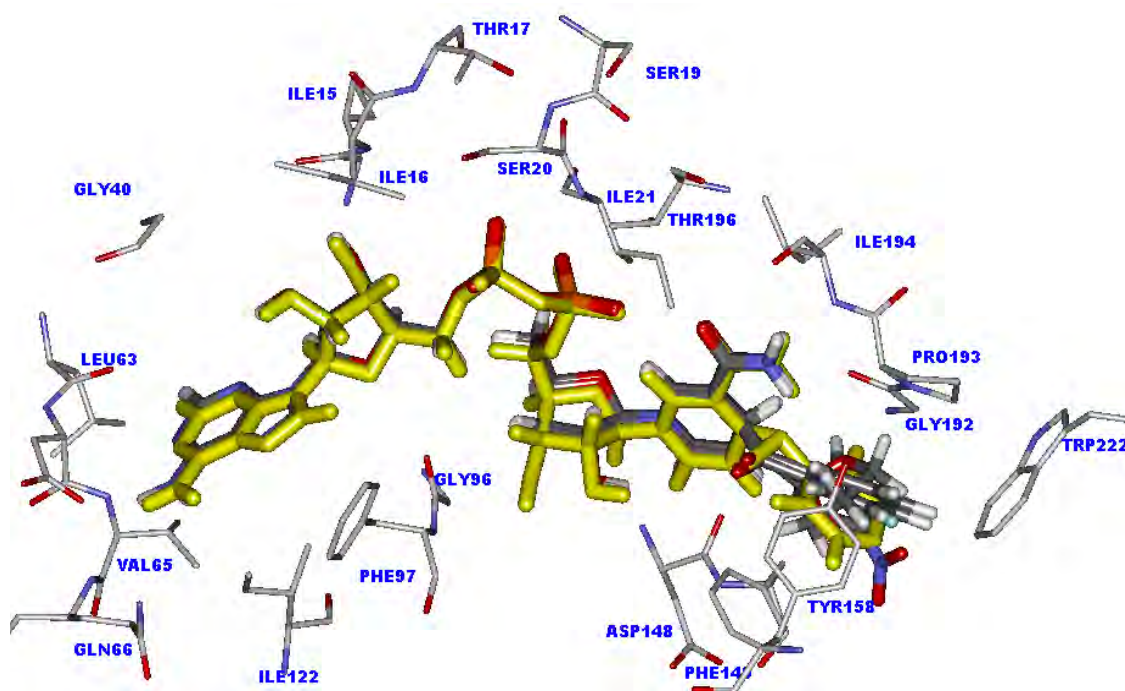
Cpd.	Nicotinamide	Pyrophosphate			Adenine ring	
	Asp148	Thr196	Ser20	Ile21	Asp64	Val65
INH	2.75, 2.34	2.99, 3.66	2.47	2.69	2.09	2.80
1	2.74, 2.33	2.92, 3.65	2.42	2.63	2.14	2.82
2	2.91, 2.40	2.97, 3.66	2.43	2.72	2.12	2.74
3	2.80, 2.36	2.85, 3.59	2.42	2.59	2.21	2.86
4	2.87, 2.36	2.94, 3.64	2.43	2.68	2.16	2.76
5	2.91, 2.41	2.89, 3.62	2.41	2.66	2.25	2.76
6	2.79, 2.35	2.91, 3.65	2.40	2.62	2.13	2.81
7	2.87, 2.34	2.91, 3.68	2.41	2.64	2.23	2.75
8	2.95, 2.39	2.90, 3.61	2.43	2.67	2.25	2.76
9	3.71, 3.38	3.21, 4.53	2.13	3.22	1.64	2.45
10	2.93, 2.99	3.31, 4.38	2.28	3.14	1.56	2.43
11	3.29, 2.81	3.10, 3.77	2.30	2.90	1.78	2.65
12	3.01, 2.50	2.91, 3.68	2.41	2.73	2.16	2.71
13	2.87, 2.34	2.90, 3.67	2.41	2.63	2.22	2.76
14	3.46, 3.15	3.12, 3.88	2.14	2.97	1.67	2.60
15	3.20, 2.85	2.87, 3.74	2.29	2.82	1.88	2.55
16	3.09, 2.53	3.12, 3.84	2.39	2.86	1.89	2.58
17	2.67, 2.99	3.31, 4.53	2.28	3.14	1.56	2.43
18	3.83, 3.62	3.30, 4.71	2.11	3.34	1.72	2.59
19	2.82, 2.36	3.02, 3.64	2.83	2.73	2.35	2.86

Table 2. Cont.

Cpd.	Nicotinamide	Pyrophosphate			Adenine ring	
	Asp148	Thr196	Ser20	Ile21	Asp64	Val65
20	3.38, 2.89	3.08, 3.83	2.21	2.89	1.77	2.59
21	3.28, 2.56	3.10, 3.67	2.30	2.90	1.78	2.65
22	3.38, 3.03	2.82, 3.76	2.18	2.82	1.81	2.58
23	3.55, 3.51	3.43, 4.66	2.19	3.37	1.53	2.60
24	2.85, 2.33	2.91, 3.67	2.41	2.64	2.23	2.75
25	2.72, 2.39	2.89, 3.70	2.41	2.66	2.25	2.76
26	3.25, 2.81	2.90, 3.70	2.38	2.88	1.92	2.55
27	2.78, 2.95	2.89, 3.66	3.01	3.15	2.15	2.61
28	3.06, 2.77	3.42, 5.17	2.15	3.07	2.62	2.26
29	2.35, 2.24	3.02, 3.66	2.91	2.70	2.50	2.93
30	2.34, 2.23	3.02, 3.56	2.83	2.73	2.35	2.86
31	4.66, 3.79	3.17, 4.46	2.32	3.35	2.15	2.69
32	2.25, 2.38	3.05, 3.68	2.70	2.71	2.09	2.78
33	3.90, 3.07	2.73, 3.57	2.16	2.81	2.02	2.68
34	3.52, 3.16	3.45, 5.03	2.19	3.19	1.96	2.59
35	2.93, 2.42	2.99, 3.68	2.42	2.74	2.01	2.75

For the other highly active compounds, compounds 2-7, the NAD parts of these compounds lie in the same position as the NAD part of INH, as shown in Figure 3. The important hydrogen bonds of these compounds are maintained, but the preferable interactions of the R substituents of Ala191, Gly192, Trp222, Tyr158, Phe149 and Pro193 in the cavity are eliminated.

Figure 3. Superimposition of the INH-NAD adduct (colored by yellow) and compounds 2-7 (colored by atom type) in InhA binding pocket obtained from molecular docking calculations.



