รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ นวัตกรรมการค้นหาสารต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพสูงด้วยการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณ

โดย

รศ.ดร.พรพรรณ พึ่งโพธิ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ
มิถุนายน 2562

สัญญาเลขที่ RSA59800057

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ นวัตกรรมการค้นหาสารต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพสูงด้วยการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณ

รศ.ดร.พรพรรณ พึ่งโพธิ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA59800057

ชื่อโครงการ : นวัตกรรมการค้นหาสารต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพสูงด้วยการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณ

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : รศ.ดร.พรพรรณ พึ่งโพธิ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

E-mail address: pornpan_ubu@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 16 มิถุนายน 2559-15 มิถุนายน 2562

วัณโรคยังเป็นปัญหาหลักทางด้านสุขภาพที่เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของประชากรโลก เนื่องจากมีการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนเพื่อพัฒนาวิธีการรักษาแบบใหม่ในการรักษาโรควัณโรค เอนไซม์ Enoyl-acyl reductase (InhA) ทำหน้าที่เป็นเป้าหมายที่น่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับการพัฒนายารักษาโรควัณโรค ในการศึกษาครั้งนี้วิธีการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณโดยอาศัยการออกแบบโมเลกุลเชิงโครงสร้าง โดยการใช้พื้นฐานทางโครงสร้างและการคัดสรรเสมือนจริง รวมทั้งการทดสอบ whole cell assay ของไมโครแบคทีเรียม ทูเบอคูโลซิส ถูกใช้เพื่อค้นหาสารยับยั้ง InhA ซึ่งเป็นสารยับยั้งโรควัณโรคตัวใหม่และมีประสิทธิภาพสูงขึ้น สารยับยั้งตัวใหม่ที่ได้ถูกศึกษาด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งและการศึกษาพลวัติเชิงโมเลกุล เพื่อให้ได้แนวคิดเชิงโครงสร้างสำหรับการปรับเปลี่ยนสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ จากนั้นได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์สารที่มีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาความต้องการทางโครงสร้างต่อการเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งโดยใช้ระเบียบวิธี 3D-QSAR CoMSIA เพื่อศึกษาการวางตัวและอันตรกิริยาที่สำคัญในโพรงการจับ โดยใช้การจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลและการคำนวณค่าพลังงานอิสระในการจับ ข้อมูลที่ได้ถูกใช้เป็นแนวทางสำคัญในการออกแบบโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง สูงกว่าสารต้นแบบจำนวน 16 ตัว จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อวัณโรคก่อโรคพบว่าสารตัวใหม่ 2 โครงสร้างมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีเทียบเท่ากับสารยับยั้งเอนไซม์ InhA มาตรฐานไตรโคซาน โดยนำเอาสารที่ยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อวัณโรคได้ดีที่สุดมาศึกษาโครงสร้างผลึกเพื่อศึกษาการวางตัวและอันตรกิริยาที่สำคัญ โดยทำการออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่ สังเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ โดยผลจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารที่ออกแบบใหม่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อวัณโรคได้ดีกว่าสารต้นแบบ การค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่เพื่อเป็นสารต้านวัณโรคพบว่าได้โครงสร้างตัวใหม่ทั้งหมด 53 โครงสร้างที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการเป็นยาและได้เลือกโครงสร้างมาวิเคราะห์ลักษณะการวางตัวของสารตัวใหม่ที่ได้จากคัดสรรเสมือนจริงและมีค่าพลังงานอิสระในการจับมากที่สุด พบอันตรกิริยาที่สำคัญคือเกิดพันธะไฮโดรเจน 2 ตำแหน่งระหว่างโครงสร้างของ 4-[(1,1-Dioxo-2,3-dihydro-1-benzothiophen-6-yl) amino]-2-(pyrrolidin-3-ylamino)-6H-pyrido[4,3-*d*] pyrimidin-5-one กับกรดอะมิโน Glu233 และ Val235 นอกจากนี้ยังเกิดพันธะไฮโดนเจนระหว่างวง pyrrolidine (NH) กับกรดอะมิโน Glu280 และ Asn281 อะตอมออกซิเจนของหมู่ sulfone เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ NH ของกรดอะมิโน Ser239 อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไฟระหว่างกรดอะมิโน Val179 กับวง pyrido[4,3-d]pyrimidin-5(6*H*)-one และมีอันตรกิริยาชนิด

ไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นกับโพรงการจับของเอนไซม์ PknG การค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknB ได้ศึกษาอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid และ quinazoline และใช้ระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้างในการค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ตัวใหม่ และทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งต่อเซลล์ (MIC) ซึ่งได้สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคจำนวน 2 โครงสร้าง สารที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ที่สูงจะถูกนำมาใช้เป็นแนวทางสำคัญในการออกแบบโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ตัวใหม่ พบว่าได้สารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารต้นแบบ จำนวน 10 โครงสร้าง ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการพัฒนาให้ได้สารต้นแบบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้นและมีศักยภาพสูงในการพัฒนาต่อเป็นยาใหม่สำหรับการรักษาโรควัณโรคต่อไป

คำหลัก: โรควัณโรค สารยับยั้งเอนไซม์ InhA สารยับยั้งเอนไซม์ PknG สารยับยั้งเอนไซม์ PknB การออกแบบโมเลกุลเพื่อการคำนวณ การคัดสรรเสมือนจริง

Abstract

Project Code : RSA59800057

Project Title: Innovative discovery of highly effective anti-tuberculosis agents: Molecular modeling and computer aided molecular design

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

E-mail address : pornpan_ubu@yahoo.com

Project Period: 16 June 2016- 15 June 2019

Tuberculosis is still a major health problem that is the main cause of death of the world population due to the ongoing epidemic of drug-resistant tuberculosis. Therefore, there is an urgent need to develop new treatment methods for the treatment of tuberculosis. Enoyl-acyl reductase (InhA) enzymes serve as an interesting target for the development of tuberculosis. In this study, computer aided molecular design methods were performed using structure-based drug design virtual screening and the testing of the whole cell assay was used to find highly and more potent InhA inhibitors. The molecular modeling approaches were applied to obtain a structural concept for changing the new InhA inhibitors. In addition, structural requirements have been conducted to improving biological activity of inhibitors using the 3D-QSAR CoMSIA method. To study the binding mode and important interactions in the binding pocket molecular dynamics simulation and free energy calculation were studied. The obtained has been used as an important guideline for the design of new InhA inhibitor. Novel sixteen inhibitors show more effective than known inhibitor. Based on InhA and mycobacterial assays, two compounds were found as novel inhibitors comparable to the reference drug, triclosan. Most effective compound on InhA enzyme and bacterial was subject to investigate the binding mode and binding interaction by X-ray crystallography technique. In addition, novel derivative of InhA inhibitors was designed, synthesized, characterized and biological evaluated. The obtained results showed that new designed compounds were effective than lead compounds. Virtual screenings of protein serine threonine kinase G (PknG) inhibitors as anti-tuberculosis agents were investigated. Fifty-three leads are suitable for drug and have chosen a structure to analyze the binding modes and binding interactions. The result indicating that two hydrogen bond interactions were found between the structure of 4 - [(1,1-dioxo-2,3-dihydro-1-benzothiophen-6-yl) amino] -2- (pyrrolidin-3-ylamino) -6*H*-pyrido [4,3-*d*] pyrimidin-5 -one with Glu233 and Val235 residues. In addition, the pyrrolidine (NH) formed hydrogen bond interaction with Glu280 and Asn281 residues. The oxygen atoms of the sulfone group formed hydrogen bonds interaction with NH of Ser239. Sigma-pi interaction between

Val179 and pyrido band [4,3-*d*] pyrimidin-5 (6*H*) -one was found. Moreover, the hydrophobic interaction in the binding pocket of PknG was found. Structure based drug design of 4-oxocrotonic acid and quinazoline derivatives as PknB inhibitors were evaluated to understanding the structural basis for design new and more potent PknB inhibitors. Structure based virtual screening of PknB inhibitors were performed. The discovery of protein serine threonine kinase B (PknB) inhibitors was investigated. The whole cell assay (MIC), which has 2 active compounds inhibiting tuberculosis. The obtained result was used as an important guideline for the structural design of the new PknB inhibitor. Ten compounds show more effective than the known compound. The integrated results provided the fruitful information for developing novel and highly potent for anti-tuberculosis agents.

KEYWORDS: Tuberculosis, InhA inhibitors, PknG inhibitors, PknB inhibitors, computer aided molecular design and virtual screening

Executive summary

วัณโรคยังเป็นปัญหาหลักทางด้านสุขภาพที่เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของประชากรโลก เนื่องจากมีการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนเพื่อพัฒนาวิธีการรักษาแบบใหม่ในการรักษาโรควัณโรค เอนไซม์ Enoyl-acyl reductase (InhA) ทำหน้าที่เป็นเป้าหมายที่น่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับการพัฒนายารักษาโรควัณโรค ในการศึกษาในครั้งนี้วิธีการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณโดยอาศัยการออกแบบโมเลกุลเชิงโครงสร้าง โดยการใช้พื้นฐานทางโครงสร้างและการคัดสรรเสมือนจริง รวมทั้งการทดสอบ whole cell assay ของไมโครแบคทีเรียม ทูเบอคูโลซิส ถูกใช้เพื่อค้นหาสารยับยั้ง InhA ซึ่งเป็นสารยับยั้งโรควัณโรคตัวใหม่และมีประสิทธิภาพสูงขึ้น สารยับยั้งตัวใหม่ที่ได้ถูกศึกษาด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งและการศึกษาสมบัติเชิงพลวัติโมเลกุล เพื่อให้ได้แนวคิดเชิงโครงสร้างสำหรับการปรับเปลี่ยนสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ จากนั้นได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์สารที่มีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาความต้องการทางโครงสร้างต่อการเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งโดยใช้ระเบียบวิธี 3D-QSAR CoMSIA เพื่อศึกษาการวางตัวและอันตรกิริยาที่สำคัญในโพรงการจับ โดยใช้การจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลและการคำนวณค่าพลังงานอิสระในการจับ ข้อมูลที่ได้ถูกใช้เป็นแนวทางสำคัญในการออกแบบโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งสูงกว่าสารต้นแบบจำนวน 16 ตัว จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อวัณโรคก่อโรคพบว่าสารตังใหม่ 2 โครงสร้างมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีเทียบกับสารยับยั้งเอนไซม์ InhA มาตรฐานไตรโคซาน โดยนำเอาสารที่ยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อวัณโรคได้ดีที่สุดมาศึกษาโครงสร้างผลึกเพื่อศึกษาการวางตัวและอันตรกิริยาที่สำคัญ โดยทำการออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่ สังเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณะ โดยผลจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารที่ออกแบบใหม่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อวัณโรคได้ดีกว่าสารต้นแบบ การค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่เพื่อเป็นสารต้านวัณโรคพบว่าได้โครงสร้างตัวใหม่ทั้งหมด 53 โครงสร้างที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการเป็นยาและได้เลือกโครงสร้างมาวิเคราะห์ลักษณะการวางตัวของสารตัวใหม่ที่ได้จาการคัดสรรเสมือนจริงและมีค่าพลังงานอิสระมากที่สุด พบอันตรกิริยาที่สำคัญเกิดพันธะไฮโดรเจน 2 ตำแหน่งระหว่างโครงสร้างของ 4-[(1,1-Dioxo-2, 3-dihydro-1-bebzothiophan-6-yl) amino]-2-(pyrrolidin)-3-ylamino)-6*H*-pyrido[4, 3-d] pyrimidin-one กับกรดอมิโน Glu33 และ Val235 นอกจากนี้ยังเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง pyrrolidine (NH) กับกรดอมิโน Glu280 และ Asn281 อะตอมของออกซิเจนหมู่ sulfone เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ NH ของกรดอมิโน Ser239 อันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพระหว่างกรดอมิโน Val179 กับวง pyrido[4, 3-d] pyrimidin-one และมีอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟรบิกที่เกิดขึ้นกับโพรงการจับเอนไซม์ PknG การค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ได้ศึกษาอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-ocxocrotonic acid และ quinazoline ละใชระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้างในการค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ตัวใหม่ และทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งต่อเซลล์ (MIC) และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ PknB ซึ่งได้จากที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคเอนไซม์ PknB จำนวน 2 โครงสร้าง สารที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์และเอนไซม์ PknB ที่สูงและถูกนำมาใช้เป็นสารต้นแบบ (lead compound) และเป็นแนวทางสำคัญในการออกแบบโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ตัวใหม่ พบว่าได้สารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารต้นแบบ จำนวน 10 โครงสร้าง ซึ่งนับเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการพัฒนาให้ได้สาร

ต้นแบบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้นและมีศักยภาพสูงในการพัฒนาต่อเป็นยาใหม่สำหรับการรักษาโรควัณโรคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สามารถดำเนินการได้ด้วยดีโดยความเอื้อเฟื้อและช่วยเหลือจากหน่วยงานต่างๆ และผู้ร่วมงานหลายท่าน คณะวิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2559 (RSA5980057) ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยนี้ ขอขอบคุณ ผศ.ดร. พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผศ.ดร. อรดี พันธ์กว้าง และดร.พฤทธิ์ คำศรี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม ผศ.ดร. นิธิมา สุทธิพันธุ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ดร. กัมปนาท ฉายจรัส คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ดร. จักริ์รดา อัตตรัถยา และ ดร. ชมภูนุช ส่งสิริฤทธิกุล สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) Professor Dr. Weiliang Zhu สถาบันมาเตเรียเมดิกา แห่งเซี่ยงไฮ้ (Shanghai Institute of Materia Medica) สาธารณรัฐประชาชนจีน Prof. Adrian J Moholland และ Dr. James Spencer จาก University of Bristol สหราชอาณาจักร ที่ได้ให้การสนับสนุนความร่วมมือทางวิชาการและการวิจัยอย่างดียิ่งตลอดโครงการ

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยคือ น.ส.ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์ นายนฤดล ภูศรี นายบัณฑิต คำศรี น.ส.บงกชวรรณ คำพาวงค์ น.ส.ภาพตะวัน ทองดี น.ส.อิสราภรณ์ เสียงล้ำ และน.ส. ฑิมพิกา พรพรม ได้ทุ่มเททำงานในโครงการอย่างเต็มกำลังและความสามารถจนทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้การสนับสนุนในด้านห้องปฏิบัติการเคมี และห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการคอมพิวเตอร์สมรรถนะสูง สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (HPCC/NECTEC) ที่ได้เอื้อเฟื้อการคำนวณโดยโปรแกรม Sybyl และคำนวณบนเครื่องคลัสเตอร์คอมพิวเตอร์ สถาบันมาเตเรีย เมดิกา แห่งเซี่ยงไฮ้ สำหรับโปรแกรม Glide ในการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง เพื่อการศึกษาการคัดสรรเสมือนจริงและคลัสเตอร์คอมพิวเตอร์ University of Bristol สหราชอาณาจักร สำหรับเครื่องคอมพิวเตอร์ในการคำนวณจลนพลศาสตร์เชิงโมเลกุล

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
ระเบียบและวิธีวิจัย	7
ผลการศึกษา	26
สรุปผลและวิจารณ์	329
เอกสารอ้างอิง	331
ผลงานวิจัย	334
ภาคผนวก	341

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของหัวข้อการวิจัย

ปัจจุบันนี้วัณโรคยังคงเป็นโรคติดเชื้อในมนุษย์ที่เป็นสาเหตุหลักของการตายของประชากรโลกมากกว่าโรคติดเชื้อเดี่ยวอื่นๆ ทั้งยังมีการแพร่ระบาดของโรควัณโรคในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีอย่างรวดเร็ว ตลอดจนมีปัญหาวัณโรคดื้อยาหลายขนานและดื้อยารุนแรงเพิ่มมากขึ้น ทำให้ผู้ป่วยวัณโรคไม่ตอบสนองต่อยาหลักหลายรายการที่ใช้รักษาอยู่ ซึ่งเป็นปัญหาหลักทางด้านสุขภาพที่สำคัญต่อประชากรทั่วโลกโดยเฉพาะโดยเฉพาะในประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรคชุกชุมสูงเป็นอันดับที่ 18 ของโลก ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางในการพัฒนายาใหม่ที่ใช้ในการรักษาโรควัณโรคจึงมีความจำเป็นที่ต้องทำอย่างต่อเนื่อง วัณโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) การรักษาโรควัณโรคแบ่งได้ตามเป้าหมายและกลไกการออกฤทธิ์ของยา กระบวนการการสังเคราะห์ทางชีวภาพของกรดไขมัน (Fatty acidbiosynthesis) ของเชื้อ *M. tuberculosis* เป็นเป้าหมายสำคัญในยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนี้ จึงทำให้มีการค้นคว้าและพัฒนายาที่ใช้ในการยับยั้งกระบวนการนี้อย่างกว้างขวาง ไอโซไนอาซิด (isoniazid หรือ INH) เป็นยาหลักในการรักษาวัณโรคมานานกว่า 50 ปี ไอโซไนอาซิดทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ของกรดไมโคลิก (biosynthesis of mycolic acids) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ข้อดีของยาในกลุ่มนี้คือมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดี มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำและราคาถูก อย่างไรก็ตามการใช้ยาในการรักษา โรควัณโรคยังมีปัญหาเนื่องจากเกิดการดื้อยาหลายขนานของโรควัณโรค (multi-drug resistant, MDR) และการเกิดร่วมกันระหว่างโรคเอดส์และโรควัณโรค ในปัจจุบันนี้ยังมีปัญหาการดื้อยาที่รุนแรงมากคือ การดื้อยาแบบ extensively drug resistant (XRD) จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเอนไซม์เป้าหมายของไอโซไนอาซิด คือ *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase (InhA) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา *beta*-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-specific reduction ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการขยายสายโซ่ของกรดไขมันใน FAS II pathway ในกระบวนการสังเคราะห์ของกรดไขมัน โดยในขั้นตอนแรกไอโซไนอาซิดต้องถูกกระตุ้นให้อยู่ในรูปอนุมูลอิสระโดยใช้เอนไซม์ *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) หลังจากนั้นอนุมูลอิสระของไอโซไนอาซิดที่เกิดขึ้นนี้จะเข้าไปจับกับ NADH เกิดเป็นสารประกอบของไอโซไนอาซิดกับ NADH (INH-NAD adduct) สารประกอบ INH-NAD ที่เกิดขึ้นทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ InhA แต่ปัญหาสำคัญของการใช้ยาชนิดนี้คือเกิดการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ KatG ซึ่งนำไปสู่ปัญหาการดื้อยาต่อไอโซไนอาซิด เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ KatG จึงมีการพัฒนาสารยับยั้งกลุ่มใหม่ให้มีกลไกที่แตกต่างจาก ไอโซไนอาซิด ซึ่งสารกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยตรง (direct inhibitor) โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการกระตุ้นของเอนไซม์ KatG ดังนั้นจึงมีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยตรงและสารในกลุ่มนี้แสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งสูง สำหรับกลุ่มสารยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยตรงพบว่ามีการศึกษาโครงสร้างผลึกของสารยับยั้งที่จับกับเอนไซม์ทั้งชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ แต่ข้อมูลในรายละเอียดของกลไกการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งกลุ่มนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้เช่นกัน ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องการหาคำตอบ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีกระบวนการศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้

ข้อมูลเชิงลึกเพิ่มเติมและเพื่อเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยตรง ดังกล่าว รวมถึงศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ที่มีต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการพัฒนาเพื่อหายาตัวใหม่ที่มี กัมมันตภาพสูงในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์เพื่อแก้ปัญหาการดื้อยาของโรควัณโรค

เอนไซม์ PknB และ PknG คือเอนไซม์ไคเนสในกลุ่มของเอนไซม์ serine-threonine protein kinases (STPKs) ทั้งหมด 11 ชนิด ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในเชื้อไมโครแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส โดย PknB และมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคและการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรคและ PknG มีความสำคัญต่อกระบวนการติดต่อของเชื้อวัณโรคกับโฮสต์ นอกจากนี้แล้ว เอนไซม์ทั้งสองยังทำงานร่วมกันในกระบวนการที่สำคัญอื่นๆของเชื้อวัณโรคและเป็นกลุ่งของเอนไซม์ไคเนสที่มีความจำเพาะพบได้เฉพาะในแบบคทีเรีย ด้วยเหตุนี้เอนไซม์ PknB และ PknG จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญตัวใหม่ในการรักษาวัณโรค ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาสารยับยั้ง InhA, PknB และ PknG ตัวใหม่ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ในการศึกษาสมบัติทางโครงสร้างสามมิติ สมบัติพลวัต พลังงานอันตรกิริยาพลังงานเสถียร และสมบัติต่างๆในระดับโมเลกุลของสารยับยั้ง InhA, PknB และ PknG และศึกษาอันตรกิริยาที่มีความสำคัญต่อการยับยั้งเอนไซม์ InhA, PknB และ PknG ด้วยระเบียบวิธีการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณ บนพื้นฐานของการคำนวณเคมีควอนตัม และการจำลองแบบ โดยจะทำการศึกษาทางด้าน Structure-based drug design และ ligand-based drug design โดยใช้ระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งร่วมกับการศึกษาพลศาสตร์เชิงโมเลกุล เพื่อหาสมบัติเชิงพลวัติของระบบและนำโครงสร้างที่ได้มาศึกษาพลังงานอันตรกิริยาของระบบ เมื่อนำเอาผลที่ได้จากการศึกษาโดยใช้ระเบียบวิธี การจำลองแบบโมเลกุล มาวิเคราะห์ร่วมกันจะได้ข้อมูลทางโครงสร้างที่สำคัญ ทำนายการจับกันของสารยับยั้งและโมเลกุลเป้าหมาย สมบัติพลวัต พลังงานเสถียร และสมบัติต่าง ๆ ในระดับโมเลกุล ซึ่งเป็นพื้นฐานสำคัญต่อความเข้าใจในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์ได้ชัดเจนและสามารถเข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของสารยับยั้ง InhA, PknB และ PknG มากขึ้น เพื่อนำไปสู่การออกแบบสารยับยั้งเอนไซม์ InhA, PknB และ PknG ตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง สำหรับการค้นหาสารตัวใหม่ในการยับยั้งเอนไซม์ InhA, PknB และ PknG โดยใช้ระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริงร่วมกับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและการศึกษาโครงสร้างผลึกเพื่อใช้ในการในการออกแบบ สังเคราะห์สารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อพัฒนาสารยับยั้งโรควัณโรคต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

การจำลองแบบและการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณถูกใช้ในการออกแบบสารยับยั้งโรควัณโรคในกลุ่มของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA PknG และ PknB โดยมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อศึกษาความต้องการทางโครงสร้างต่อการเพิ่มค่ากัมมันตภาพสารต้านวัณโรคในกลุ่มของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA และ PknG โดยใช้ระเบียบวิธี 3D-QSAR CoMSIA

2. เพื่อศึกษาการวางตัวและอันตรกิริยาที่สำคัญในโพรงการจับของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA PknG และ PknB โดยใช้การจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลและการคำนวณค่าพลังงานอิสระในการจับ

3. เพื่อออกแบบสารยับยั้งเอนไซม์ InhA และ PknG ตัวใหม่ที่มีศักยภาพสูงสำหรับสารต้านโรควัณโรคโดยใช้ผลที่วิเคราะห์ร่วมกันระหว่างแบบจำลอง 3D-QSAR CoMSIA และการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุล

4. เพื่อค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA PknG และ PknB ตัวใหม่เพื่อเป็นสารต้านวัณโรคโดยใช้ระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้างโดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

5. เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์และเชื้อวัณโรคก่อโรคของสารยับยั้งตัวใหม่ที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริง

6. เพื่อศึกษาการวางตัวและอันตรกิริยาของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่โดยใช้เทคนิคผลึกเอกซเรย์

7. เพื่อสังเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่

3. ขอบเขตของการวิจัย

การค้นหายาตัวใหม่ต้องการระยะเวลาในการรักษาที่สั้นและสามารถป้องกันการดื้อยาของเชื้อวันโรคได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนเพื่อพัฒนาวิธีการรักษาแบบใหม่ในการรักษาโรควัณโรค เอนไซม์ Enoyl-acyl reductase (InhA) ทำหน้าที่เป็นเป้าหมายที่น่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับการพัฒนายารักษาโรควัณโรค ในการศึกษาครั้งนี้วิธีการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณโดยอาศัยการออกแบบโมเลกุลเชิงโครงสร้าง โดยการใช้พื้นฐานทางโครงสร้างและการคัดสรรเสมือนจริง รวมทั้งการทดสอบ whole cell assay ของไมโครแบคทีเรียม ทูเบอคูโลซิส ถูกใช้เพื่อค้นหาสารยับยั้ง InhA ซึ่งเป็นสารยับยั้งโรควัณโรคตัวใหม่และมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริงเป็นหนึ่งในวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้เพื่อค้นหาสารยับยั้งโรควัณโรคตัวใหม่กับค่ากัมมันตภาพได้อย่างรวดเร็วและจะถูกประยุกต์ใช้เพื่อค้นหาสารยับยั้งที่มีศักยภาพของเอนไซม์เป้าหมาย ดังนั้นจำนวนของสารประกอบที่ใช้มีจำนวนลดลงสำหรับการทดสอบ whole cell assay เพื่อระบุสารยับยั้งตัวใหม่ที่มีศักยภาพ สารยับยั้งตัวใหม่ที่ได้ถูกศึกษาด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งและการศึกษาพลวัติเชิงโมเลกุล เพื่อให้ได้แนวคิดเชิงโครงสร้างสำหรับการปรับเปลี่ยนสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ จากนั้นได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์สารที่มีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาความต้องการทางโครงสร้างต่อการเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งโดยใช้ระเบียบวิธี 3D-QSAR CoMSIA เพื่อศึกษาการวางตัวและอันตรกิริยาที่สำคัญในโพรงการจับ โดยใช้การจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลและการคำนวณค่าพลังงานอิสระในการจับ และค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่เพื่อเป็นสารต้านวัณโรค การค้นหาสารออกกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknB ได้ศึกษาอัตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid และ quinazoline และใช้ระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้างในการค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ตัวใหม่ เพื่อให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการระบุเอกลักษณ์ของเชื้อไมโครแบคทีเรียมทูเบอคูโลซิสที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัณโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *M. tuberculosis* ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุขที่คุกคามประชากรทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา โดยยาที่ใช้ในการรักษาโรควัณโรคแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม โดยยาในกลุ่มแรกคือ ยากลุ่ม first line ซึ่งได้แก่ isonizid rifampin rifapentine ethambutal และ pyrazinamide และยาในกลุ่มที่สองคือ ยากลุ่ม second line ได้แก่ ethionamide cycloserine capreomycin และ para-aminosalicylic acid และการรักษาโรควัณโรคทำได้โดยการ

ใช้ยาหลายขนานร่วมกัน แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาในการรักษาโรควัณโรคยังมีปัญหาเนื่องจากเกิดการดื้อยาหลายขนานของโรควัณโรค (multidrug resistant, MDR) และการเกิดร่วมกันระหว่างโรคเอดส์และโรควัณโรค นอกจากนี้ในปัจจุบันนี้ยังเจอปัญหาการดื้อยาที่ถือว่ารุนแรงคือการดื้อยาแบบ extensively drug-resistant (XRD) ไอโซไนอาซิดถูกใช้เป็นยารักษาโรควัณโรคอย่างกว้างขวางและมีประสิทธิภาพสูง ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์และเอนไซม์เป้าหมายในการยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* ของตัวยาไอโซไนอาซิดจึงได้รับความสนใจสูง เอนไซม์ enoyl-ACP reductase (InhA) ได้ถูกค้นพบว่าเป็นเอนไซม์เป้าหมายของตัวยาไอโซไนอาซิด ในปี 1994 Banerjee และคณะ พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน InhA จะทำให้เกิดการดื้อยาของไอโซไนอาซิดและอีแธมบิวตอล ต่อมาในปี 1995 Dessen และคณะ ได้วิเคราะห์โครงสร้างของผลึกของเอนไซม์ InhA ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธ์ได้เป็นครั้งแรก โดยวิธีผลึกเอกซ์เรย์ (X-ray Crystallography) โดยมีค่า resolution เป็น 2.2 และ 2.7 อังสตรอมตามลำดับ และจากโครงสร้างผลึกที่ได้พบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องโดยตรงกับการรบกวนพันธะไฮโดรเจนที่ช่วย stabilizes การจับของ NADH นอกจากการศึกษาทางโครงสร้างผลึกแล้วยังทำการศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ InhA ซึ่งพบว่าเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา *beta*-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-specific reduction ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการขยายสายโซ่ของกรดไขมัน เนื่องจากตัวยาไอโซไนอาซิดมีคุณสมบัติเป็น prodrug ซึ่งในการออกฤทธิ์ต้องอาศัยการกระตุ้นจากเอนไซม์ mycobacterial catalase peroxidase (KatG) และจากการศึกษาในเวลาต่อมาพบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ katG และ InhA protein [9-10] ในปี 1999 Rozwarski และคณะ ได้วิเคราะห์โครงสร้างผลึกของเอนไซม์ InhA ที่จับกับ NAD^+ และซับสเตรต C16 fatty acyl จากโครงสร้างผลึกพบว่าซับสเตรตจะจับกับเอนไซม์ในลักษณะ U-shaped โดยพันธะคู่ของซับสเตรตจะอยู่ใกล้กับวงไนโคตินาไมด์ของ NAD^+ และวงอะโรมาติกของ Tyr158 จะเกิดอันตรกิริยาโดยตรงกับไทโอเอสเทอร์คาบอร์นิลออกซิเจนของซับสเตรตซึ่งจะช่วยให้อินเตอร์มีเดียตมีความเสถียร หลังจากนั้นได้มีผู้ศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ InhA ทั้งชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ที่จับอยู่กับ NADH ที่เป็นโคเอนไซม์ และโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ชนิดนี้ที่จับอยู่กับตัวยาไอโซไนอะซิดทั้งที่เป็นชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์แบบ I21V และ S94A และจากข้อมูลทางโครงสร้างผลึกเหล่านี้ทำให้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์และการดื้อยาของไอโซไนอาซิดในการยับยั้ง *M. tuberculosis* ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากการศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ InhA ด้วยเทคนิคเอกซ์เรย์ดิฟแฟคชั่นแล้วยังได้มีการศึกษาทางด้านการจำลองโครงสร้างโดยคอมพิวเตอร์ (Computer aided molecular design) ของเอนไซม์ชนิดนี้อีกด้วย ในปี 2002 Pantano และคณะ 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 ศึกษาเปรียบเทียบ affinity ของ NADH ในการจับกับเอนไซม์ InhA ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์แบบ I21V และ I16T โดยใช้เทคนิค molecular dynamics simulation เมื่อเทียบคอนฟอร์เมชั่นของ NADH ที่จับอยู่กับเอนไซม์ InhA ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ พบว่าคอนฟอร์เมชันของ NADH ในส่วน pyrophosphate ที่จับอยู่กับเอนไซม์ InhA ชนิดกลายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งทำให้การเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบลดลง ส่งผลให้ affinity ของ

NADHในการจับกับเอนไซม์ InhA ชนิดกลายพันธุ์ลดลง จากข้อมูลที่ได้เหล่านี้ทำให้เข้าถึงกลไกการดื้อยาซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการออกแบบตัวยาที่มีศักยภาพสูงในการรักษาโรควัณโรคเพื่อพัฒนาตัวยับยั้งให้มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ InhA ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพการยับยั้งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยในปี2004 Pasqualoto และคณะ ใช้เทคนิค 4D-QSAR ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของสารในกลุ่ม hydrazides จำนวน 37 โมเลกุล โดยสารในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกับไอโซไนอาซิด จากการศึกษาพบว่าโมเลกุลของสารที่มีหมู่แทนที่ที่ไม่มีขั้วในส่วนของ acyl moiety จะทำให้ค่าการยับยั้งลดลง นอกจากนี้การปรับเปลี่ยนโมเลกุลของสารในส่วน NAD moiety ให้มีหมู่แทนที่ที่ไม่มีขั้วและเป็นมีสมบัติเป็น hydrogen bond donor and acceptor จะช่วยปรับปรุงอันตรกิริยาของสารยับยั้งกับกรดอะมิโนใน active site ของเอนไซม์ InhA นอกจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของสารในกลุ่มนี้แล้วยังได้มีการศึกษาในกลุ่มของสารอนุพันธ์ benzoxazines และ phenylquinazoline และสารในกลุ่ม isonicotinic acid hydrazides เมื่อเร็วนี้เพื่อเป็นการพัฒนาตัวยาในกลุ่มสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิด ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิด

ตั้งแต่มีการรายงานการดื้อยาของไอโซไนอาซิดที่เกี่ยวเนื่องกับการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ KatG ทำให้มีการสังเคราะห์สารกลุ่มใหม่ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้โดยตรง โดยไม่ต้องอาศัยการกระตุ้นจากเอนไซม์ KatG สารยับยั้งในกลุ่มสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ได้นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ สารในกลุ่มนี้มีความสามารถสูงในการยับยั้งเอนไซม์ InhA สารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.09 μM แต่อย่างไรก็ตามสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ยังให้ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย ที่ต่ำ โดยให้ค่า minimum inhibitory concentrations (MIC) มากกว่า 125 μM ดังนั้นการศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงพื้นฐานทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ ที่จำเป็นต่อค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ในปี 2006 He และคณะได้พัฒนาสารในกลุ่ม Pyrrolidine Carboxamides เพื่อเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่ไม่ต้องการการกระตุ้นจากเอนไซม์ KatG เพื่อแก้ปัญหาการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ KatG ที่ส่งผลต่อการดื้อยาของไอโซไนอาซิดด้วย ในปี 2008 Kumar และคณะได้ทำการศึกษา CoMFA ของสารในกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการออกแบบยาตัวใหม่ของสารกลุ่มนี้ นอกจากสารในกลุ่ม Pyrrolidine Carboxamides แล้วยังมีการพัฒนาสารกลุ่มอื่นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยไม่ต้องการการกระตุ้นจากเอนไซม์ KatG ขึ้นมาอีก[35] จากนั้น Xin และคณะและBoyne และคณะ ได้พัฒนาสารในกลุ่ม arylamides และ diphenyl ethers ตามลำดับ ปี 2008 Ende และคณะได้ทำการสังเคราะห์และทดสอบกัมมันตภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *M. tuberculosis* ของสารในกลุ่ม B-ring modified diaryl ether และล่าสุดในปี 2009 Freundlich และคณะ ได้ทำสังเคราะห์สารในกลุ่ม triclosan และได้ทำการทดสอบค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งต่อเซลล์ *M. tuberculosis* ทั้งชนิดดั้งเดิมและชนิดที่มีการดื้อต่อตัวยา INH จากการทดลองพบว่าสารอนุพันธ์ของสาร triclosan มีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวยา INH ในการยับยั้งเซลล์ *M. tuberculosis* ชนิดที่มีการดื้อต่อตัวยา INH

ในปี 2010 Lu และคณะได้ทำการศึกษา 3D-QSAR ของสารยับยั้งในกลุ่ม arylamide เพื่อนำผลที่ได้ไปทำการคัดกรองสารยับยั้งตัวใหม่ของเอนไซม์ InhA นอกจากนี้คณะผู้วิจัย ได้ทำการศึกษาโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งของสารยับยั้งในกลุ่มเดียวกันนี้และทำการศึกษา QSAR โดยใช้ระเบียบ CoMFA CoMSIA และ HQSAR โดยแบบจำลอง QSAR ที่ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของสนามสเตอริก สนามอิ

เล็กโตรสแตติก และสนามไฮโดรโฟบิก ที่ตำแหน่งต่างๆ ของโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารยับยั้งนี้นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาพลศาสตร์เชิงโมเลกุลเพื่อหาสมบัติและพฤติกรรมเชิงพลวัติของสารยับยั้งในกลุ่มเอริลเอไมด์ในบริเวณการจับของเอนไซม์ ผลการศึกษาพบว่าโพรงไฮโดรโฟบิกของเอนไซม์ InhA มีความยืดหยุ่นต่อการจับสารยับยั้ง

ในปีเดียวกันนี้คณะผู้วิจัยได้ประยุกต์ใช้ระเบียบการออกแบบโมเลกุลด้วยคำนวณ (Computer-Aided Molecular Design) บนพื้นฐานของการคำนวณเคมีควอนตัม (Quantum chemistry) และการจำลองแบบ (Molecular Modeling) เพื่ออธิบายอันตรกิริยาที่เฉพาะเจาะจงของสารอนุพันธ์ไอโซไนอาซิดในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA จากการศึกษาพบว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ INH-NAD adduct ในการจับกับเอนไซม์ InhA โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไพโรฟอสเฟต แบบจำลองที่ได้จากการศึกษา Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) ได้บ่งชี้ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพของสารเหล่านี้ โดยสามารถชี้แนะโครงสร้างสำคัญของสารอนุพันธ์ที่ทำให้สารกลุ่มนี้มีค่ากัมมันตภาพที่สูงขึ้นได้[42] นอกจากนี้ Wahab และคณะ ได้ทำการศึกษาการดื้อยาของไอโซไนอาซิด โดยใช้ระเบียบวิธี MD Simulations จากการศึกษาทำให้เข้าใจถึงกลไกการยับยั้งของตัวยาไอโซไนอาซิดในเอนไซม์ InhA ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ได้ โดยการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA ทำให้ประสิทธิภาพการจับของตัวยาไอโซไนอาซิดในโพรงการจับลดลง Muddassar และคณะ ได้ใช้ระเบียบวิธี hybrid virtual screening ในการคัดสรรสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ สารยับยั้งจำนวน 2 โครงสร้าง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์ *M. tuberculosis* ได้ในระดับไมโครโมลาร์ ซึ่งสารยับยั้งใหม่ทั้งสองตัวนี้อาจนำไปใช้เป็นสารต้นแบบในการพัฒนาสารยับยั้งโรควัณโรคได้ Kumar และคณะ ได้ใช้แบบจำลองโมเลกุลจากวิธี CoMFA และ CoMSIA ในการทำ virtual screening ในการคัดสรรสารยับยั้งเอนไซม์ InhA จากการศึกษาพบว่าสารยับยั้งใหม่จำนวน 20 โครงสร้าง มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งที่ได้จากการทำนายสูง

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, Gaussian 09)

1.5 โปรแกรมการคำนวณทางโมเลคิวลาร์โมเดลลิง (Discovery studio, Gausview และ ChemDraw)

1.6 โปรแกรมส่งข้อมูล (winscp, putty, SSH secure shell)

1.7 โปรแกรม Autodock 3.0.5, Autodock 4.02

1.8 โปรแกรม Amber12

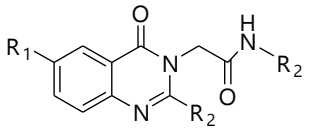
1.9 โปรแกรม Glide

1.10 โปรแกรม Pymole

2. ศึกษาความต้องการทางโครงสร้างด้วยระเบียบวิธี 3D-QSAR

รวบรวมข้อมูลทางโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพการยับยั้ง ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)acetamide จำนวน 26 โครงสร้างและสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3H)-ones จำนวน 27 โครงสร้าง ดังแสดงใน**ตารางที่ 1** และ**ตารางที่ 2** โดยทำการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ InhA และค่า กัมมันตภาพในการยับยั้งของสารประกอบคือ MIC (Minimum inhibition concentration) ค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เป็นค่าที่นิยมใช้บ่งบอกถึงความไวของเชื้อที่มีต่อยาและเป็นค่าที่ใช้ประกอบการพิจารณาถึงขนาดของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดของสารประกอบอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide และสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones การศึกษาครั้งนี้ตัวแปรตาม (Dependent variable) คือ ค่ากัมมันตภาพและตัวแปรอิสระ (Independent variable) คือสมบัติเชิงโมเลกุลซึ่งคำนวณได้จากโครงสร้างของสารประกอบ

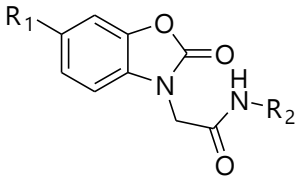
ตารางที่ 1 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide และค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA



No.	R_1	R_2	R_3	MIC (μM)
1*	-H	Phenyl	-H	11.18
2	-Cl	Phenyl	-H	4.97
3	-H	2-chloro-5-(trfluoromethyl)-2-phenyl	-H	8.18
4	-Cl	2-chloro-5-(trfluoromethyl)-2-phenyl	-H	3.74
5	-H	2-furylmethyl	-H	5.50
6	-Cl	2-furylmethyl	-H	4.91
7	-H	2-thiophenylmethyl	-H	5.21
8	-Cl	2-thiophenylmethyl	-H	9.36
9	-H	Phenyl	$-CH_3$	10.65
10*	-Cl	Phenyl	$-CH_3$	4.76
11	-H	2-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	$-CH_3$	15.79
12	-Cl	2-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	$-CH_3$	7.26
13	-H	2-furylmethyl	$-CH_3$	84.08
14	-Cl	2-furylmethyl	$-CH_3$	4.70
15	-H	2-thiophenylmethyl	$-CH_3$	9.97
16	-Cl	2-thiophenylmethyl	$-CH_3$	17.96
17	-H	5-nitrothiazol-2-yl	-H	37.72
18	-Cl	5-nitrothiazol-2-yl	-H	34.17
19	-H	5-nitrothiazol-2-yl	$-CH_3$	72.39
20	-Cl	5-nitrothiazol-2-yl	$-CH_3$	32.91
21	-H	2-benzothiazolyl	-H	37.16
22	-Cl	2-benzothiazolyl	-H	33.70
23	-Cl	2-benzothiazolyl	$-CH_3$	16.24

หมายเหตุ : Compounds* คือ test set

ตารางที่ 2 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones และค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA



No.	R_1	R_2	MIC (μM)
1	-H	Phenyl	46.59
2	-Cl	Phenyl	82.58
3	$-NO_2$	Phenyl	79.80
4	-H	2-Chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	67.43
5	-Cl	2-Chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	61.70
6	$-NO_2$	2-Chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	60.13
7	-H	2-Pyridyl	46.42
8	-Cl	2-Pyridyl	82.31
9*	$-NO_2$	2-Pyridyl	39.77
10	-H	2-Pyridylmethy	88.25
11*	-Cl	2-Pyridylmethy	39.34
12	$-NO_2$	2-Pyridylmethy	76.15
13	-H	2-Furylmethyl	22.95
14	-Cl	2-Furylmethyl	40.75
15*	$-NO_2$	2-Furylmethyl	78.80
16	-H	2-Thiophenylmethyl	21.66
17	-Cl	2-Thiophenylmethyl	38.72
18*	$-NO_2$	2-Thiophenylmethyl	18.75
19	-H	5-Nitrothiazol-2-yl	78.05
20	-Cl	5-Nitrothiazol-2-yl	17.61
21	$-NO_2$	5-Nitrothiazol-2-yl	17.11
22	-H	2-Benzothiazolyl	19.21
23	-Cl	2-Benzothiazolyl	17.37
24	$-NO_2$	2-Benzothiazolyl	33.75
25	-H	6-Nitro-2-benzothiazolyl	33.75
26	-Cl	6-Nitro-2-benzothiazolyl	30.88
27	$-NO_2$	6-Nitro-2-benzothiazolyl	15.04

หมายเหตุ : Compounds* คือ test set

3. การคัดสรรเสมือนจริง

การคัดสรรเสมือนจริงเป็นวิธีการที่ประยุกต์ใช้การจำลองแบบและการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณร่วมกันหลายวิธีเพื่อใช้ในการค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งตัวใหม่ที่คาดว่าจะมีศักยภาพสูงในการยับยั้งเป้าหมายโดยประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ

3.1 การบ่งชี้บริเวณการจับของเอนไซม์เป้าหมาย สำหรับในงานวิจัยนี้การบ่งชี้บริเวณของโพรงการจับนั้นได้อาศัยข้อมูลการจับของสารยับยั้งเอนไซม์เป้าหมายจากโครงสร้างเอกซเรย์เดียวกันกับที่ใช้ในการศึกษาการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

3.2 การทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรมการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งโดยพิจารณาจากโครงสร้างที่วางตัวจากการทำนายโดยการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งและค่า RMSD

3.3 การคัดสรรเสมือนจริงโดยใช่การคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งและการคำนวณค่าพลังงานในการจับ

4. In vitro MTB MABA (Microplate Alamar Blue Assay)

4.1 ทำการเลี้ยงเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Rv ใน LJ medium (Lowenstein-Jensen medium) แล้วนำมาละลายใน 7H9 medium (7H9 broth, 0.1% casitone, 0.5% glycerol, supplemented oleic acid, albumin, dextrose, and catalase [OADC]) แล้วนำมาเติมลงใน McFarland tube No. 1 เพื่อปรับความเข้มข้นของเชื้อ แล้วทำการเจือจางด้วย7H9 medium ในอัตราส่วน 1ต่อ 20 ก่อนทำการทดลองในขั้นต่อไป

4.2 ละลายสารยับยั้งใน 7H9 medium และ ทำการเจือจางสารยับยั้งใน 7H9 medium โดยการทำ two-fold serial dilution จนได้ความเข้นอย่างน้อย 1/16 เท่าของความเข้มข้นเริ่มต้น

4.3 ปิเปตเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ใน 7H9 medium ที่เตรียมในข้อ 2.3.1 และสารยับยั้งที่เตรียมในข้อ 2 อย่างละ 100 ไมโครลิตร ลงใน sterile 96-well microtiter plate ปิดด้วย sterile cover seal plastic บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

4.4 ชุดควบคุมที่เป็นบวก (positive control) ทำโดยปิเปตเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ใน 7H9 medium ที่ไม่มีสารที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เพื่อยืนยันว่า *M. tuberculosis* H37Rv ใน 7H9 medium สามารถเจริญใน 7H9 medium ส่วนชุดควบคุมที่เป็นลบ (negative control) คือ 7H9 medium ไม่ใส่แบคทีเรียเพื่อตรวจสอบว่าไม่มีการปนเปื้อน (contamination) ในขบวนการทดลอง

4.5 เติมสารละลาย alamar blue ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม (well) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4.6 สังเกตการเปลี่ยนสีของ alamar blue (oxidized state) จากสีฟ้าเป็นสีชมพู (reduced) แสดงให้เห็นการการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

4.7 หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารยับยั้ง ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) จากความเข้มข้นต่ำสุดของสารยับยั้งที่ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี alamar blue จากสีฟ้าเป็นสีชมพู โดยการทดสอบจะทำ 3 ซ้ำ 3 ครั้ง (tritriplicate)

5. การสกัด plasmid DNA เอนไซม์ InhA

1) ปิเปต cell culture ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่บ่มทิ้งไว้ไม่เกิน 15 ชั่วโมง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 3 นาที จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ทำซ้ำใส่หลอดเดิมอีก 1 ครั้ง

2) เติม Nulcease Free Water 600 ไมโครลิตร นำไป vortex จากนั้นเติม 7x Lysis Buffer 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที (ห้าม vortex) จะได้สารละลายที่มีสีน้ำเงิน

3) เติม Neutralization Buffer ที่แช่เย็น 350 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ห้าม vortex) จะได้สารละลายที่มีสีเหลือง

4) นำไป centrifuge นาน 4 นาที ที่ 11,000 rpm

5) ถ่ายสารละลายจากหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากข้อ 4) ใส่ในหลอด Zymo-Spin IIN column

6) นำไป centrifuge นาน 15 วินาที ที่ 11,000 rpm เทสารละลายที่ผ่านการกรองทิ้ง

7) เติม Endo-Wash Buffer 200 ไมโครลิตร นำไป centrifuge นาน 30 วินาที ที่ 11,000 rpm เทสารละลายที่ผ่านการกรองทิ้ง

8) เติม Zypy Wash Buffer 400 ไมโครลิตร นำไป centrifuge นาน 1 นาที ที่ 11,000 rpm เทสารละลายที่ผ่านการกรองทิ้ง และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ ethanol ระเหย

9) ถ่าย Zymo-Spin IIN column ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สะอาดจากนั้นเติม Nulcease Free Water 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

10) นำไป centrifuge นาน 30 วินาที ที่ 11,000 rpm ได้สารละลายใสไม่มีสีคือ plasmid DNA ของเอนไซม์ InhA เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

11) นำไปรัน gel Electrophoresis ด้วย gel 15 % Agarose ที่ศักย์ไฟฟ้า 100 วัตต์ และส่ง sequencing กับบริษัท word medic

6. การ Transformation ของ DNA เอนไซม์ InhA/pET15b เข้าไปใน BL21, BL21-DE3 และ BL21-DE3(Lys)

1) นำ competent cell มาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นปิเปต competent cell BL21 50 ไมโครลิตร เติมลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง micro centrifuge

2) เติม DNA เอนไซม์ InhA/pET15b 2 ไมโครลิตร ลงใน competent cell ที่แช่ในน้ำแข็ง แล้วเคาะหลอด microcentrifuge เบาๆ 3 ครั้ง

3) แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไป Heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

4) แช่ในน้ำแข็งนาน 2 นาที

5) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ LB w/o antibiotic 1 มิลลิลิตร

6) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 rpm นาน 60 นาที

7) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 2 นาที ปิเปตสารละลายที่อยู่ข้างบนออก 800 ไมโครลิตร

8) นำส่วนที่เหลือไปเขย่าให้เป็นสารละลายเดียวกัน จากนั้นปิเปต DNA เอนไซม์ InhA/pET15b 50, 100 ไมโครลิตรและส่วนที่เหลือ (rest) ลงบนจานเพราะเชื้อที่มี LB amp 100 ตามลำลับ

9) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

10) competent cell BL21-DE3 และ BL21-DE3(Lys) ทำตามขั้นตอนของ competent cell BL21

7. การคัดเลือกโคโลนีจาก competent cell BL21, BL21-DE3 และ BL21-DE3(Lys)

1) คัดเลือกโคโลนีจาก competent cell BL21 มา 10 โคโลนีเป็นหมายเลข 1-10

2) เลือกโคโลนีจากจานเพราะเชื้อถ่ายลงในหลอด pcr ที่มีน้ำผ่านการฆ่าเชื้อ 50 ไมโครลิตร

3) นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ด้วยเครื่อง Thermocycle pcr และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที

5) นำสารละลายส่วนที่ใสด้านบน 10 ไมโครลิตร ถ่ายใสในหลอด pcr หลอดใหม่

6) เติมสารดังต่อไปนี้ (25 ไมโครลิตร)

- 10x standard Tag reaction buffer	2.50 ไมโครลิตร
- 10 mM dNTP mix	0.50 ไมโครลิตร
- 10 mM Forword primer (T7 promoter)	0.50 ไมโครลิตร
- 10 mM Reverse primer (T7 terminater)	0.50 ไมโครลิตร
- Template DNA	10.0 ไมโครลิตร
- DMSO	2.50 ไมโครลิตร
- Tag DNA polymerase	0.25 ไมโครลิตร
- Nuclease free water	8.25 ไมโครลิตร

7) นำสารที่เติมลงในหลอด pcr ทำ polymerase chain reaction (pcr)

โปรแกรม pcr (*** N band 800 bp)

clenature	step 1 x (1 cycle)	95 องศาเซลเซียส : 5 นาที
pcr	step 2 x (30 cycle)	95 องศาเซลเซียส : 30 วินาที
		55 องศาเซลเซียส : 30 วินาที
		68 องศาเซลเซียส : 55 วินาที
Final extension	step 3 x (1 cycle)	68 องศาเซลเซียส : 5 นาที
Hold	step 4	4 องศาเซลเซียส

8) นำไปรัน gel Electrophoresis ด้วย gel 15 % Agarose ที่ศักย์ไฟฟ้า 100 วัตต์

9) คัดเลือกโคโลนีจาก competent cell BL21-DE3 มา 10 โคโลนีเป็นหมายเลข 11-20 และ competent cell BL21-DE3(Lys) มา 10 โคโลนีเป็นหมายเลข 21-30

8. การผลิตโปรตีนจากเอนไซม์ InhA (InhA protein expression)

1) เลือกโคโลนีจากหมายเลขที่ทำการเลือกไว้ในข้อที่ 3.2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ LB amp 100 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในหลอด microcentrifuge นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เขย่าที่ 250 rpm

2) นำโคโลนีที่เลี้ยงได้มาทำการวัดหาความเข้มข้นด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer โดยการเติมโคโลนีที่เลี้ยงได้ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ LB amp 100 ในอัตราส่วน 1:100 ให้ได้ค่าความทึบแสง (OD) อยู่ในช่วง 0.1-0.2

3) นำโคโลนีที่เลี้ยงได้ที่มีค่าความทึบแสง (OD) อยู่ในช่วง 0.1-0.2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ LB amp 100 mg/L ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ทั้งหมด 5 ขวด นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2.5 ชั่วโมง เขย่าที่ 250 rpm

4) นำโคโลนีที่เลี้ยงได้มาทำการวัดหาความเข้มข้นด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer โดยการเติมโคโลนีที่เลี้ยงได้ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ LB amp 100 mg/L ในอัตราส่วน 1:100 ให้ได้ค่าความทึบแสง (OD) อยู่ในช่วง 0.6-0.7

5) เมื่อเลี้ยงโคโลนีให้ได้ค่าความทึบแสง (OD) อยู่ในช่วง 0.6-0.7 แล้วเติม Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) ลงไปที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 400 µM จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา0, 1, 2, 4 และ 12 ชั่วโมง ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด นำไปวัดหาค่าความทึบแสง (OD) ด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer

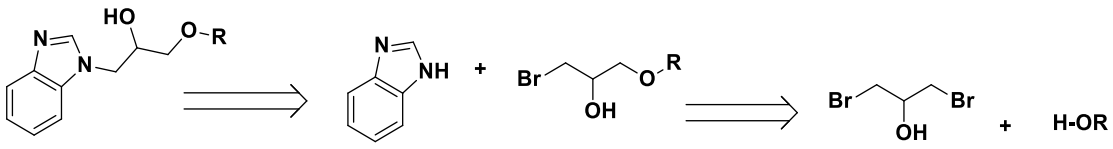
6) นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกเก็บตัวอย่างที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7) นำตัวอย่างที่ได้ไปแยกโดยวิธี Electrophoresis บน 12% SDS-PAGE ที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่ (constant volt) 100 วัตต์

9. การออกแบบวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ซึ่งเป็นโมเลกุลเป้าหมายในการศึกษา ซึ่งในการสังเคราะห์ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบวิธีการสังเคราะห์ออกเป็น 2 วิธี ดังต่อไปนี้

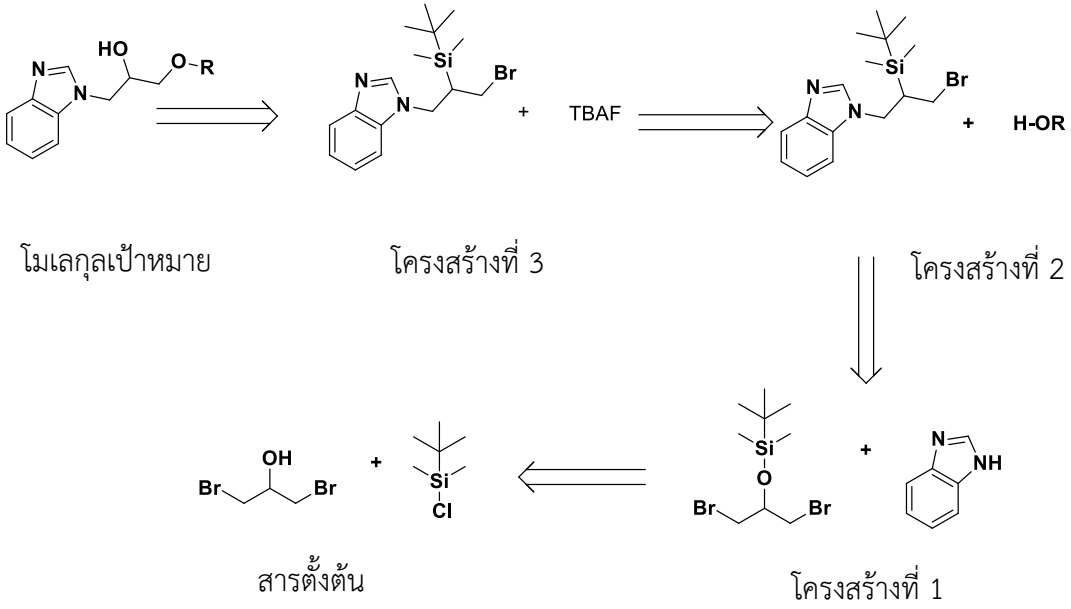
วิธีสังเคราะห์ที่ 1



โมเลกุลเป้าหมาย โครงสร้างที่ 1 สารตั้งต้น

รูปที่ 1 การออกแบบการสังเคราะห์โครงสร้างของสารอนุพันธ์ Benzimidazole วิธีที่ 1

วิธีสังเคราะห์ที่ 2

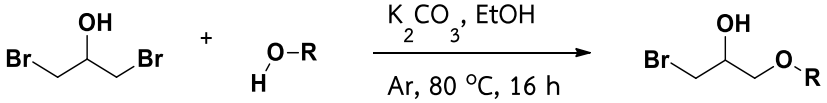


รูปที่ 2 การออกแบบการสังเคราะห์โครงสร้างของสารอนุพันธ์ Benzimidazole วิธีที่ 2

10. การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole

10.1 วิธีการสังเคราะห์ที่ 1

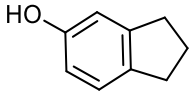
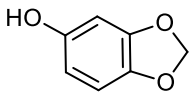
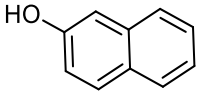
ขั้นตอนที่ 1



Phenyl group

รูปที่ 3 แสดงวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 1 โดยวิธีที่ 1

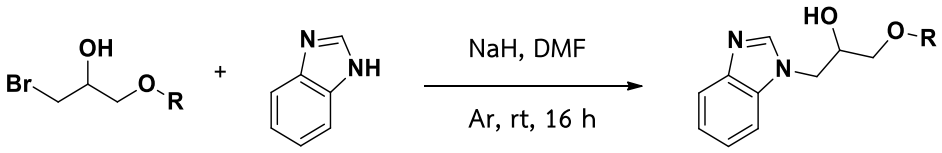
ตารางที่ 3 ข้อมูลสาร (Hydroxy group) และระบบในการลงคอลัมน์ของสารแต่ละโครงสร้างในขั้นตอนที่ 1

Phenyl group	ชื่อสาร	ระบบในการแยกสารโดยคอลัมน์
	2,3-dihydro-1H-inden-5-ol	10% EtOAc/Hexane
	Sesamol	
	Naphthalen-2-ol	

วิธีการทดลอง

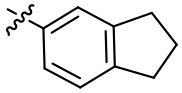
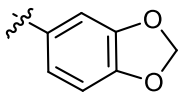
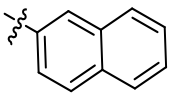
นำ 1,3-dibromopropan-2-ol (1.5 eq) มาทำปฏิกิริยากับสารในกลุ่ม Phenyl group ดังแสดงในตาราง 3.3 (1 eq) ในขวดก้นกลม จากนั้นเติมสารละลายเอทานอล แล้วค่อยๆเติมโพแทสเซียมคาร์บอเนต (4 eq) และ Stirred พร้อมทั้ง Reflux Overnight หลังจากนั้นกำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator แล้วทำการสกัดด้วยน้ำกับไดคลอโรมีเทน 3 รอบ เก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟต จากนั้นกรองเอาชั้นสารอินทรีย์โดยกรองผ่านสำลี นำสารไประเหยเพื่อกำจัดสารละลายโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์

ขั้นตอนที่ 2



รูปที่ 4 แสดงวิธีการสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 2 โดยวิธีที่ 1

ตารางที่ 4 ลักษณะหมู่แทนที่ R และระบบในการลงคอลัมน์ของสารแต่ละโครงสร้างในขั้นตอนที่ 2

หมู่ R	ระบบในการแยกสารโดยคอลัมน์
	50%EtOAc/Hexane
	50%EtOAc/Hexane สำหรับ (Short column) หรือ 100%EtOAc สำหรับ (Long column)
	

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ (2) ล้างโซเดียมไฮไดรด์ (3 eq) ด้วยเฮกเซน 3 รอบเพื่อล้างเอาพาราฟินออยล์ที่เคลือบไว้ออก นำโซเดียมไฮไดรด์ที่ล้างเสร็จแล้วไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งโดยการลดแรงดันบรรยากาศ หรือถ้าใช้เบสเป็นซีเซียมคาร์บอเนต (3 eq) ก็สามารถใช้ทำปฏิกิริยาได้เลย จากนั้นนำสารในกลุ่ม Phenyl group ดังแสดงในตาราง 3.3 (1 eq) ลงในขวดก้นกลม ในสารละลาย ไดเมทิลฟอร์มาร์ไมด์ (DMF) เติมเบสโซเดียมไฮไดรด์ที่ล้างเสร็จแล้วลงไปในปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของแก๊สอาร์กอน Stirred ประมาณ 30 นาที แล้วเติมสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนที่ (1) (1.25 eq) Stirred ที่อุณหภูมิห้อง 16 ชั่วโมง จากนั้นเติมเมทานอล ทำการสกัดด้วยน้ำกับเมทานอลเก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟต และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์

10.2 วิธีการสังเคราะห์ที่ 2

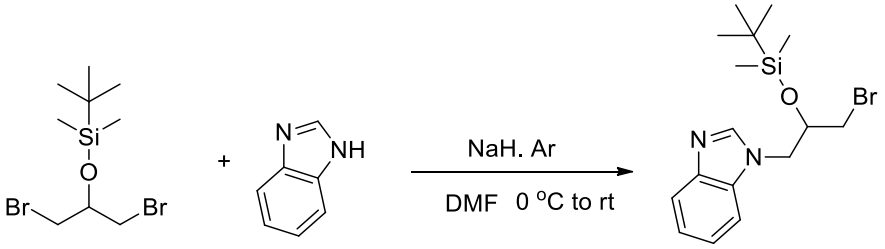
ขั้นตอนที่ 1

รูปที่ 5 แสดงวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 1 โดยวิธีที่ 2

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ (1) นำ 1,3-dibromopropan-2-ol 5 ml (0.049 mol, 1 eq) มาทำปฏิกิริยากับ tert-butylchlorodimethylsilane 11.07 กรัม (0.0735 mol, 1.5 eq) และ Imidazole 6.67 กรัม (0.098 mol, 2 eq) ในสารละลาย Tetrahydrofuran ในขวดก้นกลม จากนั้น Stirrer 16 ชั่วโมง โดยจะให้อุณหภูมิของระบบจาก 0 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิห้องหลังจากนั้น กำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator แล้วทำการสกัดด้วยน้ำกับไดคลอโรมีเทน 3 ครั้ง เก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองผ่านกรวยกรองสำลี กำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์โดยใช้ 10% DCM/Hexane

ขั้นตอนที่ 2



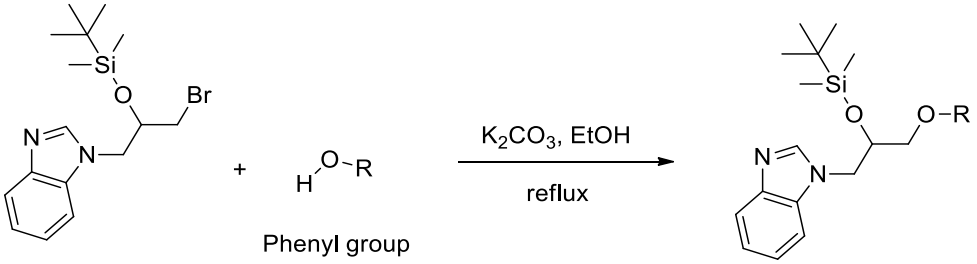
รูปที่ 6 แสดงวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 2 โดยวิธีที่ 2

วิธีการทดลอง

ล้างโซเดียมไฮไดรด์ 1.1064 กรัม (4.61×10-2 mol, 5 eq) ด้วยเฮกเซน 3 รอบ เพื่อล้างเอาพาราฟินออยล์ที่เคลือบไว้ออก นำโซเดียมไฮไดรด์ที่ล้างเสร็จแล้วไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งโดยการลดแรงดันบรรยากาศ จากนั้นนำ 1H-benzo[d]imidazole 1.090 กรัม (9.232×10-3 mol, 1 eq) ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 ml ในสารละลายไดเมทิลฟอร์มาร์ไมด์ (DMF) เติมเบสโซเดียมไฮไดรด์ที่ล้างเสร็จแล้วลงไปในปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของแก๊สอาร์กอน Stirred ประมาณ 30 นาทีแล้วเติมสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนที่ (1) 9.2 กรัม (2.76×10^{-2} mol, 3eq) Stirred ที่อุณหภูมิห้อง 16 ชั่วโมง จากนั้นเติม เมทานอล ทำการสกัดด้วยน้ำ

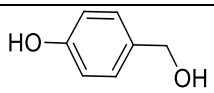
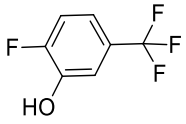
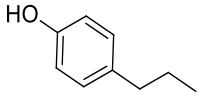
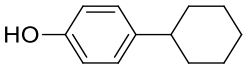
กับเอทธิลอะซีเตท เก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟตแอน-ไฮดรัส และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์โดยใช้ 50% EtOAc/Hexane สำหรับ (Short column) หรือ 100% EtOAc สำหรับ (Long column)

ขั้นตอนที่ 3



รูปที่ 7 แสดงวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 3 โดยวิธีที่ 2

ตารางที่ 5 ข้อมูลสาร (Hydroxy group) และระบบในการลงคอลัมน์ของสารแต่ละโครงสร้างในขั้นตอนที่ 1

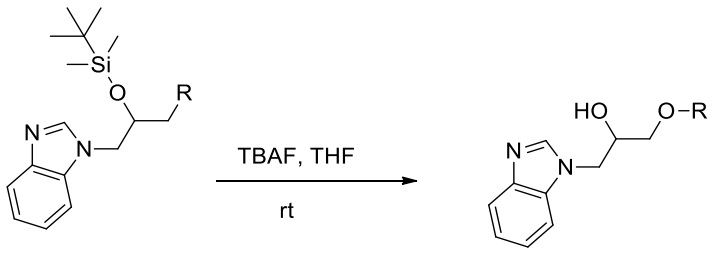
Phenyl group	ชื่อสาร	ระบบในการแยกสารโดยคอลัมน์
	4-hydroxy methyl phenol	100% EtOAc
	2-Fluro-5-(trifluoromethyl)phenol	100% EtOAc
	4-Propylphenol	8% MeOH/DCM
	Pentafluoro phenol	100% EtOAc
	4-Cyclohexylphenol	60% EtOAC/Hexane

วิธีการทดลอง

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนที่ (2) (1 eq) มาทำปฏิกิริยายากับสารในกลุ่ม Phenyl group ดังแสดงในตารางที่ 3.5 (2 eq) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (4 eq) ในสารละลายเอทานอล ในขวดก้นกลมซึ่งระบบทำภายใต้บรรยากาศของแก๊สอาร์กอน จากนั้น Stirrer 16 ชั่วโมงและควบคุมอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น กำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary

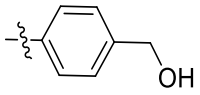
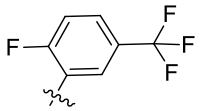
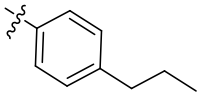
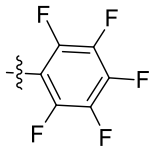
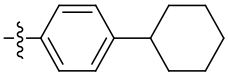
Evaporator แล้วทำการสกัดด้วยน้ำกับ เอทธิลอะซีเตท 3 ครั้ง เก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองผ่านกรวยกรองสำลี กำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์

ขั้นตอนที่ 4



รูปที่ 8 แสดงวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยวิธีที่ 2

ตารางที่ 6 ลักษณะหมู่แทนที่ R และระบบในการลงคอลัมน์ของสารแต่ละโครงสร้างในขั้นตอนที่ 4

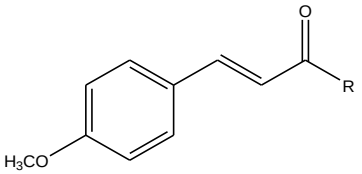
หมู่ R	ระบบในการแยกสารโดยคอลัมน์
	100% EtOAc
	100% EtOAc
	100% EtOAc
	3% MeOH/DCM
	100% EtOAc

วิธีการทดลอง

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนที่ (3) (1 eq) มาทำปฏิกิริยายากับ TBAF (4 eq) ในสารละลายเตตระไฮโดรฟูแรน ในขวดก้นกลมจากนั้น Stirrer 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นกำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator แล้วทำการสกัดด้วยน้ำกับเอทธิลอะซีเตท 3 ครั้ง เก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองผ่านกรวยกรองสำลี กำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์

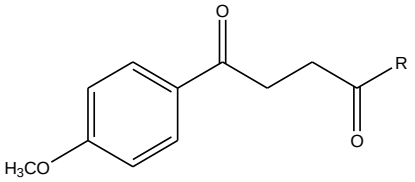
การศึกษาอันตรกิริยาของสารยับยั้งเอนไซม์ PknB

ตารางที่ 7 แสดงโครงสร้างและค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PknB (% inhibition)



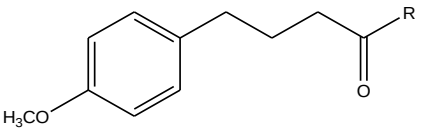
General structure of compound No. 1-3

Compound No.	R	% inhibition
1	OH	30.7±1.6
2	OCH_3	1.7±0.2
3	NH_2	5.4±0.6



General structure of compound No. 4-6

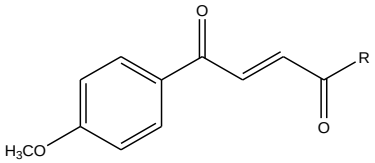
Compound No.	R	% inhibition
4	OH	3.3±0.2
5	OCH_3	5.1±1.6
6	NH_2	8.7±0.6



General structure of compound No. 7-9

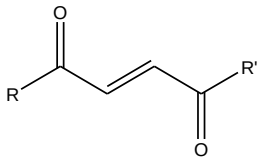
Compound No.	R	% inhibition
7	OH	7.0±0.5
8	OCH_3	5.6±0.5
9	NH_2	8.0±0.7

ตารางที่ 7 แสดงโครงสร้างและค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PknB (% inhibition) (ต่อ)

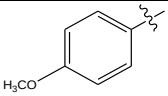
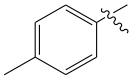
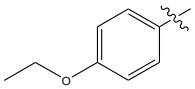
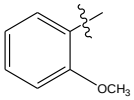
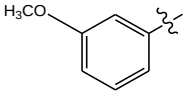
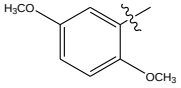
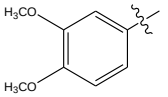
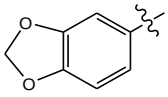
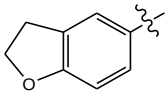
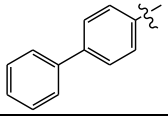


General structure of compound No. 10

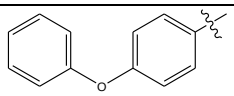
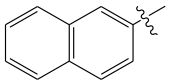
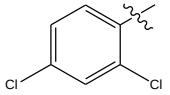
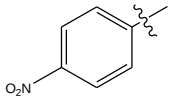
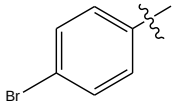
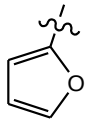
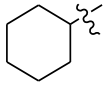
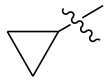
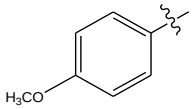
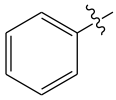
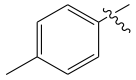
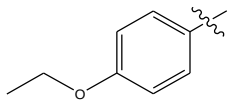
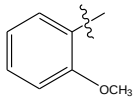
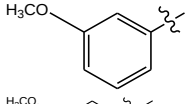
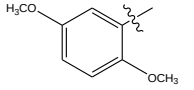
Compound No.	R	% inhibition
10	OCH_3	24.7±1.5



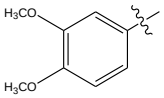
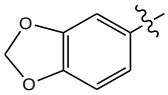
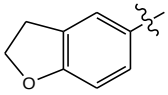
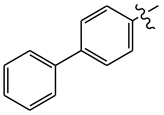
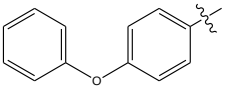
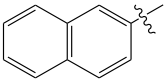
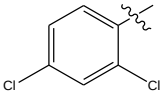
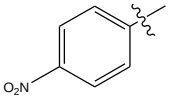
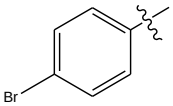
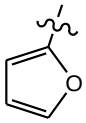
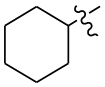
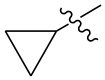
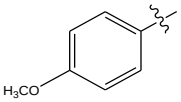
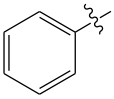
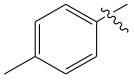
General structure of compound No. 11-90

Compound No.	R	R'	% inhibition
11		MeO	52.1±1.8
12		MeO	47.8±4.1
13		MeO	60.5±5.5
14		MeO	54.2±4.8
15		MeO	62.1±5.0
16		MeO	63.1±6.8
17		MeO	70.1±4.0
18		MeO	65.6±8.3
19		MeO	45.4±2.8
20		MeO	39.0±2.7
21		MeO	48.6±5.4

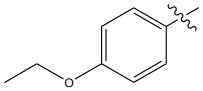
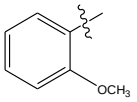
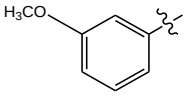
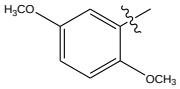
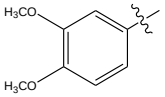
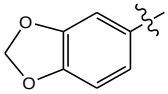
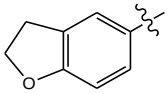
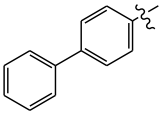
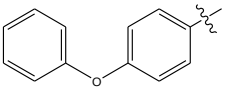
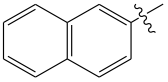
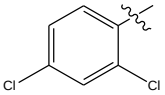
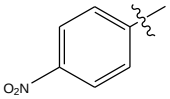
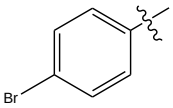
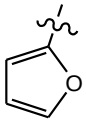
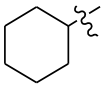
ตารางที่ 7 แสดงโครงสร้างและค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PknB (% inhibition) (ต่อ)

Compound No.	R	R'	% inhibition
22		MeO	59.1±4.9
23		MeO	62.8±6.1
24		MeO	57.0±6.0
25		MeO	65.1±7.6
26		MeO	66.7±5.8
27		MeO	63.2±3.7
28	Me	MeO	32.6±3.7
29		MeO	33.2±2.7
30		MeO	36.9±4.0
31		EtO	48.7±4.9
32		EtO	64.3±7.7
33		EtO	15.5±2.3
34		EtO	47.8±7.1
35		EtO	45.3±3.7
36		EtO	55.7±7.0
37		EtO	67.7±5.0

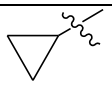
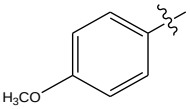
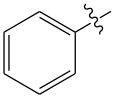
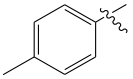
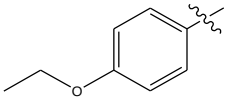
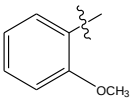
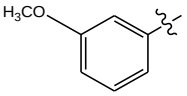
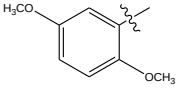
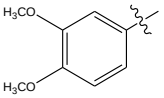
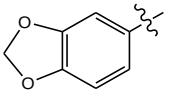
ตารางที่ 7 แสดงโครงสร้างและค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PknB (% inhibition) (ต่อ)

Compound No.	R	R'	% inhibition
38		EtO	68.3±5.4
39		EtO	51.2±1.4
40		EtO	45.9±3.2
41		EtO	45.9±6.1
42		EtO	51.6±7.8
43		EtO	61.3±4.6
44		EtO	49.0±3.9
45		EtO	65.3±8.5
46		EtO	67.5±5.7
47		EtO	63.8±6.2
48	Me	EtO	40.4±4.2
49		EtO	53.5±6.8
50		EtO	33.4±5.8
51		isopropyl	41.1±3.4
52		isopropyl	11.2±1.7
53		isopropyl	72.8±7.4

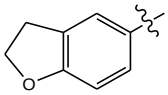
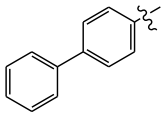
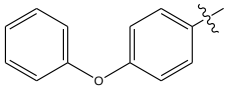
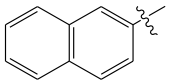
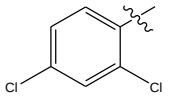
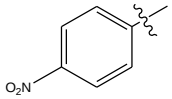
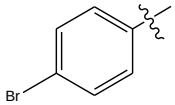
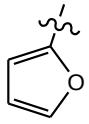
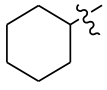
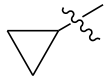
ตารางที่ 7 แสดงโครงสร้างและค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PknB (% inhibition) (ต่อ)

Compound No.	R	R'	% inhibition
54		isopropyl	38.0±4.2
55		isopropyl	56.2±5.0
56		isopropyl	42.6±2.9
57		isopropyl	61.4±4.7
58		isopropyl	63.9±7.6
59		isopropyl	60.6±1.7
60		isopropyl	43.1±5.9
61		isopropyl	19.5±1.9
62		isopropyl	45.5±5.8
63		isopropyl	61.6±3.8
64		isopropyl	57.1±5.1
65		isopropyl	59.1±4.3
66		isopropyl	64.5±4.7
67		isopropyl	60.8±5.3
68	Me	isopropyl	38.3±1.5
69		Isopropyl	42.7±3.2

ตารางที่ 7 แสดงโครงสร้างและค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PknB (% inhibition) (ต่อ)

Compound No.	R	R'	% inhibition
70		isopropyl	43.7±2.9
71		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	61.6±2.8
72		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	69.1±4.5
73		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	65.8±5.5
74		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	55.6±2.7
75		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	54.3±3.7
76		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	66.2±4.9
77		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	67.1±5.4
78		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	62.1±4.8
79		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	59.0±4.5

ตารางที่ 7 แสดงโครงสร้างและค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PknB (% inhibition) (ต่อ)

Compound No.	R	R'	% inhibition
80		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	53.8±5.3
81		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	50.6±5.6
82		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	46.0±2.6
83		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	73.6±4.0
84		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	87.1±4.3
85		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	87.9±5.3
86		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	87.6±5.8
87		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	67.0±4.6
88	Me	2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	46.2±5.4
89		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	54.3±4.0
90		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	40.0±3.4

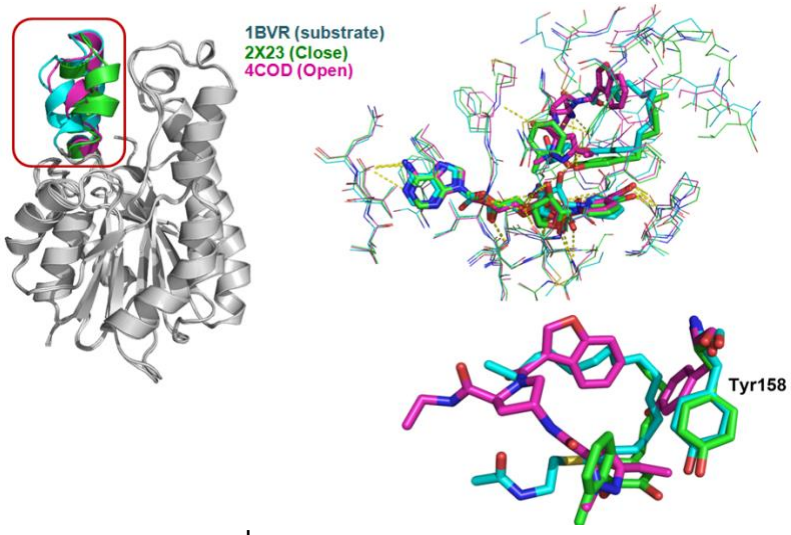
ผลการศึกษา

สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่

การคัดสรรเสมือนจริง

การวิเคราะห์บริเวณการจับ

จากการคำนวณค่า RMSD ของโครงสร้างเอนไซม์ InhA จำนวน 99 โมโนเมอร์เปรียบเทียบกับโครงสร้างเฉลี่ยของเอนไซม์ InhA ซึ่งเป็นข้อมูลโครงสร้างที่ได้มาจากเอกซเรย์พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.20 Å ถึง 1.43 Å ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ InhA มีความยืดหยุ่นสูงในบริเวณของโพรงการจับที่จับกับซับสเตรท ดังนั้นแล้วในงานวิจัยนี้จึงเลือกโครงสร้างของเอนไซม์ InhA ที่จับกับสารยับยั้งแตกต่างกัน 2 แบบเพื่อใช้เป็นบริเวณการจับของเอนไซม์ในการคัดสรรเสมือนจริง เอนไซม์ InhA ที่จับกับสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์ (PDB code: 2X23) ถูกใช้เป็นตัวแทนของเอนไซม์ InhA ที่มีลักษณะของโพรงการจับที่เป็นแบบปิด (closed conformation) และเอนไซม์ InhA ที่จับกับสารอนุพันธ์ benzofuran pyrrolidine pyrazole (PDB code: 4COD) ถูกใช้เป็นตัวแทนของเอนไซม์ InhA ที่มีลักษณะของโพรงการจับที่เป็นแบบเปิด (open conformation) ทำให้มีลักษณะของโพรงการจับบริเวณของซับสเตรทที่แตกต่างกัน 2 แบบ ซึ่งแสดงรายละเอียดของโพรงการจับดัง**รูปที่ 9** โดยอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์ที่จับกับเอนไซม์ InhA (PDB code: 2X23) คือพันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโน Tyr158 โดยเรียกลักษณะการจับแบบนี้ว่า Y158-in conformation แต่ในทางตรงกันข้ามอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ benzofuran pyrrolidine pyrazole ภายในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์ โดยพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างสารยับยั้งและกรดอะมิโน Tyr158 หายไป ซึ่งเรียกการจับแบบนี้ว่า Y158-out conformation



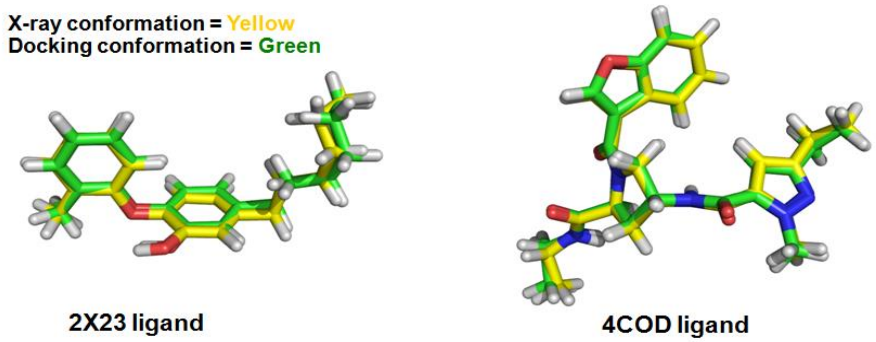
รูปที่ 9 โครงสร้างของเอนไซม์ InhA

การทดสอบประสิทธิภาพของโปรแกรมการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ในงานวิจัยนี้โปรแกรม Glide ได้ใช้เป็นโปรแกรมการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งในการคัดสรรเสมือนจริงเพื่อหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ ดังนั้นแล้วพารามิเตอร์สำหรับการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งจึงถูกทดสอบโดยอาศัยค่า RMSD เป็นค่าที่ใช้ในการตัดสินพารามิเตอร์ที่มีประสิทธิภาพในการคำนวณ ซึ่งค่า RMSD ที่ได้เป็นการเปรียบเทียบโครงสร้างของลิแกนด์จากโครงสร้างเอกซเรย์และการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง ซึ่ค่า RMSD และ docking score ของลิแกนด์ที่จับกับเอนไซม์ InhA (PDB code 2X23 และ 4COD) สรุปดัง**ตารางที่ 8** และ**รูปที่ 10**

ตารางที่ 8 ค่า RMSD และค่า Glide XP docking score ของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA จากโครงสร้างเอกซเรย์

X-ray	PDB code	
	2X23	4COD
RMSD (Å)	0.49	0.33
Docking score (kcal/mol)	-10.52	-9.12

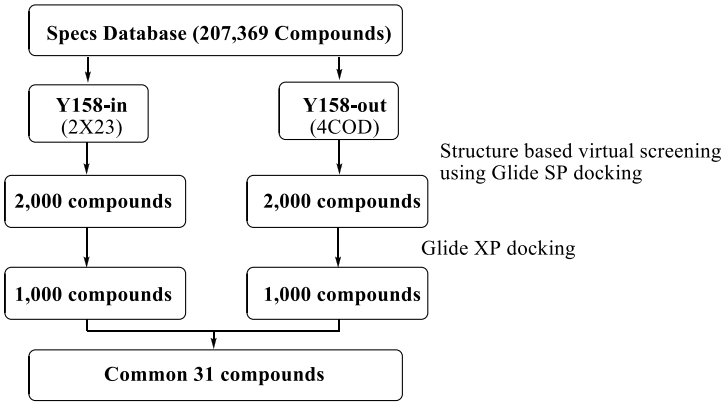


รูปที่ 10 การวางตัวของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA จากโครงสร้างเอกซเรย์และการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

การคัดสรรเสมือนจริงเพื่อหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่จากฐานข้อมูล Specs

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ฐานข้อมูล Specs ซึ่งมีโครงสร้างของลิแกนด์จำนวน 207,369 โครงสร้างเป็นฐานข้อมูลสารเพื่อที่จะค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ที่มีศักยภาพในการยับยั้งสูงตัวใหม่ โดยขั้นตอนในการคัดสรรเสมือนจริงในงานวิจัยนี้แสดงดัง**รูป 3** ในขั้นตอนแรกการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งโดยใช้ SP scoring ได้ถูกใช้ในการคำนวณการจับของลิแกนด์ทั้งหมดในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA แต่ละแบบและเลือกสารทั้งหมดจำนวน 2,000 ที่มีค่าพลังงานในการจับดีที่สุดในแต่ละโพรงการจับมาคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งซ้ำอีกครั้งโดยใช้ XP scoring ในขั้นตอนสุดท้ายเลือกสารทั้งหมด 1,000 ที่มีค่าพลังงานในการจับดีที่สุดในแต่ละโพรงการจับมาวิเคราะห์โดยเลือกสารที่พบได้ทั้งในโพรงการจับแบบ Y158-in และ Y158-out จำนวนทั้งหมด 31 โครงสร้างดังแสดงใน**ตารางที่ 9** โดยแบ่งออกเป็นสารอนุพันธ์ 5-oxo-3-pyrrolidine carboxamide (14

โครงสร้าง), สารอนุพันธ์ 1-(3-phenoxybenzyl)-4-(carbonyl)piperazine (3 โครงสร้าง), สารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3- aryloxypropan-2-ol (2 โครงสร้าง) , สารอนุพันธ์ 2-(3-benzoylphenyl)-N-phenyl propanamide (3 โครงสร้าง), สารอนุพันธ์ 2-(3-methoxyphenyl)-2-oxoethyl 3-(benzoyl amino) benzoate (2 โครงสร้าง) และกลุ่มสารอนุพันธ์อื่นๆอีกจำนวน 7 โครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 และ 1.10 ตามลำดับ



รูปที่ 11 ขั้นตอนการคัดสรรเสมือนจริงเพื่อหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่

ตารางที่ 9 สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่เลือกจำนวน 31 โครงสร้างและค่า Glide XP docking score

Cpd.	Specs ID	Name	Docking score (kcal/mol)	
			Y158-in	Y158-out
1	AK-918/40909651	2-(3-methoxyphenyl)-2-oxoethyl 3-(benzoylamino)benzoate	-9.68	-8.54
2	AG-690/40719693	1-(3-methoxybenzoyl)-4-(3-phenoxy benzyl)piperazine	-10.37	-8.28
3	AN-652/41793331	2-(3-benzoylphenyl)-*N*-(3-methyl phenyl)propanamide	-9.55	-8.23
4	AT-057/43313860	1-(3-phenoxybenzyl)-4-(phenylacetyl) piperazine	-10.99	-8.16
5	AT-057/43313837	1-(phenoxyacetyl)-4-(3-phenoxybenzyl) piperazine	-10.17	-8.07
6	AK-918/42905679	1-benzoylpropyl 1)-4-ethoxyphenyl-(5-oxo-3-pyrrolidinecarboxylate	-10.08	-8.03

ตารางที่ 9 สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่เลือกจำนวน 31 โครงสร้างและค่า Glide XP docking score (ต่อ)

Cpd.	Specs ID	Name	Docking score (kcal/mol)	
			Y158-in	Y158-out
7	AK-778/43464987	3-{2]-5)-4-chlorophenyl-(2-furyl-[2-oxoethyl}-3-hydroxy-1,3-dihydro-2H-indol-2-one	-9.58	-8.01
8	AT-057/43314035	1)-4-methoxybenzoyl-(4)]-2-naphthyloxy (acetyl[piperazine	-10.97	-7.79
9	AK-087/42718313	1]-4)-benzyloxy-(2-hydroxyphenyl-[2-)hydroxymethyl-(1-butanone	-10.90	-7.78
10	AK-918/42688804	1-methyl-2-oxo-2-phenylethyl 1-)3-methoxyphenyl-(5-oxo-3-pyrrolidine carboxylate	-9.90	-7.78
11	AN-652/42190908	2)-3-benzoylphenyl-(N)-2-methoxyphenyl (propanamide	-9.04	-7.77
12	AN-652/41793320	2)-3-benzoylphenyl-(N-phenyl propanamide	-9.87	-7.73
13	AK-968/15606121	N)-2-carbamoylphenyl-(5)-2,3-dihydro-1H-inden-5-yloxymethyl (furan-2-carboxamide	-11.05	-7.70
14	AK-918/42028907	N-{3]-2)-3-methoxyphenyl-(2-oxoethoxy[phenyl}-2-methyl benzamide	-9.26	-7.66
15	AK-918/42028944	N]-3)-1-methyl-2-oxo-2-phenylethoxy (phenyl-[2-thiophenecarboxamide	-9.61	-7.63
16	AK-968/40358194	4-methyl-N)-3-{)]4-methylbenzoyl (amino[methyl}benzyl(benzamide	-10.34	-7.61

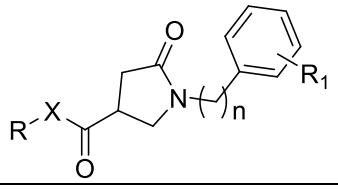
ตารางที่ 9 สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่เลือกจำนวน 31 โครงสร้างและค่า Glide XP docking score (ต่อ)

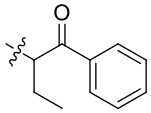
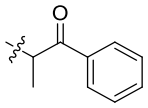
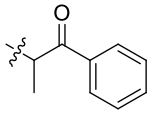
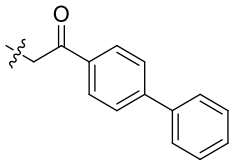
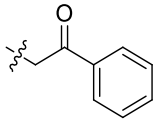
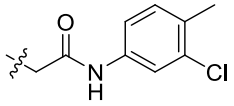
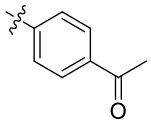
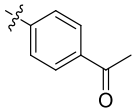
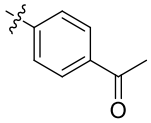
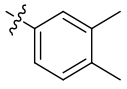
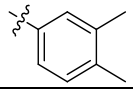
Cpd.	Specs ID	Name	Docking score (kcal/mol)	
			Y158-in	Y158-out
17	AK-918/41957257	2)-3-chloro-4-methylanilino-(2-oxoethyl 5-oxo-1-phenyl-3-pyrrolidinecarboxylate	-9.30	-7.50
18	AF-399/41615593	1])-1,1'-biphenyl-[4-yloxy-(3)-2-methyl-1H-benzimidazol-1-yl-(2-propanol	-10.16	-7.45
19	AK-918/42813987	N)-4-acetylphenyl-(1-benzyl-5-oxo-3-pyrrolidinecarboxamide	-10.11	-7.43
20	AK-918/42688743	1-methyl-2-oxo-2-phenylethyl 1-)2-ethylphenyl-(5-oxo-3-pyrrolidine carboxylate	-9.39	-7.42
21	AK-918/42814152	N)-4-acetylphenyl-(1)-3-chloro-4-methylphenyl-(5-oxo-3-pyrrolidine carboxamide	-10.19	-7.29
22	AK-918/43446442	3,4-dimethylphenyl 1)-3,4-dimethyl phenyl-(5-oxo-3-pyrrolidine carboxylate	-9.42	-7.28
23	AK-918/42813982	1-benzyl-N]-4)-3-methyl phenoxy (phenyl-[5-oxo-3-pyrrolidine carboxamide	-10.53	-7.22
24	AK-918/42905452	4-acetylphenyl 1)-4-methylphenyl-(5-oxo-3-pyrrolidinecarboxylate	-9.72	-7.18
25	AP-124/43238118	1-(1*H*-benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro- 1*H*- inden- 5- yloxy) - 2-propanol	-10.16	-7.14

ตารางที่ 9 สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่เลือกจำนวน 31 โครงสร้างและค่า Glide XP docking score (ต่อ)

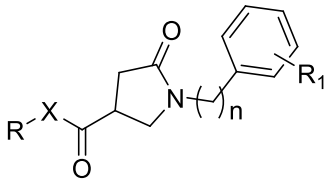
Cpd.	Specs ID	Name	Docking score (kcal/mol)	
			Y158-in	Y158-out
26	AN-988/41349156	3-[(1,1-dioxido-1,2-benzisothiazol-3-yl)amino]phenyl 1-(4-chlorophenyl)-5-oxopyrrolidine-3-carboxylate	-10.56	-6.99
27	AK-918/42813833	*N*-(4-acetylphenyl)-1-(3-methoxy phenyl)-5-oxo-3-pyrrolidine carboxamide	-9.54	-6.91
28	AN-919/13592066	3-{[2-(3-methoxyphenyl)ethyl]amino}-1-(4-methylphenyl)-2,5-pyrrolidine dione	-9.48	-6.90
29	AK-918/42905451	3,4-dimethylphenyl 1-(4-methyl phenyl)-5-oxo-3-pyrrolidine carboxylate	-9.19	-6.86
30	AG-205/36264055	2-[1,1'-biphenyl]-4-yl-2-oxoethyl 5-oxo-1-phenyl-3-pyrrolidinecarboxylate	-10.11	-6.84
31	AG-205/36264046	2-oxo-2-phenylethyl 1-(4-fluoro phenyl)-5-oxo-3-pyrrolidine carboxylate	-9.17	-6.84