2.3. Docking analysis of the moderately active compounds

The different R substituents of the INH derivative adducts are located inside the hydrophobic cavity generated by the residues of Ala191, Gly192, Trp222, Tyr158, Phe149 and Pro193. The R substituents of moderately active compounds, compounds **8-23**, mostly interact with Pro193 to form hydrophobic interactions and interact with Ala191, Gly192 and Tyr158 to form van der Waals interactions. Unfavorably, a steric effect between the R substituents and the aromatic sidechain of Trp222 could be observed. Two of six member ring substituents, phenyl and pyridyl rings, are favored to form a hydrophobic interaction with Pro193, such as compounds **12**, **15**, **17** and **20**. However, the bulkier atoms or group of atoms in the six member ring substituents could collide with surrounding amino acid, in particular with Trp222. To reduce the steric effect, the position of the NAD part of these compounds may be shifted as compared with INH, leading to an increase in the hydrogen bond distances of the NAD part, especially for the two hydrogen bonds of the nicotinamide ring with Asp148, as shown in Table 2.

For the five member ring substituents contained in compounds **13** and **19**, no steric effect could be found with the surrounding amino acids in the R substituent cavity. The important hydrogen bonds of the NAD part also remain in the same quality as in INH, as shown in Table 2. Because the five member ring substituents of these compounds are rather small, the favorable interactions for high inhibitory activity, H- π or π - π interactions with Phe149 and H- π interaction with Tyr158, could not be formed. As for the interaction analysis of the moderately active compounds in the InhA binding pocket, the loss of inhibitory activity of these compounds could be explained by the steric effect and the absence of some favorable interactions in the R substituent cavity.

2.4. Docking analysis of the weakly active compounds

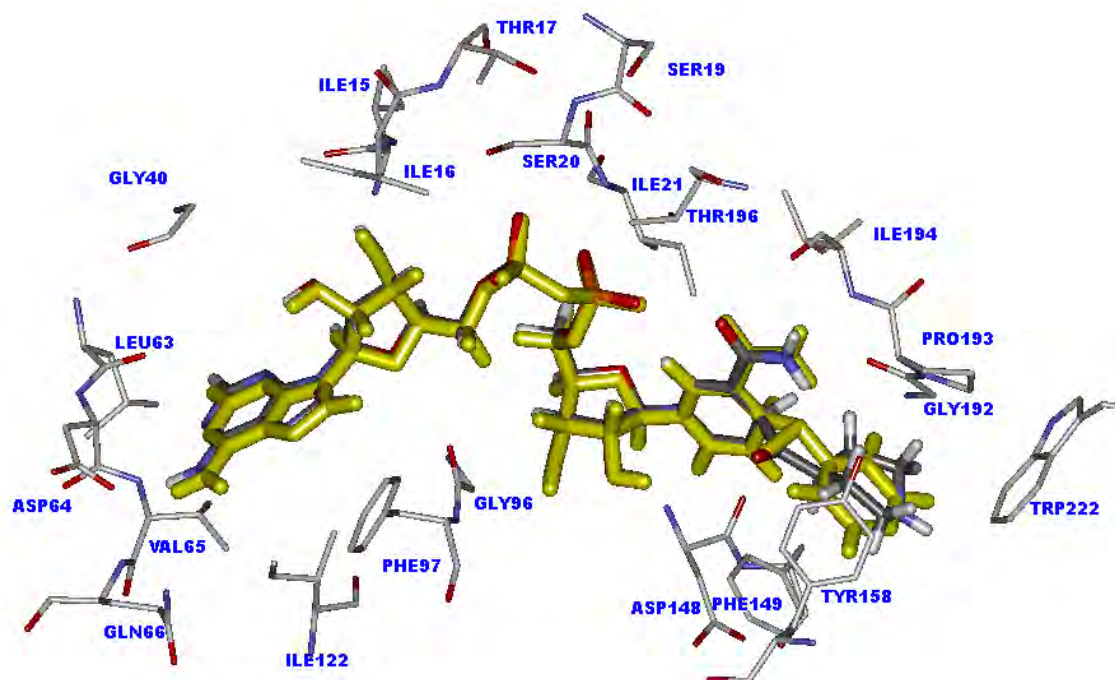
Compounds **24-35** show lower activity against strains of *M. tuberculosis*. The van der Waals interactions are the major interaction of the R substituents of these compounds. Steric effects between the substituents and the sidechain of Pro193, Phe149, Tyr158 and Trp222 could be found. The bicyclic substituents in compounds **28**, **31** seem to be the large substituents. These large substituents bump into amino acids in the R substituent cavity, leading to a shift in the position of the NAD part of these compounds, compared with INH. Moving the NAD part position leads to a loss of the hydrogen bond interactions of the nicotinamide ring with Asp148 and pyrophosphate part with Thr196, as shown in Table 2.

Compounds **33-35** display the lowest activity against strains of *M. tuberculosis*. The R positions of these compounds are substituted by a piperidine ring. The bulky piperidine ring could only form a van der Waals interaction with amino acids in the R substituent cavity. A steric effect of this substituent with the sidechains of Pro193, Phe149, Tyr158 and Trp222 is also observed. The bulky groups at the N position on piperidine ring of compounds **33-35** reinforce the steric effect of these compounds. Because of the steric effect, the hydrogen bonding interactions of nicotinamide part with Asp148 and pyrophosphate part with Thr196 of compounds **33**, **34** are eliminated, as shown in Table 2.

Interestingly, although compound **35** possesses the piperidine ring in the R substituent, the NAD part of this compound shows good alignment with the NAD part of the INH-NAD adduct, as shown in

Figure 4. The piperidine ring interacts with Phe149, Tyr158 and Trp222 to form H- π interactions. Moreover, the steric effect is absent in this compound. The important hydrogen bonding interactions of the NAD part are well within the range of INH, as presented in Table 2. Therefore, the weak inhibitory activity of compound **35** may be related to the activation process. The activation process of these compounds proceeds via free radical formation. The ability of R substituents to stabilize the acyl radical should influence the efficiency for coupling of the acyl radical with NAD⁺ to form an adduct inhibitor for InhA. The rich aromatic group has a higher capacity to stabilize the acyl radical than a non-aromatic group. The electronic charge of the acyl radical can be delocalized through resonance of the aromatic ring. This makes it more stable, whereas the electronic charge delocalization of acyl radical in the non-aromatic system could not occur. Therefore, the aromatic pyridyl ring of INH shows higher potency to stabilize the acyl radical than the non-aromatic piperidine ring of compound **35**, thereby explaining the lower inhibitory activity of this compound, compared with INH. Accordingly, the low potency for stabilizing the acyl radical of R substituents may be additional cause for the poor activity against *M. tuberculosis* of other compounds that contain the R substituent like compound **35**.

Figure 4. Superimposition of the INH-NAD adduct (colored by yellow) and compound **35** (colored by atom type) in the InhA binding pocket obtained from molecular docking calculations.



2.5. The favorable interactions for binding of INH derivative adducts

The hydrogen bonds of the NAD part with Asp148, Thr196, Ile21, Ser20 and Asp48 are major interactions for adduct binding. For the R substituent, the π - π or H- π interaction with the aromatic sidechain of Phe149 and the H- π interaction with the aromatic sidechain of Tyr158 are also required to enhance the binding of these inhibitors. Moreover, the capacity of R substituents for stabilizing the free radical intermediate in the activation process is interesting. To facilitate the activation process, R substituents should reveal a high aromatic property. Importantly, R substituents must not present a

steric effect in the R substituent cavity. The 4-pyridyl ring and furan ring seem to be optimal for binding of InhA inhibitors. The replacement of hydrogen atoms on these ring with bulkier atoms or groups of atoms such as Cl, I, Br, NH₂ and NO₂ completely reduces the inhibitory activity of compounds because of their steric effect in the R substituent cavity.