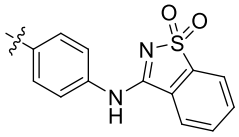
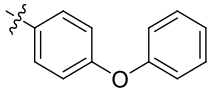
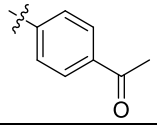
ตารางที่ 10 โครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ในกลุ่มของสารอนุพันธ์ 5-oxo-3-pyrrolidine carboxamide



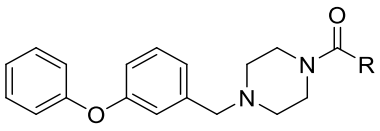
Cpd.	Specs ID	R	X	n	R_1
1	AK-918/42905679		O	0	4-OEt
2	AK-918/42688804		O	0	3-OMe
3	AK-918/42688743		O	0	2-Et
4	AG-205/36264055		O	0	H
5	AG-205/36264046		O	0	4-F
6	AK-918/41957257		O	0	H
7	AK-918/42814152		NH	0	3- Cl, 4-Me
8	AK-918/42813833		NH	0	3-OMe
9	AK-918/42905452		O	0	4-Me
10	AK-918/43446442		O	0	3,4-diMe
11	AK-918/42905451		O	0	4-Me

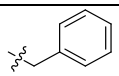
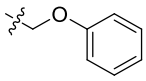
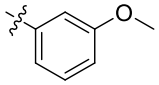
ตารางที่ 10 โครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ในกลุ่มของสารอนุพันธ์ 5-oxo-3-pyrrolidine carboxamide (ต่อ)



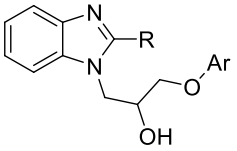
Cpd.	Specs ID	R	X	n	R_1
12	AN-988/41349156		O	0	4-Cl
13	AK-918/42813982		NH	1	H
14	AK-918/42813987		NH	1	H

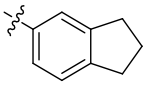
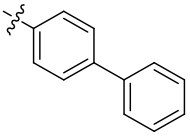
ตารางที่ 11 โครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ในกลุ่มของสารอนุพันธ์ 1-(3-phenoxybenzyl)-4-(carbonyl)piperazine



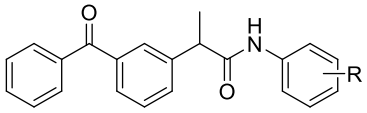
Cpd.	Specs ID	R
1	AT-057/43313860	
2	AT-057/43313837	
3	AG-690/40719693	

ตารางที่ 12 โครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ในกลุ่มของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3- aryloxypropan-2-ol



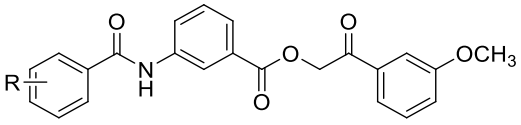
Cpd.	Specs ID	Ar	R
1	AP-124/43238118		H
2	AF-399/41615593		Me

ตารางที่ 13 โครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ในกลุ่มของสารอนุพันธ์ 2-(3-benzoylphenyl)-*N*-phenylpropanamide



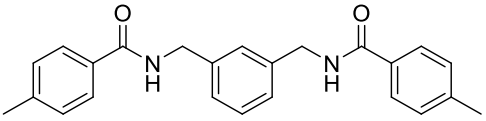
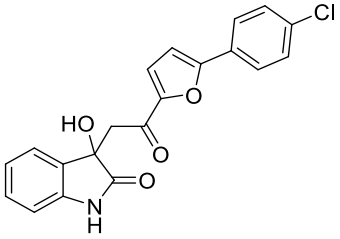
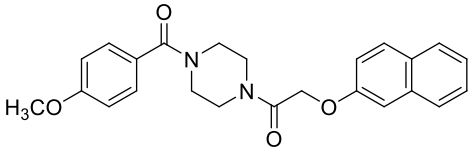
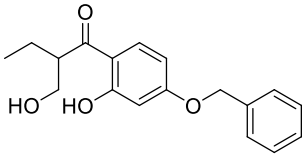
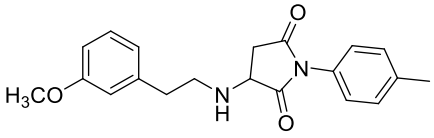
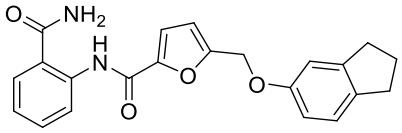
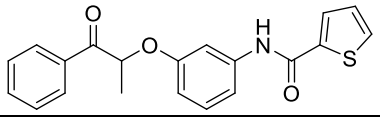
Cpd.	Specs ID	R
1	AN-652/41793331	3-Me
2	AN-652/42190908	2-OMe
3	AN-652/41793320	H

ตารางที่ 14 โครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ในกลุ่มของสารอนุพันธ์ 2-(3-methoxyphenyl)-2-oxoethyl 3-(benzoylamino)benzoate



Cpd.	Specs ID	R
1	AK-918/40909651	H
2	AK-918/42028907	2-Me

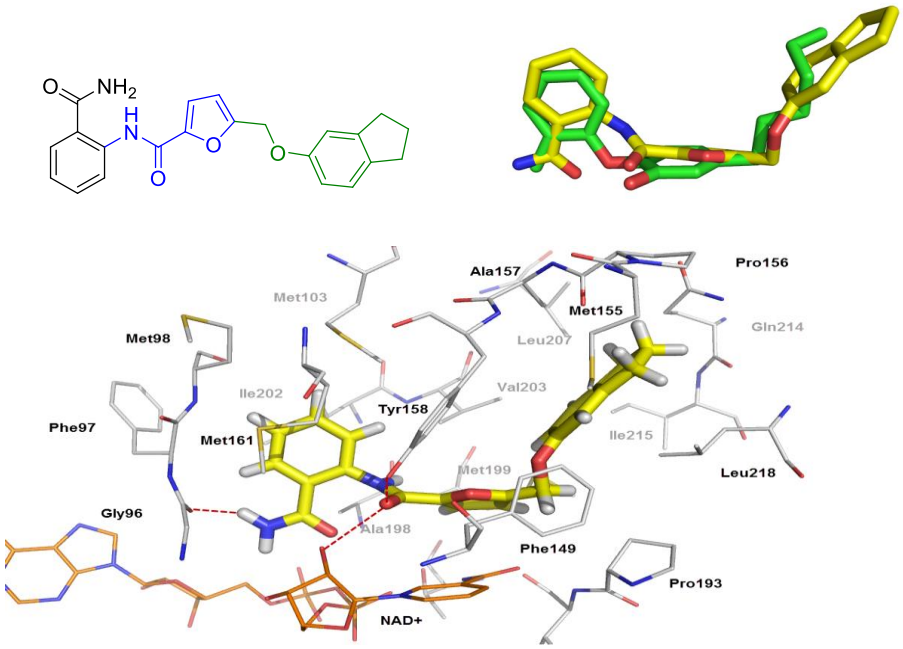
ตารางที่ 15 โครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ในกลุ่มของสารอนุพันธ์อื่นๆ

Cpd.	Specs ID	Structure
1	AK-968/40358194	
2	AK-778/43464987	
3	AT-057/43314035	
4	AK-087/42718313	
5	AN-919/13592066	
6	AK-968/15606121	
7	AK-918/42028944	

จากค่า Glide XP docking score ค่าพลังงานการจับของสารยับยั้งกลุ่มใหม่ในโพรงการจับ Y158-in มีค่าที่สูงกว่าในโพรการจับแบบ Y158-out และในงานวิจัยก่อนหน้านี้สารอนุพันธ์ 1-(3-phenoxybenzyl)-4-(carbonyl)piperazine ถูกรายงานฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรคและเอนไซม์ InhA (Kinjo et al., 2013; Kanetaka et al., 2015) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการที่ใช้ในการค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพใน นอกจากนี้สารอนุพันธ์ 1-(3-phenoxybenzyl)-4-(carbonyl)piperazine ยังมีค่า Glide XP docking score ในโพรงการจับแบบ Y158-in ที่สูงดังแสดงใน**ตารางที่ 9**

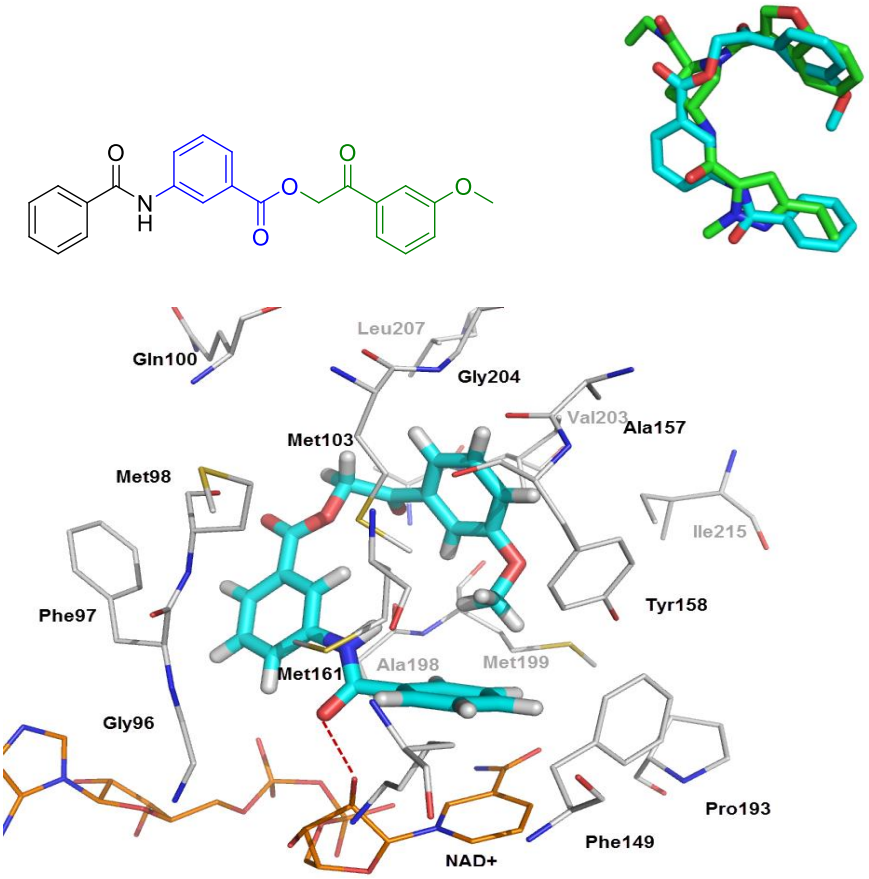
N-(2-carbamoylphenyl)-5-(2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yloxy methyl) furan-2-carboxamide (AK-968/15606121) เป็นสารที่มีค่า Glide XP docking score ในโพรงการจับแบบ Y158-in ที่สูงที่สุด โครงสร้างนี้ประกอบไปด้วย 2-carbamoylphenyl (สีดำ), furan-2-carboxamide (สีน้ำเงิน) และ 5-methoxy-2,3-dihydro-1*H*-indene (สีเขียว) ตามลำดับ ลักษณะการวางตัวในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA แสดงดัง**รูปที่ 4** โดยที่เกิดพันธะไฮโดรเจนขึ้น 3 ตำแหน่ง

ตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 2 หมู่คาร์บอนิลของ furan-2-carboxamide เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ OHของกรดอะมิโน Tyr158 และ nicotinamide ribose และพันธะไฮโดรเจนตำแหน่งสุดท้ายเกิดระหว่าง NH ของ 2-carbamoylphenyl กับหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโน Gly96 พันธะไพ-ไพระหว่างวง furan ring ของ furan-2-carboxamide กับวง nicotinamide ring ของ NAD^+ และวง phenyl ของ 5-methoxy-2,3-dihydro-1*H*-indene ซึ่งเกิดกับวง phenyl ของกรดอะมิโน Tyr158 ดังแสดงใน**รูปที่ 4** เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการจับระหว่าง AK-968/15606121ที่วางตัวในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA เมื่อเปรียบเทียบกับสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์ (PDB 2X23) ซึ่งสารทั้งสองโครงสร้างสามารถวางซ้อนทับกันได้เป็นอย่างดี วง 2-Carbamoylphenyl วงซ้อนทับกับวง phenyl B ของสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA หมู่เอไมด์ที่ตำแหน่ง *ortho* ของวง phenyl (2-carbamoylphenyl) วงซ้อนทับกับหมู่แทนที่ methyl ของสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์ นอกจากนี้ยังพบพันธะไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นในส่วนของหมู่ NH (primary amide) และหมู่คาร์บอนนิลของกระอะมิโน Gly96 ซึ่งอันตรกิริยานี้ไม่พบในสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์ เมื่อเรียบเทียบส่วนของ furan-2-carboxamide กับสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์พบว่าส่วนของหมู่คาร์บอนิลเกิดการวางตัวซ้อนทับกันกับหมู่ OH ของสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์และเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ OH ของกรดอะมิโน Tyr158 และ nicotinamide หมู่ NH ที่อยู่ระหว่างวง furan กับวง phenyl ของ 2-carbamoylphenyl ทำหน้าที่เปฝฝฝ



รูปที่ 12 ลักษณะการวางตัวในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของ AK-968/15606121

การวางตัวและอันตรกิริยาของสารที่มีค่าพลังงานในการจับจาก Glide XP ในโพรงการจับแบบ Y158-out คือ 2-(3-methoxyphenyl)-2-oxoethyl-3-(benzoylamino) benzoate (AK-918/ 40909651) โดยลักษณะในการวางตัวแสดงดัง**รูปที่ 12** โดยโครงสร้างประกอบด้วย 3 ส่วนหลักได้แก่ benzamide (สีดำ), benzoate (สีน้ำเงิน) และ 3'-methoxyacetophenone (สีเขียว) ตามลำดับ โดยฟมู่คาร์บอนิลของ benzamide วางตัวซ้อนทับกันกับวง pyrazole ของสารอนุพันธ์ benzofuran pyrrolidine pyrazole ส่วนของวง benzene วางตัวซ้อนทับกันกับหมู่แทนที่ ethyl ของวง pyrazole หมู่คาร์บอนิลเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ OH ของNAD^+ วง benzene เกิดอันตรกิริยาชนิดไพ-ไพและซิกมา-ไพกับวง nicotinamide ของ NAD^+ และกรดอะมิโนPhe149 ตามลำดับ วง benzoate วางตัวซ้อนทับกันกับ amide linker ของวง pyrrolidine ของสารอนุพันธ์ benzofuran pyrrolidine pyrazole ซึ่งส่วนนี้เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโพบิกกับกรดอะมิโน Gly96, Phe97, Met103, Met161 และ Ala198 ส่วนของวง 3'-Methoxyacetophenone วงตัวซ้อนทับกันกับวง benzofuran หมู่แทนที่คาร์บอนิลเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ NH ของกรดอะมิโน Ile202 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Met103, Gly104, Ala157, Tyr158, Met199, Ile202, Leu207 และ Ile215 ซึ่งสามารถยืนยันได้จากค่า Glide XP docking score ของสารต้นแบบ (Glide XP docking score = -8.54 kcal/mol) แต่อย่างไรก็ตามมีค่าที่น้อยกว่าสารอนุพันธ์ benzofuran pyrrolidine pyrazole (Glide XP docking score = -9.12 kcal/mol).



รูปที่ 13 ลักษณะการวางตัวในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของ AK-918/40909651

ฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อวัณโรคของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA

ตารางที่ 16 แสดงค่าฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อวัณโรคก่อนโรคของสารที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริง ซึ่งพบว่ามีสาร 2 ตัวคือ AK-968/15606121 และ AP-124/43238118 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรคเท่ากับ 100 (μg/ml) และ 50 (μg/ml) ตามลำดับ

ตารางที่ 16 ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเชื้อวัณโรคของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA

Cpd.	Specs ID	MIC (μg/ml)	Docking score (kcal/mol)	
			Y158-in	Y158-out
1	AK-918/40909651	>100	-9.68	-8.54
2	AG-690/40719693	>100	-10.37	-8.28
3	AN-652/41793331	>100	-9.55	-8.23
4	AT-057/43313860	>100	-10.99	-8.16
5	AT-057/43313837	>100	-10.17	-8.07
6	AK-918/42905679	>100	-10.08	-8.03
7	AK-778/43464987	>100	-9.58	-8.01
8	AT-057/43314035	>100	-10.97	-7.79
9	AK-087/42718313	>100	-10.90	-7.78
10	AK-918/42688804	>100	-9.90	-7.78
11	AN-652/42190908	>100	-9.04	-7.77
12	AN-652/41793320	>100	-9.87	-7.73
13	AK-968/15606121	100	-11.05	-7.70
14	AK-918/42028907	>100	-9.26	-7.66
15	AK-918/42028944	>100	-9.61	-7.63
16	AK-968/40358194	>100	-10.34	-7.61
17	AK-918/41957257	>100	-9.30	-7.50
18	AF-399/41615593	>100	-10.16	-7.45
19	AK-918/42813987	>100	-10.11	-7.43
20	AK-918/42688743	>100	-9.39	-7.42
21	AK-918/42814152	>100	-10.19	-7.29
22	AK-918/43446442	>100	-9.42	-7.28
23	AK-918/42813982	>100	-10.53	-7.22
24	AK-918/42905452	>100	-9.72	-7.18
25	AP-124/43238118	50	-10.16	-7.14
26	AN-988/41349156	>100	-10.56	-6.99
27	AK-918/42813833	>100	-9.54	-6.91
28	AN-919/13592066	>100	-9.48	-6.90
29	AK-918/42905451	>100	-9.19	-6.86
30	AG-205/36264055	>100	-10.11	-6.84
31	AG-205/36264046	>100	-9.17	-6.84

ผลการสร้างโคลนยีน InhA และการแสดงออกของยีน

RESULT OF SIX FRAME TRANSLATION

> gi|407313|gb|U02492.1|MTU02492 - 832 nucleotides

Translation in forward direction:

DNA: tgacacaacacaaggacgcacatgacaggactgctggacggcaaacggattctggttagc

+1fr: •*••H••N••T••R••T••H••M••T••G••L••L••D••G••K••R••I••L••V••S•

DNA: ggaatcatcaccgactcgtcgatcgcgtttcacatcgcacgggtagcccaggagcagggc

+1fr: •G••I••I••T••D••S••S••I••A••F••H••I••A••R••V••A••Q••E••Q••G•

DNA: gcccagctggtgctcaccgggttcgaccggctgcggctgattcagcgcatcaccgaccgg

+1fr: •A••Q••L••V••L••T••G••F••D••R••L••R••L••I••Q••R••I••T••D••R•

DNA: ctgccggcaaaggccccgctgctcgaactcgacgtgcaaaacgaggagcacctggccagc

+1fr: •L••P••A••K••A••P••L••L••E••L••D••V••Q••N••E••E••H••L••A••S•

DNA: ttggccggccgggtgaccgaggcgatcggggcgggcaacaagctcgacggggtggtgcat

+1fr: •L••A••G••R••V••T••E••A••I••G••A••G••N••K••L••D••G••V••V••H•

DNA: tcgattgggttcatgccgcagaccgggatgggcatcaacccgttcttcgacgcgccctac

+1fr: •S••I••G••F••M••P••Q••T••G••M••G••I••N••P••F••F••D••A••P••Y•

DNA: gcggatgtgtccaagggcatccacatctcggcgtattcgtatgcttcgatggccaaggcg

+1fr: •A••D••V••S••K••G••I••H••I••S••A••Y••S••Y••A••S••M••A••K••A•

DNA: ctgctgccgatcatgaaccccggaggttccatcgtcggcatggacttcgacccgagccgg

+1fr: •L••L••P••I••M••N••P••G••G••S••I••V••G••M••D••F••D••P••S••R•

DNA: gcgatgccggcctacaactggatgacggtcgccaagagcgcgttggagtcggtcaacagg

+1fr: •A••M••P••A••Y••N••W••M••T••V••A••K••S••A••L••E••S••V••N••R•

DNA: ttcgtggcgcgcgaggccggcaagtacggtgtgcgttcgaatctcgttgccgcaggccct

+1fr: •F••V••A••R••E••A••G••K••Y••G••V••R••S••N••L••V••A••A••G••P•

DNA: atccggacgctggcgatgagtgcgatcgtcggcggtgcgctcggcgaggaggccggcgcc

+1fr: •I••R••T••L••A••M••S••A••I••V••G••G••A••L••G••E••E••A••G••A•

DNA: cagatccagctgctcgaggagggctgggatcagcgcgctccgatcggctggaacatgaag
+1fr: •Q••I••Q••L••L••E••E••G••W••D••Q••R••A••P••I••G••W••N••M••K•

DNA: gatgcgacgccggtcgccaagacggtgtgcgcgctgctgtctgactggctgccggcgacc
+1fr: •D••A••T••P••V••A••K••T••V••C••A••L••L••S••D••W••L••P••A••T•

DNA: acgggtgacatcatctacgccgacggcggcgcgcacacccaattgctctaga
+1fr: •T••G••D••I••I••Y••A••D••G••G••A••H••T••Q••L••L••*•

WORKING SEQUENCE

>gi|407313|gb|U02492.1|MTU02492 Mycobacterium tuberculosis H37Rv isoniazid and ethionamide target protein (inhA) gene, complete cds

----------AGCATATGACAGGACTGCTGGAC----------[InhA NdeI-F03]

----------GGAATTCCATATGACAGGACTGCTGGACGGC----------[InhA NdeI-F02]

-CTTTAAGAAGGAGATATCATATGACAGGACTGCTGGACGGC—----------[InhA NdeI-F01]

TGACACAACACAAGGACGCACATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAA
TCATC

ACCGACTCGTCGATCGCGTTTCACATCGCACGGGTAGCCCAGGAGCAGGGCGCCCAGCTGGTGC
TCACC

GGGTTCGACCGGCTGCGGCTGATTCAGCGCATCACCGACCGGCTGCCGGCAAAGGCCCCGCTGC
TCGAA

CTCGACGTGCAAAACGAGGAGCACCTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCGATCGGG
GCGGGC

AACAAGCTCGACGGGGTGGTGCATTCGATTGGGTTCATGCCGCAGACCGGGATGGGCATCAACC
CGTTC
TTCGACGCGCCCTACGCGGATGTGTCCAAGGGCATCCACATCTCGGCGTATTCGTATGCTTCGA
TGGCC

AAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCCGGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCC
GGGCG

ATGCCGGCCTACAACTGGATGACGGTCGCCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCGTGG
CGCGC

GAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTCGAATCTCGTTGCCGCAGGCCCTATCCGGACGCTGGCGA
TGAGT

GCGATCGTCGGCGGTGCGCTCGGCGAGGAGGCCGGCGCCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGC
TGGGAT

CAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGGATGCGACGCCGGTCGCCAAGACGGTGTGCGCG
CTGCTG

TCTGACTGGCTGCCGGCGACCACGGGTGACATCATCTACGCCGACGGCGGCGCGCACACCCAAT
TGCTC

TAGA

[InhA BamHI-R01]----------CCAATTGCTCTAGGATCCGGCGTC

[InhA BamHI-R02]----------TCCCAATTGCTCTAGGATCCG

10 20 30 40 50 60
MTGLLDGKRI LVSGIITDSS IAFHIARVAQ EQGAQLVLTG FDRLRLIQRI TDRLPAKAPL

70 80 90 100 110 120
LELDVQNEEH LASLAGRVTE AIGAGNKLDG VVHSIGFMPQ TGMGINPFFD APYADVSKGI

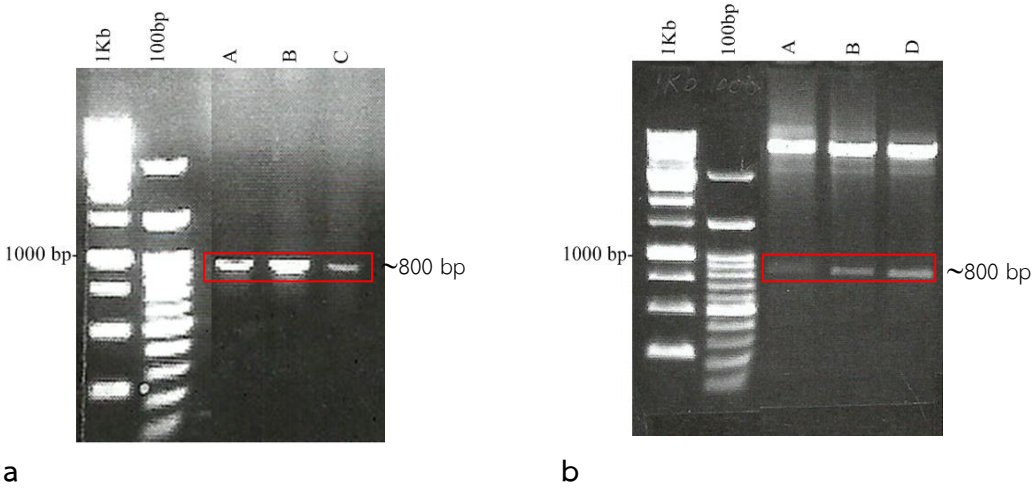
130 140 150 160 170 180
HISAYSYASM AKALLPIMNP GGSIVGMDFD PSRAMPAYNW MTVAKSALES VNRFVAREAG

190 200 210 220 230 240
KYGVRSNLVA AGPIRTLAMS AIVGGALGEE AGAQIQLLEE GWDQRAPIGW NMKDATPVAK

250 260
TVCALLSDWL PATTGDIIYA DGGAHTQLL

นำพลาสมิด DNA InhA ที่สกัดได้โดยการออกแบบ forward primer : 5′- CTTTAAGAAGGAGATATCATATGACAGGACTGCTGGACGGC -3′ และ reverse primer : 5′- TCCCAATTGCTCTAGGATCCG -3′ ตามลำดับผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing (Ta) ที่ 57 องศาเซลเซียส จำนวน 30 รอบ แล้วทำการวิเคราะห์ขนาดของ PCR products ที่ได้ด้วย 15% (w/v) Agarose gel electrophoresis พบแถบ PCR products ขนาด 800 bp. (**รูปที่ 14**)

ชิ้นส่วนของ PCR products ที่ได้คาดว่าเป็นยีน InhA ของโคโลนี 10, 14 และ 15 (A, B และ C) ที่มีลำดับเบส 800 bp. ที่สามารถถอดรหัสจากกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง M001 ถึง L269 ของโปรตีน InhA ซึ่งมีตำแหน่งที่สามารถตัดด้วย NdeI และ BamHI ที่ตำแหน่งปลาย 5′ และ 3′ จากการออกแบบด้วย forward และ reverse primers ตามลำดับ ซึ่งทำให้สามารถตัดต่อลงใน pET15b vector ที่ตัด restriction enzymes ที่ตำแหน่งเดียวกันเป็นผลทำให้ได้ plasmid ของ InhA ขนาด 800 bp.



a b

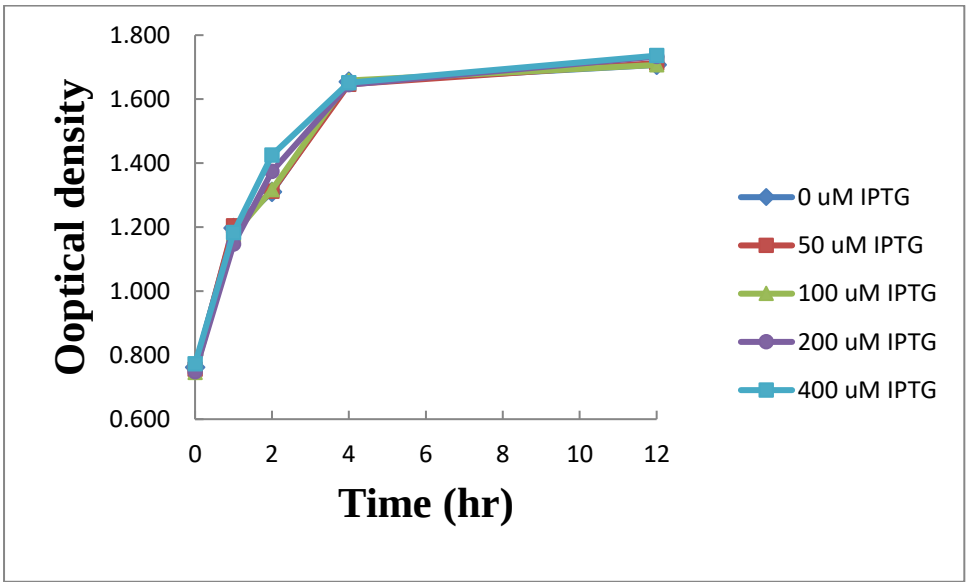
รูปที่ 14 (a) PCR products และ (b) Digested with NdeI/BamHI ที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย 1.5% (w/v) Agarose gel electrophoresis

การผลิตโปรตีนจากเอนไซม์ InhA (InhA protein expression)

การเหนี่ยวนำให้เซลล์ของเอนไซม์ InhA ผลิตโปรตีนดังกล่าวด้วย IPTG เป็นผลทำให้recombinant leptin มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลา และความเข้มข้นของ IPTG ดัง**ตารางที่ 17-19**

ตารางที่ 17 ค่าความทึบแสง (OD) ของการผลิตโปรตีนของเอนไซม์ InhA จาก competent cell BL21

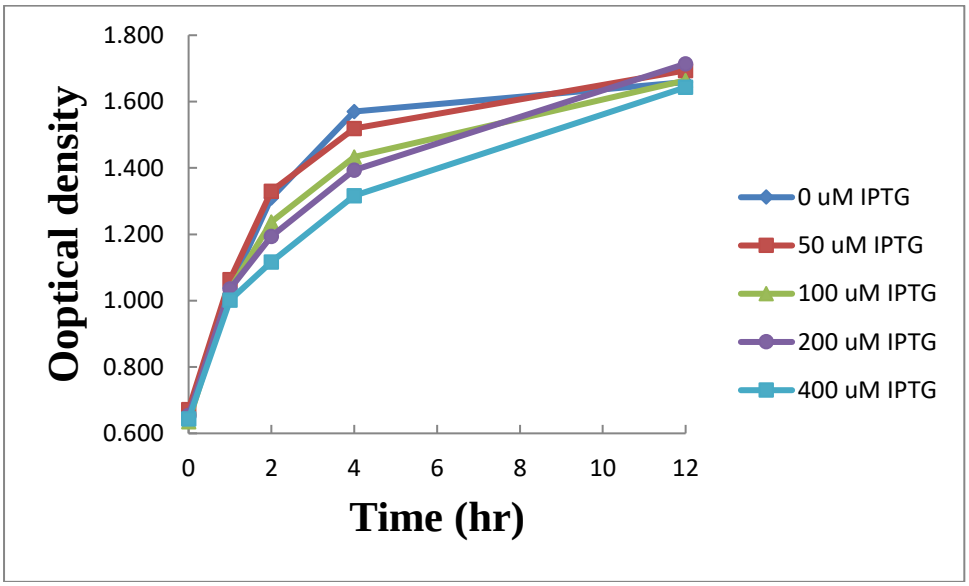
เวลา (hr)	ความเข้มข้นของ IPTG (μM)				
	0	50	100	200	400
0	0.762	0.756	0.746	0.748	0.773
1	1.197	1.204	1.177	1.147	1.183
2	1.310	1.312	1.317	1.374	1.425
4	1.654	1.646	1.658	1.645	1.651
12	1.707	1.713	1.707	1.733	1.736



รูปที่ 15 กราฟแสดงการผลิตโปรตีนของเอนไซม์ InhA จาก competent cell BL21 ระหว่างเวลาและความเข้มข้นของ IPTG

ตารางที่ 18 ค่าความทึบแสง (OD) ของการผลิตโปรตีนของเอนไซม์ InhA จาก competent cell BL21-DE3

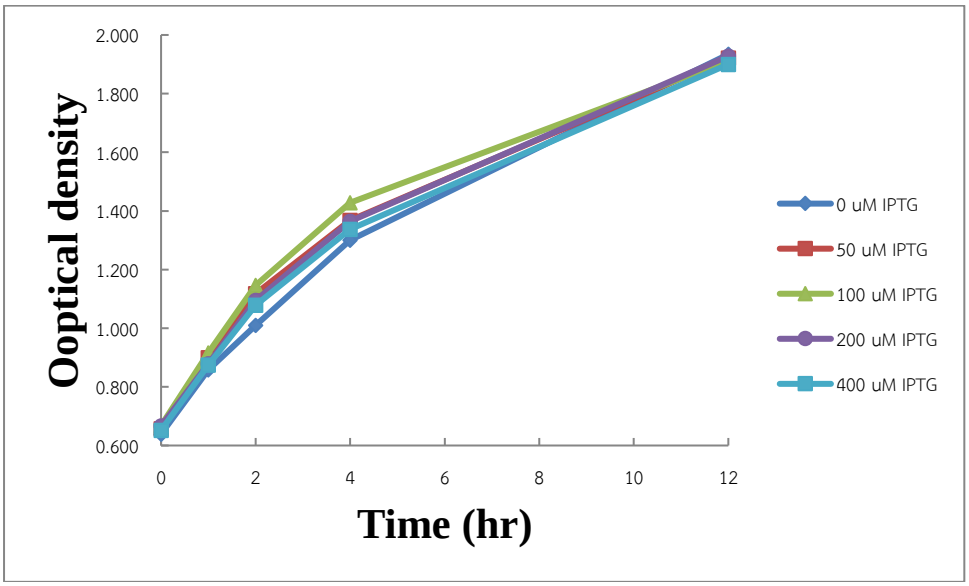
เวลา (hr)	ความเข้มข้นของ IPTG (μM)				
	0	50	100	200	400
0	0.648	0.672	0.635	0.654	0.644
1	1.038	1.064	1.035	1.036	1.002
2	1.310	1.330	1.237	1.194	1.117
4	1.570	1.519	1.433	1.394	1.316
12	1.659	1.694	1.664	1.714	1.643



รูปที่ 16 กราฟแสดงการผลิตโปรตีนของเอนไซม์ InhA จาก competent cell BL21-DE3 ระหว่างเวลาและความเข้มข้นของ IPTG

ตารางที่ 19 ค่าความทึบแสง (OD) ของการผลิตโปรตีนของเอนไซม์ InhA จาก competent cell BL21-DE3(Lys)

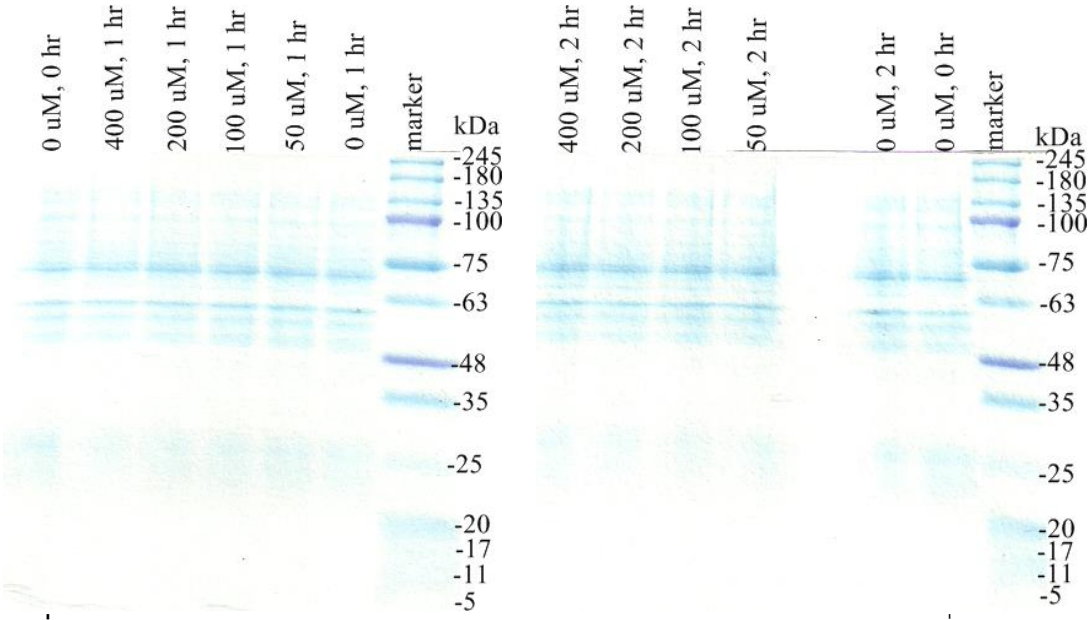
เวลา (hr)	ความเข้มข้นของ IPTG (μM)				
	0	50	100	200	400
0	0.639	0.657	0.668	0.667	0.652
1	0.858	0.899	0.916	0.879	0.874
2	1.010	1.118	1.146	1.095	1.079
4	1.300	1.368	1.428	1.364	1.337
12	1.934	1.921	1.912	1.928	1.900



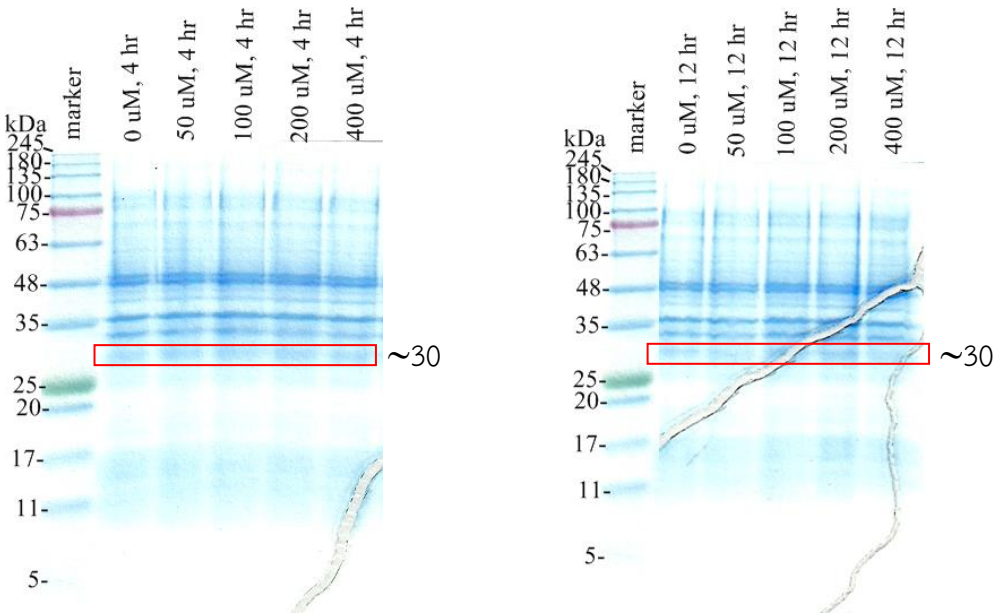
รูปที่ 17 กราฟแสดงการผลิตโปรตีนของเอนไซม์ InhA จาก competent cell BL21-DE3(lys) ระหว่างเวลาและความเข้มข้นของ IPTG

จากขอมูลค่าความทึบแสง (OD) ของการผลิตโปรตีนของเอนไซม์ InhA จาก competent cell BL21, BL21-DE3 และ BL21-DE3(Lys) พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาเริ่มต้นจาก 0-12 ชั่วโมง และเพิ่มความเข้มข้นของ IPTG เริ่มต้นจาก 50-400 μM จะส่งผลให้เกิดการผลิตโปรตีนเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของ IPTG ที่มากขึ้นจะส่งผลให้เซลล์เกิดความเครียดที่มากขึ้นจึงอาจจะส่งผลให้เซลล์ตายและผลิตโปรตีนที่น้อยลง ซึ่งจากข้อมูลจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มเวลาและความเข้มข้นของ IPTG เป็นเท่าตัว การผลิตโปรตีนกลับไม่เพิ่มปริมาณที่เป็นเท่าตัวตามเวลาและความเข้มข้นของ IPTG ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเลือกระบบในการผลิตโปรตีนจากเอนไซม์

InhA ที่ความเข้มข้น ของ competent cell BL21 และ BL21-DE3 มารันด้วย 15% (w/v) Agarose gel electrophoresis เพื่อหาระบบในการผลิตโปรตีน ดัง**รูปที่ 17-20** โดยจะต้องมีโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 30 kDa ขึ้นที่แผ่น 15% (w/v) Agarose gel ส่วน competent cell BL21-DE3(Lys) มีการผลิตโปรตีนที่ค่อนข้าวต่ำในระยะเวลาที่น้องกว่าจึ่งไม่นำมาหาระบบการผลิตโปรตีน

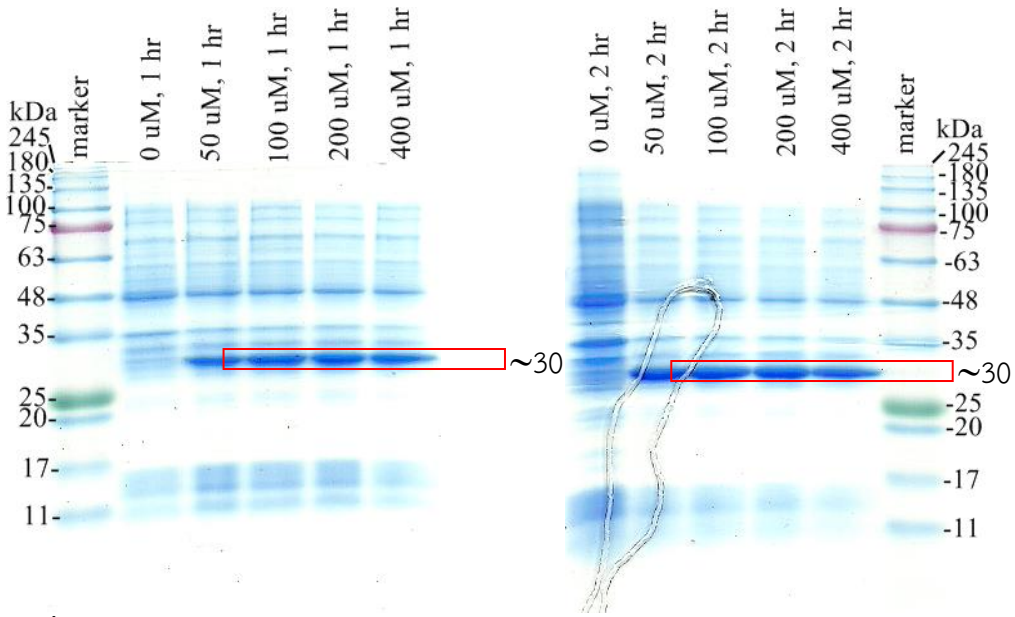


รูปที่ 18 15% (w/v) Agarose gel electrophoresis ของ competent cell BL21 ที่เวลา 1 และ 2 ชั่วโมง

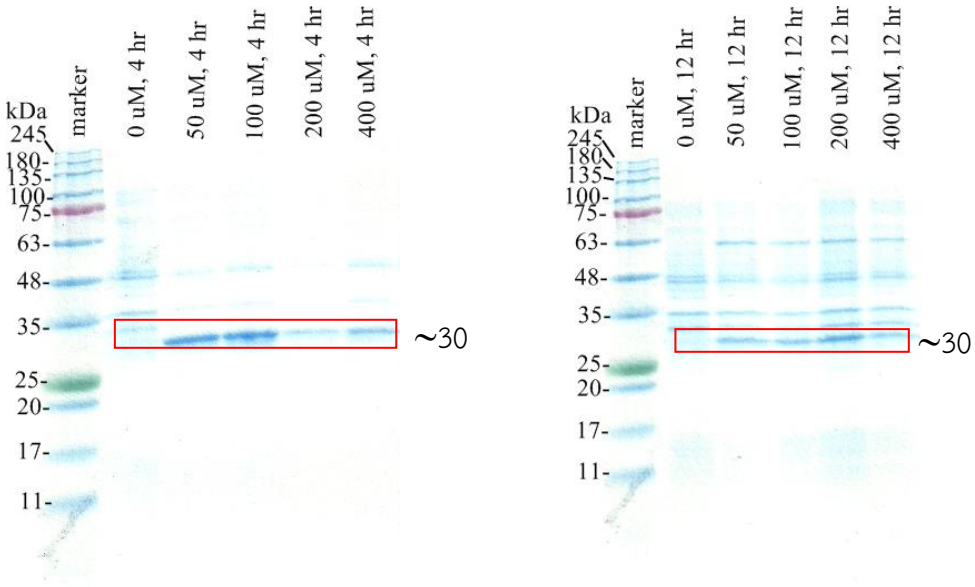


รูปที่ 19 15% (w/v) Agarose gel electrophoresis ของ competent cell BL21 ที่เวลา 4 และ 12 ชั่วโมง

จาก**รูปที่ 18-19** พบว่า เมื่อทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตของโปรตีนด้วย 50-400 µM IPTG ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ไม่มีการผลิตโปรตีน และที่เวลา 4 และ 12 ชั่วโมง มีการผลิตโปรตีนเกิดขึ้นที่ความเข้มข้น 50-400 µM แต่มีการผลิตโปรตีนที่ยังต่ำ และจะเห็นได้ว่าที่เวลา 4 และ 12 ชั่วโมง ที่ไม่ได้มีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG (0 µM IPTG) เกิดการผลิตโปรตีนเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มเวลาในการเหนี่ยวนำขึ้นที่ความเข้มข้นต่างๆจะเกิดการผลิตโปรตีนที่มากขึ้น



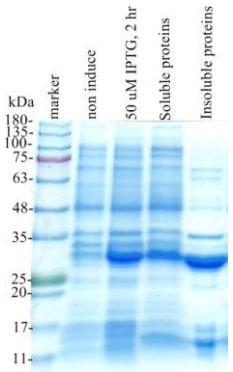
รูปที่ 20 15% (w/v) Agarose gel electrophoresis ของ competent cell BL21-DE3 ที่เวลา 1 และ 2 ชั่วโมง



รูปที่ 21 15% (w/v) Agarose gel electrophoresis ของ competent cell BL21-DE3 ที่เวลา 4 และ 12 ชั่วโมง

จาก**รูปที่ 18-21** พบว่า เมื่อทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตของโปรตีนด้วย 50-400 μM IPTG ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 4 และ 12 ชั่วโมง มีการผลิตโปรตีนที่ความเข้มข้น 50-400 μM IPTG และที่เวลา 1 และ 2 ชั่วโมงมีการผลิตโปรตีนที่มากสุดเมื่อเทียบกับเวลาที่นานขึ้น (4 และ 12 ชั่วโมง) จะมีการผลิตโปรตีนที่น้อยลงอาจเนื่องมาจาก เมื่อเวลานานขึ้นเซลล์อาจเกิดความเครียดมากเกินไปจึงก่อให้เกิดการหยุดผลิตโปรตีน หรือผลิตโปรตีนที่น้อยลง และจะเห็นได้ว่าที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG (0 μM IPTG) ไม่เกิดการผลิตโปรตีน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มเวลาในการเหนี่ยวนำขึ้นที่ความเข้มข้นต่างๆจะเกิดการผลิตโปรตีนที่มากขึ้น

การตรวจสอบผลการผลิตโปรตีนจากเอนไซม์ InhA พบว่า ระบบที่ผลิตโปรตีนที่เหมาะสมคือ competent cell BL21-DE3 ที่ความเข้มข้น 50 μM IPTG เวลา 2 ชั่วโมง โดยโปรตีนดังกล่าวมีขนาดประมาณ 30 kDa (**รูปที่ 18**) ใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้ และจากนั้นตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนที่ได้ด้วยการทำให้เซลล์แตกและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เพื่อแยกเก็บระหว่างส่วนของ supernatant fractions ที่มีโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (soluble proteins) และ Pellet fraction ที่มีโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble proteins) อยู่ผลที่ได้ พบว่า โปรตีน InhA อยู่ในรูปของโปรตีนที่ละลายน้ำ หรือ soluble form ที่พบในชั้นของ supernatant ตรวจสอบตำแหน่งและชนิดของแบนโปรตีนผลสอดคล้องกับ SDS-PAGE (**รูปที่ 1**9) น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน InhA ที่ได้ใกล้เคียงกับค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการทำนายโดยใช้โปรแกรม Compute pI/Mw มีจำนวนกรดอะมิโนทั้งหมด 289 ตัว ค่าTheoretical pI/ Mw เท่ากับ 5.73 / 28527.84 Da (∼30 kDa)ดังนั้นจึงสามารถสรุประบบที่ใช้ในการผลิตโปรตีน InhA ได้ คือ ระบบการเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้น 50 μM IPTG นาน 2 ชั่วโมง และได้เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำ

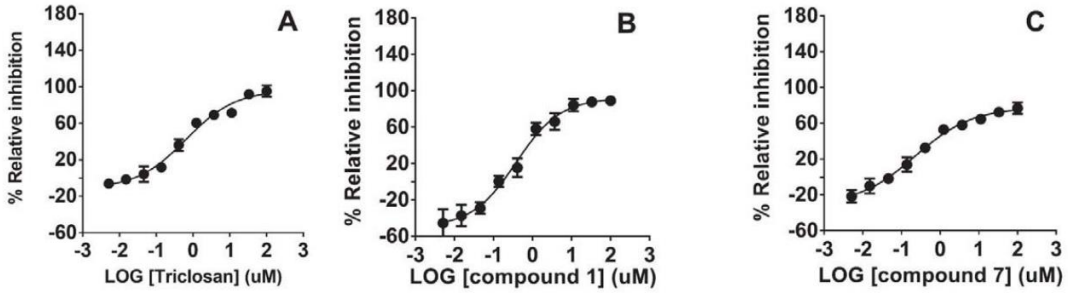


รูปที่ 22 15% (w/v) Agarose gel electrophoresis ของ competent cell BL21-DE3 ที่ละลายในสารละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ของสารที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริงทั้ง 16 โครงสร้างพบว่ามีสารทั้งหมด 2 โครงสร้างที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้มากกว่า 60 % คือสารหมายเลข 1 และ 7 ดังแสดงในตารางที่ 20 ซึ่งมีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานไตรโคซาน

ตารางที่ 20. The percentage InhA inhibition and IC_{50} values of hit compounds

Compound no	MIC (ug/ml)	% Relative inhibition at 1 uM	IC_{50} (uM)
1	100	66	0.38±0.98
2	>100	48	NT
3	>100	23	NT
4	>100	44	NT
5	>100	58	NT
6	>100	4	NT
7	50	62	0.22±0.97
8	>100	44	NT
9	>100	21	NT
10	>100	45	NT
11	>100	50	NT
12	>100	48	NT
13	>100	57	NT
14	>100	58	NT
15	>100	14	NT
16	>100	35	NT
Triclosan	50	70	0.60±0.94



รูปที่ 23 IC_{50} curves fitting for the inhibition of InhA by selected compounds at various concentrations

การตกผลึกเอนไซม์และการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลึกของเอนไซม์ InhA ถูกสร้างโดยการใช้สภาวะที่คล้ายคลึงกันกับที่มีรายงานก่อนหน้านี้โดยใช้วิธี sitting-drop vapor diffusion ในถาดหลุมชนิด 24 หลุม โดยในแต่ละหลุมจะประกอบไปด้วย 1.5 µl ของ InhA ความเข้มข้น 13 mg/ml และ 1 µl ของ reservoir solution (17% w/v PEG 4000, 0.1 M ADA pH 6.8, 6 mM DMSO, 0.1 M ammonium acetate, 1% glycerol, 4.5 mM NAD^+) โดยบ่มที่ 19°C จนกว่าผลึกจะมีขนาดใหญ่ที่สุด โดยจะพบได้ในระยะ 3 -5 วัน หลังจากนั้นผลึกของเอนไซม์ InhA กับสารหมายเลข 7 ถูกเตรียมโดยใช้วิธี soaking crystal โดยใช้สารหมายเลข 7 ความเข้มข้น 10 mM ในสารละลาย 25% glycerol v/v, 17% w/v PEG 4000, 0.1 M ADA pH 6.8, 6 mM DMSO, 0.1 M ammonium acetate, 1% glycerol, 4.5 mM NAD^+ หลังจากนั้นนำเอาผลึกที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้รังสีเอ็กซ์ที่อุณหภูมิ 100 K (beamline I03, Diamond Light Source, United Kingdom) ร่วมกับเทคนิค XDS ใน Xia2 pipeline และขนาดโดยใช้ Aimless ในโปรแกรม CCP4 เฟสของผลึกเอนไซม์ถูกวิเคราะห์โดย Phaser โดยใช้ผลึกเอนไซม์ PDB code 4BQP เป็นแบบจำลองเริ่มต้นซึ่งให้ลักษณะผลึกแบบ asymmetric unit หลังจากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลโครงสร้างอย่างละเอียด (refinement) โดยใช้ Refmac5 ในโปรแกรม Coot ในส่วนของโครงสร้างของลิแกนด์ถูกสร้างโดยใช้ ProDRG server และวิเคราะห์โดย eLBOW ในโปรแกรม Phenix หลังจากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างของลิแกนด์ที่จับโดยละเอียดโดยใช้ Coot และ Phenix ตรวจสอบความถูกต้องโดย MolProbity และ Phenix และนำเอาข้อมูลโครงสร้างที่วิเคราะห์ได้เข้าสู่ฐานข้อมูลผลึกโปรตีน (Protein databank) โดยได้รับ PDB code คือ 6R9W

ผลการวิเคราะห์ผลึกของสารยับยั้งหมายเลข 7 ในเอนไซม์ InhA

สารยับยั้งหมายเลข 7 ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ซึ่งเป็นสารยับยั้งตัวใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนถูกนำมาวิเคราะห์การจับในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA โดยใช้เทคนิคผลึกเอกซเรย์ เอนไซม์ InhA บริสุทธิ์ถูกตกผลึกร่วมกับ NADH และได้ลักษณะผลึกแบบ C2 crystal จากวิธีการตกผลึกแบบ hanging-drop vapor diffusion โดยนำเอาผลึกที่ได้มาแช่ในสารละลายของสารยับยั้งก่อนที่จะทำให้อยู่ในสภาวะเยือกแข็งและวิเคราะห์โดยวิธี

ผลึกรังสีเอ็กซ์ โดยให้ค่าจากการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดคือ resolution เท่ากับ 1.75 Å แสดงดังตารางที่ 2 หลังจากการวิเคราะห์โดยละเอียดพบความ

แตกต่างของความหนาแน่นอิเล็กตรอน (Fo – Fc) ที่เป็นแบบ positive โดยเป็นโครงสร้างของสารยับยั้งหมายเลข 7 ใรแผนภาพอิเล็กตรอนเพียง 1 โครงสร้างจากโครงสร้างของเอนไซม์ InhA ที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด 6 โครงสร้าง โดยที่ผลึกของเอนไซท์ InhA ที่พบมีลักษณะแบบ asymmetric unit โดยได้ค่า real-space correlation coefficient (RSCC) จากการวิเคราะห์ข้อมูลการจับของสารหมายเลข 7 เท่ากับ 0.897 ซึ่งให้ค่าที่น่าเชื่อถือและยอมรับได้ แสดงว่าโครงสร้างสารหมายเลข 7 สอดคล้องกับความหนาแน่นของอิเล็กตรอนที่ได้จากการทดลอง มีค่า B-factor เฉลี่ยการจับของสารยับยั้งเท่ากับ 31.66 $Å^2$ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของโคแฟกเตอร์ซึ่งอยู่ในรูปของ NAD^+ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยจากทั้ง 6 โครงสร้าง InhA เท่ากับ 33.64 $Å^2$ ลักษณะการวางตัวและการจับของสารยับยั้งหมายเลข 7 ในเอนไซม์ InhA แสดงดังรูปที่ 5

สารหมายเลข 7 จับกับเอนไซม์ InhA ในโพรงการจับไฮโดรโพบิก โดยวงอินแดน (indane) เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโพบิกกับกรดอะมิโน Phe149, Met155, Pro156, Ala157, Ile215 และ Leu218 วงเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) เกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโน Met103, Ala198, Met199, Ile202 และ Leu207 หมู่ไฮดรอกซิลของสารหมายเลข 7 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ Ala211 (backbone) ผ่านโมเลกุลของน้ำ โดย Tyr158 วางตัวในลักษณะ “in” คอนฟอร์เมชันเมื่อจับกับสารยับยั้ง ในโมเลกุลอื่นๆของ InhA ซึ่งมีลักษณะ asymmetric unit feature มีการวางตัวของ Tyr158 “in” คอนฟอร์เมชันในโมเลกุล B และ D การวางตัวของ Tyr158 แบบ “out” คอนฟอร์เมชันในโมเลกุล C และ F นอกจากนี้พบได้ทั้ง 2 แบบใน Tyr158 ในโมเลกุล E แสดงให้เห็นว่าการวางตัวของ Tyr158 นั้นสามารถที่จะวางตัวกันได้หลายแบบขึ้นอยู่กับลักษณะของผลึก เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างของ InhA ที่จับกับสารยับยั้งหมายเลข 7 และโครงสร้างที่เป็นแบบ “out” คอนฟอร์เมชัน พบว่าวงอินแดนของสารยับยั้งหใยเลข 7 มีส่วนทำให้การวางตัวของ Tyr158 เป็นแบบ “in” คอนฟอร์เมชันเมื่อจับกับสารยับยั้งหมายเลข 7 นอกจากนี้ยังพบว่าการวางตัวของสารยับยั้งหมายเลข 7 วางตัวห่างจากโคแฟกเตอร์ (NAD+) โดยมีระยะห่างระหว่างวงเบนซิมิดาโซลกับวงนิโคตินนาไมด์และหมู่ไพโรฟอสเฟตเท่ากับ 6.97 Å และ 6.58 Å ตามลำดับ

เอนไซม์ InhA เป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจในการพัฒนาสารยับยั้งวัณโรคโดยมุ่งเน้นการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยตรงโดยมีรายงานผลึกโปรตีน ดังนั้นจึงได้เปรียบเทียบผลึกเอกซเรย์เอนไซม์ InhA ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ InhA หมายเลข 7 นั้นสอดคล้องกัน เมื่อเปรียบเทียบการวางตัวของสารยับยั้งหมายเลข 7 กับซับสเตรทของเอนไซม์ InhA (*trans*-2-hexadecenoyl-(*N*-acetylcysteamine)-thioester) ซึ่งวางตัวในลักษณะ U-shaped conformation โดยมี cysteamine/thioester เป็นส่วนหัวและ aliphatic เป็นส่วนหางโดยเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโพบิกกับกรดอะมิโน Met103, Phe149, Met161, Ala198, Met199, Ala201, Ile202, Leu207, Ile215 และ Leu218 ซึ่งเป็นส่วนที่รายงานการเกิดอันตรกิริยาเช่นเดียวกันกับสารหมายเลข 7 โดยบริเววณการวางตัวของสารหมายเลข 7 วางตัวในตำแหน่งของไตรโคซานท่างตัวในตำแหน่งมรา 2 (site II) จากรายงานของผลึกเอกซเรย์ PDB 1P45 แต่อย่างไรก็ตามโครงสร้างของไตรโคซานมีโครงสร้างที่คล้ายกันกับโครงสร้างของสารอนุพันธ์ไดฟีนอลอีเทอร์ ซึ่งวางตัวใกล้กันกับโคแฟกเตอร์ NAD(H) ซึ่งอยู่บริเวณใกล้กับ THT cysteamine ซึ่งบริเวณที่พบได้ในตำแหน่งโพรงการจับที่ 2

นั้นไม่สามารถพบได้โดยทั่วไป นอกจากนี้การวางตัวของ Tyr158 วางตัวในลักษณะ “in” คอนฟอร์เมชัน จะเกิดขึ้นเมื่อ H6 alpha helix (residues 196 – 206) เป็นแบบเปิด (open) โครงสร้างเอนไซม์ InhA นั้นสามารถปรับได้หลายคอนฟอร์เมชั่นดังนั้นจึงสามารถที่จะสรุปได้ว่าสารหมายเลข 7 วางตัวในบริเวณเดียวกันกับซับสเตรท

เมื่อเปรียบเทียบการวางตัวของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ที่เกิดอันตรกิริยาหลักกับโคแฟกเตอร์ ซึ่งมีส่วนของของโครงสร้างที่ซ้อนทับกันกับโครงสร้างอินแดนของสารหมายเลข 7 ได้แก่ หมู่อัลคิลของ diaryl ether 8PS (PDB 2B37) หมู่ fluoroenyl ของ carboxamide GENZ10850 (PDB 1P44) และวงเบซิมิดาโซลกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ pyridomycin (chain D ของ PDB 4BII) หมู่ 2-chloro-6-fluoro ของ PDB 5JF0 ซึ่งไม่สามารถพบได้ในโครงสร้างของผลึกเอนไซม์ InhA ตัวอื่นๆ

ตารางที่ 21 ค่าข้อมูลจากรังสีเอ็กซ์และการวิเคราะห์โครงสร้างผลึก

Data collection[a]	
Beamline	DLS I03
Space group	*C*2
Molecules/ASU	6
Cell dimensions	
a, *b*, *c* (Å)	100.90, 81.60, 189.42
α, β, γ (°)	90.0, 95.52, 90.0
Wavelength(s) (Å)	0.97624
Resolution (Å)*	43.32 – 1.75 (1.78 – 1.75)
R_{pim}	0.046 (0.389)

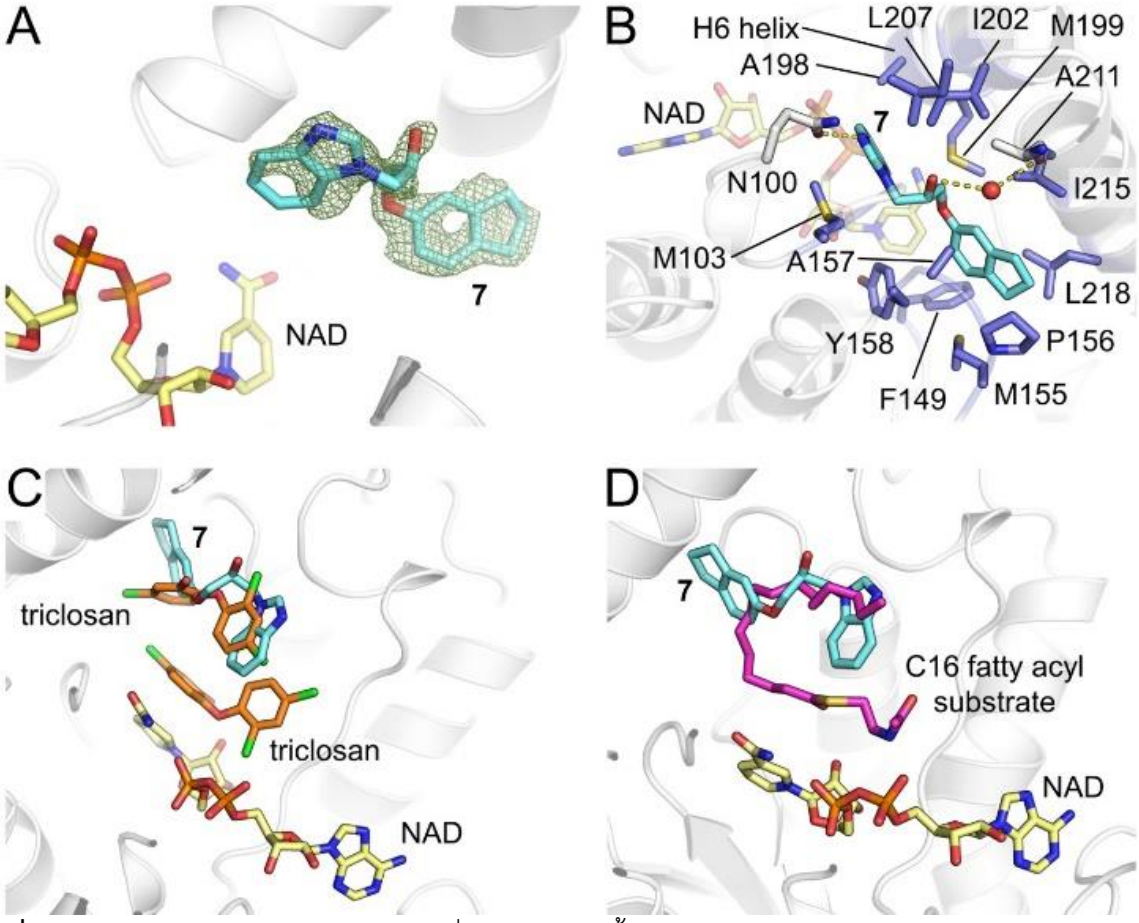
ตารางที่ 21 ค่าข้อมูลจากรังสีเอ็กซ์และการวิเคราะห์โครงสร้างผลึก(ต่อ)

Cell dimensions	
$CC_{1/2}$	0.997 (0.765)
I / **σ**(I)	10.1 (2.3)
Completeness (%)	99.3 (98.4)
Redundancy	6.9 (6.8)
Refinement	
Resolution (Å)	43.317 – 1.75
No. reflections	152,796
R_{work} / R_{free}	0.1871 / 0.2269
No. non-H atoms	
Protein	11795
Solvent	1031
Inhibitor	23
NAD	264
B-factors	
Protein	39.87
Solvent	38.06
Inhibitor	31.66

ตารางที่ 21 ค่าข้อมูลจากรังสีเอ็กซ์และการวิเคราะห์โครงสร้างผลึก(ต่อ)

B-factors	
NAD	33.64
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.017
Bond angles (°)	1.480
Ramachandran (%)	
Outliers	0.00
Favoured	95.94
PDB code	6R9W

[a] ข้อมูลจากการวิเคราะห์ที่ได้คือ highest-resolution shell

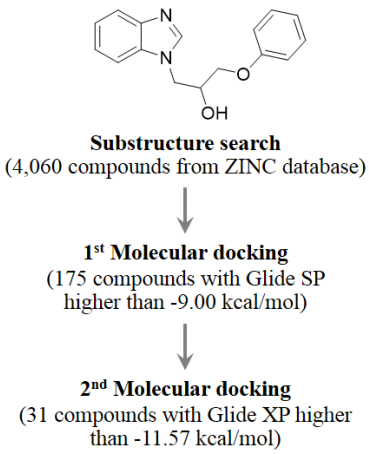


รูปที่ 24 โครงสร้างผลึกของเอนไซม์ InhA ที่จับกับสารยับยั้งหมายเลข 7 กับโครงสร้างผลึกเอนไซม์ InhA อื่นๆ

การออกแบบสารยับยั้งเชื้อวัณโรคของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ในกลุ่มสารอนุพันธ์ AP-124/43238118

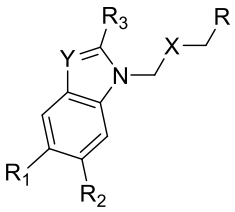
1) Sub-structure search

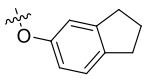
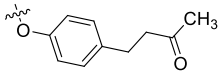
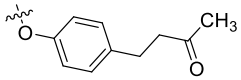
เพื่อให้ได้สารยับยั้งเชื้อวัณโรคตัวใหม่ที่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งสูง การคัดสรรเสมือนจริงได้ถูกนำเอามาใช้อีกครั้งในการค้นหาสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงแสดงดัง**รูปที่ 25** โดยเริ่มจากการใช้ระเบียบวิธี substructure search ในการค้นหากลุ่มสารอนุพันธ์ AP-124/43238118 แต่เพื่อให้ได้โครงสร้างของสารอนุพันธ์ AP-124/43238118 ที่หลากหลายมากขึ้นวง indane เป็น phenyl ในการค้นหาสารยับยั้งจากฐานข้อมูล ZINC โดยพบว่ามีโครงสร้างทั้งหมด 4,060 โครงสร้าง โดยคำนวณการวางตัวในเอนไซม์ InhA (PDB code: 2X23) ด้วยการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง Glide SP และเลือกสารจำนวนทั้งหมด 175 โครงสร้างที่มีค่าพลังงานในการจับที่ต่ำกว่า -9.00 kcal/mol ทำคำนวณต่อในรอบที่ 2 โดยใช้การคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง Glide XP ซึ่งพบว่ามี 31 โครงสร้าง มีค่าพลังงานในการจับที่ต่ำกว่า -11.57 kcal/mol



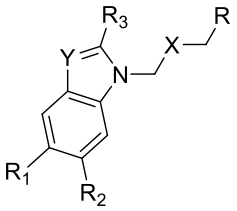
รูปที่ 25 ขั้นตอนการคัดสรรเสมือนจริงเพื่อหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ ด้วยวิธี Substructure searc

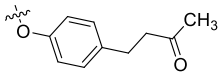
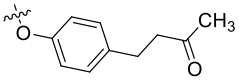
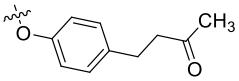
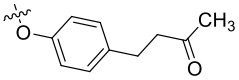
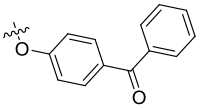
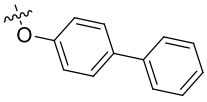
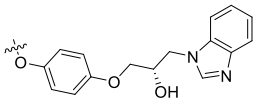
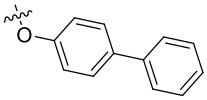
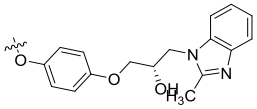
ตารางที่ 22 สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่เลือกจำนวน 31 โครงสร้างและค่า Glide XP docking score ของสารที่ได้จาก substructure search



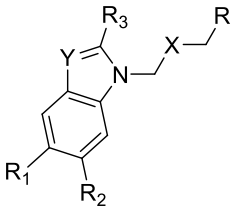
No	Code	docking score	R	R_1	R_2	R_3	X	Y
1	Hit compound	-11.57		H	H	H		N
2	ZINC58647946	-13.31		H	H	C=O		NCH_3
3	ZINC25256759	-13.09		F	F	H		N

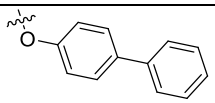
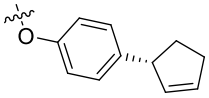
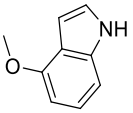
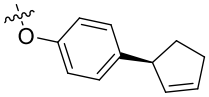
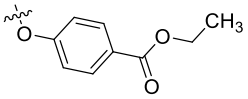
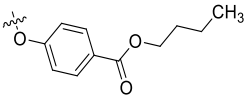
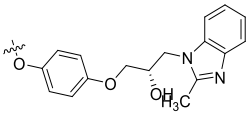
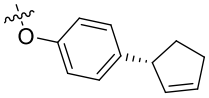
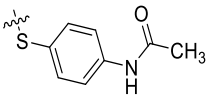
ตารางที่ 22 สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่เลือกจำนวน 31 โครงสร้างและค่า Glide XP docking score ของสารที่ได้จาก substructure search (ต่อ)



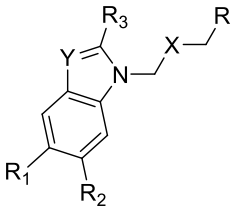
No	Code	docking score	R	R_1	R_2	R_3	X	Y
4	ZINC23386665	-12.90		H	H	H		N
5	ZINC23387530	-12.82		H	H	CH_2OH		N
6	ZINC44348827	-12.66		H	H	C=O		NCH_2CH_3
7	ZINC24097751	-12.62		CH_3	CH_3	H		N
8	ZINC01108527	-12.29		H	H	H		N
9	ZINC04623980	-12.22		H	H	H		N
10	ZINC01507955	-12.18		H	H	H		N
11	ZINC25256428	-11.98		F	F	H		N
12	ZINC00898728	-11.95		H	H	CH_3		N

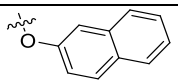
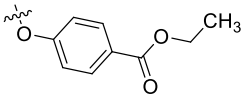
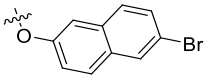
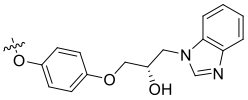
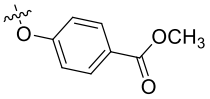
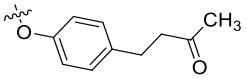
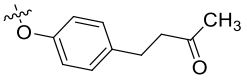
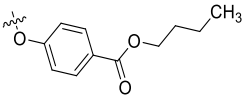
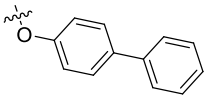
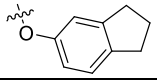
ตารางที่ 22 สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่เลือกจำนวน 31 โครงสร้างและค่า Glide XP docking score ของสารที่ได้จาก substructure search (ต่อ)



No	Code	docking score	R	R_1	R_2	R_3	X	Y
13	ZINC16780511	-11.91		H	H	CH_3		N
14	ZINC00253552	-11.85		H	H	CH3		N
15	ZINC95414566	-11.82		H	H	H		N
16	ZINC00253528	-11.81		H	H	CH3		N
17	ZINC22018703	-11.79		CH3	CH3	H		N
18	ZINC02326675	-11.77		CH3	CH3	H		N
19	ZINC16675577	-11.74		H	H	CH3		N
20	ZINC00253572	-11.73		H	H	CH3		N
21	ZINC51228453	-11.72		CH3	CH3	H		N

ตารางที่ 22 สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่เลือกจำนวน 31 โครงสร้างและค่า Glide XP docking score ของสารที่ได้จาก substructure search (ต่อ)

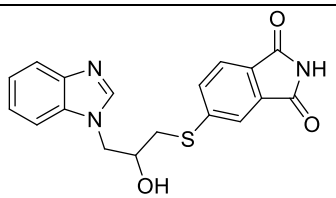
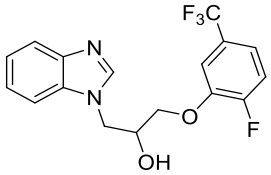
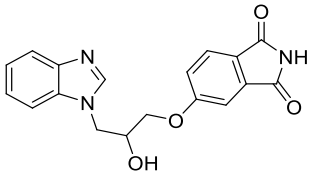
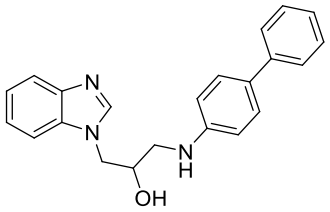
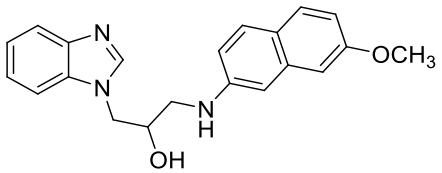


No	Code	docking score	R	R_1	R_2	R_3	X	Y
22	ZINC03141009	-11.71		H	H	H		N
23	ZINC71849341	-11.70		H	H	C=O		NCH3
24	ZINC00936185	-11.70		H	H	H		N
25	ZINC13763758	-11.69		H	H	H		N
26	ZINC58647969	-11.62		H	H	C=O		NCH3
27	ZINC58647944	-11.61		H	H	C=O		NCH3
28	ZINC23386667	-11.61		H	H	H		N
29	ZINC02326673	-11.58		H	H	H		N
30	ZINC04623982	-11.58		H	H	H		N
31	ZINC04649680	-11.58		H	H	CH3		N

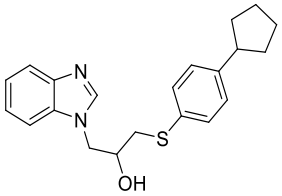
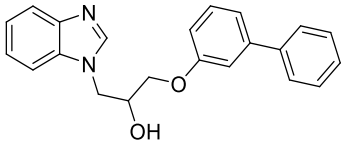
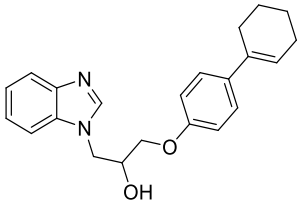
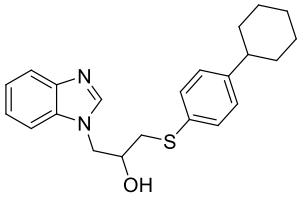
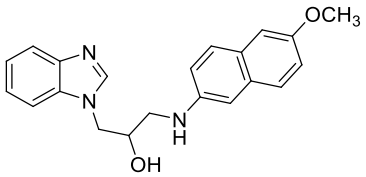
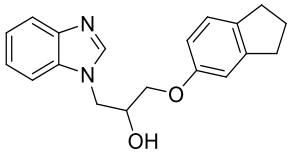
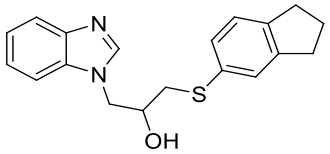
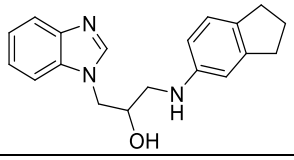
2) Bioisoster

เพื่อให้ได้โครงสร้างสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ที่หลากหลายและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อวัณโรคที่สูงหลักการ Bioisoster ได้นำมาใช้ในการออกแบบโครงสร้างที่คุณสมบัติเดียวกันกับ Indine จากการศึกษาการวางตัวด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งของสารที่ออกแบบใหม่ทั้งหมด 600 โครงสร้างพบว่ามีสารที่ออกแบบใหม่ทั้งหมด 10 โครงสร้างที่มีค่าพลังงานในการจับจากการคำนวณที่ดีกว่าสารต้านแบบ AP-124/43238118

ตารางที่ 23 สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ค่า Glide XP docking score ของสารที่ได้จากการออกแบบ

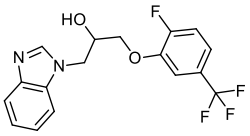
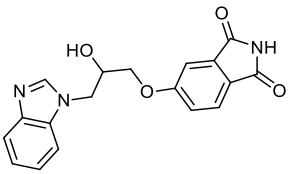
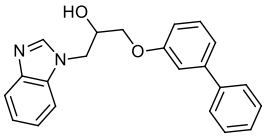
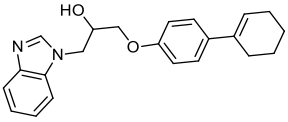
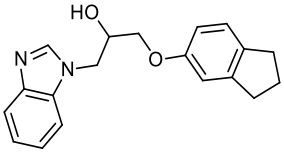
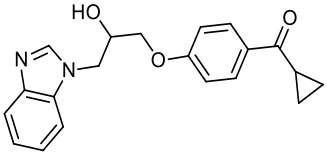
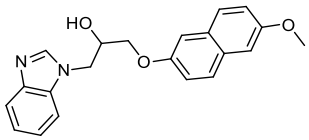
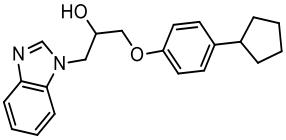
No	Compound ID	Docking score (kcal/mol)	Structure
1	AS212	-12.57	
2	AO185	-12.27	
3	AO212	-12.22	
4	AN090	-12.14	
5	AN065	-12.10	

ตารางที่ 22 สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ค่า Glide XP docking score ของสารที่ได้จากการออกแบบ (ต่อ)

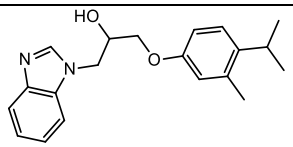
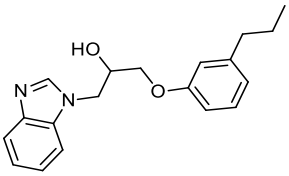
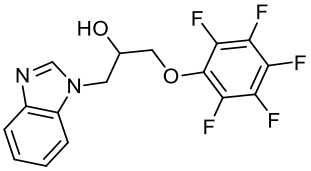
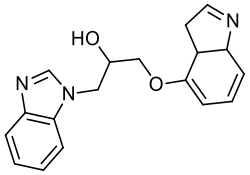
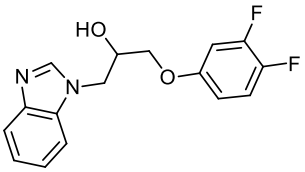
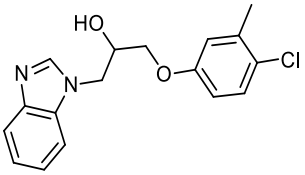
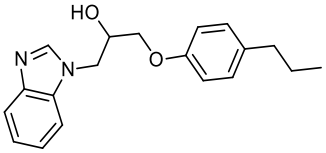
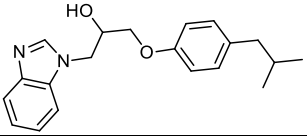
No	Compound ID	Docking score (kcal/mol)	Structure
6	AS195	-12.10	
7	AO038	-12.09	
8	AO076	-12.08	
9	AS105	-12.03	
10	AN063	-11.98	
11	AO000	-11.97	
12	AS000	-11.46	
13	AN000	-11.44	

จากการศึกษาอันตรกิริยาและการวางตัวของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง พบว่าให้ค่า Binding energy ดังแสดงใน**ตารางที่ 24**

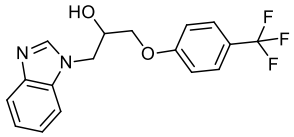
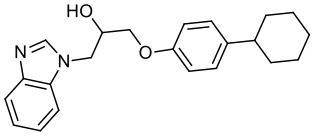
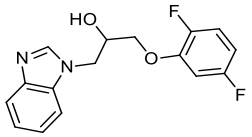
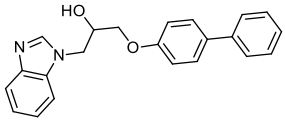
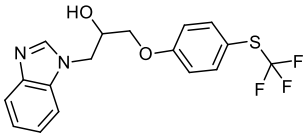
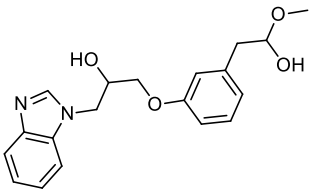
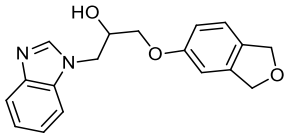
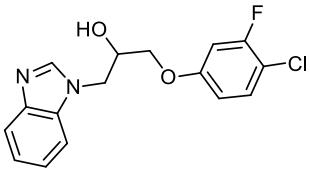
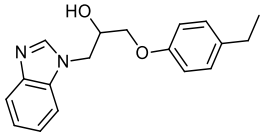
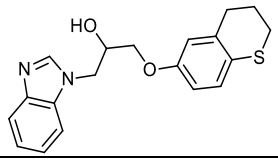
ตารางที่ 24 โครงสร้าง Docking score และ ค่า Binding energy ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole

จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา	สารอนุพันธ์หมายเลข	Structure	Docking score	Binding energy
1	1		-12.27	-7.57
2	2		-12.22	-8.96
3	3		-12.09	-9.95
4	4		-12.08	-9.90
5	5		-11.97	-8.78
6	6		-11.96	-8.75
7	7		-11.91	-9.34
8	8		-11.85	-9.24

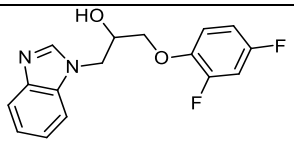
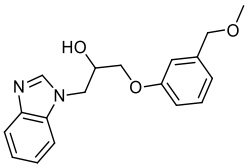
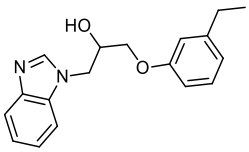
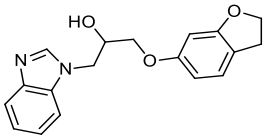
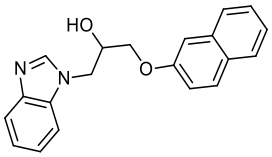
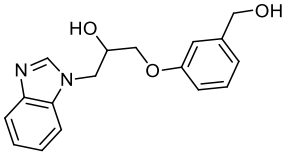
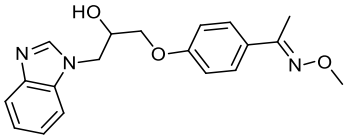
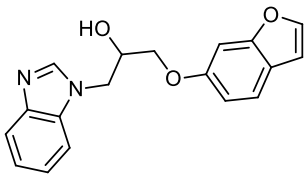
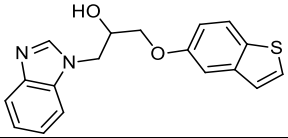
ตารางที่ 24 โครงสร้าง Docking score และ ค่า Binding energy ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole (ต่อ)

จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา	สารอนุพันธ์หมายเลข	Structure	Docking score	Binding energy
9	9		-11.83	-8.83
10	10		-11.79	-8.54
11	11		-11.79	-6.71
12	12		-11.78	-8.16
13	13		-11.76	-7.38
14	14		-11.75	-8.38
15	15		-11.68	-8.44
16	16		-11.67	-8.89

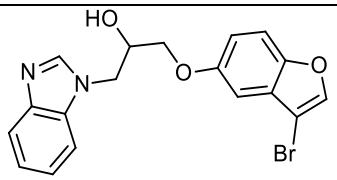
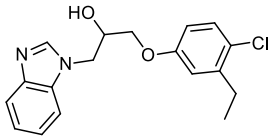
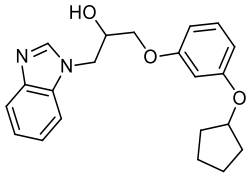
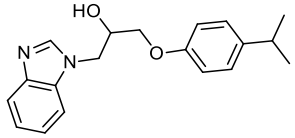
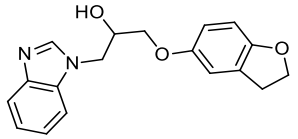
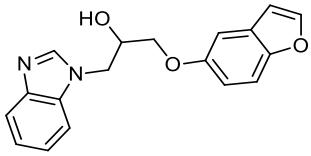
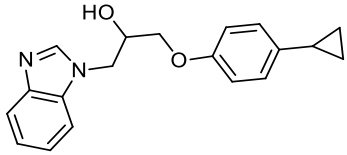
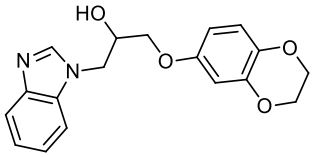
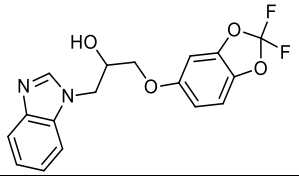
ตารางที่ 24 โครงสร้าง Docking score และ ค่า Binding energy ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole (ต่อ)

จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา	สารอนุพันธ์หมายเลข	Structure	Docking score	Binding energy
17	17		-11.65	-7.56
18	18		-11.64	-9.47
19	19		-11.61	-7.27
20	20		-11.60	-9.62
21	21		-11.60	-8.07
22	22		-11.58	-8.10
23	23		-11.57	-8.30
24	24		-11.55	-7.92
25	25		-11.54	-8.18
26	27		-11.52	-9.38

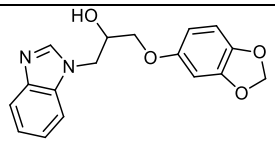
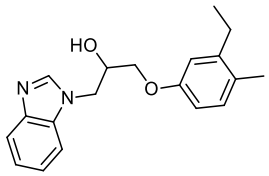
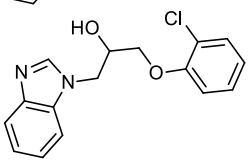
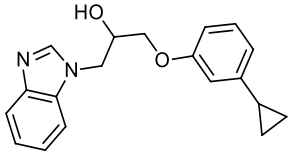
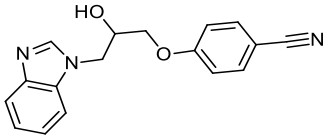
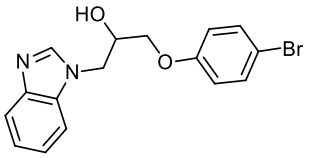
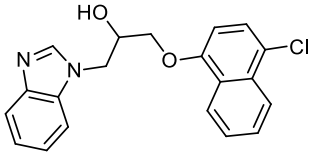
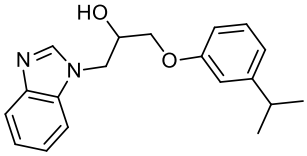
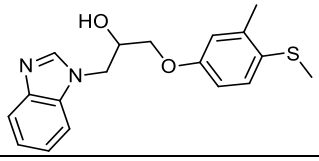
ตารางที่ 24 โครงสร้าง Docking score และ ค่า Binding energy ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole (ต่อ)

จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา	สารอนุพันธ์หมายเลข	Structure	Docking score	Binding energy
27	28		-11.48	-7.26
28	29		-11.48	-7.86
29	30		-11.47	-8.30
30	31		-11.47	-8.38
31	32		-11.46	-9.31
32	33		-11.44	-7.67
33	34		-11.43	-8.01
34	35		-11.42	-8.50
35	36		-11.40	-9.09

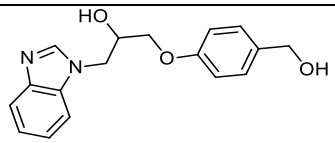
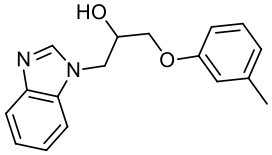
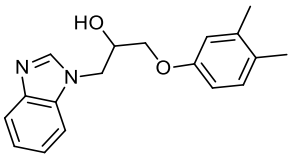
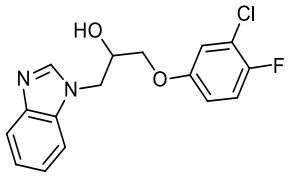
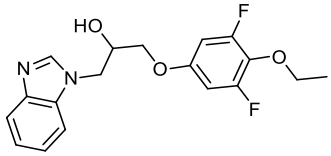
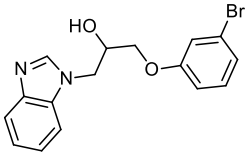
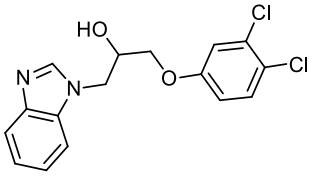
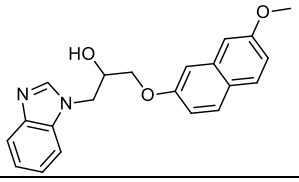
ตารางที่ 24 โครงสร้าง Docking score และ ค่า Binding energy ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole (ต่อ)

จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา	สารอนุพันธ์หมายเลข	Structure	Docking score	Binding energy
36	37		-11.39	-9.05
37	38		-11.39	-8.39
38	39		-11.39	-9.60
39	40		-11.38	-8.50
40	41		-11.38	-8.58
41	42		-11.38	-8.66
42	43		-11.37	-8.31
43	44		-11.36	-8.48
44	45		-11.36	-8.31

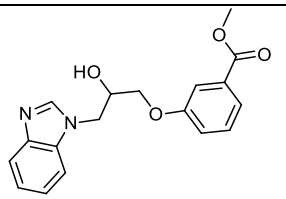
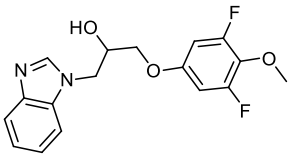
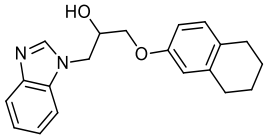
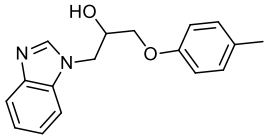
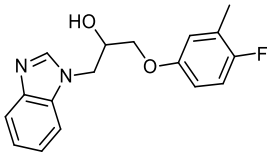
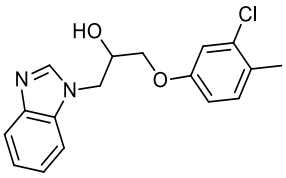
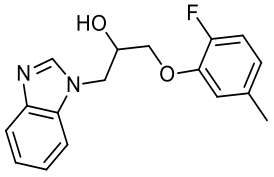
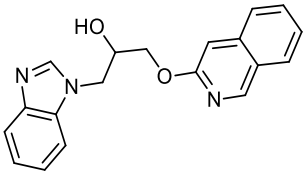
ตารางที่ 24 โครงสร้าง Docking score และ ค่า Binding energy ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole (ต่อ)

จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา	สารอนุพันธ์หมายเลข	Structure	Docking score	Binding energy
45	46		-11.33	-8.01
46	47		-11.33	-8.40
47	48		-11.31	-7.59
48	49		-11.29	-8.64
49	50		-11.26	-7.50
50	51		-11.25	-8.19
51	52		-11.25	-9.10
52	53		-11.22	-8.87
53	54		-11.21	-8.30

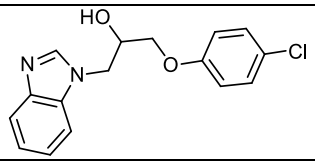
ตารางที่ 24 โครงสร้าง Docking score และ ค่า Binding energy ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole (ต่อ)

จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา	สารอนุพันธ์หมายเลข	Structure	Docking score	Binding energy
54	55		-11.21	-7.47
55	56		-11.18	-7.82
56	57		-11.17	-8.28
57	58		-11.16	-8.07
58	59		-11.15	-7.75
59	60		-11.14	-8.44
60	61		-11.13	-8.44
61	63		-11.12	-9.24

ตารางที่ 24 โครงสร้าง Docking score และ ค่า Binding energy ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole (ต่อ)

จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา	สารอนุพันธ์หมายเลข	Structure	Docking score	Binding energy
62	64		-11.12	-8.29
63	65		-11.09	-7.41
64	66		-11.07	-9.25
65	67		-11.07	-7.89
66	68		-11.04	-7.97
67	69		-11.03	-8.44
68	70		-11.02	-7.80
69	71		-11.02	-8.97

ตารางที่ 24 โครงสร้าง Docking score และ ค่า Binding energy ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole (ต่อ)

จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา	สารอนุพันธ์หมายเลข	Structure	Docking score	Binding energy
70	72		-11.00	-7.96

การวิเคราะห์อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค โดยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

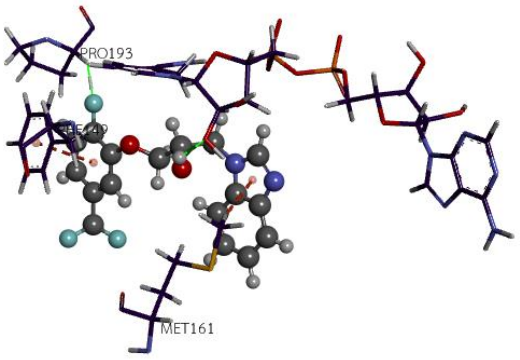
ในการศึกษาอันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคซึ่งได้จากวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง ได้แบ่งการศึกษาอันตรกิริยาออกเป็น 3 กลุ่ม คือ สารที่มีประสิทธิภาพสูง สารที่มีประสิทธิภาพปานกลาง และสารที่มีประสิทธิภาพประสิทธิภาพต่ำ โดยใช้ค่า Docking score เป็นค่ากำหนดกลุ่มของสารประกอบโดยสารที่มีประสิทธิภาพสูงจะมีค่า Docking score ที่ต่ำ และสารที่มีประสิทธิภาพปานกลางและต่ำ จะมีค่า Docking score ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ

สารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารอนุพันธ์ Benzimidazole

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด คือ สารหมายเลข 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 และ 27 ซึ่งมีค่า docking score -12.27, -12.22, -12.09, -12.08, -11.97, -11.96, -11.91, -11.85, -11.83, -11.79, -11.79, -11.78, -11.76, -11.75, -11.68, -11.67, -11.65, -11.64, -11.61, -11.60, -11.60, -11.58, -11.57, -11.55, -11.54 และ -11.52 ตามลำดับ ซึ่งมีตำแหน่งในการวางตัวและ พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญดังนี้

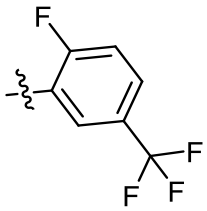
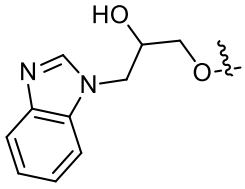
สารหมายเลข 1 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ TYR158 VAL203 และ PRO193 โดยกรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.985 Å และ 2.278 Å ตามลำดับ และนอกจากนี้กรดอะมิโน TYR158 ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.362 Å กรดอะมิโน VAL203 และ PRO193 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ในตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.390 Å และ 1.901 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.862 Å และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 กับวงอะโรมาติกของ กรดอะมิโน

PHE194 พบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 พบอันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 ดังแสดงใน**รูปที่ 26** และพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 24**



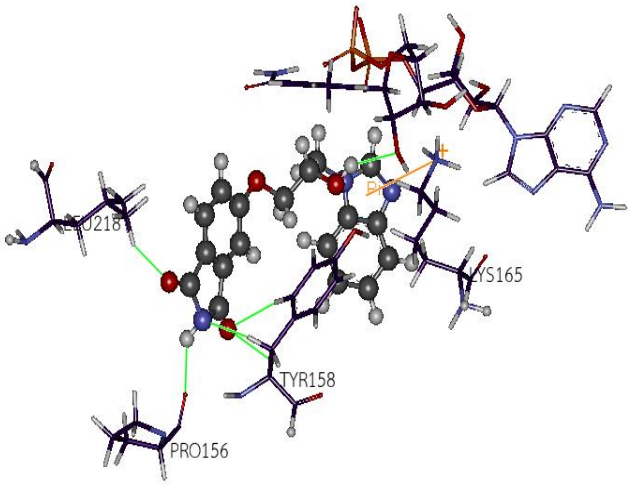
รูปที่ 26 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 1 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 25 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 1

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 1	
	H-bond	R_1(F26)—(HA)PRO193	1.901 Å
		R_1(H6)—(HE1)TYR158	2.070 Å
		R_1(H4)—(HB2)PRO193	1.337 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HG21)ILE202	2.266 Å
		R_1(H4)—(HD21)LEU218	1.778 Å
		R_1(H5)—(HD21)LEU218	2.310 Å
R_1		R_1(H5)—(HD23)LEU218	2.017 Å
	Pi-Pi	R_1(Pi)—(Pi)PHE149	
	H-bond	Cpd01(H33)—(O2D)NAD	1.862 Å
		Cpd01(H13)—(HA)PHE97	1.916 Å
		Cpd01(H12)—(HB2)MET98	1.829 Å
	Hydrophobic	Cpd01(H11)—(HA)MET103	1.227 Å
		Cpd01(H2)—(HE1)TYR158	1.596 Å
		Cpd01(H10)—(HG22)VAL203	2.336 Å
Cpd01	Sigma-Pi	Cpd01(Pi)—(Sigma)MET161	
	N-Pi	Cpd01(Pi)—(NZ)LYS165	

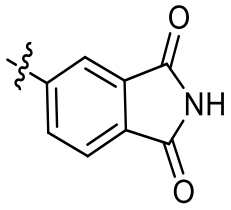
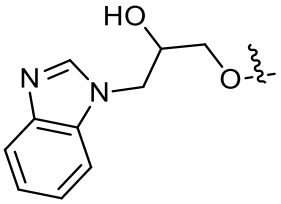
หมายเหตุ : Pi-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไพ-ไพ
Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 2 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ TYR158 LEU218 และ PRO156 โดยกรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.485 Å และ 2.410 Å ตามลำดับ และนอกจากนี้กรดอะมิโน TYR158 ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ที่หมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.370 Å กรดอะมิโน PRO156 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.290 Å และ กรดอะมิโน LEU218 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับออกซิเจนของลิแกนด์ในตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.131 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.128 Å และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของ ลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 ดังแสดงใน**รูปที่ 27** และพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของ ลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, ALA157, TYR158, PRO193, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 25**



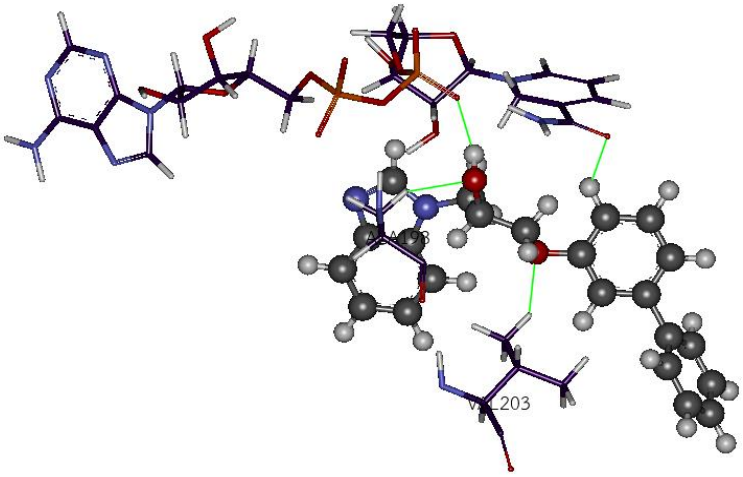
รูปที่ 27 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 2 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 26 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 2

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 2	
 R_1	H-bond	R_1(H36)—(O)PRO156	2.290 Å
		R_1(O40)—(HD1)TYR158	2.485 Å
		R_1(O40)—(HA)TYR158	2.410 Å
		R_1(N35)—(HB1)TYR158	2.370 Å
		R_1(O38)—(HD12)LEU218	2.131 Å
	Hydrophobic	R_1(H6)—(HZ)PHE149	2.207 Å
		R_1(H36)—(HB2)ALA157	1.951 Å
		R_1(H4)—(HE1)TYR158	1.659 Å
		R_1(H5)—(HB2)PRO193	2.163 Å
		R_1(H7)—(HG23)VAL203	2.338 Å
		R_1(H7)—(HG21)VAL203	1.592 Å
		R_1(H6)—(HD11)LEU218	2.305 Å
 Cpd02	H-bond	Cpd02(H27)—(O2D)NAD	2.128 Å
		Cpd02(H14)—(HA)PHE97	2.199 Å
		Cpd02(H13)—(HB2)MET98	1.939 Å
	Hydrophobic	Cpd02(H12)—(HE3)MET103	1.188 Å
		Cpd02(H13)—(HG21)ILE202	2.396 Å
		Cpd02(H11)—(HG22)VAL203	1.944 Å
	N-Pi	Cpd02(Pi)—(NZ)LYS165	

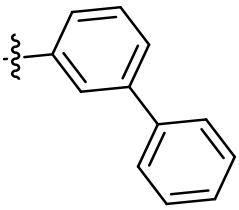
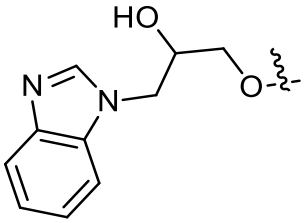
หมายเหตุ : N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 3 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ ALA198 และ VAL203 โดยกรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.221 Å และกรดอะมิโน VAL203 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.159 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.964 Å และอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.201 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 28** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, TYR158, PRO193, ALA198, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 27**

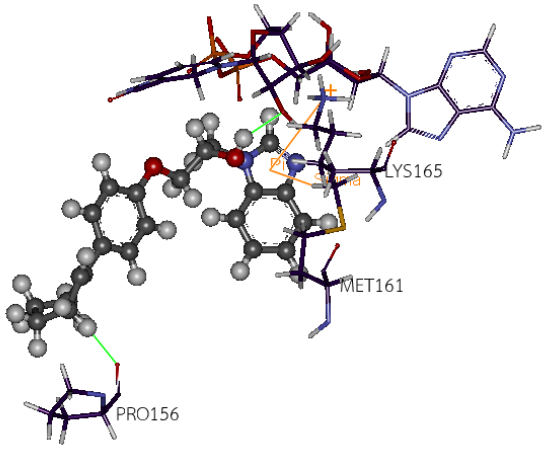


รูปที่ 28 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 3 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 27 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 3

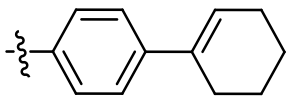
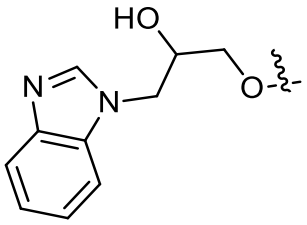
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 3	
 R_1	H-bond	Cpd03(H4)—(O7N)NAD	2.201 Å
		R_1(H6)—(HB2)PRO193	2.288 Å
		R_1(H5)—(HB2)PRO193	1.887 Å
		R_1(H5)—(HA)PRO193	1.964 Å
	Hydrophobic	R_1(H8)—(HG11)VAL203	2.051 Å
		R_1(H7)—(HG11)VAL203	1.979 Å
		R_1(H9)—(HD11)LEU207	2.367 Å
		R_1(H6)—(HD21)LEU218	2.272 Å
		Cpd03(O16)—(HG21)VAL203	2.159 Å
 Cpd03	H-bond	Cpd03(O26)—(HB2)ALA198	2.221 Å
		Cpd03(H27)—(O1N)NAD	1.964 Å
		Cpd03(H19)—(HA)PHE97	1.649 Å
		Cpd03(H18)—(HB2)MET98	1.846 Å
		Cpd03(H17)—(HE3)MET103	1.463 Å
	Hydrophobic	Cpd03(H12)—(HE1)PHE149	2.261 Å
		Cpd03(H16)—(HE1)TYR158	2.345 Å
		Cpd03(H13)—(HB2)ALA198	2.392 Å

สารหมายเลข 4 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ PRO156 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1ซึ่งมีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.969 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.980 Å และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 และพบ อันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 29** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, ALA157, TYR158, PRO193, VAL203, ILE215 และ LEU218 และพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรฟิลิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน GLN214 ดังแสดงใน**ตารางที่ 28**



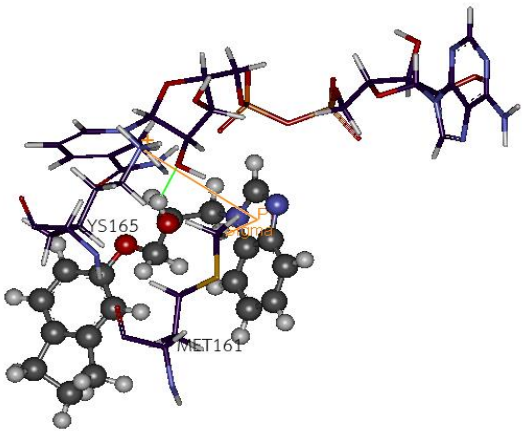
รูปที่ 29 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 4 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 28 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 4

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 4	
	H-bond	R_1(H15)—(O)PRO156	1.969 Å
		R_1(H9)—(HB2)ALA157	1.907 Å
		R_1(H4)—(HB2)PRO193	2.172 Å
		R_1(H7)—(HG21)VAL203	1.673 Å
	Hydrophobic	R_1(H11)—(HD12)ILE215	2.313 Å
		R_1(H5)—(HD21)LEU218	2.019 Å
R_1		R_1(H10)—(HD23)LEU218	1.466 Å
		R_1(H12)—(HB1)LEU218	2.288 Å
	Hydrophilic	R_1(H11)—(HG2)GLN214	1.858 Å
		R_1(H13)—(HG2)GLN214	2.262 Å
	H-bond	Cpd04(H27)—(O2D)NAD	1.980 Å
		Cpd04(H23)—(HA)PHE97	2.181 Å
	Hydrophobic	Cpd04(H22)—(HB2)MET98	1.895 Å
		Cpd04(H21)—(HE3)MET103	1.228 Å
		Cpd04(H3)—(HE1)TYR158	1.676 Å
	N-Pi	Cpd04(Pi)—(NZ)LYS165	
Cpd04	Sigma-Pi	Cpd04(Pi)—(Sigma)MET161	

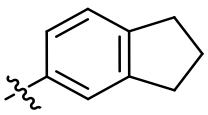
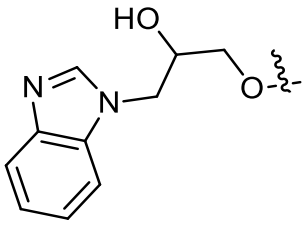
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 5 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.947 Å และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 และพบ อันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 30** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, ALA157, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 29**



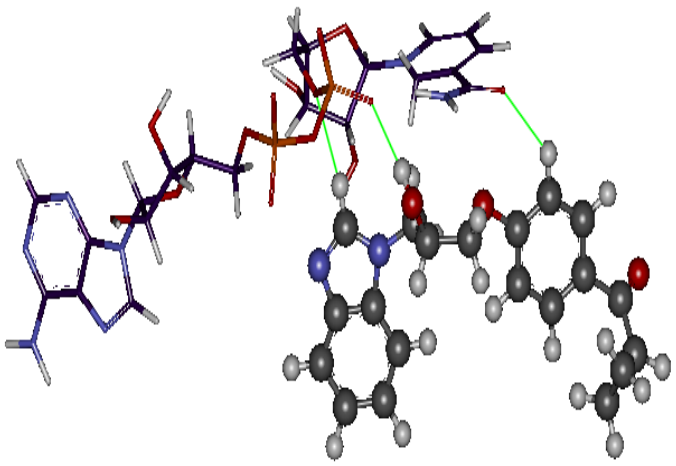
รูปที่ 30 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 5 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 29 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 5

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 5	
 R	Hydrophobic	R_1(H20)—(HB2)ALA157	2.275 Å
		R_1(H14)—(HD1)TYR158	2.157 Å
		R_1(H14)—(HB1)TYR158	2.211 Å
		R_1(H18)—(HA)PRO193	2.072 Å
		R_1(H18)—(HB2)PRO193	2.161 Å
		R_1(H15)—(HB2)PRO193	1.821 Å
		R_1(H13)—(HG12)VAL203	2.187 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.790 Å
		R_1(H15)—(HD21)LEU218	2.103 Å
		R_1(H17)—(HD12)LEU218	1.899 Å
 Cpd05	H-bond	Cpd05(H22)—(O2D)NAD	1.947 Å
	Hydrophobic	Cpd05(H8)—(HA)PHE97	2.050 Å
		Cpd05(H7)—(HB2)MET98	1.833 Å
		Cpd05(H6)—(HE3)MET103	1.286 Å
		Cpd05(H11)—(HE1)TYR158	1.759 Å
		Cpd05(H10)—(HG21)VAL203	2.298 Å
		Cpd05(H10)—(HG22)VAL203	2.176 Å
	Sigma-Pi	Cpd05(Pi)—(Sigma)MET161	
	N-Pi	Cpd05(Pi)—(NZ)LYS165	

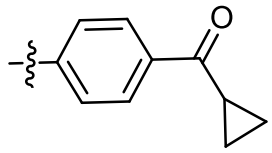
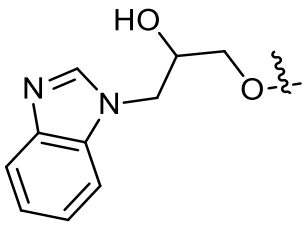
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 6 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.435 Å และเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.451 Å และ 2.055 Å ตามลำดับ ดังแสดงใน**รูปที่ 31** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, ALA157, TYR158, PRO193, VAL203 และ ILE215 ดังแสดงใน**ตารางที่ 30**

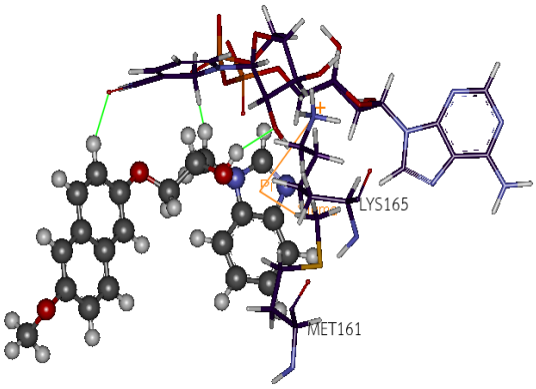


รูปที่ 31 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 6 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 30 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 6

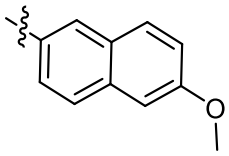
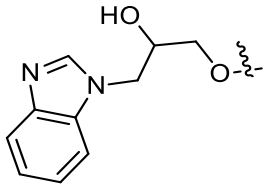
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 6	
 R_1	H-bond	R_1(H14)—(O7N)NAD	2.435 Å
		R_1(H12)—(HB1)ALA157	2.374 Å
		R_1(H12)—(HB2)ALA157	1.412 Å
		R_1(H6)—(HD1)TYR158	2.080 Å
		R_1(H4)—(HA)PRO193	2.098 Å
	Hydrophobic	R_1(H4)—(HB2)PRO193	2.276 Å
		R_1(H5)—(HB2)PRO193	1.810 Å
		R_1(H7)—(HG21)VAL203	1.807 Å
		R_1(H9)—(HD12)ILE215	2.033 Å
		R_1(H5)—(HD21)LEU218	2.220 Å
 Cpd06	H-bond	Cpd06(H20)—(O5D)NAD	2.451 Å
		Cpd06(H27)—(O1N)NAD	2.055 Å
	Hydrophobic	Cpd06(H19)—(HA)PHE97	1.816 Å
		Cpd06(H18)—(HB2)MET98	1.998 Å
		Cpd06(H17)—(HE3)MET103	1.449 Å
		Cpd06(H16)—(HE1)TYR158	2.357 Å
		Cpd06(H3)—(HG21)VAL203	1.798 Å

สารหมายเลข 7 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.494 Å และเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.493 Å และ 1.869 Å ตามลำดับ และพบ อันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 32** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, ALA157, TYR158, PRO193, VAL203, ALA198 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 31**



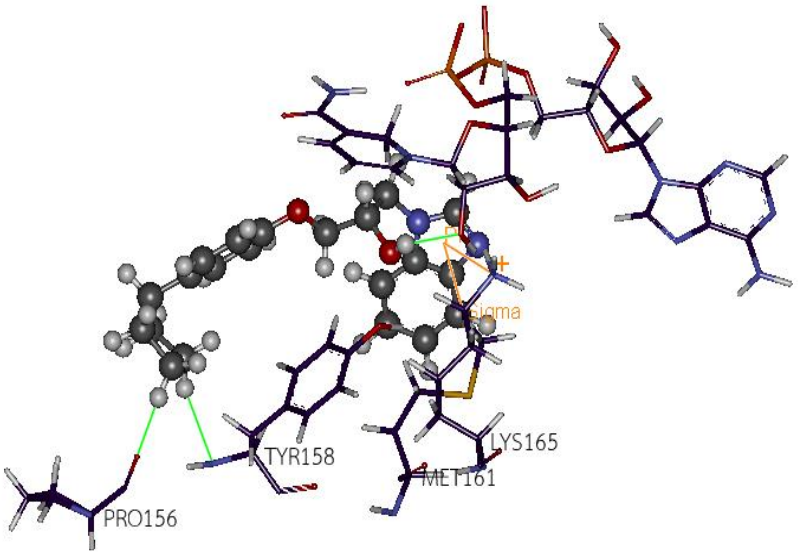
รูปที่ 32 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 7 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 31 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 7

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 7	
 R_1	H-bond	R_1(H8)—(O7N)NAD	2.494 Å
	Hydrophobic	R_1(H9)—(HB2)ALA157	1.956 Å
		R_1(H11)—(HB2)ALA157	1.865 Å
		R_1(H5)—(HD1)TYR158	1.887 Å
		R_1(H8)—(HA)PRO193	2.105 Å
		R_1(H8)—(HB2)PRO193	2.291 Å
		R_1(H6)—(HB2)PRO193	1.714 Å
		R_1(H4)—(HG21)VAL203	1.732 Å
		R_1(H6)—(HD21)LEU218	2.267 Å
		R_1(H7)—(HD12)LEU218	1.710 Å
		R_1(H7)—(HD11)LEU218	1.985 Å
 Cpd07	H-bond	Cpd07(H15)—(O1N)NAD	2.493 Å
		Cpd07(H26)—(O2D)NAD	1.869 Å
	Hydrophobic	Cpd07(H19)—(HA)PHE97	2.051 Å
		Cpd07(H18)—(HB2)MET98	1.880 Å
		Cpd07(H17)—(HE3)MET103	1.303 Å
		Cpd07(H2)—(HE1)TYR158	1.748 Å
		Cpd07(H14)—(HB2)ALA198	2.385 Å
		Cpd07(H3)—(HG21)VAL203	2.227 Å
	Sigma-Pi	Cpd07(Pi)—(Sigma)MET161	
		Cpd07(Pi)—(NZ)LYS165	

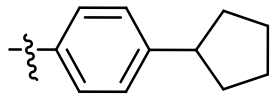
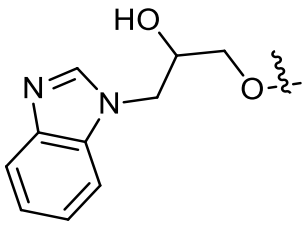
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 8 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ TYR158 และ PRO156 โดยกรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.563 Å กรดอะมิโน PRO156 เกิด อันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.245 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.958 Å และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 และพบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 33** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, PHE149, MET155, ALA157, TYR158, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 32**



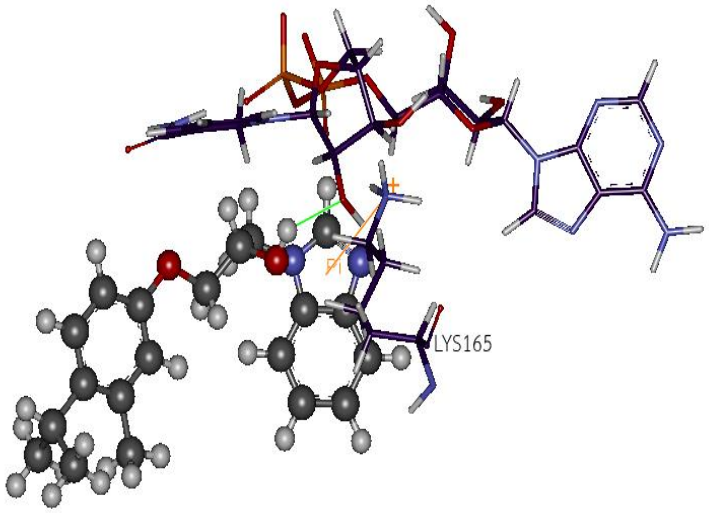
รูปที่ 33 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 8 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 32 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 8

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 8	
 R_1	H-bond	R_1(H22)—(O)PRO156	2.245 Å
		R_1(H14)—(N)TYR158	2.563 Å
	Hydrophobic	R_1(H6)—(HZ)PHE149	2.215 Å
		R_1(H12)—(HG2)MET155	2.316 Å
		R_1(H14)—(HB2)ALA157	1.790 Å
		R_1(H11)—(HB1)TYR158	1.944 Å
		R_1(H12)—(HB1)TYR158	2.379 Å
		R_1(H5)—(HG11)VAL203	1.168 Å
		R_1(H4)—(HG21)VAL203	1.291 Å
		R_1(H8)—(HD23)LEU218	1.182 Å
		R_1(H10)—(HD12)LEU218	2.206 Å
		R_1(H9)—(HD12)LEU218	2.095 Å
 Cpd08	H-bond	Cpd08(H26)—(O2D)NAD	1.958 Å
	Hydrophobic	Cpd08(H23)—(HA)PHE97	2.065 Å
		Cpd08(H22)—(HB2)MET98	1.907 Å
		Cpd08(H21)—(HE3)MET103	1.288 Å
		Cpd08(H3)—(HE1)TYR158	1.685 Å
		Cpd08(H22)—(HG21)ILE202	2.351 Å
		Cpd08(H2)—(HG21)VAL203	2.371 Å
		Cpd08(H20)—(HG22)VAL203	2.236 Å
	Sigma-Pi	Cpd08(Pi)—(Sigma)MET161	
	N-Pi	Cpd08(Pi)—(NZ)LYS165	

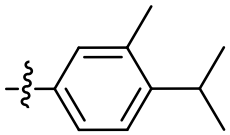
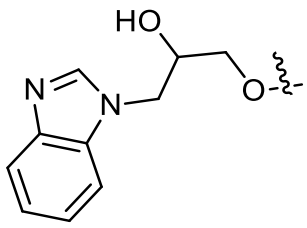
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 9 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.964 Å และเกิดอันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 ดังแสดงใน**รูปที่ 34** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิด ไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, MET155, TYR158, PRO193, ILE202, VAL203, ILE215 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 33**



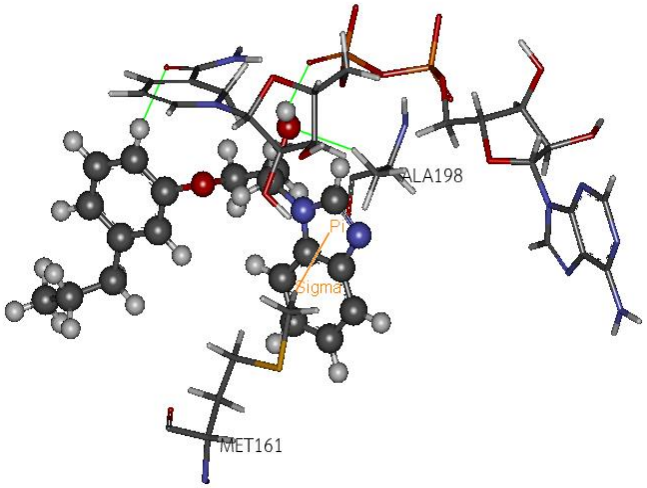
รูปที่ 34 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 9 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 33 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 9

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 9	
 R_1	Hydrophobic	R_1(H23)—(SD)MET155	2.602 Å
		R_1(H15)—(HD1)TYR158	1.969 Å
		R_1(H17)—(HB1)TYR158	2.371 Å
		R_1(H12)—(HB2)PRO193	2.001 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	2.386 Å
		R_1(H14)—(HG21)VAL203	1.910 Å
		R_1(H15)—(HG23)VAL203	2.335 Å
		R_1(H16)—(HG12)VAL203	2.092 Å
		R_1(H16)—(HG11)VAL203	2.354 Å
		R_1(H21)—(HD12)ILE215	2.204 Å
		R_1(H13)—(HD11)LEU218	2.225 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218	1.880 Å
		R_1(H21)—(HD23)LEU218	1.941 Å
		R_1(H18)—(HD23)LEU218	2.118 Å
		R_1(H18)—(HD12)LEU218	1.738 Å
 Cpd09	H-bond	Cpd09(H25)—(O2D)NAD	1.964 Å
		Cpd09(H8)—(HA)PHE97	2.048 Å
		Cpd09(H7)—(HB2)MET98	1.875 Å
		Cpd09(H6)—(HE3)MET103	1.168 Å
	Hydrophobic	Cpd09(H11)—(HE1)TYR158	1.483 Å
		Cpd09(H7)—(HG21)ILE202	2.375 Å
		Cpd09(H5)—(HG22)VAL203	2.118 Å
		Cpd09(H10)—(HG21)VAL203	2.157 Å
	N-Pi	Cpd09(Pi)—(NZ)LYS165	

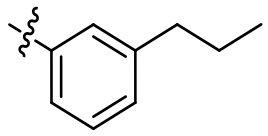
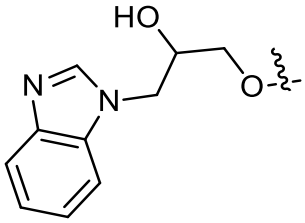
หมายเหตุ : N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 10 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.272 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.938 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.077Å และพบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 35** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ALA198, VAL203 และ ILE202 ดังแสดงใน**ตารางที่ 34**



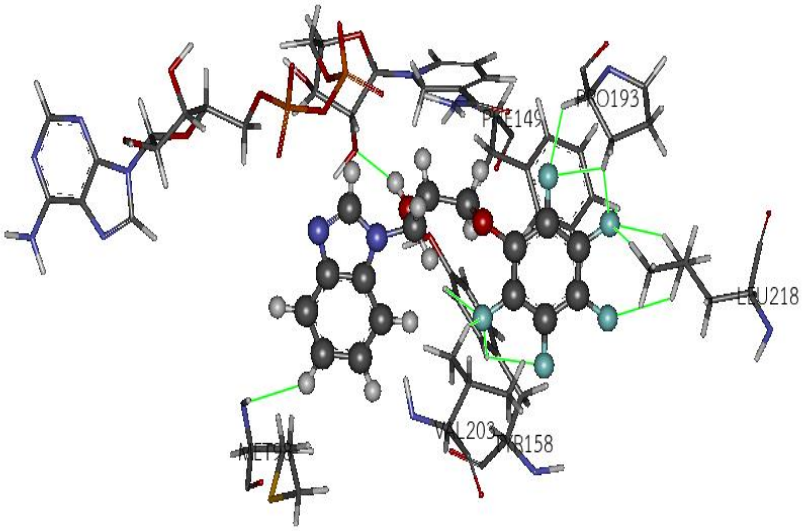
รูปที่ 35 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 10 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 34 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 10

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 10	
	H-bond	R_1(H15)—(O7N)NAD	2.077 Å
		R_1(H21)—(HB2)ALA157	1.923 Å
		R_1(H17)—(HD1)TYR158	2.079 Å
	Hydrophobic	R_1(H18)—(HB1)TYR158	1.633 Å
R_1		R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.432 Å
		R_1(H16)—(HG11)VAL203	2.293 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.711 Å
	H-bond	Cpd10(H25)—(O1N)NAD	1.938 Å
		Cpd10(O24)—(HB2)ALA198	2.272 Å
	Hydrophobic	Cpd10(H8)—(HA)PHE97	1.811 Å
		Cpd10(H7)—(HB2)MET98	1.827 Å
		Cpd10(H6)—(HE1)MET103	2.375 Å
		Cpd10(H6)—(HE3)MET103	1.269 Å
		Cpd10(H2)—(HB1)ALA198	2.235 Å
		Cpd10(H2)—(HB2)ALA198	2.281 Å
Cpd10		Cpd10(H7)—(HG21)ILE202	2.278 Å
		Cpd10(H11)—(HG21)VAL203	1.658 Å
	N-Pi	Cpd10(Pi)—(Sigma)MET161	

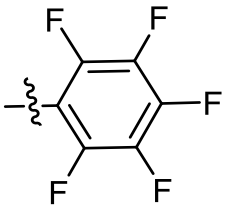
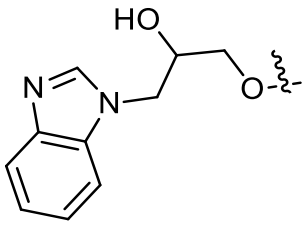
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 11 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 6 ชนิด คือ MET98, PHE149, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 โดยกรดอะมิโน MET98 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.470 Å และกรดอะมิโน PHE149, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอมดังแสดงในตารางที่ 4.28 และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.790 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 36** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103 และ TYR158 ดังแสดงใน**ตารางที่ 35**

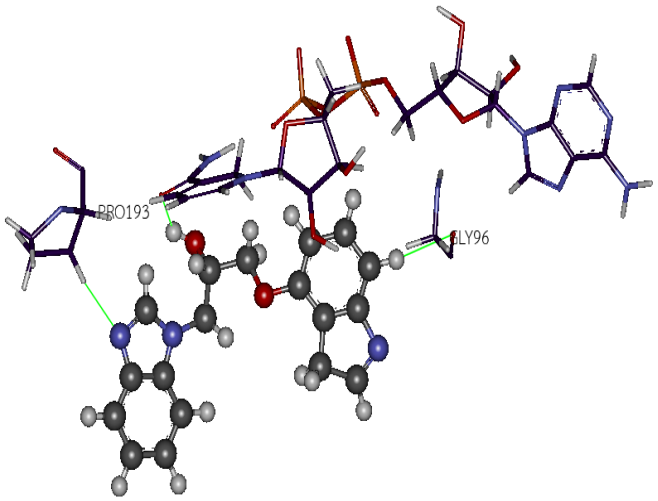


รูปที่ 36 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 11 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 35 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 11

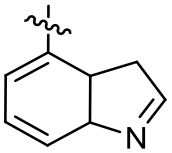
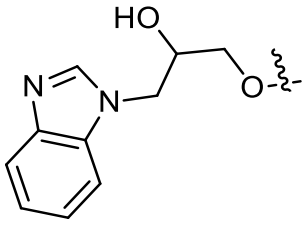
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 11	
	H-bond	R_1(F35)—(HZ)PHE149	2.510 Å
		R_1(F33)—(HD1)TYR158	2.513 Å
		R_1(F32)—(HD1)TYR158	2.183 Å
		R_1(F32)—(HE1)TYR158	2.455 Å
		R_1(F35)—(HB2)PRO193	1.941 Å
		R_1(F36)—(HB2)PRO193	2.159 Å
		R_1(F36)—(HA)PRO193	2.149 Å
R_1		R_1(F32)—(HG21)VAL203	1.911 Å
		R_1(F35)—(HD21)LEU218	2.026 Å
		R_1(F35)—(HD11)LEU218	2.131 Å
		R_1(F34)—(HD12)LEU218	2.512 Å
	H-bond	Cpd11(H9)—(N)MET98	2.470 Å
		Cpd11(H25)—(O2D)NAD	1.790 Å
	Hydrophobic	Cpd11(H10)—(HA)PHE97	1.831 Å
		Cpd11(H9)—(HB2)MET98	1.890 Å
		Cpd11(H9)—(HN)MET98	2.397 Å
		Cpd11(H8)—(HE3)MET103	1.479 Å
Cpd11		Cpd11(H2)—(HE1)TYR158	2.003 Å
		Cpd11(H7)—(HE1)TYR158	2.350 Å

สารหมายเลข 12 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ GLY96 และ PRO193 โดยกรดอะมิโน GLY96 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.390 Å กรดอะมิโน PRO193 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.235 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.059 Å ดังแสดงใน **รูปที่ 37** นอกจากนี้ยังพบ อันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET98, MET103, TYR158, MET161, ILE194, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 36**

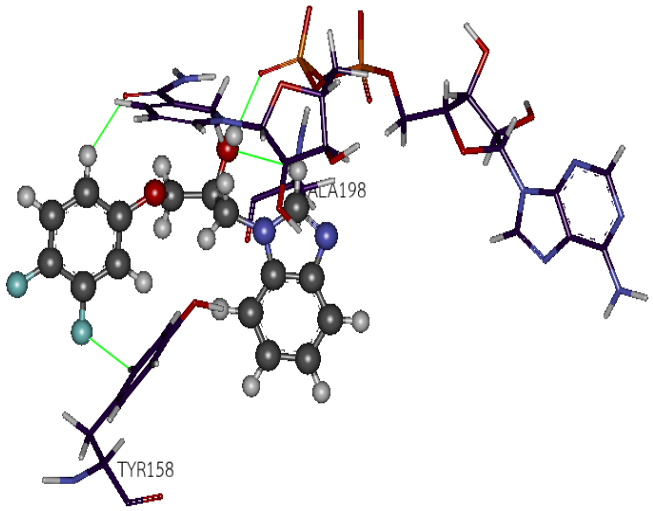


รูปที่ 37 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 12 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 36 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 12

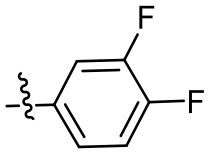
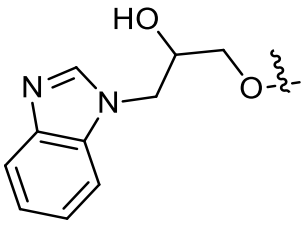
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 12	
 R$_1$	H-bond	R$_1$(H14)—(O)GLY96	2.390 Å
		R$_1$(H17)—(HB2)MET98	2.321 Å
		R$_1$(H16)—(HE3)MET103	2.144 Å
		R$_1$(H17)—(HE3)MET103	2.130 Å
	Hydrophobic	R$_1$(H15)—(HE1)TYR158	2.326 Å
		R$_1$(H5)—(HD1)TYR158	2.272 Å
		R$_1$(H15)—(HG1)MET161	1.429 Å
		R$_1$(H17)—(HG21)ILE202	2.249 Å
 Cpd12	H-bond	Cpd12(N12)—(HB2)PRO193	2.235 Å
		Cpd12(H25)—(O7N)NAD	2.059 Å
	Hydrophobic	Cpd12(H25)—(HA)ILE194	2.387 Å
		Cpd12(H4)—(HG21)VAL203	1.674 Å
		Cpd12(H3)—(HG21)VAL203	1.697 Å
		Cpd12(H8)—(HD11)LEU218	2.274 Å
		Cpd12(H5)—(HD12)LEU218	2.026 Å

สารหมายเลข 13 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ คือ TYR158 และ ALA198 โดยกรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.350 Å กรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.306 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.059 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.193 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 38** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 37**

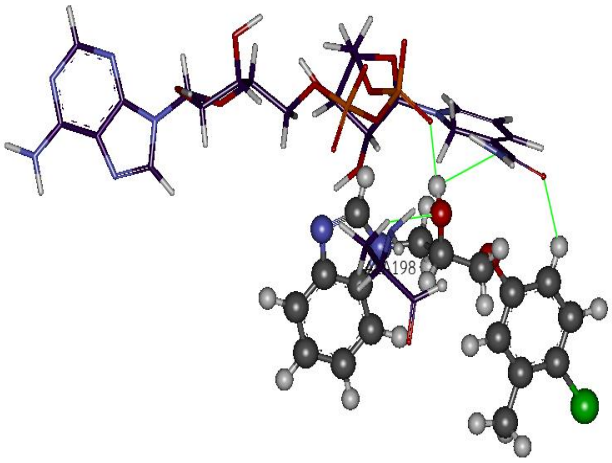


รูปที่ 38 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 13 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 37 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 13

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 13	
	H-bond	R_1(F35)—(HD1)TYR158	2.350 Å
		R_1(H14)—(O7N)NAD	2.193 Å
	Hydrophobic	R_1(H14)—(HA)PRO193	1.971 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	1.444 Å
R_1		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.829 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218	2.253 Å
	H-bond	Cpd13(O24)—(HB2)ALA198	2.306 Å
		Cpd13(H25)—(O1N)NAD	2.059 Å
	Hydrophobic	Cpd13(H8)—(HA)PHE97	1.673 Å
		Cpd13(H7)—(HN)MET98	2.354 Å
		Cpd13(H7)—(HB2)MET98	1.959 Å
		Cpd13(H6)—(HE13)MET103	1.528 Å
Cpd13		Cpd13(H5)—(HE1)TYR158	2.329 Å
		Cpd13(H11)—(HG21)VAL203	1.792 Å

สารหมายเลข 14 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.270 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.397 Å และ 1.997 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.465 Å ดังแสดงใน **รูปที่ 39** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, TYR158, PRO193, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 38**

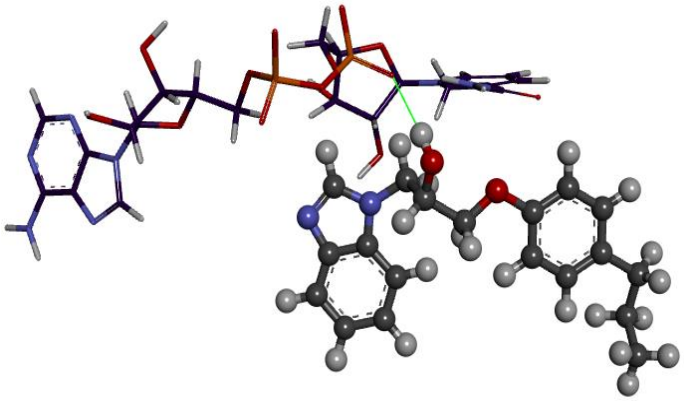


รูปที่ 39 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 14 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 38 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 14

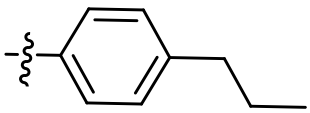
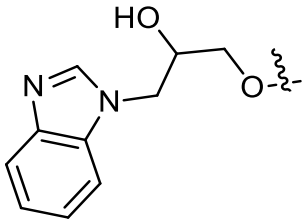
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 14	
	H-bond	R_1(H12)—(O7N)NAD	2.465 Å
	Hydrophobic	R_1(H15)—(HD1)TYR158	1.786 Å
		R_1(H17)—(HB1)TYR158	2.264 Å
		R_1(H12)—(HA)PRO193	2.128 Å
		R_1(H12)—(HB2)PRO193	2.365 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	1.844 Å
		R_1(H14)—(HG21)VAL203	1.671 Å
		R_1(H15)—(HG23)VAL203	2.296 Å
R_1		R_1(H16)—(HG12)VAL203	2.390 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218	2.238 Å
	H-bond	Cpd14(O24)—(HB2)ALA198	2.270 Å
		Cpd14(H25)—(O1N)NAD	1.997 Å
		Cpd14(H25)—(N7N)NAD	2.397 Å
	Hydrophobic	Cpd14(H8)—(HA)PHE97	1.775 Å
		Cpd14(H7)—(HB2)MET98	1.990 Å
		Cpd14(H6)—(HE3)MET103	1.437 Å
		Cpd14(H6)—(SD)MET103	2.998 Å
Cpd14		Cpd14(H5)—(HE1)TYR158	2.289 Å
		Cpd14(H7)—(HG21)ILE202	2.371 Å
		Cpd14(H11)—(HG21)VAL203	2.066 Å

สารหมายเลข 15 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ PRO156 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.319 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.036 Å และ 2.284 Å ตามลำดับและพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.984 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 40** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่าง อะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, PHE149, MET55, ALA157, TYR158, PRO193, ALA198, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 39**

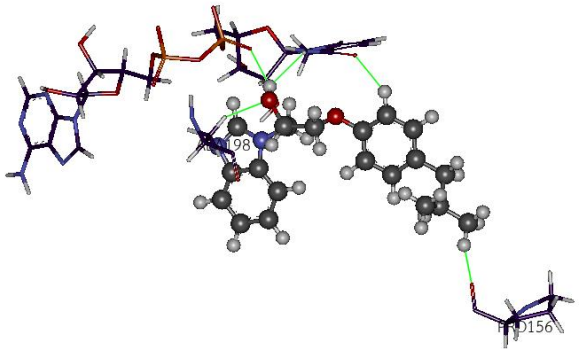


รูปที่ 40 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 15 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 39 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 15

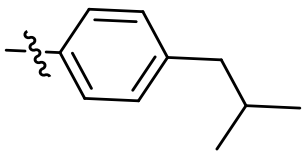
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 15	
	H-bond	R_1(H20)—(O)PRO156	2.319 Å
		R_1(H12)—(O7N)NAD	1.984 Å
		R_1(H16)—(HZ)PHE149	2.043 Å
		R_1(H19)—(SD)MET155	2.449 Å
		R_1(H20)—(HB2)ALA157	2.067 Å
		R_1(H14)—(HD1)TYR158	2.271 Å
R_1	Hydrophobic	R_1(H18)—(HB1)TYR158	2.253 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	1.446 Å
		R_1(H12)—(HA)PRO193	2.117 Å
		R_1(H17)—(HD12)LEU218	2.268 Å
		R_1(H17)—(HD23)LEU218	2.102 Å
	H-bond	Cpd15(H25)—(O1N)NAD	2.036 Å
		Cpd15(H8)—(HA)PHE97	1.715 Å
		Cpd15(H7)—(HB2)MET98	1.903 Å
		Cpd15(H6)—(HE3)MET103	1.548 Å
	Hydrophobic	Cpd15(H2)—(HB1)ALA198	2.075 Å
		Cpd15(H2)—(HB2)ALA198	2.101 Å
Cpd15		Cpd15(H10)—(HG21)VAL203	1.711 Å
		Cpd15(H15)—(HG21)VAL203	1.495 Å

สารหมายเลข 16 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ PRO156 และ ALA198 โดยกรดอะมิโน PRO156 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.430 Å กรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.206 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.956 Å และ 2.460 Å ตามลำดับและพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.430 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 41** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, ALA157, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 40**

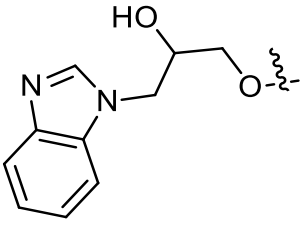


รูปที่ 41 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 16 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

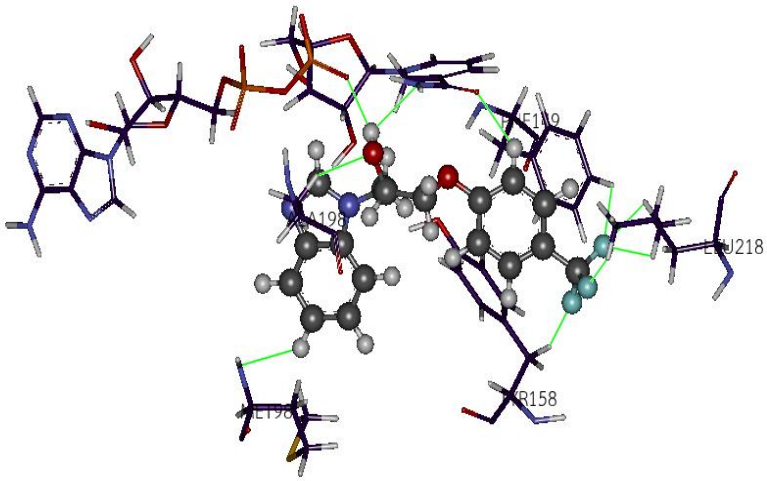
ตารางที่ 40 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 16

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 16
 R_1	H-bond	R_1(H19)—(O)PRO156 2.430 Å
		R_1(H15)—(O7N)NAD 2.170 Å
		R_1(H19)—(HB2)ALA157 2.966 Å
		R_1(H12)—(HE1)TYR158 2.176 Å
		R_1(H13)—(HD1)TYR158 2.071 Å
		R_1(H14)—(HB2)PRO193 1.539 Å
		R_1(H15)—(HA)PRO193 2.081 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203 2.037 Å
		R_1(H23)—(HG11)VAL203 2.117 Å
	Hydrophobic	R_1(H14)—(HD21)LEU218 2.174 Å
		R_1(H17)—(HD12)LEU218 2.024 Å
		R_1(H17)—(HD11)LEU218 2.316 Å
		R_1(H17)—(HD21)LEU218 2.266 Å
		R_1(H17)—(HD23)LEU218 2.127 Å
		R_1(H24)—(HD23)LEU218 1.653 Å
		R_1(H20)—(HD12)LEU218 2.304 Å

ตารางที่ 40 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 16(ต่อ)

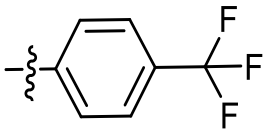
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 16	
	H-bond	Cpd16(O24)—(HB2)ALA198 Cpd16(H25)—(O1N)NAD Cpd16(H25)—(7NN)NAD	2.206 Å 1.956 Å 2.460 Å
Cpd16			

สารหมายเลข 17 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 5 ชนิด คือ MET98, PHE149, TYR158, ALA198 และ LEU218 โดยกรดอะมิโน MET98 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.515 Å กรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.277 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE149, TYR158 และ LEU218 กับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.038 Å และ 2.465 Å ตามลำดับและพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.325 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 42** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่าง อะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 41**

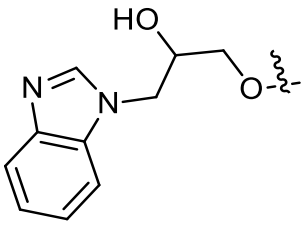


รูปที่ 42 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 17 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

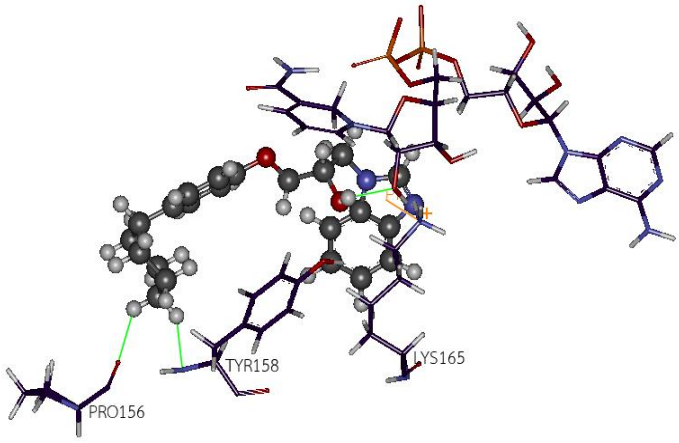
ตารางที่ 41 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 17

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 17	
 R_1	H-bond	R_1(F37)—(HZ)PHE149	2.305 Å
		R_1(F38)—(HB1)TYR158	2.522 Å
		R_1(F37)—(HD11)LEU218	2.467 Å
		R_1(F37)—(HD12)LEU218	2.443 Å
		R_1(F39)—(HD23)LEU218	2.209 Å
		R_1(H12)—(O7N)NAD	2.325 Å
		R_1(H14)—(HD1)TYR158	1.959 Å
		R_1(H15)—(HE1)TYR158	2.375 Å
	Hydrophobic	R_1(H13)—(HB2)PRO193	1.822 Å
		R_1(H12)—(HA)PRO193	2.130 Å
		R_1(H15)—(HG21)VAL203	1.769 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218	2.351 Å
		R_1(H13)—(HD11)LEU218	2.855 Å

ตารางที่ 41 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 17(ต่อ)

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 17	
 Cpd17	H-bond	Cpd17(H7)—(N)MET98	2.515 Å
		Cpd17(O24)—(HB2)ALA198	2.277 Å
		Cpd17(H25)—(O1N)NAD	2.038 Å
		Cpd17(H25)—(N7N)NAD	2.465 Å
		Cpd17(H8)—(HA)PHE97	1.642 Å
	Hydrophobic	Cpd17(H7)—(HB2)MET98	1.828 Å
		Cpd17(H6)—(HE3)MET103	1.503 Å
		Cpd17(H5)—(HE1)TYR158	2.321 Å
		Cpd17(H11)—(HG21)VAL203	1.685 Å

สารหมายเลข 18 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ PRO156 และ TYR158 โดยกรดอะมิโน PRO156 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.143 Å กรดอะมิโน TYR158 เกิด อันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.109 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.968 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 ดังแสดงใน**รูปที่ 43** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, MET155, ALA157, TYR158, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 42**

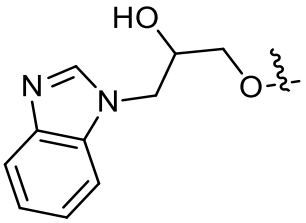


รูปที่ 43 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 18 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

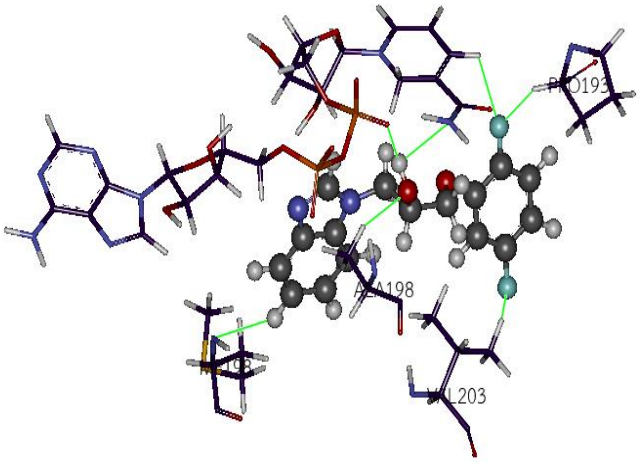
ตารางที่ 42 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 18

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 18	
	H-bond	R_1(H13)—(O)PRO156	2.143 Å
		R_1(H14)—(N)TYR158	2.109 Å
		R_1(H17)—(HZ)PHE149	2.386 Å
		R_1(H6)—(HZ)PHE149	2.129 Å
		R_1(H15)—(SD)MET155	2.256 Å
		R_1(H11)—(HB2)ALA157	2.118 Å
		R_1(H13)—(HB2)ALA157	2.059 Å
		R_1(H14)—(HA)TYR158	2.305 Å
		R_1(H14)—(HN)TYR158	2.236 Å
		R_1(H14)—(HB1)TYR158	1.921 Å
R_1	Hydrophobic	R_1(H15)—(HB1)TYR158	1.751 Å
		R_1(H14)—(HG21)VAL203	1.422 Å
		R_1(H5)—(HG11)ALA203	1.370 Å
		R_1(H12)—(HG11)VAL203	2.356 Å
		R_1(H11)—(HG12)VAL203	2.299 Å
		R_1(H8)—(HD21)LEU218	1.828 Å
		R_1(H8)—(HD23)LEU218	1.353 Å
		R_1(H8)—(HD12)LEU218	2.243 Å
		R_1(H18)—(HD12)LEU218	2.214 Å

ตารางที่ 42 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 18 (ต่อ)

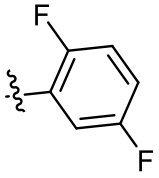
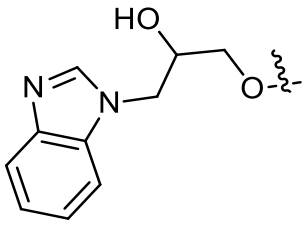
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 18	
 Cpd18	H-bond	Cpd18(H25)—(O2D)NAD	1.968 Å
		Cpd18(H25)—(HA)PHE97	2.111 Å
		Cpd18(H25)—(HN)MET98	2.357 Å
	Hydrophobic	Cpd18(H24)—(HB2)MET98	1.835 Å
		Cpd18(H23)—(HE3)MET103	1.277 Å
		Cpd18(H2)—(HE1)TYR158	1.884 Å
		Cpd18(H20)—(HB2)ALA198	2.096 Å
		Cpd18(H24)—(HG21)ILE202	2.359 Å
		Cpd18(H22)—(HG22)VAL203	2.313 Å
	N-Pi	Cpd18(Pi)—(NZ)LYS165	

สารหมายเลข 19 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ MET98, PRO193, ALA198 และ VAL203 โดยกรดอะมิโน PRO193 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.211 Å กรดอะมิโน VAL203 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.255 Å กรดอะมิโน MET98 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.497 Å กรดอะมิโน ALA198 เกิด อันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.372 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.137 Å และ 2.415 Å พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมฟลูออรีนของ ลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.598 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 44** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 43**

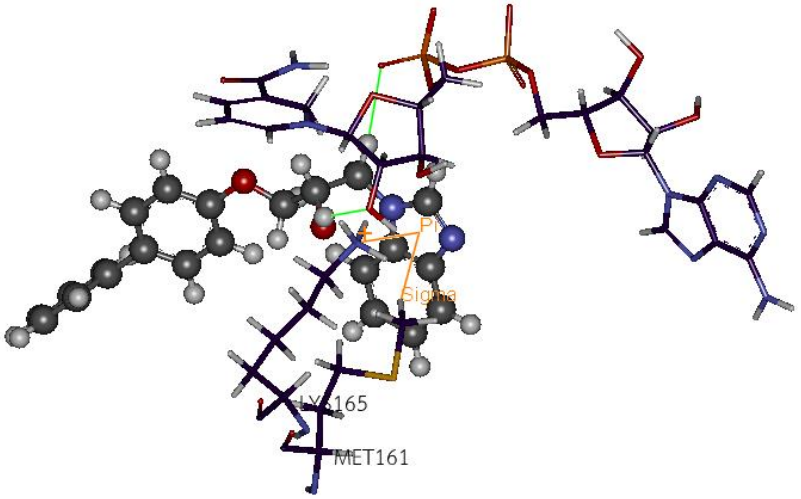


รูปที่ 44 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 19 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 43 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 19

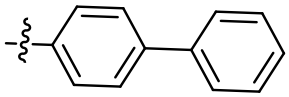
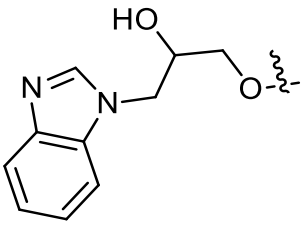
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 19	
	H-bond	R_1(F35)—(HA)PRO193	2.211 Å
		R_1(F36)—(HG11)VAL203	2.255 Å
		R_1(F35)—(H25)NAD	2.598 Å
	Hydrophobic	R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.734 Å
R_1		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.382 Å
		R_1(H13)—(HD23)LEU218	2.254 Å
	H-bond	Cpd19(H7)—(N)MET98	2.497 Å
		Cpd19(O24)—(HB2)ALA198	2.372 Å
		Cpd19(H25)—(O1N)NAD	2.137 Å
		Cpd19(H25)—(N7N)NAD	2.415 Å
	Hydrophobic	Cpd19(H8)—(HA)PHE97	1.712 Å
		Cpd19(H7)—(HN)MET98	2.347 Å
		Cpd19(H7)—(HB2)MET98	2.004 Å
		Cpd19(H6)—(HE3)MET103	1.613 Å
Cpd19		Cpd19(H5)—(HE1)TYR158	2.169 Å
		R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.734 Å
		Cpd19(H11)—(HG21)ALA203	2.199 Å

สารหมายเลข 20 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.985 Å และ 2.475 Å และพบอันตรกิริยา ซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 พบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 ดังแสดงใน**รูปที่ 45** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 และพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรฟิลิก โดยเกิดระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Gln214 ดังแสดงใน**ตารางที่ 44**

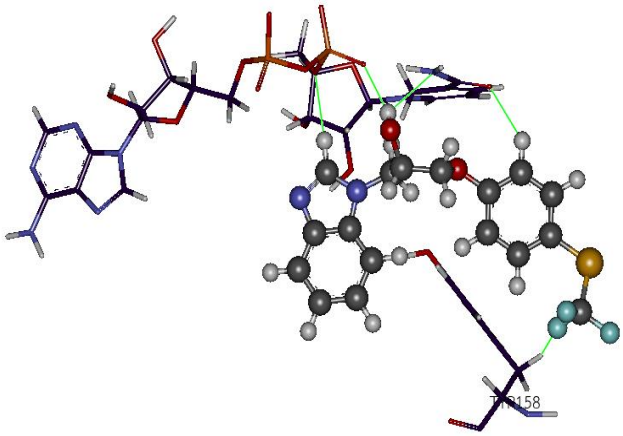


รูปที่ 45 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 20 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 44 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 20

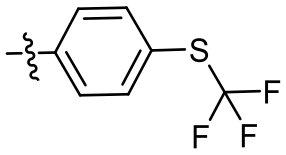
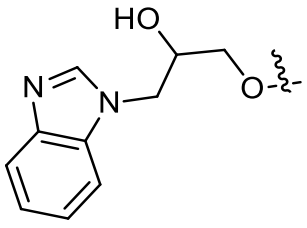
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 20	
	H-bond	-	
	Hydrophobic	R_1(H17)—(HB2)PRO193	2.217 Å
		R_1(H4)—(HG21)VAL203	1.605 Å
R_1		R_1(H6)—(HD21)LEU218	2.134 Å
	Hydrophilic	R_1(H11)—(HG2)GLN214	1.788 Å
	H-bond	Cpd20(H25)—(O2D)NAD	1.985 Å
		Cpd20(H15)—(O1N)NAD	2.475 Å
	Hydrophobic	Cpd20(H19)—(HA)PHE97	2.128 Å
		Cpd20(H18)—(HB2)MET98	1.906 Å
		Cpd20(H17)—(HE3)MET103	1.276 Å
		Cpd20(H2)—(HE1)TYR158	1.812 Å
		Cpd20(H14)—(HB2)ALA198	2.344 Å
		Cpd20(H18)—(HG21)ILE202	2.361 Å
		Cpd20(H16)—(HG22)VAL203	2.232 Å
Cpd20		Cpd20(H3)—(HG21)VAL203	2.449 Å
	Sigma-Pi	Cpd20(Pi)—(Sigma)MET161	
	N-Pi	Cpd20(Pi)—(NZ)LYS165	

สารหมายเลข 21 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ TYR158 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.867 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจน และอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.428 Å 1.984 Å และ 2.296 Å ตามลำดับดังแสดงใน**รูปที่ 46** และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.239 Å นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, PRO156, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 45**

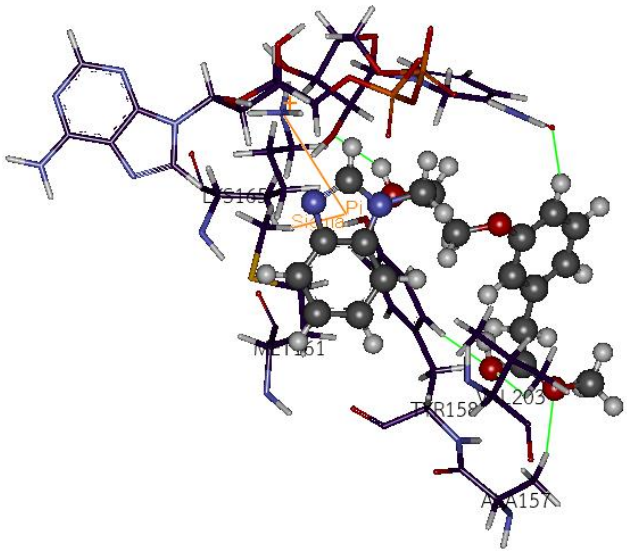


รูปที่ 46 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 21 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 45 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 21

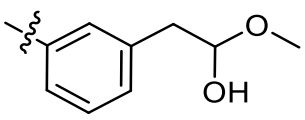
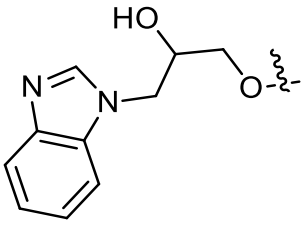
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 21
 R_1	H-bond	R_1(F40)—(HB1)TYR158 1.867 Å
		R_1(H7)—(O7N)NAD 2.239 Å
		R_1(H4)—(HE1)TYR158 2.169 Å
	Hydrophobic	R_1(H5)—(HD1)TYR158 2.069 Å
		R_1(H6)—(HB2)PRO193 1.594 Å
		R_1(H7)—(HA)PRO193 2.103 Å
		R_1(H4)—(HG21)VAL203 2.043 Å
		R_1(H6)—(HD21)LEU218 2.182 Å
		R_1(S36)—(HD12)LEU218 2.650 Å
 Cpd21	H-bond	Cpd21(H15)—(O5D)NAD 2.428 Å
		Cpd21(H25)—(O1N)NAD 1.984 Å
		Cpd21(H25)—(N7N)NAD 2.296 Å
	Hydrophobic	Cpd21(H14)—(HA)PHE97 1.817 Å
		Cpd21(H13)—(HB2)MET98 1.997 Å
		Cpd21(H12)—(HE3)MET103 1.449 Å
		Cpd21(F39)—(O)PRO156 2.698 Å
		Cpd21(H11)—(HE1)TYR158 2.295 Å
		Cpd21(H2)—(HG21)VAL203 1.874 Å

สารหมายเลข 22 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ คือ ALA157, TYR158 และ VAL203 โดยกรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอม ฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.165 Å กรดอะมิโน ALA157 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.391 Å กรดอะมิโน VAL203 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.380 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.891 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.003 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 และพบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน **รูปที่ 47** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่าง อะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 46**



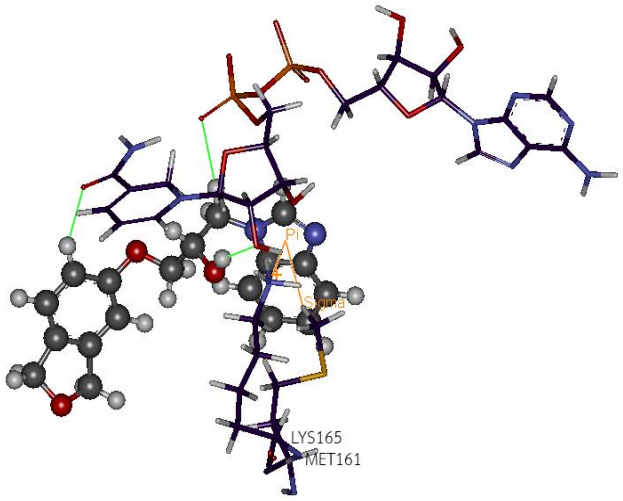
รูปที่ 47 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 22 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 46 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 22

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 22	
	H-bond	R_1(O39)—(HB2)ALA157	2.391 Å
		R_1(O45)—(HD1)TYR158	2.165 Å
		R_1(O45)—(HG12)VAL203	2.380 Å
	Hydrophobic	R_1(H4)—(O7N)NAD	2.003 Å
		R_1(H8)—(HD1)TYR158	2.108 Å
		R_1(H8)—(HB1)TYR158	1.960 Å
		R_1(H5)—(HB2)PRO193	1.003 Å
R_1		R_1(H4)—(HA)PRO193	2.249 Å
		R_1(H7)—(HG21)VAL203	2.076 Å
		R_1(H11)—(HG21)VAL203	2.173 Å
		R_1(H11)—(HG23)VAL203	2.040 Å
		R_1(H13)—(HD23)LEU218	2.192 Å
	H-bond	Cpd22(H25)—(O2D)NAD	1.891 Å
	Hydrophobic	Cpd22(H21)—(HA)PHE97	2.061 Å
		Cpd22(H20)—(HB2)MET98	1.795 Å
		Cpd22(H19)—(HE3)MET103	1.251 Å
		Cpd22(H2)—(HE1)TYR158	1.729 Å
		Cpd22(H18)—(HG22)VAL203	2.102 Å
		Cpd22(H3)—(HG21)VAL203	2.179 Å
Cpd22	Sigma-Pi	Cpd22(Pi)—(Sigma)MET161	
	N-Pi	Cpd22(Pi)—(NZ)LYS165	

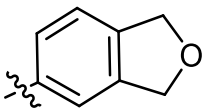
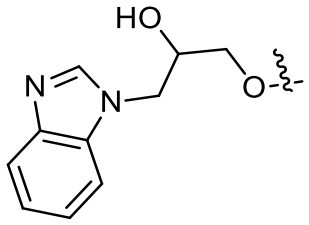
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 23 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.874 Å และ 2.478 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.230 Å พบอันตรกิริยาซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 พบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 ดังแสดงใน**รูปที่ 48** และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, PHE149, TYR158, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 47**



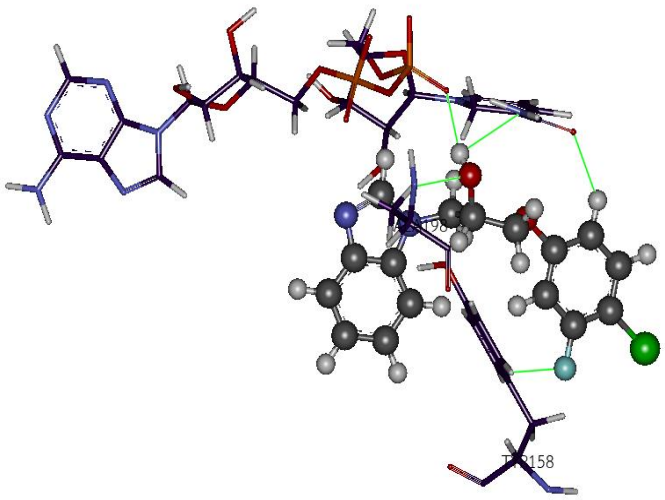
รูปที่ 48 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 23 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 47 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 23

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 23
 R_1	H-bond	R_1(H12)—(O7N)NAD 2.230 Å
		R_1(H14)—(HZ)PHE149 2.367 Å
		R_1(H18)—(HD1)TYR158 1.793 Å
		R_1(H18)—(HB1)TYR158 2.354 Å
		R_1(H12)—(HA)PRO193 2.160 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193 1.434 Å
	Hydrophobic	R_1(H16)—(HG21)VAL203 1.691 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218 2.335 Å
		R_1(H14)—(HD11)LEU218 2.376 Å
		R_1(H14)—(HD12)LEU218 2.293 Å
		R_1(H15)—(HD12)LEU218 2.221 Å
		R_1(H15)—(HD23)LEU218 2.113 Å
 Cpd23	H-bond	Cpd23(H25)—(O2D)NAD 1.874 Å
		Cpd23(H4)—(O1N)NAD 2.478 Å
	Hydrophobic	Cpd23(H8)—(HA)PHE97 2.060 Å
		Cpd23(H7)—(HB2)MET98 1.898 Å
		Cpd23(H6)—(HE3)MET103 1.312 Å
		Cpd23(H11)—(HE1)TYR158 1.794 Å
		Cpd23(H3)—(HB2)ALA198 2.270 Å
		Cpd23(H7)—(HG21)ILE202 2.333 Å
		Cpd23(H5)—(HG22)VAL203 2.178 Å
		Cpd23(H10)—(HG21)VAL203 2.204 Å
	Sigma-Pi	Cpd23(Pi)—(Sigma)MET161
	N-Pi	Cpd23(Pi)—(NZ)LYS165

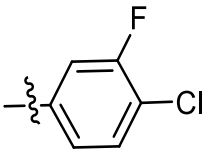
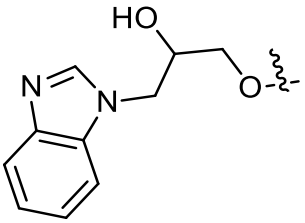
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 24 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ ALA198 และ TYR158 โดยกรดอะมิโน ALA158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.288 Å กรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.217Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.009 Å และ 2.487 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.453 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 49** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 48**

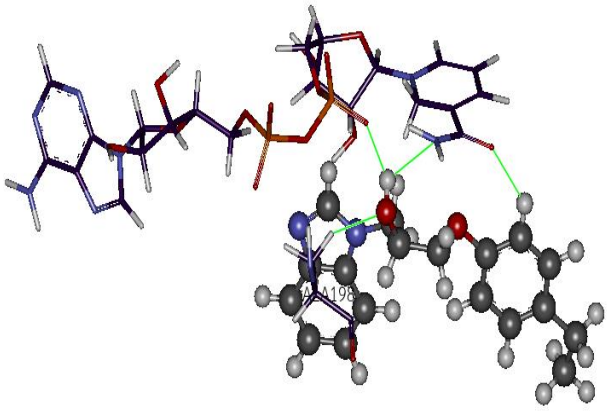


รูปที่ 49 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 24 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 48 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 24

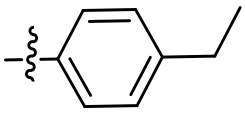
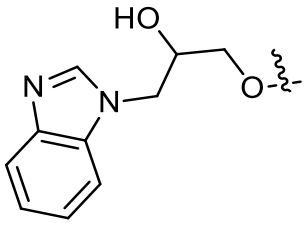
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 24
 R_1	H-bond	R_1(F36)—(HD1)TYR158 2.217 Å
		R_1(H12)—(O7N)NAD 2.453 Å
	Hydrophobic	R_1(H13)—(HB2)PRO193 1.867 Å
		R_1(H12)—(HA)PRO193 2.179 Å
		R_1(H14)—(HG21)VAL203 1.589 Å
		R_1(H11)—(HG21)VAL203 1.825 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218 2.289 Å
 Cpd24	H-bond	Cpd24(O24)—(HB2)ALA198 2.288 Å
		Cpd24(H25)—(O1N)NAD 2.009 Å
		Cpd24(H25)—(N7N)NAD 2.487 Å
	Hydrophobic	Cpd24(H8)—(HA)PHE97 1.738 Å
		Cpd24(H7)—(HB2)MET98 1.967 Å
		Cpd24(H8)—(HN)MET98 2.771 Å
		Cpd24(H6)—(HE3)MET103 1.464 Å
		Cpd24(H6)—(SD)MET103 3.000 Å
		Cpd24(H5)—(HE1)TYR158 2.328 Å

สารหมายเลข 25 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.209 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจน และอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.006 Å และ 2.334 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.402 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 50** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 49**

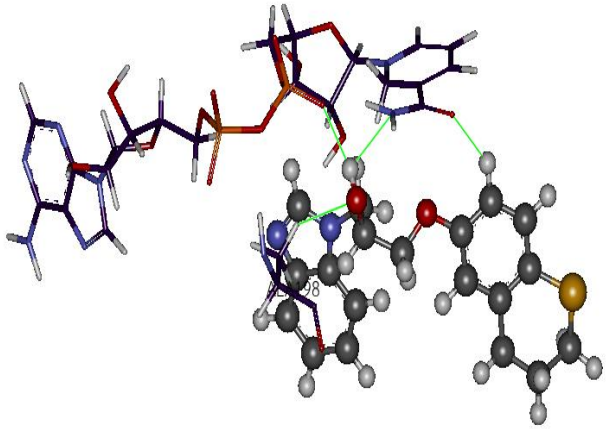


รูปที่ 50 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 25 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 49 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 25

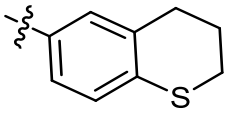
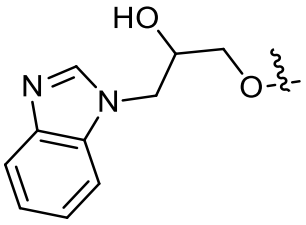
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 25	
 R_1	H-bond	R_1(H12)—(O7N)NAD	2.402 Å
		R_1(H15)—(HE1)TYR158	2.400 Å
		R_1(H14)—(HD1)TYR158	2.156 Å
		R_1(H19)—(HB1)TYR158	1.902 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	1.817 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HA)PRO193	2.125 Å
		R_1(H15)—(HG21)VAL203	1.763 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218	2.240 Å
		R_1(H17)—(HD23)LEU218	2.025 Å
		R_1(H16)—(HD12)LEU218	2.349 Å
 Cpd25	H-bond	Cpd25(O24)—(HB2)ALA198	2.209 Å
		Cpd25(H25)—(O1N)NAD	2.006 Å
		Cpd25(H25)—(N7N)NAD	2.334 Å
	Hydrophobic	Cpd25(H8)—(HA)PHE97	1.751 Å
		Cpd25(H7)—(HB2)MET98	1.937 Å
		Cpd25(H6)—(HE3)MET103	1.467 Å
		Cpd25(H5)—(HE1)TYR158	2.271 Å
		Cpd25(H11)—(HG21)VAL203	2.026 Å

สารหมายเลข 27 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.408 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.057 Å และ 2.353 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.115 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 51** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ALA198, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 50**



รูปที่ 51 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ของสารหมายเลข 27 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

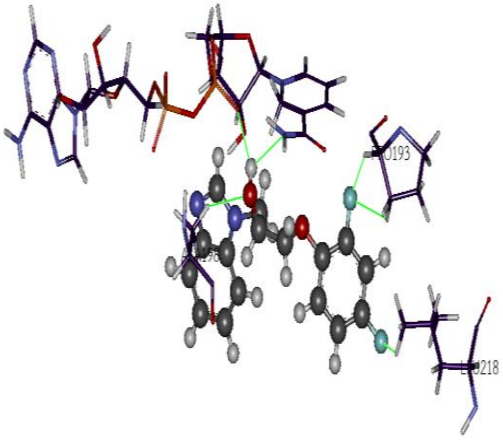
ตารางที่ 50 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงของสารประกอบหมายเลข 27

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 27	
 R_1	H-bond	R_1(H16)—(O7N)NAD	2.115 Å
	Hydrophobic	R_1(H20)—(HB2)ALA157	1.884 Å
		R_1(H14)—(HD1)TYR158	1.321 Å
		R_1(H17)—(HB1)TYR158	1.913 Å
		R_1(H16)—(HA)PRO193	2.106 Å
		R_1(H15)—(HB2)PRO193	1.802 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.252 Å
		R_1(H13)—(HG11)VAL203	2.225 Å
		R_1(H13)—(HG12)VAL203	2.134
 Cpd27	H-bond	Cpd27(O23)—(HB2)ALA198	2.408 Å
		Cpd27(H24)—(O1N)NAD	2.057 Å
		Cpd27(H24)—(N7N)NAD	2.353 Å
	Hydrophobic	Cpd27(H8)—(HA)PHE97	1.737 Å
		Cpd27(H7)—(HB2)MET98	1.850 Å
		Cpd27(H6)—(HE3)MET103	1.434 Å
		Cpd27(H6)—(HE1)MET103	2.385 Å
		Cpd27(H5)—(HE1)TYR158	2.393 Å
		Cpd27(H2)—(HB1)ALA198	2.175 Å
		Cpd27(H2)—(HB2)ALA198	2.223 Å
		Cpd27(H11)—(HG21)VAL203	1.773 Å
		Cpd27(S44)—(HD12)LEU218	2.663 Å

สารที่มีประสิทธิภาพปานกลางในการยับยั้งเอนไซม์ ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารอนุพันธ์ Benzimidazole

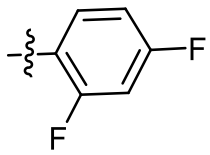
เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง คือ สารหมายเลข 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 และ 52 ซึ่งมีค่า docking score -11.48, -11.48, -11.47, -11.47, -11.46, -11.44, -11.43, -11.42, -11.40, -11.39, -11.39, -11.39, -11.38, -11.38, -11.38, -11.37, -11.36, -11.36, -11.33, -11.33, -11.31, -11.29, -11.26, -11.25 และ -11.25 ตามลำดับ มีตำแหน่งในการวางตัวและ พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญดังนี้

สารหมายเลข 28 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ PRO193, ALA198 และ LEU218 โดยเกิดระหว่างอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน Pro193 และ Leu218 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.120 Å, 2.565 Å และ 2.529 Å ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.28 และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน ALA198 กับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.361Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.112 Å และ 2.435 Å ตามลำดับ ดังแสดงใน**รูปที่ 52** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193 และ VAL203 ดังแสดงใน**ตารางที่ 51**

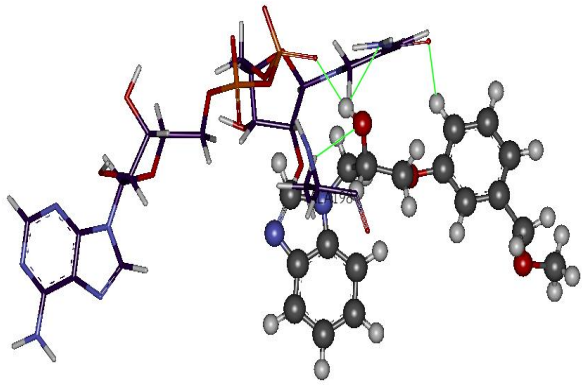


รูปที่ 52 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 28 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 51 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 28

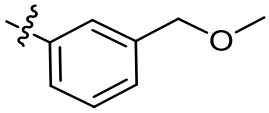
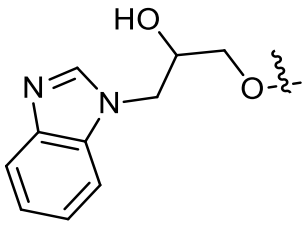
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 28	
 R_1	H-bond	R_1(F35)—(HA)PRO193	2.120 Å
		R_1(F35)—(HB2)PRO193	2.565 Å
		R_1(F36)—(HD23)LEU218	2.529 Å
	Hydrophobic	R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.972 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.257 Å
		R_1(H13)—(HG11)VAL203	2.324 Å
K	H-bond	Cpd28(O23)—(HB2)ALA198	2.361 Å
		Cpd28(H24)—(O1N)NAD	2.112 Å
		Cpd28(H24)—(N7N)NAD	2.435 Å
	Hydrophobic	Cpd28(H8)—(HA)PHE97	1.788 Å
		Cpd28(H7)—(HB2)MET98	1.900 Å
		Cpd28(H6)—(HE3)MET103	1.411 Å
		Cpd28(H5)—(HE1)TYR158	2.228 Å
		Cpd28(H11)—(HG21)VAL203	1.932 Å

สารหมายเลข 29 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.439 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.990 Å และ 2.454 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.233 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 53** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, MET155, TYR158, PRO193, ALA198, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 52**

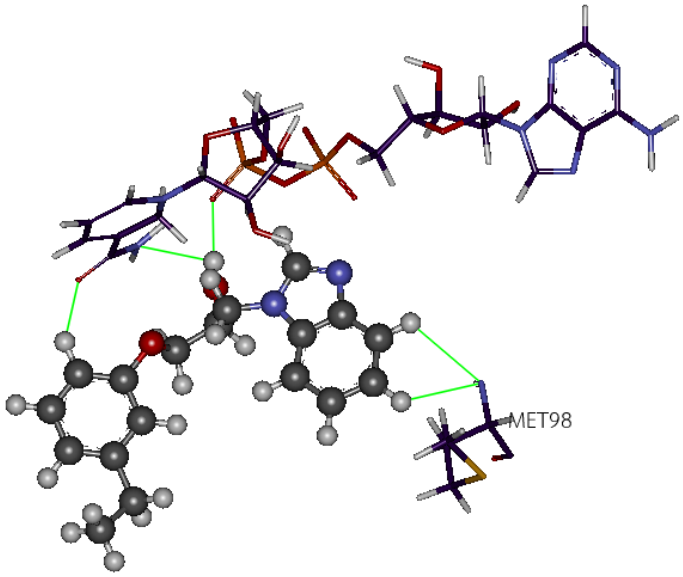


รูปที่ 53 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารหมายเลข 29 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 52 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 29

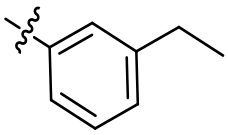
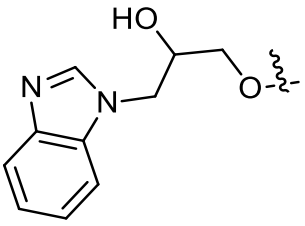
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 29
 R_1	H-bond	R_1(H15)—(O7N)NAD 2.233 Å
		R_1(H18)—(HG2)MET155 2.307 Å
		R_1(H18)—(HB1)TYR158 1.880 Å
		R_1(H14)—(HB2)PRO193 1.651 Å
	Hydrophobic	R_1(H14)—(HA)PRO193 2.280 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203 1.656 Å
		R_1(H17)—(HG11)VAL203 1.908 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218 2.159 Å
		Cpd29(O23)—(HB2)ALA198 2.439 Å
	H-bond	Cpd29(H24)—(O1N)NAD 1.990 Å
		Cpd29(H24)—(N7N)NAD 2.454 Å
 Cpd29	Hydrophobic	Cpd29(H8)—(HA)PHE97 1.822 Å
		Cpd29(H7)—(HB2)MET98 1.795 Å
		Cpd29(H6)—(HE3)MET103 1.216 Å
		Cpd29(H6)—(HE1)MET103 2.397 Å
		Cpd29(H2)—(HB2)ALA198 2.176 Å
		Cpd29(H2)—(HB1)ALA198 2.130 Å
		Cpd29(H7)—(HG21)ILE202 2.236 Å
		Cpd29(H11)—(HG21)VAL203 1.535 Å

สารหมายเลข 30 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ ALA198 และ MET98 โดยกรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.349 Å กรดอะมิโน MET98 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.598 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.036 Å และ 2.468 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.278 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 54** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 53**



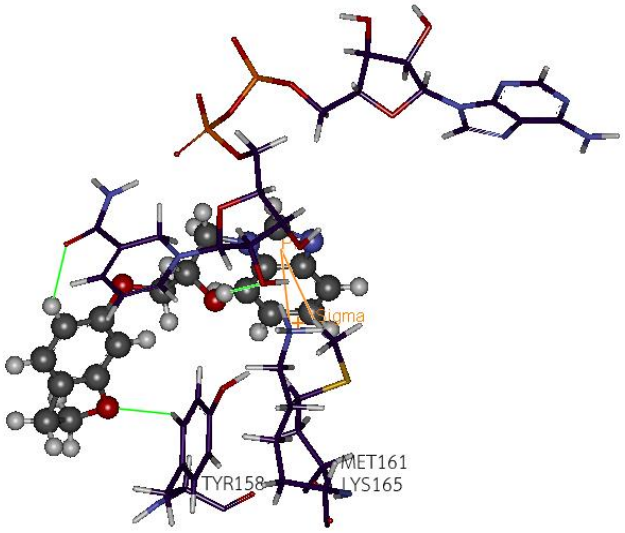
รูปที่ 54 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 30 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 53 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 30

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 30
 R_1	H-bond	R_1(H15)—(O7N)NAD 2.278 Å
	Hydrophobic	R_1(H18)—(HB2)ALA157 2.115 Å R_1(H17)—(HD1)TYR158 1.739 Å R_1(H20)—(HB1)TYR158 2.198 Å R_1(H15)—(HA)PRO193 2.034 Å R_1(H14)—(HB2)PRO193 1.435 Å R_1(H12)—(HG21)VAL203 1.667 Å R_1(H16)—(HG11)VAL203 1.956 Å R_1(H16)—(HG12)VAL203 2.176 Å R_1(H14)—(HD21)LEU218 2.303 Å
 Cpd30	H-bond	Cpd30(O23)—(HB2)ALA198 2.349 Å Cpd30(H7)—(N)MET98 2.598 Å Cpd30(H24)—(O1N)NAD 2.036 Å Cpd30(H24)—(N7N)NAD 2.468 Å
	Hydrophobic	Cpd30(H8)—(HA)PHE97 1.726 Å Cpd30(H7)—(HB2)MET98 1.965 Å Cpd30(H6)—(HE3)MET103 1.476 Å Cpd30(H5)—(HE1)TYR158 2.272 Å Cpd30(H7)—(HG21)ILE202 2.388 Å Cpd30(H11)—(HG21)VAL203 1.889 Å

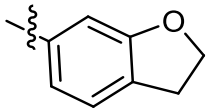
สารหมายเลข 31 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ TYR158 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.418 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.947 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.491Å และพบอันตรกิริยาซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 พบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 ดังแสดงใน**รูปที่ 55** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน

PHE97, MET98 , MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 54**

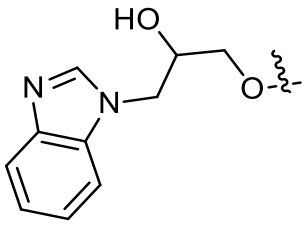


รูปที่ 55 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 31 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 54 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 31

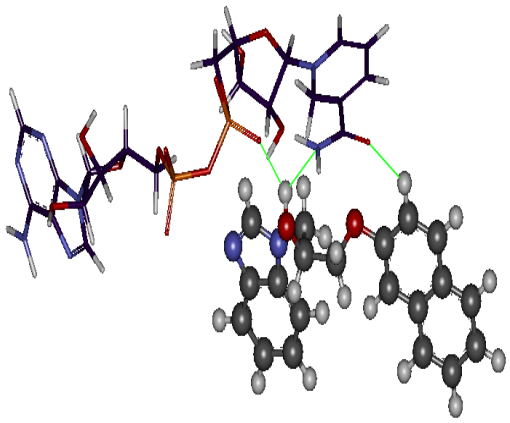
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 31	
 R_1	H-bond	R_1(O41)—(HD1)TYR158	2.418 Å
		R_1(H16)—(O7N)NAD	2.491 Å
		R_1(H18)—(HB2)ALA157	2.379 Å
		R_1(H16)—(HA)PRO193	2.145 Å
		R_1(H16)—(HB2)PR0193	2.248 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO1931	1.760 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.648 Å
	Hydrophobic	R_1(H13)—(HD21)LEV218	2.130 Å
		R_1(H15)—(HD12)LEV218	1.978 Å
		R_1(H15)—(HD23)LEU	2.246 Å

ตารางที่ 54 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง ของสารประกอบหมายเลข 31(ต่อ)

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 31	
	H-bond	Cpd31(H24)—(O2D)NAD	1.947 Å
		Cpd31(H8)—(HA)PHE97	2.118 Å
		Cpd31(H7)—(HB2)MET98	1.893 Å
		Cpd31(H6)—(HE3)MET103	1.327 Å
	Hydrophobic	Cpd31(H11)—(HE1)TRY158	1.941 Å
		Cpd31(H3)—(HB2)ALA198	2.171 Å
		Cpd31(H7)—(HG21)ILE202	2.348 Å
		Cpd31(H5)—(HG22)VAL203	2.101 Å
Cpd31		Cpd31(H10)—(HG21)VAL203	2.249 Å
	Sigma-Pi	Cpd31(Pi)—(Sigma) HE3 MET161	
	N-Pi	Cpd31(Pi)—(+)NZ LYS165	

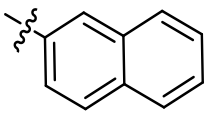
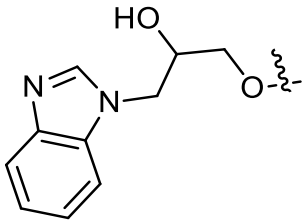
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 32 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.987 Å และ 2.405 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.237 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 56** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ALA198, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 55**

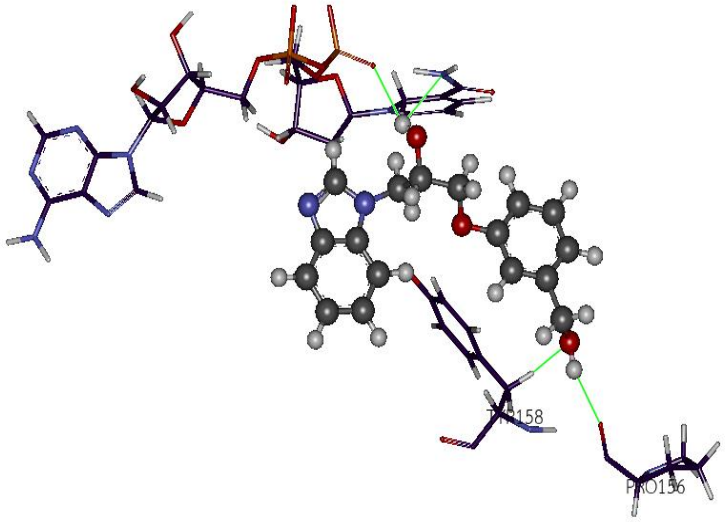


รูปที่ 56 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 32 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 55 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 32

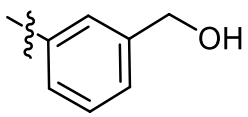
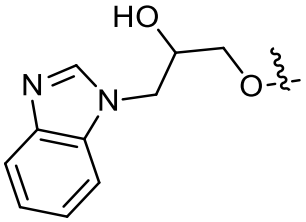
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 32	
 R_1	H-bond	R_1(H16)—(O7N)NAD	2.237 Å
		R_1(H18)—(HB2)ALA157	2.056 Å
		R_1(H13)—(HD1)TRY158	1.873 Å
	Hydrophobic	R_1(H16)—(HA)PR0193	2.044 Å
		R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.612 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.655 Å
		R_1(H15)—(HD12)LEU218	1.963 Å
		R_1(H15)—(HD11)LEU218	2.114 Å
		R_1(H14)—(HD21)LEU218	2.391 Å
 Cpd32	H-bond	Cpd32(H24)—(O1N)NAD	1.987 Å
		R_1(H24)—(N7N)NAD	2.405 Å
	Hydrophobic	Cpd32(H8)—(HA)PHE97	1.728 Å
		Cpd32(H7)—(HB2)MET98	1.826 Å
		Cpd32(H6)—(SD)MET103	2.910 Å
		Cpd32(H6)—(HE1)MET103	2.368 Å
		Cpd32(H6)—(HE3)MET103	1.414 Å
		Cpd32(H5)—(HE1)TRY158	2.254 Å
		Cpd32(O23)—(HB2)ALA198	2.226 Å
		Cpd32(H11)—(HG21)VAL203	1.899 Å

สารหมายเลข 33 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ PRO156 และ TYR158 โดยกรดอะมิโน PRO156 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.113 Å กรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.190 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.255 Å และ 2.334 Å ตามลำดับ ดังแสดงใน**รูปที่ 57** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ILE202 และ VAL203 ดังแสดงใน**ตารางที่ 56**

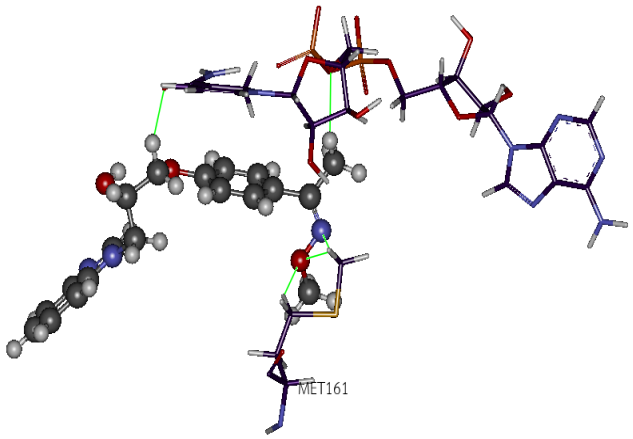


รูปที่ 57 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 33 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 56 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบ หมายเลข 33

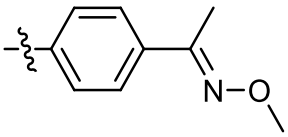
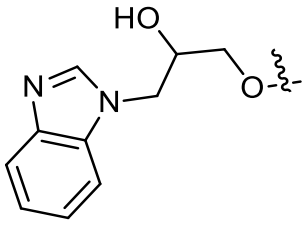
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 33	
	H-bond	R1(H40)—(O)PRO156	2.113 Å
		R_1(H39)—(OB1)TYR158	2.190 Å
		R_1(H40)—(HB2)ALA157	2.385 Å
		R_1(H13)—(HD1)TRY158	2.000 Å
R_1	Hydrophobic	R_1(H40)—(HN)TRY158	2.178 Å
		R_1(H15)—(HB2)PRO193	1.712 Å
		R_1(H13)—(HG21)VAL203	2.187 Å
		R_1(H13)—(HG23)VAL203	2.386 Å
	H-bond	Cpd33(H24)—(O1N)NAD	2.255 Å
		Cpd33(H24)—(N7N)NAD	2.334 Å
	Hydrophobic	Cpd33(H9)—(HA)PHE97	1.773 Å
		Cpd33(H8)—(HB2)MET98	1.943 Å
		Cpd33(H7)—(HE3)MET103	1.422 Å
		Cpd33(H7)—(HE1)MET103	2.398 Å
Cpd33		Cpd33(H8)—(HG21)ILE202	2.262 Å
		Cpd33(H12)—(HG21)VAL203	2.223 Å