2.6. Interaction energy of the INH-NAD adduct in the InhA binding pocket

To investigate the key interactions for binding of INH-NAD adduct and its derivatives, INH, the highly active compound **1** and the weakly active compound **33** were selected for quantum chemical calculations. Moreover, to explain the effect of the activation process on the inhibitory activity of these inhibitors, the interaction energy of compound **35** was also calculated. Based on quantum chemical calculations at MP2/6-31G(d) level of theory, the interaction energies of INH-NAD adduct fall in the range of -33.01 to 13.20 kcal/mol. The 4-pyridyl ring, the R substituent of INH-NAD adduct, shows an attractive interaction with Phe149 and Tyr158 with an attraction energy of 1.21 and 2.09 kcal/mol. These attraction energies correlate well with the observed interactions from the X-ray crystal structure of INH-NAD bound in the InhA active site. The 4-pyridyl ring forms a π - π interaction with the aromatic sidechain of Phe149 and a H- π interaction with the aromatic sidechain of Tyr158. The nicotinamide part provides the main attraction energy of 4.31 kcal/mol with Asp148. This attraction energy agrees with the weak hydrogen bonds produced from two hydrogen atoms on the nicotinamide ring and the carbonyl backbone of Asp148. In this part, a high repulsion interaction with Ile194 could be observed with a repulsion energy of 13.20 kcal/mol. From the X-ray crystal structure, the carbonyl amide of the nicotinamide part lies near the carbonyl backbone of Ile194. The repulsion between two groups with the same charge may occur. Nicotinamide ribose displays a highly attractive interaction of 11.15 kcal/mol with Lys165, due to the electrostatic interaction of nicotinamide ribose hydroxy group with Lys165. The pyrophosphate part presents higher attraction energy than other parts of the INH-NAD adduct. The highest attraction energy of 33.01 kcal/mol is found between the pyrophosphate part and Ser20. Moreover, other highly attractive interactions are also produced between the pyrophosphate part and Ile21 and Thr196, with attraction energies of 23.92 and 24.48 kcal/mol, respectively. These high attraction energies of the pyrophosphate part relate to the strong hydrogen bond interactions of the phosphate oxygens with Ser20, Thr196 and Ile21. These results confirm that the hydrogen bond interactions are the key interactions in this region. Among all attraction energies of the adenine part, the interaction with Asp64 shows the highest attraction energy (9.11 kcal/mol), consistent with the hydrogen bond interaction of NH₂ on the adenine part with the carbonyl sidechain of Asp64. Indeed in the X-ray crystal structure, the NH backbone of Val65 can form a hydrogen bond with the nitrogen atom of the adenine ring. The interaction energy of this interaction is low (2.67 kcal/mol). Based on the interaction energy calculation results, all high attraction energies correlate with the hydrogen bond interactions of the INH-NAD adduct in the InhA binding pocket observed in the X-ray crystal structure. Therefore, we can conclude that the hydrogen bond interactions are crucial for binding of the INH-NAD adduct, particularly the hydrogen bond interactions of the pyrophosphate part.

2.7. Interaction energy of the highly active compounds in the InhA binding pocket

In the data set of our study, the INH-NAD adduct is the highest potency compound against *M. tuberculosis*, with a log (1/MIC) of 7.70. The inhibitory activity of compound **1** at a log (1/MIC) of 7.22 is comparable with INH-NAD adduct. These two compounds show structural difference in the R substituent. The furan and 4-pyridyl rings are maintained at the R substituent position of compound **1** and the INH-NAD adduct, respectively. The binding mode of compound **1** in the InhA active site was studied by means of molecular docking calculations. To quantitatively elucidate the R substituent influence on its activity, the interaction energy of compound **1** was calculated and compared with the calculated interaction energy of the INH-NAD adduct. The interaction energy of compound **1** is presented in Table 3. The furan ring of compound **1** attractively contacts with Phe149 with an attraction energy of 0.93 kcal/mol. This attractive interaction correlates with the H- π interaction of the hydrogen atom on the furan ring with the aromatic sidechain of Phe149. Moreover, this attractive interaction is comparable with the π - π interaction of the 4-pyridyl ring of INH-NAD adduct with the aromatic sidechain of Phe149. Additionally, slightly attractive interactions with Pro193 and Trp222 could be found with attraction energies of 0.89 and 1.48 kcal/mol, respectively. However, the furan ring of compound **1** is missing the attractive interaction with Try158 of about 1 kcal/mol. This result correlates with the docking results in which the smaller furan ring loses the H- π interaction with Try158 compared with the 4-pyridyl ring of the INH-NAD adduct. For other parts of compound **1**, nicotinamide, nicotinamide ribose, pyrophosphate, adenine ribose and adenine ring, the main interaction energies are all similar to those of the INH-NAD adduct. These results suggest that the slightly lower inhibitory activity of compound **1** as compared with INH-NAD adduct could be attributed to the loss of attractive interaction of the furan substituent with Try158 because of its smaller size.

Table 3. Interaction energy between each part of the adducts of INH, compounds 1, 33, 35 and each amino acid surrounding within 6 Å from each part of adducts in InhA binding pocket.

Adduct fragment	Amino acid	Interaction energy (kcal/mol)			
		INH	Cpd. 1	Cpd. 33	Cpd. 35
R substituent	Phe149	-1.21	-0.93	30.17	2.64
	Tyr158	-2.09	-0.98	23.02	-0.07
	Ala191	0.78	3.69	18.01	4.01
	Gly192	1.61	1.96	-2.92	5.13
	Pro193	0.23	-0.89	23.68	6.72
	Trp222	0.03	-1.48	18.17	-0.21
	Ile21	-0.62	0.54	-0.61	-0.39
Nicotinamide	Met147	-0.58	-0.23	-0.08	-0.32
	Asp148	-4.31	-5.98	-4.65	-5.75
	Phe149	6.95	2.50	-0.20	4.55
	Lys165	1.56	1.90	3.43	2.64
	Ala191	-2.41	-1.84	-1.10	-1.90
	Gly192	-0.12	-0.57	-0.24	-0.35
	Pro193	0.52	0.62	-0.71	-0.22
	Ile194	13.20	10.70	3.34	3.74

Table 3. Cont.