สารหมายเลข 34 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ MET161 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.197 Å, 2.310 Å และ 2.157 Å ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.34 และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.370 Å พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.468 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 58** และพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET103, PHE149, MET155, TYR158, ALA198, ILE202 และ VAL203 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิด ไฮโดรฟิลิกกับกรดอะมิโน GLN214 ดังแสดงใน**ตารางที่ 57**

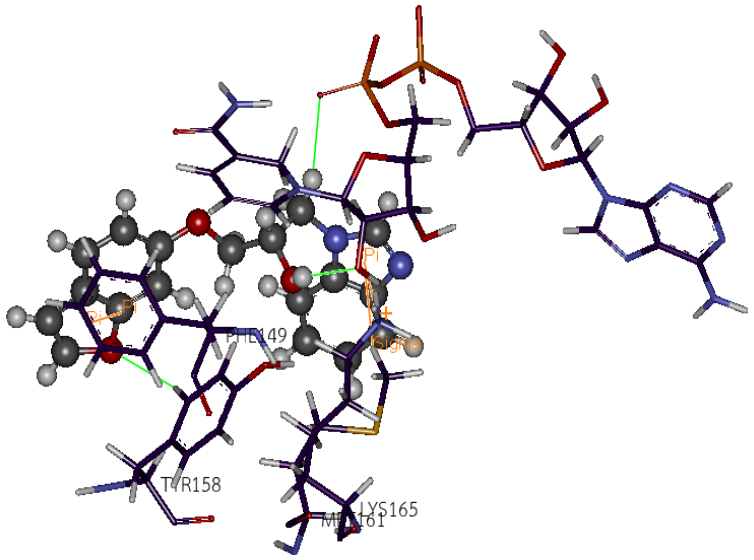


รูปที่ 58 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารหมายเลข 34 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 57 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบ หมายเลข 34

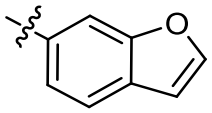
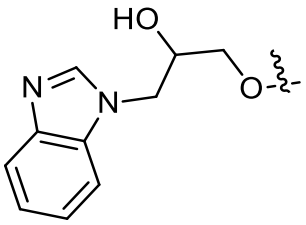
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 34	
 R$_1$	H-bond	R$_1$(N37)—(HE3)MET161	2.157 Å
		R$_1$(O42)—(HE3)MET161	2.197 Å
		R$_1$33(O42)—(HG1)MET161	2.310 Å
	Hydrophobic	R$_1$(H9)—(OSD)NAD	2.468 Å
		R$_1$(H11)—(HE3)MET103	2.094 Å
		R$_1$(H6)—(HB1)ALA198	2.006 Å
		R$_1$(H6)—(HB2)ALA198	1.542 Å
		R$_1$(H10)—(HB2)ALA198	2.049 Å
		R$_1$(H10)—(HB3)ALA198	2.216 Å
		R$_1$(H13)—(HG21)ILE202	2.137 Å
 Cpd34	H-bond	Cpd14(H3)—(O7N)NAD	2.370 Å
	Hydrophobic	Cpd34(H17)—(HE1)PHE149	2.120 Å
		Cpd34(H17)—(SD)MET155	2.729 Å
		Cpd34(H18)—(SD)MET155	2.752 Å
		Cpd34(H5)—(HH)TYR158	2.168 Å
		Cpd34(H21)—(HG11)VAL203	1.835 Å
	Hydrophilic	Cpd34(H20)—(HG2)GLN214	2.175 Å

สารหมายเลข 35 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ TYR158 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.424 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.953 Å และ 2.493 Å และพบอันตรกิริยาซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 พบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 พบอันตรกิริยาชนิด ไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับ วงอะโรมาติกของกรดอะมิโน PHE149 ดังแสดงใน**รูปที่ 59** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 58**



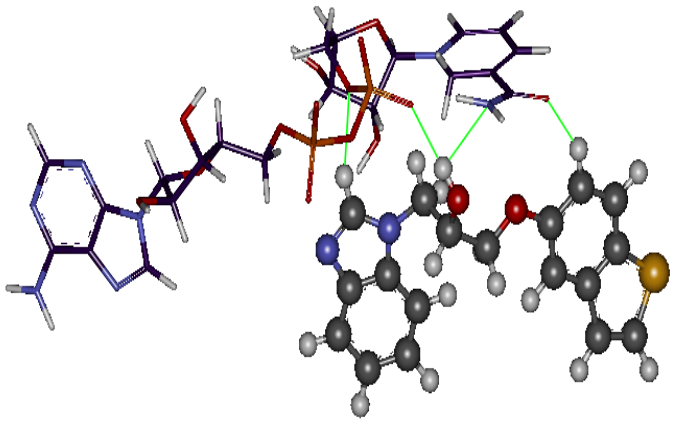
รูปที่ 59 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารหมายเลข 35 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 58 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 35

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 35
 R_1	H-bond	R_1(O39)—(HD1)TYR158 2.424 Å
		R_1(H16)—(HB2)ALA157 2.249 Å
		R_1(H12)—(HA)PRO193 2.080 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HB2)PRO193 2.204 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193 1.751 Å
		R_1(H1)—(HG21)VAL203 1.901 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEV218 1.975 Å
		R_1(H14)—(HD12)LEV218 1.878 Å
		R_1(H14)—(HD23)LEV218 2.245 Å
 Cpd35	H-bond	Cpd35(H24)—(O2D)NAD 1.953 Å
		Cpd35(H4)—(O1N)NAD 2.493 Å
	Hydrophobic	Cpd35(H8)—(HA)PHE97 2.033 Å
		Cpd35(H7)—(HB2)MET98 1.896 Å
		Cpd35(H6)—(HE3)MET103 1.297 Å
		Cpd35(H11)—(HE1)TYR158 1.731 Å
		Cpd35(H3)—(HB2)ALA198 2.371 Å
		Cpd35(H7)—(HG21)ILE202 2.344 Å
		Cpd35(H5)—(HG22)VAL203 2.316 Å
	Sigma-Pi	Cpd35(Pi)—(Sigma)(HE3) MET161
	N-Pi	Cpd35(Pi)—(NZ) LYS165
	Pi-Pi	R1(Pi)—(Pi) PHE149

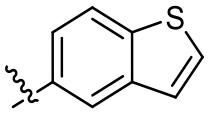
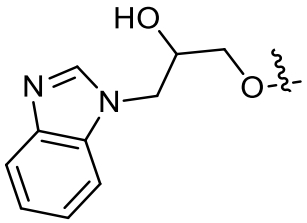
หมายเหตุ : Pi-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไพ-ไพ
Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 36 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.485 Å, 2.057Å และ 2.304 Å ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.36 และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.996 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 60** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, ALA198, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 59**

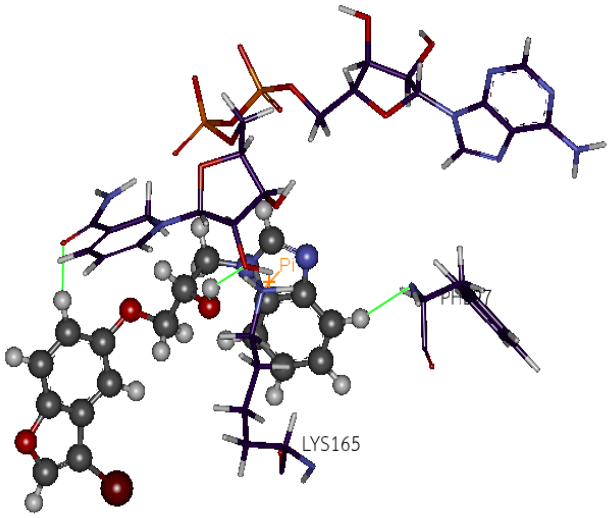


รูปที่ 60 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 36 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 59 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 36

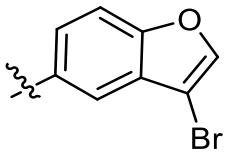
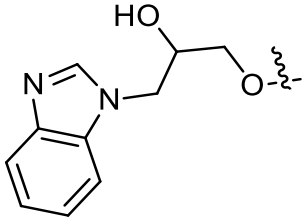
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 36
	H-bond	R_1(H12)—(O7N)NAD 1.966 Å
		R_1(H15)—(HD1)TYR158 2.218 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193 1.446 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HA)PRO193 2.039 Å
R_1		R_1(H14)—(HG21)VAL203 1.306 Å
		R_1(S39)—(HD12)LEU218 2.873 Å
		Cpd36(H9)—(O5D)NAD 2.485 Å
	H-bond	Cpd36(H24)—(O1N)NAD 2.057 Å
		Cpd36(H24)—(N7N)NAD 2.304 Å
		Cpd36(H8)—(HA)PHE97 1.749 Å
		Cpd36(H7)—(HB2)MET98 1.916 Å
		Cpd36(H6)—(HE3)MET103 1.535 Å
		Cpd36(H2)—(HB2)ALA198 2.176 Å
	Hydrophobic	Cpd36(H2)—(HB1)ALA198 2.150 Å
Cpd36		Cpd36(H10)—(HG22)VAL203 2.260 Å
		Cpd36(H10)—(HG21)VAL203 1.652 Å

สารหมายเลข 37 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ PHE97 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.454 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.849 Å พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.841 Å พบอันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 ดังแสดงใน**รูปที่ 61** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, ALA198, และ VAL203 ดังแสดงใน**ตารางที่ 60**

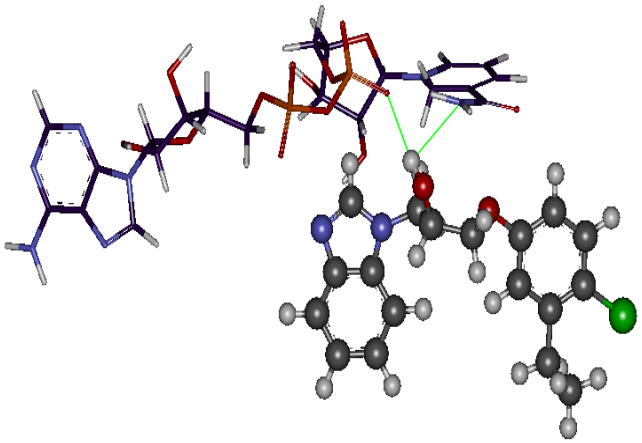


รูปที่ 61 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง ของ สารหมายเลข 37 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 60 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง ของสารประกอบหมายเลข 37

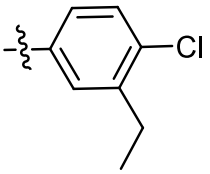
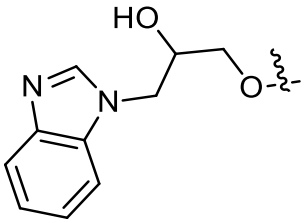
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 37	
 R$_1$	H-bond	R$_1$(H12)—(O7N)NAD	1.841 Å
		R$_1$(H15)—(HD1)TYR158	2.218 Å
	Hydrophobic	R$_1$(H12)—(HA)PRO193	2.145 Å
		R$_1$(H13)—(HB2)PRO193	1.189 Å
		R$_1$(H14)—(HG21)VAL203	1.626 Å
 Cpd37	H-bond	Cpd37(H24)—(O2D)NAD	1.849 Å
		Cpd37(H8)—(N)PHE97	2.454 Å
	Hydrophobic	Cpd37(H8)—(HA)PHE97	1.896 Å
		Cpd37(H7)—(HB2)MET98	1.831 Å
		Cpd37(H6)—(HE3)MET103	1.432 Å
		Cpd37(H11)—(HE1)TYR158	1.841 Å
		Cpd37(H3)—(HB2)ALA198	2.334 Å
		Cpd37(H4)—(HB2)ALA198	2.366 Å
		Cpd37(H5)—(HG22)VAL203	2.147 Å
		Cpd37(H10)—(HG21)VAL203	2.217 Å
	N-Pi	Cpd37(Pi)—(NZ)(+)LYS165	

สารหมายเลข 38 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.142 Å และ 2.458 Å ตามลำดับ ดังแสดงใน**รูปที่ 62** และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 61**



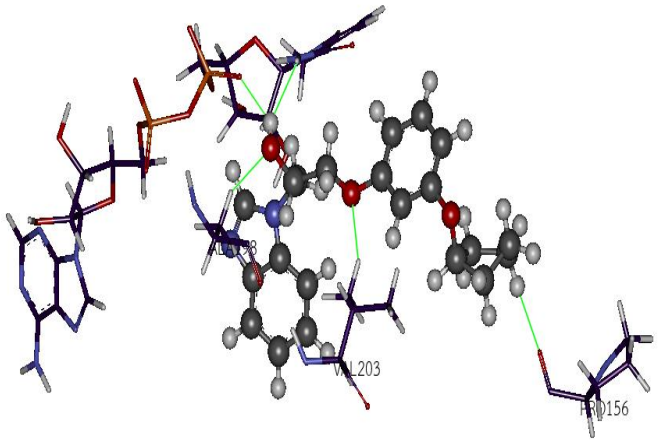
รูปที่ 62 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 38 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 61 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 38

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 38	
	H-bond	-	
 R$_1$	Hydrophobic	R$_1$(H17)—(HB2)ALA157	1.928 Å
		R$_1$(H17)—(HB1)ALA157	2.111 Å
		R$_1$(H15)—(HD1)TYR158	1.669 Å
		R$_1$(H16)—(HD1)TYR158	2.199 Å
		R$_1$(H16)—(HB1)TYR158	2.096 Å
		R$_1$(H12)—(HA)PRO193	2.145 Å
		R$_1$(H12)—(HB2)PRO193	2.297 Å
		R$_1$(H13)—(HB2)PRO193	1.841 Å
		R$_1$(H18)—(HG12)VAL203	1.751 Å
		R$_1$(H18)—(HG11)VAL203	1.502 Å
		R$_1$(H14)—(HG21)VAL203	1.644 Å
		R$_1$(H13)—(HD21)LEU218	2.280 Å
 Cpd38	H-bond	Cpd38(H24)—(O1N)NAD	2.142 Å
		Cpd38(H24)—(N7N)NAD	2.458 Å
	Hydrophobic	Cpd38(H8)—(HA)PHE97	1.916 Å
		Cpd38(H7)—(HB2)MET98	2.026 Å
		Cpd38(H6)—(HE3)MET103	1.336 Å
		Cpd38(H5)—(HE1)TYR158	2.338 Å
		Cpd38(H7)—(HG21)ILE202	2.361 Å
		Cpd38(H18)—(HG21)VAL203	1.571 Å

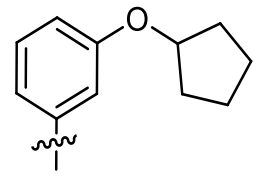
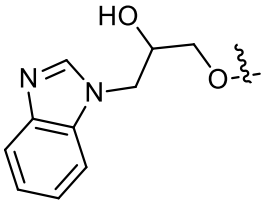
สารหมายเลข 39 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ PRO156, ALA198 และ VAL203 โดยกรดอะมิโน PRO156 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R$_1$ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.136 Å กรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.115 Å กรดอะมิโน VAL203 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.379 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.871 Å และ 2.343 Å ตามลำดับ

ดังแสดงใน**รูปที่ 63** และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่าง อะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, ALA157, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตาราง 62**



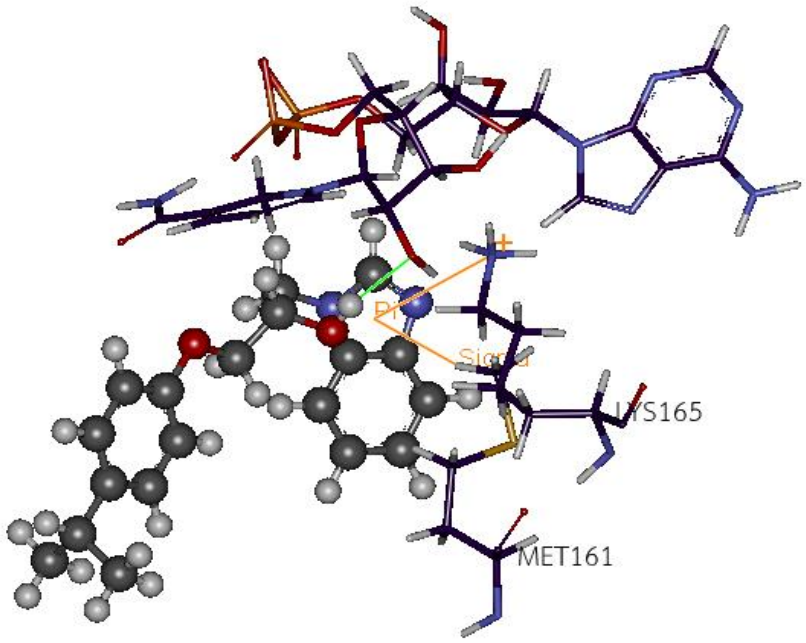
รูปที่ 63 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 39 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 62 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 39

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 39	
 R_1	H-bond	R_1(H11)—(O)PRO156	2.136 Å
		R_1(H16)—(HB2)ALA157	1.371 Å
		R_1(H9)—(HD1)TYR158	2.288 Å
		R_1(H9)—(HB1)TYR158	1.939 Å
	Hydrophobic	R_1(H5)—(HA)PRO193	2.305 Å
		R_1(H5)—(HB2)PRO193	1.965 Å
		R_1(H6)—(HB2)PRO193	2.217 Å
		R(H7)—(HG21)VAL203	1.633 Å
		R_1(H7)—(HG11)VAL203	1.838 Å
		R_1(H8)—(HG11)VAL203	2.038 Å
		R_1(H8)—(HG12)VAL203	2.166 Å
		R_1(H6)—(HD21)LEU218	1.830 Å
		R_1(O36)—(HD23)LEU218	2.470 Å
		R_1(H14)—(HD23)LEU218	1.951 Å
		R_1(H14)—(HD12)LEU218	2.025 Å
 Cpd39	H-bond	Cpd39(O23)—(HB2)ALA198	2.115 Å
		Cpd39(O16)—(HG21)VAL203	2.379 Å
		Cpd39(H24)—(O1N)NAD	1.871 Å
		Cpd39(H24)—(N7N)NAD	2.343 Å
	Hydrophobic	Cpd39(H23)—(HA)PHE97	1.623 Å
		Cpd39(H22)—(HB2)MET98	1.847 Å
		Cpd39(H21)—(HE3)MET103	1.529 Å
		Cpd39(H20)—(HE1)TYR158	2.288 Å

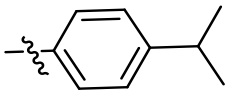
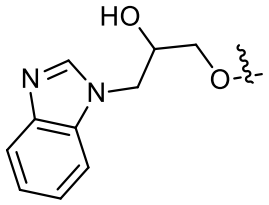
สารหมายเลข 40 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.951 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 และพบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 64** และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน

PHE97, MET98, MET103, MET155, TYR158, PRO193, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 63**



รูปที่ 64 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 40 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

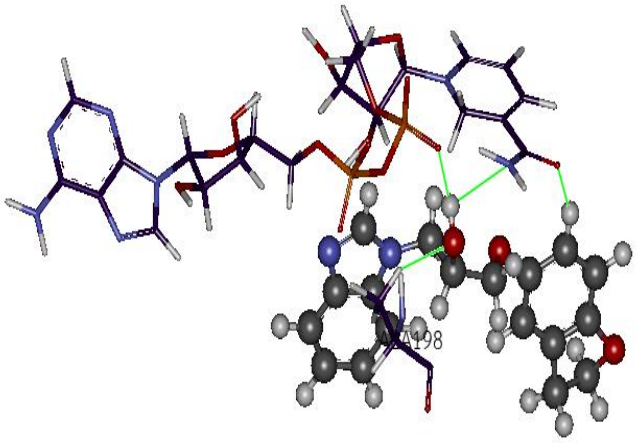
ตารางที่ 63 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 40

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 40	
	H-bond	-	
	Hydrophobic	R_1(H18)—(SD)MET155	2.794 Å
		R_1(H19)—(HB1)TYR158	2.362 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	2.152 Å
		R_1(H12)—(HB2)PRO193	2.135 Å
		R_1(H12)—(HA)PRO193	2.326 Å
R_1		$R_1$40(H5)—(HG22)VAL203	2.255 Å
		R_1(H15)—(HG21)VAL203	1.729 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218	1.921 Å
		R_1(H22)—(HD23)LEU218	1.977 Å
		R_1(H16)—(HD12)LEU218	1.877 Å
	H-bond	Cpd40(H24)—(O2D)NAD	1.951 Å
		Cpd40(H8)—(HA)PHE97	2.122 Å
		Cpd40(H7)—(HB2)MET98	1.892 Å
	Hydrophobic	Cpd40(H6)—(HE3)MET103	1.253 Å
		Cpd40(H11)—(HE1)TYR158	1.708 Å
		Cpd40(H7)—(HG21)ILE202	2.374 Å
Cpd40	Sigma-Pi	Cpd40(Pi)—(Sigma)(HE3)MET161	
	N-Pi	Cpd40(Pi)—(NZ)LYS165	

หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

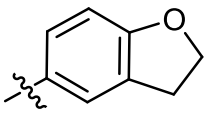
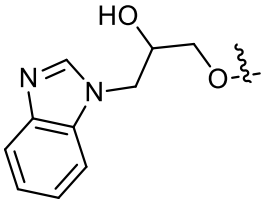
สารหมายเลข 41 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.218 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.948 Å และ 2.343 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่

มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.177 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 65** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 64**

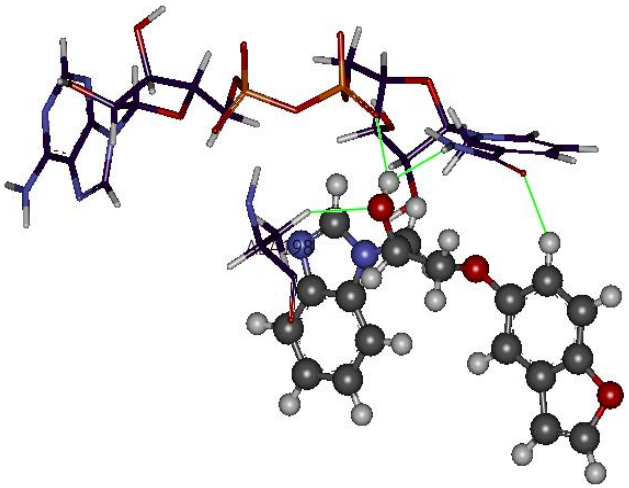


รูปที่ 65 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารหมายเลข 41 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 64 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 41

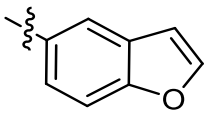
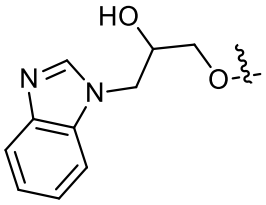
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 41	
 R$_1$	H-bond	R$_1$(H16)—(O7N)NAD	2.177 Å
		R$_1$(H14)—(HD1)TYR158	1.917 Å
		R$_1$(H16)—(HA)PRO193	2.127 Å
		R$_1$(H15)—(HB2)PRO193	1.398 Å
	Hydrophobic	R$_1$(H12)—(HB2)PRO193	2.135 Å
		R$_1$(H13)—(HG11)VAL203	2.284 Å
		R$_1$(H12)—(HG21)VAL203	1.730 Å
		R$_1$(H15)—(HG21)LEU218	2.298 Å
 Cpd41		Cpd41(O23)—(HB2)ALA198	2.218 Å
	H-bond	Cpd41(H24)—(O1N)NAD	1.948 Å
		Cpd41(H24)—(N7N)NAD	2.343 Å
		Cpd41(H8)—(HA)PHE97	1.697 Å
		Cpd41(H7)—(HB2)MET98	1.906 Å
	Hydrophobic	Cpd41(H6)—(HE3)MET103	1.492 Å
		Cpd41(H5)—(HE1)TYR158	2.256 Å
		Cpd41(H11)—(HG21)VAL203	1.985 Å

สารหมายเลข 42 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.268 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.965 Å และ 2.386 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.136 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 66** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 65**

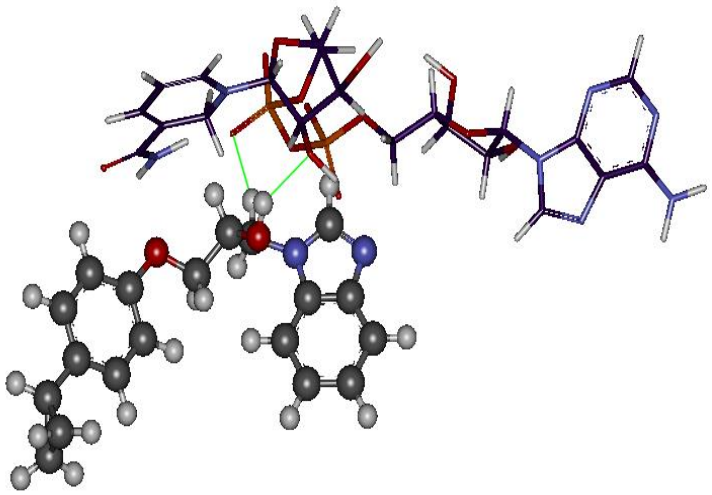


รูปที่ 66 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 42 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 65 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 42

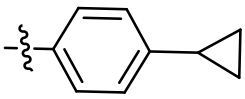
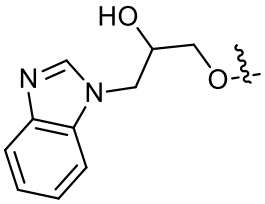
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 42	
 R_1	H-bond	R_1(H15)—(O7N)NAD	2.136 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HE1)TYR158	2.225 Å
		R_1(H12)—(HD1)TYR158	2.354 Å
		R_1(H13)—(HD1)TYR158	2.135 Å
		R_1(H15)—(HS)PRO	2.163 Å
		R_1(H14)—(HB2)PRO	1.327 Å
 Cpd42	H-bond	Cpd42(O23)—(HB2)ALA198	2.268 Å
		Cpd42(H24)—(O1N)NAD	1.965 Å
		Cpd42(H24)—(N7N)NAD	2.386 Å
	Hydrophobic	Cpd42(H8)—(HA)PHE97	1.755 Å
		Cpd42(H7)—(HB2)MET98	1.939 Å
		Cpd42(H6)—(HE1)MET103	2.373 Å
		Cpd42(H6)—(HE3)MET103	1.501 Å
		Cpd42(H11)—(HG21)	1.990 Å
		Cpd42(H12)—(HG21)	2.128 Å
		Cpd42(H14)—(HD21)	2.215 Å

สารหมายเลข 43 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.477 Å และ 1.988 Å ตามลำดับ ดังแสดงใน**รูปที่ 67** และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 66**

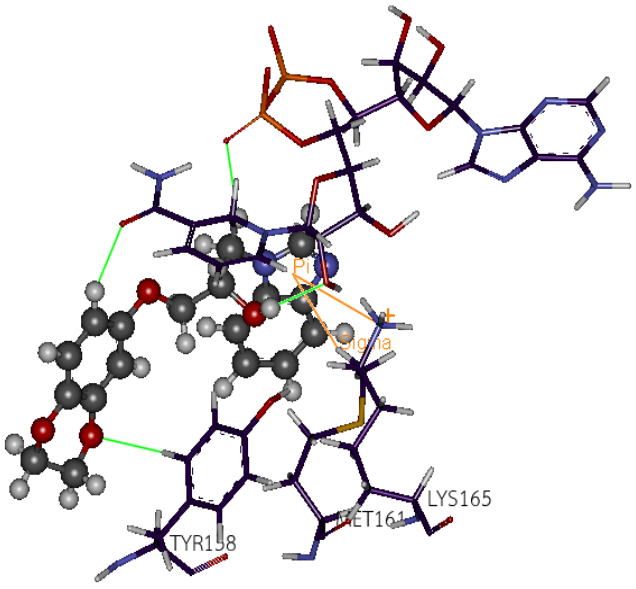


รูปที่ 67 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 43 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 66 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 43

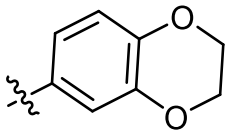
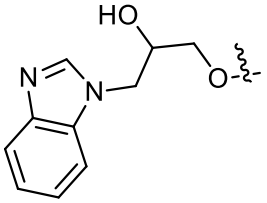
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 43
 R_1	H-bond	-
	Hydrophobic	R_1(H19)—(HE1)TYR158 1.959 Å R_1(H15)—(HA)PRO193 2.247 Å R_1(H15)—(HB2)PRO 2.240 Å R_1(H15)—(HB2)PRO 2.115 Å R_1(H14)—(HD21)LEU218 2.260 Å R_1(H16)—(HD12)LEU218 1.758 Å
 Cpd43	H-bond	Cpd43(H4)—(O1N)NAD 2.477 Å Cpd43(H24)—(O2D)NAD 1.988 Å Cpd43(H8)—(HA)PHE97 2.080 Å Cpd43(H7)—(HB2)MET98 1.869 Å
	Hydrophobic	Cpd43(H6)—(HE3)MET103 1.276 Å Cpd43(H11)—(HE1)TYR158 1.818 Å Cpd43(H3)—(HB2)ALA198 2.350 Å Cpd43(H7)—(HG21)ILE203 2.390 Å Cpd43(H5)—(HG22)VAL203 1.758 Å

สารหมายเลข 44 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ TYR158 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.482 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.005 Å และ 2.473 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.266 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 และพบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 68** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 67**



รูปที่ 68 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 44 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้

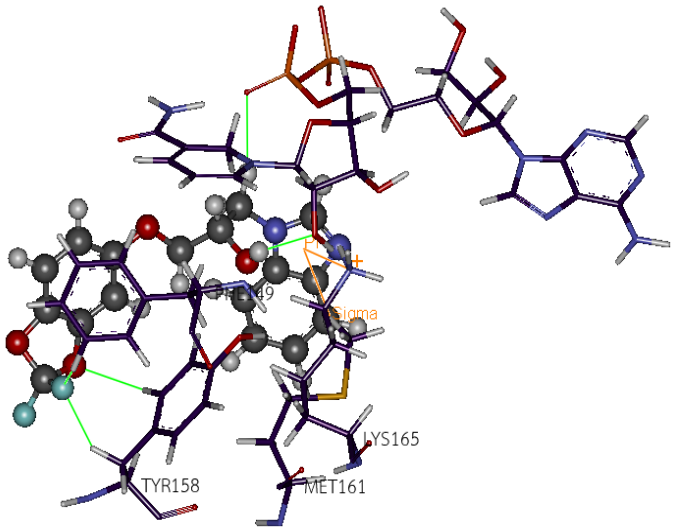
ตารางที่ 67 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 44

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 44
	H-bond	R_1(O35)—(HD1)TYR158 2.482 Å
		R_1(H12)—(O7N)NAD 2.266 Å
		R_1(H15)—(HB2)ALA157 2.368 Å
		R_1(H11)—(HE1)TYR158 1.816 Å
		R_1(H16)—(HB1)TYR158 1.801 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HA)PRO193 2.008 Å
R_1		R_1(H12)—(HB2)PRO193 2.347 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193 1.436 Å
		R_1(H14)—(HG21)VAL203 1.823 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218 2.207 Å
	H-bond	Cpd44(H24)—(O2D)NAD 2.005 Å
		Cpd44(H4)—(O1N)NAD 2.473 Å
	Hydrophobic	Cpd44(H8)—(HA)PHE97 2.073 Å
		Cpd44(H7)—(HB2)MET98 1.909 Å
		Cpd44(H6)—(HE3)MET103 1.297 Å
		Cpd44(H3)—(HB2)ALA198 2.306 Å
		Cpd44(H7)—(HG21)ILE202 2.324 Å
		Cpd44(H10)—(HG21)VAL203 2.292 Å
Cpd44	Sigma-Pi	Cpd44(Pi)—(Sigma)(HE3)MET161
	N-Pi	Cpd44(Pi)—(NZ)LYS165

หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

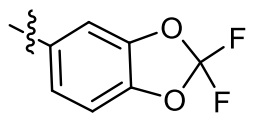
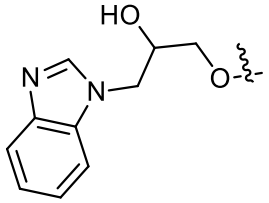
สารหมายเลข 45 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ PHE149, และ TYR158 โดยกรดอะมิโน PHE149 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.342 Å กรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนและอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.177 Å และ 2.488 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.497 Å และ 1.965 Å และพบอันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 และ

พบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 69** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่าง อะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, MET155, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 68**



รูปที่ 69 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 45 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

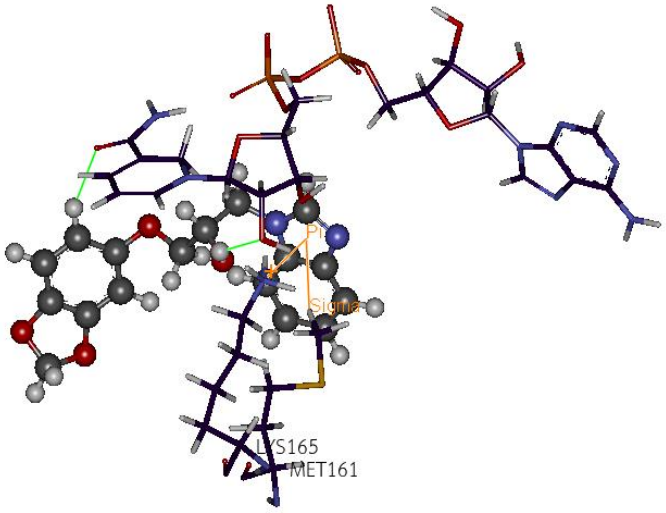
ตารางที่ 68 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 45

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 45	
	H-bond	R_1(F38)—(HE1)PHE149	2.342 Å
		R_1(F38)—(HB1)TYR158	2.177 Å
		R_1(O36)—(HD1)TYR158	2.488 Å
		R_1(F38)—(SD)MET155	2.924 Å
R_1	Hydrophobic	R_1(H4)—(HA)PRO193	2.061 Å
		R_1(H4)—(HB2)PRO193	2.117 Å
		R_1(H5)—(HB2)PRO193	1.720 Å
		R_1(H6)—(HG21)VAL203	2.093 Å
	H-bond	Cpd45(H9)—(O1N)NAD	2.497 Å
		Cpd45(H24)—(O2D)NAD	1.965 Å
	Hydrophobic	Cpd45(H13)—(HA)PHE97	2.107 Å
		Cpd45(H12)—(HB2)MET98	1.873 Å
		Cpd45(H11)—(HE3)MET103	1.252 Å
		Cpd45(H6)—(HE1)TYR158	2.336 Å
		Cpd45(H3)—(HE1)TYR158	1.736 Å
		Cpd45(H10)—(HG22)VAL203	2.252 Å
Cpd45		Cpd45(H2)—(HG21)VAL203	2.341 Å
		Cpd45(H5)—(HD21)LEU218	1.829 Å
	Sigma-Pi	Cpd45(Pi)—(Sigma)(HE3)MET161	
	N-Pi	Cpd45(Pi)—(NZ)LYS165	

หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

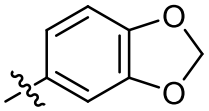
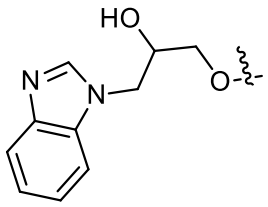
สารหมายเลข 46 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.233 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซี ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.978 Å และพบอันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 และพบอันตรกิริยาชนิด ซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 70** นอกจากนี้ยังพบอันตร

กิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, TYR158, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 69**



รูปที่ 70 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 46 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

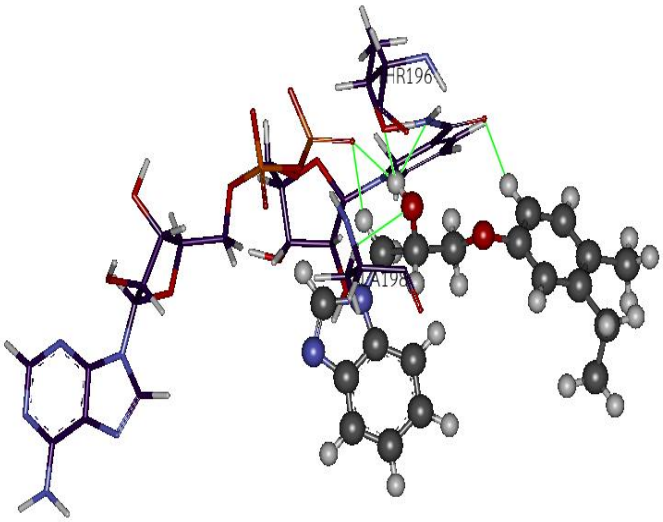
ตารางที่ 69 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบ หมายเลข 46

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 46	
	H-bond	R_1(H12)—(O7N)NAD	2.233 Å
		R_1(H15)—(HE1)PHE149	2.068 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	1.409 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HA)PRO193	2.158 Å
R_1		R_1(H14)—(HG21)VAL203	1.764 Å
		R_1(H23)—(HD21)LEU218	2.325 Å
	H-bond	Cpd46(H24)—(O2D)NAD	1.978 Å
		Cpd46(H8)—(HA)PHE97	2.044 Å
		Cpd46(H7)—(HB2)MET98	1.858 Å
		Cpd46(H6)—(HE3)MET103	1.269 Å
		Cpd46(H11)—(HE1)TYR158	1.711 Å
	Hydrophobic	Cpd46(H3)—(HB2)ALA198	2.379 Å
		Cpd46(H7)—(HG21)ILE202	2.336 Å
		Cpd46(H5)—(HG22)VAL203	2.207 Å
Cpd46		Cpd46(H10)—(HG21)VAL203	2.243 Å
	Sigma-Pi	Cpd45(Pi)—(Sigma)(HE3)MET161	
	N-Pi	Cpd46(Pi)—(NZ)LYS165	

หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

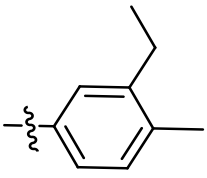
สารหมายเลข 47 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ THR196, และ ALA198 โดยกรดอะมิโน THR196 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.372 Å กรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.421 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.008 Å, 2.218 Å และ 2.255 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.995 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 71** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิ

แกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, ALA157, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 70**

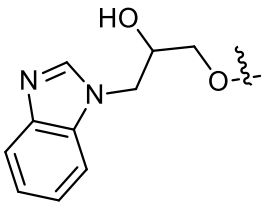


รูปที่ 71 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง ของ สารหมายเลข 47 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

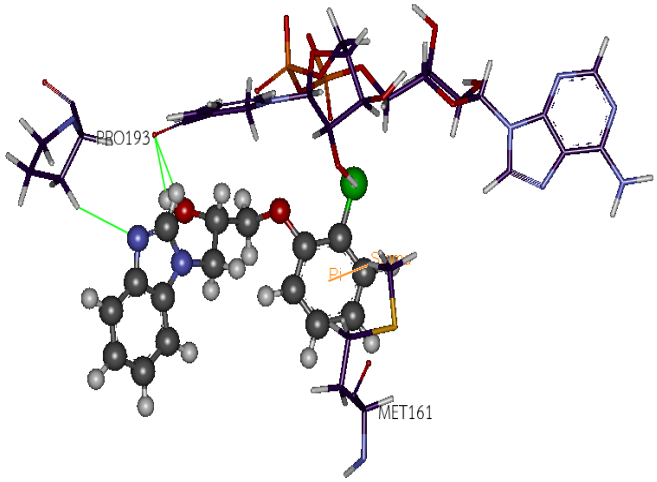
ตารางที่ 70 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง ของสารประกอบหมายเลข 47

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 47	
 R_1	H-bond	R_1(H17)—(O7N)NAD	1.995 Å
	Hydrophobic	R_1(H14)—(HZ)PHE149	1.707 Å
		R_1(H20)—(HB2)ALA157	2.131 Å
		R_1(H21)—(HD1)TYR158	2.270 Å
		R_1(H21)—(HB1)TYR158	2.253 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	2.086 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.350 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.691 Å
		R_1(H19)—(HG11)VAL203	1.638 Å
		R_1(H19)—(HG12)VAL203	2.390 Å
		R_1(H14)—(HD11)LEU218	2.113 Å
		R_1(H16)—(HD12)LEU218	2.999 Å
		R_1(H16)—(HD21)LEU228	2.236 Å
		R_1(H16)—(HD23)LEU218	2.054 Å

ตารางที่ 70 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง ของสารประกอบหมายเลข 47(ต่อ)

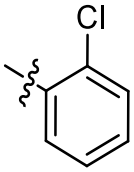
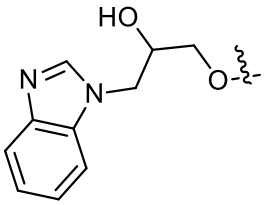
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 47	
	H-bond	Cpd47(H24)—(OG1)THR196	2.372 Å
		Cpd47(H24)—(N7N)NAD	2.255 Å
		Cpd47(O23)—(HB2)ALA198	2.421 Å
		Cpd47(H14)—(O1N)NAD	2.008 Å
		Cpd47(H3)—(O1N)NAD	2.218 Å
		Cpd47(H8)—(HA)PHE97	2.212 Å
		Cpd4(H7)—(HB2)MET98	2.207 Å
		Cpd47(H6)—(HE1)MET103	2.303 Å
Cpd47	Hydrophobic	Cpd47(H6)—(HE3)MET103	1.777 Å
		Cpd46(H10)—(HG21)VAL203	2.243 Å

สารหมายเลข 48 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ PRO193 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.497 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.155 Å และ 2.357 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 72** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET103, PHE149, TYR158, ALA198, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 71**



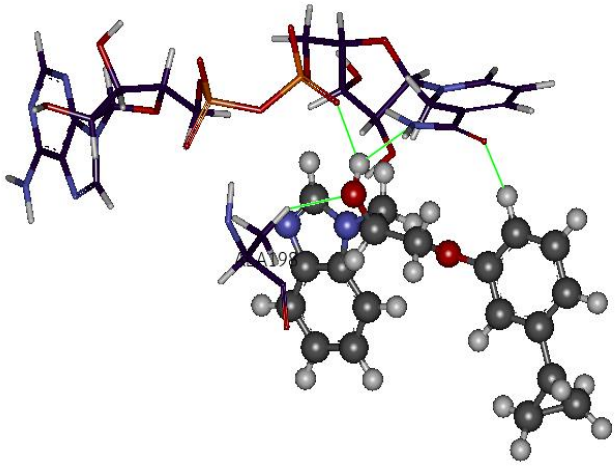
รูปที่ 72 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 48 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 71 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 48

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 48	
			
		R_1(H15)—(HA)PHE97	2.195 Å
	Hydrophobic	R_1(H13)—(HE3)MET103	1.701 Å
R_1			
		Cpd48(N12)—(HB2)PRO193	2.497 Å
	H-bond	Cpd48(H9)—(O7N)NAD	2.155 Å
		Cpd48(H24)—(O7N)NAD	2.357 Å
		Cpd48(H8)—(HZ)PHE149	2.304 Å
		Cpd48(H4)—(HE1)TYR158	1.836 Å
		Cpd48(H5)—(HD1)TYR158	2.286 Å
	Hydrophobic	Cpd48(H11)—(HE2)ALA198	2.041 Å
		Cpd48(H3)—(HG21)VAL203	1.941 Å
Cpd48		Cpd48(H5)—(HG21)VAL203	1.277 Å
		Cpd48(H8)—(HD11)LEV218	2.043 Å
	Sigma-Pi	R_1(Pi)—(Sigma)(HE3)MET161	

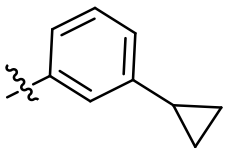
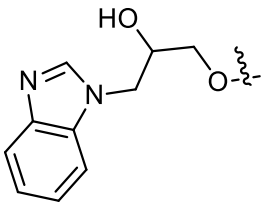
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ

สารหมายเลข 49 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.214 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.908 Å และ 2.332 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.079 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 73** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 72**

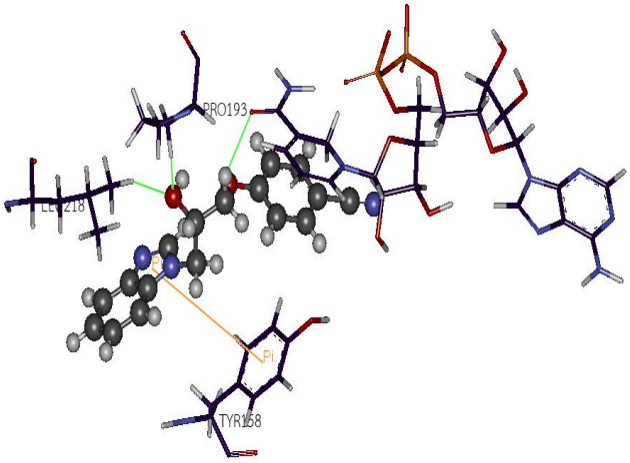


รูปที่ 73 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 49 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 72 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 49

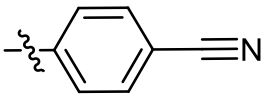
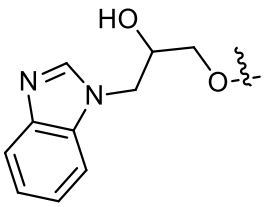
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 49	
 R_1	H-bond	R_1(H15)—(O7N)NAD	2.079Å
		R_1(H18)—(HD1)TYR158	1.848 Å
		R_1(H19)—(HB1)TYR158	1.678 Å
		R_1(H14)—(HA)PRO193	2.326 Å
	Hydrophobic	R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.306 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.857 Å
		R_1(H17)—(HG12)VAL203	2.307 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218	2.072 Å
 Cpd49		Cpd49(O23)—(HB2)ALA198	2.214 Å
	H-bond	Cpd49(H24)—(O1N)NAD	1.908 Å
		Cpd49(H24)—(N7N)NAD	2.332 Å
		Cpd49(H8)—(HA)PHE97	1.738 Å
		Cpd49(H7)—(HB2)MET98	1.920 Å
		Cpd49(H6)—(HE3)MET103	1.446 Å
	Hydrophobic	Cpd49(H17)—(HB1)ALA157	2.313 Å
		Cpd49(H5)—(HE1)TYR158	2.286 Å
		Cpd49(H7)—(HG21)ILE202	2.349 Å
		Cpd49(H11)—(HG21)VAL203	2.259 Å

สารหมายเลข 50 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ PRO193 และ LEU218 โดยกรดอะมิโน PRO193 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของ ลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.234 Å กรดอะมิโน LEU218 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.991 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.444 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับวงอะโรมาติกของกรดอะมิโน TYR158 ดังแสดงใน**รูปที่ 74** พบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET155, PRO193, ALA198 และ VAL203 และนอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรฟิลิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของ ลิแกนด์กับกรดอะมิโน GLN214 ดังแสดงใน**ตารางที่ 73**



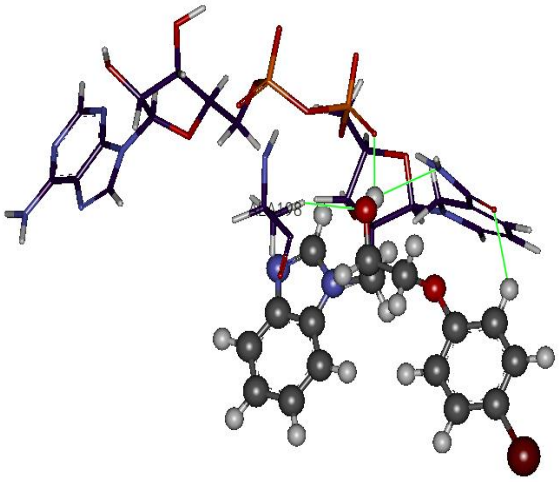
รูปที่ 74 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 50 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 73 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 50

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 50
	H-bond	-
R_1	Hydrophobic	R_1(H4)—(HB2)ALA198 1.775 Å
	H-bond	Cpd50(O23)—(HB2)PRO193 2.234 Å Cpd50(O23)—(HD21)LEU218 1.991 Å Cpd50(H7)—(O7N)NAD 2.444 Å Cpd50(H8)—(H2)PHE149 2.235 Å Cpd50(H10)—(HE1)PHE149 2.303 Å Cpd50(H11)—(HE1)PHE149 2.220 Å
Cpd50	Hydrophobic	Cpd50(H11)—(SD)MET155 2.669 Å Cpd50(H7)—(HA)PRO193 2.176 Å Cpd50(H15)—(HG11)VAL203 1.479 Å Cpd50(H14)—(HG2)GLN214 1.835 Å
	Pi-Pi	Cpd50(Pi)—(Pi)TYR158

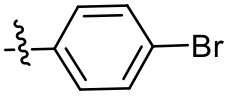
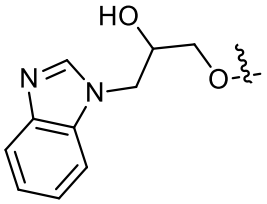
หมายเหตุ : Pi-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไพ-ไพ

สารหมายเลข 51 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.214 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.952 Å และ 1.952 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.401 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 75** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 74**



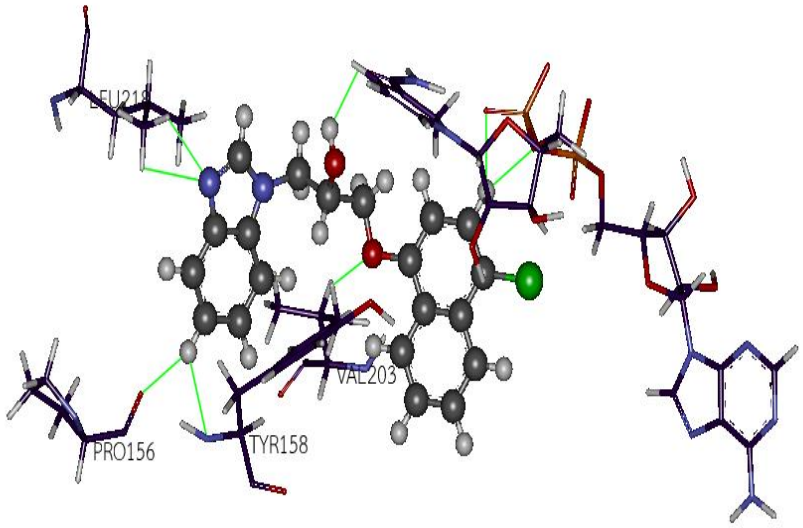
รูปที่ 75 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารหมายเลข 51 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 74 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 51

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 51	
	H-bond	R_1(H15)—(O7N)NAD	2.401 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HE1)TYR158	2.323 Å
		R_1(H13)—(HD1)TYR158	1.999 Å
		R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.886 Å
		R_1(H15)—(HA)PRO193	2.165 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.801 Å
R_1		R_1(H14)—(HD21)LEU218	2.444 Å
	H-bond	Cpd51(O22)—(HB2)ALA198	2.214 Å
		Cpd51(H23)—(O1N)NAD	1.952 Å
		Cpd51(H23)—(N7N)NAD	1.952 Å
	Hydrophobic	Cpd51(H8)—(HA)PHE97	1.757 Å
		Cpd51(H7)—(HB2)MET98	1.914 Å
		Cpd51(H6)—(HE3)MET103	1.499 Å
		Cpd51(H5)—(HE1)TYR158	2.232 Å
Cpd51		Cpd51(H11)—(HG21)VAL203	1.950 Å

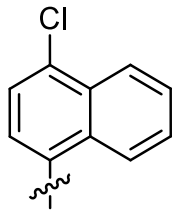
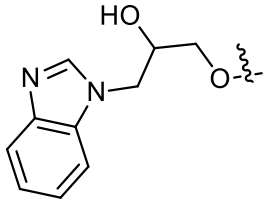
สารหมายเลข 52 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ PRO156, TYR158, VAL203 และ LEU218 โดยกรดอะมิโน PRO156 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.125 Å กรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.477 Å กรดอะมิโน VAL203 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.192 Å กรดอะมิโน LEU218 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.333 Å และ 2.589 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.121 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.284 Å และ 2.182 Å

ดังแสดงใน**รูปที่ 76** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET103, ALA157, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 75**



รูปที่ 76 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของ สารหมายเลข 52 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 75 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลางของสารประกอบหมายเลข 52

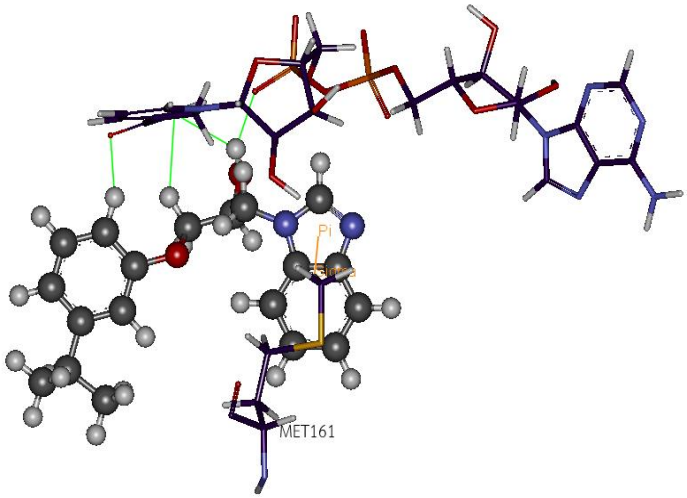
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 52	
 R_1	H-bond	R_1(H5)—(O1N)NAD	2.284 Å
		R_1(H5)—(O5D)NAD	2.182 Å
	Hydrophobic	R_1(H8)—(HE3)MET103	1.715 Å
		R_1(H7)—(HG22)VAL203	2.215 Å
 Cpd52	H-bond	Cpd52(H15)—(O)PRO156	2.125 Å
		Cpd52(H15)—(N)TYR158	2.477 Å
		Cpd52(O16)—(HG21)VAL203	2.192 Å
		Cpd52(N12)—(HD11)LEU218	2.333 Å
		Cpd52(N12)—(HD12)LEU218	2.589 Å
		Cpd51(H24)—(O7N)NAD	2.121 Å
	Hydrophobic	Cpd52(H15)—(HB2)ALA157	2.049 Å
		Cpd52(H15)—(HN)TYR158	2.132 Å
		Cpd52(H17)—(HB2)PRO193	1.240 Å
		Cpd52(H13)—(HG21)VAL203	1.881 Å
		Cpd52(H13)—(HG11)VAL203	2.118 Å
		Cpd52(H17)—(HD21)LEU218	2.282 Å

สารที่มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งเอนไซม์ ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารอนุพันธ์ Benzimidazole

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำคือ สารหมายเลข 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71และ 72 ซึ่งมีค่า docking score -11.22, -11.21, -11.21, -11.18, -11.17, -11.16, -11.15, -11.14, -11.13, -11.12, -11.12, -11.09, -11.07, -11.07, -11.04, -11.03, -11.02, -11.02 และ -11.00 ตามลำดับ มีตำแหน่งในการวางตัวและพบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญดังนี้

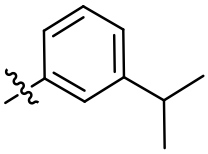
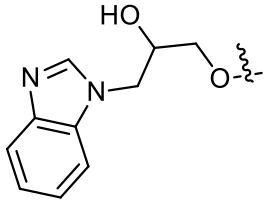
สารหมายเลข 53 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.234 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ และพบอันตรกิริยาชนิด

ซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน **รูปที่ 77** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ALA198, ILA202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 76**



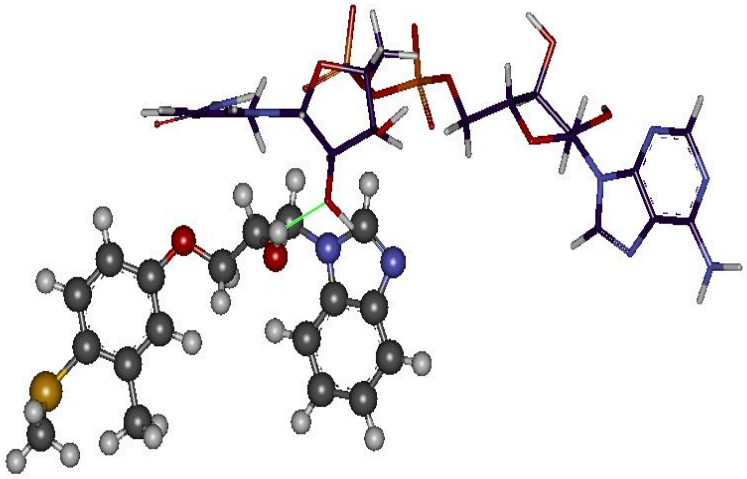
รูปที่ 77 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 53 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 76 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 53

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 53	
 R_1	H-bond	R_1(H12)—(O7N)NAD	2.014 Å
		R_1(H20)—(HB2)ALA157	2.234 Å
		R_1(H19)—(HB1)TYR158	1.924 Å
		R_1(H21)—(HA)TYR158	2.367 Å
		R_1(21)—(HD1)TYR158	1.434 Å
		R_1(H15)—(HD1)TYR158	2.229 Å
	Hydrophobic	R_1(H13)—(HA)PRO193	2.200 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	1.372 Å
		R_1(H15)—(HG21)VAL203	2.016 Å
		R_1(H22)—(HG12)VAL203	1.839 Å
		R_1(H22)—(HG11)VAL203	1.996 Å
		R_1(H14)—(HD21)LEU218	2.177 Å
 Cpd53	H-bond	Cpd53(H24)—(O1N)NAD	1.844 Å
		Cpd53(H24)—(N7N)NAD	2.287 Å
		Cpd53(H10)—(N7N)NAD	2.537 Å
	Hydrophobic	Cpd53(H8)—(HA)PHE97	1.718 Å
		Cpd53(H7)—(HB2)MET98	1.878 Å
		Cpd5(H6)—(HE3)MET103	1.388 Å
		Cpd53(H5)—(HE1)TYR158	2.352 Å
		Cpd53(O23)—(HB2)ALA198	2.138 Å
		Cpd53(H7)—(HG21)ILE202	2.271 Å
	Sigma-Pi	Cpd53(Pi)—(Sigma)Met161	

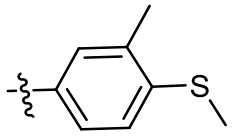
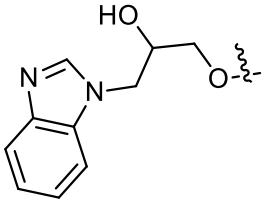
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ

สารหมายเลข 54 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.974 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 78** และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, MET155, TYR158, PRO193, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 77**

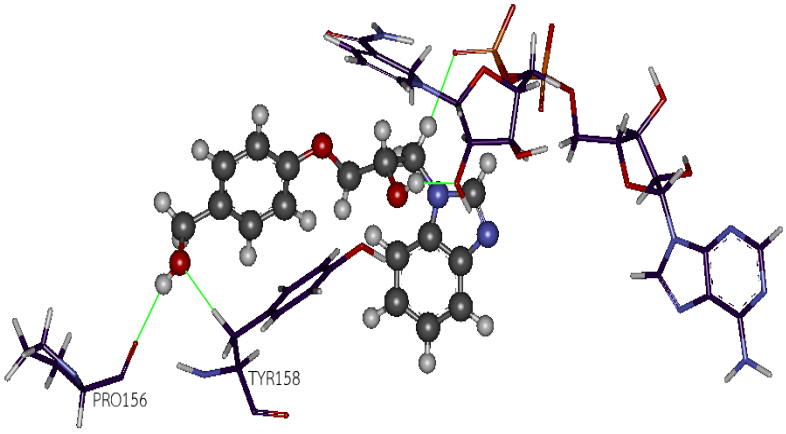


รูปที่ 78 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 54 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 77 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 54

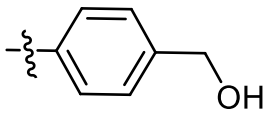
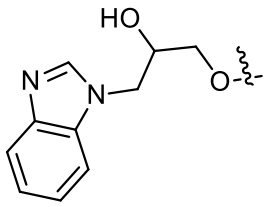
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 54	
 R_1	H-bond	-	
		R_1(H12)—(HE1)TYR158	2.300 Å
		R_1(H14)—(HD1)TYR158	1.418 Å
		R_1(H14)—(HA)TYR158	2.166 Å
		R_1(20)—(HB1)TYR158	2.172 Å
		R_1(H16)—(HB2)PRO193	2.032 Å
		R_1(H17)—(HB2)PRO193	2.239 Å
		R_1(H17)—(HA)PRO193	2.395 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HG21)VAL203	2.004 Å
		R_1(H15)—(HG23)VAL203	2.395 Å
		R_1(H15)—(HG11)VAL203	2.135 Å
		R_1(H15)—(HG12)VAL203	1.737 Å
		R_1(H16)—(HD21)LEU218	1.743 Å
		R_1(H16)—(HD11)LEU218	2.389 Å
		R_1(S43)—(HD23)LEU218	2.517 Å
		R_1(S43)—(HD12)LEU218	2.811 Å
 Cpd54	H-bond	Cpd54(H24)—(O2D)NAD	1.974 Å
		Cpd54(H8)—(HA)PHE97	2.048 Å
		Cpd54(H7)—(HB2)MET98	1.915 Å
		Cpd54(H6)—(HE3)MET103	1.248 Å
		Cpd54(H19)—(SD)MET155	2.558 Å
	Hydrophobic	Cpd54(H11)—(HE1)TYR158	1.588 Å
		Cpd54(H7)—(HG21)ILE202	2.366 Å
		Cpd54(H5)—(HG22)VAL203	2.263 Å
		Cpd54(H10)—(HG21)VAL203	2.331 Å

สารหมายเลข 55 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ PRO156 และTYR158 โดยกรดอะมิโน PRO156 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.092 Å กรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.314 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.793 Å และ 2.492 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 79** และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 78**



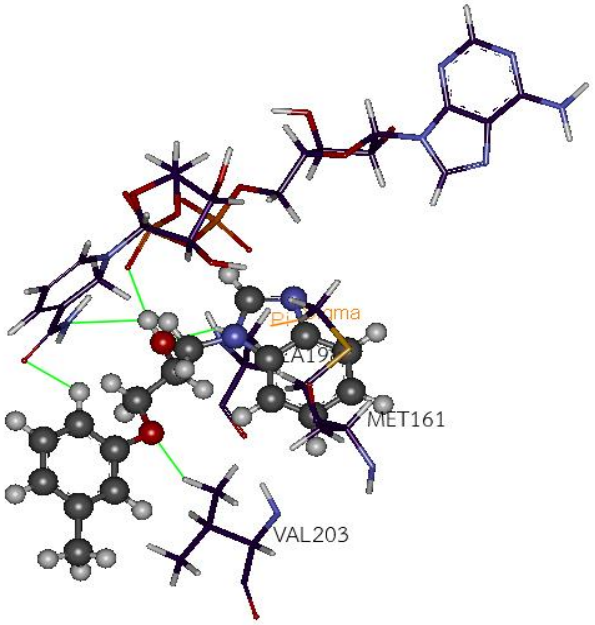
รูปที่ 79 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 55 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 78 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 55

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 55	
	H-bond	R_1(H40)—(O)PRO156	2.092 Å
		R_1(O39)—(HB1)TYR158	2.314 Å
		R_1(H15)—(HD1)TYR158	2.394 Å
	Hydrophobic	R_1(H16)—(HG21)VAL203	1.463 Å
		R_1(H16)—(HG23)VAL203	2.392 Å
R_1		R_1(H15)—(HG11)VAL203	2.551 Å
		R_1(H17)—(HD12)LEU218	2.387 Å
	H-bond	Cpd55(H24)—(O2D)NAD	1.793 Å
		Cpd55(H3)—(O1N)NAD	2.492 Å
	Hydrophobic	Cpd55(H9)—(HA)PHE97	2.075 Å
		Cpd55(H8)—(HB2)MET98	1.934 Å
		Cpd55(H7)—(HE3)MET103	1.278 Å
		Cpd55(H12)—(HE1)TYR158	1.609 Å
		Cpd55(H18)—(HG21)ILE202	2.366 Å
Cpd55		Cpd55(H6)—(HG22)VAL203	2.249 Å
		Cpd55(H11)—(HG21)VAL203	2.317 Å

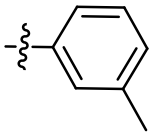
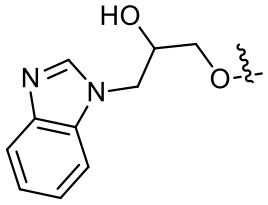
สารหมายเลข 56 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ ALA198 และVAL203 โดยกรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.989 Å กรดอะมิโน VAL203 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.896 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.981 Å และ 2.492 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.214 Å พบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ

ระหว่างวงอะโรมาติกของ ลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 80** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 79**



รูปที่ 80 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 56 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

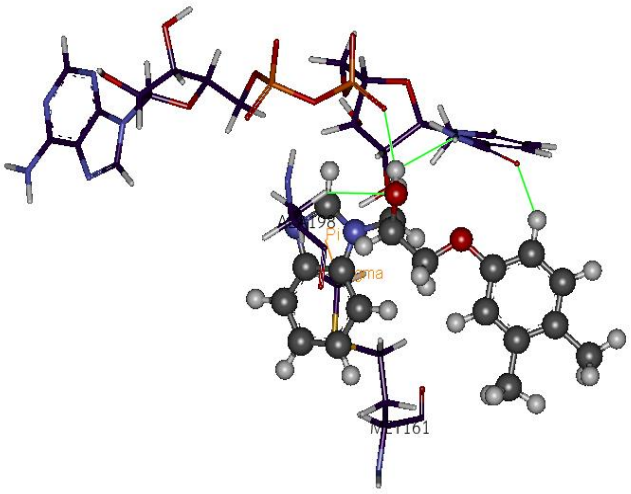
ตารางที่ 79 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 56

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 56	
 R_1	H-bond	R_1(H18)—(O7N)NAD	2.214 Å
		R_1(H17)—(HA)PRO193	1.977 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	2.193 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	2.037 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HG11)VAL203	1.944 Å
		R_1(H16)—(HD23)LEU218	2.281 Å
		R_1(H14)—(HD23)LEU218	2.250 Å
		R_1(H14)—(HD23)LEU218	2.300 Å
 Cpd56	H-bond	Cpd56(O23)—(HB2)ALA198	1.989 Å
		Cpd56(O16)—(HG21)VAL203	1.896 Å
		Cpd56(H24)—(O1N)NAD	1.981 Å
		Cpd56(H24)—(N7N)NAD	2.492 Å
	Hydrophobic	Cpd56(H8)—(HA)PHE97	1.712 Å
		Cpd56(H7)—(HB2)MET98	1.716 Å
		Cpd56(H6)—(HE1)MET103	2.350 Å
		Cpd56(H6)—(HE3)MET103	1.335 Å
		Cpd56(H6)—(SD)MET103	2.887 Å
		Cpd56(H5)—(HE1)TYR158	2.299 Å
	Sigma-Pi	Cpd56(Pi)—(Sigma)(HE3)MET161	

หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ

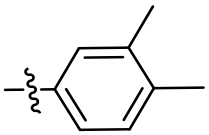
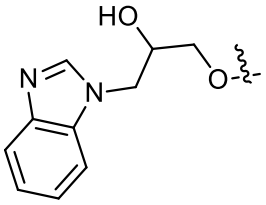
สารหมายเลข 57 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.454 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.067 Å และ 2.352 Å ตามลำดับ และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.952 Å พบอันตรกิริยาชนิด ซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 81** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิด

ไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, TYR158, PRO193, ALA198, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน **ตารางที่ 80**



รูปที่ 81 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 57 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

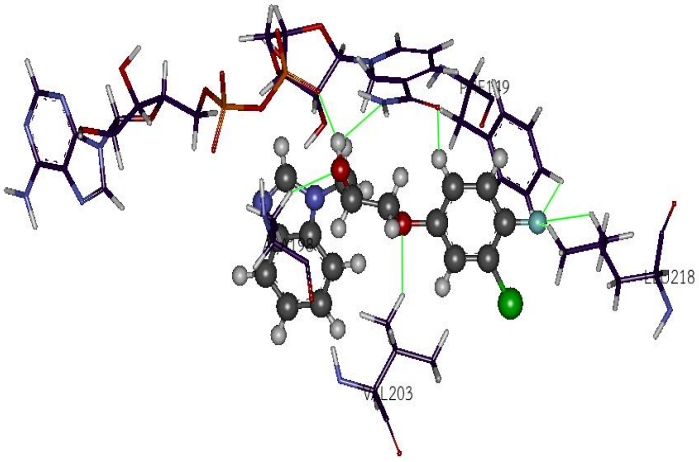
ตารางที่ 80 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 57

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 57	
 R_1	H-bond	R_1(H20)—(O7N)NAD	1.952 Å
		R_1(H17)—(Hz)PHE149	2.162 Å
		R_1(H14)—(HD1)TYR158	1.650 Å
		R_1(H16)—(HB)PRO193	1.621 Å
		R_1(H120)—(HA)PRO193	2.031 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.132 Å
		R_1(H15)—(HG11)VAL203	1.806 Å
		R_1(H15)—(HG21)VAL203	2.064 Å
		R_1(H19)—(HD23)LEU218	2.318 Å
		R_1(H17)—(HD12)LEU218	2.389 Å
		R_1(H17)—(HD11)LEU218	2.026 Å
 Cpd57	H-bond	Cpd57(O23)—(HB2)ALA198	2.454 Å
		Cpd57(H24)—(O1N)NAD	2.067 Å
		Cpd57(H24)—(N7N)NAD	2.352 Å
		Cpd57(H8)—(HA)PHE97	1.795 Å
		Cpd57(H7)—(HB2)MET98	1.839 Å
		Cpd57(H6)—(HE3)MET103	1.360 Å
	Hydrophobic	Cpd57(H6)—(HE1)MET103	2.371 Å
		Cpd57(H2)—(HB2)ALA198	2.175 Å
		Cpd57(H10)—(HG21)VAL203	1.975 Å
		Cpd57(H11)—(HG21)VAL203	1.995 Å
	Sigma-Pi	Cpd57(Pi)—(Sigma)(HE3)MET161	

หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ

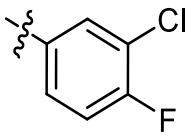
สารหมายเลข 58 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ PHE149, ALA198, VAL203 และ LEU218 โดยกรดอะมิโน PHE149 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.503 Å กรดอะมิโน LEU218 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.239 Å และ 2.256 Å กรดอะมิโน VAL203 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.463 Å กรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับ

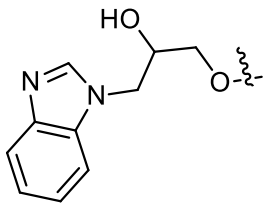
อะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.201 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.884 Å และ 2.407 Å ตามลำดับ พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.016 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 82** นอกจากนี้ยังพบ อันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193 และ VAL203 ดังแสดงใน**ตารางที่ 81**



รูปที่ 82 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 58 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

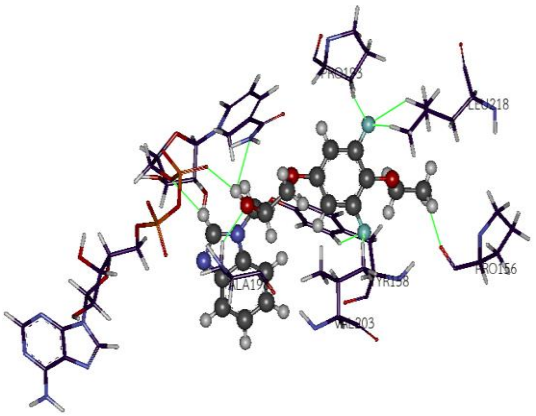
ตารางที่ 81 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 58

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 58	
 R_1	H-bond	R_1(F34)—(HZ)PHE149	2.503 Å
		R_1(F34)—(HD21)LEU218	2.239 Å
		R_1(F34)—(HD11)LEU218	2.256 Å
		R_1(H12)—(O7N)NAD	2.016 Å
	Hydrophobic	R_1(H14)—(HD1)TYR158	2.176 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	1.492 Å
		R_1(H13)—(HA)PRO193	2.025 Å
		R_1(H14)—(HG21)VAL203	2.202 Å

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 58	
 Cpd58	H-bond	Cpd58(O23)—(HB2)ALA198	2.201 Å
		Cpd58(O16)—(HG21)VAL203	2.463 Å
		Cpd58(H24)—(O1N)NAD	1.884 Å
		Cpd58(H24)—(N7N)NAD	2.407 Å
	Hydrophobic	Cpd58(H8)—(HA)PHE97	1.636 Å
		Cpd58(H7)—(HB2)MET98	1.881 Å
		Cpd58(H6)—(HE3)MET103	1.519 Å

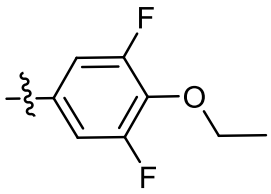
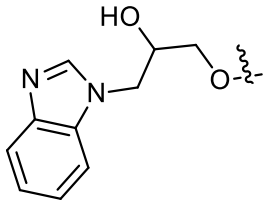
สารหมายเลข 59 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 6 ชนิด คือ PRO156, TYR158, PRO193, ALA198, VAL203 และ LEU218 โดยกรดอะมิโน PRO156 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.301 Å กรดอะมิโน TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.534 Å, 1.881 Å, 2.526 Å, 2.429 Å และ 2.052 Å ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.59 กรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.168 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์

ดังแสดงใน**รูปที่ 83** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, MET155, TYR158, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน **ตารางที่ 82**

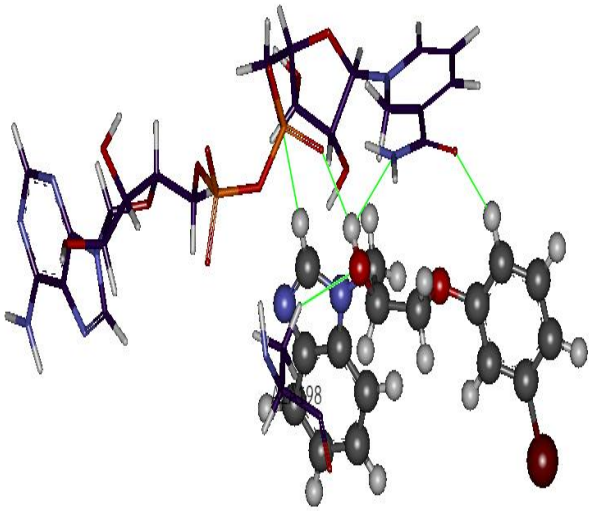


รูปที่ 83 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 59 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณ โมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 82 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 59

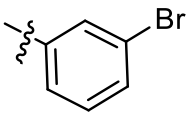
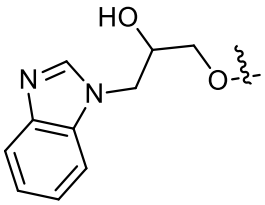
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 59	
	H-bond	R_1(H8)—(O)PRO156	2.301 Å
		R_1(F35)—(HD1)TYR158	2.534 Å
		R_1(F34)—(HB2)PRO193	1.881 Å
		R_1(F35)—(HO11)VAL203	2.526 Å
		R_1(F34)—(HD11)LEU218	2.429 Å
		R_1(F34)—(HD21)LEU218	2.052 Å
		R_1(H7)—(HE1)PHE149	2.241 Å
		R_1(H8)—(HG2)MET155	2.135 Å
R_1		R_1(H6)—(HB1)TYR158	2.341 Å
	Hydrophobic	R_1(H4)—(HB2)PRO193	2.343 Å
		R_1(H4)—(HA)PRO193	2.237 Å
		R_1(H5)—(HG21)VAL203	1.472 Å
		R_1(H10)—(HD12)LEU218	2.264 Å
	H-bond	Cpd59(O23)—(HB2)ALA198	2.168 Å
		Cpd59(H24)—(O1N)NAD	2.053 Å
		Cpd59(H24)—(N7N)NAD	2.511 Å
		Cpd59(H18)—(O5D)NAD	2.469 Å
		Cpd59(H17)—(HA)PHE97	1.809 Å
		Cpd59(H16)—(HB2)MET98	2.067 Å
		Cpd59(H15)—(HE3)MET103	1.482 Å
	Hydrophobic	Cpd59(H14)—(HE1)TYR158	2.257 Å
Cpd59		Cpd59(H24)—(HE2)ALA198	2.493 Å
		Cpd59(H16)—(HG21)ILE202	2.377 Å
		Cpd59(H3)—(HG21)VAL203	2.393 Å

สารหมายเลข 60 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.399 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.427 Å และ 2.036 Å และเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.402 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.217 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 84** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 83**

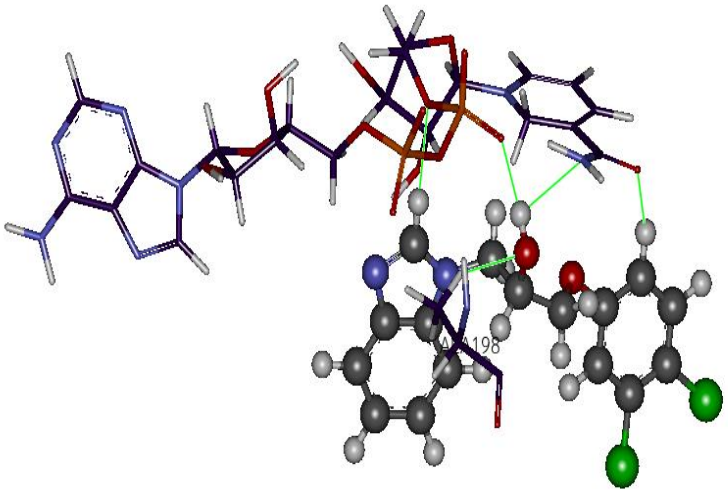


รูปที่ 84 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 60 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 83 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 60

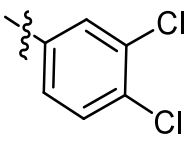
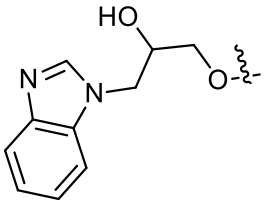
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 60	
	H-bond	R_1(H15)—(O7N)NAD	2.217 Å
		R_1(H5)—(HE1)TYR158	2.250 Å
		R_1(H12)—(HD1)TYR158	2.341 Å
	Hydrophobic	R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.273 Å
R_1		R_1(H15)—(HA)PRO193	2.300 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.194 Å
		R_1(H14)—(HD21)LEU218	2.362 Å
		Cpd60(O23)—(HB2)ALA198	2.399 Å
	H-bond	Cpd60(H9)—(O5D)NAD	2.427 Å
		Cpd60(H24)—(O1N)NAD	2.036 Å
		Cpd60(H24)—(N7N)NAD	2.402 Å
		Cpd60(H8)—(HA)PHE97	1.766 Å
		Cpd60(H7)—(HB2)MET98	2.009 Å
	Hydrophobic	Cpd60(H6)—(HE3)MET103	1.499 Å
Cpd60		Cpd60(H7)—(HG21)ILE202	2.377 Å
		Cpd60(H11)—(HG21)VAL203	1.844 Å

สารหมายเลข 61 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.268 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.001 Å และ 2.419 Å และเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.317 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.328 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 85** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193 และ VAL203 ดังแสดงใน**ตารางที่ 84**

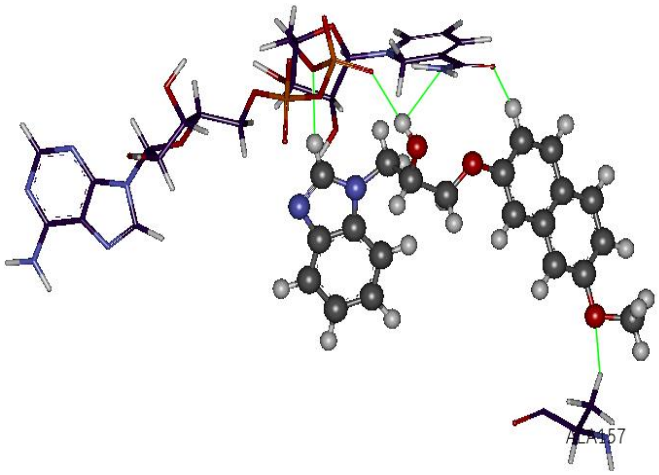


รูปที่ 85 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารหมายเลข 61 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 84 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 61

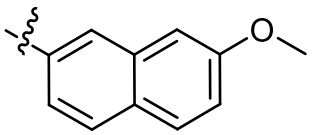
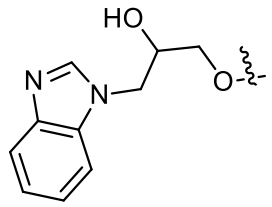
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 61	
 R_1	H-bond	R_1(H12)—(O7N)NAD	2.328 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HA)PRO193	2.298 Å
		R_1(H13)—(HB2)PR193	1.869 Å
		R_1(H14)—(HG21)VAL203	1.422 Å
 Cpd61	H-bond	Cpd61(O23)—(HB2)ALA198	2.268 Å
		Cpd61(H24)—(N7N)NAD	2.317 Å
		Cpd61(H24)—(O1N)NAD	2.001 Å
		Cpd61(H9)—(O5D)NAD	2.419 Å
	Hydrophobic	Cpd61(H8)—(HA)PHE97	1.698 Å
		Cpd61(H7)—(HB2)MET98	1.967 Å
		Cpd61(H6)—(HE3)MET103	1.508 Å
		Cpd61(H5)—(HE1)TYR158	2.388 Å
		Cpd61(H11)—(HG21)VAL203	1.627 Å

สารหมายเลข 63 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA157 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.916 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.457 Å และ 2.059 Å และเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.316 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.816 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 86** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, ALA157, PRO193, ALA198, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 85**

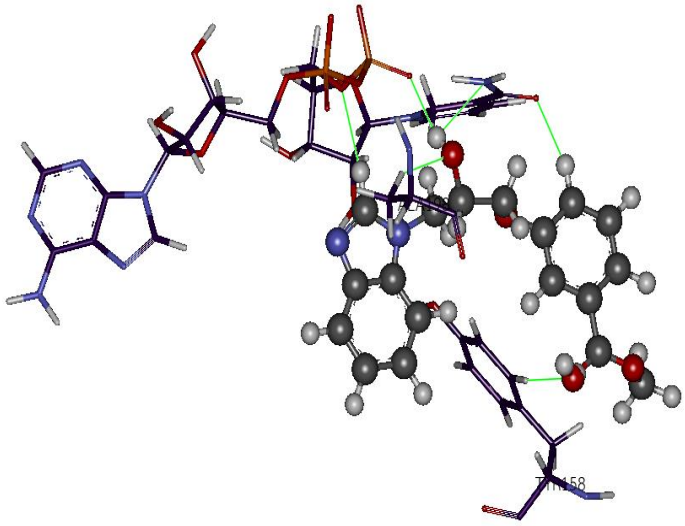


รูปที่ 86 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารหมายเลข 63 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 85 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 63

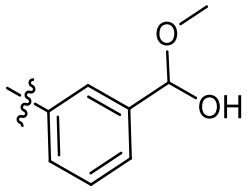
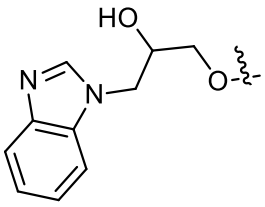
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 63	
 R_1	H-bond	R_1(O42)—(HB2)ALA157	1.916 Å
		R_1(H4)—(O7N)NAD	1.816
	Hydrophobic	R_1(H6)—(H2)PHE149	1.973 Å
		R_1(H10)—(H32)ALA157	1.731 Å
		R_1(H4)—(HA)PRO193	2.161 Å
		R_1(H5)—(HB2)PRO193	1.707 Å
		R_1(H5)—(HB2)PRO193	1.707 Å
		R_1(H9)—(HG11)VAL203	2.238 Å
		R_1(H8)—(HG11)VAL203	1.876 Å
		R_1(H8)—(HG12)VAL103	2.045 Å
		R_1(H7)—(HD12)LEU218	2.278 Å
		R_1(H6)—(HD11)LEU218	1.996 Å
 Cpd63	H-bond	Cpd63(H20)—(O5D)NAD	2.457 Å
		Cpd63(H23)—(O1N)NAD	2.059 Å
		Cpd63(H23)—(N7N)NAD	2.316 Å
	Hydrophobic	Cpd63(H9)—(HA)PHE97	1.717 Å
		Cpd63(H18)—(HB2)MET98	1.903 Å
		Cpd63(H7)—(HE3)MET103	1.502 Å
		Cpd63(H13)—(HB2)ALA198	2.153 Å
		Cpd63(H13)—(HB1)ALA198	2.119 Å
		Cpd63(13)—(HG21)VAL203	1.605 Å
		Cpd63(H3)—(HG21)VAL203	1.605 Å

สารหมายเลข 64 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ TYR158 และ ALA198 โดยกรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.163 Å กรดอะมิโน ALA198 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.288 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.962 Å และ 2.468 Å พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.448 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง อะตอมออกซิเจนของ nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.204 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 87** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98 , MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 86**



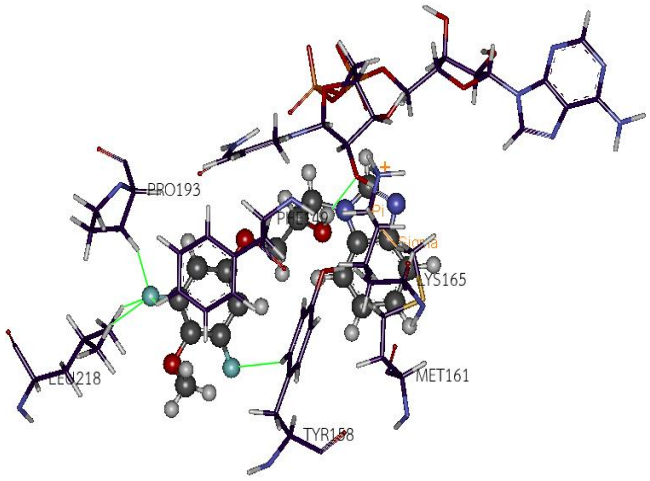
รูปที่ 87 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 64 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 86 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 64

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 64	
 R_1	H-bond	R_1(O41)—(HD1)TYR158	2.163 Å
		R_1(H15)—(O7N)NAD	2.204
		R_1(H20)—(HN)TYR158	2.364 Å
		R_1(H20)—(HB1)TYR158	1.639 Å
		R_1(H16)—(HD1)TYR158	2.161 Å
	Hydrophobic	R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.305 Å
		R_1(H15)—(HA)PRO193	2.183 Å
		R_1(H12)—(H22)VAL203	1.827 Å
		R_1(H17)—(HG23)VAL203	2.051 Å
		R_1(H17)—(HG11)VAL203	2.217 Å
		R_1(H17)—(HG21)VAL203	2.833 Å
		R_1(H14)—(HD21)LEU218	2.166 Å
 Cpd64	H-bond	Cpd64(O22)—(HB2)ALA198	2.288 Å
		Cpd64(H23)—(O1N)NAD	1.962 Å
		Cpd64(H23)—(N7N)NAD	2.448 Å
		Cpd64(H9)—(O5D)NAD	2.468 Å
	Hydrophobic	Cpd64(H8)—(HA)PHE97	1.754 Å
		Cpd64(H7)—(HB2)MET98	1.961 Å
		Cpd64(H6)—(HE3)MET103	1.539 Å
		Cpd64(H5)—(HE1)TYR158	2.184 Å
		Cpd64(H11)—(HG21)VAL203	2.051 Å

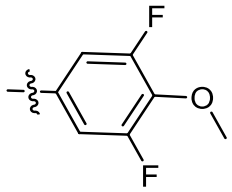
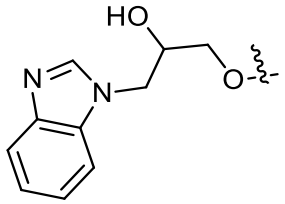
สารหมายเลข 65 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ คือ PHE149, TYR158, PRO193 และ LEU218 โดยกรดอะมิโน PHE149, TYR158, PRO193 และ LEU218 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.539 Å, 2.593 Å, 1.923 Å, 2.051 Å และ 2.224 Å ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.64 และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.974 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165

และพบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 88** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, MET155, TYR158, PRO193, ILE202 และ VAL203 ดังแสดงใน**ตารางที่ 87**



รูปที่ 88 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 65 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

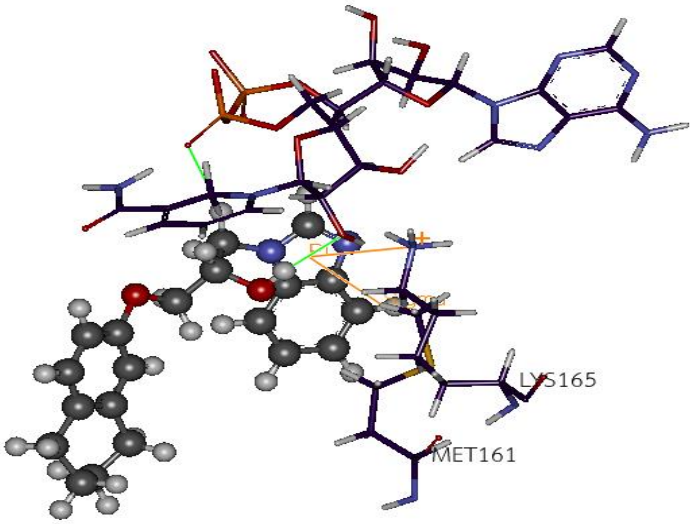
ตารางที่ 87 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 65

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 65	
	H-bond	R_1(F35)—(HZ)PHE149	2.539 Å
		R_1(F34)—(HD1)TYR158	2.593 Å
		R_1(F35)—(HB2)PRO193	1.923 Å
		R_1(F35)—(HD21)LEU218	2.051 Å
		R_1(F35)—(HD11)LEU218	2.224
	Hydrophobic	R_1(H15)—(HE1)PHE149	2.142 Å
		R_1(H15)—(SD)MET155	2.782 Å
R_1		R_1(H16)—(HB1)TYR158	2.276 Å
		R_1(H15)—(HB1)TYR158	3.211 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	2.222 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.668 Å
	H-bond	Cpd65(H23)—(O2D)NAD	1.974 Å
	Hydrophobic	Cpd65(H8)—(HA)PHE97	2.008 Å
		Cpd65(H7)—(HB2)MET98	1.898 Å
		Cpd65(H6)—(HE3)MET103	1.286 Å
		Cpd65(H11)—(HE11)TYR158	1.680 Å
		Cpd65(H7)—(HG21)ILE202	2.324 Å
		Cpd65(H5)—(HG22)VAL203	2.334 Å
		Cpd65(H10)—(HG21)VAL203	2.351 Å
Cpd65			
	Sigma-Pi	Cpd65(Pi)—(Sigma)(HE3)MET161	
	N-Pi	Cpd65(Pi)—(NZ)LYS165	

หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

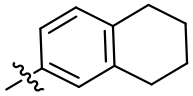
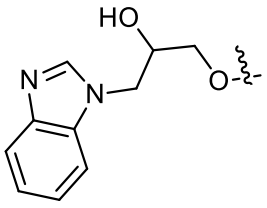
สารหมายเลข 66 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.068 Å และ 2.405 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน LYS165 และพบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161 ดังแสดงใน**รูปที่ 89** นอกจากนี้ยัง

พบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, ALA157, TYR158, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 88**



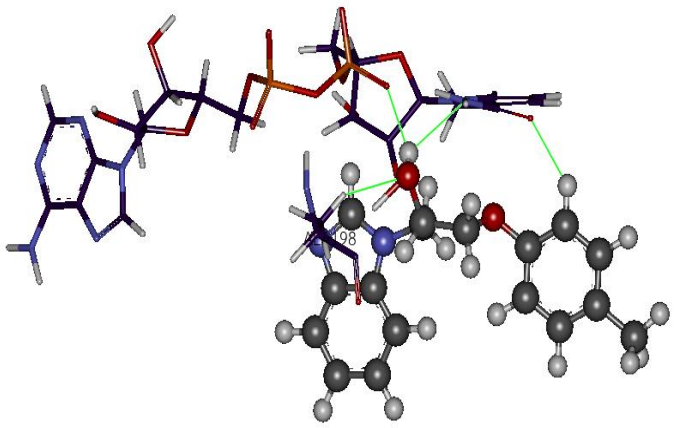
รูปที่ 89 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารหมายเลข 66 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 88 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 66

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 66
 R_1	Hydrophobic	R_1(H20)—(HB2)ALA157 1.645 Å
		R_1(H18)—(HD1)TYR158 1.343 Å
		R_1(H18)—(HB1)TYR158 2.348 Å
		R_1(H18)—(HA)TYR158 2.327 Å
		R_1(H21)—(HB1)TYR158 2.043 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193 2.077 Å
		R_1(H12)—(HB2)PRO193 2.239 Å
		R_1(H12)—(HA)PR0193 2.222 Å
		R_1(H16)—(HG21)VAL203 1.484 Å
		R_1(H17)—(HG12)VAL203 2.141 Å
		R_1(H13)—(HD21)LEU218 2.335 Å
		R_1(H14)—(HD12)LEU218 2.085 Å
		R_1(H15)—(HD23)LEU218 1.811 Å
 Cpd66	H-bond	Cpd66(H23)—(O21)NAD 2.068 Å
		Cpd66(H4)—(O1N)NAD 2.405 Å
	Hydrophobic	Cpd66(H8)—(HA)PHE97 2.118 Å
		Cpd66(H7)—(HB2)MET98 1.938 Å
		Cpd66(H6)—(HE3)MET103 1.359 Å
		Cpd66(H11)—(HE1)TYR158 2.105 Å
		Cpd66(H3)—(HB2)ALA198 2.147 Å
		Cpd66(H7)—(HG21)ILE202 2.344 Å
		Cpd66(H5)—(HG22)VAL203 2.116 Å
		Cpd66(H10)—(HG21)VAL203 2.351 Å
		Cpd66(Pi)—(NZ)LYS165

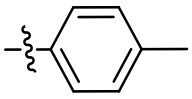
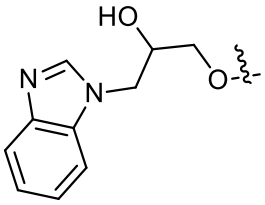
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ
N-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดไนโตรเจน-ไพ

สารหมายเลข 67 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.226 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.985 Å พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.445Å และ พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.226 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 90** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 89**

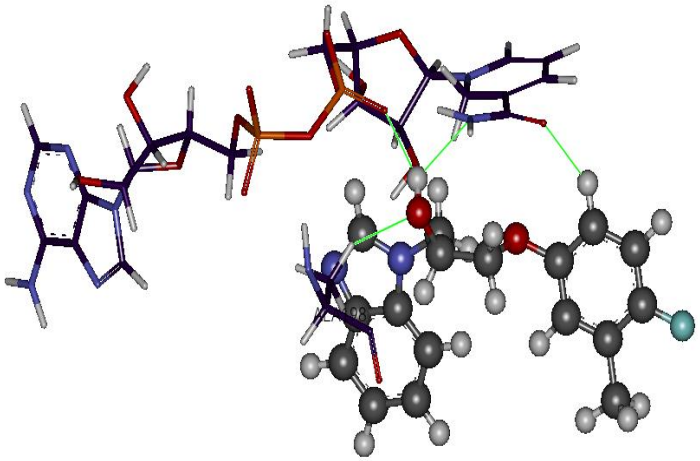


รูปที่ 90 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 67 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 89 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 67

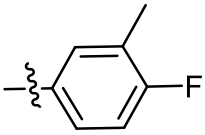
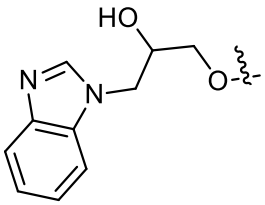
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 67	
 R_1	H-bond	R_1(H18)—(O7N)NAD	2.226 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HE1)TYR158	2.320 Å
		R_1(H13)—(HD1)TYR158	2.192 Å
		R_1(H18)—(HA)PRO193	2.055 Å
		R_1(H14)—(HB2)PR0193	1.571 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.903 Å
		R_1(H15)—(HD12)LEU218	1.906 Å
		R_1(H15)—(HD11)LEU218	2.093 Å
		R_1(H14)—(HD21)LEU218	2.205 Å
 Cpd67	H-bond	Cpd67(D22)—(HB2)ALA198	2.226 Å
		Cpd67(H23)—(O1N)NAD	1.985 Å
		Cpd67(H23)—(N7N)NAD	2.445 Å
	Hydrophobic	Cpd67(H9)—(HA)PHE97	1.739 Å
		Cpd67(H7)—(HB2)MET98	1.855 Å
		Cpd67(H6)—(HE1)MET103	2.381 Å
		Cpd67(H6)—(HE3)MET103	1.425 Å
		Cpd67(H6)—(SD)MET103	2.936 Å
		Cpd67(H5)—(HE1)TYR158	2.257 Å
		Cpd67(H11)—(HG21)VAL203	1.872 Å

สารหมายเลข 68 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.244 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.950 Å พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.367 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.184 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 91** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193 และ VAL203 ดังแสดงใน**ตารางที่ 90**

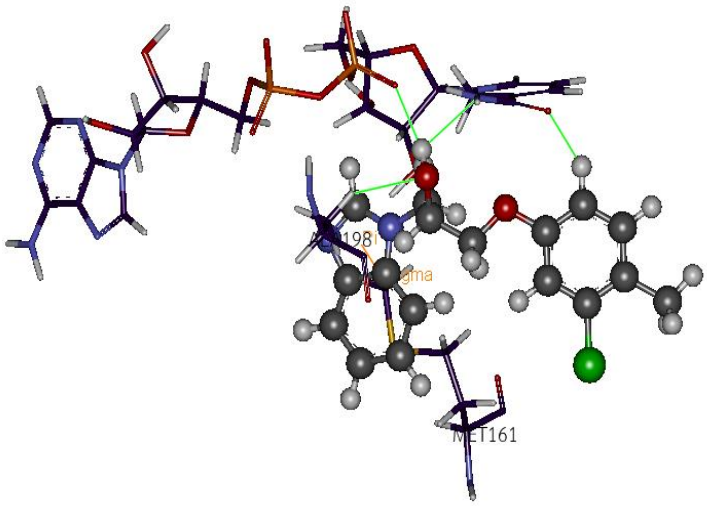


รูปที่ 91 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารหมายเลข 68 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 90 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 68

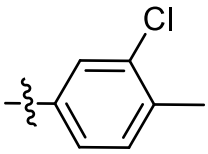
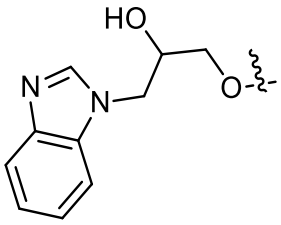
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 68	
 R_1	H-bond	R_1(H12)—(O7N)NAD	2.184 Å
	Hydrophobic	R_1(H15)—(HD1)TYR158	2.197 Å
		R_1(H13)—(HB2)PRO193	1.425 Å
		R_1(H12)—(HA)PRO193	2.160 Å
		R_1(H14)—(HG21)VAL203	1.632 Å
 Cpd68	H-bond	Cpd68(O22)—(HB2)ALA198	2.244 Å
		Cpd68(H23)—(O1N)NAD	1.950 Å
		Cpd68(H23)—(N7N)NAD	2.367 Å
	Hydrophobic	Cpd68(H8)—(HA)PHE97	1.744 Å
		Cpd68(H7)—(HB2)MET98	1.901 Å
		Cpd68(H6)—(HE3)MET103	1.440 Å
		Cpd68(H6)—(HE1)MET103	2.377 Å
		Cpd68(H5)—(HE1)TYR158	2.264 Å
		Cpd68(H11)—(HG21)VAL203	1.862 Å

สารหมายเลข 69 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.440 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.057 Å พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.326 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.925 Å และพบอันตรกิริยาชนิดซิกม่า-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET161ดังแสดงใน**รูปที่ 92** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, PRO193, ALA198, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 91**



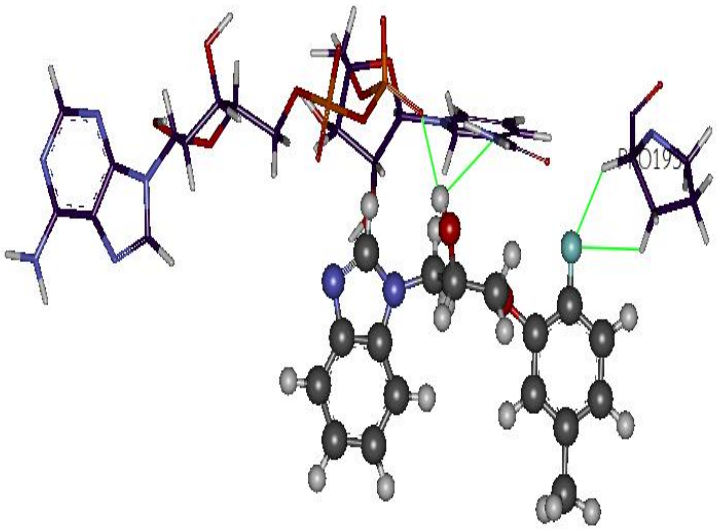
รูปที่ 92 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารหมายเลข 69 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 91 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 69

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 69	
	H-bond	R_1(H7)—(O7N)NAD	1.925 Å
		R_1(H14)—(Hz)phe149	2.116 Å
		R_1(H17)—(Ha)PRO193	2.025 Å
	Hydrophobic	R_1(H13)—(HB2)PRO193	1.605 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.167 Å
R_1		R_1(H14)—(HD11)LEU218	1.997 Å
		R_1(H16)—(HD23)LEU218	2.283 Å
		Cpd68(O22)—(HB2)ALA198	2.440 Å
	H-bond	Cpd69(H23)—(O1N)NAD	2.057 Å
		Cpd69(H23)—(N7N)NAD	2.326 Å
		Cpd69(H8)—(HA)PHE97	1.854 Å
		Cpd69(H7)—(HB2)MET98	1.845 Å
		Cpd69(H6)—(HE1)MET103	2.383 Å
		Cpd69(H6)—(HE3)MET103	1.276 Å
	Hydrophobic	Cpd69(H2)—(HB1)ALA198	2.212 Å
		Cpd69(H2)—(HB2)ALA198	2.162 Å
Cpd69		Cpd69(H7)—(HG21)ILE202	2.331 Å
		Cpd69(H11)—(HG21)VAL203	2.085 Å
		Cpd69(H10)—(HG21)VAL203	1.959 Å
		Cpd69(Pi)—(Sigma)(HE3)MET161	

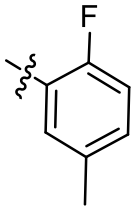
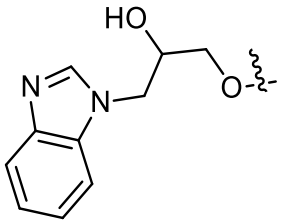
หมายเหตุ : Sigma-Pi คือ อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพ

สารหมายเลข 70 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ PRO193 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.547 Å และ 2.180 Å พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.419 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.395 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 93** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, ILE202, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 92**

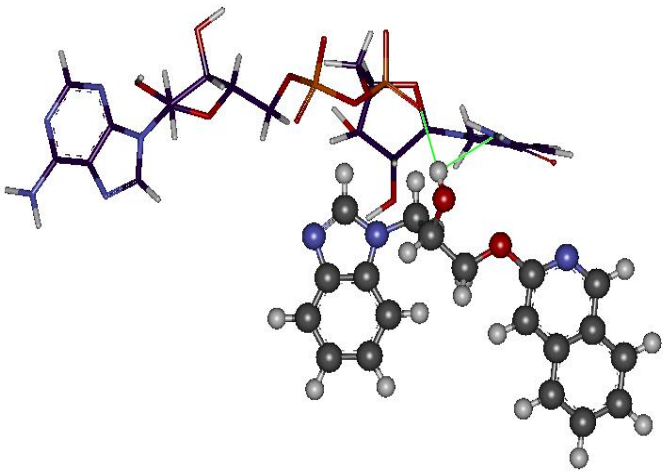


รูปที่ 93 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 70 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 92 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 70

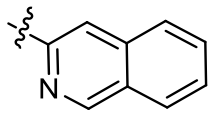
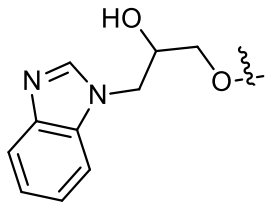
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 70	
	H-bond	R_1(F35)—(HB2)PRO193	2.547 Å
		R_1(F35)—(HA)PRO193	2.180 Å
		R_1(H12)—(HD1)TYR158	2.319 Å
		R_1(H15)—(HD1)TYR158	1.882 Å
		R_1(H17)—(HB2)PRO193	1.764 Å
	Hydrophobic	R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.877 Å
R_1		R_1(H16)—(HG11)VAL203	2.178 Å
		R_1(H16)—(HG12)VAL203	1.961 Å
		R_1(H17)—(HD21)LEU218	2.194 Å
	H-bond	Cpd70(H23)—(O1N)NAD	2.419 Å
		Cpd70(H23)—(N7N)NAD	2.395 Å
		Cpd70(H8)—(HA)PHE97	1.771 Å
		Cpd70(H7)—(HB2)MET98	1.976 Å
		Cpd70(H6)—(HE3)MET103	1.518 Å
	Hydrophobic	Cpd70(H5)—(HE1)TYR158	2.104 Å
Cpd70		Cpd70(H7)—(HG21)ILE202	2.379 Å
		Cpd670(H11)—(HG21)VAL203	2.031 Å

สารหมายเลข 71 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2048 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.268 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 94** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, PHE149, TYR158, PRO193, ALA198, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 93**

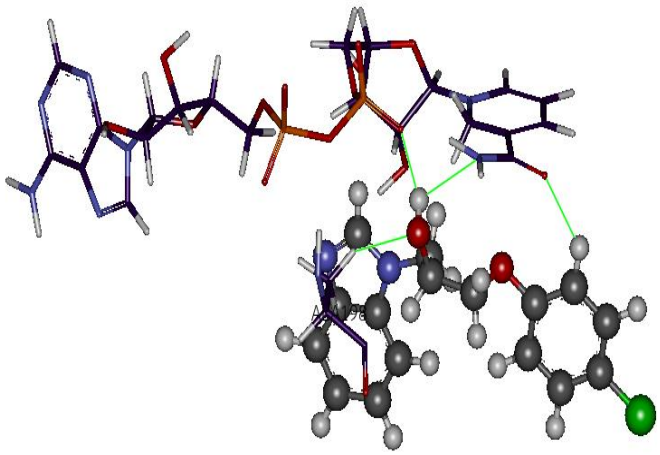


รูปที่ 94 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารหมายเลข 71 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ตารางที่ 93 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 71

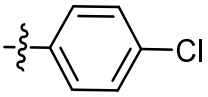
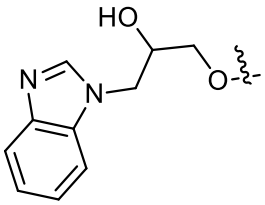
ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 71	
	Hydrophobic	R_1(H15)—(HZ)PHE149	2.274 Å
		R_1(H13)—(HD1)TYR158	2.103 Å
		R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.378 Å
R_1		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.254 Å
		R_1(H15)—(HD11)LEU218	1.932 Å
		R_1(H15)—(HD12)LEU218	2.374 Å
	H-bond	Cpd71(H22)—(O1N)NAD	2.048 Å
		Cpd71(H22)—(N7N)NAD	2.268 Å
	Hydrophobic	Cpd71(H8)—(HA)PHE97	1.698 Å
		Cpd71(H7)—(HB2)MET98	1.937 Å
		Cpd71(H6)—(HE3)MET103	1.599 Å
		Cpd71(H2)—(HB2)ALA198	2.178 Å
Cpd71		Cpd71(H2)—(HB1)ALA198	2.149 Å
		Cpd71(H10)—(HG22)VAL203	2.232 Å

สารหมายเลข 72 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ALA198 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.219 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.960 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.469 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.322 Å ดังแสดงใน**รูปที่ 95** นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE97, MET98, MET103, TYR158, PRO193, VAL203 และ LEU218 ดังแสดงใน**ตารางที่ 94**



รูปที่ 95 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของ สารหมายเลข 72 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ตารางที่ 94 อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำของสารประกอบหมายเลข 72

ส่วนของสารยับยั้ง	อันตรกิริยา	สารประกอบหมายเลข 72	
	H-bond	R_1(H15)—(O7N)NAD	2.322 Å
		R_1(H12)—(HE1)TYR158	2.360 Å
		R_1(H13)—(HD1)TYR158	2.044 Å
R_1	Hydrophobic	R_1(H15)—(HA)PRO193	2.136 Å
		R_1(H14)—(HB2)PRO193	1.810 Å
		R_1(H12)—(HG21)VAL203	1.774 Å
		R_1(H14)—(HD21)LEU218	2.347 Å
	H-bond	Cpd72(O2)—(HB2)ALA198	2.219 Å
		Cpd72(H22)—(O1N)NAD	1.960 Å
		Cpd72(H22)—(N7N)NAD	2.469 Å
	Hydrophobic	Cpd72(H8)—(HA)PHE97	1.704 Å
		Cpd72(H7)—(HB2)MET98	1.862 Å
		Cpd72(H6)—(HE3)MET103	1.445 Å
Cpd72		Cpd72(H5)—(HE1)TYR158	2.291 Å
		Cpd72(H11)—(HG21)VAL203	1.849 Å

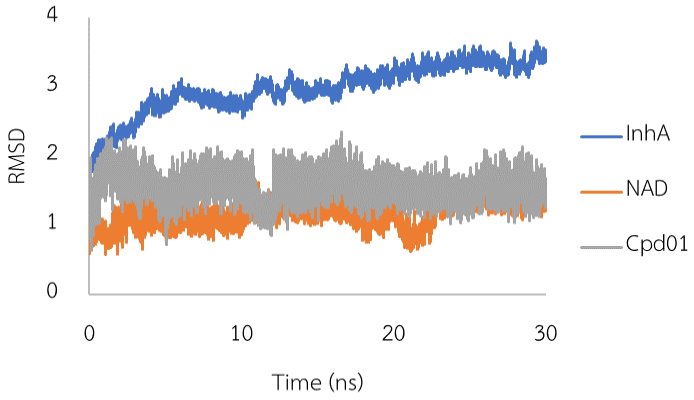
การวิเคราะห์อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคโดยวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล (Molecular Dynamics simulations)

ในการศึกษาอันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคซึ่งได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล (Molecular Dynamics simulations) โดยวิธีนี้โมเลกุลของ Receptor จะมีความยืดหยุ่นได้ ซึ่งในการทดลองได้ทำการศึกษาสารอนุพันธ์ Benzimidazole หมายเลข 01 05 09 11 13 15 18 19 32 46 55 และ 72 ตามลำดับ ซึ่งมีตำแหน่งในการวางตัวและพบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญดังนี้

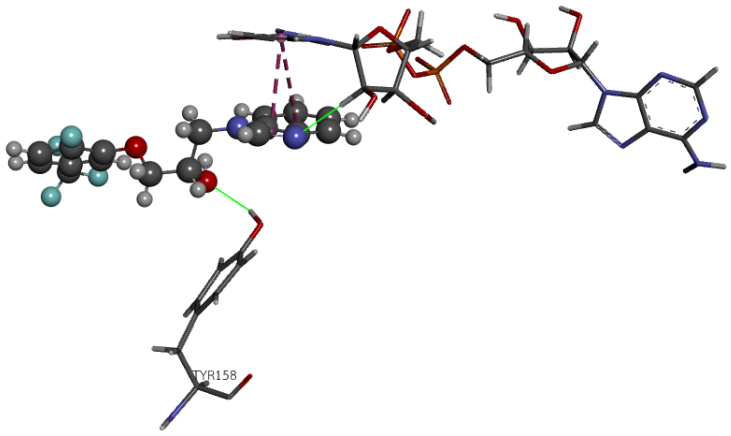
สารหมายเลข 1 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ TYR158 VAL203 และ LEU207 โดยกรดอะมิโน TYR158 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.544 Å กรดอะมิโน VAL203 และ LEU207 เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ในตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.544 Å และ 2.464 Å ตามลำดับ พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Nicotinamide ribose cofactor NAD กับ ลิแกนด์ โดยเกิดระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไนโตรเจนของ ลิแกนด์ ที่มีระยะห่างอะตอม 1.698 Å และนอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิด ไพ-ไพ ฟอสฟอรัส-ไพ

ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับวงอะโรมาติกและอะตอมฟอสฟอรัสของ Nicotinamide ribose cofactor NAD และพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของ กรดอะมิโน LEU207 PHE149 MET161 ALA198 และ MET199 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรฟิลิก ระหว่างลิแกนด์กับ กรดอะมิโน GLN214

จากรูปที่ 96 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 1 โดยศึกษาที่ 30 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 5 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 1 ns และ cpd01 เริ่มมีความเสถียรที่ 15 ns



รูปที่ 96 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 1

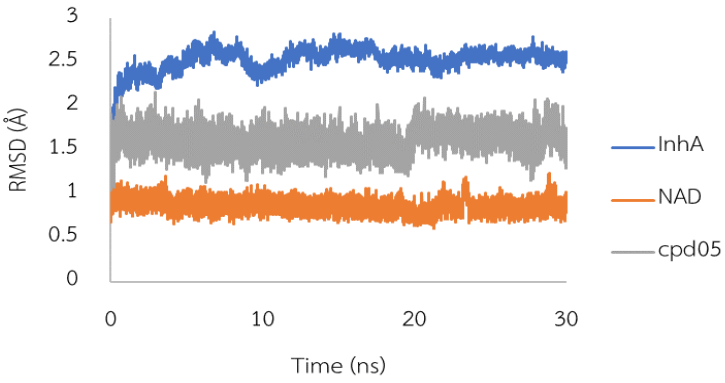


รูปที่ 97 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของ สารหมายเลข 1 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

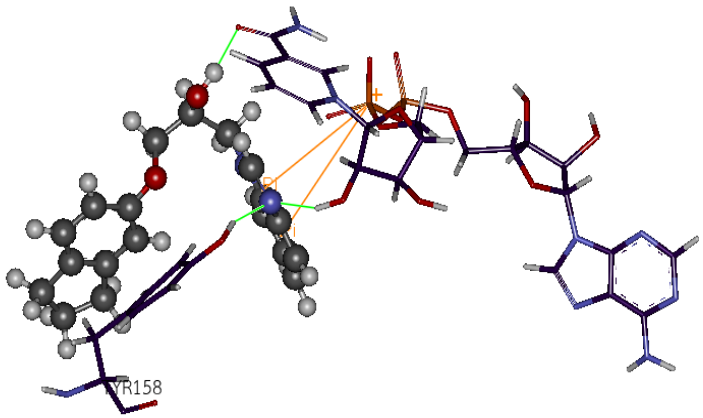
สารหมายเลข 5 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ TYR158 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.384 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่าง

ระหว่างอะตอม 1.707 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.948 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ฟอสฟอรัส-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมฟอสฟอรัสของ Nicotinamide ribose cofactor NAD นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET199, ILE202 และ LEU207

จากรูปที่ 98 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 5 โดยศึกษาที่ 30 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 10 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 1 ns และ cpd05 เริ่มมีความเสถียรที่ 5 ns



รูปที่ 98 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 5

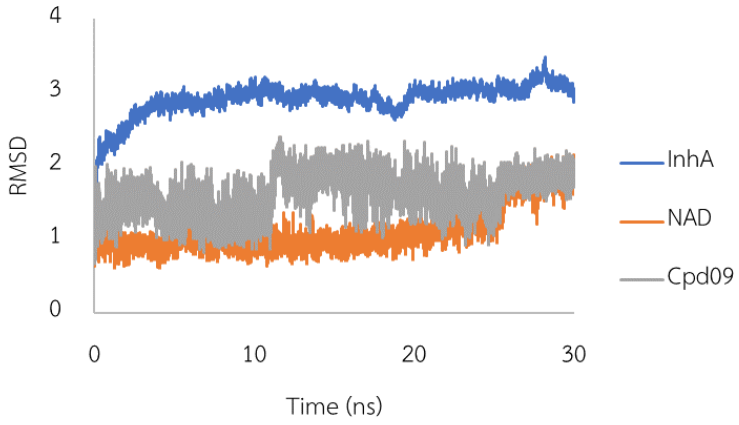


รูปที่ 99 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 5 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

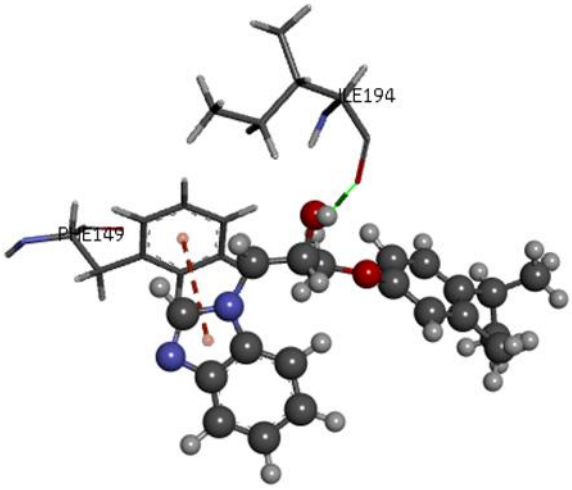
สารหมายเลข 9 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ ILE194 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่ตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิล ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.806 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับ วงอะโรมาติกของกรดอะมิโน PHE149 นอกจากนี้ยังพบอันตร

กิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET199, LEU207, PHE149 และ MET199

จากรูปที่ 100 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 9 โดยศึกษาที่ 30 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 5 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 1-25 ns และ cpd09 เริ่มมีความเสถียรที่ 25 ns



รูปที่ 100 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 9

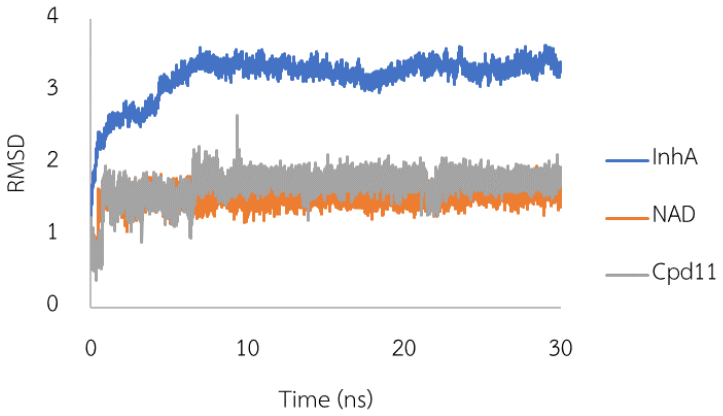


รูปที่ 101 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 9 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

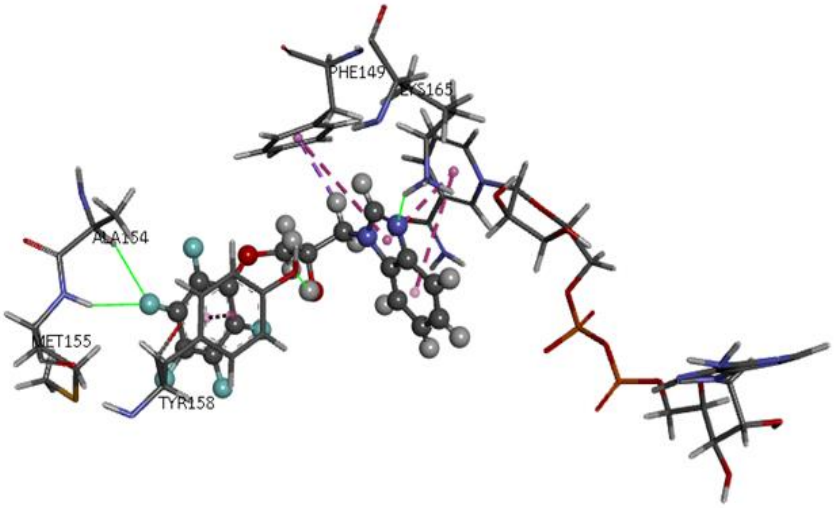
สารหมายเลข 11 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ ALA154, MET155, TYR158 และ LYS165 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน ALA154 และ MET155 กับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระว่างอะตอม 2.457Å และ 2.531 Åตามลำดับ นอกจากนี้ยังเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนTYR158 กับอะตอมไฮโดรเจนของ ลิแกนด์ที่ตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิลที่มีระยะห่าง

ระหว่างอะตอม 1.835 Å และอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน LYS165 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.166 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับวงอะโรมาติกของ NAD และกรดอะมิโน TYR158 และพบอันตรกิริยาซิกม่า-ไพ ระหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโน TYR158 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET199, LEU207, PHE149, MET161 และ MET199

จากรูปที่ 102 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 9 โดยศึกษาที่ 30 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 10 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 1 ns และ cpd11 เริ่มมีความเสถียรที่ 10 ns



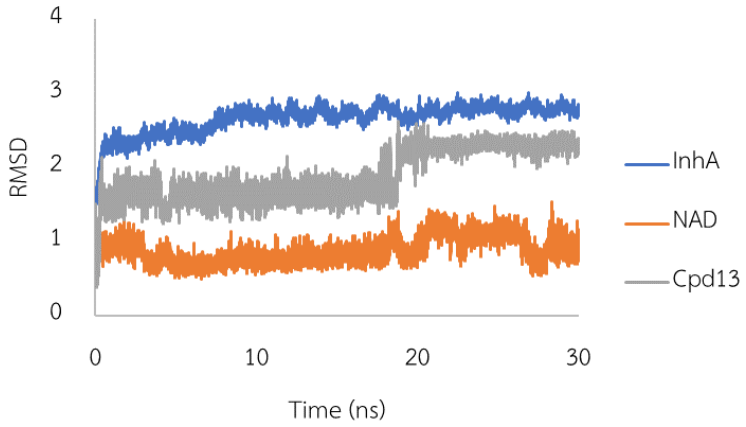
รูปที่ 102 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 11



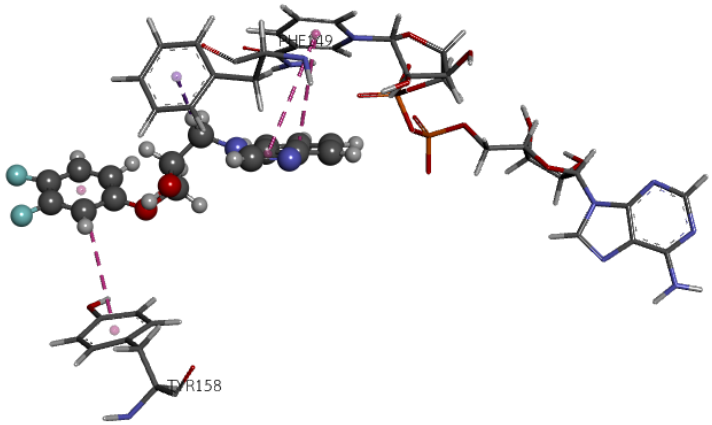
รูปที่ 103 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 11 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

สารหมายเลข 13 เกิดอันตรกิริยาชนิด ไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับวงอะโรมาติกของ NAD และกรดอะมิโน TYR158 และพบอันตรกิริยา ซิกม่า-ไพ ระหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโน TYR158 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET199, PRO151 และ PHE149

จากรูปที่ 104 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 13 โดยศึกษาที่ 30 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 5 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 5-10 ns และ cpd11 เริ่มมีความเสถียรที่ 20 ns



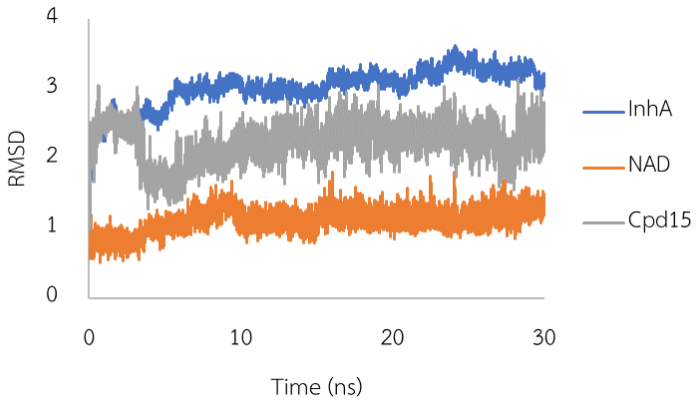
รูปที่ 104 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 13



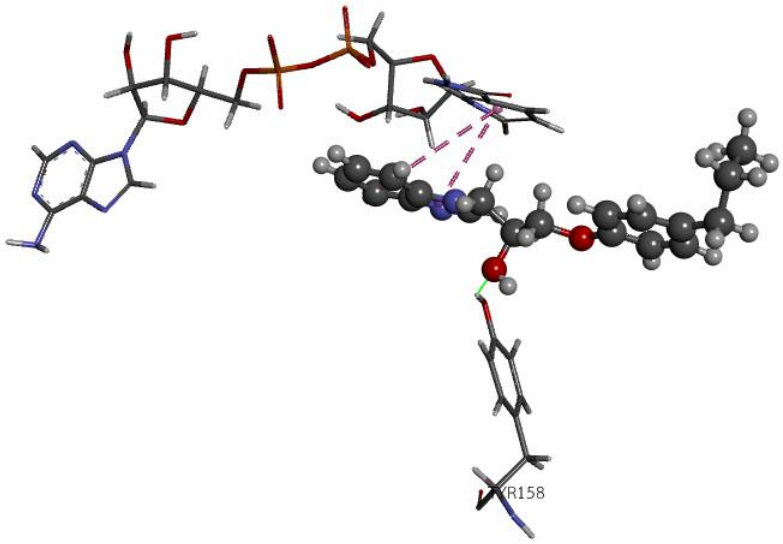
รูปที่ 105 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 13 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

สารหมายเลข 15 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ TYR158 โดยเกิด อันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน TYR158 กับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิลที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.001 Å และพบอันตรกิริยาชนิดไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของ ลิแกนด์กับวงอะโรมาติกของ NAD นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET155, PRO193, MET199, TRP222, TYR155, และ MET199 ดังแสดงในตารางที่ 4.77

จากรูปที่ 106 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 15 โดยศึกษาที่ 30 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 5 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 5 ns และ cpd15 เริ่มมีความเสถียรที่ 10 ns



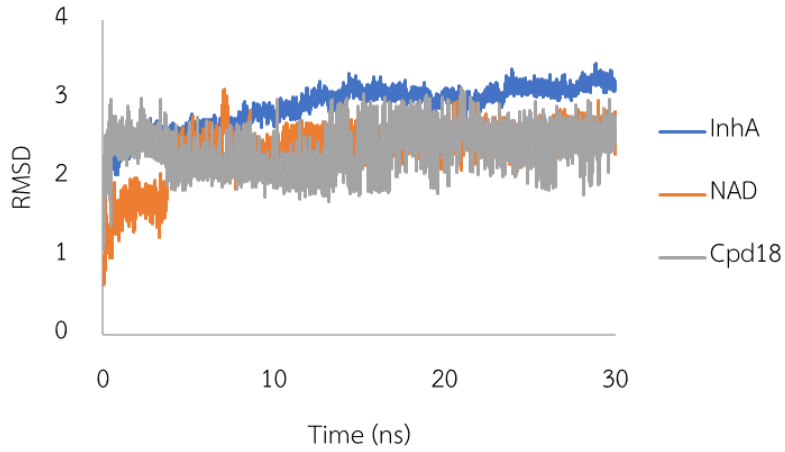
รูปที่ 106 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 15



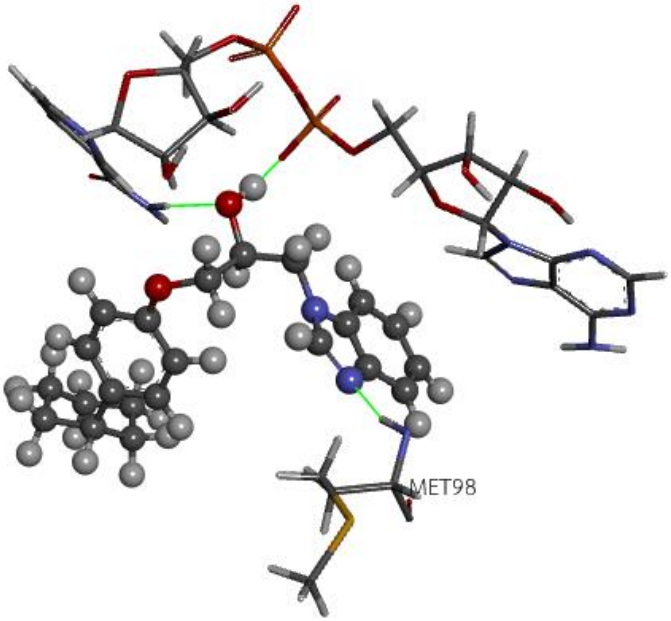
รูปที่ 107 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 15 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

สารหมายเลข 18 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ MET98 โดยเกิด อันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET98 กับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.111 Å และเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนตรงตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิลกับอะตอมไฮโดรเจนของ NAD ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.218 Å และเกิดระหว่างอะตอมออกซิเจนของ NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.567 Å ดังแสดงในรูปที่ 4.78 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET199, ALA206, LEU207 และ TYR158

จากกราฟที่ 108 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 18 โดยศึกษาที่ 5 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 5 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 5 ns และ cpd18 เริ่มมีความเสถียรที่ 15 ns



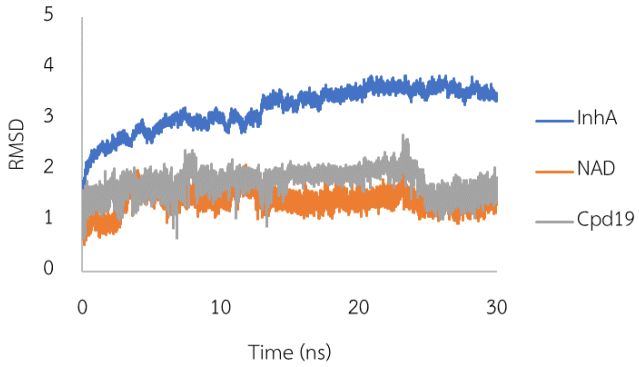
รูปที่ 108 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 18



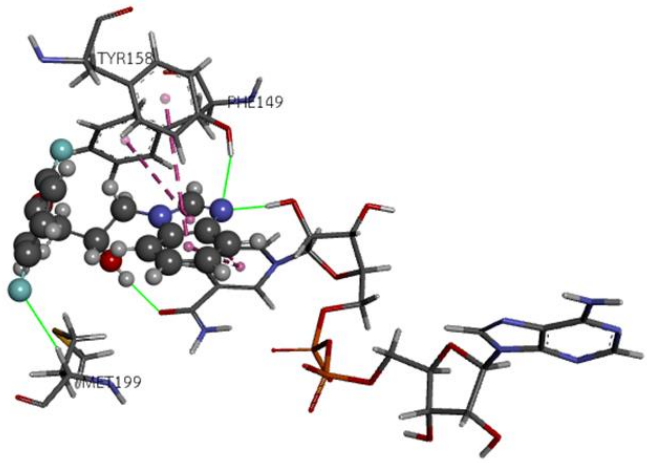
รูปที่ 109 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 18 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

สารหมายเลข 19 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ MET199 และ TYR158 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET199 กับอะตอมฟลูออรีนของลิแกนด์ตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.500 Å และเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน TYR158 กับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.284 Å และเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนของ NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระว่างอะตอม 1.821 Å เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของ NAD กับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.744 Å พบอันตรกิริยาชนิด ไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับวงอะโรมาติกของ NAD กรดอะมิโน TYR158 และกรดอะมิโน PHE149 ดังแสดงในรูปที่ 4.79 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน ILE202, PHE149, ALA198 และ TYR158

จากรูปที่ 110 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 19 โดยศึกษาที่ 5 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 15 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 5 ns และ cpd19 เริ่มมีความเสถียรที่ 15-25 ns



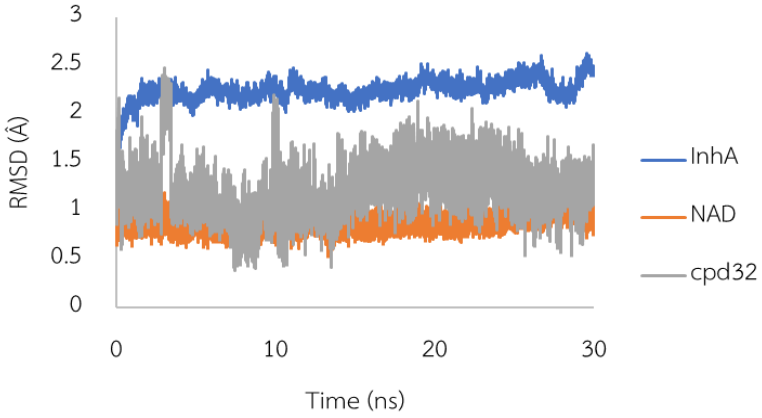
กราฟที่ 110 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 19



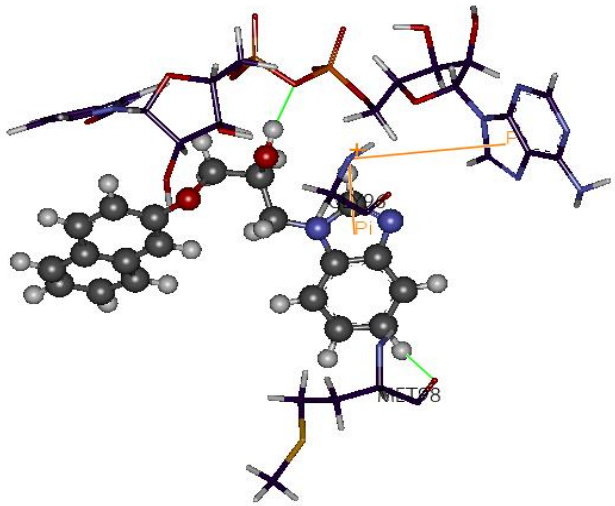
รูปที่ 111 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 19 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

สารหมายเลข 32 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ MET98 โดยเกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.449 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ Nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.709 Å และพบอันตรกิริยาชนิด ไนโตรเจน-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโน GLY98 ดังแสดงในรูปที่ 4.80 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน ALA157, MET98, MET103 และ MET161

จากรูปที่ 112 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 32 โดยศึกษาที่ 30 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 5 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 1 ns และ cpd32 เริ่มมีความเสถียรที่ 15 ns



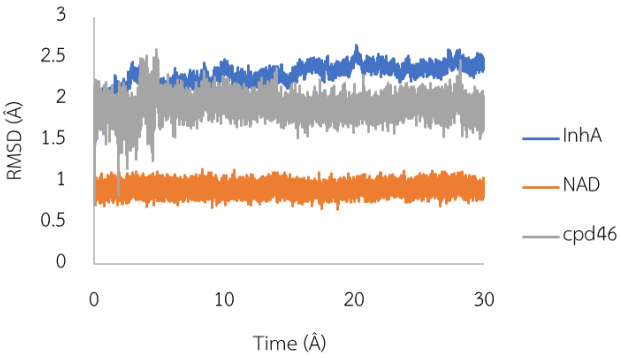
รูปที่ 112 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 32



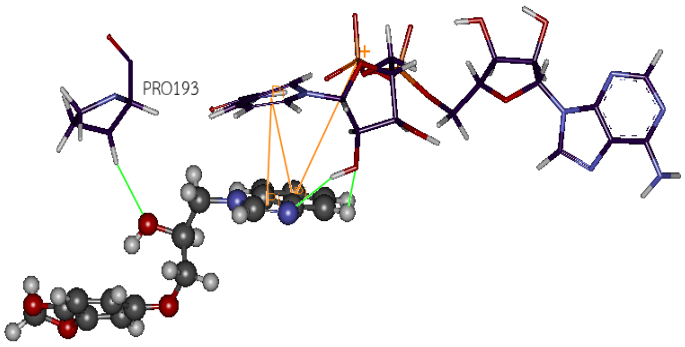
รูปที่ 113 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 32 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

สารหมายเลข 46 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ PRO193 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.462 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.332 Å และ พบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของ nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.174 Å พบอันตรกิริยาชนิด ฟอสฟอรัส-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับอะตอมฟอสฟอรัสของ nicotinamide ribose cofactor NAD และพบอันตรกิริยาชนิด ซิกไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติกของลิแกนด์กับวงอะโรมาติกของ nicotinamide ribose cofactor NAD ดังแสดงในรูปที่ 4.81 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน PHE149 และ ALA198

จากรูปที่ 114 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 46 โดยศึกษาที่ 30 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 5 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 1 ns และ cpd32 เริ่มมีความเสถียรที่ 5 ns



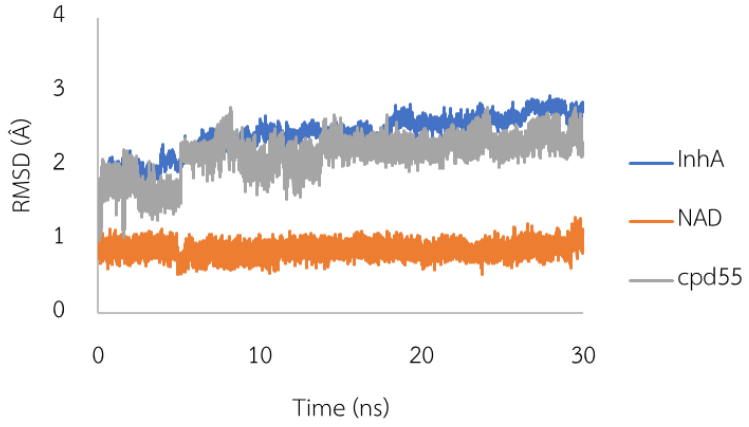
รูปที่ 114 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 46



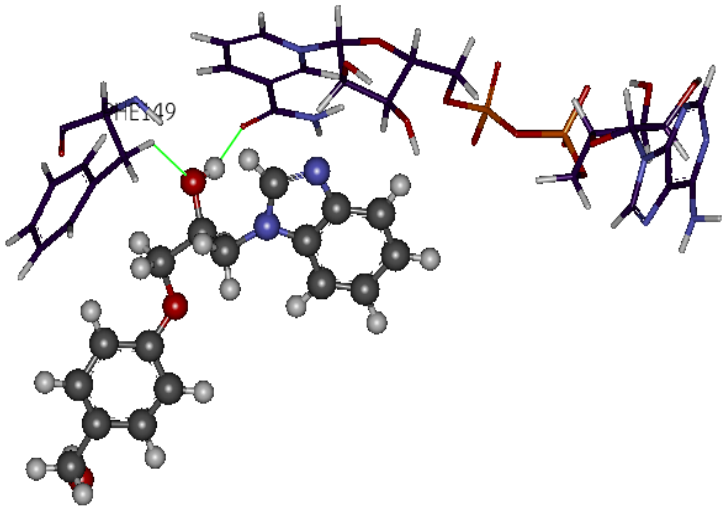
รูปที่ 115 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 46 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

สารหมายเลข 55 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ PHE149 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.495 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 1.658 Å ดังแสดงในรูปที่ 4.82 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดร โฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน MET155, LEU207, MET199 และ ILE202

จากรูปที่ 116 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 55 โดยศึกษาที่ 30 ns พบว่า โพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 10 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 1 ns และ cpd55 เริ่มมีความเสถียรที่ 15 ns



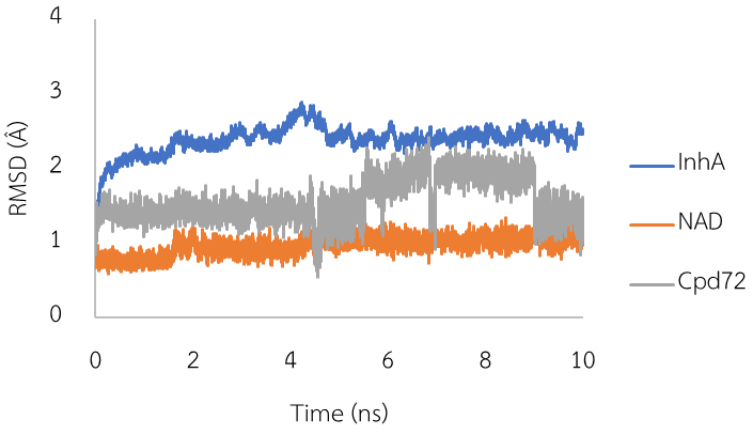
รูปที่ 116 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 55



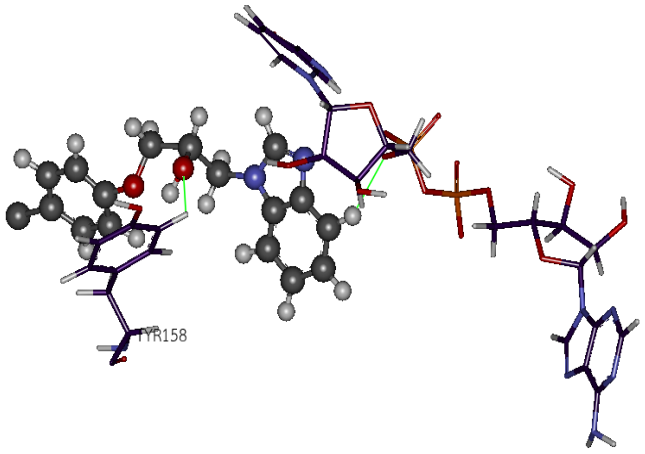
รูปที่ 117 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 55 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

สารหมายเลข 72 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ TYR158 โดย เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.461 Å และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมออกซิเจนของ nicotinamide ribose cofactor NAD กับอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์ ที่มีระยะห่างระหว่างอะตอม 2.389 Å ดังแสดงในรูปที่ 4.83 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน TYR158 และ LEU218

จากรูปที่ 118 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (S) กับ RMSD (Å) ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 72 โดยศึกษาที่ 10 ns พบว่าโพรงโปรตีน (InhA) เริ่มเสถียรที่ 5 ns NAD เริ่มเสถียรที่ 2 ns และ cpd 72 เริ่มมีความเสถียรที่ 1 ns ถึง 5 ns



รูปที่ 118 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 72



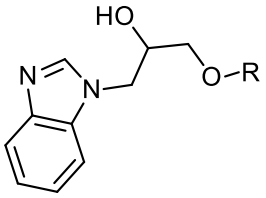
รูปที่ 119 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ของสารหมายเลข 72 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล

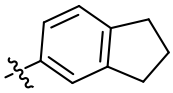
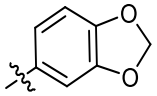
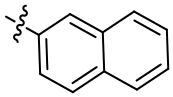
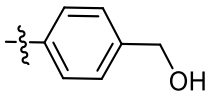
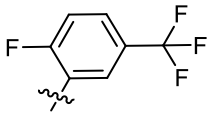
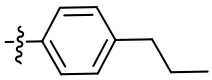
การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ผ่านวิธีการสังเคราะห์ที่ 1

สารอนุพันธ์ Benzimidazole

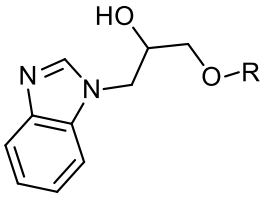
ข้อมูลทางโครงสร้างค่า Docking score และ ค่า Binding energy ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่ทำการสังเคราะห์ จำนวน 8 โครงสร้าง ซึ่งมีโครงสร้างหลักที่หมือนกันแต่ต่างกันตรงที่หมู่แทนที่ R ดังแสดงใน**ตารางที่ 95**

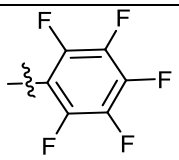
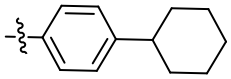
ตารางที่ 95 โครงสร้างสารอนุพันธ์ Benzimidazole ค่า Docking score และ ค่า Binding energy ที่ทำการสังเคราะห์



ชื่อสาร	Compounds	R	Docking score (kcal/mol)	Binding energy (kcal/mol)
TB01	Cpd05		-11.97	-8.78
TB02	Cpd46		-11.33	-8.01
TB03	Cpd32		-11.46	-9.31
TB04	Cpd55		-11.21	-7.47
TB05	Cpd01		-12.27	-7.57
TB06	Cpd15		-11.68	-8.44

ตารางที่ 95 โครงสร้างสารอนุพันธ์ Benzimidazole ค่า Docking score และ ค่า Binding energy ที่ทำการสังเคราะห์ (ต่อ)

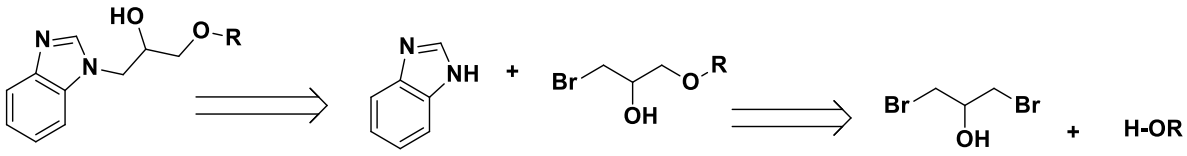


ชื่อสาร	Compounds	R	Docking score (kcal/mol)	Binding energy (kcal/mol)
TB07	Cpd11		-11.79	-6.71
TB08	Cpd18		-11.64	-9.47

การออกแบบวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ซึ่งเป็นโมเลกุลเป้าหมายในการศึกษา ซึ่งในการสังเคราะห์ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบวิธีการสังเคราะห์ออกเป็น 2 วิธี ดังต่อไปนี้

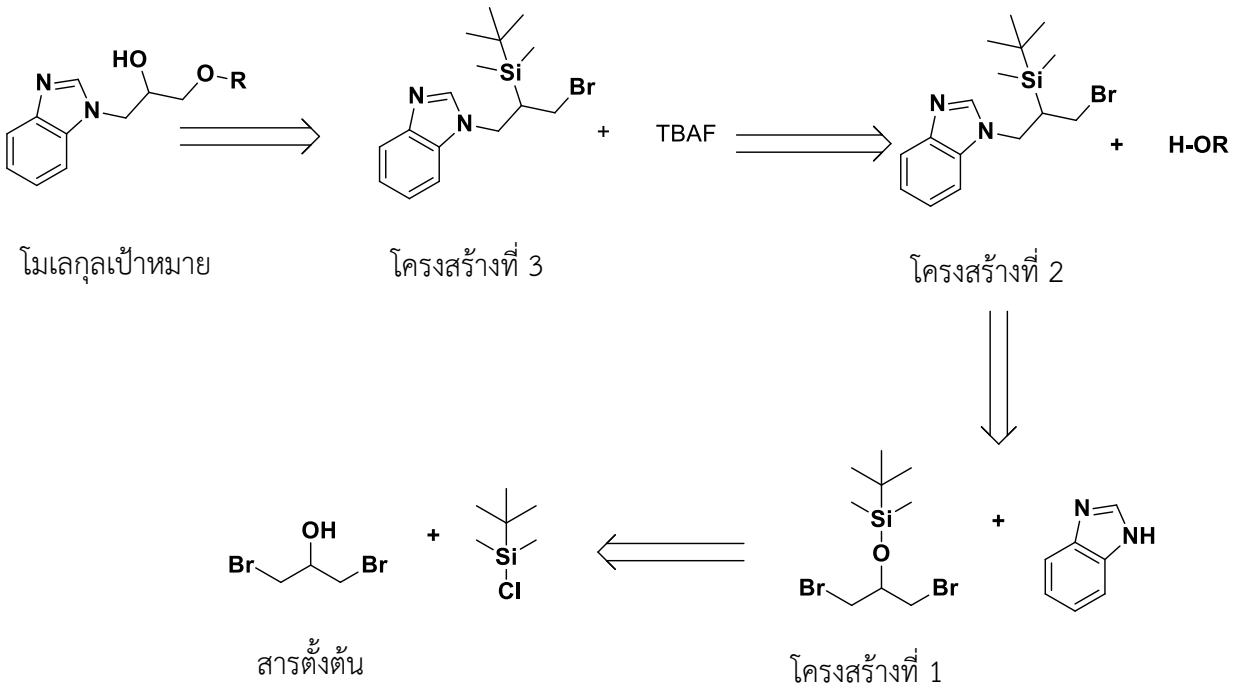
วิธีสังเคราะห์ที่ 1



โมเลกุลเป้าหมาย โครงสร้างที่ 1 สารตั้งต้น

รูปที่ 120 การออกแบบการสังเคราะห์โครงสร้างของสารอนุพันธ์ Benzimidazole วิธีที่ 1

วิธีสังเคราะห์ที่ 2

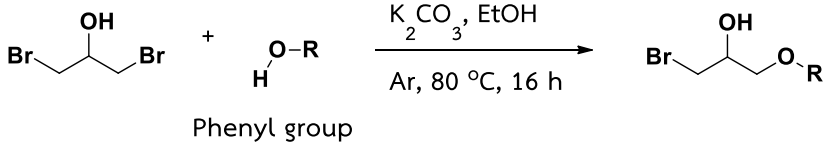


รูปที่ 121 การออกแบบการสังเคราะห์โครงสร้างของสารอนุพันธ์ Benzimidazole วิธีที่ 2

4.6 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole

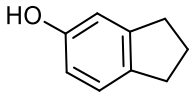
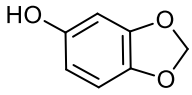
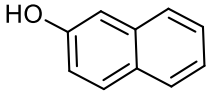
4.6.1 วิธีการสังเคราะห์ที่ 1

ขั้นตอนที่ 1



รูปที่ 122 แสดงวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 1 โดยวิธีที่ 1

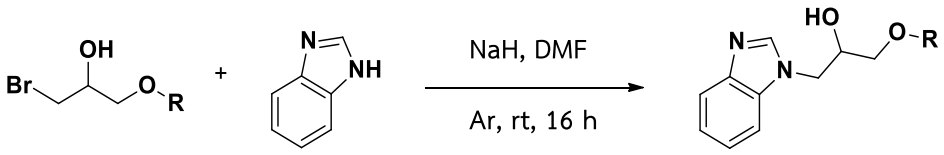
ตารางที่ 96 ข้อมูลสาร (Hydroxy group) และระบบในการลงคอลัมน์ของสารแต่ละโครงสร้างในขั้นตอนที่ 1

Phenyl group	ชื่อสาร	ระบบในการแยกสารโดยคอลัมน์
	2,3-dihydro-1H-inden-5-ol	10% EtOAc/Hexane
	Sesamol	
	Naphthalen-2-ol	

วิธีการทดลอง

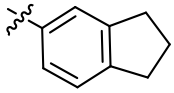
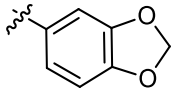
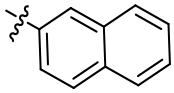
นำ 1,3-dibromopropan-2-ol (1.5 eq) มาทำปฏิกิริยากับสารในกลุ่ม Phenyl group ดังแสดงในตาราง 99 (1 eq) ในขวดก้นกลม จากนั้นเติมสารละลายเอทานอล แล้วค่อยๆเติม โพแทสเซียมคาร์บอเนต (4 eq) และ Stirred พร้อมทั้ง Reflux Overnight หลังจากนั้นกำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator แล้วทำการสกัดด้วยน้ำกับไดคลอโรมีเทน 3 รอบ เก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟต จากนั้นกรองเอาชั้นสารอินทรีย์โดยกรองผ่านสำลี นำสารไประเหยเพื่อกำจัดสารละลายโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์

ขั้นตอนที่ 2



รูปที่ 123 แสดงวิธีการสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 2 โดยวิธีที่ 1

ตารางที่ 97 ลักษณะหมู่แทนที่ R และระบบในการลงคอลัมน์ของสารแต่ละโครงสร้างในขั้นตอนที่ 2

หมู่ R	ระบบในการแยกสารโดยคอลัมน์
	50%EtOAc/Hexane
	50%EtOAc/Hexane สำหรับ (Short column) หรือ 100%EtOAc สำหรับ (Long column)
	

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ (2) ล้างโซเดียมไฮไดรด์ (3 eq) ด้วยเฮกเซน 3 รอบเพื่อล้างเอาพาราฟินออยล์ที่เคลือบไว้ออก นำโซเดียมไฮไดรด์ที่ล้างเสร็จแล้วไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งโดยการลดแรงดันบรรยากาศ หรือถ้าใช้เบสเป็นซีเซียมคาร์บอเนต (3 eq) ก็สามารถใช้ทำปฏิกิริยาได้เลย จากนั้นนำสารในกลุ่ม Phenyl group ดังแสดงในตาราง 3.3 (1 eq) ลงในขวดก้นกลม ในสารละลาย ไดเมทิลฟอร์มาร์ไมด์ (DMF) เติมเบสโซเดียมไฮไดรด์ที่ล้างเสร็จแล้วลงไปในปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของแก๊สอาร์กอน Stirred ประมาณ 30 นาที แล้วเติมสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนที่ (1) (1.25 eq) Stirred ที่อุณหภูมิห้อง 16 ชั่วโมง จากนั้นเติมเมทานอลทำการสกัดด้วยน้ำกับเมทานอลเก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟต และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์

วิธีการสังเคราะห์ที่ 2

ขั้นตอนที่ 1

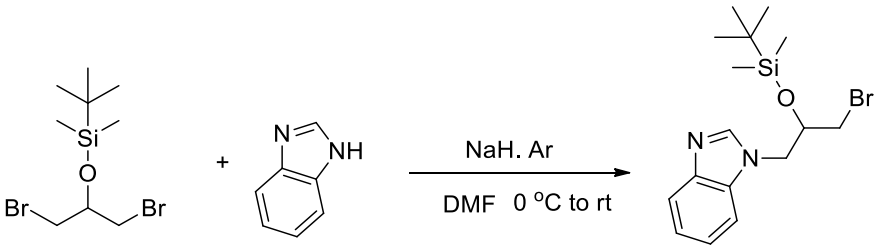
รูปที่ 124 แสดงวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 1 โดยวิธีที่ 2

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ (1) นำ 1,3-dibromopropan-2-ol 5 ml (0.049 mol, 1 eq) มาทำปฏิกิริยากับ tert-butylchlorodimethylsilane 11.07 กรัม (0.0735 mol, 1.5 eq) และ Imidazole 6.67 กรัม (0.098 mol, 2 eq) ในสารละลาย Tetrahydrofuran ในขวดก้นกลม

จากนั้น Stirrer 16 ชั่วโมง โดยจะให้อุณหภูมิของระบบจาก 0 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิห้องหลังจากนั้น กำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator แล้วทำการสกัดด้วยน้ำกับไดคลอโรมีเทน 3 ครั้ง เก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองผ่านกรวยกรองสำลี กำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์โดยใช้ 10% DCM/Hexane

ขั้นตอนที่ 2

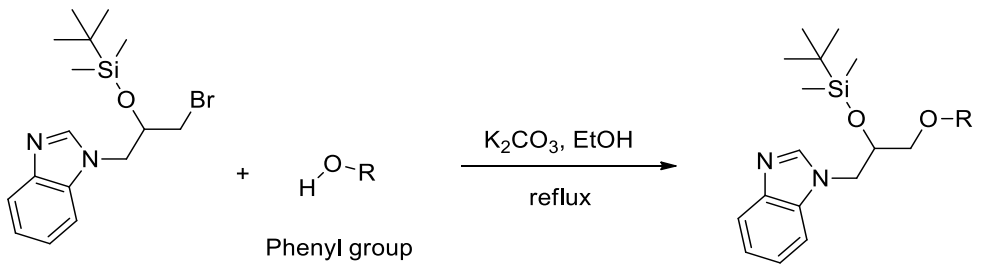


รูปที่ 125 แสดงวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 2 โดยวิธีที่ 2

วิธีการทดลอง

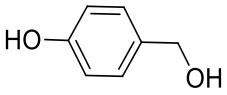
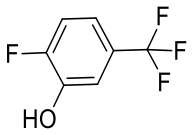
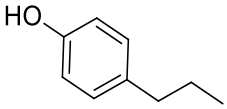
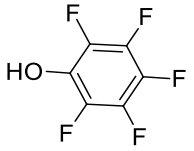
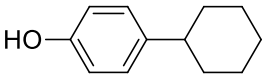
ล้างโซเดียมไฮไดรด์ 1.1064 กรัม (4.61×10-2 mol, 5 eq) ด้วยเฮกเซน 3 รอบเพื่อล้างเอาพาราฟินออยล์ที่เคลือบไว้ออก นำโซเดียมไฮไดรด์ที่ล้างเสร็จแล้วไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งโดยการลดแรงดันบรรยากาศ จากนั้นนำ 1H-benzo[d]imidazole 1.090 กรัม (9.232×10-3 mol, 1 eq) ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 ml ในสารละลายไดเมทิลฟอร์มาร์ไมด์ (DMF) เติมเบสโซเดียมไฮไดรด์ที่ล้างเสร็จแล้วลงไปในปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของแก๊สอาร์กอน Stirred ประมาณ 30 นาทีแล้วเติมสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนที่ (1) 9.2 กรัม (2.76×10^{-2} mol, 3eq) Stirred ที่อุณหภูมิห้อง 16 ชั่วโมง จากนั้นเติม เมทานอล ทำการสกัดด้วยน้ำกับเอทธิลอะซีเตท เก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟตแอน-ไฮดรัส และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์โดยใช้ 50% EtOAc/Hexane สำหรับ (Short column) หรือ 100% EtOAc สำหรับ (Long column)

ขั้นตอนที่ 3



รูปที่ 126 แสดงวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 3 โดยวิธีที่ 2

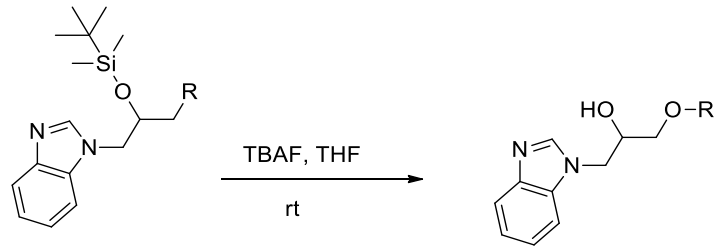
ตารางที่ 98 ข้อมูลสาร (Hydroxy group) และระบบในการลงคอลัมน์ของสารแต่ละโครงสร้างในขั้นตอนที่ 1]

Phenyl group	ชื่อสาร	ระบบในการแยกสารโดยคอลัมน์
	4-hydroxy methyl phenol	100% EtOAc
	2-Fluro-5-(trifluoromethyl)phenol	100% EtOAc
	4-Propylphenol	8% MeOH/DCM
	Pentafluoro phenol	100% EtOAc
	4-Cyclohexylphenol	60% EtOAC/Hexane

วิธีการทดลอง

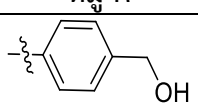
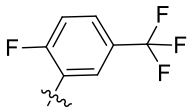
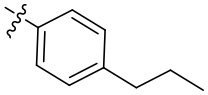
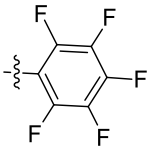
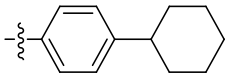
นำ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนที่ (2) (1 eq) มาทำปฏิกิริยายากับสารในกลุ่ม Phenyl group ดังแสดงใน**ตารางที่ 98** (2 eq) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (4 eq) ในสารละลายเอทานอล ในขวดก้นกลมซึ่งระบบทำภายใต้บรรยากาศของแก๊สอาร์กอน จากนั้น Stirrer 16 ชั่วโมงและควบคุมอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น กำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator แล้วทำการสกัดด้วยน้ำกับ เอทธิลอะซีเตท 3 ครั้ง เก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองผ่านกรวยกรองสำลี กำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์

ขั้นตอนที่ 4



รูปที่ 127 แสดงวิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยวิธีที่ 2

ตารางที่ 99 ลักษณะหมู่แทนที่ R และระบบในการลงคอลัมน์ของสารแต่ละโครงสร้างในขั้นตอนที่ 4

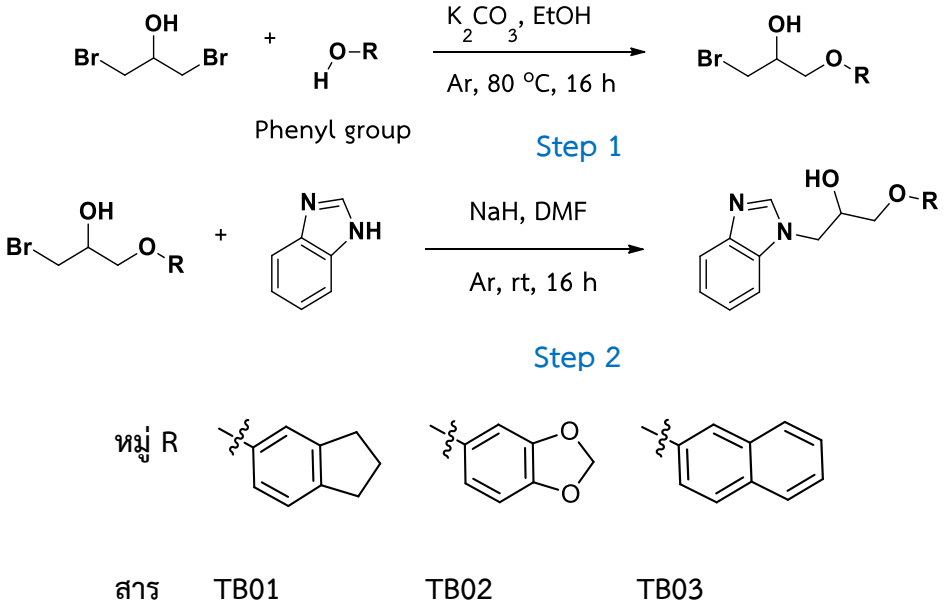
หมู่ R	ระบบในการแยกสารโดยคอลัมน์
	100% EtOAc
	100% EtOAc
	100% EtOAc
	3% MeOH/DCM
	100% EtOAc

วิธีการทดลอง

นำ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนที่ (3) (1 eq) มาทำปฏิกิริยายากับ TBAF (4 eq) ในสารละลาย เตตระไฮโดรฟูแรน ในขวดก้นกลมจากนั้น Stirrer 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นกำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator แล้วทำการสกัดด้วยน้ำกับเอทธิลอะซีเตท 3 ครั้ง เก็บชั้นสารอินทรีย์เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส กรองผ่านกรวยกรองสำลี กำจัดสารละลายที่เหลือออกโดยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator และแยกสารผสมออกเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยการลงคอลัมน์

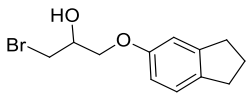
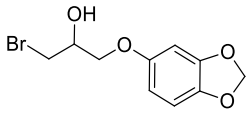
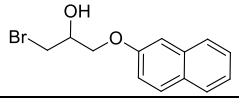
การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ผ่านวิธีการสังเคราะห์ที่ 1

ในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole โดยการใช้วิธีการสังเคราะห์ด้วยวิธีที่ 1 ผู้วิจัยได้ใช้วิธีนี้ ในการสังเคราะห์สาร TB01, TB02 และ TB03 ซึ่งแต่ละขั้นตอนในการสังเคราะห์ให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

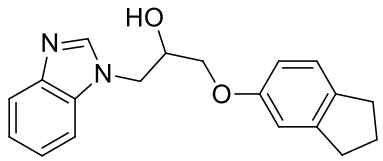


รูปที่ 128 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole TB01, TB02 และ TB03

ตารางที่ 100 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 1 โดยใช้วิธีที่ 1

สาร	ลักษณะของสาร	% yield
	ของเหลวใสไม่มีสี	47.00%
	ของเหลวใสไม่มีสี	48.31%
	ของเหลวใสไม่มีสี	66.38%

ตารางที่ 101 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้วิธีที่ 1



TB01

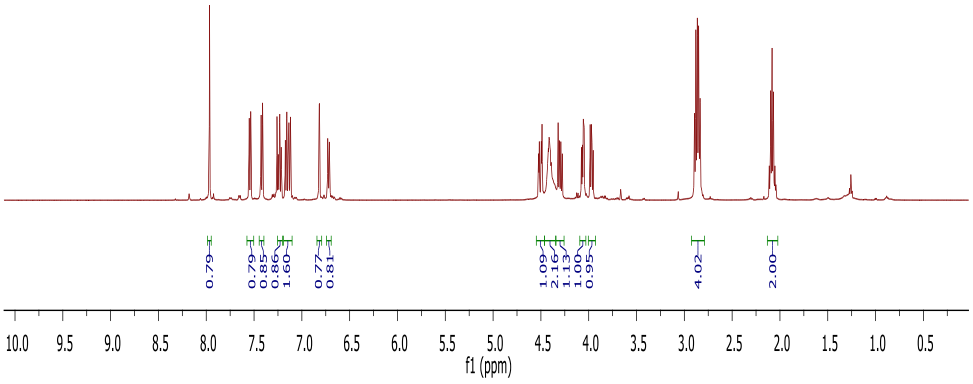
ลักษณะของสาร

ของแข็งสีขาว

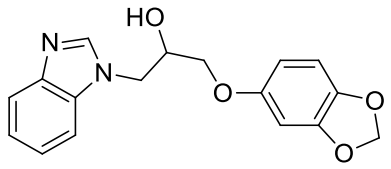
% Yield 36.00%

% Overall 16.92%

^{1}H NMR



ตารางที่ 101 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้วิธีที่ 1 (ต่อ)



TB02

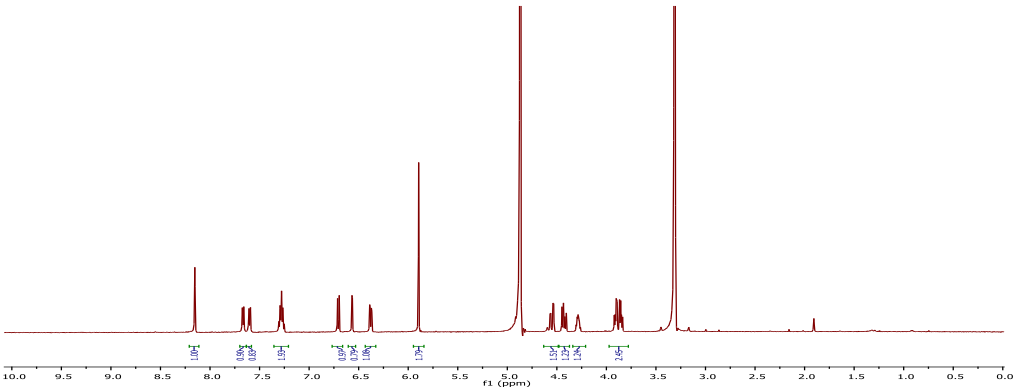
ลักษณะของสาร

ของแข็งสีขาว

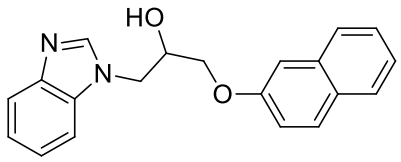
% Yield 62.08 %

% Overall 29.99 %

^{1}H NMR



ตารางที่ 101 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้วิธีที่ 1 (ต่อ)



TB03

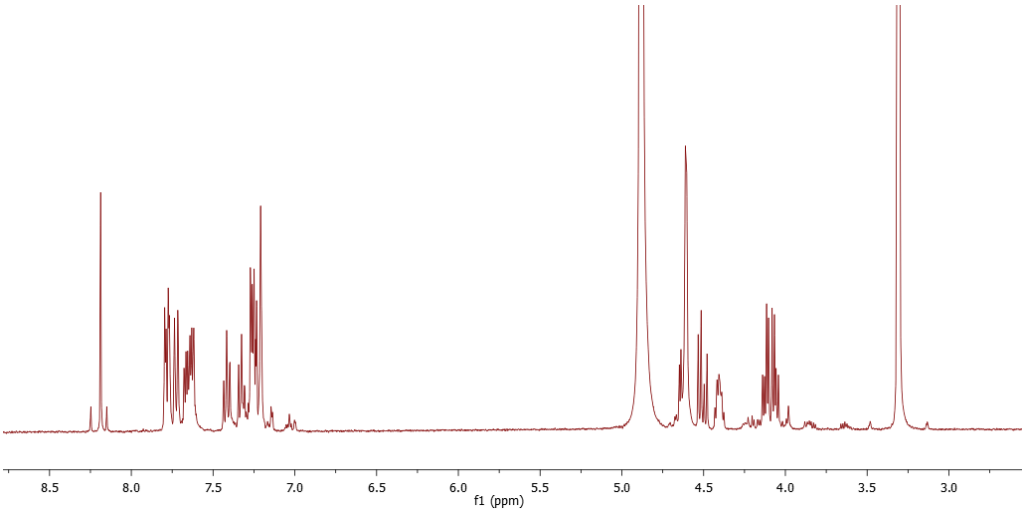
ลักษณะของสาร

ของแข็งสีขาว

% Yield 32.06 %

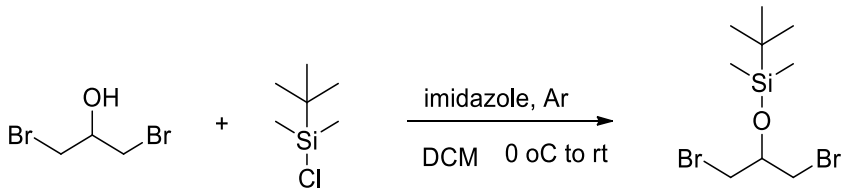
% Overall 21.28 %

^{1}H NMR

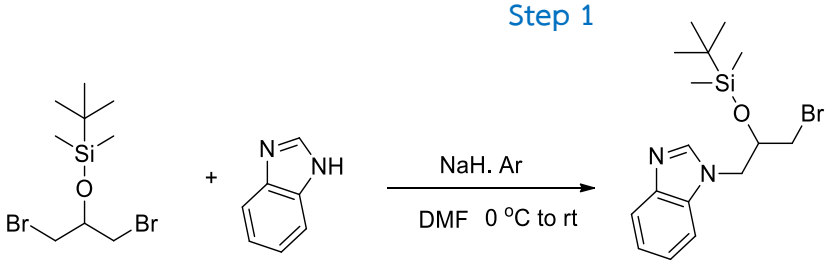


การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ผ่านวิธีการสังเคราะห์ที่ 2

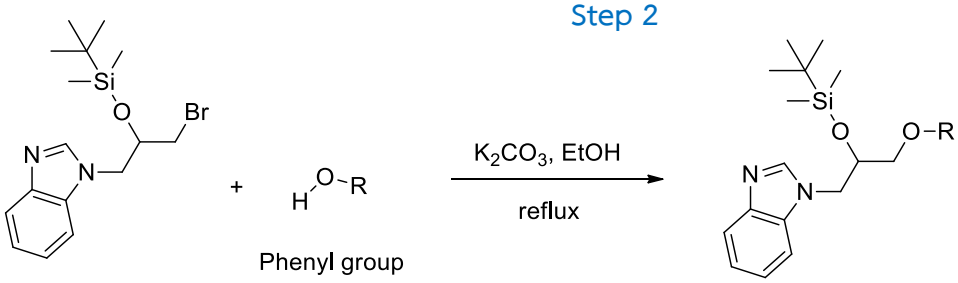
ในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole โดยการใช้วิธีการสังเคราะห์วิธีที่ 2 ผู้วิจัยได้ใช้วิธีนี้ ในการสังเคราะห์สาร TB04, TB05, TB06, TB07 และ TB08 ซึ่งแต่ละขั้นตอนในการสังเคราะห์ให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้



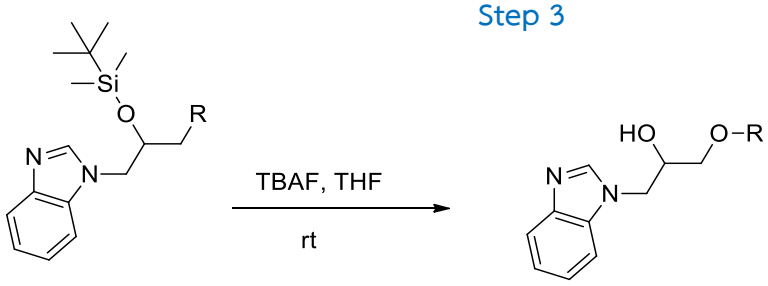
Step 1



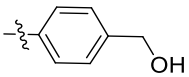
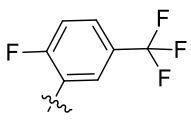
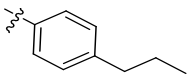
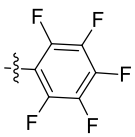
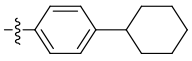
Step 2



Step 3

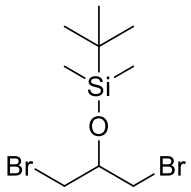


Step 4

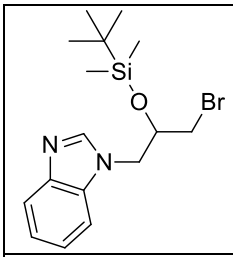
หมู่ R					
สาร	TB04	TB05	TB06	TB07	TB08

รูปที่ 129 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole TB04, TB05, TB06, TB07 และ TB08

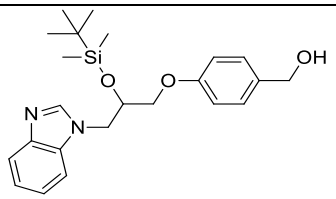
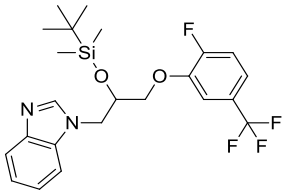
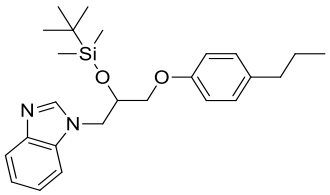
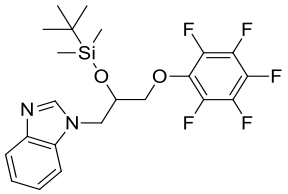
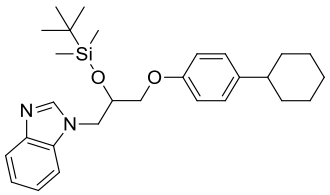
ตารางที่ 102 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 1 โดยใช้วิธีที่ 2

สาร	ลักษณะของสาร	% yield	^{1}H NMR
	ของเหลวใสไม่มีสี	97%	^{1}H NMR (400 MHz, CDCl3) **δ** 4.04 – 3.96 (m, 1H), 3.51 – 3.46 (m, 4H), 0.91 (s, 9H), 0.12 (s, 6H).

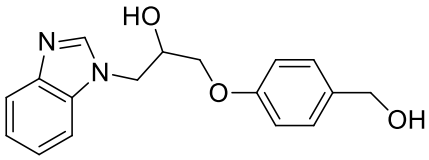
ตารางที่ 103 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้วิธีที่ 2

	
ลักษณะของสาร	ของเหลวสีเหลือง
% Yield	NaH = 45.97%, Cs_2CO_3 = 44.59%
% Overall yield	NaH = 21.28%, Cs_2CO_3 = 60.39%
^{1}H NMR	^{1}H NMR (400 MHz, CDCl3) **δ** 7.89 (s, 1H), 7.82 – 7.69 (m, 1H), 7.47 – 7.37 (m, 1H), 7.34 – 7.18 (m, 2H), 4.49 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 4.23 – 4.11 (m, 3H), 3.32 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 3.29 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 3.21 (dd, J = 10.5, 7.9 Hz, 1H), 0.79 (s, 9H), -0.11 (s, 3H), -0.40 (d, J = 8.7 Hz, 3H).