Adduct fragment	Amino acid	Interaction energy (kcal/mol)			
		INH	Cpd. 1	Cpd. 33	Cpd. 35
Nicotinamide Ribose	Thr196	-1.88	-1.88	-2.66	-2.09
	Gly14	-0.18	-0.21	-0.21	-0.20
	Ser20	0.01	0.01	-0.02	0.01
	Ile21	-0.54	0.29	0.39	-0.19
	Ala22	-0.02	-0.04	-0.04	-0.03
	Ser94	-1.30	-0.41	-1.71	-1.15
	Ile95	0.22	-0.32	0.00	-0.17
	Gly96	-1.19	-1.08	-1.21	-1.24
	Met147	0.54	3.76	-1.27	0.99
	Asp148	-0.29	-0.61	0.26	-0.39
	Phe149	-0.26	-0.23	-0.22	-0.24
	Met161	-0.18	-0.16	-0.18	-0.16
	Lys165	-11.15	-11.87	-10.19	-12.00
	Ala191	-0.30	-0.31	-0.27	-0.30
Pyrophosphate	Gly14	8.87	9.29	9.79	9.34
	Ile16	-10.17	-10.28	-5.55	-10.12
	Thr17	-7.32	-7.81	-9.80	-7.83
	Ser19	-1.09	-1.24	-1.77	-1.24
	Ser20	-33.01	-32.55	-13.41	-32.08
	Ile21	-23.92	-22.51	-23.39	-23.87
	Ala22	-10.86	-11.12	-10.26	-10.84
	Ser94	6.63	9.15	7.41	8.70
	Ile95	-4.14	-4.10	-4.19	-4.16
	Gly96	3.27	3.35	3.41	3.41
	Met147	-3.63	-3.57	-2.99	-3.49
	Thr196	-24.48	-24.93	-25.04	-24.94
Adenine Ribose	Gly14	2.62	6.28	6.74	6.42
	Ile15	-1.36	-1.32	-1.32	-1.37
	Ile16	3.17	3.92	2.92	2.96
	Ser20	-0.09	-0.03	-0.02	-0.04
	Phe41	0.10	0.27	3.00	0.65
	Val65	0.04	0.06	0.07	0.06
	Ser94	-0.15	0.17	-0.10	0.07
	Ile95	-2.08	-1.55	-1.88	-1.64
	Gly96	-1.74	-1.79	-1.36	-1.70
	Phe97	-0.50	-0.36	-0.35	-0.36
	Ile122	0.11	0.12	0.11	0.12
Adenine	Gly14	-0.65	-0.80	-0.71	-0.76
	Gly40	-1.36	-0.20	-0.13	-0.18
	Phe41	-2.03	-2.48	-2.35	-2.45
	Leu63	0.18	1.32	1.51	1.67
	Asp64	-9.11	-8.43	-7.54	-8.80
	Val65	-2.67	4.18	14.11	5.76
	Gln66	0.85	1.31	1.66	1.45
	Ile95	-0.95	0.45	0.90	0.15
	Gly96	-1.31	-1.18	-0.88	-1.08
	Phe97	-0.03	0.05	0.04	0.05
	Ile122	-0.94	-0.30	-0.93	-0.70

2.8. Interaction energy of the weakly active compounds in the InhA binding pocket

The docked structure of compound **33**, the least active compound, was taken to calculate the interaction energies and then these calculated interaction energies were compared with the interaction energy of the INH-NAD adduct, the most active compound. The interaction energy of this compound is given in Table 3. Compound **33** possesses a piperidyl ring in the R substituent position. The interactions of the piperidyl ring substituent with Phe149, Tyr158, Ala191, Pro193 and Trp222 show high repulsion energies (18.01–23.68 kcal/mol). These high repulsion energies relate to the steric effect of the R substituent, as found from the docking results. As in the docking results, the steric effect changes the position of the NAD part of compound **33** leading to an alteration of the hydrogen bond patterns of this compound. Supporting the molecular docking results, the attraction energy of the important hydrogen bonds between pyrophosphate and Ser20 are decreased about 20 kcal/mol as compared with the INH-NAD adduct.

Moreover, the attraction energy of pyrophosphate with Ile16 is also reduced by about 5 kcal/mol. In addition of the reduction of the main attraction energy, a repulsion energy of 14.11 kcal/mol between the adenine ring and Val65 is additionally detected. Therefore, based on the calculated interaction energy, the high repulsion energy between the R substituent and surrounding amino acid could account for the lowest activity of compound **33**.

Compound **35** shows inhibitory activity like compound **33** with log (1/MIC) of 3.22. The binding mode of this compound is similar to that of the INH-NAD adduct, as described in the previous discussion of the docking results. To elucidate the important binding interactions of this compound, the interaction energy of compound **35** was calculated as given in Table 3. The piperidyl R substituent of compound **35** exhibits slightly attractive interactions with Tyr158 and Trp222. Repulsive interactions of the piperidyl ring with Phe149, Ala191, Gly192 and Pro193 could be observed with repulsion energy of less than 6.72 kcal/mol. Nevertheless, all interaction energies of other parts of compound **35** are quite comparable with those of INH-NAD. Moreover, the repulsion energy between the nicotinamide and Ile194 is decreased about 10 kcal/mol. Based on the calculated interaction energy, the binding affinities of compound **35** and INH in the InhA binding pocket should be similar. Therefore, the lower activity of compound **35** may depend on the activation process that requires the high capacity of substituents for stabilizing the free radical intermediate. In this case, the aromatic pyridyl rings of INH-NAD are more suitable for the activation process than the non-aromatic piperidyl ring of compound **35**, supporting the lower inhibitory activity of this compound.

2.9. CoMFA and CoMSIA models

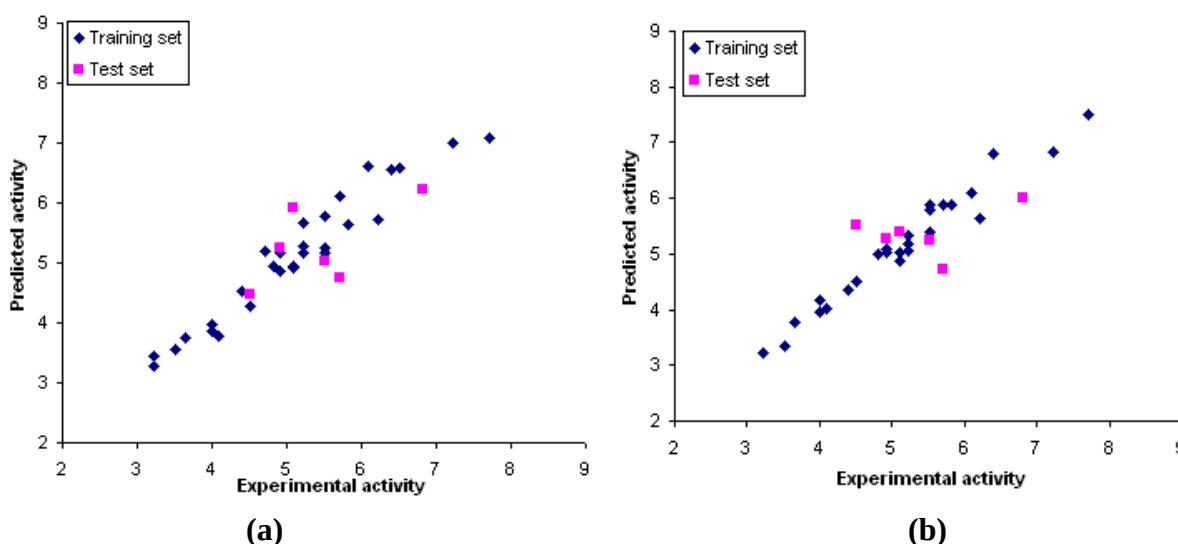
The statistical parameters of the best CoMFA and CoMSIA models generated based on molecular docking alignment are shown in Table 4. The obtained CoMFA and CoMSIA models are consistent with good correlation and predictive capability, the non-cross-validation (r^2) and the cross-validation (r^2_{cv}) of 0.94 and 0.67 for CoMFA model and 0.96 and 0.74 for CoMSIA model. The selection of the best CoMSIA is based on the highest r^2_{cv} . Thus, the best CoMSIA model includes steric and electrostatic fields. Considering all statistical parameters, the best model CoMSIA including steric and electrostatic fields shows slightly more predictive ability than the best CoMFA model.

Table 4. The statistical parameters of the CoMFA and CoMSIA models.

Models	Statistical parameters						Fraction
	r^2_{cv}	r^2	N	s-press	SEE	F	
CoMFA	0.67	0.94	5	0.71	0.31	72.74	91/9 (S/E)
CoMSIA							
S/E	0.74	0.96	6	0.64	0.25	82.78	43/57
S/E/H	0.55	0.87	5	0.86	0.46	28.30	17.4/21.2/61.4
S/E/HD	0.56	0.93	6	0.86	0.35	42.94	27.1/28.6/44.3
S/E/HA	0.62	0.93	6	0.77	0.34	41.26	32.2/38.9/28.9
S/E/HD/HA	0.38	0.95	5	1.14	0.28	86.84	18.2/22.9/39.3/19.6
/E/H/HD/HA	0.32	0.91	5	1.06	0.40	39.84	11.1/13.4/40.5/26.3/8.7

Bold values indicate the best CoMSIA model. r^2_{cv} , leave-one-out (LOO) cross-validated correlation coefficient; r^2 , non-cross-validated correlation coefficient; N, optimum number of components; s-press, Standard error of prediction, SEE, standard error of estimate; F, F-test value; S, steric field; E, electrostatic field; H, hydrophobic; HD, hydrogen donor field and HA, hydrogen acceptor field.

The correlations between experimental and predicted activities are shown in Figure 5. These results exhibit a good agreement between the experimental and predicted values. In order to verify the predictive ability of the obtained models, the biological activities of the test set were predicted by these CoMFA and CoMSIA models. All compounds show predicted values within one logarithmic unit difference from the experimental values. These results show that CoMFA and CoMSIA models provide good accuracy for predicting the inhibitory activity.

Figure 5. Plots between the experimental and predicted activities of training and test sets from CoMFA model (a) and CoMSIA model (b).

2.10. CoMFA and CoMSIA contour analysis of INH derivative adducts

The CoMFA and CoMSIA models reveal the importance of steric and electrostatic fields through the contour maps shown in Figures 6-7. Favorable and unfavorable steric interactions are displayed in green and yellow contours, respectively, while blue and red contours illustrate the regions that favor

the positive and negative charge, respectively. The CoMSIA steric and electrostatic contours appear more localized and detailed than those of the CoMFA model because they are closer to ligand.

Figure 6. CoMFA contour maps for steric and electrostatic fields.

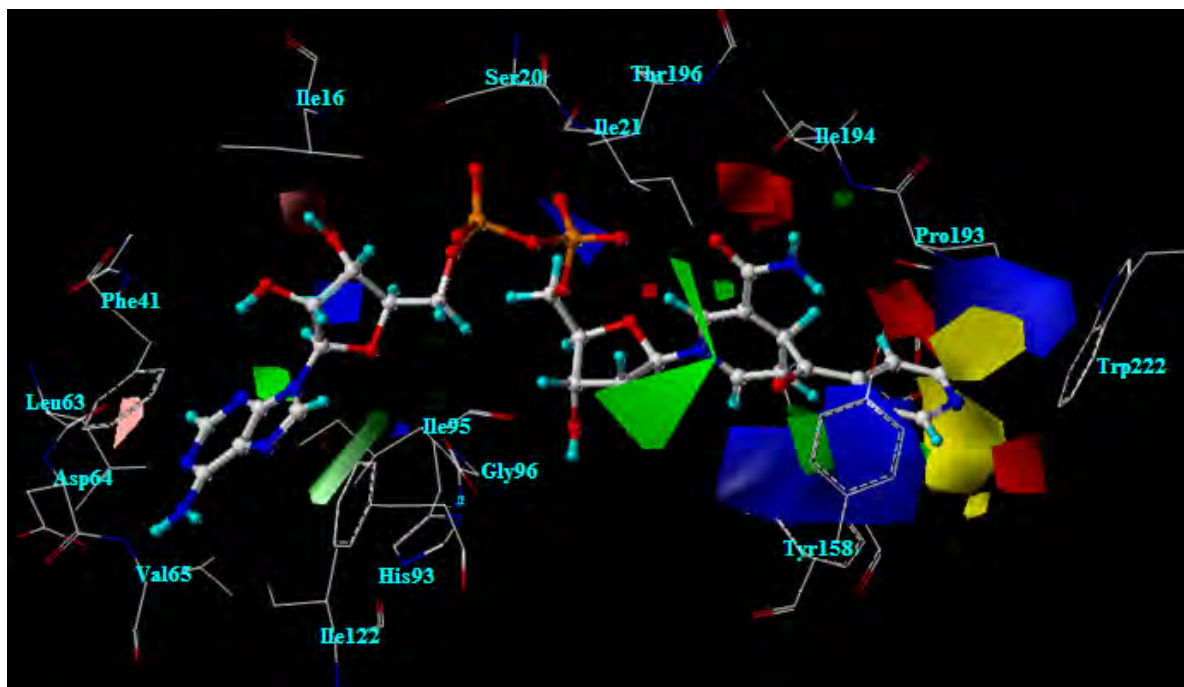
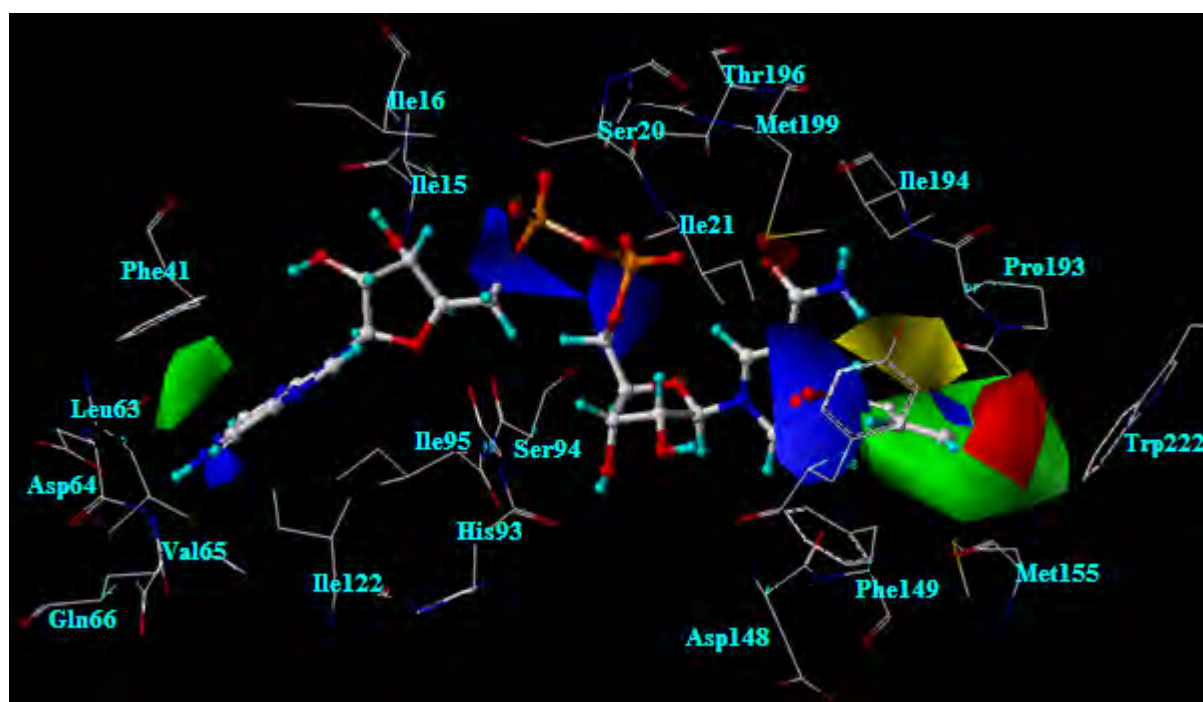