ตารางที่ 104 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 3 โดยใช้วิธีที่ 2

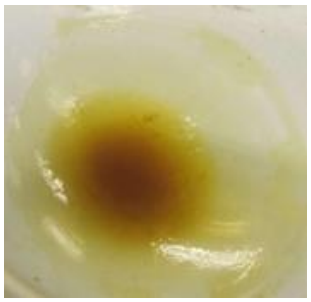
สาร	ลักษณะของสาร	% yield	Over all yield
	ของเหลวสีเหลือง	24.95%	11.13%
	ของเหลวสีเหลือง	7.05%	3.14%
	ของเหลวสีเหลือง	2.44%	1.08%
	ของเหลวสีเหลือง	18.45%	8.23%
	ของเหลวสีเหลือง	42.80%	19.08%

ตารางที่ 105 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้วิธีที่ 2



TB04

ลักษณะของสาร

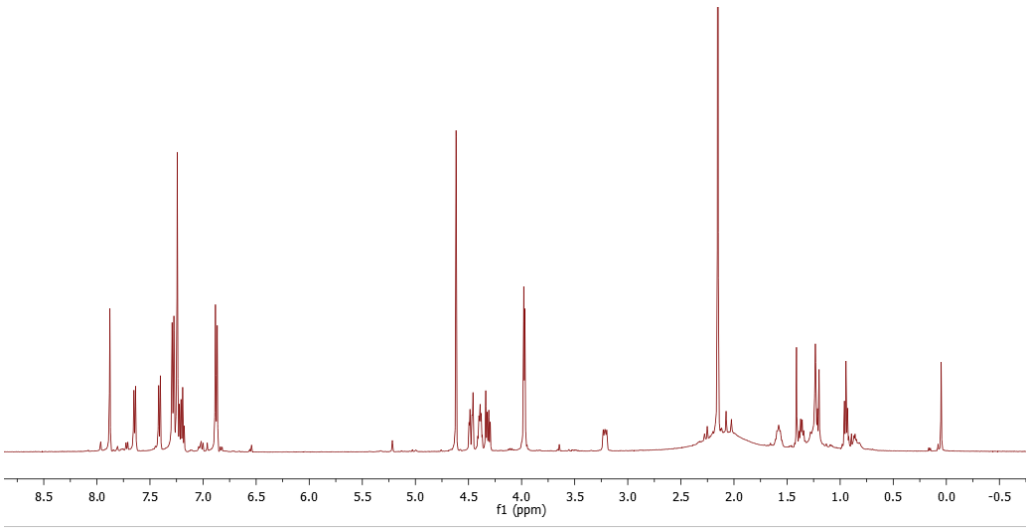


ของแข็งสีเหลือง

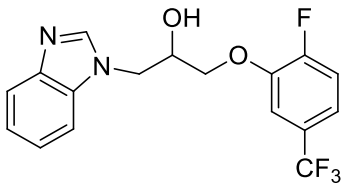
% Yield 24.95%

% Overall 11.13 %

^{1}H NMR



ตารางที่ 105 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้วิธีที่ 2 (ต่อ)



TB05

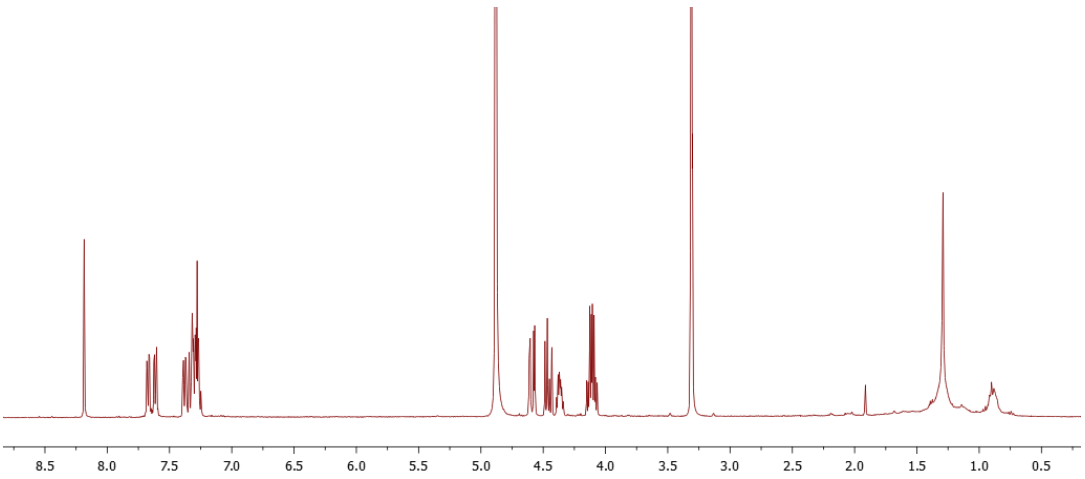
ลักษณะของสาร

ของแข็งสีเหลือง

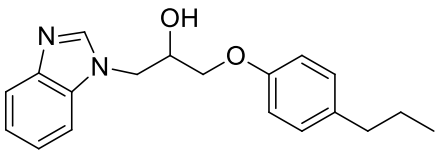
% Yield 73.58 %

% Overall 2.31 %

^{1}H NMR



ตารางที่ 105 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้วิธีที่ 2 (ต่อ)



TB06

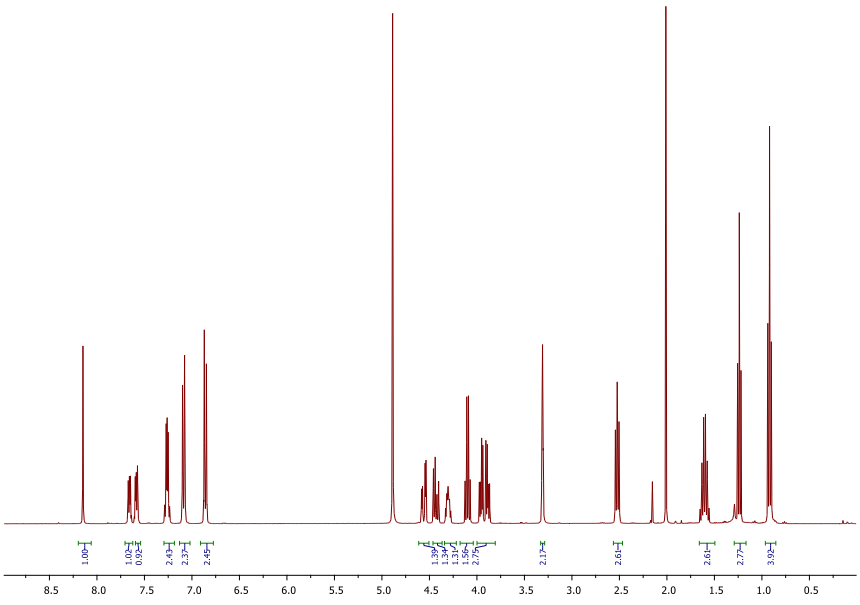
ลักษณะของสาร

ของแข็งสีเหลือง

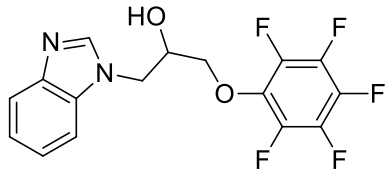
% Yield 29.00%

% Overall 8.00 %

^{1}H NMR



ตารางที่ 105 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้วิธีที่ 2 (ต่อ)



TB07

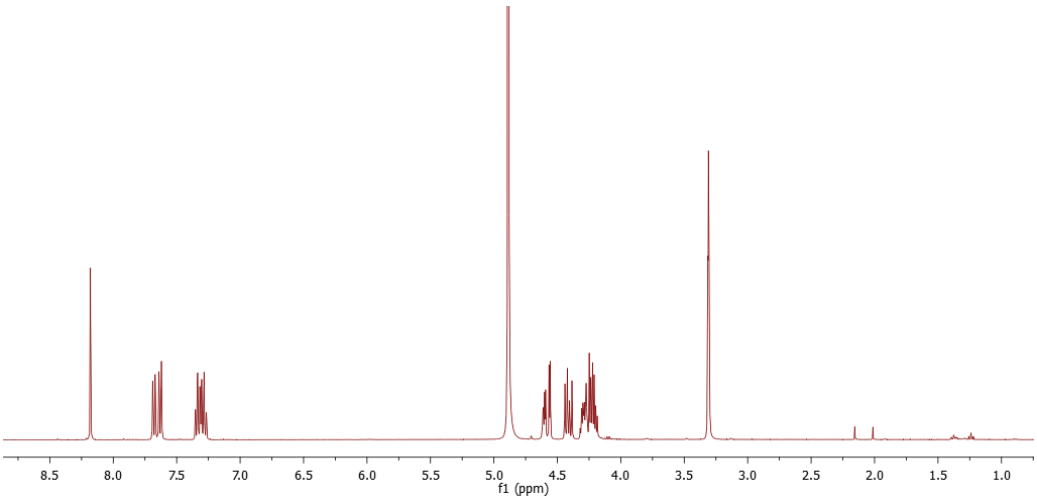
ลักษณะของสาร

ของแข็งสีขาว

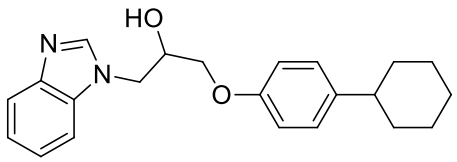
% Yield 51.03 %

% Overall 4.20 %

^{1}H NMR



ตารางที่ 105 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้วิธีที่ 2 (ต่อ)



TB08

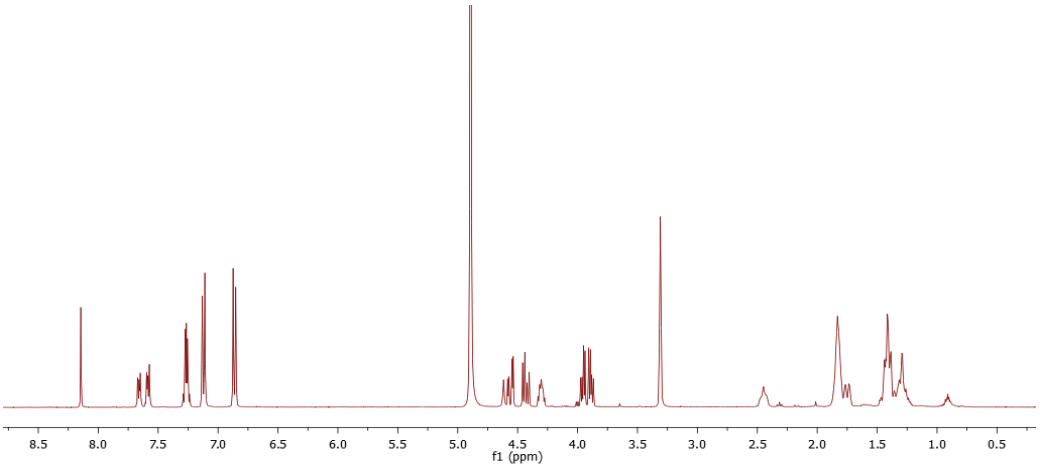
ลักษณะของสาร

ของแข็งสีขาว

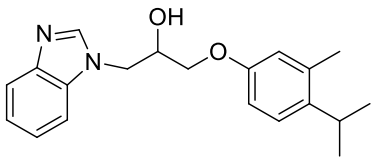
% Yield 87.17 %

% Overall 16.64 %

^{1}H NMR

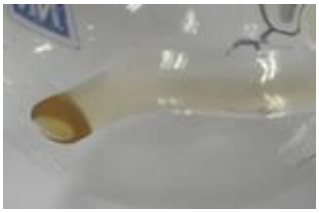


ตารางที่ 105 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้วิธีที่ 2 (ต่อ)



TB09

ลักษณะของสาร

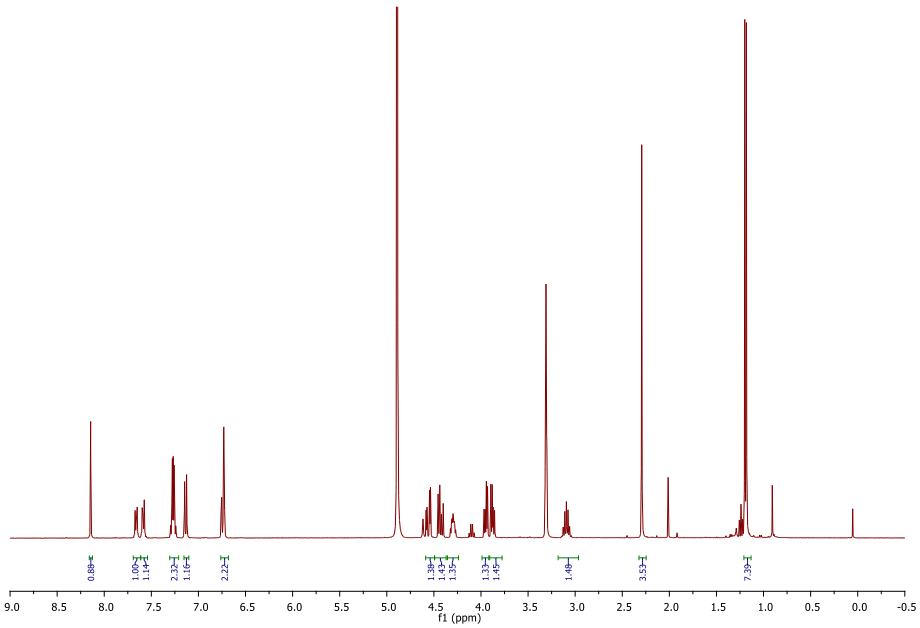


ของแข็งสีเหลือง

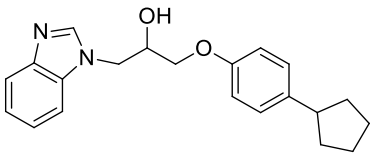
% Yield 35.00%

% Overall 9.00%

^{1}H NMR



ตารางที่ 105 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้วิธีที่ 2 (ต่อ)



TB10

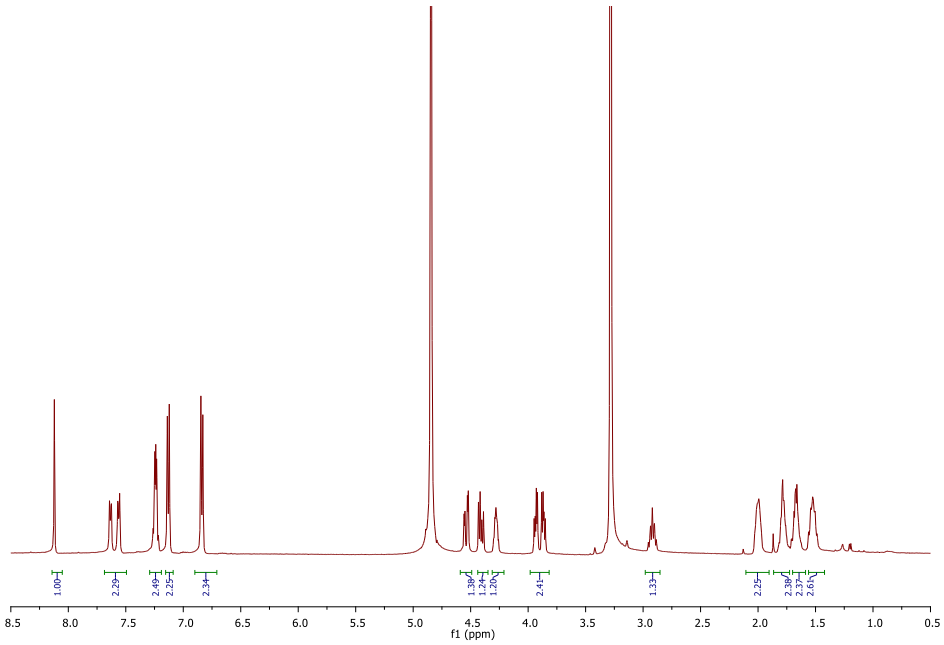
ลักษณะของสาร

ของแข็งสีขาว

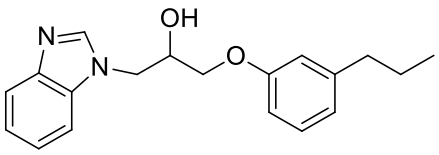
% Yield 63.00%

% Overall 24.00%

^{1}H NMR



ตารางที่ 105 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้วิธีที่ 2 (ต่อ)



TB11

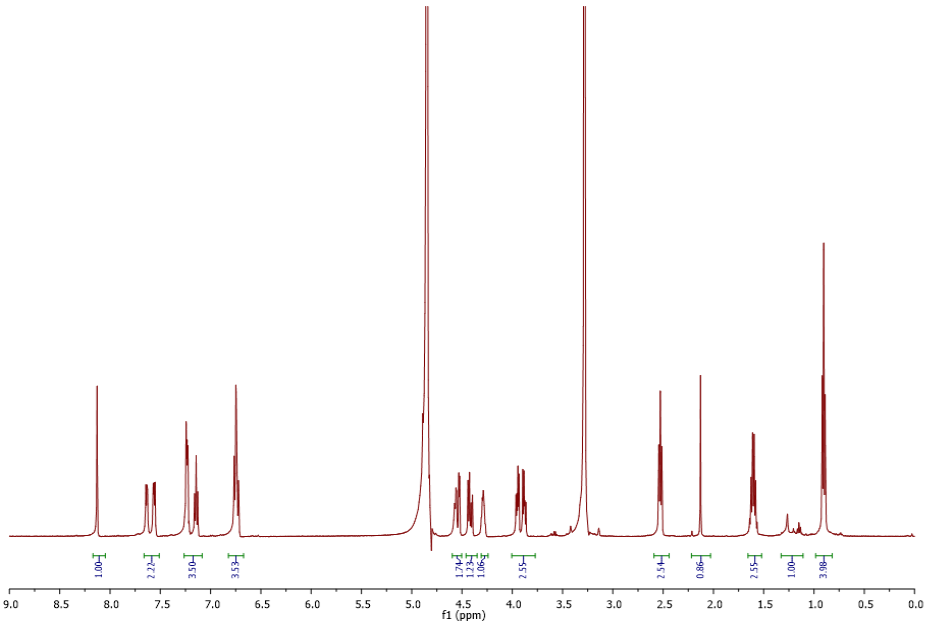
ลักษณะของสาร

ของแข็งสีขาว

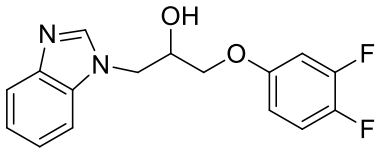
% Yield 69 %

% Overall 42 %

^{1}H NMR

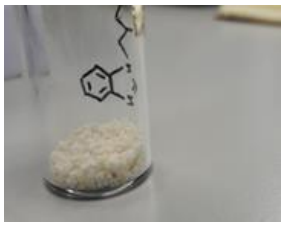


ตารางที่ 105 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole ในขั้นตอนที่ 4 โดยใช้วิธีที่ 2 (ต่อ)



TB12

ลักษณะของสาร

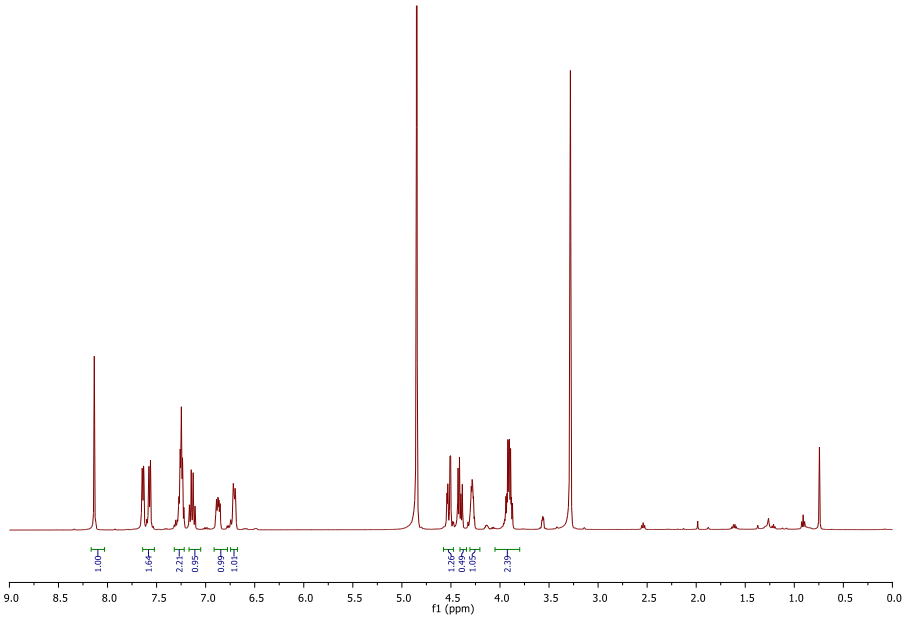


ของแข็งสีขาว

% Yield 78 %

% Overall 12 %

^{1}H NMR

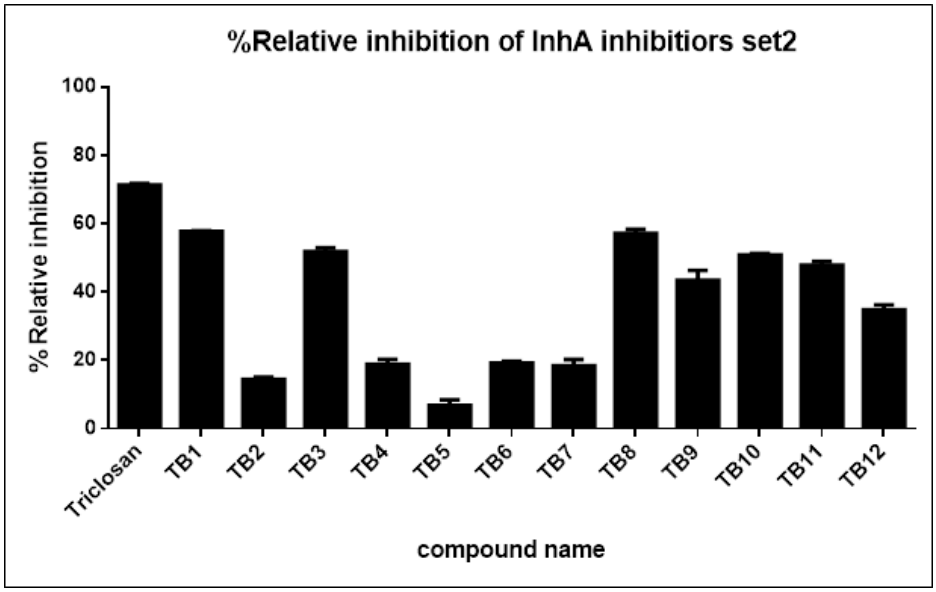


ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งที่ได้จากการสังเคราะห์

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งตัวใหม่จากการสังเคราะห์ แสดงดัง**ตารางที่ 106** ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้ การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ InhA ของสารที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้ง 12 โครงสร้างพบว่ามีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ InhA อยู่ในช่วง 6.72 ± 1.72 % ถึง 57.63 ± 0.25 % ที่ความเข้มข้นของสารยับยั้ง 1 μM ซึ่งพบว่ามีสารยับยั้งตัวใหม่ที่มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ InhA มากกว่า 50% จำนวน 4 โครงสร้างคือสารหมายเลข TB1, TB3, TB8 และสารหมายเลข TB10 ดังแสดงใน**รูปที่ 130**

ตารางที่ 106 การทดสอบ % relative inhibition ของเอนไซม์ InhA

สารหมายเลข	การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	
	% relative inhibition at 1 μM	MIC (μg/ml)
Triclosan	71.31±0.43	-
TB1	**57.63±0.25**	**50, 25**
TB2	14.34±0.70	50, 50
TB3	**51.79±1.10**	**12.5, 50**
TB4	18.84±1.42	>100
TB5	6.72±1.72	>100, >100
TB6	19.17±0.50	50, >100
TB7	18.41±1.82	50
TB8	**57.11±1.22**	**25**
TB9	43.31±2.97	50
TB10	**50.80±0.46**	**25**
TB11	47.79±1.11	>100
TB12	34.79±1.42	>100



รูปที่ 130 แสดงกราฟ % relative inhibition ของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ทั้ง 12 โครงสารที่ได้จากการสังเคราะห์

จากการศึกษารวบรวมข้อมูลทางโครงสร้างของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในกลุ่มของสารอนุพันธ์ Benzimidazole ที่คาดว่าจะออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรคจำนวน 70 โครงสร้าง ด้วยระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริง (Virtual screening) ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง (Molecular docking calculation) และวิธีการจำลองแบบเชิงพลวัตเชิงโมเลกุล (Molecular dynamics simulations) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อทำนายลักษณะการวางตัวและศึกษาอันตรกิริยาที่สำคัญของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA เพื่อออกแบบสารยับยั้งเชื้อวัณโรคตัวใหม่ เพื่อให้ได้สารที่เกิดอันตรกิริยาในการจับกับเอนไซม์ InhA ที่ดีขึ้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นข้อมูลที่สำคัญที่นำมาสู่การสังเคราะห์สารยับยั้งเชื้อวัณโรคในกลุ่มสารอนุพันธ์ Benzimidazole ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole จำนวน 8 โครงสร้าง ได้แก่ สารประกอบหมายเลข 01 05 11 15 18 32 46 และ 55 พร้อมทั้งพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Mass spectrometry และ Infrared Spectroscopy (IR)

ซึ่งจากการศึกษาพบว่าในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ Benzimidazole หมายเลข 05 32 และ 46 สามารถสังเคราะห์ได้โดยผ่านวิธีการสังเคราะห์ที่ 1 ซึ่งมีขั้นตอนในการสังเคราะห์ 2 ขั้นตอน โดยในการสังเคราะห์สารหมายเลข 05 32 และ 46 ให้ % Overall yield เท่ากับ 16.92%, 32.06% และ 62.08% ตามลำดับ ส่วนการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ หมายเลข 01 11 15 18 และ 55 สามารถสังเคราะห์ได้โดยผ่านวิธีการสังเคราะห์ที่ 2 ซึ่งมีขั้นตอนในการสังเคราะห์ 4 ขั้นตอน โดยในการสังเคราะห์สารหมายเลข 01 11 15 18 และ 55 ให้ % Overall yield เท่ากับ 2.31%, 4.20%, 0.84%, 16.64% และ 10.45% ตามลำดับ ซึ่งในการสังเคราะห์สารแต่ละโครงสร้างในขั้นตอนสุดท้ายของสารบางตัวจะได้สารที่เป็นของเหลว ซึ่งสามารถตกผลึกได้โดยใช้ เอตทิลอะซิเตต

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งด้วยระเบียบวิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (CoMSIA) ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4H)-yl) acetamide

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งด้วย ระเบียบวิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (CoMSIA) โดยศึกษาสมบัติทางโครงสร้าง คือ สนามสเตอริค สนามอิเล็กโตรสแตติก สนามไฮโดรโฟบิก สนามไฮโดรเจนโดเนอร์ สนามไฮโดรเจนแอคเซปเตอร์ และค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเชื้อเอนไซม์ InhA ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)-acetamide จำนวน 26 โครงสร้าง โดยแยกเป็นชุดสร้างแบบจำลอง (training set) จำนวน 23 โครงสร้าง และชุดทดสอบ (test set) 3 โครงสร้าง ดังตารางที่ 4.10 ทำการวิเคราะห์ด้วยระเบียบวิธี non-cross-validation (r^2_{cv} หรือ Q^2) และ cross-validation (R^2 หรือ r^2_{nv}) พบว่า แบบจำลอง CoMSIA ที่ดีที่สุด คือ แบบจำลองที่มีค่า Q^2 และค่า R^2 เท่ากับ 0.676 และ 0.995 ตามลำดับ โดยมีค่า components เท่ากับ 6 ซึ่งมีอัตราส่วนการมีส่วนร่วมของสนามสเตอริก สนามอิเล็กโตรสแตติก สนามไฮโดรโฟบิก และสนามไฮโดรเจนโดเนอร์ เป็น 0.086, 0.370, 0.255 และ 0.290 ตามลำดับ ดังแสดงใน**ตารางที่ 107** ผลการศึกษานี้ ค่าความสามารถในการทำนาย (predictive ability) ของแบบจำลองที่ได้มากกว่า 0.600 แสดงให้เห็นว่าแบบจำลอง CoMSIA ที่ได้นี้ สามารถอธิบายความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)-acetamide ในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถนำไปใช้ในการออกแบบสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)-acetamide ตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น

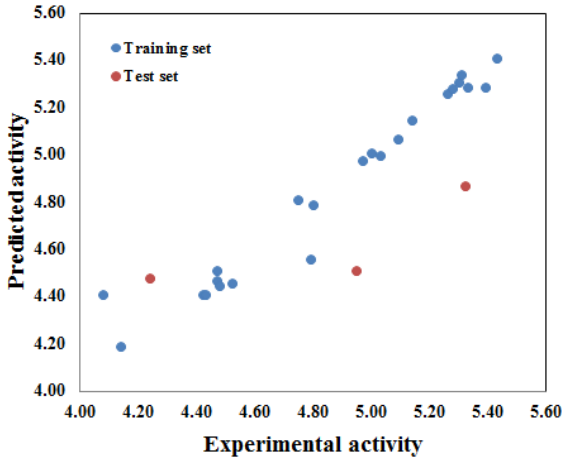
ตารางที่ 107 ผลทางสถิติของแบบจำลอง CoMSIA ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4H)-yl) acetamide

model	Statistical parameters						Fraction
	Q^2	R^2	N	S	SEE	F	
S/E	0.312	0.989	5	0.414	0.051	228.397	0.219, 0.781
S/H	0.371	0.993	6	0.386	0.041	349.701	0.274, 0.726
S/HA	0.468	0.975	6	0.355	0.076	99.533	0.244, 0.756
S/HD	0.171	0.952	6	0.443	0.106	50.033	0.442, 0.558
S/E/H	0.299	0.990	4	0.421	0.050	236.815	0.127, 0.507, 0.366
S/E/HA	0.671	0.991	6	0.279	0.047	266.411	0.120, 0.439, 0.442
S/E/HD	0.618	0.987	6	0.301	0.054	197.295	0.152, 0.499, 0.349
S/E/H/HD	**0.676**	**0.995**	**6**	**0.277**	**0.034**	**511.562**	**0.086, 0.370, 0.255, 0.290**
S/E/H/HA	0.551	0.993	6	0.326	0.040	368.256	0.088, 0.333, 0.250, 0.329
S/E/H/HD/HA	0.697	0.996	6	0.268	0.032	563.619	0.067, 0.274, 0.198, 0.236, 0.225

หมายเหตุ : N คือ Optimum number of component, S คือ Standard error of prediction SEE คือ Standard error of estimate, F คือ F Value, S คือ steric field, E คือ electrostatic field, H คือ Hydrophobic field, HD คือ Hydrogen Donor field และ HA คือ Hydrogen Acceptor field

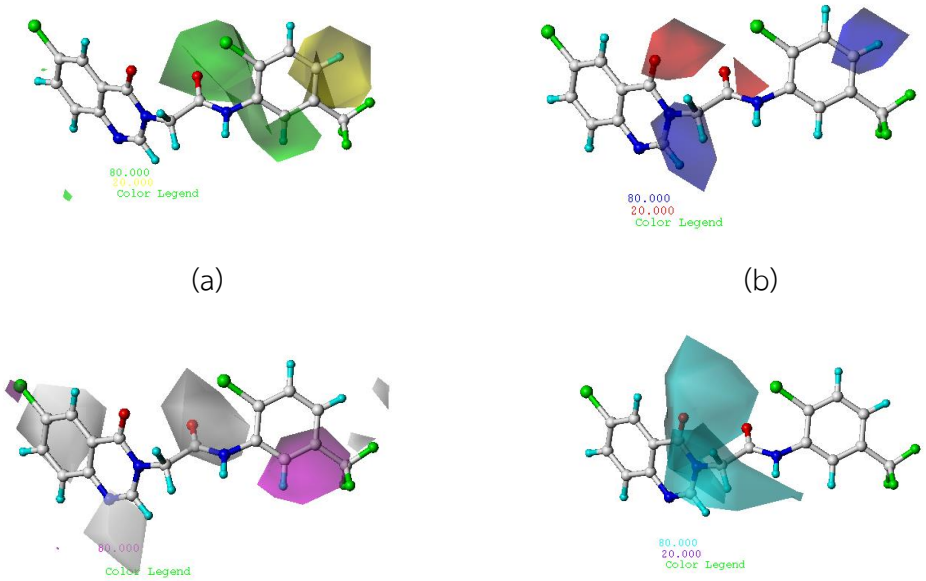
การทดสอบความน่าเชื่อถือของแบบจำลอง CoMSIA ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide

จากแบบจำลอง CoMSIA ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ที่สร้างขึ้นมีค่าทางสถิติที่ยอมรับได้ เมื่อนำเอาแบบจำลองที่ได้ไปทำนายค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง โดยใช้แบบจำลอง CoMSIA ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ที่ดีที่สุด ก็พบว่า ผลที่ได้จากการทำนายให้ค่าค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ที่ใกล้เคียงกับผลจากการทดลอง แสดงโดยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจากการทดลองและการทำนาย ดังแสดงใน**รูปที่ 131** จากกราฟความสัมพันธ์จะเห็นได้ว่าจุดหรือค่าที่พลอตอยู่ในช่วงเส้นตรง 45 องศา ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าแบบจำลอง QSAR ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide มีความน่าเชื่อถือได้ในการทำนายค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจากการคำนวณได้อย่างถูกต้อง



รูปที่ 131 กราฟที่พลอตระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับค่ากัมมันตภาพยับยั้งที่ได้จากการคำนวณของสารอนุพันธ์2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ด้วยวิธี CoMSIA

การวิเคราะห์เปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (CoMSIA) ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(*4H*)-yl) acetamide

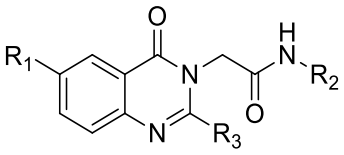


(a) (b)

(c) (d)

รูปที่ 132 แผนภาพคอนทัวร์ CoMSIA ในสนามต่างๆ

(a) สนามสเตอริก (b) แสดงสนามอิเล็กโตรสแตติก
(c) แสดงสนามไฮโดรโฟบิก (d) แสดงสนามโฮโดรเจนโดเนอร์



โครงสร้างทั่วไปของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)acetamide

ความต้องการทางโครงสร้างสำหรับหมู่แทนที่ R_1

จากแผนภาพคอนทัวร์พบว่าที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ไม่มีคอนทัวร์ของสนามสเตอริก สนามอิเล็กโตร-สแตติก และสนามโฮโดรเจนโดเนอร์ ขึ้นที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_1 ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide แต่จะพบว่ามีคอนทัวร์จากสนามคอนทัวร์ไฮโดรโฟบิก พบว่ามีคอนทัวร์สีขาวขนาดปานกลางขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง R_1 ดังนั้น ควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูงหรือหมู่แทนที่ที่ละลายน้ำ จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น

ความต้องการทางโครงสร้างสำหรับหมู่แทนที่ R_2

จากแผนภาพคอนทัวร์สนามสเตอริกของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide พบว่ามีคอนทัวร์สีเขียวขนานใหญ่ขึ้นรอบๆบริเวณที่ตำแหน่ง R_2 และมีคอนทัวร์สีเหลืองขนาดปานกลางบริเวณตำแหน่ง R_2 ซึ่งบ่งชี้ว่า ที่บริเวณตำแหน่ง R_2 นั้นต้องการความต้องการความเป็นสเตอริกสูง ชอบที่จะมีหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่ มีความเกะกะสูง จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น แต่ก็ไม่ควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่มากเกินไป เพราะ ดูได้จากมีคอนทัวร์สีเหลืองขนาดปานกลางขึ้น ตรงบริเวณตำแหน่ง R_2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าก็ไม่ควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่มากนัก จากสนามอิเล็กโตร-สแตติก พบว่ามีคอนทัวร์สีน้ำเงินขนาดปานกลางขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง R_2 ซึ่งบ่งชี้ว่าต้องการการกระจายตัวของอิเล็กตรอนน้อย ดังนั้นจึงต้องการหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอน จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น จากสนามคอนทัวร์ไฮโดรโฟบิก พบว่ามีคอนทัวร์สีชมพูขนาดปานกลางขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง R_2 ดังนั้นควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงหรือหมู่แทนที่ที่ไม่ละลายน้ำ จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น

ความต้องการทางโครงสร้างสำหรับหมู่แทนที่ R_3

จากแผนภาพคอนทัวร์สนามอิเล็กโตรสแตติกของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide พบว่ามีคอนทัวร์สีน้ำเงินขนาดปานกลางขึ้นที่บริเวณหมู่แทนที่ตรงตำแหน่ง R_3 ซึ่งบ่งชี้ว่า บริเวณดังกล่าวนั้น มีความต้องการอิเล็กตรอน แสดงว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_3 ซึ่งบ่งชี้ว่าต้องการการกระจายตัวของอิเล็กตรอนน้อย ดังนั้นจึงต้องการหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอน จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น จากสนามคอนทัวร์ไฮโดรโฟบิก พบว่ามีคอนทัวร์สีขาวขนาดปานกลางขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง R_3 ดังนั้น ควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูงหรือหมู่แทนที่ที่ละลายน้ำ จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น จากสนามคอนทัวร์โฮโดรเจนโดเนอร์ พบว่ามีคอนทัวร์สีฟ้าขนาดใหญ่ขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง R_3 ดังนั้น ควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีความต้องการรับโปรตอน จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งด้วยระเบียบวิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (CoMSIA) ของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งด้วย ระเบียบวิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (CoMSIA) โดยศึกษาสมบัติทางโครงสร้าง คือ สนามสเตอริค สนามอิเล็กโตรสแตติก สนามไฮโดรโฟบิก สนามไฮโดรเจนโดเนอร์ สนามไฮโดรเจนแอคเซปเตอร์ และค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเชื้อเอนไซม์ InhA ของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones จำนวน 27 โครงสร้าง โดยแยกเป็นชุดสร้างแบบจำลอง (training set) จำนวน 23 โครงสร้าง และชุดทดสอบ (test set) 4 โครงสร้าง ดังตารางที่ 3.2 ทำการวิเคราะห์ด้วยระเบียบวิธี non-cross-validation (r^2_{cv} หรือ Q^2) และ cross-validation (R^2 หรือ r^2_{nv}) พบว่า แบบจำลอง CoMSIA ที่ดีที่สุด คือ แบบจำลองที่มีค่า Q^2 และค่า R^2 เท่ากับ 0.620 และ 0.994 ตามลำดับ โดยมีค่า components เท่ากับ 6 ซึ่งมีอัตราส่วนการมีส่วนร่วมของสนามสเตอริก สนามอิเล็กโตรสแตติก สนามไฮโดรโฟบิก และไฮโดรเจนแอคเซปเทอร์ เป็น 0.136, 0.313, 0.337 และ 0.215 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้ ค่าความสามารถในการทำนาย (predictive

ability) ของแบบจำลองที่ได้มากกว่า 0.600 แสดงให้เห็นว่าแบบจำลอง CoMSIA ที่ได้นี้ สามารถอธิบายความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถนำไปใช้ในการออกแบบสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น

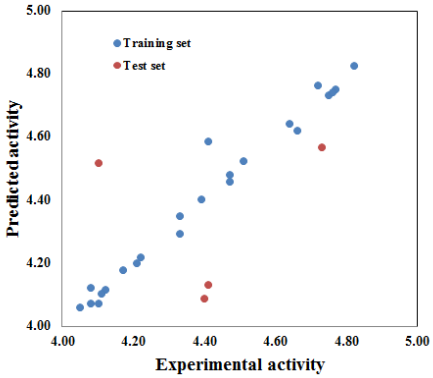
ตารางที่ 108 ผลทางสถิติของแบบจำลอง CoMSIA ของอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones

Model	Statistical parameters						Fraction
	Q^2	R^2	N	S	SEE	F	
S/E	0.588	0.882	4	0.192	0.103	31.740	0.295, 0.705
S/H	0.393	0.864	3	0.227	0.107	38.202	0.307, 0.693
S/HA	0.115	0.410	1	0.250	0.212	13.882	0.421, 0.579
S/HD	0.594	0.983	6	0.203	0.042	141.633	0.311, 0.689
S/E/H	0.709	0.995	6	0.172	0.022	529.766	0.179, 0.416, 0.405
S/E/HA	0.498	0.883	4	0.212	0.102	529.766	0.186, 0.470, 0.344
S/E/HD	0.602	0.963	5	0.195	0.059	84.273	0.159, 0.424, 0.417
S/E/H/HD	0.581	0.998	6	0.206	0.015	1166.165	0.114, 0.294, 0.311, 0.281
S/E/H/HA	**0.620**	**0.994**	**6**	**0.197**	**0.025**	**399.353**	**0.136, 0.313, 0.337, 0.215**
S/E/H/HD/HA	0.515	0.996	5	0.215	0.019	693.897	0.092, 0.238, 0.267,0.245, 0.158

หมายเหตุ : N คือ Optimum number of component, S คือ Standard error of prediction SEE คือ Standard error of estimate, F คือ F Value, S คือ steric field, E คือ electrostatic field, H คือ Hydrophobic field, HD คือ Hydrogen Donor field และ HA คือ Hydrogen Acceptor field

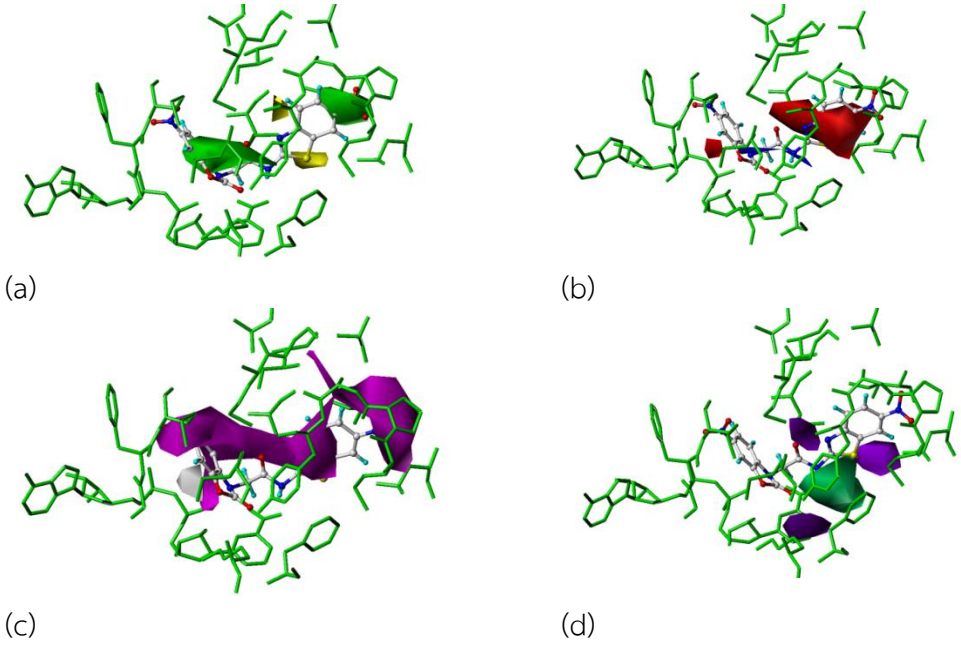
การทดสอบความน่าเชื่อถือของแบบจำลอง CoMSIA ของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones

จากแบบจำลอง CoMSIA ของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ที่สร้างขึ้นมีค่าทางสถิติที่ยอมรับได้ เมื่อนำเอาแบบจำลองที่ได้ไปทำนายค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง โดยใช้แบบจำลอง CoMSIA ของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ที่ดีที่สุดก็พบว่าผลที่ได้จากการทำนายให้ค่าค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ที่ใกล้เคียงกับผลจากการทดลอง โดยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจากการทดลองและการทำนาย ดังแสดงใน**รูปที่ 133** ซึ่งจากกราฟความสัมพันธ์จะเห็นได้ว่าจุดหรือค่าที่พลอตอยู่ในช่วงเส้นตรง 45 องศา ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าแบบจำลอง QSAR ของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones มีความน่าเชื่อถือได้ในการทำนายค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจากการคำนวณได้อย่างถูกต้อง



รูปที่ 133 กราฟที่พลอตระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับค่ากัมมันตภาพยับยั้งที่ได้จากการคำนวณของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ด้วยวิธี CoMSIA

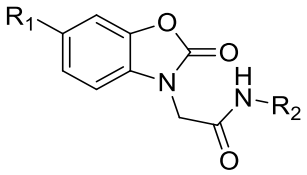
การวิเคราะห์เปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (CoMSIA) ของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones



(a) (b)

(c) (d)

รูปที่ 134 แผนภาพคอนทัวร์ CoMSIA ในสนามต่างๆ
(a) สนามสเตอริก (b) แสดงสนามอิเล็กโตรสแตติก
(c) แสดงสนามไฮโดรโฟบิก (d) แสดงสนามโฮโดรเจนแอคเซปเตอร์



โครงสร้างทั่วไปของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones

ความต้องการทางโครงสร้างสำหรับหมู่แทนที่ R_1

จากแผนภาพคอนทัวร์พบว่าที่ตำแหน่งหมู่แทนนี่ R_1 ไม่มีคอนทัวร์ของสนามสเตอริก สนามอิเล็กโตร-สแตติก และสนามโฮโดรเจนโดเนอร์ ขึ้นที่ตำแหน่งหมู่แทนนี่ R_1 ของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones แต่จะพบว่ามีคอนทัวร์จากสนามคอนทัวร์ไฮโดรโฟบิก พบว่ามีคอนทัวร์สีม่วงขนาดใหญ่ขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง R_1 ดังนั้น ควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงหรือหมู่แทนที่ที่ไม่ละลายน้ำ จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น

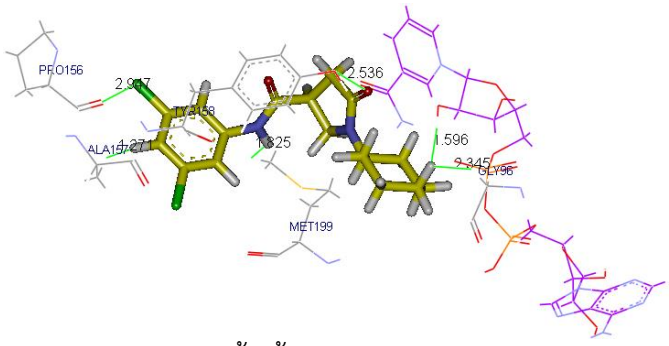
ความต้องการทางโครงสร้างสำหรับหมู่แทนที่ R_2

จากแผนภาพคอนทัวร์สนามสเตอริกของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones พบว่ามีคอนทัวร์สีเขียวขนานปานกลางขึ้นบริเวณที่ตำแหน่ง R_2 และมีคอนทัวร์สีเหลืองขนาดเล็กบริเวณตำแหน่ง R_2 ซึ่งบ่งชี้ว่า ที่บริเวณตำแหน่ง R_2 นั้นต้องการความต้องการความเป็นสเตอริกสูง ชอบที่จะมีหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่ มีความเกะกะสูง จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น แต่ก็ไม่ควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่มากเกินไป เพราะ ดูได้จากมีคอนทัวร์สีเหลืองขนาดเล็กขึ้น ตรงบริเวณตำแหน่ง R_2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าก็ไม่ควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่มากนัก จากสนามอิเล็กโตร-สแตติก พบว่ามีคอนทัวร์สีแดงขนาดใหญ่ขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง R_2 ซึ่งบ่งชี้ว่ามีความต้องการอิเล็กตรอน ดังนั้นจึงต้องการหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น จากสนามคอนทัวร์ไฮโดรโฟบิก พบว่ามีคอนทัวร์สีชมพูขนาดใหญ่ขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง R_2 ดังนั้น ควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงหรือหมู่แทนที่ที่ไม่ละลายน้ำ จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น จากสนามคอนทัวร์โฮโดรเจนแอคเซปเตอร์ พบว่ามีคอนทัวร์สีม่วงขนาดปานกลางขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง R_3 ดังนั้นควรจะเป็นหมู่แทนที่ที่มีความต้องการไม่รับโปรตอน จึงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น

เปรียบเทียบอันตรกิริยาของสารยับยั้งเชื้อวัณโรค ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม ที่ได้จากโครงสร้างผลึกทางเอ็กซเรย์และโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณ

จากการศึกษาได้เปรียบเทียบการจำลองระบบระหว่างโครงสร้างเอ็กซเรย์ กับโครงสร้างที่ได้จากการจำลองระบบด้วยวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งภายในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ซึ่งจาก**รูปที่ 135** แสดงลักษณะในการวางตัวของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide และสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ในโพรงการจับของโครงสร้างจากเอ็กซเรย์ กับที่ได้จากการทำนายตำแหน่งการวางตัว ซึ่งพบว่า ไม่มีอันตรกิริยาที่สำคัญใดๆต่อการยับยั้งเอนไซม์เชื้อวัณโรคของอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)acetamide และสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones แต่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกและอันตรกิริยาชนิดไฮโดรฟิลิกกับกรดอะมิโนและ Nicotinamide Ribose ของ NADH ซึ่งทำหน้าที่

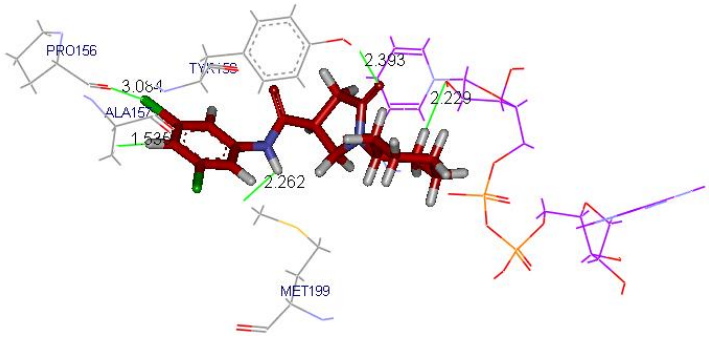
เป็นโคแฟกเตอร์ในการเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการชีวะสังเคราะห์กรดไขมันของเชื้อ *Mycobacterium Tuberculosis* ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบอันตรกิริยาระหว่างโครงสร้าง X-ray และโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณโมเคิวลาร์ด็อกกิ้งของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide และสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones กับโพรงการจับของเอนไซม์ InhA จากผลึก X-ray (PDB Code: 2x23) จากโครงสร้างผลึกเอ็กซเรย์ พบว่า ที่อะตอมไฮโดรเจนของหมู่ไซโคลเฮกเซนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของ Nicotinamide Ribose ของ NADH เกิดอันตรกิริยา Van der waal โดยมีระยะห่างเท่ากับ 1.596 อังสตรอม ดังแสดงใน**รูปที่ 135** นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ได้แก่ ที่อะตอมไฮโรเจนของของหมู่ไซโคลเฮกเซนจะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนเมตไทโอนีนที่ตำแหน่ง 161 (Met161), กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับ 1,3-dichlorobenzene ได้แก่ ที่อะตอมคลอไรด์ของของหมู่ 1,3-dichlorobenzene จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนโปรลีนที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) และที่อะตอมไฮโดรเจนของของหมู่ 1,3-dichlorobenzene จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) โดยมีระยะห่าง 2.947 และ 1.271 อังสตรอม ตามลำดับ, กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับ pyrrolidin-2-one ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของของหมู่ pyrrolidin-2-one จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) โดยมีระยะห่าง 2.536 อังสตรอม และกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับเอไมด์ ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของของหมู่เอไมด์ จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 199 (Met199) โดยมีระยะห่าง 1.825 อังสตรอม และที่อะตอมไฮโรเจนของของหมู่ไซโคลเฮกเซนจะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรฟิลิกกับกรดอะมิโนไกลซีนที่ตำแหน่ง 96 (Gly96) โดยมีระยะห่าง 2.345 อังสตรอม



รูปที่ 135 โครงสร้าง X-ray ของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค

จากโครงสร้างผลึกเอ็กซเรย์ พบว่า ที่อะตอมไฮโดรเจนของหมู่ไซโคลเฮกเซนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของ Nicotinamide Ribose ของ NADH เกิดพันธะไฮโดรเจนโดยมีระยะห่างเท่ากับ 2.229 อังสตรอม ดังแสดงใน**รูปที่ 136** นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ได้แก่ ที่อะตอมไฮโรเจนของของหมู่ไซโคลเฮกเซนจะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนเมตไทโอนีนที่ตำแหน่ง 103 (Met103) และกรดอะมิโนเมตไทโอนีนที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่าง 2.266 และ 2.278 อังสตรอม ตามลำดับกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับ 1,3-dichlorobenzene ได้แก่ ที่อะตอมคลอไรด์ของของหมู่ 1,3-dichlorobenzene จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนโปรลีนที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) และที่อะตอมไฮโดรเจนของของหมู่ 1,3-dichlorobenzene จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนอะ

ลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) โดยมีระยะห่าง 3.084 และ 1.535 อังสตรอม ตามลำดับ กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับ pyrrolidin-2-one ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของของหมู่ pyrrolidin-2-one จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) โดยมีระยะห่าง 2.393 อังสตรอม และกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับเอไมด์ ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของของหมู่เอไมด์ จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 199 (Met199) โดยมีระยะห่าง 2.262 อังสตรอม

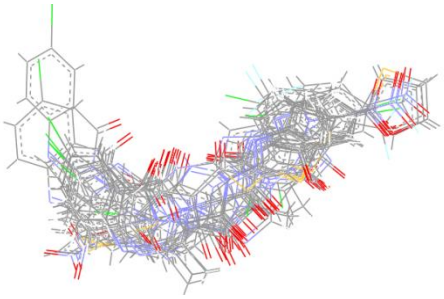


รูปที่ 136 โครงสร้างจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค

จากการเปรียบเทียบระยะห่างระหว่างอะตอมของสารยับยั้งวัณโรคกับกรดอะมิโนในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค พบว่ามีอันตรกิริยาที่เหมือนกัน และมีระยะห่างที่ใกล้เคียงกันเกือบทุกตัว จากค่าที่ได้ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งและพารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษานั้นมีความน่าเชื่อถือในระดับหนึ่งในการทำนายตำแหน่งการจัดวางตัวของสารยับยั้งเชื้อวัณโรค ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีการนี้ไปใช้ในการทำนายรูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)acetamide และสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ที่ใช้ในการศึกษา

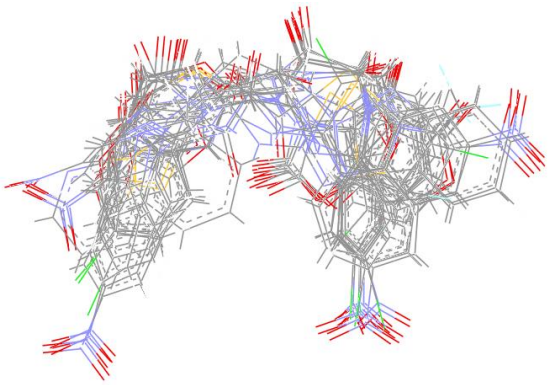
การทำนายตำแหน่งการวางตัวของอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)acetamide และสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones

ผลจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค พบว่ารูปแบบการวางตัวของสารยับยั้งอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide แสดงดัง**รูปที่ 137** ซึ่งแต่ละโมเลกุลจะมีลักษณะการวางตัวในตำแหน่งเดียวและซ้อนทับกันในโมเลกุลส่วนใหญ่ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide แต่มีบางโมเลกุลที่มีการวางตัวไม่ซ้อนทับกันกับโมเลกุลส่วนใหญ่ ได้แก่ สารหมายเลข 1, 6, 7, 8, 13 และ 18 เนื่องจากว่าชุดข้อมูลนี้มีความแตกต่างกันของหมู่แทนที่ในตำแหน่งต่างๆอยู่มาก จึงทำให้มีการวางตัวของโมเลกุลได้ไม่ดีนัก



รูปที่ 137 การวางตัวของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide จำนวน 26 โครงสร้าง

ผลจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค พบว่ารูปแบบการวางตัวของสารยับยั้งอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones แสดงดัง**รูปที่ 138** ซึ่งแต่ละโมเลกุลจะมีลักษณะการวางตัวในตำแหน่งเดียวและซ้อนทับกันในโมเลกุลส่วนใหญ่ของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones แต่มีบางโมเลกุลที่มีการวางตัวไม่ซ้อนทับกันกับโมเลกุลส่วนใหญ่ ได้แก่ สารหมายเลข 6, 12, 14, 16 และ 19 เนื่องจากว่าชุดข้อมูลนี้มีความแตกต่างกันของหมู่แทนที่ในตำแหน่งต่างๆอยู่มาก จึงทำให้มีการวางตัวของโมเลกุลได้ไม่ดีนัก



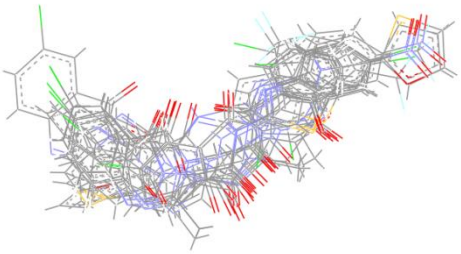
รูปที่ 138 การวางตัวของสารอนุพันธ์ benzo[d]oxazol-2(3H)-ones จำนวน 27 โครงสร้าง

การวิเคราะห์อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)acetamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค

ในการศึกษาอันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค ซึ่งได้จากวิธีการคำนวณคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง ได้แบ่งการศึกษาอันตรกิริยาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สารที่มีประสิทธิภาพสูงและสารที่มีประสิทธิภาพต่ำ โดยใช้ค่าร้อยละในการยับยั้งเป็นค่ากำหนดกลุ่มของสารประกอบโดยสารที่มีประสิทธิภาพสูงจะมีค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงมากกว่า 50.00 โดยสารที่มีประสิทธิภาพต่ำจะมีค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงต่ำกว่า 50.00

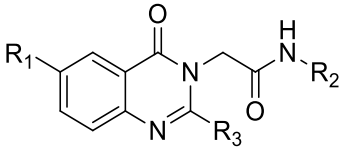
สารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)acetamide

สารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค ซึ่งมีค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงมากกว่า 50.00 จำนวน 18 โครงสร้าง ได้แก่ 1, 26, 22, 11, 3, 2, 9, 23, 12, 15, 8, 13, 16, 24, 15, 4, 6 และ 10 ดังแสดงใน**ตารางที่ 109** จากการศึกษารูปแบบการวางตัวของสารในกลุ่มนี้พบว่ามีรูปแบบการจับและตำแหน่งการวางตัวที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 139 และได้สรุปอันตรกิริยาทั้งหมดของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ในกลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค แสดงใน**ตารางที่ 109**



รูปที่ 139 รูปแบบการวางตัวของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4H)-yl) acetamide ในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค

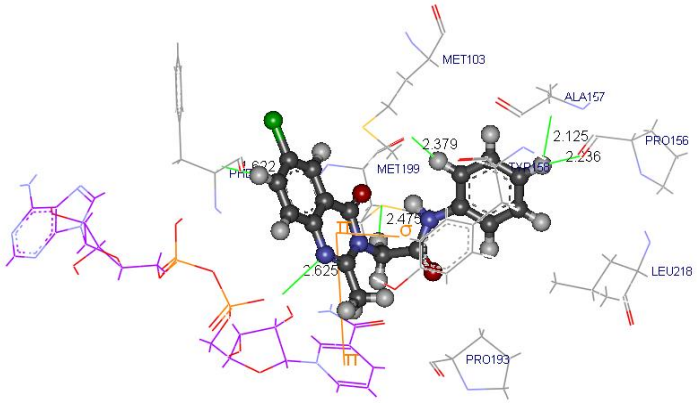
ตารางที่ 109 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide และค่าร้อยละ ในการยับยั้งอยู่ในช่วงมากกว่า 50.00 ของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง จำนวน 18 โครงสร้าง



No.	R_1	R_2	R_3	MIC (μM)	% of InhA inhibition at 10 μM
1	-H	Phenyl	-H	11.18	52.16
26	-Cl	6-nitro-2-benzothiazolyl	$-CH_3$	58.16	54.12
22	-Cl	2-benzothiazolyl	-H	33.70	54.56
11	-H	2-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	$-CH_3$	15.79	56.12
3	-H	2-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	-H	8.18	58.12
2	-Cl	Phenyl	-H	4.97	58.34
9	-H	Phenyl	$-CH_3$	10.65	60.12
23	-Cl	2-benzothiazolyl	$-CH_3$	16.24	60.32
12	-Cl	2-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	$-CH_3$	7.26	62.12

No.	R_1	R_2	R_3	MIC (μM)	% of InhA inhibition at 10 μM
15	-H	2-thiophenylmethyl	$-CH_3$	9.97	68.16
8	-Cl	2-thiophenylmethyl	-H	9.36	68.90
13	-H	2-furylmethyl	$-CH_3$	84.08	70.12
16	-Cl	2-thiophenylmethyl	$-CH_3$	17.96	70.16
24	-H	6-nitro-2-benzothiazolyl	-H	4.09	72.18
14	-Cl	2-furylmethyl	$-CH_3$	4.70	78.12
4	-Cl	2-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	-H	3.74	80.12
6	-Cl	2-furylmethyl	-H	4.91	82.43
10	-Cl	Phenyl	$-CH_3$	4.76	88.12

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดคือ สารหมายเลข 10 ซึ่งมีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM คือ 88.12 มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังใน**รูปที่ 140** พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ พันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮโดรเจนของฟีนิลกับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) มีระยะห่าง 2.236 อังสตรอม เกิดอันตรกิริยาชนิดไพ-ไพ Nicotimamide Ribose ของ NADH และเกิดอันตรกิริยาชนิดโพ-ซิกมา ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนเมไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) กับวงอะโรมาติก B มีระยะหาง 1.448 อังสตรอม นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 97 (The97), กรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 98 (Met98) และกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่าง 1.622, 2.194 และ 1.779 อังสตรอม ตามลำดับ เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมซัลเฟอร์ของกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 199 (Met199) และกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่ตำแหน่ง R_2 จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของฟีนิลกับกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 103 (Met103) และกรดอะมิโนฟินิลอะลานีนที่ตำแหน่ง 157 (Phe157) โดยมีระยะห่างเท่ากับ 2.379 และ 2.125 อังสตรอม ตามลำดับ อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก B จะเกิดอันตรกิริยากับอะตอมไนโตรเจนกับ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 2.625 อังสตรอม

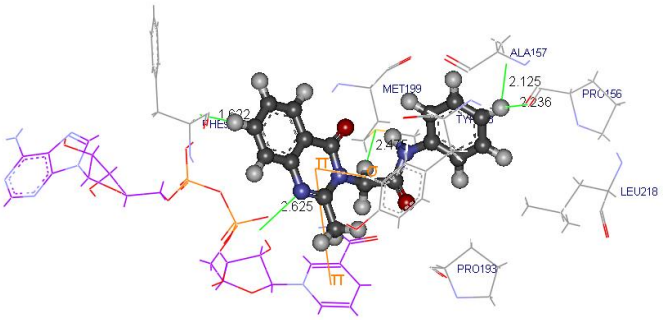


รูปที่ 140 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4H)-yl) acetamide สารหมายเลข 10 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ผลของหมู่แทนที่ R_1

เมื่อพิจารณาสารหมายเลข 9 ซึ่งมีความเหมือนกันทางโครงสร้างกับสารหมายเลข 10 ซึ่งเป็นสารที่มีมีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุด แตกต่างกันเฉพาะหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_1 เท่านั้น พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮโดรเจนของฟีนิลกับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) มีระยะห่าง 2.236 อังสตรอม เกิดอันตรกิริยาชนิดโพ-ไพ Nicotimamide Ribose ของ NADH และเกิดอันตรกิริยาชนิดโพ-ซิกมา ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนเมไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) กับวงอะโรมาติก B ระยะทาง 1.448 อังสตรอม นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 97 (The97), กรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 98 (Met98) และกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่าง 1.622, 2.194 และ 1.779 อังสตรอม ตามลำดับ เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมซัลเฟอร์ของกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 199 (Met199) และกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่ตำแหน่ง R_2 จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของฟีนิลกับกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) โดยมีระยะห่างเท่ากับ 2.125 อังสตรอม อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก B จะเกิดอันตรกิริยากับอะตอมไนโตรเจนกับ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 2.625 อังสตรอม

สำหรับในส่วนของอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 103 (Met103) ของวงฟีนิลที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 ก็พบว่ามีเพียงสารหมายเลข 10 เท่านั้นที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยมีระยะห่าง 2.379 อังสตรอม ซึ่งสารหมายเลข 9 มีหมู่แทนที่ R_1 คือ หมู่ไฮโดรเจน สารหมายเลข 10 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดมีหมู่แทนที่ R_1 คือ หมู่คลอไรด์ ซึ่งก็เป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูง แต่กลับพบว่า สารหมายเลข 9 นี้มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำ เพราะมีหมู่แทนที่ R_1 นั้นมีความเป็นไฮโดรโฟบิก จึงก็ทำให้การวางตัวของสารนั้นเปลี่ยนไป ซึ่งก็เป็นผลให้สารหมายเลข 9 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำกว่าสารหมายเลข 10



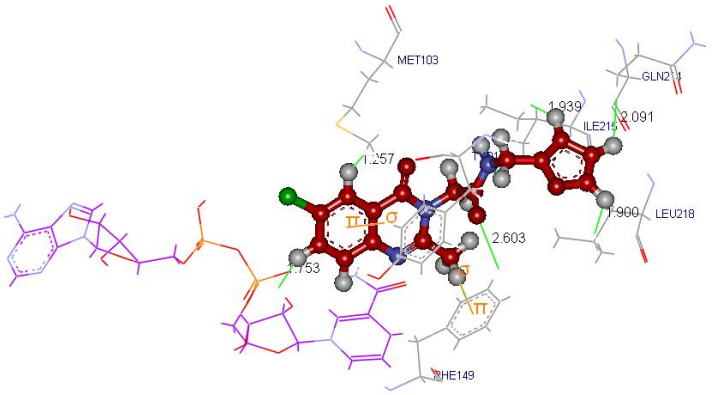
รูปที่ 141 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารหมายเลข 9

ผลของหมู่แทนที่ R_2

เมื่อพิจารณาสารยับยั้งหมายเลข 14, 16, 12, 23 และ 26 ซึ่งมีความเหมือนกันทางโครงสร้างกับสารหมายเลข 10 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุด แตกต่างกันเฉพาะหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_2 เท่านั้น พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 เพียงสารหมายเลข 26 เท่านั้น คือ พันธะไฮโดรเจนของหมู่ออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกลูตามีน ที่ตำแหน่ง 214 (Gln214) มีระยะห่าง 2.080 อังสตรอม ซึ่งสารหมายเลข 14 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงกว่าสารหมายเลข 16 แต่สารทั้งสองนี้ต่างมีความเหมือนกันทางโครงสร้าง แตกต่างกันเฉพาะที่ตำแหน่ง R_2 เท่านั้น โดยที่หมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_2 ของสารหมายเลข 14 และ 16 คือ 2-furylmethyl และ 2-thiophenylmethyl ตามลำดับ พบว่าไม่เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน

สำหรับในส่วนของอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างกรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 ของสารหมายเลข 14 และ 16 โดยมีระยะห่าง 2.202 และ 2.198 อังสตรอม ตามลำดับ และกรดอะมิโนไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Try158) ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 ของสารหมายเลข 14 และ 16 โดยมีระยะห่าง 1.578 และ 1.503 อังสตรอม ตามลำดับ และเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรฟิลิกระหว่างกรดอะมิโนกลูตามีน ที่ตำแหน่ง 218 (Gln218) ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 ของสารหมายเลข 14 และ 16 โดยมีระยะห่าง 2.091 และ 1.931 อังสตรอม ตามลำดับ ซึ่งสารหมายเลข 12, 23 และ 26 มีหมู่แทนที่ R_2 คือ 2-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl,2-benzothiazolyl และ 6-nitro-2-benzothiazolyl ตามลำดับ และสารหมายเลข 23 ไม่เกิดอันตรกิริยากับ Nicotimamide Ribose ของ NADH ที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ ซึ่งหมู่แทนที่ดังกล่าวเป็นหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนได้ดีและมีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ที่ต่ำกว่าสารหมายเลข 14 และ 16 และอะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยากับอะตอมไนโตรเจนกับ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 1.753 และ 1.800 อังสตรอม ตามลำดับ แต่สารหมายเลข 14 ในโครงสร้างหลักเกิดเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ พันธะไฮโดรเจนของหมู่ออกซิเจนที่ตำหน่งคาร์บอนิลกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 149 (Phe149) มีระยะห่าง 2.603 อังสตรอม และเกิดอันตรกิริยาชนิดโพ-ซิกมา ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนเมไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) กับวงอะโรมาติก A มีระยะหาง 1.265 อังสตรอม ซึ่งสารหมายเลข 14 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น

10 μM ที่สูงกว่าสารหมายเลข 16 ดังนั้นผลของหมู่แทนที่ทำให้ทราบว่าหมู่แทนที่ควรเป็นหมู่ที่มีขนากใหญ่ แต่ไม่เกะกะมากเกินไป ดังนั้นจึงก็ทำให้การวางตัวของสารนั้นเปลี่ยนไป ซึ่งก็เป็นผลให้สารหมายเลข 26 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำที่สุดในสารกลุ่มนี้ ซึ่งมีความเป็นหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน และมีความเกะกะสูงจึงทำให้เกิดอันตรกิริยาได้ไม่ดีเท่าหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนและไม่เกะกะมาก

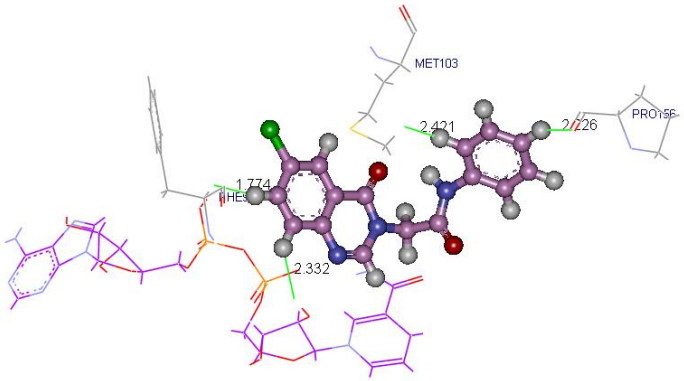


รูปที่ 142 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4H)-yl) acetamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารหมายเลข 14

ผลของหมู่แทนที่ R_3

เมื่อพิจารณาสารหมายเลข 2 ซึ่งมีความเหมือนกันทางโครงสร้างกับสารหมายเลข 10 ซึ่งเป็นสารที่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งสูงที่สุด แตกต่างกันเฉพาะหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_3 เท่านั้น พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮโดรเจนของฟีนิลกับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) มีระยะห่าง 2.226 อังสตรอม เกิดอันตรกิริยาชนิดโพ-ซิกมา ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนเมไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) กับวงอะโรมาติก B ระยะทาง 1.448 อังสตรอม นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 97 (The97) และกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่าง 1.774 และ 1.724 อังสตรอม ตามลำดับ เกิดอันตรกิริยากับอะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติก A กับ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 2.332 อังสตรอม

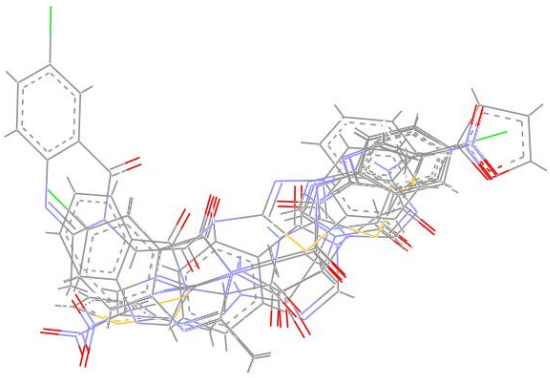
สำหรับในส่วนของอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 103 (Met103) และกรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) ของวงฟีนิลที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 ก็พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยมีระยะห่าง 2.421 และ 2.002 อังสตรอม ตามลำดับ ซึ่งสารหมายเลข 2 มีหมู่แทนที่ R_3 คือ หมู่ไฮโดรเจน สารหมายเลข 10 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดมีหมู่แทนที่ R_3 คือ หมู่เมทิล ซึ่งก็เป็นหมู่แทนที่ที่มีความในการให้อิเล็กตรอน แต่กลับพบว่าสารหมายเลข 2 นี้มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำ เพราะมีหมู่แทนที่ R_3 นั้นเป็นหมู่แทนที่ที่ให้อิเล็กตรอนไม่มากพอ จึงทำให้การวางตัวของสารนั้นเปลี่ยนไป ดังข้อมูลที่แสดงตามตารางที่ 3.18 ซึ่งก็เป็นผลให้สารหมายเลข 2 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำกว่าสารหมายเลข 10



รูปที่ 143 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารหมายเลข 2

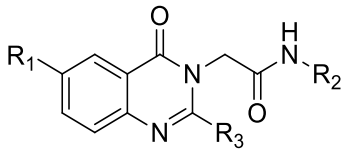
สารที่มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งเอนไซม์ ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)acetamide

สารที่มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค ซึ่งมีค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงน้อยกว่า 50.00 จำนวน 8 โครงสร้าง ได้แก่ 7, 19, 21, 17, 25, 20, 5 และ 18 จากการศึกษารูปแบบการวางตัวของสารในกลุ่มนี้พบว่ามีรูปแบบการจับและตำแหน่งการวางตัวที่ใกล้เคียงกัน และได้สรุปอันตรกิริยาทั้งหมดของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ในกลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค แสดงในตารางที่ 144



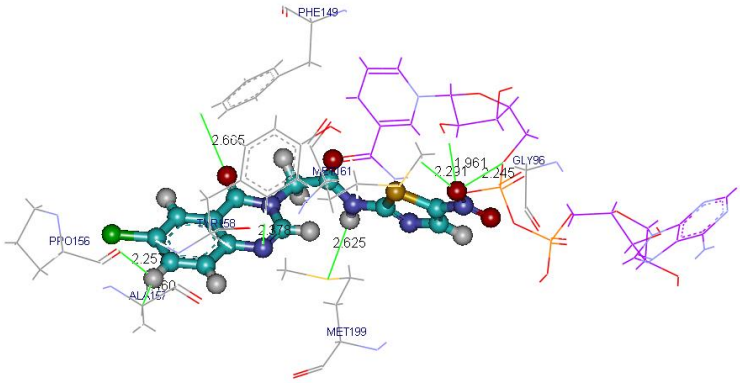
รูปที่ 144 รูปแบบการวางตัวของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค

ตารางที่ 110 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide และค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงน้อยกว่า 50.00 ของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำ จำนวน 8 โครงสร้าง



No.	R_1	R_2	R_3	MIC (μM)	% of InhA inhibition at 10 μM
7	-H	2-thiophenylmethyl	-H	5.21	33.70
19	-H	5-nitrothiazol-2-yl	$-CH_3$	72.39	34.12
21	-H	2-benzothiazolyl	-H	37.16	40.44
17	-H	5-nitrothiazol-2-yl	-H	37.72	41.23
25	-Cl	6-nitro-2-benzothiazolyl	-H	30.06	45.62
20	-Cl	5-nitrothiazol-2-yl	$-CH_3$	32.91	45.68
5	-H	2-furylmethyl	-H	5.50	46.12
18	-Cl	5-nitrothiazol-2-yl	-H	34.17	48.90

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ สารหมายเลข 18 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มประสิทธิภาพต่ำ คือ 48.90 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 137 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ พันธะไฮโดรเจนของออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 149 (Phe149) มีระยะห่าง 2.665 อังสตรอม พันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) มีระยะห่าง 2.257 อังสตรอม นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) โดยมีระยะห่าง 1.460 อังสตรอม อะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติก B จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) โดยมีระยะห่าง 2.378 อังสตรอม เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของอะตอมไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 199 (Met199) และกรดอะมิโนลูซีน ที่ตำแหน่ง 218 (Leu218) โดยมีระยะห่าง 2.632 และ 1.228 อังสตรอม ตามลำดับ

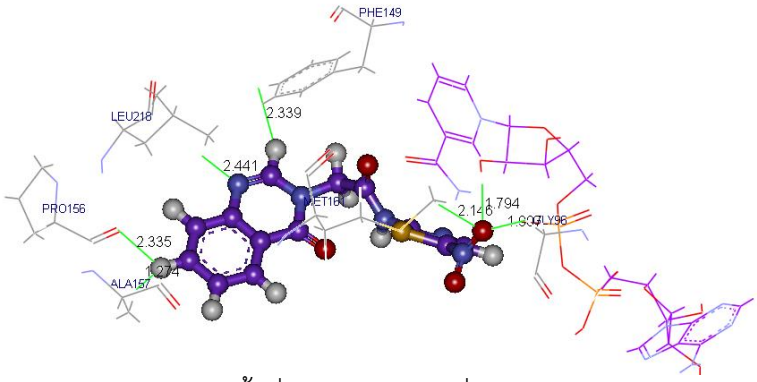


รูปที่ 145 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพต่ำของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide สารหมายเลข 18 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค ที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

ผลของหมู่แทนที่ R_1

เมื่อพิจารณาสารหมายเลข 17 ซึ่งมีความเหมือนกันทางโครงสร้างกับสารหมายเลข 18 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ แตกต่างกันเฉพาะหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_1 เท่านั้น พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) มีระยะห่าง 2.335 อังสตรอม นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) โดยมีระยะห่าง 1.274 อังสตรอม เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของอะตอมไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 199 (Met199) และอะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติก B กับกรดอะมิโนลูซีน ที่ตำแหน่ง 218 (Leu218) โดยมีระยะห่าง 2.324 และ 2.441 อังสตรอม ตามลำดับ เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญที่ตำแหน่ง R_2 จะเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของอะตอมออกซิเจนกับกรดอะมิโนไกลซีน ที่ตำแหน่ง 96 (Gly96) และกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่างเท่ากับ 1.907 และ 2.146 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนอะตอมออกซิเจนกับ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 1.794 อังสตรอม

สำหรับในส่วนของหมู่แทนที่ R_1 ไม่เกิดอันตรกิริยาใดๆ ซึ่งสารหมายเลข 17 มีหมู่แทนที่ R_1 คือ หมู่ไฮโดรเจน สารหมายเลข 18 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำมีหมู่แทนที่ R_1 คือ หมู่คลอไรด์ ซึ่งก็เป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูง แต่กลับพบว่า สารหมายเลข 17 นี้มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำ เพราะมีหมู่แทนที่ R_1 นั้นมีความเป็นไฮโดรโฟบิก จึงก็ทำให้การวางตัวของสารนั้นเปลี่ยนไป ซึ่งก็เป็นผลให้สารหมายเลข 17 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำกว่าสารหมายเลข 18



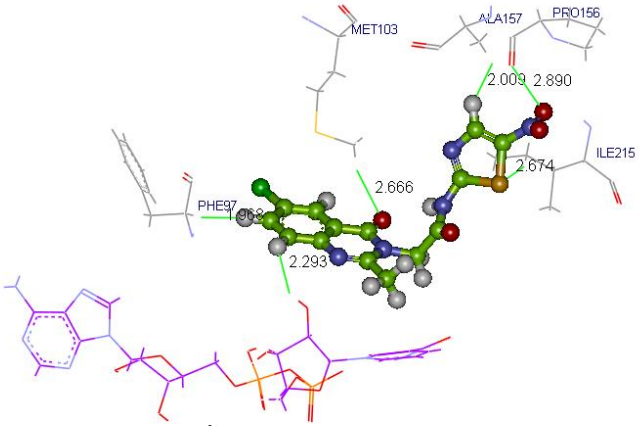
รูปที่ 146 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพต่ำของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของหมายเลข 17

ผลของหมู่แทนที่ R_2

เมื่อพิจารณาสารหมายเลข 25 ซึ่งมีความเหมือนกันทางโครงสร้างกับสารหมายเลข 18 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ แตกต่างกันเฉพาะหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_2 เท่านั้น พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่แทนที่ R_2 คือ อะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 155 (Met155), อะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) และอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกลูตามีน ที่ตำแหน่ง 214 (Gln214) มีระยะห่าง 2.563, 2.311 และ 2.356 อังสตรอม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 97 (Phe97) กรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 98 (Met98) และกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่าง 1.891, 1.466 และ 2.316 อังสตรอม ตามลำดับ และอะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก B เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนอะตอมออกซิเจนกับ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 2.274 อังสตรอม สำหรับในส่วนของอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างกรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157), กรดอะมิโนอะไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) และกรดอะมิโนลูซีน ที่ตำแหน่ง 218 (Leu218) ของหมู่แทนที่ R_2 ก็พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยมีระยะห่าง 1.368, 2.660 และ 1.426 อังสตรอม ตามลำดับ ซึ่งสารหมายเลข 25 มีหมู่แทนที่ R_2 คือ หมู่ 6-nitro-2-benzothiazolyl สารหมายเลข 18 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำมีหมู่แทนที่ R_2 คือ 5-nitrothiazol-2-yl ดังนั้นผลของหมู่แทนที่ทำให้ทราบว่าหมู่แทนที่ควรเป็นหมู่ที่มีขนากใหญ่ แต่ไม่เกะกะมากเกินไป ดังนั้นจึงก็ทำให้การวางตัวของสารนั้นเปลี่ยนไป ซึ่งก็เป็นผลให้สารหมายเลข 25 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำกว่าสารหมายเลข 18 แต่อย่างไรก็ตามสารหมายเลข 18 และ 25 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำเพราะ หมู่แทนที่ของสารทั้งสองเป็นแทนที่ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน จึงทำให้เกิดอันตรกิริยาได้ไม่ดีเท่าหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนและไม่เกะกะ

ผลของหมู่แทนที่ R_3

เมื่อพิจารณาสารหมายเลข 20 ซึ่งมีความเหมือนกันทางโครงสร้างกับสารหมายเลข 18 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ แตกต่างกันเฉพาะหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_3 เท่านั้น พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่แทนที่ R_2 คือ อะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 103 (Met103) มีระยะห่าง 2.666 อังสตรอม นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 97 (Phe97) และกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่าง 1.968 และ 1.512 อังสตรอม ตามลำดับ หมู่แทนที่ R_2 เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่ง 156 (Pro156),กรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157), กรดอะมิโนไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) และกรดอะมิโนไอโซลูซีน ที่ตำแหน่ง 215 (Ile215) โดยมีระยะห่าง 2.890, 2.009, 2.567 และ 2.674 อังสตรอม ตามลำดับ และอะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A เกิดอันตรกิริยาอะตอมไฮโดรเจนกับ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 2.293 อังสตรอม สำหรับในส่วนของหมู่แทนที่ R_3 ไม่เกิดอันตรกิริยาใดๆ ซึ่งสารหมายเลข 20 มีหมู่แทนที่ R_3 คือ หมู่เมทิล สารหมายเลข 18 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำมีหมู่แทนที่ R_3 คือ หมู่ไฮโดรเจน ซึ่งก็เป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูง แต่กลับพบว่า สารหมายเลข 20 นี้มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำ เพราะมีหมู่แทนที่ R_3 นั้นมีความเป็นไฮโดรโฟบิก และหมู่เมทิลเป็นหมู่แทนที่ที่มีความในการให้อิเล็กตรอนแต่กลับพบว่า สารหมายเลข 20 นี้มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำ เพราะมีหมู่แทนที่ R_3 นั้นเป็นหมู่แทนที่ที่ให้อิเล็กตรอนไม่มากพอ จึงก็ทำให้การวางตัวของสารนั้นเปลี่ยนไป ซึ่งก็เป็นผลให้สารหมายเลข 20 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำกว่าสารหมายเลข 18



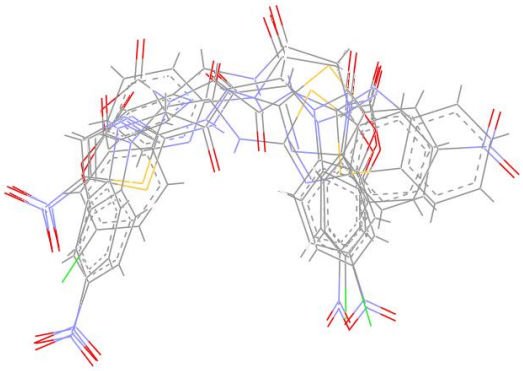
รูปที่ 147 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพต่ำของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารหมายเลข 20

การวิเคราะห์อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค

ในการศึกษาอันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค ซึ่งได้จากวิธีการคำนวณคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง ได้แบ่งการศึกษาอันตรกิริยาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สารที่มีประสิทธิภาพสูง และสารที่มีประสิทธิภาพต่ำ โดยใช้ค่าร้อยละในการยับยั้งเป็นค่ากำหนดกลุ่มของสารประกอบโดยสารที่มีประสิทธิภาพสูงจะมีค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงมากกว่า 50.00 โดยสารที่มีประสิทธิภาพต่ำจะมีค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงต่ำกว่า 50.00

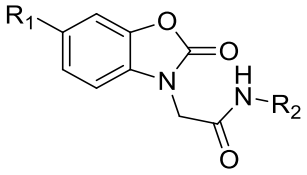
สารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones

สารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค ซึ่งมีค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงมากกว่า 50.00 จำนวน 7 โครงสร้าง ได้แก่ 8, 27, 23, 24, 12, 20 และ 21 ดังแสดงใน**ตารางที่ 107** จากการศึกษารูปแบบการวางตัวของสารในกลุ่มนี้พบว่ามีรูปแบบการจับและตำแหน่งการวางตัวที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงใน**รูปที่148** และได้สรุปอันตรกิริยาทั้งหมดของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ในกลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค แสดงใน**ตารางที่ 112**



รูปที่ 148 รูปแบบการวางตัวของสารอนุพันธ์ benzo[d]oxazol-2(3H)-ones ในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค

ตารางที่ 111 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones และค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงมากกว่า 50.00 ของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงจำนวน 7 โครงสร้าง

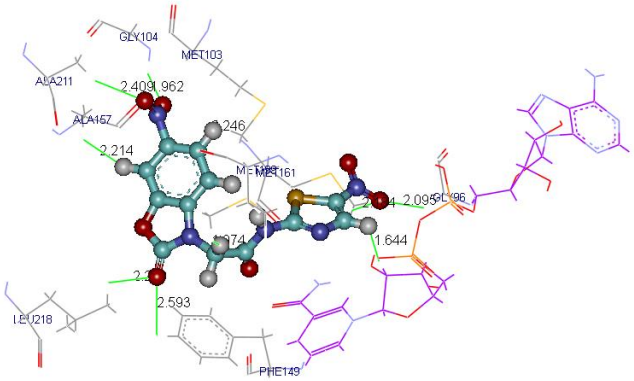


โครงสร้างทั่วไปของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones

No.	R_1	R_2	MIC (μM)	% of InhA inhibition at 10 μM (IC_{50} in μM)
8	-Cl	2-Pyridyl	82.31	51.60
27	$-NO_2$	6-Nitro-2-benzothiazolyl	15.04	51.70
23	-Cl	2-Benzothiazolyl	17.37	58.16
24	$-NO_2$	2-Benzothiazolyl	33.75	60.80
12	$-NO_2$	2-Pyridylmethy	76.15	68.12
20	-Cl	5-Nitrothiazol-2-yl	17.61	72.60
21	$-NO_2$	5-Nitrothiazol-2-yl	17.11	82.43

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดคือ สารหมายเลข 21 ซึ่งมีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM คือ 82.43 มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 3.30 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ พันธะไฮโดรเจนของอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 149 (Phe149) และกรดอะมิโนลูซีน ที่ตำแหน่ง 218 (Leu218) มีระยะห่าง 2.593 และ 2.298 อังสตรอม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 103 (Met103), กรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) และกรดอะมิโนไอโซลูซีน ที่ตำแหน่ง 202 (Ile202) โดยมีระยะห่าง 2.246, 2.214 และ 1.951 อังสตรอม ตามลำดับ เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของอะตอมไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 199 (Met199) โดยมีระยะห่าง 1.974 อังสตรอม กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญที่หมู่แทนที่ตำแหน่ง R_1 คือ พันธะไฮโดรเจน จะเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของอะตอมออกซิเจนกับกรดอะมิโนไกลซีน ที่ตำแหน่ง 104 (Gly104) และกรดอะมิโนอะลานีนที่ตำแหน่ง 211 (Ala211) โดยมีระยะห่างเท่ากับ 1.962 และ 2.409 อังสตรอม ตามลำดับ และกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญที่หมู่แทนที่ตำแหน่ง R_2 คือ พันธะไฮโดรเจน จะเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของอะตอมออกซิเจนกับกรดอะมิโนไกลซีน ที่ตำแหน่ง 96 (Gly96) และกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่างเท่ากับ 2.095 และ 2.184 อังสตรอม

ตามลำดับ และอะตอมไฮโดรเจนเกิดอันตรกิริยากับอะตอมไฮโดรเจนกับ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 1.644 อังสตรอม



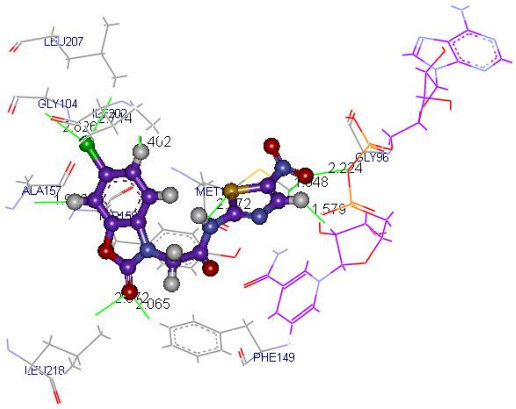
รูปที่ 149 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงของสารอนุพันธ์ benzo[d]oxazol-2(3H)-ones สารหมายเลข 21 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ผลของหมู่แทนที่ R_1

เมื่อพิจารณาสารหมายเลข 20 ซึ่งมีความเหมือนกันทางโครงสร้างกับสารหมายเลข 21 ซึ่งเป็นสารที่มีมีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุด แตกต่างกันเฉพาะหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_1 เท่านั้น พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 149 (Phe149) และกรดอะมิโนลูซีน ที่ตำแหน่ง 218 (Leu218) มีระยะห่าง 2.065 และ 2.672 อังสตรอม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) และกรดอะมิโนไอโซลูซีน ที่ตำแหน่ง 202 (Ile202) โดยมีระยะห่าง 1.972 และ 1.402 อังสตรอม ตามลำดับ เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของอะตอมไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 199 (Met199) โดยมีระยะห่าง 2.217 อังสตรอม และกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญที่หมู่แทนที่ตำแหน่ง R_2 คือ พันธะไฮโดรเจน จะเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของอะตอมออกซิเจนกับกรดอะมิโนไกลซีน ที่ตำแหน่ง 96 (Gly96) กรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่างเท่ากับ 2.224 และ 1.948 อังสตรอม ตามลำดับ และกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่ตำแหน่ง R_2 จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของอะตอมซัลเฟอร์กับกรดอะมิโนไทโลซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) โดยมีระยะห่างเท่ากับ 2.172 อังสตรอม เกิดอันตรกิริยากับอะตอมไฮโดรเจนกับ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 1.579 อังสตรอม

สำหรับในส่วนของกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญที่หมู่แทนที่ตำแหน่ง R_1 คือ พันธะไฮโดรเจนก็พบว่าสารหมายเลข 20 ที่หมู่แทนที่ตำแหน่ง R_1 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนเท่านั้น โดยจะเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของอะตอมคลอไรด์กับกรดอะมิโนไกลซีน ที่ตำแหน่ง 104 (Gly104) กรดอะมิโนลูซีน ที่ตำแหน่ง 207 (Leu207) โดยมีระยะห่างเท่ากับ 2.626 และ 2.714 อังสตรอม ตามลำดับ ซึ่งสารหมายเลข 20 มีหมู่แทนที่ R_1 คือ

หมู่คลอไรด์ สารหมายเลข 21 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดมีหมู่แทนที่ R_1 คือ หมู่ $-NO_2$ ซึ่งก็เป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงและเป็นหมู่ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนได้ดี ซึ่งสารหมายเลข 20 นี้มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำกว่าสารหมายเลข 21 เพราะมีหมู่แทนที่ R_1 นั้นมีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่ต่ำกว่าหมู่แทนที่ R_1 ของสารหมายเลข 20 จึงก็ทำให้การวางตัวของสารนั้นเปลี่ยนไป ดังข้อมูลที่แสดงตามตารางที่ 4.3 ซึ่งก็เป็นผลให้สารหมายเลข 20 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำกว่าสารหมายเลข 21



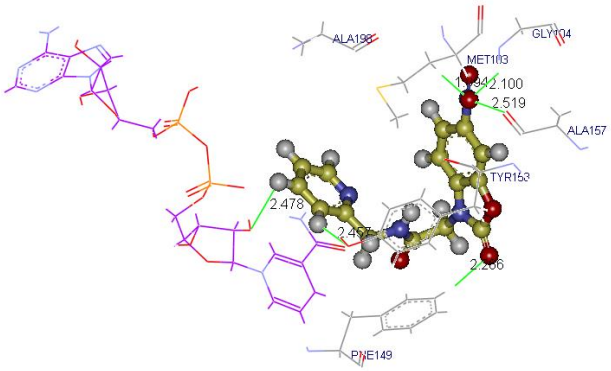
รูปที่ 150 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพต่ำของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-one ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารหมายเลข 20

ผลของหมู่แทนที่ R_2

เมื่อพิจารณาสารยับยั้งหมายเลข 12, 24 และ 27 ซึ่งมีความเหมือนกันทางโครงสร้างกับสารหมายเลข 21 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุด แตกต่างกันเฉพาะหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_2 เท่านั้น พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 เพียงสารหมายเลข 24 และ 27 เท่านั้น คือ สารหมายเลข 24 เกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) มีระยะห่าง 2.325 อังสตรอม และสารหมายเลข 27 เกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) และกรดอะมิโนกลูตามีน ที่ตำแหน่ง 214 (Gln214) โดยมีระยะห่าง 2.697 และ 2.246 อังสตรอม ตามลำดับ ซึ่งสารหมายเลข 24 และ 27 มีความเหมือนกันทางโครงสร้าง แตกต่างกันเฉพาะที่ตำแหน่ง R_2 เท่านั้น โดยที่หมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_2 ของสารหมายเลข 24 และ 27 คือ 2-Benzothiazolyl และ 6-Nitro-2-benzothiazolyl ตามลำดับ

สำหรับในส่วนของอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างกรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 ของสารหมายเลข 24 และ 27 โดยมีระยะห่าง 1.459 และ 1.437 อังสตรอม ตามลำดับ และกรดอะมิโนไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Try158) ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 ของสารหมายเลข 24 โดยมีระยะห่าง 2.566 อังสตรอม และกรดอะมิโนลูซีน ที่ตำแหน่ง 218 (Leu218) ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 ของสารหมายเลข 27 โดยมีระยะห่าง 1.179 อังสตรอม และเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 149 (Phe149) ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 ของสารหมายเลข 12 โดยมีระยะห่าง 1.988 อังสตรอม โดยที่หมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_2 ของสารหมายเลข 24 คือ 2-Pyridylmethy และเกิด

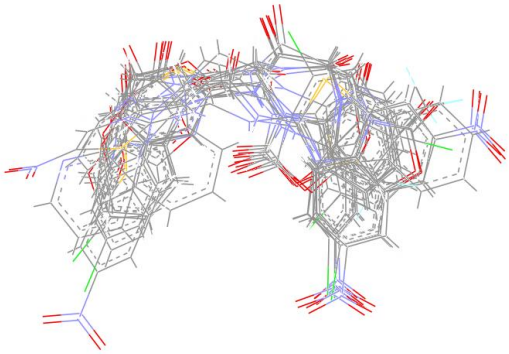
อันตรกิริยาพันธะไฮโดรเจนของอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 1.877 อังสตรอม จะเห็นได้ว่าสารหมายเลข 24 และ 27 เกิดอันตรกิริยามากกว่าสารหมายเลข 12 ซึ่งสารหมายเลข 12 จะเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในสารกลุ่มนี้ ดังนั้นจะห็นได้ว่าหมู่แทนที่ R_2 ที่จะเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนในโพรงเอนไซม์ InhA นั้นจะต้องเป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นมีขนาดใหญ่ เกะกะ และมีความเป็นหมู่ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนที่ดี และผลของหมู่แทนที่ R_2 ส่งผลให้การวางตัวของสารนั้นเปลี่ยนไป ซึ่งก็เป็นผลให้สารหมายเลข 12, 24 และ 27 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำกว่าสารหมายเลข 21



รูปที่ 151 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพต่ำของสารอนุพันธ์ benzo[d]oxazol-2(3H)-ones ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารหมายเลข 12

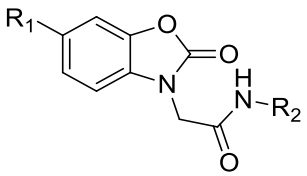
สารที่มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งเอนไซม์ ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones

สารที่มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค ซึ่งมีค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงน้อยกว่า 50.00 จำนวน 20 โครงสร้าง ได้แก่ 9, 7, 16, 4, 2, 13, 6, 1, 18, 22, 5, 15, 10, 11, 25, 17, 3, 14, 19 และ 26 ดังแสดงในตารางที่ 3.23 จากการศึกษารูปแบบการวางตัวของสารในกลุ่มนี้พบว่ามีรูปแบบการจับและตำแหน่งการวางตัวที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงใน**รูปที่ 144** และได้สรุปอันตรกิริยาทั้งหมดของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ในกลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค แสดงใน**ตารางที่ 112**



รูปที่ 152 รูปแบบการวางตัวของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค

ตารางที่ 112 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones และค่าร้อยละในการยับยั้งอยู่ในช่วงน้อยกว่า 50.00 ของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงจำนวน 20 โครงสร้าง

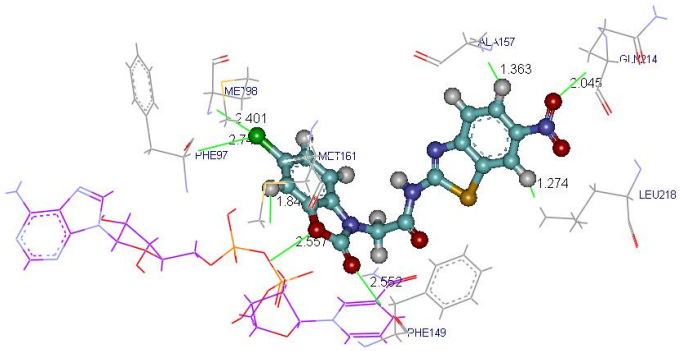


โครงสร้างทั่วไปของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones

No.	R_1	R_2	MIC (μM)	% of InhA inhibition at 10 μM (IC_{50} in μM)
9	$-NO_2$	2-Pyridyl	39.77	15.63
7	-H	2-Pyridyl	46.42	26.12
16	-H	2-Thiophenylmethyl	21.66	26.12
4	-H	2-Chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	67.43	26.80
2	-Cl	Phenyl	82.58	28.16
13	-H	2-Furylmethyl	22.95	30.12
6	$-NO_2$	2-Chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	60.13	32.16
1	-H	Phenyl	46.59	32.41
18	$-NO_2$	2-Thiophenylmethyl	18.75	35.71
15	$-NO_2$	2-Furylmethyl	78.80	36.86
5	-Cl	2-Chloro-5-(trifluoromethyl)-2-phenyl	61.70	40.12
22	-H	2-Benzothiazolyl	19.21	42.10
10	-H	2-Pyridylmethy	88.25	42.18
11	-Cl	2-Pyridylmethy	39.34	43.12
25	-H	6-Nitro-2-benzothiazolyl	33.75	45.12
17	-Cl	2-Thiophenylmethyl	38.72	45.62
3	$-NO_2$	Phenyl	79.80	46.12
14	-Cl	2-Furylmethyl	40.75	47.48
19	-H	5-Nitrothiazol-2-yl	78.05	48.15
26	-Cl	6-Nitro-2-benzothiazolyl	30.88	48.60

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl) acetamide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ สารหมายเลข 26 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มประสิทธิภาพต่ำ คือ 48.60 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังใน**รูปที่152** พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ พันธะไฮโดรเจนของ

อะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 149 (Phe149) มีระยะห่าง 2.552 อังสตรอม เกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮโดรเจนของหมู่แทนที่ R_1 เกิดพันธะไฮโดรเจนของออกซิเจนของอะตอมคลอรีนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 97 (Phe97) และกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 98 (Met98) มีระยะห่าง 2.744 และ 2.401 อังสตรอม และเกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮโดรเจนของหมู่แทนที่ R_2 เกิดพันธะไฮโดรเจนของอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนกลูตามีน ที่ตำแหน่ง 214 (Gln217) โดยมีระยะห่าง 2.045 อังสตรอม นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่าง 1.844 อังสตรอม และที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของอะตอมไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) และกรดอะมิโนลูซีน ที่ตำแหน่ง 218 (Leu218) โดยมีระยะห่าง 1.363 และ 1.274 อังสตรอม ตามลำดับ

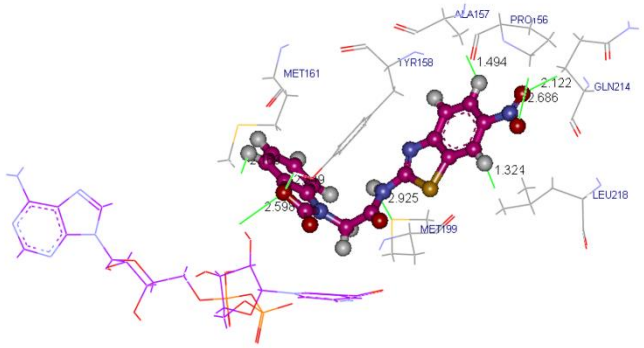


รูปที่ 153 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพต่ำของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol- (3*H*)-ones สารหมายเลข 26 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ผลของหมู่แทนที่ R_1

เมื่อพิจารณาสารหมายเลข 25 ซึ่งมีความเหมือนกันทางโครงสร้างกับสารหมายเลข 26 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ แตกต่างกันเฉพาะหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_1 เท่านั้น พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโนไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) มีระยะห่าง 2.349 อังสตรอม เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของอะตอมออกซิเจนกับ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 2.598 อังสตรอม นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก โดยที่กรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับวงอะโรมาติก A ได้แก่ ที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติก A จะเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 161 (Met161) โดยมีระยะห่าง 2.169 อังสตรอม เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับอะตอมซัลเฟอร์ของกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 199 (Met199) โดยมีระยะห่าง 2.925 อังสตรอม เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญที่ตำแหน่ง R_2 จะเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนของอะตอมออกซิเจนกับกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่ง 156 (Pro156) และกรดอะมิโนกลูตามีน ที่ตำแหน่ง 214 (Gln214) โดยมีระยะห่างเท่ากับ 2.686 และ 2.122 อังสตรอม และเกิด

อันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก กับกรดอะมิโนอะลานีน ที่ตำแหน่ง 157 (Ala157) และกรดอะมิโนลูซีน ที่ตำแหน่ง 218 (Leu218) โดยมีระยะห่าง 1.494 และ 1.324 อังสตรอม ตามลำดับ สำหรับในส่วนของหมู่แทนที่ R_1 ไม่เกิดอันตรกิริยาใดๆ ซึ่งสารหมายเลข 25 มีหมู่แทนที่ R_1 คือ หมู่ไฮโดรเจน สารหมายเลข 26 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำมีหมู่แทนที่ R_1 คือ หมู่คลอไรด์ ซึ่งก็เป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูง แต่กลับพบว่า สารหมายเลข 25 นี้มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำ เพราะมีหมู่แทนที่ R_1 นั้นมีความเป็นไฮโดรโฟบิก จึงก็ทำให้การวางตัวของสารนั้นเปลี่ยนไป ก็เป็นผลให้สารหมายเลข 25 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำกว่าสารหมายเลข 26

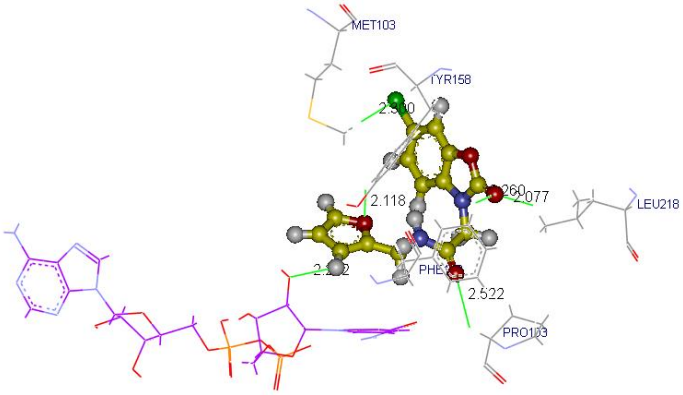


รูปที่ 154 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพต่ำของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารหมายเลข 25

ผลของหมู่แทนที่ R_2

เมื่อพิจารณาสารหมายเลข 14, 17 และ 11 ซึ่งมีความเหมือนกันทางโครงสร้างกับสารหมายเลข 26 ซึ่งเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ แตกต่างกันเฉพาะหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_2 เท่านั้น พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 คือ สารหมายเลข 14 เกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ออกซิเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโนไทโรซีน ที่ตำแหน่ง 158 (Tyr158) มีระยะห่าง 2.118 อังสตรอม และเกิดอันตรกิริยาพันธะไฮโดรเจนของอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 2.282 อังสตรอม สารหมายเลข 17 เกิดอันตรกิริยาพันธะไฮโดรเจนของอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 2.265 อังสตรอม และสารหมายเลข 11 เกิดอันตรกิริยาพันธะไฮโดรเจนของอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของ Nicotimamide Ribose ของ NADH มีระยะห่าง 1.861 อังสตรอม โดยที่หมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R_2 ของสารหมายเลข 14, 17 และ 11 คือ 2-Furylmethyl, 2-Thiophenylmethyl และ 2-Pyridylmethy ตามลำดับ สำหรับในส่วนของอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างกรดอะมิโนเมตไทโอนีน ที่ตำแหน่ง 199 (Met199) ที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ R_2 ของสารหมายเลข 17 โดยมีระยะห่าง 2.111 อังสตรอม และสารหมายเลข 11 เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ที่ตำแหน่ง 149 (Phe149) โดยมีระยะห่าง 1.908 อังสตรอม จะเห็นได้ว่าสารหมายเลข 14 เกิดอันตรกิริยามากกว่าสารหมายเลข 17 และ 11 ซึ่งสารหมายเลข 14 จะเป็นสารที่มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM สูงที่สุดในสารกลุ่มนี้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหมู่แทนที่ R_2 ที่จะเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนในโพรงเอนไซม์ InhA นั้นจะต้องเป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นมีขนาดใหญ่ ที่ไม่เกะกะมาก และมีความเป็นหมู่ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนที่ดี