Figure 7. The best CoMSIA contour maps for steric and electrostatic fields.



2.11. The steric contour analysis of INH derivative adducts

The CoMFA steric field reveals two yellow contours and one large green contour near the R substituent, as shown in Figure 6. Meanwhile, the CoMSIA steric field reveals one yellow contour above the plane of the R substituent. The R substituent is buried in the large green contour, as presented in Figure 7. However, steric contours from two models agree that a large plane of the R substituent is preferable in producing higher activity against strains of *M. tuberculosis*. Nevertheless, the R substituent size is limited by the neighboring steric region. As the X-ray structure of the INH-NAD adduct bound in InhA, three amino acid residues, Ala191, Gly192 and Trp222 are located near the steric region. Therefore, any larger R substituent may collide with these residues. From molecular docking calculations, the moderately active compounds and weakly active compounds display steric effects with Trp222.

Compounds **1**, **3**, **6**, **13** and **16** that contain a five member ring substituent show lower activity than INH bearing the 4-pyridyl ring. The five member ring of compound **1** is completely buried in the large green contour but is not present any atom in the steric region represented by a yellow contour. As compared with the 4-pyridyl plane of INH, the plane of the five member ring is rather small. The results suggest that the plane size of the five member ring substituent does not generate any steric effect and it is not large enough for improving the inhibitory activity. Compounds **9**, **18**, **23**, **25**, **28**, **31** and **32** possess the large plane of bicyclic rings at the R substituent position. Although the bicyclic rings of these compounds are favorable for a green contour, the activities of these compounds are not better as compared with INH. From molecular docking calculations, these substituents are too large, which leads to generation of a steric effect with Trp222. As a result of the steric hindrance, the hydrogen bond interactions of the pyrophosphate parts of these compounds with Thr196 are eliminated. Compounds bearing the piperidine ring, **33–35**, show the lowest activity. The piperidine ring of these compounds is bulkier than the 4-pyridyl ring of INH. The piperidine ring of compound **34** lies in the yellow contour, resulting in unfavorable active compound against strains of *M. tuberculosis*. These results indicate that steric effect is an additional cause of the lower activity of these compounds.

2.12. The electrostatic contour analysis of INH derivative adducts

The CoMFA contours of the electrostatic field are shown in Figure 6. Blue and red contours are located near the R substituent, the 4-pyridyl ring of the INH-NAD adduct. Two large blue contours are present outside the plane of the 4-pyridyl ring. Red contours lie above the 4-pyridyl plane and another red contour lies opposite the nitrogen atom at the 4-pyridyl ring of the INH-NAD adduct (N4). In the case of the CoMSIA contour, the electrostatic field contours are closer to the ligand than in the CoMFA contour, as shown in Figure 7. A large red contour covers N4 in the 4-pyridyl ring of the INH-NAD adduct. Two blue contours are present outside the plane of the 4-pyridyl ring. Therefore, to improve the activity of adduct inhibitors based on CoMFA and CoMSIA models, the N4 position should contain the electronegative group and both sides of the R substituent plane should contain electropositive groups. Hydrogen atoms at the 4-pyridyl ring of INH-NAD adduct lie near both blue contours as shown in Figure 7. One of these hydrogen atoms is replaced by a fluorine atom in compound **4**. The results show that the fluorine atom does not enhance the inhibitory activity of this

compound because this atom is close to the unfavorable blue contour. In accordance with the CoMFA and CoMSIA models for improving the inhibitory activity, hydrogen atoms on both sides of the 4-pyridyl ring should be substituted by more electropositive groups. The phenyl ring of compound **5** is like the 4-pyridyl ring of INH except for the fact the nitrogen atom (N4) of the 4-pyridyl ring is replaced by the carbon atom of a phenyl ring (C4). The alignment of compound **5** and the INH-NAD adduct obtained from molecular docking calculations reveals that the N4 of the pyridyl ring lies in the same position as C4 of the phenyl ring. The hydrogen atom attached to the C4 of the phenyl ring of compound **5** is placed in the red contour. Regarding inhibitory activity, compound **5** shows lower inhibitory activity than INH. These results imply that the hydrogen atom attached to the C4 of the phenyl ring is not favourable. Compounds **11**, **14**, **20** and **22** contain R substituents like compound **5**. The C4 of the phenyl ring of these compounds attaches to Cl, I, Br and NO₂ that are more electronegative than the hydrogen atom in compound **5**. Although these groups are favorable for a red contour, the activities of these compounds are not increased as compared with compound **5**. From molecular docking calculations, these compounds lose the important hydrogen bonds of the pyrophosphate moiety because of the steric effect of Cl, I, Br and NO₂ with Trp222. These results imply that the nitrogen atom on the 4-pyridyl ring is optimal for both the steric and electrostatic fields.

2.13. The structural requirement of the R substituent of INH derivative adducts

To enhance the activity of INH derivative adducts, the R substituents should contain a large plane. Both sides of the plane should present electropositive groups. However, size of the R substituents is controlled by the steric region above the substituent plane. Accordingly, the steric and electrostatic fields of the 4-pyridyl ring are optimal for greater potency of compounds. The improvement of electrostatic properties on the 4-pyridyl ring by replacement of the hydrogen atom on both sides of the 4-pyridyl ring with more electropositive groups should be done carefully because a steric effect can also be generated.

3. Experimental

3.1. Biological activity data

Isoniazid and its 35 derivatives, a total of 36 compounds, with the general formula RC(O)NHNH₂ were chosen from the original reference [39]. The inhibitory activities of INH and its derivatives tested against the BCG strain of *M. tuberculosis* were reported in Table 1. Because the structure-activity relationship of these compounds was investigated in this study, the inhibition activities have been expressed in terms of log (1/MIC). Isoniazid derivatives are separated into two groups; 30 compounds served as the training set and six compounds served as the test set, sampling from structurally diverse molecules possessing various ranges of logarithm unit activities.