และผลของหมู่แทนที่ R_2 ส่งผลให้การวางตัวของสารนั้นเปลี่ยนไป ซึ่งก็เป็นผลให้สารหมายเลข 14, 17 และ 11 มีค่าร้อยละในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 10 μM ต่ำกว่าสารหมายเลข 26



รูปที่ 155 รูปแบบการจับของสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพต่ำของสารอนุพันธ์ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคของสารหมายเลข 14

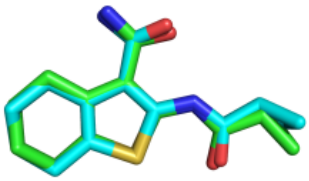
การคัดสรรเสมือนจริงเพื่อหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่

การวิเคราะห์บริเวณการจับ

สำหรับโครงสร้างจากเอกซเรย์ของเอนไซม์ PknG มีทั้งหมด 3 โครงสร้าง และมีเพียงโครงสร้างเดียวเท่านั้นคือเอนไซม์ PknG ที่จับกับสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene inhibitor (AX20017) (PDB code: 2PZI) ได้ถูกใช้เป็นบริเวณการจับสำหรับการคัดสรรเสมือนจริงโดยโครซม์ PknG มีกรดอะมิโนทั้งหมด 681 กรดอะมิโนตั้งแต่ลำดับที่ 73-750 ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ส่วนคือ tetratricopeptide repeat (TPR) domain, kinase domain และ rubredoxin domain ตามลำดับโดยสารยับยั้ง AX20017 จะวางตัวที่ตำแหน่ง ATP ของ kinase domain โดยที่โพรงการจับของสารยับยั้ง AX20017 กับเอนไซม์ PknG เป็นบริเวณการจับที่ใช้ในการคัดสรรสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่ โดยในโพรงการจับมีน้ำ 2 โมเลกุลอยู่ในโพรงการจับ ดังนั้นแล้วบริเวณการจับแตกต่างกัน 2 แบบคือมีโมเลกุลของน้ำและไม่มีโมเลกุลของน้ำในโพรงการจับ

การทดสอบประสิทธิภาพของโปรแกรมการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

สารยับยั้ง AX20017 ถูกวางลงไปใน kinase binding ของเอนไซม์ PknG (2PZI) โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง Glide XP เพื่อที่จะทดสอบพารามิเตอร์ในการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง โดยผลของ Glide XP ถูกทดสอบโดยใช้ค่า RMSD แสดงดัง**รูปที่ 156** โดยค่า RMSD ของทั้ง 2 รูปแบบของบริเวณการจับที่ค่าน้อยกว่า 1 Å โดยที่โพรงการจับแบบมีโมเลกุลของน้ำและไม่มีโมเลกุลของน้ำในโพรงการจับมีค่า RMSD เท่ากับ 0.43 และ 0.38 Å ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของน้ำไม่มีผลต่อโพรงการจับของของสารยับยั้ง AX20017 ดังนั้นโพรงการจับแบบไม่มีโมเลกุลของน้ำในโพรงการจับถูกเลือกใช้เป็นบริเวณการจับของเอนไซม์ PknG ในการคัดสรรเสมือนจริงและเลือกพารามิเตอร์จากการทดสอบการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง Glide XP ในการคัดสรรเสมือนจริง



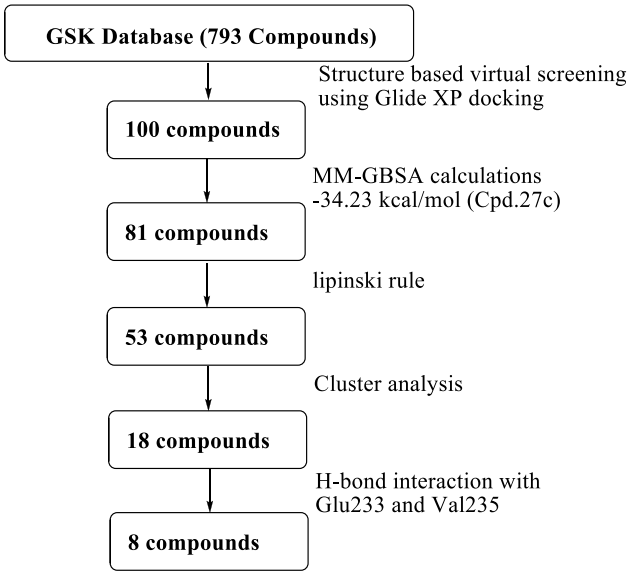
มีโมเลกุลน้ำในโพรงการจับ

ไม่มีโมเลกุลน้ำในโพรงการจับ

รูปที่ 156 การวางตัวของโครงสร้างเอกซเรย์และโครงสร้างจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งของสารยับยั้ง AX20017

การคัดสรรเสมือนจริงเพื่อหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่จากฐานข้อมูล GSK

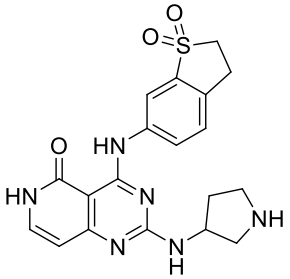
เพื่อที่จะค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG ชนิดใหม่โดยใช้ 2 ขั้นตอนคือ การคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งการคำนวณค่าพลังงานอิสระในการจับดังแสดงใน **รูปที่ 156** ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ฐานข้อมูล GSK ซึ่งประกอบไปด้วยข้อมูลทั้งหมด 793 โครงสร้างโดยการวางตัวของสารในโพรงการจับและคำนวณค่าพลังงานโดยใช้ Glide XP หลังจากนั้นเลือกสารทั้งหมด 100 โครงสร้างซึ่งมีค่าพลังงานจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง Glide XP ไปคำนวณค่าพลังงานอิสระในการจับต่อโดยใช้ระเบียบวิธี MM-GBSA โดยใช้แบบจำลองตัวทำละลายเท่ากับ igb8 หลังจากนั้นใช้ค่าพลังงานอิสระในการจับของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ได้สูงสุด (-34.23 kcal/mol) เป็นค่าอ้างอิงในการเลือกสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งตัวใหม่จากการคัดสรรเสมือนจริง ซึ่งพบว่ามีทั้งหมด 81 โครงสร้าง ดังนั้นจึงใช้คุณสมบัติการเป็นยา (lipinski rule of 5) ในการคัดเลือกสารยับยั้งโดยพบว่ามีโครงสร้างทั้งหมด 53 มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการเป็นยาและตามด้วยการจัดกลุ่มโครงสร้างพบว่ามีทั้งหมด 18 กลุ่มและได้เลือกโครงสร้างในแต่ละกลุ่มที่มีค่าพลังงานในการจับสูงสุดมาให้ในการวิเคราะห์ ซึ่งพบว่าสารทั้งหมด 8 โครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 113 และ**รูปที่ 157** โดยพิจารณาจากสารที่เกิดพันธะไฮโดรเจนในโพรงการจับกับกรดอะมิโน Glu233 และ Val235



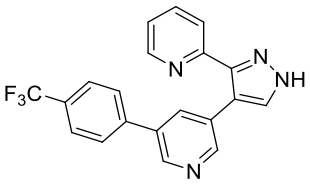
รูปที่ 157 Schematic representation of the virtual screening workflow for PknG inhibitor

ตารางที่ 113 สารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่ที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริง

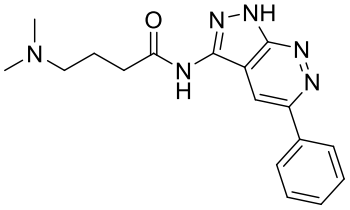
GSK ID	Chemical name	ΔH	Nrot	ΔG
GSK2181306A	4- [(1,1- Dioxo- 2,3- dihydro- 1-benzothiophen- 6- yl) amino] - 2-(pyrrolidin-3-ylamino)-6*H*-pyrido[4,3-d] pyrimidin-5-one	-51.60	4	-55.60
GW599550X	2-[4-(Trifluoromethyl)phenyl]-4-(3-pyridin-2-yl-1*H*-pyrazol-4-yl)pyridine	-45.37	4	-49.37
SB-627772-A	4- Dimethylamino- *N*- (5- phenyl- 1*H*-pyrazolo[5,4- c] pyridazin- 3- yl) butanamide	-42.35	6	-48.35
GSK2298859A	(3*S*,6*R*)-1-[6-(3-Amino-1*H*-indazol-6-yl)-2-(methylamino)-4-pyrimidinyl]-6- methyl- *N*- phenyl- 3- piperidine carboxamide	-40.74	5	-45.74
SB-222516	4- [5- (4- Fluorophenyl) - 3- (3-morpholinopropyl)imidazol-4-yl]-*N*-methyl-pyrimidin-2-amine	-38.67	7	-45.67
SB-390767	3-(3,5-Dichloro-4-hydroxyanilino)-4-(3-methoxyphenyl)pyrrole-2,5-dione	-39.18	4	-43.18
GW276655X	4- [1- (5- Oxazol- 5- yl- 2- oxo- 1,2-dihydro-indol-3-ylidene)-hydrazino] benzenesulfonamide	-36.32	4	-40.32
GSK993273A	*N*-[4-(1*H*-Pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yl) phenyl]methanesulfonamide	-34.51	3	-37.51



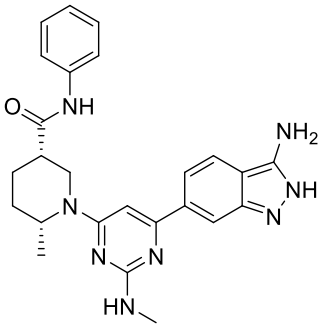
GSK2181306A



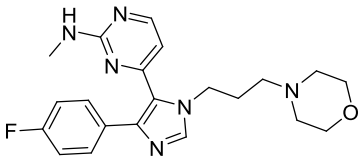
GW599550X



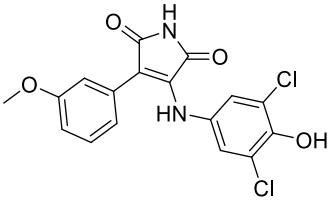
SB-627772-A



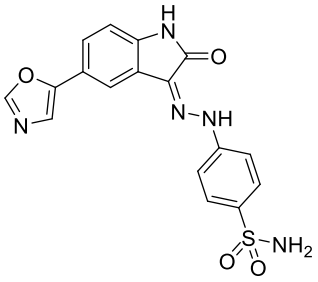
GSK2298859A



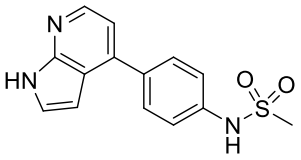
SB-222516



SB-390767



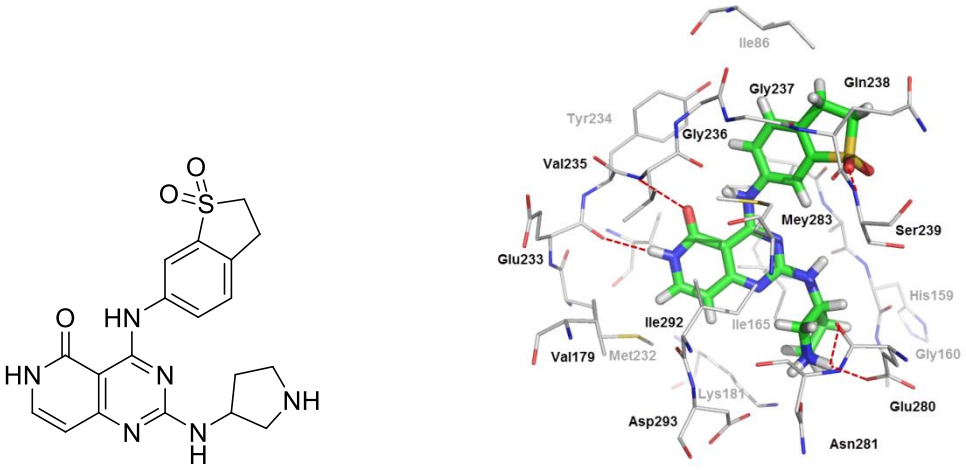
GW276655X



GSK993273A

รูปที่ 158 โครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่ที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริง

ลักษณะการวางตัวของสารตัวใหม่ที่ได้จากคัดสรรเสมือนจริงและมีค่าพลังงานอิสระในการจับมากที่สุดแสดงดัง**รูปที่ 159** โดยเกิดพันธะไฮโดรเจน 2 ตำแหน่งระหว่างโครงสร้างของ 4-[(1,1-Dioxo-2,3-dihydro-1-benzothiophen-6-yl) amino]-2-(pyrrolidin-3-ylamino)-6*H*-pyrido[4,3-d] pyrimidin-5-one กับกรดอะมิโน Glu233 และ Val235 นอกจากนี้ยังเกิดพันธะไฮโดนเจนระหว่างวง pyrrolidine (NH) กับกรดอะมิโน Glu280 และ Asn281 อะตอมออกซิเจนของหมู่ sulfone เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ NH ของกรดอะมิโน Ser239 อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไพระหว่างกรดอะมิโน Val179 กับวง pyrido[4,3-d]pyrimidin-5(6*H*)-one และมีอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นกับโพรงการจับของเอนไซม์ PknG



รูปที่ 159 ลักษณะการจับของ **GSK2181306A** ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งด้วยระเบียบวิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (CoMSIA) ของสารยับยั้งเอนไซม์ Serine/Threonine kinase G (PknG)

แบบจำลอง CoMSIA

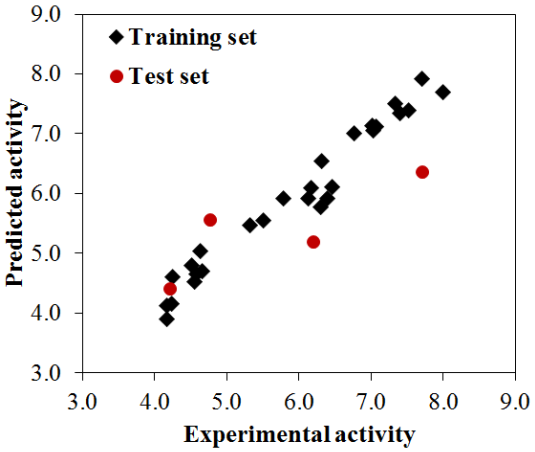
ค่าทางสถิติของแบบจำลอง CoMSIA แสดงดังตารางที่ 3.20 จากค่าทางสถิติมี 2 แบบจำลองคือ แบบจำลองที่ 8 และแบบจำลองที่ 9 มีค่าความสามารถจากการทำนายที่สูง โดยค่าความสามารถในการทำนายของแบบจำลองที่ 9 มีค่าสูงที่สุด (0.72) แต่อย่างไรก็ตาม แบบจำลองที่ 9แต่อย่างไรก็ตามแบบจำลองนี้ให้ข้อมูลความต้องการทางโครงสร้างแค่สนามสเตอริก สนามอิเล็กโตรสแตติก สนามการให้และรับไฮโดรเจน ซึ่งไม่เพียงพอต่อการใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบสารยับยั้ง เนื่องจากไม่มีในส่วนของข้อมูลความต้องการทางโครงสร้างของสนามไฮโดรโฟบิก แต่ในส่วนของแบบจำลองที่ 8 ซึ่งให้ข้อมูลสนามสเตอริก สนามอิเล็กโตรสแตติก สนามไฮโดรโฟบิก และสนามการให้ไฮโดรเจนซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการเพิ่มค่ากซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง ดังนั้นแล้วแบบจำลองที่ 8 จึงถูกเลือกเป็นแบบจำลองที่ดีที่สุด โดยแบบจำลองที่ 8 มีค่า q^2 เท่ากับ 0.63 ค่า r^2 เท่ากับ 0.96, ค่า F เท่ากับ 110.16 และค่า estimated standard error เท่ากับ 0.27 นอกจากนี้แบบจำลองที่ 8 ยังมีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจากการทำนายอละจากการทดลองที่ใกล้เคียงกันทั้ง training setและ test set แสดงดัง**รูปที่ 160** และมีค่าความแตกกต่างระหว่างการทำนายจากแบบจำลองที่ 8 และจากการการทดลองของกลุ่ม test set ที่น้อยกว่า 1 ลอการิทึม เป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่าแบบจำลอง CoMSIA ที่ได้มีความน่าเชื่อถือสูง

ตารางที่ 114 ค่าทางสถิติของแบบจำลอง CoMSIA

Model	q^2	r^2	s	SEE	F	N	Fractions
1.S/E	0.61	0.97	0.89	0.23	120.88	6	29.8/70.2
2.S/H	0.54	0.70	0.88	0.72	27.53	2	16.0/84.0
3.S/D	0.72	0.96	0.75	0.27	89.61	6	31.3/68.7
4.S/A	0.64	0.93	0.84	0.37	56.69	5	47.1/52.9
5.S/E/D	0.77	0.96	0.66	0.29	92.92	5	14.0/38.3/47.7
6.S/H/D	0.61	0.95	0.87	0.30	83.88	5	12.0/48.9/39.1
7.S/D/A	0.68	0.96	0.81	0.29	80.03	6	21.6/52.1/26.4
8.S/E/H/D	**0.63**	**0.96**	**0.85**	**0.27**	**110.16**	**5**	**8.8/24.7/35.7/30.8**
9.S/E/D/A	0.72	0.96	0.76	0.28	84.73	6	13.7/33.3/38.0/15.0
10.S/E/H/A	0.43	0.98	1.08	0.22	143.57	6	12.7/28.1/43.1/16.0
11.S/E/H/D/A	0.55	0.97	0.94	0.25	123.21	5	8.8/20.4/31.5/26.0/13.2

ตัวหนังสือหนาคือแบบจำลอง CoMSIA ที่ดีที่สุด

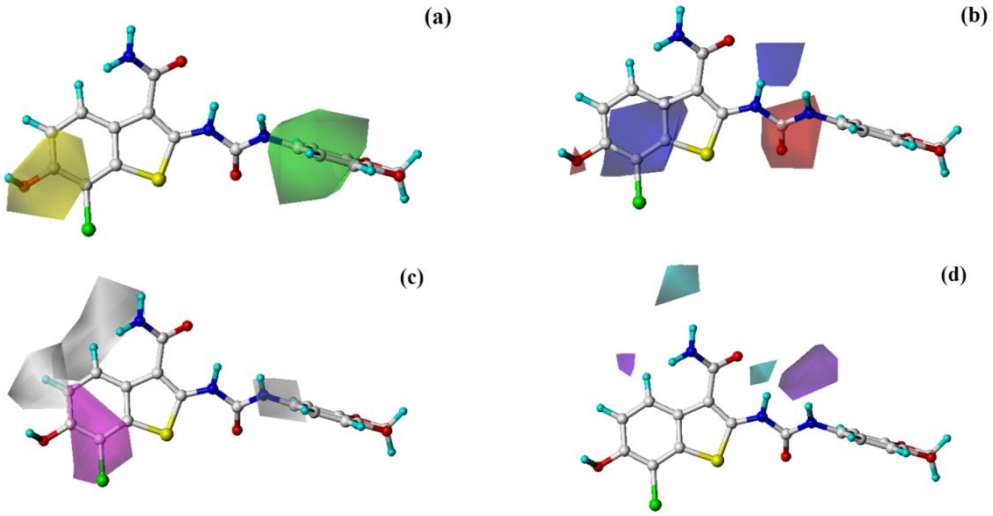
N, optimum number of components; s, standard error of prediction; SEE, standard error of estimate; F, F test value; S, steric field; E, electrostatic field; H, hydrophobic; D, hydrogen donor field; A, hydrogen acceptor field



รูปที่ 160 ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจากการทดลองและการทำนายจากแบบจำลอง CoMSIA

แผนภาพคอนทัวร์ของแบบจำลอง CoMSIA

แผนภาพของแบบจำลอง CoMSIA ได้ถูกนำมาใช้วิเคราะห์เพื่อหาความต้องการทางโครงสร้างสำหรับการเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของเอนไซม์ PknG ซึ่งแผนภาพคอนทัวร์ของแบบจำลองที่ดีที่สุดแสดงดัง**รูปที่ 161** โดยมีสารหมายเลข **27c** ซึ่งเป็นสารที่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งสูงสุดร่วมในการวิเคราะห์



รูปที่ 161 แผนภาพคอนทัวร์สนามสเตอริก (a), สนามอิเล็กโตรสแตติก (b), สนามไฮโดรโพบิก (c) และสนามการให้ไฮโดรเจน (d) ของแบบจำลอง CoMSIA ที่ดีที่สุด

ความต้องการทางโครงสร้างของหมู่แทนที่ R_1

คอนทัวร์สีเทาและฟ้าซึ่งขึ้นอยู่บริเวณใกล้เคียงกับหมู่แทนที่ R_1 ของสารยับยั้งหมายเลข **27c** หมู่แทนที่นี้ต้องการหมู่แทนที่ที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกและสามารถให้ไฮโดรเจน เพื่อที่จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนได้ ซึ่งสามารถที่จะยืนยันได้จากสารยับยั้งหมายเลข **3b** ($\log(1/IC_{50})$ = 6.30) ซึ่งมีหมู่แทนที่ NH_2 ที่ตำแหรน่งของหมู่แทนที่ R_1 มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่สูงกว่าสารหมายเลข **13b** ($\log(1/IC_{50})$ = 4.66) และสารยับยั้งหมายเลข **22c** ($\log(1/IC_{50})$ = 4.24) ซึ่งมีหมู่แทนที่เป็น NCH_3 และ OCH_2CH_3 ยิกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งที่มีคุณสมบัติตรงหมู่แทนที่นี่เป็นไฮโดรโฟบิกมีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่ต่ำ ดังนั้นแล้วหมู่แทนที่ที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกและให้ไฮโดรเจนเช่น NH_2 เป็นหมู่แทนที่ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมตรงบริเวณของหมู่แทนที่ R_1

ความต้องการทางโครงสร้างของหมู่แทนที่ R_2

คอนทัวร์สีเขียวและสีเทาที่ขึ้นใกล้กับบริเวณ R_2 ของสารยับยั้งหมายเลข **27c** แสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่ที่ต้องการสำหรับเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งคือหมู่แทนที่ที่มีคุณสมบัติหมู่โครงสร้างขนาดใหญ่และมีหมู่แทนที่ที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกที่ตำแหน่งนี้ ซึ่งสามารถอธิบายความต้องการนี้ได้จากสารยับยั้งหมายเลข **3b-12b** ($\log(1/IC_{50})$ = 4.21-6.39) โดยค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene เพิ่มขึ้นโดยการเพิ่มขนาดของหมู่แทนที่ R_2 แต่อย่างไรก็ตามขนาดของหมู่แทนที่ R_2 ควรจะมีขนาดที่เหมาะสม ถ้าหมู่

แทนที่มีขนาดใหญ่เกินไปค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งลดลงเช่นสารยับยั้ง **12b** ถ้ากรณีของหมู่แทนที่ที่มุคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกที่หมู่แทนที่ R_2 ถูกแทนที่ด้วยสารยับยั้งหมายเลข **26c** ($\log(1/IC_{50})$ = 7.33), **29c** ($\log(1/IC_{50})$ = 7.70) และ **27c**($\log(1/IC_{50})$ = 8.00) หมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่และมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก ได้แก่สารยับยั้งหมายเลข **27c** มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่สูงกว่าสารหมายเลข **26c** และ **29c** จากผลของหมู่แทนที่ R_2 แสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่นี้มีความสำคัญต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene

ความต้องการทางโครงสร้างของหมู่แทนที่ตำแหน่ง X

แผนภาพคอนทัวร์สีเหลืองและสีม่วงที่ขึ้นอยู่ใกล้ตำแหน่งของ X แสดงว่าตำแหน่งนี้ต้องการหมู่อทนที่ที่มีขนาดเล็กและคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene ซึ่งความต้องการนี้อธิบายได้จาก **1a** ($\log(1/IC_{50})$ = 6.46) ซึ่งมีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่สูงกว่าสารหมายเลข **3b** ($\log(1/IC_{50})$ = 6.30) และ **2a** ($\log(1/IC_{50})$ = 4.17) ในกรณีของความต้องการทางสเตอริก สารยับยั้งหมายเลข **3b** ($\log(1/IC_{50})$ = 6.30) มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่สูงกว่าสารยับยั้งหมายเลข **14b-19b** ($\log(1/IC_{50})$ = 4.17-6.20) ซึ่งอธิบายได้ด้วยผลของหมู่แทนที่ไฮโดรโฟบิกที่ตำแหน่ง X ที่ตำแหน่ง X ของสารยับยั้งหมายเลข **14b-19b** ซึ่งมีหมู่แทนที่เป็นไฮโดรฟิลิกเมื่อเปรียบเทียบกับสารหมายเลข **3b** ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งหมายเลข **3b** มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่สูงกว่า **14b-19b** ดังนั้นแล้วหมู่แทนที่นี้มีขนาดเล็กและมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกเพื่อเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง

การคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งของสารยับยั้งเอนไซม์ Serine/Threonine kinase G (PknG)

ค่าพลังงานการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งที่ดีที่สุดของสารยับยั้งแต่ล่ะโครงสร้างซึ่งได้จาก Glide XP ถูกสรุปได้ดัง**ตารางที่ 116** โดยลักษณะการวางตัวของสารยับยั้งทุกโครงสร้างมีลักณะการวางตัวที่เหมือนกันกับสารยับยั้ง tetrahydrobenzothiophene (AX20017) ที่จับในโครงสร้างเอกซเรย์ (Scherr et al., 2007) โดยค่าพลังงานจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งสามารถที่จะแบ่งสารยับยั้งที่ออกฤทธิ์ได้ดีและออกฤทธิ์ได้ไม่ดี (ค่า IC_{50} ในการยับยั้งเอนไซม์ PknG สูงกว่า 100 μM) ในการยับยั้งเอนไซม์ PknG ค่ากลางของพลังงานในการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งและออกฤทธิ์ยับยั้งได้ไม่ดีซึ่งหาได้จาก box plot เท่ากับ -6.70 และ -5.83 kcal/mol ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าพลังงานจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งสามารถที่จะแยกสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีและยับยั้งได้ไม่ดีออกจากกันได้เป็นอย่างดี ค่าพลังงานการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งสูงที่สุด (-6.44 kcal/mol) ของสารที่ยับยั้งได้ไม่ดีมีค่าที่สูงกว่าค่ากลาง (-6.70 kcal/mol) ของพลังงานจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งของสารที่ยับยั้งได้ไม่ดี ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งมีความน่าเชื่อถือที่จะประมาณค่าสารยับยั้งที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีและได้ไม่ดี ดังนั้นแล้วลักษณะการจับของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ภายในโพรงการจับในการศึกษานี้มีค่าที่ถูกต้อง ลักษณะการวางตัวของสารยับยั้งทุกโครงสร้างภายในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG มีลักษณะการวางตัวเหมือนกันกับสารยับยั้ง tetrahydrobenzothiophene (AX20017) ที่มาจากโครงสร้างเอกซเรย์ (Scherr et al., 2007) หมู่แทนที่คาร์บอนิลของกรดอะมิโน Glu233 และ NH ของกรดอะมิโน Val235 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่เอไมด์ของสารยับยั้งยกเว้นสารยับยั้งสารหมายเลข **22c** เพื่อที่จะศึกษารายละเอียดของอันตรกิริยาที่สำคัญต่อค่ากัมมันตภาพในการ

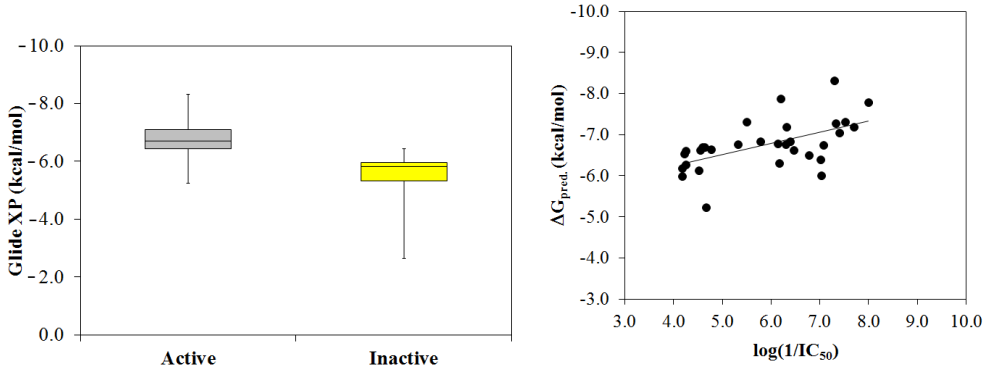
ยับยั้ง ในงานวิจัยนี้เลือกสารยับยั้งทั้งหมดจำนวน 2 โครงสร้างมาใช้ในการศึกษาด้วยระเบียบวิธีการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุล เพื่อที่จะศึกษาอันตรกิริยาที่มีความสำคัญและผลของหมู่แทนที่ต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งโดยเลือกสารยับยั้งหมายเลข **21c** และ **27c** ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานจากการทดลองและจากการคำนวณมีค่าต่ำ ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญของการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง เนื่องจากเป็นวิธีการที่รวดเร็วในการคำนวณแต่ให้ค่าพลังงานในการคำนวณที่ต่ำ ดังนั้นแล้วค่าพลังงานในการจับโดยใช้วิธีการคำนวณที่แตกต่างกันได้แก่การคำนวณ MM-PBSA และ MM-GBSA ถูกเลือกใช้เพื่อการคำนวณพลังงานในการจับของ tetrahydrobenzothiophene ภายในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG นอกจากนี้ผลของหมู่แบบจำลอง MM-GBSA solvation (igb1, igb2, igb5, igb7 และ igb8) ยังถูกปรับเปลี่ยนเพื่อใช้ในการคำนวณค่าพลังงานในการจับของสารยับยั้งในกลุ่มของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG เพื่อที่จะเพิ่มค่าความสัมพันธ์ของค่าพลังงานการจับจากการทดลองและจากการคำนวณ

ตารางที่ 115 ค่าพลังงานจากการทำนายของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG จาก Glide XP

Cpd.	IC_{50} (μM)	$\log(1/IC_{50})$	XP score (kcal/mol)
1a	0.35	6.46	-6.62
2a	68	4.17	-6.19
3b	0.500	6.30	-6.76
4b	31	4.51	-6.12
5b	23	4.64	-6.69
6b	17	4.77	-6.64
7b	4.79	5.32	-6.77
8b	1.66	5.78	-6.83
9b	56	4.25	-6.60
10b	62	4.21	-6.54
11b	0.41	6.39	-6.84
12b	26	4.59	-6.70
13b	22	4.66	-5.24
14b	0.63	6.20	-7.87
15b	68	4.17	-5.99
16b	0.74	6.13	-6.79
17b	28	4.55	-6.63
18b	0.68	6.17	-6.30
19b	0.085	7.07	-6.74
20b	58	4.24	-6.27
21c	0.095	7.02	-6.40
22c	0.093	7.03	-6.01
23c	0.17	6.77	-6.49

ตารางที่ 115 ค่าพลังงานจากการทำนายของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG จาก Glide XP(ต่อ)

Cpd.	IC50) µM(	log)1/IC50(	XP score (kcal/mol)
24c	3.16	5.50	-7.31
25c	0.49	6.31	-7.18
26c	0.047	7.33	-7.28
27c	0.01	8.00	-7.79
28c	0.05	7.30	-8.31
29c	0.02	7.70	-7.18
30c	0.04	7.40	-7.04
31c	0.03	7.52	-7.32
In1	>100	<5.49	-5.02
In2	>100	<5.49	-2.65
In3	>100	<5.49	-5.82
In4	>100	<5.49	-6.28
In5	>100	<5.49	-6.44
In6	>100	<5.49	-5.87
In7	>100	<5.49	-5.41
In8	>100	<5.49	-5.84



รูปที่ 162 Box plot ของ Glide XP scoring ของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งและไม่ยับยั้งเอนไซม์ PknG

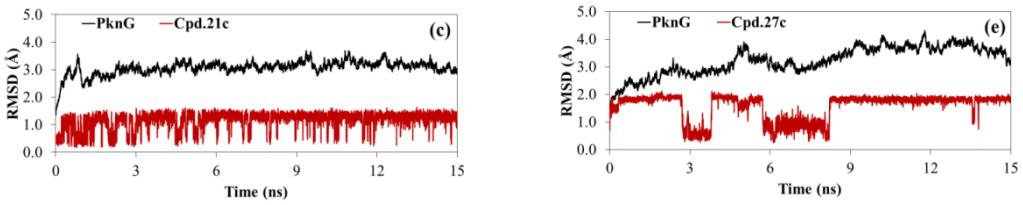
ตารางที่ 116 ค่ากลางและค่าทางสถิติของ Glide XP ของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG

Method	Medium value of active	Medium value of inactive	RMSE	q^2
Glide XP	-6.70 kcal/mol	-5.83 kcal/mol	1.04	0.32

การจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลของสารยับยั้งเอนไซม์ Serine/Threonine kinase G (PknG)

สมดุลของระบบ

โครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG (สารยับยั้งหมายเลข **21c** และ **27c**) ถูกจำลองโดยใช้การจำลองพลวัติเชิงโมเลกุล โดยค่าRMSDs แสดงดัง**รูปที่ 163** โดยเมื่อพิจารณาค่า RMSD แสดงให้เห็นว่าระบบของสารยับยั้งหมายเลข **21c** และ **27c** เข้าสู่สมดุลหลัง 3 ns และ 12 ns ตามลำดับ โดยค่า RMSD เฉลี่ยหลังจากสมดุลมีของสารหมายเลข **21c** ค่าอยู่ในช่วง 2.5 และ 3.5 Å ส่วนค่า RMSDs ของสารยับยั้งหมายเลข **27c** เฉลี่ยในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG มีค่าอยู่ในช่วง 3.0 และ 4.0 Å ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงข้อมูลของขนาดของสารทั้ง 2 โครงสร้าง โดยค่า total polar surface area (TPSA) และปริมาตรรวมของสารยับยั้งที่คำนวณจาก Molinspiration Cheminformatics Software (Ertl, Rohde and Selzer, 2000) ถูกใช้ในการพิจารณาโดยสารยับยั้งหมายเลข **27c** (ปริมาตร =309.70 $Å^3$, TPSA=122.92) มีค่าที่สูงกว่าสารยับยั้งหมายเลข **21c** (ปริมาตร = 220.00 $Å^3$, TPSA =72.19) ซึ่งต้องการโพรงการจับของเอนไซม์ PknG ที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งหมายเลข **21c** ดังนั้นแล้วค่าพลังงานโครงสร้างของสารยับยั้งและโครงสร้างจึงถูกวิเคราะห์หลังจาก 2 ns

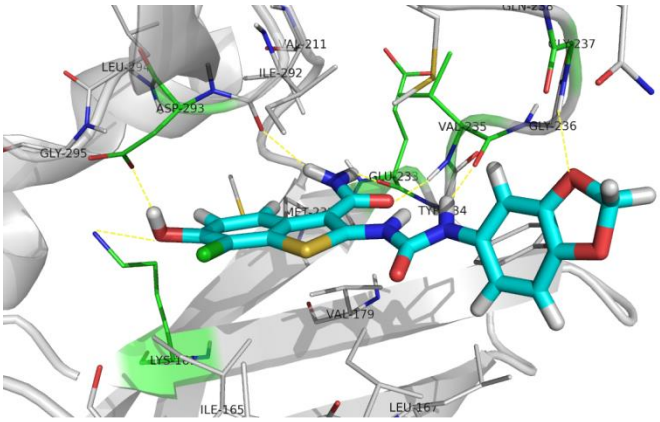


รูปที่ 163 ค่า RMSDs ของเอนไซม์ PknG และสารยับยั้งหมายเลข **21c**(a) และ **27c**(b)

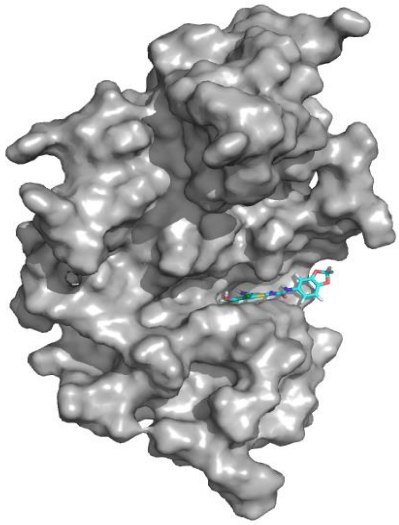
2) การวางตัวของสารยับยั้งในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG

จากโครงสร้างเอกซเรย์ของ PknG-AX20017 (**3b**) กรดอะมิโน Glu233 (O) และ Val235 (NH) ของโพรงการจับเอนไซม์ PknG เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่เอไมด์ของสารยับยั้งหมายเลข **3b** นอกจากนี้ยังพบพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Val235 (NH) และหมู่เอไมด์ของสารยับยั้งหมายเลข **3b** (Scherr et al., 2007) ซึ่งพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นนี้สามารถพบได้เช่นเดียวกันกับวารยับยั้งหมายเลข **27c** (สารยับยั้งที่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งสูงสุด) ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG **ดังรูป 164** แสดงให้เห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นอันตรกิริยาที่สำคัญที่ส่งผลต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ benzothiophene นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งหมายเลข **27c** เกิดพันธะไฮโดรเจนเพิ่มเติมกับ Ile292(O), Asp293(OD), Gly237(NH) และ Lys181 ดัง**รูปที่**

164 ซึ่งอันตรกิริยาเหล่านี้ส่งผลให้สารหมายเลข **27c** มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่สูงกว่าสารยับยั้งหมายเลข **3b** ส่วนของโครงสร้างของ benzothiophene เกิดอันตรกิริยา van der Waals กับกรดอะมิโน Ile157, Ala158, Ile165, Val179, Met232, Val258 และ Ile292 ในส่วนของวง benzo dioxole (หมู่แทนที่ R_2) เกิดอันตรกิริยา van der Waals กับกรดอะมิโน Ile157, Tyr234, Gly236, Gly237, Gln238 และ Met283 แต่อย่างไรก็ตามหมู่แทนที่ R_2 บางส่วนยื่นออกมาจากโพรงการจับของเอนไซม์ PknG ดังแสดงใน**รูปที่ 165**



รูปที่ 164 ลักษณะการจับของสารยับยั้งหมายเลข **27c** ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG ที่ได้จากการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุล



รูปที่ 165 สารยับยั้งหมายเลข **27c** ที่จับกับเอนไซม์ PknG ที่ได้จากการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุล

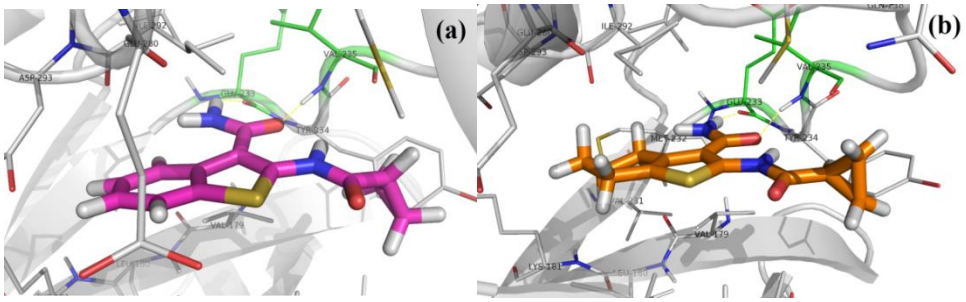
ความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ benzothiophene สำหรับการเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ PknG

จากแผนภาพคอนทัวร์ของแบบจำลอง CoMSIA แสดงดัง**รูป 161** ซึ่งวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับโครงสร้างของสารยับยั้งที่จับกับเอนไซม์ PknG ที่ได้จากการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลทำให้ได้ข้อมูลความต้องการทางโครงสร้างของสารยับยั้ง benzothiophene สำหรับการเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ PknG สารยับยั้งหมายเลข **27c** ซึ่งมีค่ากัมมันตภาพในการ

ยับยั้ง (IC_{50}) ในการยับยั้งเอนไซม์ PknG ถูกใช้เป็นโครงสร้างของสารยับยั้งในการวิเคราะห์แผนภาพคอนทัวร์ CoMSIA โดยโครงสร้างหลักถูกแบ่งออกเป็นหมู่แทนที่ต่างๆโดยมีความต้องการ ทางโครงสร้างดังนี้

โครงสร้างหลักของสารยับยั้ง

โครงสร้างหลักของสารยับยั้งที่แบ่งออกเป็น 2 แบบคือโครงสร้างหลักท่ต่อกับ cycloalkane และ benzene โดยแผนภาพคอนทัวร์ของแบบจำลอง CoMSIA แสดงคอนทัวร์สีเหลืองและสีม่วงบริเวณของโครงสร้าง benzene ของโครงสร้างสารยับยั้งหมายเลข **27c** ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่ที่มีขนาด็กและมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกคือความต้องการทางโครงสร้างของสารยับยั้งของโครงสร้างหลัก โดยแสดงดังโครงสร้างของสารยับยั้งหลายเลข **21c**, **23-31c** แสดงค่า IC_{50} ซึ่งมีโครงสร้างเป็น benzene มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งหมายเลข **1-2a**, **3-20b** จึงแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของสารยับยั้งที่ประกอบไปด้วย benzene มีความเหมาะสมทั้งด้านขนาดและคุณสมบัติที่เป็นไฮโดรโฟบิกในการยับยั้งเอนไซม์ PknG และเพื่อศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ที่ส่งผลโดยโครงสร้างหลัก โครงสร้างของสารหมายเลข **21c** จากการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลมีอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นในโพรงการจับที่ดีกว่าสารยับยั้งหมายเลข **3b** ดังแสดงใน**รูปที่ 166**



รูปที่ 166 ลักษณะการจับของสารยับยั้งหมายเลข **21c**)a (และ **3b**)b (ที่วางตัวในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG

หมู่แทนที่ R_1

ในการศึกษานี้มีโครงสร้างของหมู่แทนที่ NH_2 ที่ตำแหน่ง R_1 เหมือนกันทุกโครงสร้างยกเว้นสารยับยั้งหมายเลข **13b** และ **22c** แผนภาพคอนทัวร์การให้ไฮโดรเจน พบแผนภาพคอนทัวร์ที่ขึ้นบริเวณของหมู่แทนที่นี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่การให้ไฮโดรเจนของหมู่แทนที่นี้ส่งผลต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่สูงขึ้น สารยับยั้งหมายเลข **3b** และ **22c** มีหมู่แทนที่ R_1 เป็น NH_2 และ OCH_2CH_3 ตามลำดับ ซึ่งส่งผลต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง (IC_{50}) ที่แตกต่างกันมาก (0.5 μM และ 58 μM ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่ NH_2 ที่บริเวณตำแหน่ง R_1 มีผลต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ PknG ดังนั้นโครงสร้างนี้จึงมีความสำคัญต่อหมู่แทนที่ซึ่งทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนของกรดอะมิโน Glu233 (O) และ Ile292 (O)

หมู่แทนที่ R_2

ขนาดของหมู่แทนที่ R_2 ซึ่งถูกปรับเปลี่ยนตั้งแต่ขนาดที่เล็กที่สุดคือ CH_3 (สารหมายเลข **4b**) ไปจนถึงขนาดที่ใหญ่คือNH-6-benzo[d][1,3]dioxole (สารหมายเลข **27c**) ซึ่งความต้องการทางสเตอริกของโครงสร้างหมู่แทนที่ R_2 แสดงดังแผนภาพคอนทัวร์จากแบบจำลอง

CoMSIA ของสนามสเตอริกดังรูปที่ 3.42a แผนภาพคอนทัวร์สีเขียนที่แสดงดังตำแหน่ง **R_2** ซึ่งขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ amido ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่ตรงบริเวณนี้ต้องการหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ PknG ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่ **R_2** ที่มีขนาดเล็กได้แก่หมู่ CH_3 ไปถึงหมู่แทนที่ขนาดใหญ่คือ cyclobutyl (สารหมายเลข **4b** – **8b**) โดยค่า IC_{50} ของสารเหล่านี้มีค่าที่เพิ่มขึ้น 31 μM ถึง 1.66 μM นอกจากนี้เมื่อเปลี่ยนหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่มากขึ้นเป็น NH-6-benzo[*d*][1,3]dioxole ของสารยับยั้งหมายเลข **27c** ซึ่งถูกแทนที่โดย cyclopropyl ของสารหมายเลข **29c**ค่า IC_{50} มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจาก 0.01 เป็น 0.02 μM ลักษณะการวางตัวและอันตรกิริยาของสารยับยั้งหมายเลข 29c มีลักษณะที่เหมือนกัน เนื่องจากหมู่แทนที่ NH-6-benzo[*d*][1,3]dioxole ของสารยับยั้งหมายเลข **27c** ยื่นออกมาจากโพรงการจับของเอนไซม์ PknG และอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นมีลักษณะที่เหมือนกัน เกิดอันตรกิริยาชนิด van der Waals กับกรดอะมิโนที่อยู่ในโพรงการจับเหมือนกัน ดังนั้นค่า IC_{50} ของสรยับยั้งหมายเลข **27c** และ **29c** จึงมีค่าที่แตกต่างกันเล็กน้อยถึงแม้ว่าโครงสร้างของหมู่แทนที่ **R_2** จะมีขนาดที่แตกต่างกันก็ตาม ดังนั้นแล้วหมู่แทนที่ **R_2** จึงควรมีขนาดที่ใหญ่และสั้นเช่น cyclopropyl, cyclobutyl และ $CHC(CH_3)_2$ ซึ่งจะเพิ่มให้ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ PknG ของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene สูงมากขึ้น

โครงสร้างพื้นฐานสำหรับการออกแบบสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ชนิดใหม่

ผลการศึกษาที่ได้จากแบบจำลอง 3D-QSAR และการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลทำให้ได้ข้อมูลความต้องการทางโครงสร้างที่มีความสำคัญของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PknG ที่สูงมากยิ่งขึ้น โครงสร้างหลักของสารยับยั้งคือ benzothiophene core มีค่าสำคัญต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งโดยบ่งชี้จากผลการศึกษาที่ได้จากแผนภาพคอนทัวร์ของแบบจำลอง CoMSIA อะตอมออกซิเจนในหมู่คาร์บอนิลของโครงสร้างหลักเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Val235 สำหรับหมู่แทนที่ R_1 ต้องการหมู่แทนที่ทีมีคุณสมบัติเป็นหมู่ให้ไฮโดรเจนและมีขนาดเล็กเช่น NH_2 เพื่อให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Glu233 (O) และ Ile292 (O) ดังนั้นหมู่แทนที่ที่บริเวณตำแหน่ง R_1 จึงเป็นอีกส่วนที่มีความสำคัญกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง หมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่ซึ่งได้จากแผนภาพคอนทัวร์ของแบบจำลอง CoMSIA ต้องการสำหรับการเกิดพันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของหมู่แทนที่ R_2 สำหรับการเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น และควรมีหมู่แทนที่ที่มีขนาดเล็กและให้ไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง X เพื่อให้เกิดพันธะไฮดโดรเจนเพิ่มเติมกับกรดอะมิโน Lys181 และ Asp293

ค่าพลังงานอิสระในการจับ

ค่าพลังงานเอนทาลปี

ค่าพลังงานที่ได้จากการคำนณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งเป็นค่าที่ได้จากการประมาณค่าจึงส่งผลให้มีความสัมพันธ์กับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่ต่ำด้วยเช่นกัน (Witchapong et al., 2010(a); 2014(b); Bermin and Sippl, 201) เช่นเดียวกันกับค่าที่ได้ในการศึกษานี้ ค่าความสำมพันธ์ระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งกับค่าพลังงานอิสระที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งที่ต่ำด้วยเช่นเดียวกัน (q^2_{LOO}=0.25 และ RMSE = 1.06) เพื่อที่จะเพิ่มค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งและค่า

พลังงานอิสระในการจับให้สูงยิ่งขึ้น ค่าพลังงานอิสระในการจับของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene ภายในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG ถูกคำนวณโดยใช้ระเบียบวิธี MM-PBSA และ MM-GBSA จากลักษณธการจับที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งโดยใช้ Glide XP docking ได้นำมาคำนวณต่อโดยใช้ energy minimization ในโปรแกรม AMBER12 และตามด้วยการคำนวณพลังงานอิสระในการจับ โดยค่าพลังงานเอนทาลปี (ΔH_{pred}) ของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene ที่จับกับเอนไซม์ PknG สรุปได้ดังตารางที่ 118 โดยค่าความสัมพันระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งกับค่าพลังงานอิสระในการจับแสดงดังรูปที่ 165 และตารางที่ 119 เมื่อพิจารณาจากค่า q^2_{LOO} ซึ่งแสดงดังตารางที่ 166 แสดงให้เห็นว่าค่าพลังงานอิสระในการจับกับเอนไซม์ PknG เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งมีความสัมพันธ์กันดีขึ้น ค่าสัมประสิทธิความสัมพันธ์ของพลังงานเอนทาลปีจากระเบียบวิธีการคำนวณ MM-PBSA (q^2_{LOO} =0.32, RMSE = 1.05) และ MM-GBSA (igb1, q^2_{LOO} =0.41, RMSE = 0.98; igb2, q^2_{LOO} =0.41, RMSE = 0.98; igb5, q^2_{LOO} =0.40, RMSE = 0.99; igb7, q^2_{LOO} =0.47, RMSE = 0.93 และ igb8, q^2_{LOO} =0.46, RMSE = 0.92, ตามลำดับ) สรุปดังตารางที่ 3.28 ซึ่งมีค่าสูงกว่าการคำนวณ XP docking กับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง (q^2_{LOO} =0.25 และ RMSE = 1.06) เมื่อพิจารณาค่าพลังงานที่ได้จากการคำนวณพลังงานเอนทาลปีดังตารางที่ 3.29 พลังงานเอนทาลปีที่คำนวณได้จากวิธีการคำนวณ MM-PBSA มีค่าที่ใกล้เคียงกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง แต่อย่างไรก็ตามวิธีการคำนวณนี้ยังไม่สามารถที่จะคำนวณค่าพลังงานของสารยับยั้งหมายเลข **22c** (6.89 kcal/mol) ในกลุ่มของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG เนื่องจากสารหมายเลข **22c** ซึ่งประกอบไปด้วยหมู่ OCH_2CH_3 แต่สารยับยั้งตัวอื่นๆประกอบไปด้วยหมู่แทนที่ NH_2 หรือ $NHCH_3$ โดยจากระเบียบวอธีการคำนวณ MM-GBSA ให้ค่าพลังงานที่มากกว่า 22.41-45.47 kcal/mol เมื่อเปรียบเทียบกับพลังงานอิสระจากการทดลอง ระเบียบวิธีการคำนวณ MM-GBSA โดยใช้แบบจำลอง igb8 แสดงค่าพลังงานจากการคำนวณที่มากกว่า 22.41-36.62 kcal/mol เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของค่าพลังงานระหว่างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG และไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG ของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene จากระเบียบวิธี MM-GBSA กับแบบจำลองของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยค่าของ box plot ของค่าพลังงานจากสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG และไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG แสดงดังรูปที่ 3.42 สามารถที่จะแยกกันได้อย่างชัดเจน โดยค่ากลางระหว่างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง/ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG ของ igb1, igb2, igb5, igb7 และ igb8 เท่ากับ -44.21/-40.84, -40.85/-37.26, -42.85/-39.05, -40.79/-35.82 และ -38.47/-34.92 kcal/mol ตามลำดับ ซึ่งพบว่าวิธีการคำนวณ MM-GBSA โดยมีแบบจำลองตัวทำละลายเท่ากับ igb7 และ igb8 ให้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (q^2) ที่สูงมากกว่า 0.6 ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของค่าพลังงานเอนทาล (ΔH_{pred}) โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณ MM-GBSA โดยมีแบบจำลองตัวทำละลายเท่ากับ igb7 และ igb8 มีค่า q^2 เท่ากับ 0.60 และ RMSE เท่ากับ 0.79 เมื่อพิจารณาถึงค่าพลังงานจากการคำนวณที่แตกต่างสูงของแบบจำลอง igb ในการคำนวณค่าพลังงาน ซึ่งพบว่าวิธีการคำนวณ MM-GBSA โดยแบบจำลอง igb8 โดยให้ผลที่ดีกว่าในการทำนายพลังงานในการจับของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ที่สูงมีค่าความแตกก่างกับค่าจากการทดลองที่ต่ำและสามารถแยกกันได้เป็นอย่างดีระหว่างสารออกฤทธิ์ยับยั้งและไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG

ผลค่าพลังงานเอนโทรปีที่มีผลต่อค่าพลังงานอิสระในการจับ

เพื่อที่จะทดสอบประสิทธิภาพในการทำนายค่าพลังงานอิสระในการจับของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG โดยใช้ระเบียบวิธีที่แตกต่างกันโดยพิจารณาผลร่วมกับพลังงานเอนโทรปี โดยแสดงค่าจากการคำนวณดัง**ตารางที่ 117** ผลของพลังงานเอนโทรปีที่มีผลต่อค่าพลังงานอิสระในการจับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับค่ากัมมันตภาพที่ได้จากการทดลอง พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์มีค่าที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าพลังงานเอนทาลปีของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene ในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG ซึ่งค่าสัมประสิทธ์ความสัมพันธ์ของค่าพลังงานอิสระในการคำนวณจากวิธีการคำนวณที่แตกต่างและแบบจำลองตัวทำละลายที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานอิสระในการจับจากการคำนวณและค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยดังแสดงใน**รูปที่ 166** ค่าทางสถิติของวิธีการคำนวณ MM-PBSA ให้ค่า q^2 และ RMSE เท่ากับ 0.33 และ 1.04 ตามลำดับ สำหรับวิธีการคำนวณ MM-GBSA กับแบบจำลองตัวทำละลายที่แตกต่างกันได้แก่ igb1, igb2, igb5, igb7 และ igb8 ให้ค่า q^2/RMSE เท่ากับ 0.40/0.99, 0.41/0.99, 0.39/1.00, 0.47/0.93 และ 0.47/0.93 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าความสัมพันธ์ที่ได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานเอนทาลปีและการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง แต่อย่างไรก็ตามพลังงานอิสระที่ได้จากการคำนวณยังไม่สามารถที่จะแก้ไขปัญหาค่าพลังงานที่มากกว่าการทดลองมากได้ โดยจากการคำนวณโดยใช้ระเบียบวิธี MM-PBSA มีค่าที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1.84 kcal/mol ถึง 16.78 kcal/mol สำหรับระเบียบวิธีการคำนวณ MM-GBSA กับแบบจำลองตัวทำละลายที่แตกต่างกันโดยมีค่าพลังงานที่แตกต่าง 33.86-50.47, 30.14-45.77, 31.52-47.10, 29.12-42.30 and 28.41-41.62 kcal/mol สำหรับแบบจำลองตัวทำละลาย igb1, igb2, igb5, igb7 และ igb8 ตามลำดับโดยเมื่อพิจารณาถึงการกระจายพลังงานอิสระของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งและไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG โดยมีการเพิ่มช่องว่างระหว่างค่าพลังงานที่มากขึ้นและแยกกันที่ดีขึ้น ยกเว้นการคำนวณด้วยระเบียบวิธี MM-GBSA โดนมีแบบจำลองตัวทำละลายเป็น igb8 โดยที่ช่วงของสารออกฤทธิ์ยับยั้งและไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG โดยวิธีการคำนวณ MM-GBSA สำหรับแบบจำลองตัวทำละลาย igb8 มีค่าที่ลดลง แต่อย่างไรก็ตามวิธีการคำนวณ MM-GBSA สำหรับแบบจำลองตัวทำละลาย igb8 ยังสามารถที่จะแยกได้ระหว่างสารที่ออกทธิ์ยับยั้งและไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG ได้โดยมีค่ากลางของค่าพลังงานเท่ากับ -42.49 และ -40.42 kcal/mol สำหรับสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งและไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG ดังนั้นแล้วระเบียบวิธีการคำนวณ MM-GBSA สำหรับแบบจำลองตัวทำละลาย igb8 ยังคงน่าเชื่อถือเนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานอิสระในการจับกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่สูงและมีค่า RMSE (0.76) ที่ต่ำ มีค่าความแตกต่างจากการทดลองและสามารถที่จะแยกระหว่างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งและไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG สำหรับระเบียบวิธีที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานอิสระในการจับและค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งดีรองลงมาคือ MM-GBSA สำหรับแบบจำลองตัวทำละลาย igb7 โดนมีค่า q^2 เท่ากับ 0.64, RMSE เท่ากับ 0.95และสามารถแยกกันได้เป็นอย่างดีระหว่างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งและไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG

ตารางที่ 116 ค่าพลังงานเอนทาลปีของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG inhibitors ที่ได้จากการคำนวณ MM-PBSA และ MM-GBSA

Cpd.	IC_{50} (μM)	$log(1/IC_{50})$	XP	Nrot	ΔH_{pred}					
					MM-PBSA	igb1	igb2	igb5	igb7	igb8
1a	0.35	6.46	-6.62	4	-6.62	-40.57	-37.76	-40.20	-37.93	-36.11
2a	68	4.17	-6.19	4	-6.19	-43.64	-40.71	-42.85	-38.42	-36.28
3b	0.500	6.30	-6.76	4	-6.76	-43.16	-40.28	-42.59	-39.65	-37.90
4b	31	4.51	-6.12	3	-6.12	-39.92	-36.94	-38.99	-36.92	-35.72
5b	23	4.64	-6.69	4	-6.69	-42.56	-39.47	-41.49	-39.26	-37.62
6b	17	4.77	-6.64	5	-6.64	-44.31	-40.89	-42.82	-39.24	-37.49
7b	4.79	5.32	-6.77	4	-6.77	-43.57	-40.45	-42.53	-40.24	-38.47
8b	1.66	5.78	-6.83	4	-6.83	-43.92	-40.85	-42.57	-39.77	-37.84
9b	56	4.25	-6.60	4	-6.60	-40.04	-36.65	-38.65	-35.76	-34.70
10b	62	4.21	-6.54	4	-6.54	-41.91	-39.00	-41.29	-38.71	-36.90
11b	0.41	6.39	-6.84	4	-6.84	-43.40	-40.11	-42.21	-38.98	-37.30
12b	26	4.59	-6.70	4	-6.70	-42.46	-38.82	-41.19	-38.65	-37.60
13b	22	4.66	-5.24	5	-5.24	-38.32	-34.95	-36.67	-32.08	-30.23
14b	0.63	6.20	-7.87	4	-15.10	-46.66	-43.74	-47.05	-40.79	-40.93
15b	68	4.17	-5.99	4	-7.09	-42.98	-40.67	-45.83	-37.37	-35.64
16b	0.74	6.13	-6.79	4	-11.98	-44.21	-40.40	-42.08	-42.08	-40.57

ตารางที่ 116 ค่าพลังงานเอนทาลปีของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG inhibitors ที่ได้จากการคำนวณ MM-PBSA และ MM-GBSA (ต่อ)

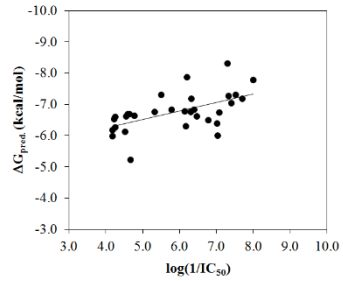
Cpd.	IC_{50} (μM)	$log(1/IC_{50})$	XP	Nrot	ΔH_{pred}					
					MM-PBSA	igb1	igb2	igb5	igb7	igb8
17b	28	4.55	-6.63	4	-17.30	-47.80	-43.40	-45.25	-42.25	-40.68
18b	0.68	6.17	-6.30	5	-12.43	-48.13	-44.32	-46.49	-42.46	-40.90
19b	0.085	7.07	-6.74	4	-13.92	-43.39	-40.23	-42.69	-40.93	-38.20
20b	58	4.24	-6.27	6	6.89	-33.68	-29.96	-31.34	-28.94	-28.23
21c	0.095	7.02	-6.40	4	-7.83	-45.21	-42.39	-44.19	-43.52	-41.08
22c	0.093	7.03	-6.01	5	-12.44	-46.04	-42.52	-44.59	-42.16	-41.95
23c	0.17	6.77	-6.49	4	-18.17	-46.91	-43.50	-46.60	-43.87	-40.31
24c	3.16	5.50	-7.31	4	-11.54	-52.86	-48.05	-50.64	-42.16	-42.05
25c	0.49	6.31	-7.18	4	-16.82	-47.27	-42.85	-44.09	-41.02	-42.77
26c	0.047	7.33	-7.28	4	-20.76	-49.50	-44.98	-47.55	-42.92	-42.75
27c	0.01	8.00	-7.79	5	-13.76	-50.24	-45.49	-48.49	-47.03	-46.15
28c	0.05	7.30	-8.31	6	-20.81	-50.95	-45.93	-48.74	-43.68	-43.85
29c	0.02	7.70	-7.18	4	-15.38	-52.12	-47.97	-49.98	-47.27	-46.74
30c	0.04	7.40	-7.04	5	-13.57	-55.63	-50.93	-52.26	-47.46	-46.78
31c	0.03	7.52	-7.32	5	-20.32	-51.81	-47.24	-49.93	-46.50	-45.81

ตารางที่ 116 ค่าพลังงานเอนทาลปีของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG inhibitors ที่ได้จากการคำนวณ MM-PBSA และ MM-GBSA (ต่อ)

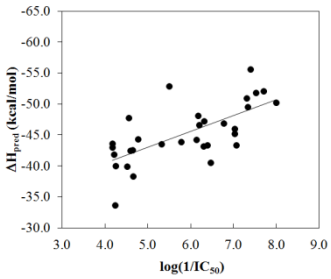
Cpd.	IC_{50} (μM)	$log(1/IC_{50})$	XP	Nrot	ΔH_{pred}					
					MM-PBSA	igb1	igb2	igb5	igb7	igb8
In1	>100	<5.49	-5.02	6	5.89	-40.59	-37.09	-38.80	-34.44	-33.21
In2	>100	<5.49	-2.65	4	17.60	-31.72	-29.31	-33.03	-26.31	-21.16
In3	>100	<5.49	-5.82	4	-11.21	-43.70	-40.45	-42.23	-39.66	-38.08
In4	>100	<5.49	-6.28	4	-7.18	-41.08	-37.36	-39.30	-36.70	-35.96
In5	>100	<5.49	-6.44	4	-13.11	-45.02	-40.76	-42.99	-39.30	-38.01
In6	>100	<5.49	-5.87	5	-11.87	-44.99	-42.03	-45.04	-43.81	-39.21
In7	>100	<5.49	-5.41	7	1.04	-40.58	-37.15	-38.50	-34.94	-33.87
In8	>100	<5.49	-5.84	4	4.49	-31.85	-30.05	-31.43	-29.73	-26.19

ตารางที่ 117 ค่ากลางและค่าทางสถิติของพลังงานเอนทาลปีของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG

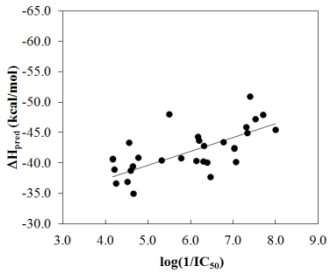
Method	igb	R^2	RMSE	q^2	Medium value of active	Medium value of inactive
MM-GBSA	1	0.46	0.98	0.41	-44.21	-40.84
	2	0.46	0.98	0.41	-40.85	-37.26
	5	0.45	0.99	0.40	-42.85	-39.05
	7	0.52	0.93	0.47	-40.79	-35.82
	8	0.53	0.92	0.46	-38.47	-34.92
MM-PBSA	-	0.38	1.05	0.32	-	-



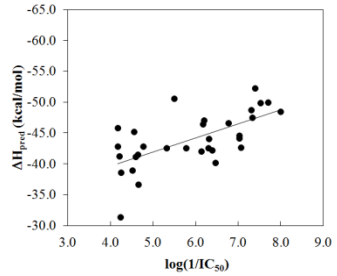
XP



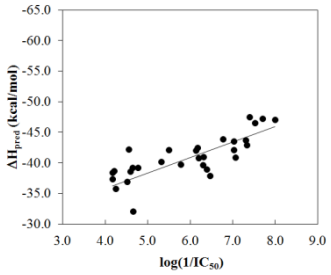
MM-GBSA, igb=1



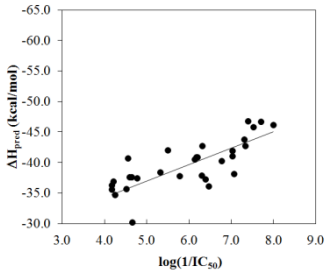
MM-GBSA, igb=2



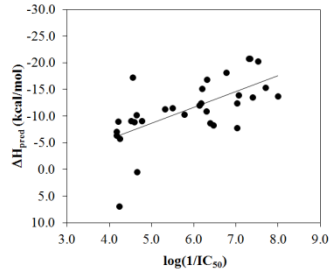
MM-GBSA, igb=5



MM-GBSA, igb=7

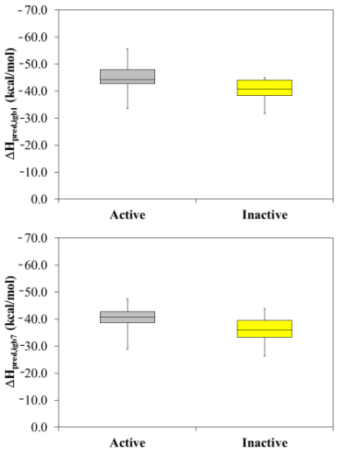


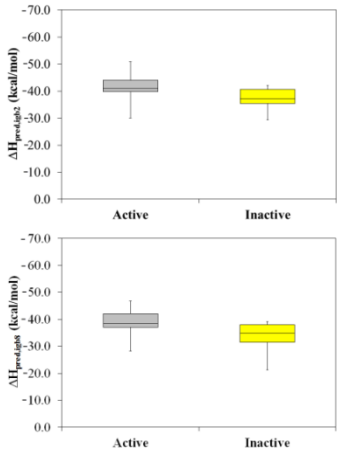
MM-GBSA, igb=8

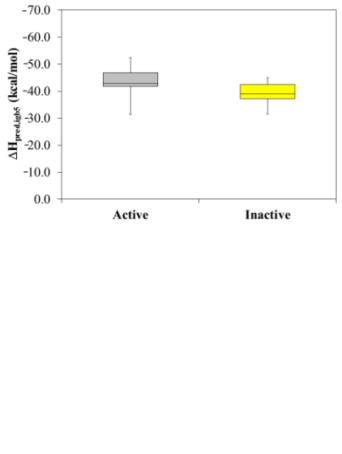


MM-PBSA

รูปที่ 167 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งกับค่าพลังงานเอนทาลปี (ΔH_{pred}) ซึ่งคำนวณจากระเบียบวิธี MM-PBSA และ MM-GBSA



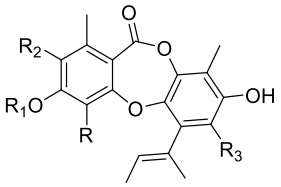




รูปที่ 168 Box plot ของค่าพลังงานเอนทาลปีของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งและไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG

การคัดสรรสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่มของ Aspergillusidone A-F ซึ่งสกัดได้จากเชื้อรา *Aspergillus unguis*

โครงสร้างสามมิติของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่มของ Aspergillusidone A-F **ดังรูปที่ 169** ถูกสร้างและปรับโครงสร้างเสถียรโดยใช้ระเบียบวิธี M06-2X/6-31G(d) เพื่อใช้ในการคัดสรรเสมือนจริงโดยใช้วิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งโดยใช้โปรแกรม Glide และใช้ scoring function แบบ Glide XP ในการคำนวณพลังงานในการจับของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่มของ Aspergillusidone A-F ภานในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG และเลือกโครสร้างที่มีค่าพลังงานต่ำที่สุด มีความสามารถในการจับกับเอนไซม์ PknG ดีที่สุด มาศึกษาโดยใช้ระเบียบวิธีการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลและการคำนวณค่าพลังงานในการจับโดยใช้ระเบียบวิธี MM-PBSA และ MM-GBSA



Aspergillusidone A: R=H, R_1=H, R_2=H, R_3=COOH

Aspergillusidone B: R=Cl, R_1=Me, R_2=H, R_3=Cl

Aspergillusidone C: R=H, R_1=H, R_2=Cl, R_3=Cl

Aspergillusidone D: R=H, R_1=H, R_2=Br, R_3=Br

Aspergillusidone E: R=H, R_1=H, R_2=Br, R_3=H

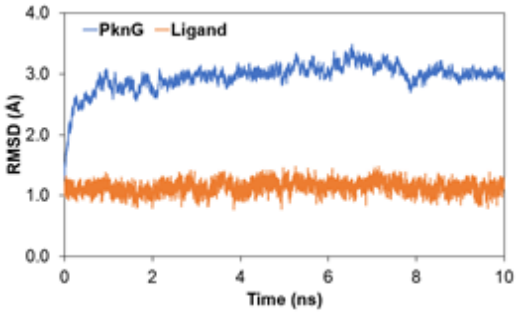
Aspergillusidone F: R=Br, R_1=H, R_2=H, R_3=Br

รูปที่ 169 โครงสร้างของ Aspergillusidone A-F

จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่มของ Aspergillusidone A-F ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้ Glide XP scoring แสดงดัง**ตารางที่ 118** ซึ่งพบว่า Aspergillusidone A มีค่าพลังงานในการจับต่ำที่สุดในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ Aspergillusidone A พบว่ามีหมู่แทนที่ที่แตกต่างจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติตัวอื่นๆคือมีหมู่ COOH ที่ตำแหน่ง R_3 ซึ่งน่าจะส่งผลต่อการจับของสารยับยั้งเมื่อเปรียบเทียบกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่มของ Aspergillusidone ผลจากการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลของ Aspergillusidone A แสดงให้เห็นว่าระบบที่จำลองเข้าสู่สมดุลตั้งแต่ 1 ns ของการจำลองพลวัติดัง**รูปที่ 170** ซึ่งส่งผลให้ได้ข้อมูลทางพลวัติที่น่าเชื่อถือในการวิเคราะห์พลังงานในการจับและศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นของ Aspergillusidone A ในโพรงการจับเอนไซม์ PknG

ตารางที่ 118 ค่าพลังงานในการจับของ Aspergillusidone A-F ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG

Aspergillusidone	Docking score (kcal/mol)
A	-9.08
B	-6.35
C	-7.32
D	-6.39
E	-6.51
F	-7.65



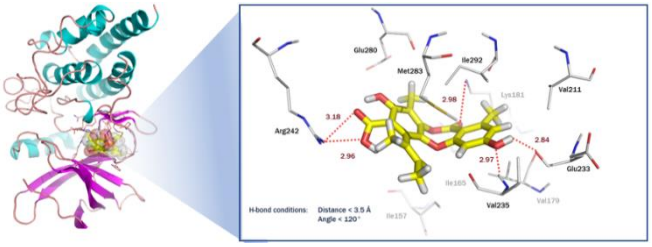
รูปที่ 170 ค่า RMSD ของ Aspergillusidone A ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG จากการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุล

ค่าพลังงานในการจับของ Aspergillusidone A ที่คำนวณได้จากระเบียบวิธี MM-PBSA และ MM-GBSA แสดงดัง**ตารางที่ 119** พบว่าพลังงานอิเล็กโตรสแตติกมีส่วนร่วมในค่าพลังงานในการจับมากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอันตรกิริยาชนิดอิเล็กโตรสแตติกเป็นอันตรกิริยาที่สำคัญในการจับของ Aspergillusidone A ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG โดยค่าพลังงานอิสระที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ -14.42 kcal/mol และ -17.76 kcal/mol สำหรับระเบียบวิธี MM-PBSA และ MM-GBSA ตามลำดับ

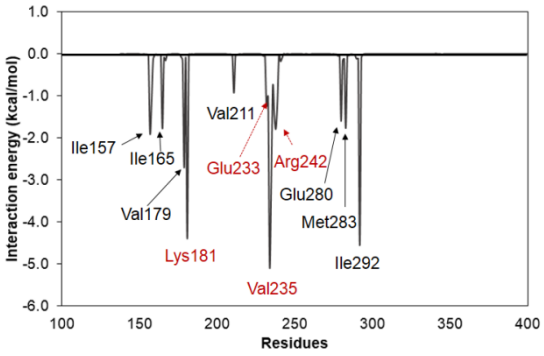
ตารางที่ 119 ค่าพลังงานอิสระในการจับของ Aspergillusidone A ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG

Contributions	Energy (kcal/mol)
ΔE_{vdW}	-33.35
ΔE_{ele}	-41.94
ΔE_{gas}	-75.29
$\Delta G_{solv\ (MM\text{-}PBSA)}$	44.75
$\Delta H_{(MM\text{-}PBSA)}$	-30.55
$\Delta G_{solv\ (MM\text{-}GBSA)}$	41.41
$\Delta H_{(MM\text{-}GBSA)}$	-33.88
$T\Delta S$	-16.13
$\Delta G_{bind\ (MM\text{-}PBSA)}$	-14.42
$\Delta G_{bind\ (MM\text{-}GBSA)}$	-17.76

จากการศึกษาการวางตัวและอันตรกิริยาของ Aspergillusidone A ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG ดัง**รูปที่ 171** พันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่าง Aspergillusidone A โดนอะตอมของออกซิเจนที่ตำแหน่ง R2 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ NH ของกรดอะมิโน Val235 โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดพันธะไฮโดรเจนมากกว่า 95 % และค่าพลังงานในการจับต่ำที่สุดดังแสดงใน**รูปที่ 172** นอกจากนี้ยังเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Glu233 อะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิลเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH_3^+ ของกรดอะมิโน Lys181 หมู่ COOH เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ Arg242 นอกจากนี้ยังพบว่าอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโพบิกของ Aspergillusidone A กับกรดอะมิโน Val179 และ Ile292 ยังช่วยในการจับของ Aspergillusidone A ในโพรงการจับของ PknG



รูปที่ 171 การวางตัวและอันตรกิริยาของ Aspergillusidone A ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG

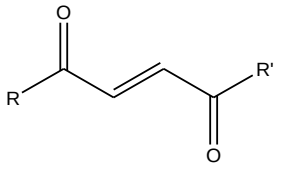


รูปที่ 172 พลังงานอันตรกิริยาของ Aspergillusidone A ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG

สารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid เพื่อเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ PknB

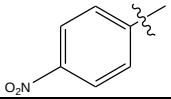
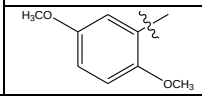
การศึกษาอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB ด้วยระเบียบวิธีโมเลคูลาร์ด๊อกกิ้ง สำหรับการศึกษา อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid โดยแบ่งกลุ่มที่มี % inhibition สูง คือมีค่า % inhibition ตั้งแต่ 65 % ขึ้นไป ทั้งสิ้น 18 โครงสร้าง ได้แก่ สารหมายเลข 17, 18, 25, 26, 37, 38, 45, 46, 53, 72, 73, 76, 77, 83, 84, 85, 86, 87 กลุ่มที่มี % inhibition ปานกลาง คือมีค่า % inhibition ตั้งแต่ 45 % แต่ไม่เกิน 65 % ทั้งสิ้น 45 โครงสร้าง ได้แก่ สารหมายเลข 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 21, 22, 23, 24, 27, 31, 32, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 49, 55, 57, 58, 59, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 71, 74, 75, 78, 79, 80, 81, 82, 88, 89 กลุ่มที่มี % inhibition ต่ำ คือมีค่า % inhibition น้อยกว่า 45 % ทั้งสิ้น 27 โครงสร้าง ได้แก่สารหมายเลข 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 28, 29, 30, 33, 48, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 60, 61, 68, 69, 70, 90

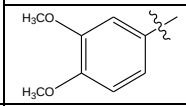
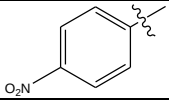
อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-oxo-crotonic acid ที่มี % inhibition สูงในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB แสดงดังตารางที่ 2

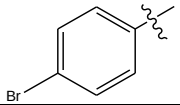
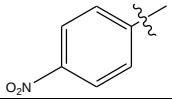


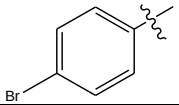
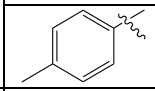
โครงสร้างทั่วไปของสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid

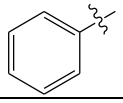
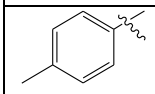
ตารางที่ 120 แสดงอันตรกิริยาที่สำคัญคัญของสารอนุพันธ์ 4-oxo-crotonic acid ที่มี % inhibition สูงในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB

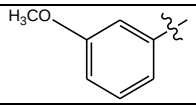
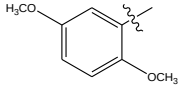
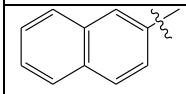
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**
Compound No. 85			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	--	O14-Leu17 (HD12) = 2.425 Å O33-Val72 (HG11) = 2.254 Å O11-Tyr94 (HE2) = 2.339 Å O33-Met155 (HB2) = 2.267 Å
	Van der Waals	H4-Tyr94 (HE2) = 2.054 Å	H9-Val25 (HG11) = 2.044 Å H18-Lys40 (HD1) = 2.097 Å H11-Met92 (HB1) = 2.341 Å H14-Val95 (HN) = 2.094 Å H3-Met145 (SD) = 2.327 Å H16-Asp156 (HA) = 1.497 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
Compound No. 17	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.039 Å H3-Val95 (O) = 1.756 Å O23-Met145 (HE1) = 1.786 Å O16-Met155 (HB2) = 2.433 Å O16-Asp156 (HN) = 1.677 Å	H6-Glu59 (OE1) = 2.223 O17-Met92 (HE1) = 1.862 Å H8-Asp156 (OD1) = 2.346 Å

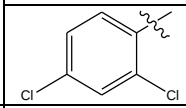
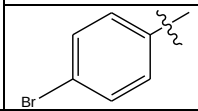
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.297 Å H5-Val25 (HG21) = 2.086 Å H11-Val72 (HG11) = 2.343 Å H1-Tyr94 (HD2) = 2.178 Å	H6-Lys40 (HD1) = 1.991 Å H7-Asp156 (HA) = 1.180 Å
Compound No. 18	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.482 Å H1-Val95 (O) = 1.508 Å O17-Met155 (HB2) = 2.315 Å O17-Asp156 (HN) = 1.612 Å	H6-Asp156 (OD1) = 1.979 Å O18-Asp156 (HB1) = 2.236 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.356 Å H4-Val72 (HG11) = 2.000 Å H2-Val95 (HN) = 1.156 Å H13-Gly97 (HN) = 2.058 Å H13-Met145 (HE1) = 1.033 Å	H8-Met92 (HE1) = 1.741 Å H8-Asp156 (HA) = 1.981 Å
Compound No. 25	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	O18-Tyr94 (HD2) = 2.061 Å -	H9-Glu93 (O) = 2.207 Å O19-Val95 (HN) = 2.275 Å H5-Val95 (O) = 2.112 Å
	Van der Waals	H5-Tyr94 (HE2) = 2.011 Å	-

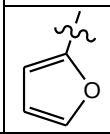
		H2-Asp96 (HA) = 2.167 Å	
Compound No. 26	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	O15-Tyr94 (HD2) = 2.201 Å O18-Met145 (HE2) = 1.905 Å	-
	Van der Waals	H6-Leu17 (HD) = 1.723 Å H2-Val72 (HG11) = 1.770 Å H6-Tyr94 (HE2) = 2.068 Å H5-Met145 (HE1) = 1.968 Å H3-Met155 (HE2) = 2.059 Å Br24-Asp156 (HN) = 2.123 Å	H9-Asp96 (HA) = 2.099 Å H8-Gly97 (HN) = 1.475 Å
Compound No. 45	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	O18-Tyr94 (HD2) = 2.108 Å H5-Val95 (O) = 2.071 Å O18- Val95 (HN) = 2.368 Å	H8-Glu93 (O) = 2.126 Å
	Van der Waals	H5-Tyr94 (HE2) = 2.100 Å H2-Asp95 (HA) = 1.991 Å	H7-Val72 (HG11) = 2.241 Å H9-Met92 (HB1) = 2.234 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**

Compound No. 46			EtO
	H-bond	H2-Val95 (O) = 2.055 Å Br27-Met145 (HE1) = 2.194 Å O18-Asp156 (HA) = 2.062 Å	O19-Asp156 (HN) = 1.529 Å
	Van der Waals	H6-Met92 (SD) = 2.165 Å O15-Met92 (HB1) = 2.496 Å H1-Tyr94 (HA) = 2.305 Å H2-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å H1-Val95 (HN) = 1.516 Å	H9-Ala63 (HB1) = 2.113 Å H11-Val72 (HB) = 1.930 Å H7-Met92 (HE3) = 2.072 Å H8-Phe157 (HN) = 2.162 Å
Compound No. 53	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			Isopropyl
	H-bond	-O15-Met92 (HB1) = 2.189 Å H2-Val95 (O) = 1.976 Å O18-Asp156 (HN) = 1.306 Å	H12-Asp156 (OD1) = 1.687 Å
	Van der Waals	H9-Val72 (HG11) = 1.314 Å H2-Tyr94 (HE2) = 2.279 Å H1-Tyr94 (HD2) = 2.295 Å H1-Tyr94 (HA) = 2.103 Å H1-Val95 (HN) = 1.810 Å H5-Gly97 (HN) = 2.401 Å	H13-Val25 (HG21) = 2.163 Å H14-Lys40 (HD1) = 1.893 Å H15-Met95 (HE1) = 1.282 Å H16-Asp156 (HA) = 1.303 Å

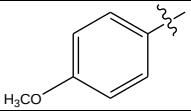
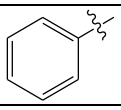
		H5-Met145 (HE1) = 0.895 Å	
Compound No. 72	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	-	O32-Leu17 (HB2) = 2.013 Å H36-Leu17 (O) = 2.172 Å O18-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å O19-Met145 (HE1) = 1.855 Å
	Van der Waals	H8-Val72 (HG11) = 1.650 Å H7-Met92 (HE1) = 2.349 Å H2-Val95 (HB) = 1.626 Å H7-Asp156 (HN) = 1.526 Å	H9-Leu17 (HD12) = 1.948 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å H21-Val25 (HG21) = 1.615 Å H13-Met145 (HE2) = 1.647 Å
Compound No. 73	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	O14-Val95 (HN) = 2.065 Å H2-Val95 (O) 1.583 Å	H15-Gly97 (O) = 1.848 Å O17-Met145 (HE1) = 2.250 Å O33-Met155 (HE1) = 2.416 Å
	Van der Waals	H5-Val72 (HG11) = 1.532 Å H8-Met92 (HE1) = 1.922 Å H5-Met92 (SD) = 2.375 Å H9-Met155 (HB2) = 1.874 Å H9-Asp156 (HN) = 1.226 Å H7-Asp156 (HB1) = 2.056 Å	H18-Leu17 (O) = 2.353 Å H35-Gly18 (HA2) = 2.194 Å H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å H14-Thr99 (HG22) = 1.782 Å H11-Met145 (HE2) = 2.156 Å
	Interaction	**Substituent**	

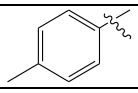
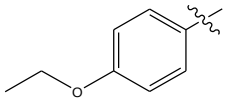
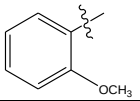
Compound No. 76		**R**	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	H4-Tyr94 (HE2) = 1.447 Å H10-Gly97 (O) = 1.790 Å	O33-Val72 (HG11) = 2.012 Å H21-Glu93 (O) = 2.493 Å H14-Asp156 (OD1) = 1.773 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HB2) = 1.848 Å H10-Val98 (HA) = 1.717 Å H8-Thr99 (HG22) = 1.808 Å H9-Met145 (HE2) = 2.045 Å	H11-Val25 (HG21) = 1.570 Å H13-Met92 (HE1) = 1.952 Å H20-Val95 (HB) = 2.229 Å H13-Asp156 (HA) = 2.256 Å
Compound No. 77	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	H20-Phe19 (O) = 2.445 Å O48-Val25 (HG21) = 2.508 Å O16-Val95 (HB) = 2.269 Å H17-Asp156 (OD1) = 1.515 Å	H16-Asp96 (OD2) = 2.026 Å H11-Gly97 (O) = 1.517 Å O17-Met145 (HE1) = 2.145 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HD13) = 2.149 Å H23-Val72 (HG11) = 1.598 Å H18-Asp156 (HA) = 2.091 Å	H7-Leu17 (HD23) = 1.926 Å H34-Gly97 (HN) = 1.961 Å H4-Met145 (HE2) = 2.235 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl

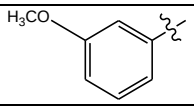
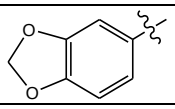
Compound No. 83	H-bond	H10-Gly97 (O) = 1.790 Å	O18-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å O19-Met145 (HE1) = 1.855 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HD13) = 1.149 Å H23-Val72 (HG11) = 1.898 Å	H9-Leu17 (HD12) = 1.948 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å
Compound No. 84	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.482 Å H1-Val95 (O) = 1.508 Å O17-Met155 (HB2) = 2.315 Å-	O14-Leu17 (HD12) = 2.425 Å O33-Val72 (HG11) = 2.254 Å
	Van der Waals	H1-Tyr94 (HA) = 2.103 Å H1-Val95 (HN) = 1.810 Å H5-Gly97 (HN) = 2.401 Å	H7-Met92 (HE3) = 2.072 Å H8-Phe157 (HN) = 2.162 Å
Compound No. 86	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	O23-Met145 (HE1) = 1.786 Å O16-Met155 (HB2) = 2.433 Å O16-Asp156 (HN) = 1.677 Å Br24-Asp156 (HN) = 2.123 Å	O14-Leu17 (HD12) = 2.425 Å O33-Val72 (HG11) = 2.254 Å
	Van der Waals	H1-Tyr94 (HA) = 2.103 Å H1-Val95 (HN) = 1.810 Å	H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å H14-Thr99 (HG22) = 1.782 Å H11-Met145 (HE2) = 2.156 Å

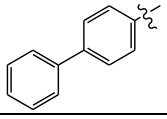
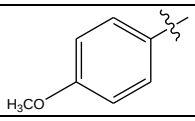
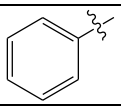
		H5-Gly97 (HN) = 2.401 Å H5-Met145 (HE1) = 0.895 Å	
Compound No. 87	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	O17-Met155 (HB2) = 2.315 Å	O18-Asp156 (HN) = 1.306 Å
	Van der Waals	H6-Tyr94 (HE2) = 2.068 Å H5-Met145 (HE1) = 1.968 Å H3-Met155 (HE2) = 2.059 Å	H21-Val25 (HG21) = 1.615 Å H13-Met145 (HE2) = 1.647 Å

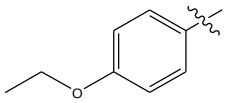
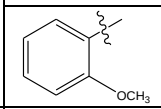
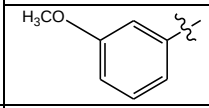
ตารางที่ 121 แสดงอันตรกิริยาที่สำคัญคัญของสารอนุพันธ์ 4-oxo-crotonic acid ที่มี % inhibition ปานกลางในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB

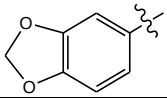
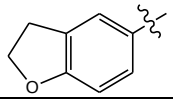
Compound No. 11	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	- H3-Val95 (0) = 1.756 Å O23-Met145 (HE1) = 1.786 Å O16-Met155 (HB2) = 2.433 Å	O18-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å O19-Met145 (HE1) = 1.855 Å
	Van der Waals	H5-Gly97 (HN) = 2.401 Å H5-Met145 (HE1) = 0.895 Å	H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å H14-Thr99 (HG22) = 1.782 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO

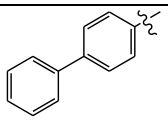
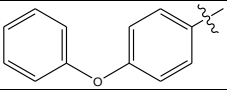
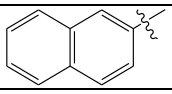
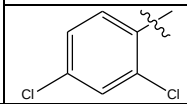
Compound No. 12	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.039 Å H3-Val95 (O) = 1.756 Å	O32-Leu17 (HB2) = 2.013 Å H36-Leu17 (O) = 2.172 Å
	Van der Waals	H5-Met145 (HE1) = 1.968 Å H3-Met155 (HE2) = 2.059 Å	H1-Val95 (HN) = 1.810 Å H5-Gly97 (HN) = 2.401 Å H5-Met145 (HE1) = 0.895 Å
Compound No. 13	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	H2-Val95 (O) = 1.976 Å O18-Asp156 (HN) = 1.306 Å	H6-Asp156 (OD1) = 1.979 Å O18-Asp156 (HB1) = 2.236 Å
	Van der Waals	H9-Val72 (HG11) = 1.314 Å H2-Tyr94 (HE2) = 2.279 Å H1-Tyr94 (HD2) = 2.295 Å	H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å H14-Thr99 (HG22) = 1.782 Å
Compound No. 14	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	O23-Met145 (HE1) = 1.786 Å O16-Met155 (HB2) = 2.433 Å	H6-Glu59 (OE1) = 2.223 O17-Met92 (HE1) = 1.862 Å
	Van der Waals	H7-Met92 (HE3) = 2.072 Å H8-Phe157 (HN) = 2.162 Å	H8-Met92 (HE1) = 1.741 Å H8-Asp156 (HA) = 1.981 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO

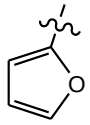
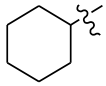
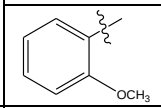
Compound No. 15	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.039 Å O23-Met145 (HE1) = 1.786 Å	H6-Glu59 (OE1) = 2.023 O17-Met92 (HE1) = 1.752 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.097 Å H5-Val25 (HG21) = 2.259 Å	H6-Lys40 (HD1) = 2.251 Å H7-Asp156 (HA) = 2.150 Å
Compound No. 16	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	H4-Tyr94 (HE2) = 1.847 Å H10-Gly97 (O) = 1.850 Å	O33-Val72 (HG11) = 2.112 Å H21-Glu93 (O) = 2.503 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HB2) = 2.048 Å H10-Val98 (HA) = 2.317 Å H9-Met145 (HE2) = 2.045 Å	H11-Val25 (HG21) = 2.370 Å H20-Val95 (HB) = 2.229 Å H13-Asp156 (HA) = 2.256 Å
Compound No. 19	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.039 Å H3-Val95 (O) = 1.756 Å O23-Met145 (HE1) = 1.786 Å	O17-Met92 (HE1) = 1.962 Å H8-Asp156 (OD1) = 2.446 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.397 Å H11-Val72 (HG11) = 2.373 Å	H6-Lys40 (HD1) = 2.095 Å H7-Asp156 (HA) = 2.180 Å

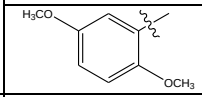
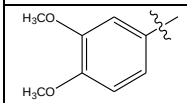
		H1-Tyr94 (HD2) = 2.278 Å	
Compound No. 21	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	H10-Gly97 (O) = 2.190 Å	O18-Tyr94 (HE2) = 2.355 Å O19-Met145 (HE1) = 1.955 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HD13) = 2.149 Å H23-Val72 (HG11) = 2.198 Å	H9-Leu17 (HD12) = 2.048 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.231 Å
Compound No. 31	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.239 Å O23-Met145 (HE1) = 2.386 Å	H6-Glu59 (OE1) = 2.323 H8-Asp156 (OD1) = 2.384 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.397 Å H5-Val25 (HG21) = 2.152 Å H11-Val72 (HG11) = 2.343 Å	H6-Lys40 (HD1) = 2.391 Å H7-Asp156 (HA) = 2.280 Å
Compound No. 32	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.139 Å H3-Val95 (O) = 2.456 Å	H8-Glu93 (O) = 2.326 Å
	Van der Waals	H5-Met145 (HE1) = 2.358 Å	H7-Val72 (HG11) = 2.341 Å H9-Met92 (HB1) = 2.269 Å

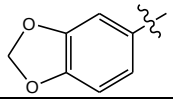
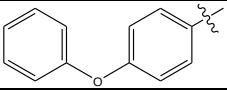
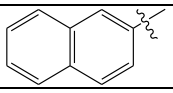
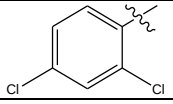
		H3-Met155 (HE2) = 2.269 Å	
Compound No. 34	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.473 Å H1-Val95 (O) = 2.508 Å	H8-Glu93 (HD1) = 2.326 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.356 Å H4-Val72 (HG11) = 2.150 Å H2-Val95 (HN) = 2.176 Å	H7-Val72 (HG11) = 2.401 Å H9-Met92 (HB1) = 2.375 Å
Compound No. 35	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	H2-Val95 (O) = 2.255 Å O18-Asp156 (HA) = 2.162 Å	O19-Asp156 (HN) = 2.329 Å
	Van der Waals	H6-Met92 (SD) = 2.265 Å H2-Tyr94 (HE2) = 2.155 Å H1-Val95 (HN) = 2.316 Å	H9-Ala63 (HB1) = 2.283 Å H11-Val72 (HB) = 2.400 Å H7-Met92 (HE3) = 2.172 Å H8-Phe157 (HN) = 2.362 Å
Compound No. 36	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	H4-Tyr94 (HE2) = 2.447 Å	O33-Val72 (HG11) = 2.212 Å

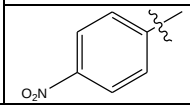
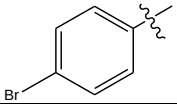
		H10-Gly97 (O) = 2.390 Å	
	Van der Waals	H2-Leu17 (HB2) = 2.348 Å H10-Val98 (HA) = 2.117 Å H8-Thr99 (HG22) = 1.908 Å H9-Met145 (HE2) = 2.245 Å	H11-Val25 (HG21) = 2.370 Å H20-Val95 (HB) = 2.379 Å H13-Asp156 (HA) = 2.356 Å
Compound No. 39	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.139 Å O23-Met145 (HE1) = 2.386 Å	O17-Met92 (HE1) = 2.062 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.397 Å H11-Val72 (HG11) = 2.373 Å H1-Tyr94 (HD2) = 2.378 Å	H6-Lys40 (HD1) = 2.295 Å H7-Asp156 (HA) = 2.280 Å
Compound No. 40	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	O23-Met145 (HE1) = 2.256 Å	O17-Met92 (HE1) = 2.262 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.237 Å H11-Val72 (HG11) = 2.253 Å	H6-Lys40 (HD1) = 2.345 Å H7-Asp156 (HA) = 2.250 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**