3.2. Geometry optimization

In the present study, the chemical structures of INH derivatives are presented in the form of INH derivative adducts, the active forms of these inhibitors. The X-ray crystal structure of the INH-NAD adduct in the InhA enzyme (pdb code 2ZID) was used as the initial geometry to build of the active

adducts of the INH derivatives. All chemical structures of adducts were drawn with the Gaussview 3.07 program [40]. The NAD part of all adducts was fixed. Only the variable R substituents of adducts were fully optimized using HF/3-21G method.

3.3. Molecular docking calculations

The X-ray crystal structure of the INH-NAD adduct complexed to InhA (pdb code 2ZID) was used for molecular docking calculations. Docking calculations were carried out by the Autodock 3.05 program using the Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) [41]. The INH-NAD adduct was extracted from the complex structure and all hydrogen atoms were added. Only polar hydrogen atoms and Kollman charges were added to the protein using the AutoDockTools. Solvation parameters were generated on the protein using the Addsol utility of Autodock. The grid maps representing the protein in the actual docking process were calculated with Autogrid. The dimensions of the grids were $60 \times 60 \times 60$ points with a spacing of 0.375 Å between the grid points and the center close to the ligand. Docking parameters were used as default values, except for the number of docking runs which was set to 50. The INH-NAD adduct was docked back into the InhA binding pocket to validate the docking method, then all derivative adducts were docked. During the docking process, the InhA enzyme and the NAD part of all adducts were kept rigid. Only the variable R substituents were allowed to freely rotate. The resulting docked conformations were those found to have the lowest final docked energy and the greatest number of members in the cluster, with a root mean square deviation (RMSD) cluster tolerance of 0.5 Å.

3.4. Interaction energy calculations

To elucidate the important interactions of INH derivative adducts in the InhA binding pocket, individual interaction energies between adducts and the surrounding amino acids were computed. The X-ray structure of the INH-NAD adduct, docked conformations of the highly active adduct (compound **1**) and the lowest active adducts (compounds **33** and **35**) were selected to calculate their interaction energies. The whole structure of the INH-NAD adduct and its derivatives was fragmented into small parts consisting of the R substituent, nicotinamide, nicotinamide ribose, pyrophosphate, adenine and adenine ribose. The ends of each part were terminated by hydrogen atoms. The amino acids located within a radius of 6 Å from each part of adducts were adopted. The peptide chain was divided at the C and N terminal into the individual amino acids. The ends of individual amino acids were capped with hydrogen atoms. The interaction energies of each part with individual amino acids in the InhA binding pocket were determined by using the MP2 method with the 6-31G (d) basis set. The interaction energy (IE) of adducts with each amino acid is defined as follows:

$$IE = E_{\text{adduct} + \text{each amino acid}} - [E_{\text{adduct}} + E_{\text{each amino acid}}]$$

where $E_{\text{adduct} + \text{each amino acid}}$ is the energy of the complex structure between adduct and each amino acid. E_{adduct} and $E_{\text{each amino acid}}$ are the energies of adduct and each amino acid, respectively.

3.5. Training and test sets

The structures and activities of compounds used to set up the CoMFA and CoMSIA models are listed in Table 1. Experimental biological activities of these compounds cover 4.5 logarithmic units in term of log (1/MIC), which provides a broad and homogenous data set for CoMFA and CoMSIA studies. The data set was divided into the training set (n = 30) and the test set (n = 6) for final model development and model validation, respectively. Data classification is based on wide range of activity and structural diversity of adduct in the data set.

3.6. Molecular alignment rules for CoMFA and CoMSIA modeling

The structural alignment of compounds into their bioactive conformations is essential in the set up of CoMFA and CoMSIA models. In the present study, the molecular alignment was derived from the reasonable positions of compounds in the InhA binding pocket obtained from the molecular docking calculations. The CoMFA and CoMSIA descriptor fields around the aligned compounds were generated automatically by Sybyl/CoMFA and CoMSIA routine at each lattice intersection on grid spacing of 2 Å. A sp³ carbon atom with a formal charge of +1 was served as the probe atom to generate CoMFA descriptors, steric (Lennard–Jones 6-12 potential) field and electrostatic (Coulombic potential) field. The probe atom was placed at each lattice point and their steric and electrostatic interactions with each atom in compounds were all calculated with CoMFA standard scaling and then compiled in a CoMFA table. The computed field energies were truncated at 30 kcal/mol for both electrostatic and steric fields. CoMSIA similarity index descriptors were derived with the same lattice box as used for the CoMFA calculations. Five CoMSIA descriptors, steric, electrostatic, hydrophobic, hydrogen bond donor and hydrogen bond acceptor, were evaluated. An attenuation factor of 0.3 was used in the CoMSIA study to generate a contour map with prominent molecular features. The partial least square (PLS) approach was employed to derive a linear relationship, in which CoMFA and CoMSIA descriptors were used as independent variables and log (1/MIC) values were used as dependent variables. To obtain the optimal number of components to be used in the final analysis, the cross-validation was performed using the leave-one-out method with a 2.0 kcal/mol column filter to minimize the influence of the noisy columns. Sequentially, a final non cross-validated analysis was performed using the optimal number of components previously identified and was then employed to analyze the results. The q² or r²_{cv} values were used to evaluate the predictive ability of the CoMFA and CoMSIA models.

4. Conclusions

Molecular docking calculations and interaction energy calculations were performed on a series of INH derivative adducts to achieve a better understanding of the crucial interactions for binding affinity of these adducts in the InhA binding pocket. The obtained results from the two approaches demonstrate that hydrogen bond interactions play an important role on the adduct binding in InhA, especially the hydrogen bonds of pyrophosphate part. To reinforce the adduct binding, the R substituents of adducts should be optimal for its cavity. Too bulky substituents generate steric effects with high repulsion energy. Conversely, too small substituents did not generate the steric effect but the

preferable interactions, π - π and H- π interactions, are missing. To clearly elucidate the structural requirements of adducts that favor binding interactions in the InhA binding pocket, robust CoMFA and CoMSIA models were established. The best CoMFA and CoMSIA models include the steric and electrostatic fields suggesting that the antitubercular activity of these adducts depend on their steric and electrostatic characteristics. CoMFA and CoMSIA steric and electrostatic fields reveal that the R substituents should contain a large plane and both sides of the plane should contain an electropositive group. However, size of R substituents is controlled by the steric region above the substituent plane. Finally, the integrated results from these approaches provide valuable concepts that can be utilized for designing new and more potential effective antitubercular drugs.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program, Thai Doctoral Degree Program of the Office of the Higher Education and The Thailand Research Fund (DBG5180022 and RTA5080005). The authors are grateful to the high performance computing center of the National Electronics and Computer Technology Centre (NECTEC) for the generous supply of computing time and Sybyl 7.2.

References and Notes

1. World Health Organization. *Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing*; WHO: Geneva, Switzerland, 2008.
2. Ducati, R.G.; Ruffino-Netto, A.; Basso, L.A.; Santos, D.S. The resumption of consumption-A review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 697-714.
3. Aoyagi, T. Chemotherapy for tuberculosis; yesterday, today, and tomorrow--basic and clinical studies. *Kekkaku* **1998**, *73*, 459-470.
4. Paramasivan, C.N.; Herbert, D.; Umapathy, K.C.; Rahman, F.; Krishnamurthy, P.V.; Prabhakar, R. Early bactericidal action of pulsed exposure to rifampicin, ethambutol, isoniazid & pyrazinamide in pulmonary tuberculosis patients. *Indian J. Med Res.* **1994**, *100*, 1-4.
5. Dutt, A.K.; Stead, W.W. Tuberculosis chemotherapy today. *Ann. Acad. Med. Singapore* **1985**, *14*, 508-514.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs—worldwide, 2000-2004. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2006**, *55*, 301-305.
7. Bloom, B.R.; Murray, C.J. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science* **1992**, *257*, 1055-1064.
8. Chakaya, J.; Getahun, H.; Granich, R.; Havlir, D. Confronting TB/HIV in the era of increasing anti-TB drug resistance. *J. Int. AIDS Soc.* **2008**, *11*, 6.
9. El-Sadr, W.M.; Tsiouris, S.J. HIV-associated tuberculosis: Diagnostic and treatment challenges. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *29*, 525-531.
10. Nunn, P.; Reid, A.; De Cock, K.M. Tuberculosis and HIV infection: the global setting. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, S5-S14.

11. Morehead, R.S. Delayed death from pulmonary tuberculosis: Unsuspected subtherapeutic drug levels. *S. Med. J.* **2000**, *93*, 507-510.
12. Wheeler, P.R.; Anderson, P.M. Determination of the primary target for isoniazid in mycobacterial mycolic acid biosynthesis with *Mycobacterium aurum* A+. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 451-457.
13. Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K.S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W.R., Jr.; InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1994**, *263*, 227-230.
14. Marrakchi, H.; Lanéelle, G.; QuéMard, A. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology* **2000**, *146*, 289-296.
15. Dessen, A.; Quémard, A.; Blanchard, J.S.; Jacobs, W.R., Jr.; Sacchettini, J.C. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1995**, *267*, 1638-1641.
16. Quémard, A.; Sacchettini, J.C.; Dessen, A.; Vilcheze, C.; Bittman, R.; Jacobs, W.R., Jr.; Blanchard, J.S. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8235-8241.
17. Rozwarski, D.A.; Grant, G.A.; Barton, D.H.; Jacobs, Jr., W.R.; Sacchettini, J.C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1998**, *279*, 98-102.
18. Lei, B.; Wei, C.J.; Tu, S.C. Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of inha inhibitor. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2520-2526.
19. Saint-Joanis, B.; Souchon, H.; Wilming, M.; Johnsson, K.; Alzari, P.M.; Cole, S.T. Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/oxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **1999**, *338*, 753-760.
20. Zhao, X.; Yu., H.; Yu, S.; Wang, F.; Sacchettini, J.C.; Magliozzo, R.S. Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-oxidase (KatG) and its S315T mutant. *Biochemistry* **2006**, *45*, 4131-4140.
21. Johnsson, K.; King, D.S.; Schultz, P.G. Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5009-5010.
22. Metcalfe, C.; Macdonald, I.K.; Murphy, E.J.; Brown, K.A.; Raven, E.L.; Moody, P.C. The tuberculosis prodrug isoniazid bound to activating peroxidases. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6193-6200.
23. Timmins, G.S.; Deretic, V. Mechanisms of action of isoniazid. *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 1220-1227.
24. Nguyen, M.; Claparols, C.; Bernadou, J.; Meunier, B. A fast and efficient metal-mediated oxidation of isoniazid and identification of isoniazid-NAD(H) adducts. *Chem. Bio. Chem.* **2001**, *2*, 877-883.
25. Rawat, R.A.; Whitty, P.J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13881-13886.

26. Dias, M.V.; Vasconcelos, I.B.; Prado, A.M.; Fadel, V.; Basso, L.A.; de Azevedo, W.F., Jr.; Santos, D.S. Crystallographic studies on the binding of isonicotinyl-NAD adduct to wild-type and isoniazid resistant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Struct. Biol.* **2007**, *159*, 369-380.
27. Oliveira, J.S.; Pereira, J.H.; Canduri, F.; Rodrigues, N.C.; de Souza, O.N.; de Azevedo, W.F., Jr.; Basso, L.A.; Santos, D.S. Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wild-type and isoniazid-resistant enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.* **2006**, *359*, 646-666.
28. Rozwarski, D.A.; Vilchèze, C.; Sugantino, M.; Bittman, R.; Sacchettini, J.C. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 15582-15589.
29. The Global Alliance for TB Drug Development (TB Alliance). Handbook of Anti-Tuberculosis Agents. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 112-116.
30. Barry, C.E.; Slayden, R.A., 3rd; Mdluli, K. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Resist. Updat.* **1998**, *1*, 128-134.
31. Larsen, M.H.; Vilchèze, C.; Kremer, L.; Besra, G.S.; Parsons, L.; Salfinger, M.; Heifets, L.; Hazbon, M.H.; Alland, D.; Sacchettini, J.C.; Jacobs, W.R., Jr. Overexpression of inhA, but not kasA, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **2002**, *46*, 453-466.
32. Wahab, H.A.; Choong, Y.S.; Ibrahim, P.; Sadikun, A.; Scior, T. Elucidating isoniazid resistance using molecular modeling. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 97-107.
33. Pasqualoto, K.F.; Ferreira, E.I.; Santos-Filho, O.A.; Hopfinger, A.J. Rational design of new antituberculosis agents: Receptor-independent four-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of a set of isoniazid derivatives. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3755-3764.
34. Bagchi, M.C.; Maity, B.C.; Bose, S. QSAR of anti tuberculosis drugs of INH type using graphical invariants. *J. Mol. Struct. Theochem.* **2004**, *679*, 179-186.
35. Andrade, C.H.; Salum Lde, B.; Castilho, M.S.; Pasqualoto, K.F.; Ferreira, E.I.; Andricopulo, A.D. Fragment-based and classical quantitative structure-activity relationships for a series of hydrazides as antituberculosis agents. *Mol. Divers.* **2008**, *12*, 47-59.
36. Ventura, C.; Martins, F. Application of quantitative structure-activity relationships to the modeling of antitubercular compounds. 1. The hydrazide family. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 612-624.
37. Cramer, III, R.D.; Patterson, D.E.; Bunce, J.D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959-5967.
38. Klebe, G.; Abraham, U.; Mietzner, T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4130-4146.
39. Klopman, G.; Fercu, D.; Jacob, J. Computer-aided study of the relationship between structure and antituberculosis activity of a series of isoniazid derivatives. *Chem. Phys.* **1996**, *204*, 181-193.
40. *GaussView 03*, Revision 3.07; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2006.

41. Morris, G.M.; Goodshell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2010 by the authors; licensee Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).