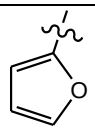
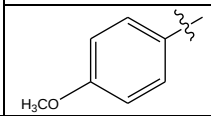
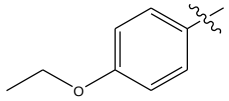
Compound No. 41			EtO
	H-bond	H10-Gly97 (O) = 2.390 Å H10-Glu93 (O) = 2.239 Å	O18-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å O19-Met145 (HE1) = 2.055 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HD13) = 2.149 Å H23-Val72 (HG11) = 2.198 Å	H9-Leu17 (HD12) = 2.248 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.331 Å
Compound No. 42	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	H1-Val95 (O) = 2.319 Å	H8-Glu93 (O) = 2.326 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.256 Å H4-Val72 (HG11) = 2.050 Å H2-Val95 (HN) = 2.276 Å	H7-Val72 (HG11) = 2.301 Å H9-Met92 (HB1) = 2.275 Å
Compound No. 43	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	H10-Gly97 (O) = 1.790 Å	H10-Gly97 (O) = 1.790 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HD13) = 1.149 Å H23-Val72 (HG11) = 1.898 Å	H2-Leu17 (HD13) = 2.359 Å H23-Val72 (HG11) = 2.158 Å
Compound No. 44	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.482 Å	O19-Asp156 (HN) = 2.229 Å

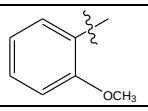
		Cl24-Met155 (HB2) = 2.315 Å-	
	Van der Waals	H1-Tyr94 (HA) = 2.303 Å H1-Val95 (HN) = 2.315 Å H5-Gly97 (HN) = 2.401 Å	H9-Ala63 (HB1) = 2.113 Å H11-Val72 (HB) = 2.350 Å
Compound No. 47	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	O17-Met155 (HB2) = 2.452 Å	O18-Asp156 (HN) = 1.306 Å
	Van der Waals	H6-Tyr94 (HE2) = 2.068 Å H5-Met145 (HE1) = 1.968 Å	H21-Val25 (HG21) = 2.402 Å H13-Met145 (HE2) = 2.347 Å
Compound No. 49	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	H3-Val95 (O) = 2.256 Å	H8-Glu96 (O) = 2.126 Å
	Van der Waals	H5-Met145 (HE1) = 2.058 Å H3-Met155 (HE2) = 2.169 Å	H7-Val72 (HG11) = 2.251 Å H9-Met92 (HB1) = 2.029 Å
Compound No. 55	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	-O15-Met92 (HB1) = 2.189 Å H2-Val95 (O) = 1.976 Å	H12-Asp156 (OD1) = 1.687 Å

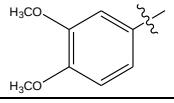
		O18-Asp156 (HN) = 1.306 Å	
	Van der Waals	H9-Val72 (HG11) = 1.314 Å H2-Tyr94 (HE2) = 2.279 Å	H13-Val25 (HG21) = 2.163 Å H14-Lys40 (HD1) = 1.893 Å H15-Met95 (HE1) = 1.282 Å
Compound No. 57	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	O48-Val25 (HG21) = 2.508 Å O16-Val95 (HB) = 2.269 Å H17-Asp156 (OD1) = 1.515 Å	H16-Asp96 (OD2) = 2.026 Å H11-Gly97 (O) = 1.517 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HD13) = 2.149 Å H23-Val72 (HG11) = 1.598 Å H18-Asp156 (HA) = 2.091 Å	H7-Leu17 (HD23) = 1.926 Å H34-Gly97 (HN) = 1.961 Å H4-Met145 (HE2) = 2.235 Å
Compound No. 58	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.482 Å H1-Val95 (O) = 1.508 Å	H6-Asp156 (OD1) = 1.979 Å O18-Asp156 (HB1) = 2.236 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.356 Å H4-Val72 (HG11) = 2.000 Å H2-Val95 (HN) = 1.156 Å	H8-Met92 (HE1) = 1.741 Å H8-Asp156 (HA) = 1.981 Å
	Interaction	**Substituent**	

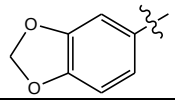
Compound No. 59		**R**	**R'**
			isopropyl
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.139 Å O23-Met145 (HE1) = 2.386 Å	H12-Asp156 (OD1) = 1.687 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.397 Å H11-Val72 (HG11) = 2.373 Å	H13-Val25 (HG21) = 2.163 Å H14-Lys40 (HD1) = 1.893 Å
Compound No. 62	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	H1-Val95 (O) = 2.319 Å	
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.256 Å H4-Val72 (HG11) = 2.050 Å H2-Val95 (HN) = 2.276 Å	H9-Asp96 (HA) = 2.099 Å H8-Gly97 (HN) = 1.475 Å
Compound No. 63	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	H10-Gly97 (O) = 1.790 Å	O18-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å O19-Met145 (HE1) = 1.855 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HD13) = 1.149 Å H23-Val72 (HG11) = 1.898 Å	H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å H14-Thr99 (HG22) = 1.782 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl

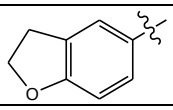
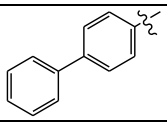
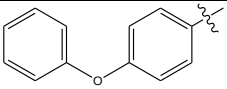
Compound No. 64	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.482 Å Cl24-Met155 (HB2) = 2.315 Å-	H6-Glu59 (OE1) = 2.023 O17-Met92 (HE1) = 1.752 Å
	Van der Waals	H1-Tyr94 (HA) = 2.303 Å H5-Gly97 (HN) = 2.401 Å	H6-Lys40 (HD1) = 2.251 Å H7-Asp156 (HA) = 2.150 Å
Compound No. 65	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	O18-Tyr94 (HD2) = 2.061 Å -	H9-Glu93 (O) = 2.207 Å O19-Val95 (HN) = 2.275 Å H5-Val95 (O) = 2.112 Å
	Van der Waals	H5-Tyr94 (HE2) = 2.011 Å H2-Asp96 (HA) = 2.167 Å	-
Compound No. 66	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	O15-Tyr94 (HD2) = 2.201 Å O18-Met145 (HE2) = 1.905 Å	H10-Gly97 (O) = 1.790 Å
	Van der Waals	H6-Leu17 (HD) = 1.723 Å H2-Val72 (HG11) = 1.770 Å H3-Met155 (HE2) = 2.059 Å Br24-Asp156 (HN) = 2.123 Å	H2-Leu17 (HD13) = 2.359 Å H23-Val72 (HG11) = 2.158 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**

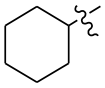
Compound No. 67			isopropyl
	H-bond	O17-Met155 (HB2) = 2.315 Å	O18-Asp156 (HN) = 1.306 Å
	Van der Waals	H6-Tyr94 (HE2) = 2.068 Å H5-Met145 (HE1) = 1.968 Å	H21-Val25 (HG21) = 1.615 Å H13-Met145 (HE2) = 1.647 Å
Compound No. 71	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.039 Å H3-Val95 (O) = 1.756 Å O23-Met145 (HE1) = 1.786 Å	O14-Leu17 (HD12) = 2.425 Å O33-Val72 (HG11) = 2.254 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.297 Å H5-Val25 (HG21) = 2.086 Å H11-Val72 (HG11) = 2.343 Å	H7-Met92 (HE3) = 2.072 Å H8-Phe157 (HN) = 2.162 Å
Compound No. 74	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.473 Å H1-Val95 (O) = 2.508 Å	H16-Asp96 (OD2) = 2.026 Å H11-Gly97 (O) = 1.517 Å O17-Met145 (HE1) = 2.145 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.356 Å H4-Val72 (HG11) = 2.150 Å H2-Val95 (HN) = 2.176 Å	H7-Leu17 (HD23) = 1.926 Å H34-Gly97 (HN) = 1.961 Å H4-Met145 (HE2) = 2.235 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**

Compound No. 75			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	H2-Val95 (O) = 2.255 Å O18-Asp156 (HA) = 2.162 Å	O32-Leu17 (HB2) = 2.013 Å H36-Leu17 (O) = 2.172 Å
	Van der Waals	H6-Met92 (SD) = 2.265 Å H2-Tyr94 (HE2) = 2.155 Å	H9-Leu17 (HD12) = 1.948 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å

Compound No. 78	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.482 Å H1-Val95 (O) = 1.508 Å O17-Met155 (HB2) = 2.315 Å	H15-Gly97 (O) = 1.848 Å O17-Met145 (HE1) = 2.250 Å O33-Met155 (HE1) = 2.416 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.356 Å H4-Val72 (HG11) = 2.000 Å H2-Val95 (HN) = 1.156 Å	H18-Leu17 (O) = 2.353 Å H35-Gly18 (HA2) = 2.194 Å H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å

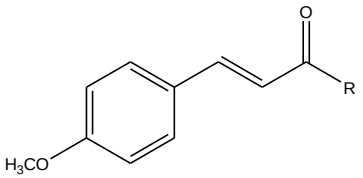
Compound No. 79	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.039 Å H3-Val95 (O) = 1.756 Å	O18-Asp156 (HN) = 1.306 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.397 Å H11-Val72 (HG11) = 2.373 Å	H21-Val25 (HG21) = 1.615 Å H13-Met145 (HE2) = 1.647 Å

Compound No. 80	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.139 Å O23-Met145 (HE1) = 2.386 Å	O18-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å O19-Met145 (HE1) = 1.855 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.397 Å H11-Val72 (HG11) = 2.373 Å	H9-Leu17 (HD12) = 1.948 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å
Compound No. 81	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	H10-Gly97 (O) = 2.390 Å H10-Glu93 (O) = 2.239 Å	O14-Leu17 (HD12) = 2.425 Å O33-Val72 (HG11) = 2.254 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HD13) = 2.149 Å H23-Val72 (HG11) = 2.198 Å	H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å H11-Met145 (HE2) = 2.156 Å
Compound No. 82	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	H1-Val95 (O) = 2.319 Å	O32-Leu17 (HB2) = 2.013 Å H36-Leu17 (O) = 2.172 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.256 Å H4-Val72 (HG11) = 2.050 Å H2-Val95 (HN) = 2.276 Å	H9-Leu17 (HD12) = 1.948 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å
	Interaction	**Substituent**	

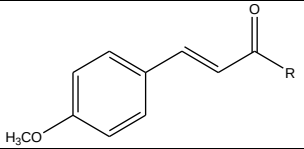
Compound No. 88		**R**	**R'**
		Methyl	2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	-	O32-Leu17 (HB2) = 2.013 Å H36-Leu17 (O) = 2.172 Å
	Van der Waals	H5-Val25 (HG21) = 2.086 Å H11-Val72 (HG11) = 2.343 Å H1-Tyr94 (HD2) = 2.178 Å	H9-Leu17 (HD12) = 1.948 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å H21-Val25 (HG21) = 1.615 Å
Compound No. 89	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	H3-Val95 (O) = 2.256 Å	H12-Asp156 (OD1) = 1.687 Å
	Van der Waals	H5-Met145 (HE1) = 2.058 Å H3-Met155 (HE2) = 2.169 Å	H13-Val25 (HG21) = 2.163 Å H14-Lys40 (HD1) = 1.893 Å

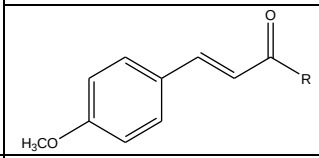
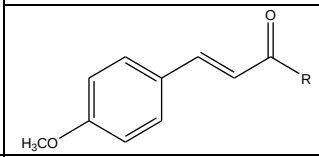
อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-oxo-crotonic acid ที่มี % inhibition ต่ำในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB แสดงดังตารางที่ 119

ตารางที่ 122 แสดงอันตรกิริยาที่สำคัญคัญของสารอนุพันธ์ 4-oxo-crotonic acid ที่มี % inhibition ต่ำในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB

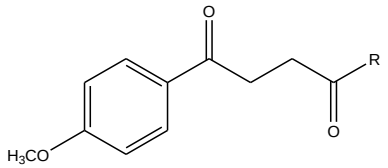


General structure of compound No. 1-3

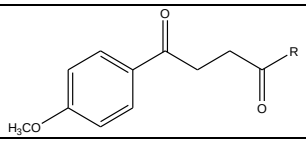
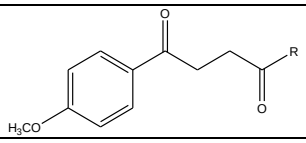
Compound No. 1	**Interaction**	**Substituent**	
		Core	**R**
			OH

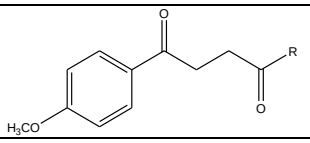
	H-bond	O15-Tyr94 (HD2) = 2.201 Å O18-Met145 (HE2) = 1.905 Å	-
	Van der Waals	H6-Leu17 (HD) = 1.723 Å H2-Val72 (HG11) = 1.770 Å H3-Met155 (HE2) = 2.059 Å	H13-Val25 (HG21) = 2.163 Å
Compound No. 2	**Interaction**	**Substituent**	
		Core	**R**
			OCH_3
	H-bond	O15-Tyr94 (HD2) = 2.401 Å O18-Met145 (HE2) = 2.205 Å	H6-Glu59 (OE1) = 2.223 O17-Met92 (HE1) = 1.862 Å H8-Asp156 (OD1) = 2.346 Å
	Van der Waals	H6-Leu17 (HD) = 1.956 Å H2-Val72 (HG11) = 1.605 Å H3-Met155 (HE2) = 2.203 Å	H6-Lys40 (HD1) = 1.991 Å H7-Asp156 (HA) = 1.180 Å
Compound No. 3	**Interaction**	**Substituent**	
		Core	**R**
			NH_2
	H-bond	O15-Tyr94 (HD2) = 1.971 Å O18-Met145 (HE2) = 1.524 Å	-
	Van der Waals	H6-Leu17 (HD) = 2.051 Å	H21-Val25 (HG21) = 1.615 Å

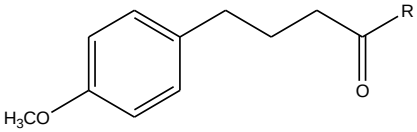
		H2-Val72 (HG11) = 1.842 Å H3-Met155 (HE2) = 2.102 Å	H13-Met145 (HE2) = 1.647 Å



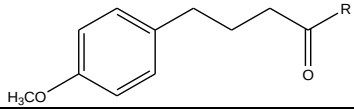
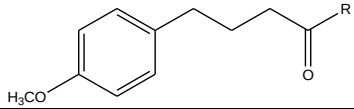
General structure of compound No. 4-6

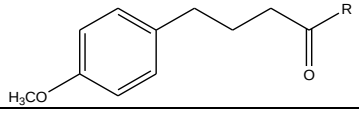
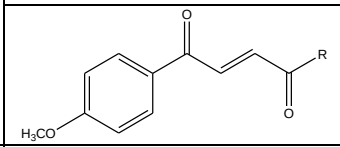
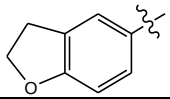
Compound No. 4	**Interaction**	**Substituent**	
		Core	**R**
			OH
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.039 Å H3-Val95 (O) = 1.756 Å	H10-Glu93 (O) = 2.039 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.297 Å H5-Val25 (HG21) = 2.086 Å	H14-Leu17 (HD23) = 2.297 Å H5-Val25 (HG21) = 2.086 Å H11-Val72 (HG11) = 2.343 Å
Compound No. 5	**Interaction**	**Substituent**	
		Core	**R**
			OCH_3
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.145 Å H3-Val95 (O) = 2.256 Å	O18-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å O19-Met145 (HE1) = 1.855 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.158 Å H5-Val25 (HG21) = 2.293 Å	H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å H14-Thr99 (HG22) = 1.782 Å
	Interaction	**Substituent**	

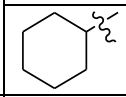
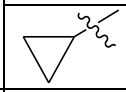
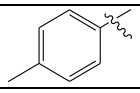
		Core	R
Compound No. 6			NH_2
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.035 Å H3-Val95 (O) = 1.752 Å	-
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 1.236 Å H5-Val25 (HG21) = 2.053 Å	H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å H14-Thr99 (HG22) = 1.782 Å H11-Met145 (HE2) = 2.156 Å



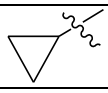
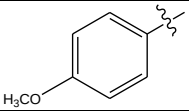
General structure of compound No. 7-9

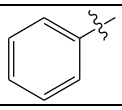
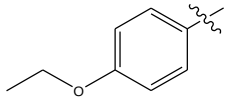
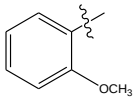
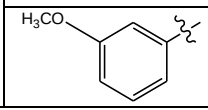
	Interaction	**Substituent**	
		Core	**R**
Compound No. 7			OH
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.482 Å H1-Val95 (O) = 1.508 Å	H6-Asp156 (OD1) = 1.979 Å O18-Asp156 (HB1) = 2.236 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.356 Å H4-Val72 (HG11) = 2.000 Å H2-Val95 (HN) = 1.156 Å	H8-Met92 (HE1) = 1.741 Å H8-Asp156 (HA) = 1.981 Å
	Interaction	**Substituent**	
		Core	**R**
Compound No. 8			OCH_3
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.281 Å H1-Val95 (O) = 2.528 Å	O33-Val72 (HG11) = 2.112 Å

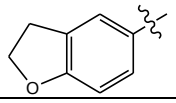
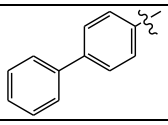
			H21-Glu93 (O) = 2.503 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.402 Å H2-Val95 (HN) = 2.183 Å	H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å H21-Val25 (HG21) = 1.615 Å
Compound No. 9	**Interaction**	**Substituent**	
		Core	**R**
			NH_2
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 1.972 Å H1-Val95 (O) = 1.541 Å	-
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 1.528 Å H2-Val95 (HN) = 2.403 Å	H9-Leu17 (HD12) = 1.948 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å H21-Val25 (HG21) = 1.615 Å
Compound No. 10	**Interaction**	**Substituent**	
		Core	**R**
			OCH_3
	H-bond	H4-Tyr94 (HE2) = 1.847 Å H10-Gly97 (O) = 1.850 Å	H6-Glu59 (OE1) = 2.223 O17-Met92 (HE1) = 1.862 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HB2) = 2.048 Å H10-Val98 (HA) = 2.317 Å H9-Met145 (HE2) = 2.045 Å	H6-Lys40 (HD1) = 1.991 Å H7-Asp156 (HA) = 1.180 Å
Compound No. 20	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	- H3-Val95 (0) = 1.756 Å O23-Met145 (HE1) = 1.786 Å	O18-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å O19-Met145 (HE1) = 1.855 Å

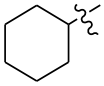
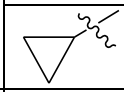
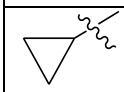
		O16-Met155 (HB2) = 2.433 Å	
	Van der Waals	H5-Gly97 (HN) = 2.401 Å H5-Met145 (HE1) = 0.895 Å	H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å H14-Thr99 (HG22) = 1.782 Å
Compound No. 28	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
		Methyl	MeO
	H-bond	-	O32-Leu17 (HB2) = 2.013 Å H36-Leu17 (O) = 2.172 Å
	Van der Waals	H5-Val25 (HG21) = 2.086 Å H11-Val72 (HG11) = 2.343 Å	H9-Leu17 (HD12) = 1.948 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å
Compound No. 29	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	H3-Val95 (O) = 2.256 Å	-
	Van der Waals	H5-Met145 (HE1) = 2.058 Å	H9-Asp96 (HA) = 2.099 Å H8-Gly97 (HN) = 1.475 Å
Compound No. 30	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			MeO
	H-bond	H18-Tyr94 (O) = 2.061 Å -	H9-Glu93 (O) = 2.207 Å O19-Val95 (HN) = 2.275 Å H5-Val95 (O) = 2.112 Å
	Van der Waals	H5-Tyr94 (HE2) = 2.011 Å H2-Asp96 (HA) = 2.167 Å	-
Compound No. 33	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	- H3-Val95 (0) = 1.756 Å	O18-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å

		O23-Met145 (HE1) = 1.786 Å O16-Met155 (HB2) = 2.433 Å	O19-Met145 (HE1) = 1.855 Å
	Van der Waals	H5-Gly97 (HN) = 2.401 Å H5-Met145 (HE1) = 0.895 Å	H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å H14-Thr99 (HG22) = 1.782 Å

Compound No. 48	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
		Methyl	EtO
	H-bond	-	H36-Leu17 (O) = 2.172 Å
	Van der Waals	H5-Val25 (HG21) = 2.086 Å H1-Tyr94 (HD2) = 2.178 Å	H9-Leu17 (HD12) = 1.948 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å
Compound No. 50	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			EtO
	H-bond	H18-Tyr94 (O) = 2.361 Å -	H9-Glu93 (O) = 2.207 Å O19-Val95 (HN) = 2.275 Å
	Van der Waals	H5-Tyr94 (HE2) = 2.211 Å H2-Asp96 (HA) = 2.055 Å	H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å
Compound No. 51	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	O18-Tyr94 (HD2) = 2.108 Å H5-Val95 (O) = 2.071 Å O18- Val95 (HN) = 2.368 Å	H8-Glu93 (O) = 2.126 Å
	Van der Waals	H5-Tyr94 (HE2) = 2.100 Å H2-Asp95 (HA) = 1.991 Å	H7-Val72 (HG11) = 2.241 Å H9-Met92 (HB1) = 2.234 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**

Compound No. 52			isopropyl
	H-bond	-O15-Met92 (HB1) = 2.189 Å H2-Val95 (O) = 1.976 Å O18-Asp156 (HN) = 1.306 Å	H12-Asp156 (OD1) = 1.687 Å
	Van der Waals	H9-Val72 (HG11) = 1.314 Å H2-Tyr94 (HE2) = 2.279 Å H1-Tyr94 (HD2) = 2.295 Å	H13-Val25 (HG21) = 2.163 Å H14-Lys40 (HD1) = 1.893 Å H15-Met95 (HE1) = 1.282 Å H16-Asp156 (HA) = 1.303 Å
Compound No. 54	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.473 Å H1-Val95 (O) = 2.508 Å	H12-Asp156 (OD1) = 1.687 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.356 Å H4-Val72 (HG11) = 2.150 Å H2-Val95 (HN) = 2.176 Å	H13-Val25 (HG21) = 2.163 Å H14-Lys40 (HD1) = 1.893 Å
Compound No. 55	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	O14-Met92 (HB1) = 2.482 Å	H6-Asp156 (OD1) = 1.979 Å O18-Asp156 (HB1) = 2.236 Å
	Van der Waals	H10-Val25 (HG11) = 2.356 Å H4-Val72 (HG11) = 2.000 Å	H8-Met92 (HE1) = 1.741 Å H8-Asp156 (HA) = 1.981 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl

Compound No. 56	H-bond	O14-Val95 (HN) = 2.065 Å	H15-Gly97 (O) = 1.848 Å O17-Met145 (HE1) = 2.250 Å
	Van der Waals	H5-Val72 (HG11) = 1.532 Å H8-Met92 (HE1) = 1.922 Å	H18-Leu17 (O) = 2.353 Å H35-Gly18 (HA2) = 2.194 Å H21-Val25 (HG21) = 2.373 Å
Compound No. 60	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	H10-Glu93 (O) = 2.139 Å O23-Met145 (HE1) = 2.386 Å	O17-Met92 (HE1) = 2.062 Å
	Van der Waals	H14-Leu17 (HD23) = 2.397 Å H11-Val72 (HG11) = 2.373 Å	H6-Lys40 (HD1) = 2.295 Å H7-Asp156 (HA) = 2.280 Å
Compound No. 61	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	H10-Gly97 (O) = 1.790 Å	O18-Tyr94 (HE2) = 2.255 Å O19-Met145 (HE1) = 1.855 Å
	Van der Waals	H2-Leu17 (HD13) = 1.149 Å H23-Val72 (HG11) = 1.898 Å	H9-Leu17 (HD12) = 1.948 Å H36-Gly18 (HA2) = 2.031 Å
Compound No. 68	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
		Methyl	isopropyl
	H-bond	-	-
	Van der Waals	H6-Tyr94 (HE2) = 2.068 Å H5-Met145 (HE1) = 1.968 Å H3-Met155 (HE2) = 2.059 Å	H21-Val25 (HG21) = 1.615 Å H13-Met145 (HE2) = 1.647 Å
	Interaction	**Substituent**	
		R	**R'**

Compound No. 69			isopropyl
	H-bond	H3-Val95 (O) = 2.256 Å	H8-Glu96 (O) = 2.126 Å
	Van der Waals	H5-Met145 (HE1) = 2.058 Å H3-Met155 (HE2) = 2.169 Å	H7-Val72 (HG11) = 2.251 Å H9-Met92 (HB1) = 2.029 Å
Compound No. 70	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			isopropyl
	H-bond	-	H9-Glu93 (O) = 2.207 Å H5-Val95 (O) = 2.112 Å
	Van der Waals	H5-Tyr94 (HE2) = 2.011 Å H2-Asp96 (HA) = 2.167 Å	-
Compound No. 90	**Interaction**	**Substituent**	
		R	**R'**
			2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl
	H-bond	-	O18-Asp156 (HN) = 1.306 Å
	Van der Waals	H6-Tyr94 (HE2) = 2.068 Å H3-Met155 (HE2) = 2.059 Å	H21-Val25 (HG21) = 1.615 Å H13-Met145 (HE2) = 1.647 Å

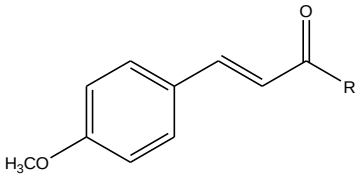
1. สารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid

วิธีการทดลอง

การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

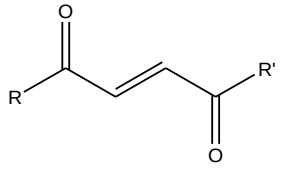
การศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตเชิงโมเลกุลโดยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน (Molecular dynamics simulations) ของสารยับยั้งที่จับกับเป้าหมายด้วยโปรแกรม AMBER16 โดยที่โครงสร้างของเอนไซม์เป้าหมายที่จับกับสารยับยั้งจากระเบียบวิธีทางโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชันนี้ได้ทำการศึกษา ระบบที่ศึกษาเป็นแบบ canonical โดยที่ตลอดเวลาการศึกษาทั้งหมดได้กำหนดให้ปริมาตรของระบบคงที่ และอุณหภูมิคงที่ที่ 300 K เป็นตัวควบคุม โดยใช้ ff14sb สำหรับพารามิเตอร์ที่อธิบายโปรตีน ใช้ RESP จากการคำนวณโดยวิธี M062X/6-31G* โมเลกุลของน้ำชนิด TIP3P ได้ถูกเติมเข้าไปในทุกระบบที่ใช้ในการศึกษาโมเลคิวลาร์ ไดนามิกส์ ซิมูเลชัน ในการกำหนดสนามแรงของลิแกนด์ และได้มีการกำหนด non-bonded cutoff ให้มีค่าเท่ากับ 10 Å และใช้ SHAKE method ช่วยในการ constrain อะตอมทั้งหมด สำหรับ time step ที่ใช้มีค่าเท่ากับ 2 fs ค่าพลังงานในการจับของสารยับยั้งที่จับกับเอนไซม์ เป้าหมาย คำนวณโดยระเบียบวิธี MM-PBSA

ตารางที่ 123 แสดงโครงสร้างและค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PknB (% inhibition) สำหรับการคำนวณการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

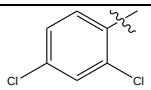
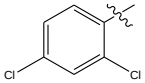
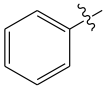
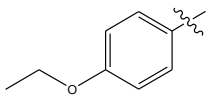
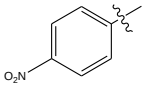
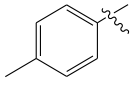
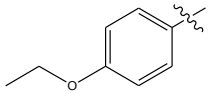
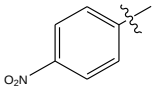


General structure of compound No. 1-2

Compound No.	R	% inhibition
1	OH	30.7±1.6
2	OCH_3	1.7±0.2

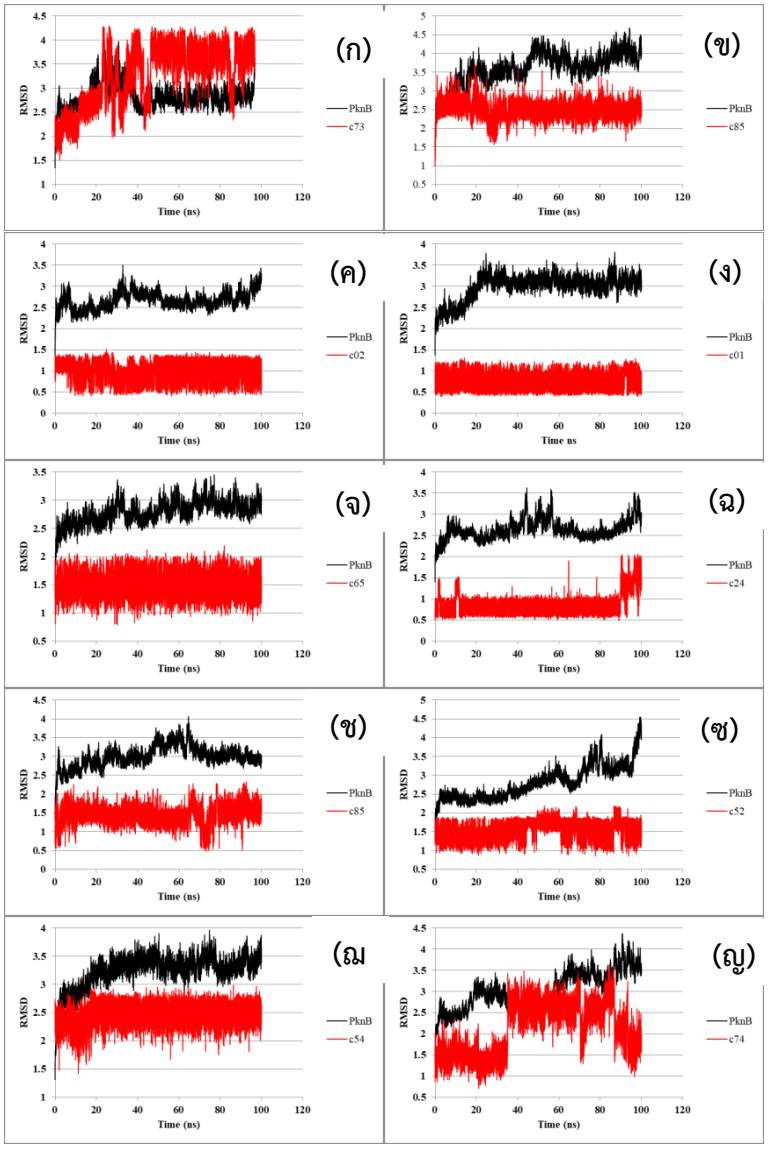


General structure of compound No. 11-90

Compound No.	R	R’	% inhibition
24		MeO	57.0±6.0
44		EtO	49.0±3.9
52		isopropyl	11.2±1.7
54		isopropyl	38.0±4.2
65		isopropyl	59.1±4.3
73		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	65.8±5.5
74		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	55.6±2.7
85		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl	87.9±5.3

ผลจากการศึกษา

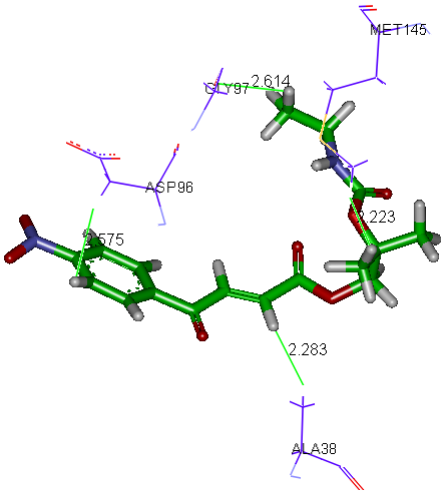
1. เพื่อตรวจสอบความน่าเชื่อถือของสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB ด้วยระเบียบวิธีการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล สำหรับการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุล การศึกษา stability ของโครงสร้างเป็นการศึกษาค่า RMSD (Root Mean Square Deviation) ระหว่างเอนไซม์ PknB กับลิแกนด์ที่เริ่มเข้าสู่สมดุลของระบบแสดงดังรูปที่ 1 จากรูปพบว่าระบบมีความเสถียรและมีความน่าเชื่อถือสำหรับนำไปศึกษารูปแบบการจับและรูปแบบการวางตัว



รูปที่ 173 แสดง ค่า **RMSD** ของสารหมายเลข 73 (ก) สารหมายเลข 85 (ข) สารหมายเลข 02 (ค) สารหมายเลข 01 (ง) สารหมายเลข 65 (จ) สารหมายเลข 24 (ฉ) สารหมายเลข 44 (ช) สารหมายเลข 52 (ซ) สารหมายเลข 54 (ฌ) สารหมายเลข 74 (ญ)

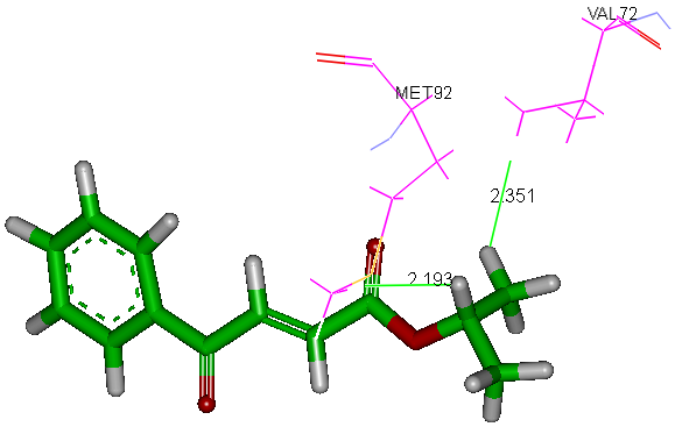
2. การวิเคราะห์อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB ด้วยระเบียบการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดคือสารหมายเลข **85** ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ PknB เท่ากับ 87.9 เปอร์เซ็นต์ มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังใน**รูปที่ 174** พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญคืออันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโน Gly97 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาแบบแวนเดอร์วาลล์กับกรดอะมิโน Ala38, Asp96 และ Met145



รูปที่ 174 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid สารหมายเลข 85 ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB ที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำที่สุดคือสารหมายเลข **52** ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ PknB เท่ากับ 11.2 เปอร์เซ็นต์ มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังใน**รูปที่ 175** พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญคืออันตรกิริยาแบบแวนเดอร์วาลล์กับกรดอะมิโน Met92 และ Val72 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารที่มีความสามารถในการยับยั้งที่สูงกว่าจะพบอันตรกิริยามากกว่าสารที่มีความสามารถในการยับยั้งที่ต่ำ



รูปที่ 175 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid สารหมายเลข **52** ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB ที่ได้จากการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

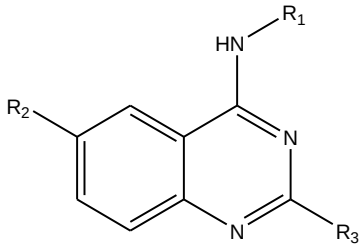
การศึกษาอันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ quinazoline เพื่อเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ PknB

วิธีการทดลอง

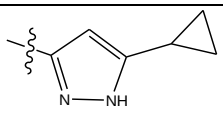
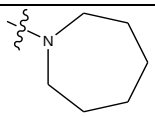
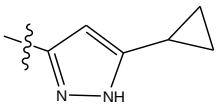
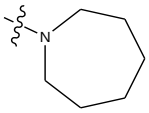
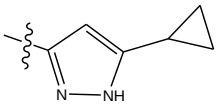
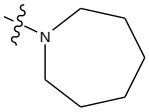
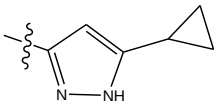
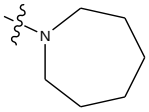
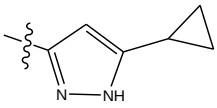
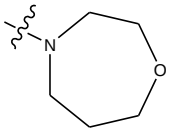
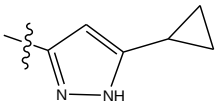
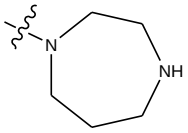
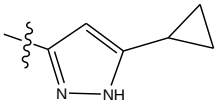
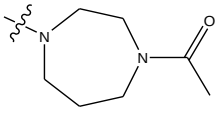
1. รวบรวมโครงสร้างของสารอนุพันธ์ quinazoline ดังแสดงใน **ตารางที่ 124**

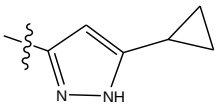
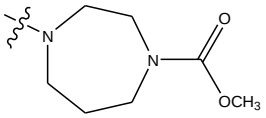
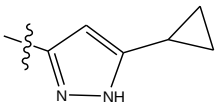
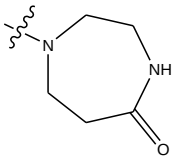
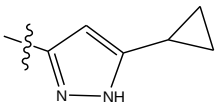
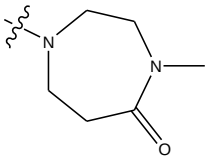
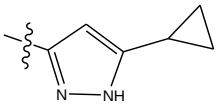
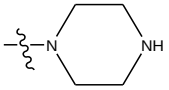
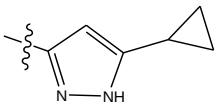
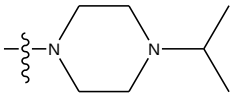
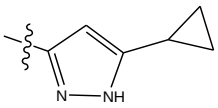
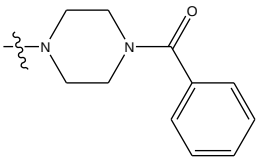
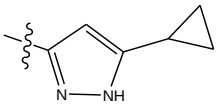
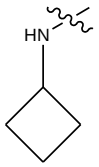
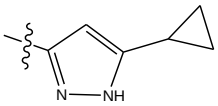
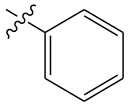
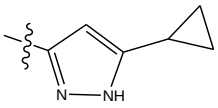
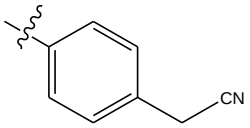
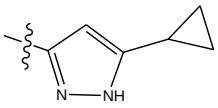
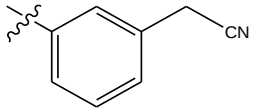
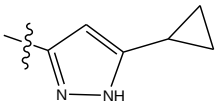
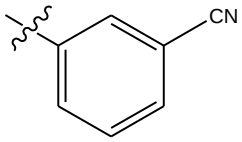
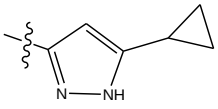
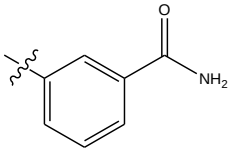
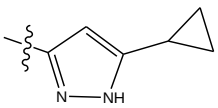
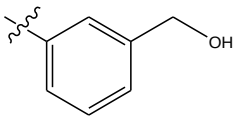
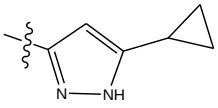
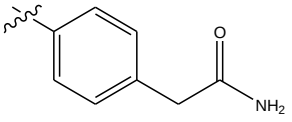
2. สร้างโครงสร้างของสารอนุพันธ์ quinazoline และคำนวณปรับโครงสร้างที่เสถียรด้วยระเบียบวิธีการคำนวณเคมีควอนตัม M062X/6-31G*

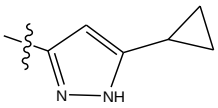
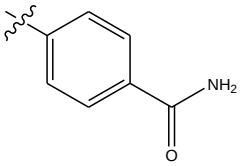
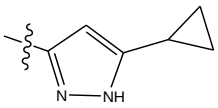
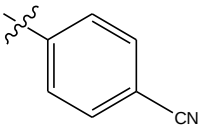
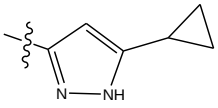
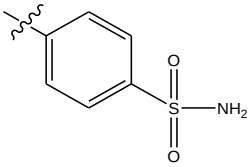
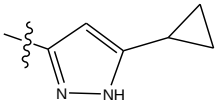
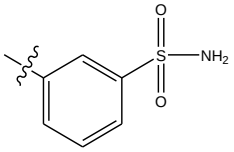
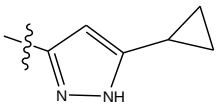
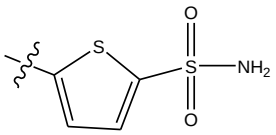
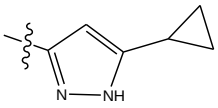
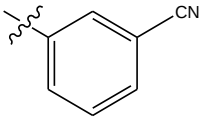
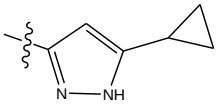
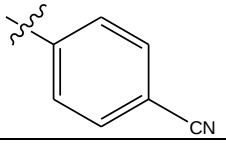
ตารางที่ 124 แสดงโครงสร้างและค่าความสามารถในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ quinazoline

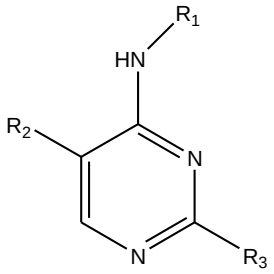


General structure of compound No. 1-28

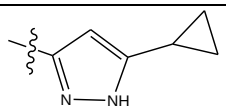
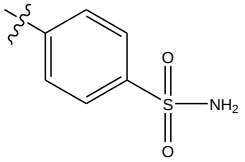
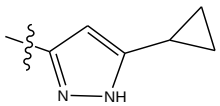
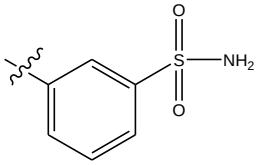
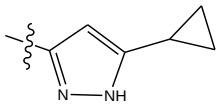
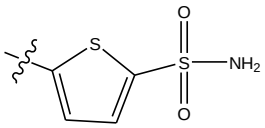
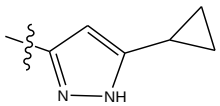
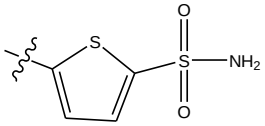
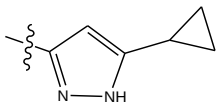
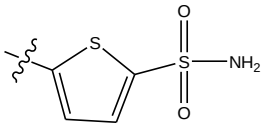
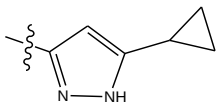
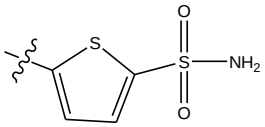
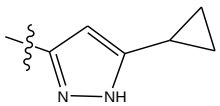
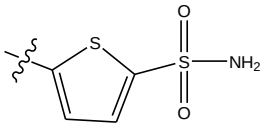
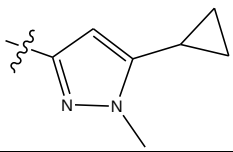
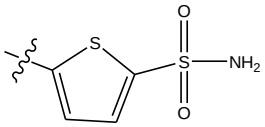
Compound No.	R_1	R_2	R_3	PknB K_i (nM)
1		Cl		150
2		F		81
3		CH_3		98
4		OCH_3		82
5		Cl		150
6		Cl		960
7		Cl		150

8		Cl		230
9		Cl		190
10		Cl		310
11		Cl		990
12		Cl		1400
13		Cl		310
14		Cl		72
15		Cl		69
16		Cl		5
17		Cl		38
18		Cl		50
19		Cl		15
20		Cl		23
21		Cl		23

22		Cl		29
23		Cl		88
24		Cl		24
25		Cl		6
26		Cl		<1
27		H		40
28		H		46

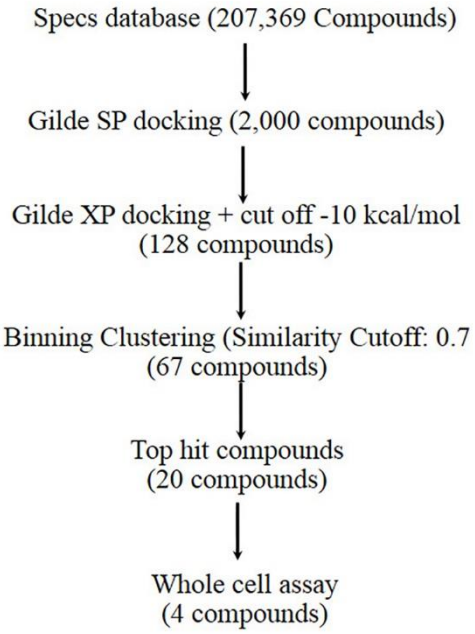


General structure of compound No. 29-36

Compound No.	R_1	R_2	R_3	PknB K_i (nM)
29		Cl		13
30		Cl		17
31		Cl		<1.3
32		H		4
33		F		<1
34		CH_3		4
35		Propyne		<2
36		CH_3		>4000

การคัดสรรเสมือนจริงและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ตัวใหม่

ฐานข้อมูล Specs ซึ่งมีโครงสร้างของลิแกนด์จำนวน 207,369 โครงสร้างเป็นฐานข้อมูลสารเพื่อที่จะค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknB ที่มีศักยภาพในการยับยั้งสูงตัวใหม่ โดยขึ้นตอนในการคัดสรรเสมือนจริงในงานวิจัยนี้แสดงดัง**รูปที่ 176** ในขั้นตอนแรกการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งโดยใช้ SP scoring ได้ถูกใช้ในการคำนวณการจับของลิแกนด์ทั้งหมดในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA แต่ละแบบและเลือกสารทั้งหมดจำนวน 2,000 ที่มีค่าพลังงานในการจับดีที่สุดในแต่ละโพรงการจับมาคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งซ้ำอีกครั้งโดยใช้ XP scoring ในขั้นตอนสุดท้ายเลือกสารทั้งหมด 128 โครงสร้างที่มีค่าพลังงานในการจับต่ำกว่า -10.00 kcal/mol มาวิเคราะห์ binning clustering เพื่อจัดกลุ่มของโครงสร้างโดยใช้ค่า similarlity cut-off เท่ากับ 0.7 และเลือกโครงสร้างที่มีค่าพลังงานต่ำสุดในแต่ล่ะกลุ่มได้ทั้งหมด 67 โครงสร้าง และ 20 โครงสร้างที่มีค่าพลังงานต่ำที่สุดไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรคแสดงดัง**ตารางที่ 125** พบว่ามี 4 โครงสร้างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรคและเหมาะสำหรับการนำไปปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้ได้ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่สูงขึ้น



รูปที่ 176 ขั้นตอนการคัดสรรเสมือนจริงเพื่อหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ตัวใหม่

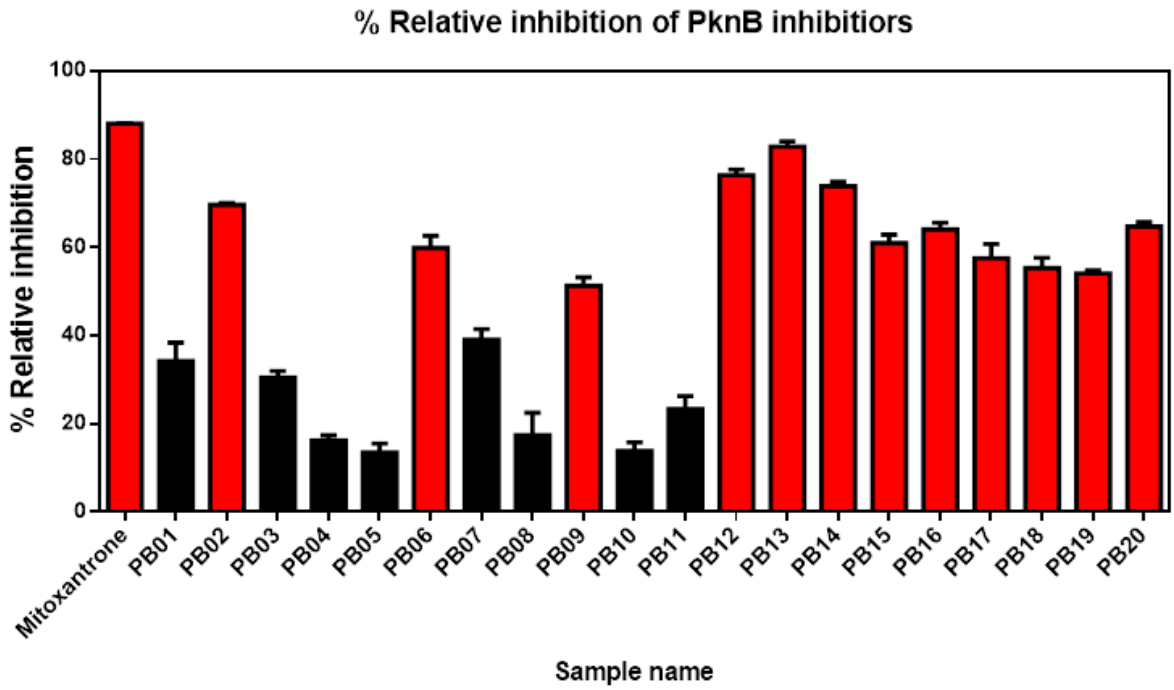
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริง

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งตัวใหม่จากฐานข้อมูล Specs แสดงดัง**ตารางที่ 125** ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้ สารยับยั้งตัวใหม่ที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริงทั้ง 20 โครงสร้างพบว่ามีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PknB อยู่ในช่วง 13.5 ± 2.02 เปอร์เซ็นต์ ถึง 82.8 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของสารยับยั้งเท่ากับ 1 μM ซึ่งพบว่ามีสารยับยั้งตัวใหม่ที่มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ PknB ได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน mitoxantrone (88.0 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์)

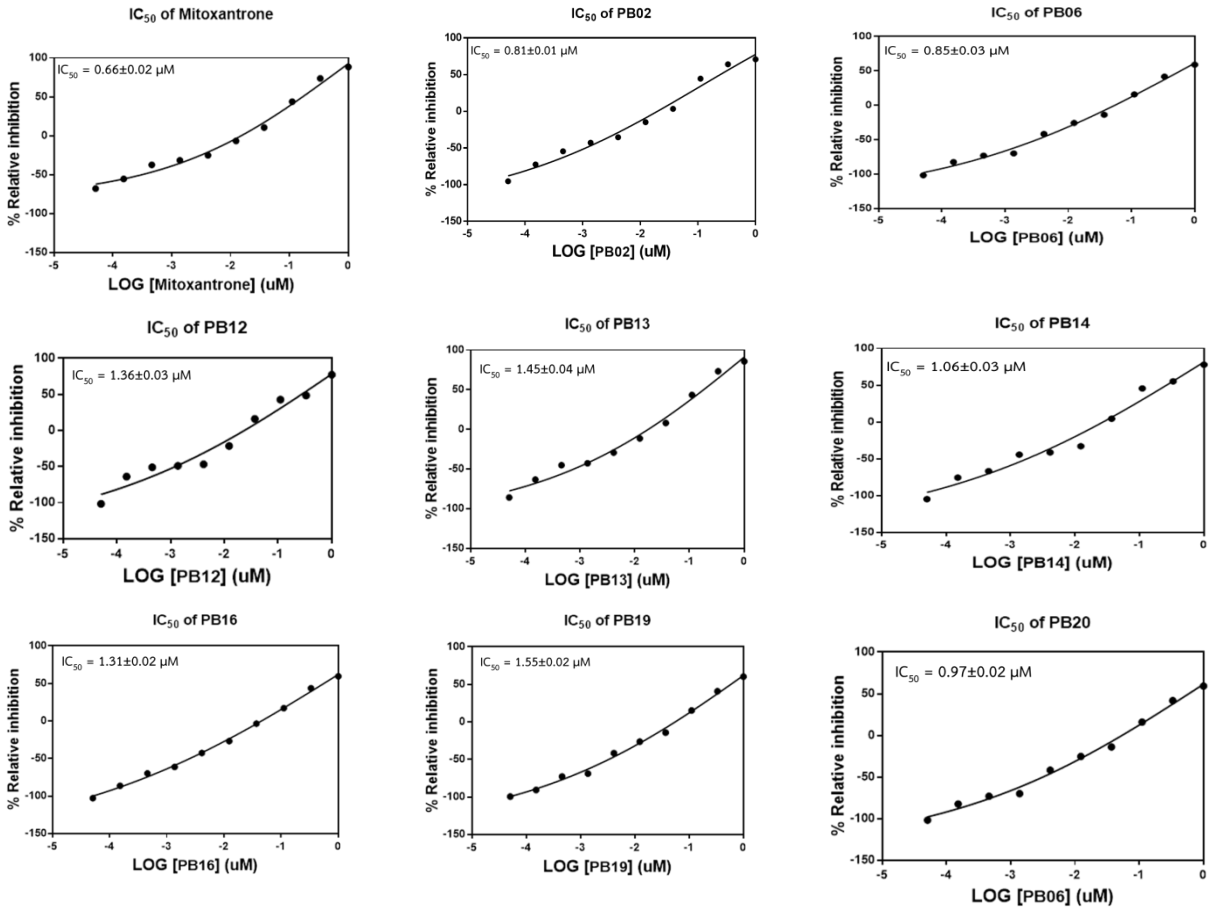
จำนวน 1 โครงสร้างคือสารหมายเลข PB13 (82.8 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงใน**รูปที่ 125** ดังนั้นแล้วเพื่อให้ได้สารยับยั้งตัวใหม่ที่มีโครงสร้างที่หลากหลายจึงเลือกสารยับยั้งที่มีค่าการยับยั้งตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป (มีจำนวนทั้งหมด 12 โครงสร้าง) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PknB ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยผลจากการศึกษาเฉลี่ย 3 ครั้ง พบว่ามีสารทั้งหมด 3 โครงสร้างคือ PB02 (IC_{50} = 0.81±0.01 μM) PB06 (IC_{50} = 0.85±0.03 μM) และ PB20 (IC_{50} = 0.97±0.02 μM) ที่มีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน mitoxantrone (IC_{50} = 0.66±0.02 μM) ดังแสดงใน**รูปที่ 177** เมื่อพิจารณาผลการทดสอบกับเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรควัณโรคพบว่าสารยับยั้งทุกตัวมีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเซลล์ (MIC) ที่มากกว่า 100 μg/ml ยกเว้นสารยับยั้งหมายเลข PB02 (MIC = 12.5 μg/ml) PB06 (MIC = 25 μg/ml) PB13 (MIC = 25 μg/ml)และ PB19 (MIC = 50 μg/ml) ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่าสารยับยั้งตัวใหม่ที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริงมีค่าการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknB ได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน mitoxantrone และมีค่าการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคก่อโรคได้สูงกว่าสารมาตรฐาน mitoxantrone [27] ดังนั้นแล้วจึงสามารถที่จะสรุปได้ว่าสารที่มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปพัฒนาโครงสร้างให้มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้นเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ PknB และเชื้อวัณโรคก่อโรคคือสารหมายเลข PB02 และ PB06

ตารางที่ 125 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งของเอนไซม์ PknB ที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริง

compound	Specs code	% inhibition	IC_{50} (μM)	MIC (μg/ml)
PB01	AS-871/43272109	34.2±4.19	ND	>100
PB02	AE-848/42799159	69.6±0.46	0.81±0.01	12.5
PB03	AG-205/12900100	30.5±1.47	ND	>100
PB04	AF-399/37305008	16.2±1.18	ND	>100
PB05	AE-641/14179094	13.5±2.02	ND	>100
PB06	AH-262/34335013	59.8±2.71	0.85±0.03	25
PB07	AJ-292/15089069	39.0±2.37	ND	>100
PB08	AJ-292/15089042	17.3±5.31	ND	>100
PB09	AP-263/43370995	51.2±1.97	ND	>100
PB10	AN-465/43369242	13.8±2.00	ND	>100
PB11	AN-465/43369755	23.3±2.96	ND	>100
PB12	AN-465/42889971	76.3±1.32	1.36±0.03	>100
PB13	AP-124/40904362	82.8±1.25	1.45±0.04	25
PB14	AK-918/10269011	73.9±0.96	1.06±0.03	>100
PB15	AN-465/43384127	60.9±1.92	ND	>100
PB16	AN-465/43369269	64.0±1.48	1.31±0.02	>100
PB17	AN-465/43421896	57.5±3.22	ND	>100
PB18	AO-365/15162008	55.2±2.34	ND	>100
PB19	AS-871/43477298	54.1±0.67	1.55±0.02	50
PB20	AN-584/43416482	64.7±1.03	0.97±0.02	>100
Mitoxantrone		82.68±1.71	0.66±0.02	400 [27]



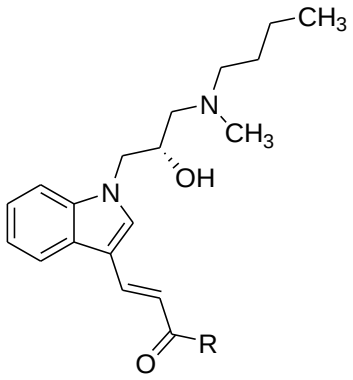
รูปที่ 177 แสดงกราฟ % relative inhibition ของสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ทั้ง 20 โครงสร้างสารที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริง



รูปที่ 178 แสดงกราฟ IC_{50} ของสารยับยั้งเอนไซม์ PknB

การออกแบบสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ตัวใหม่

ในการออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่เพื่อใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ PknB โดยเลือกโครงสร้างของ PB02 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ได้เท่ากับ 12.5 µg/ml และมีค่าความเข้มข้นของสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PknB ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 0.81±0.01 µM โดยเลือกปรับเปลี่ยนโครงสร้าง phenyl ของสาร PB02 โดยออกแบบทั้งหมด 100 โครงสร้างทำนายคุณสมบัติความเป็นยา (ADME) ของสารที่ออกแบบเพื่อให้ได้สารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการเป็นยาในอนาคตโดยพิจารณาจากค่า BBB มากกว่า 2 PPB มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ MDCK มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์และ HIA มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้สารที่ออกแบบใหม่ทั้งหมด 10 โครงสร้างที่ผ่านคุณสมบัติดังกล่าวและมีคุณสมบัติที่ดีกว่าสารต้นแบบ ซึ่งมีค่าความเป็นพิษในระดับปานกลางกับมีผลการทดสอบกับหนูเป็นลบจากการทำนายดังแสดงใน**ตารางที่ 126** และ**ตารางที่ 127** ตามลำดับ เมื่อนำเอาสารทั้ง 10 โครงสร้างมาทำนายรูปแบบการจับโดยใช้เทคนิคการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง แสดง**ดังตารางที่ 128** ซึ่งพบว่ามีค่าพลังงานในการจับจากการทำนาย (docking score) ในช่วง -8.26 ถึง - 11.37 kcal/mol ซึ่งพบว่ามี 8 โครงสร้างที่มีค่าพลังงานในการจับที่ดีกว่าสารต้นแบบ (-9.07 kcal/mol)



ตารางที่ 126 ค่าการทำนายคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการเป็นยาของสารยับยั้งตัวใหม่โดยใช้สารหมายเลข PB02 เป็นสารต้นแบบ

Cpd.	R	ADME											
		BBB	PPB	HIA	Caco2	MDCK	CYP2C19 inhibition	CYP2C9 inhibition	CYP2D6 inhibition	CYP2D6 substrate	CYP3A4 inhibition	CYP3A4 substrate	Pgp inhibition
AE-848/42799159	Phenyl	1.94	92.55	96.81	54.39	53.83	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Weakly	Inhibitor
D005	3-chlorophenyl	4.04	90.93	97.03	51.90	49.94	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Weakly	Inhibitor
D014	3-Methylphenyl	3.39	91.93	96.87	54.77	51.92	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Weakly	Inhibitor
D021	2-naphtnyl	3.05	98.08	97.15	54.83	33.90	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Weakly	Inhibitor
D027	4-Biphenyl	4.49	91.25	97.15	54.98	49.98	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Weakly	Inhibitor
D052	3,5-Dimethylphenyl	5.24	91.46	96.92	55.06	51.39	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Weakly	Inhibitor
D067	4-n-Propylphenyl	7.49	90.93	96.97	54.92	33.54	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Weakly	Inhibitor

D077	2-Ethylphenyl	5.12	91.25	96.92	55.03	32.00	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Weakly	Inhibitor
D084	3-Ethylphenyl	5.67	91.20	96.92	55.10	48.55	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Weakly	Inhibitor
D093	3-Bipheny	4.99	91.34	97.15	55.29	47.52	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Weakly	Inhibitor
D095	2-Biphenyl	5.34	91.31	97.15	55.49	52.43	Non	Non	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Substrate	Inhibitor

ตารางที่ 127 ค่าการทำนายความเป็นพิษของสารยับยั้งตัวใหม่โดยใช้สารหมายเลข PB02 เป็นสารต้นแบบ

Cpd.	**R**	**Toxicity**			
		Ames test	**Carcino Mouse**	**Carcino Rat**	**hERG inhibition**
AE-848/42799159	Phenyl	Mutagen	Negative	Negative	Medium risk
D005	3-chlorophenyl	Mutagen	Negative	Negative	Medium risk
D014	3-Methylphenyl	Non-mutagen	Negative	Negative	Medium risk
D021	2-naphtnyl	Non-mutagen	Negative	Negative	Medium risk
D027	4-Biphenyl	Non-mutagen	Negative	Negative	Medium risk
D052	3,5-Dimethylphenyl	Non-mutagen	Negative	Negative	Medium risk
D067	4-n-Propylphenyl	Non-mutagen	Negative	Negative	Medium risk
D077	2-Ethylphenyl	Non-mutagen	Negative	Negative	Medium risk
D084	3-Ethylphenyl	Non-mutagen	Negative	Negative	Medium risk
D093	3-Bipheny	Non-mutagen	Negative	Negative	Medium risk
D095	2-Biphenyl	Non-mutagen	Negative	Negative	Medium risk

ตารางที่ 128 ค่าพลังงานในการจับของโครงสร้างที่ออกแบบโดยการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

Cpd.	R	Docking score (kcal/mol)
AE-848/42799159	Phenyl	-9.07
D005	3-chlorophenyl	-11.37
D014	3-Methylphenyl	-9.64
D021	2-naphtnyl	-9.59
D027	4-Biphenyl	-9.46
D052	3,5-Dimethylphenyl	-10.46
D067	4-n-Propylphenyl	-8.98
D077	2-Ethylphenyl	-9.17
D084	3-Ethylphenyl	-9.68
D093	3-Bipheny	-9.70
D095	2-Biphenyl	-8.26

สรุปผลและวิจารณ์

การคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้างและการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งพบว่าจากสาร 16 โครงสร้างที่มีพลังงานในการจับดี มีสารยับยั้งตัวใหม่ 2 โครงสร้างมีค่ากัมมันภาพในการยับยั้งดีเทียบเท่ากับสารมาตรฐานไตรโคซาน จากการศึกษาโครงสร้างผลึกของสารที่ยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อวัณโรคได้ดีที่สุดเพื่อศึกษาการวางตัวและอันตรกิริยาที่สำคัญ ทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญในการออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่เพื่อสังเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ ผลจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารที่ออกแบบใหม่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อวัณโรคได้ดีกว่าสารต้นแบบ ผลจากการศึกษา 3D-QSAR ของสารอนุพันธ์ 2-(4-oxoquinazolin-3(4*H*)-yl)acetamide และ benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-ones ร่วมกับการศึกษาการวางตัวและอันตรกิริยาโดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งทำให้ได้ข้อมูลความต้องการทางโครงสร้างและอันตรกิริยาที่สำคัญต าอการพัฒนาสารยับยั้งทั้งสองกลุ่มให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่สูงขึ้น

สำหรับเอนไซม์ PknG ได้ทำการค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG ชนิดใหม่โดยใช้ 2 ขั้นตอนคือ การคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งการคำนวณค่าพลังงานอิสระในการจับ โดยเลือกใช้ฐานข้อมูล GSK ซึ่งประกอบไปด้วยข้อมูลทั้งหมด 793 โครงสร้างโดยการวางตัวของสารในโพรงการจับและคำนวณค่าพลังงานโดยใช้ Glide XP หลังจากนั้นเลือกสารทั้งหมด 100 โครงสร้างซึ่งมีค่าพลังงานจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง Glide XP หลังจากนั้นใช้ค่าพลังงานอิสระในการจับของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ได้สูงสุด (-34.23 kcal/mol) เป็นค่าอ้างอิงในการเลือกสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งตัวใหม่จากการคัดสรรเสมือนจริง พบว่ามีโครงสร้างทั้งหมด 53 มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการเป็นยาและตามด้วยการจัดกลุ่มโครงสร้างพบว่ามีทั้งหมด 18 กลุ่มและได้เลือกโครงสร้างในแต่ละกลุ่มที่มีค่าพลังงานในการจับสูงสุดมาให้ในการวิเคราะห์ ลักษณะการวางตัวของสารตัวใหม่ที่ได้จากคัดสรรเสมือนจริงและมีค่าพลังงานอิสระในการจับมากที่สุด เกิดพันธะไฮโดรเจน 2 ตำแหน่งระหว่างโครงสร้างของ 4-[(1,1-Dioxo-2,3-dihydro-1-benzothiophen-6-yl) amino]-2-(pyrrolidin-3-ylamino)-6H-pyrido[4,3-d] pyrimidin-5-one กับกรดอะมิโน Glu233 และ Val235 นอกจากนี้ยังเกิดพันธะไฮโดนเจนระหว่างวง pyrrolidine (NH) กับกรดอะมิโน Glu280 และ Asn281 อะตอมออกซิเจนของหมู่ sulfone เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ NH ของกรดอะมิโน Ser239 อันตรกิริยาชนิดซิกมา-ไฟระหว่างกรดอะมิโน Val179 กับวง pyrido[4,3-d]pyrimidin-5(6H)-one และมีอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นกับโพรงการจับของเอนไซม์ PknG

ผลการศึกษาที่ได้จากแบบจำลอง 3D-QSAR และการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลทำให้ได้ข้อมูลความต้องการทางโครงสร้างที่มีความสำคัญของสารอนุพันธ์ tetrahydrobenzothiophene ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PknG ที่สูงมากยิ่งขึ้น โครงสร้างหลักของสารยับยั้งคือ benzothiophene core มีค่าสำคัญต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งโดยบ่งชี้จากผลการศึกษาที่ได้จากแผนภาพคอนทัวร์ของแบบจำลอง CoMSIA อะตอมออกซิเจนในหมู่คาร์บอนิลของโครงสร้างหลักเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Val235 สำหรับหมู่แทนที่ R_1 ต้องการหมู่แทนที่ที่มีคุณสมบัติเป็นหมู่ให้ไฮโดรเจนและมีขนาดเล็กเช่น NH_2 เพื่อให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Glu233 (O) และ Ile292 (O) ดังนั้นหมู่แทนที่ที่บริเวณตำแหน่ง R_1 จึงเป็นอีกส่วนที่มีความสำคัญกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง หมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่ซึ่งได้จากแผนภาพคอนทัวร์ของแบบจำลอง CoMSIA ต้องการสำหรับการเกิดพันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกของหมู่แทนที่ R_2 สำหรับการเพิ่ม

ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้น และควรมีหมู่แทนที่ที่มีขนาดเล็กและให้ไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง X เพื่อให้เกิดพันธะไฮดโดรเจนเพิ่มเติมกับกรดอะมิโน Lys181 และ Asp293

สำหรับเอนไซม์ PknB ได้ทำการศึกษารูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid และสารอนุพันธ์ quinazoline ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง จากการศึกษาพบว่าการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งมีความสามารถสูงในการทำนายรูปแบบการจับสารอนุพันธ์ 4-oxocrotonic acid โดยให้ค่า rsmd ระหว่างโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณและโครงสร้างทางเอ็กเซย์ เท่ากับ 1.55 อังสตรอม จากการศึกษาพบว่า พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาชนิดแวนเดอวาลส์ ที่หมู่แทนที่ R และ R' กับกรดอะมิโน Leu17, Val25, Tyr94, Gly97 และ Asp156 ดังนั้นผลจากการศึกษาที่ได้ ทำให้ได้ข้อมูลทางโครงสร้างที่สำคัญของสารยับยั้งเอนไซม์ PknB และข้อมูลจากกการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งต่อเซลล์ถูกใช้เป็นแนวทางสำคัญในการออกแบบโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ PknBตัวใหม่ พบว่าได้สารยับยั้งตัวใหม่ที่สูงกว่าสารต้นแบบ จำนวน 10 ตัว ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการพัฒนาให้ได้สารต้นแบบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้นและมีศักยภาพสูงในการพัฒนาต่อเป็นยาใหม่สำหรับการรักษาโรควัณโรคต่อไป

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, Lanéelle G, Quémard A. InhA, a target of the antituberculosis 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 isoniazid resistant 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, Lanéelle 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.
27. Wehenkel A, Fernandez P, Bellinzoni M, Catherinot V, Barilone N, Labesse G, Jackson M, Alzari PM. The structure of PknB in complex with mitoxantrone, an ATP-competitive inhibitor suggests a mode of protein kinase regulation in mycobacteria. FEBS Letters 580 (2006) 3018–3022

ผลงานเผยแพร่

1. วารสารวิชาการนานาชาติ

1. N. Phusi, R. Sato , T. Ezawa , S. Tomioka , C. Hanwarinroj, B. Khamsri, P. Kamsri, A. Punkvang, P. Pungpo and N. Kurita, Specific interactions between 2-trans enoyl-acyl carrier protein reductase and its ligand: Protein-ligand docking and ab initio fragment molecular orbital calculations, *J. Mol. Graph. Model*., **2019**, 88, 299-308.
2. P. Kamsri, C. Hanwarinroj, N. Phusi, T. Pornprom, K. Chayajarus, A. Punkvang, N. Suttipanta, P. Srimanote, K. Suttisintong, C. Songsiriritthigul, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, S. Rattanabunyong, S. Seetaha, K. Choowongkomon, S. Sureram, P. Kittakoop, P. Hongmanee, P. Santanirand, Z. Chen, W. Zhu, R. A Blood, Y. Takebayashi, P. Hinchliffe, A. J. Mulholland, J. Spencer, and P. Pungpo, Discovery of New and Potent InhA Inhibitors as Antituberculosis Agents: Structure Based Virtual Screening Validated by Biological Assays and X-ray Crystallography, *J. Chem. Inf. Model*., **2020**, 60(1), 226-234.

2. สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

1. คมสันต์ สุทธิสินทอง ณรงค์พล แก้วจังหวัด เอกนรินทร์ ธนายุพงศ์ สหรัฐ เตชะพนาลัย บุญรัตน์ ทารัตน์ ฑิมพิกา พรพรม ศรสวรรค์ บาททอง พรพรรณ พึ่งโพธิ์ และ พฤทธิ์ คำศรี, สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค และวิธีการสังเคราะห์สารประกอบดังกล่าว, อนุสิทธิบัตรไทย เลขที่ 1901006115. 27 ก.ย. 2562.

3. เอกสารสืบเนื่องจากงานประชุมในงานประชุมวิชาการนานาชาติ

1. P. Thongdee, B. Pakamwong, I. Saenglam, K. Yotyiamkrae, B. Tharat, B. Khamsri, T. Chuansupak, N. Phusi, C. Hanwarinroj, K. Chayajarus, P. Kamsri, A. Punkvang, N. Suttipanta, P. Saparpakorn,S. Hannongbua, P. Kittakoop, U. Leartsakulpanich, K. Suttisintong, J. Spencer, A. Mulholland, and P. Pungpo, Molecular docking and 3D-QSAR study of pyrrolyl benzohydrazide derivatives to explore the structure requirements of InhA inhibitors, Proceeding of pure and Applied Chemistry International Conference 2018, 2018, 85-88.
2. C. Hanwarinroj, N. Phusi, K. Chayajarus, P. Kamsri, A. Punkvang, N. Suttipanta, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, K. Suttisintong, P. Kittakoop, J. Spencer, A. Mulholland, and P. Pungpo, Rational design of PknB inhibitors in class of 4-oxo-crotonic acid derivatives as highly potent anti-tuberculosis agents, Proceeding of pure and Applied Chemistry International Conference 2018, 2018, 80-84.
3. B. Tharat, B. Pakamwong, K. Yotyiamkrae, P. Thongdee, I. Saenglam, B. Khamsri, T. Chuansupak, N. Phusi, C. Hanwarinroj, K. Chayajarus, P. Kamsri, A. Punkvang, N. Suttipanta, P. Saparpakorn,S. Hannongbua, P. Kittakoop, Leartsakulpanich, U.; K.

Suttisintong, J. Spencer, A. Mulholland, and P. Pungpo, Molecular modeling, design and synthesis of InhA inhibitors in the class of benzimidazole derivatives as a novel Anti-tuberculosis agents, Proceeding of pure and Applied Chemistry International Conference 2018, 2018, 54-59.

4. P. Kamsri, A. Punkvang, P. Thongdee, I. Saenglam, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, S. Sureram, P. Kittakoop, N. Suttipanta, K. Suttisintong, A. Mulholland, J. Speccer and P. Pungpo, In - silico Aided Inhibitor Design of Benzoimidazole-containing Derivatives as Novel Direct InhA Inhibitors, Proceeding of pure and Applied Chemistry International Conference 2018, 2018, 49-53.
5. P. Kamsri, A. Punkvang, P. Kittakoop, K. Suttisintong and P. Pungpo, Rational design of Aspergillusidone A-F isolated from marine-derived fungus aspergillus unguis as new PknG inhibitors, Proceedings of 99th ISERD International Conference, 2018, 50-53.
6. I. Saenglum, P. Tongdee, N. Phusi, C. Hanwarinroj, T. Pornprom, K. Chayajarus, K. Ariyachaokun, P. Kamsri, A. Punkvang, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, K. Suttisintong, P. Kittakoop, J. Spencer, A. Mulholland and P. Pungpo, Molecular docking calculations of novel pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives InhA inhibitors as anti-tuberculosis agents. Proceeding of pure and Applied Chemistry International Conference 2019, 2019, 54-59.
7. T. Pornprom, B. Khamsri, B. Pakamwon, P. Thongdee, I. Saenglam, N. Phusi, C. Hanwarinroj, K. Chayajarus, K. Ariyachaokun, P. Kamsri, A. Punkvang, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, K. Suttisintong, P. Kittakoop, J. Spencer, A. Mulholland and P. Pungpo. Interaction and structural requirement of 4-thiazolidinone (rhodanine) inhibitors as potential anti-tuberculosis agents: MD simulations, molecular docking calculations and 3D-QSAR, Pure and Applied Chemistry International Conference 2019 2019, 71-76.
8. T. Pornprom, B. Khamsri, B. Pakamwong, P. Thongdee, I. Saenglam, N. Phusi, C. Hanwarinroj, P. Kamsri, A. Punkvang, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, K. Suttisintong, P. Kittakoop, J. Spencer, A. Mulholland and P. Pungpo. The crucial binding characteristic of 4-Thiazolidinone (rhodanine) derivatives with InhA based on molecular docking calculations. GSRD INTERNATIONAL CONFERENCE, 2018. 38-40.

4. เอกสารสืบเนื่องจากงานประชุมในงานประชุมวิชาการนานาชาติ

1. บุญรัตน์ ทารัตน์ นฤดล ภูศรี ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์ พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง กัมปนาท ฉายจรัส คมสันต์ สุทธิสินทอง พัชรีนาถ ทรัพย์อากรณ์ สุภา หารหนองบัว และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์, การออกแบบสารยับยั้งโดยอาศัยข้อมูลทางโครงสร้างของต้านวัณโรคตัวใหม่กับเอนไซม์ Enoyl-ACP Reductase ของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-

yloxy) propan-2-ol, เอกสารสืบเนื่องในการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีวิจัย ครั้งที่ 11, 2560, 292-298.

2. พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์ สุภา หารหนองบัว Zhaoqiang Chen Weiliang Zhu สัญญาสุเรรัมย์ ประสาท กิตตะคุปต์ คมสันต์ สุทธิสินทอง นิธิมา สุทธิพันธุ์ กัมปนาท ฉายจรัส อินทุอร อัปปะมะโต และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์, การค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่เพื่อใช้เป็นสารต้านวัณโรคบนพื้นฐานโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีน: การคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้าง, เอกสารสืบเนื่องในการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีวิจัยครั้งที่ 11, 2560, 306-313.
3. นฤดล ภูศรี ฑิมพิกา พรพรม ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์ บัณฑิต คำศรี บงกชวรรณ พาคำวงค์ ภาพตะวัน ทองดี กัมปนาท ฉายจรัส นิธิมา สุทธิพันธ์ พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์ สุภา หารหนองบัว พจนีย์ ศรีมาโนชญ์ คมสันต์ สุทธิสินทอง และพรพรรณ พึ่งโพธิ์ การอธิบายข้อมูลทางโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA สำหรับสารต้านโรควัณโรค: การออกแบบสารยับยั้งโดยอาศัยข้อมูลทางลิแกนด์และข้อมูลทางโครงสร้าง, เอกสารสืบเนื่องในการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีวิจัย ครั้งที่ 12, 2561, 335-344.
4. ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์ นฤดล ภูศรี บุญรัตน์ ทารัตน์ พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง กัมปนาท ฉายจรัส นิธิมา สุทธิพันธุ์ พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ สุภา หารหนองบัว คมสันต์ สุทธิสินทอง และพรพรรณ พึ่งโพธิ์ การออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณของสารอนุพันธ์ 4 aminoquinolone piperidine amide ซึ่งเป็นการยับยั้งโรควัณโรคที่มีศักยภาพสูง, เอกสารสืบเนื่องในการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีวิจัย ครั้งที่ 12, 2561, 350-360.
5. ภาพตะวัน ทองดี ฑิมพิกา พรพรม บัณฑิต คำศรี บงกชวรรณ พาคำวงค์ นฤดล ภูศรี ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์ กัมปนาท ฉายจรัส พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์ สุภา หารหนองบัว พจนีย์ ศรีมาโนชญ์ คมสันต์ สุทธิสินทอง และพรพรรณ พึ่งโพธิ์ การศึกษารูปแบบการจับและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ Pyrrolyl benzohydrazide ซึ่งเป็นสารยับยั้งโรควัณโรคโดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งและการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล, เอกสารสืบเนื่องในการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีวิจัย ครั้งที่ 12, 2561, 129-135.
6. อิสราภรณ์ เสียงล้ำ นฤดล ภูศรี ชญาณิลห์ หาญวลินโรน์ ฑิมพิกา พรพรม กัมปนาท ฉายจรัส กัลย์ชิญาภัท อริยะเชาว์กุล พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง สุภา หารหนองบัว พัชรีนาถ ทรัพย์อากรณ์ คมสันต์ สุทธิสินทอง และพรพรรณ พึ่งโพธิ์, การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพทางชีวภาพเชิงสามมิติ และการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งของสารอนุพันธ์ Pyrrolyl Benzohydrazide และ Pyrrolyl Benzamide เพื่อการยับยั้งเชื้อวัณโรค, เอกสารสืบเนื่องในการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีวิจัย ครั้งที่ 13, 2562, 111-118.

5. บทคัดย่อในงานประชุมวิชาการ

1. C. Hanwarinroj, N. Phusi, T. Pornprom, K. Ariyachaokun, P. Kamsri, A. Punkvang, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, K. Suttisintong, P. Kittakoop, J. Spencer, A. Mulholland and P. Pungpo, Computational investigation of quinazoline analogues as PknB inhibitors for tuberculosis treatment through combined QSAR, molecular docking

and molecular dynamics simulation, 10th International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources June 23-27, 2019, Ioannina, Greece (Poster presentation).

2. I. Saenglum, P. Tongdee, N. Phusi, C. Hanwarinroj, T. Pornprom, K. Chayajarus, K. Ariyachaokun, P. Kamsri, A. Punkvang, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, K. Suttisintong, P. Kittakoop, J. Spencer, A. Mulholland and P. Pungpo, Molecular docking calculations of novel pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives InhA inhibitors as anti-tuberculosis agents. Pure and Applied Chemistry International Conference February 7-8, 2019, 2019, Bangkok, Thailand (Poster presentation).
3. T. Pornprom, B. Khamsri, B. Pakamwon, P. Thongdee, I. Saenglam, N. Phusi, C. Hanwarinroj, K. Chayajarus, K. Ariyachaokun, P. Kamsri, A. Punkvang, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, K. Suttisintong, P. Kittakoop, J. Spencer, A. Mulholland and P. Pungpo. Interaction and structural requirement of 4-thiazolidinone (rhodanine) inhibitors as potential anti-tuberculosis agents: MD simulations, molecular docking calculations and 3D-QSAR, Pure and Applied Chemistry International Conference 2019, February 7-8, 2019, Bangkok, Thailand (Poster presentation).
4. T. Pornprom, B. Khamsri, B. Pakamwong, P. Thongdee, I. Saenglam, N. Phusi, C. Hanwarinroj, P. Kamsri, A. Punkvang, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, K. Suttisintong, P. Kittakoop, J. Spencer, A. Mulholland and P. Pungpo. The crucial binding characteristic of 4-Thiazolidinone (rhodanine) derivatives with InhA based on molecular docking calculations GLOBAL Society for Research and Development, December 6, 2018, Tokyo, Japan (Oral presentation).
5. C. Hanwarinroj, N. Phusi, K. Chayajarus, P. Kamsri, A. Punkvang, N. Suttipanta, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, K. Suttisintong, P. Kittakoop, J. Spencer, A. Mulholland, and P. Pungpo, Rational design of PknB inhibitors in class of 4-oxo-crotonic acid derivatives as highly potent anti-tuberculosis agents, Pure and Applied Chemistry International Conference 2018, February 7-9, 2018, Songkhla, Thailand (Poster presentation).
6. P. Thongdee, B. Pakamwong, I. Saenglam, K. Yotyiamkrae, B. Tharat, B. Khamsri, T. Chuansupak, N. Phusi, C. Hanwarinroj, K. Chayajarus, P. Kamsri, A. Punkvang, N. Suttipanta, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, P. Kittakoop, U. Leartsakulpanich, K. Suttisintong, J. Spencer, A. Mulholland, and P. Pungpo, Molecular docking and 3D-QSAR study of pyrrolyl benzohydrazide derivatives to explore the structure requirements of InhA inhibitors, Pure and Applied Chemistry International Conference 2018, February 7-9, 2018, Songkhla, Thailand (Poster presentation).
7. B. Tharat, B. Pakamwong, K. Yotyiamkrae, P. Thongdee, I. Saenglam, B. Khamsri, T. Chuansupak, N. Phusi, C. Hanwarinroj, K. Chayajarus, P. Kamsri, A. Punkvang, N.

Suttipanta, P. Saparpakorn,S. Hannongbua, P. Kittakoop, U. Leartsakulpanich, K. Suttisintong, J. Spencer, A. Mulholland, and P. Pungpo, Molecular modeling, design and synthesis of InhA inhibitors in the class of Benzimidazole derivatives as a novel Anti-tuberculosis agents, Pure and Applied Chemistry International Conference 2018, February 7-9, 2018, Songkhla, Thailand (Poster presentation).

8. P. Kamsri, A. Punkvang, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, S. Sureram, P. Kittakoop, N. Suttipanta, K. Suttisintong, A. Mulholland, J. Speccer and P. Pungpo, In - silico Aided Inhibitor Design of Benzoimidazole-containing Derivatives as Novel Direct InhAInhibitors, Pure and Applied Chemistry International Conference 2018, February 7-9, 2018, Songkhla, Thailand (Poster presentation).
9. P. Kamsri, A. Punkvang, P. Kittakoop, K. Suttisintong and P. Pungpo, Rational design of Aspergillusidone A-F isolated from marine-derived fungus aspergillus unguis as new PknG inhibitors, Proceedings of 99th ISERD International Conference, January 6-7, 2018, Tokyo, Japan (Oral presentation).
10. C. Hanwarinroj, N. Phusri, P. Kamsri, A. Punkvang, K. Suttisintong, P. Saparpakorn, S. Hannongbua and P. Pungpo, Structure based inhibitors design of PknB inhibitors as anti-tuberculosis agents using molecular docking calculations, 9th International Kasetsart University Science and Technology Annual Research Symposium (I-KUSTARS), June 1-2, 2017, Bangkok, Thailand (Poster presentation).
11. P. Kamsri, A. Punkvang P. Saparpakorn, S. Hannongbua Z. Chen, W. Zhu S. Sureram, K. Suttisintong, P. Kittakoop P. Pungpo, Binding Mode of Bioactive Compounds of Marine-Derived Fungus Aspergillus unguis in *M. tuberculosis* PknG Binding Site: Structure Based Drug Design, 9th International Kasetsart University Science and Technology Annual Research Symposium (I-KUSTARS), June 1-2, 2017, Bangkok, Thailand (Poster presentation).
12. P. Kamsri, A. Punkvang P. Saparpakorn, S. Hannongbua Z. Chen, W. Zhu S. Sureram, K. Suttisintong, P. Kittakoop P. Pungpo, Identifications of new PknG inhibitors as anti-tuberculosis agents based on 2-aminopyrimedine derivatives: Structure based virtual screening, การประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ. วิจัย ครั้งที่ 11 วันที่ 13-14 กรกฎาคม 2560 (Poster presentation).
13. B. Tharat, K. Khomthawee, C. Hanwarinroj, N. Phusi, N. Suttipanta, P. Kamsri, A. Punkvang, K. Suttisintong, and P. Pungpo, Structure based inhibitor design of novel Anti-tuberculosis Agents of Enoyl-ACP Reductase Inhibitors in a Series of 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1H-inden-5-yloxy) propan-2-ol, การประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 11 วันที่ 13-14 กรกฎาคม 2560 (Poster presentation).
14. 3. นฤดล ภูศรี ฑิมพิกา พรพรม ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์ บัณฑิต คำศรี บงกชวรรณ พาคำวงค์ ภาพตะวัน ทองดี กัมปนาท ฉายจรัส นิธิมา สุทธิพันธ์ พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์ สุภา หารหนองบัว พจนีย์ ศรีมาโนชญ์ คมสันต์ สุทธิสินทอง และพรพรรณ พึ่ง

โพธิ์ การอธิบายข้อมูลทางโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA สำหรับสารต้านโรควัณโรค: การออกแบบสารยับยั้งโดยอาศัยข้อมูลทางลิแกนด์และข้อมูลทางโครงสร้าง, การประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 12, 12-13 กรกฎาคม 2561 (Poster presentation).

15. ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์ นฤดล ภูศรี บุญรัตน์ ทารัตน์ พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง กัมปนาท ฉายจรัส นิธิมา สุทธิพันธุ์ พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ สุภา หารหนองบัว คมสันต์ สุทธิสินทอง และพรพรรณ พึ่งโพธิ์ การออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณของสารอนุพันธ์ 4 aminoquinolone piperidine amide ซึ่งเป็นการยับยั้งโรควัณโรคที่มีศักยภาพสูง, การประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 12, 12-13 กรกฎาคม 2561 (Poster presentation).
16. ภาพตะวัน ทองดี ฑิมพิกา พรพรม บัณฑิต คำศรี บงกชวรรณ พาคำวงค์ นฤดล ภูศรี ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์ กัมปนาท ฉายจรัส พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์ สุภา หารหนองบัว พจนีย์ ศรีมาโนชญ์ คมสันต์ สุทธิสินทอง และพรพรรณ พึ่งโพธิ์ การศึกษารูปแบบการจับและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ Pyrrolyl benzohydrazide ซึ่งเป็นสารยับยั้งโรควัณโรคโดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด๊อกกิ้งและการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล, การประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 12, 12-13 กรกฎาคม 2561 (Poster presentation).
17. อิสราภรณ์ เสียงล้ำ นฤดล ภูศรี ชญาณิลห์ หาญวลินโรน์ ฑิมพิกา พรพรม กัมปนาท ฉายจรัส กัลย์ชิญาภัท อริยะเชาว์กุล พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง สุภา หารหนองบัว พัชรีนาถ ทรัพย์อากรณ์ คมสันต์ สุทธิสินทอง และพรพรรณ พึ่งโพธิ์, การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพทางชีวภาพเชิงสามมิติ และการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งของสารอนุพันธ์ Pyrrolyl Benzohydrazide และ Pyrrolyl Benzamide เพื่อการยับยั้งเชื้อวัณโรค, การประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 13, 12-13 กรกฎาคม 2562 (Poster presentation).
18. ฑิมพิกา พรพรม บัณฑิต คำศรี บงกชวรรณ พาคำวงค์ ภาพตะวัน ทองดี นฤดล ภูศรี ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์ กัมปนาท ฉายจรัส นิธิมา สุทธิพันธุ์ พฤทธิ์ คำศรี อรดี พันธ์กว้าง พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์ สุภา หารหนองบัว พจนีย์ ศรีมาโนชญ์ คมสันต์ สุทธิสินทอง และพรพรรณ พึ่งโพธิ์ การออกแบบยาโดยอาศัยโครงสร้างของสารอนุพันธ์ ควินาโซลิน ซึ่งเป็นการยับยั้งโรควัณโรค ที่มีศักยภาพสูง: การคำนวณโมเลคูลาร์ด๊อกกิ้ง, การประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 12, 12-13 กรกฎาคม 2561 (Poster presentation).

6. รางวัล/ทุนวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Newton Fund Grant Agreement PhD Travel grant for Supervisors 2018/19

7. การนำเสนอผลงานในรูปแบบอื่นๆ

ผลงานวิจัยนี้ ได้รับการคัดเลือก ให้เป็นผลงานวิจัยเด่น จากสำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เพื่อแสดงผลงานการใช้องค์ความรู้จากงานวิจัย” ในงาน แสดงผลงานวิจัยระดับชาติ “๒๕ ปี สกว.: สร้างคน สร้างความรู้ สร้างอนาคต” ซึ่งจัดขึ้นวันที่ ๒๕ – ๒๖ สิงหาคม ๒๕๖๐ ณ รอยัล พาราก้อน ฮอลล์

การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น

1. สถาบันภายในประเทศ

1.1 ศ.ดร.สุภา หารหนองบัว และ ผศ.ดร.พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 รศ.ดร. เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 ผศ.ดร.นิธิมา สุทธิพันธุ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.4 ผศ.ดร. พจนีย์ ศรีมาโนชญ์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

1.5 ดร. อุบลศรี เลิศสกุลพาณิช ห้องปฏิบัติการการวิเคราะห์และประยุกต์ใช้สารชีวโมเลกุล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

1.6 ดร. คมสันต์ สุทธิสินทอง ห้องปฏิบัติการวัสดุนาโนเฉพาะทางและโครงสร้างพื้นผิวศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (NANOTEC)

1.7 ดร.จักรี๋รดา อัตตรัถยา และดร. ชมภูนุช ส่งสิริฤทธิกุล นักวิทยาศาสตร์ระบบลำเลียงแสง สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน)

1.8 ดร. ประสาท กิตตะคุปต์ ห้องปฏิบัติการเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

1.9 รศ.พูนพิลาส หงษ์มณี ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

2. สถาบันนอกประเทศ

2.1 Prof. Weiliang Zhu, Drug Discovery and Design Centre, Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai, China.

2.2 Prof. Wolfgang Sippl, Department of Pharmaceutical Chemistry, Martin-Luther University of Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany.

2.3 Prof. Adiran Mulholland, Centre of Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, United Kingdom.

2.4 Dr. James Spencer, School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol, United Kingdom.

2.5 Dr Richard Sessions School of Biochemistry University of Bristol, Bristol, UK.

2.6 Assoc. Prof. Dr. Noriyuki Kurita, Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Toyohashi, Aichi, Japan.

ภาคผนวก

Journal of Molecular Graphics and Modelling 88 (2019) 299–308

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Graphics and Modelling

journal homepage: www.elsevier.com/locate/JMGM

Specific interactions between *2-trans* enoyl-acyl carrier protein reductase and its ligand: Protein-ligand docking and *ab initio* fragment molecular orbital calculations

Naruedon Phusi [a], Riku Sato [b], Takuya Ezawa [b], Shogo Tomioka [b], Chayanin Hanwarinroj [a], Bandit Khamsri [a], Pharit Kamsri [c], Auradee Punkvang [c], Pornpan Pungpo [a, *], Noriyuki Kurita [b, **]

[a] Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand
[b] Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Tempaku-cho, Toyohashi, Aichi, 441-8580, Japan
[c] Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom, 48000, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 December 2018
Received in revised form
22 February 2019
Accepted 22 February 2019
Available online 25 February 2019

Keywords:
Heteroaryl benzamide derivatives
2-Trans enoyl-acyl carrier protein
InhA
Ab initio molecular simulations
Protein-ligand docking
Molecular mechanics
Fragment molecular orbital
Specific interactions
Inhibitor

ABSTRACT

2-trans enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) has been identified as a promising target for the development of novel chemotherapy for tuberculosis. In the present study, a series of heteroaryl benzamide derivatives were selected as potent inhibitors against InhA, and their binding properties with InhA were investigated at atomic and electronic levels by *ab initio* molecular simulations based on protein-ligand docking, classical molecular mechanics optimizations and *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations. The results evaluated by FMO highlight some key interactions between InhA and the derivatives, indicating that the most potent derivative has strong hydrogen bonds with the Met98 side chain of InhA and strong electrostatic interactions with the nicotinamide adenine dinucleotide cofactor. These findings provide informative structural concepts for designing novel heteroaryl benzamide derivatives with higher binding affinity to InhA.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) and has been a major problem for global health. In 2017, there were an estimated 10.4 million new TB patients worldwide, and the high mortality rate of TB patients is caused by its HIV co-infection as well as strong drug resistance of *M. tuberculosis* [1]. Drugs such as isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol are currently used for the treatment of TB, although there are many types of *M. tuberculosis* bacteria having resistance to these drugs. In addition, multidrug resistant TB (MDR-TB) [2,3], extensive drug-resistance TB (XDR-TB) [4,5], and co-infection between *M. tuberculosis* and HIV (TB/HIV) [6–9] are major problems in the treatment of TB [10,11].

2-trans-enoyl acyl-carrier-protein (ACP) reductase (InhA) of *M. tuberculosis* was shown to be a primary target of the isoniazid (INH) frontline drug [12,13]. The *M. tuberculosis* InhA catalyzes the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)-specific reduction of the *2-trans*-enoyl-ACP in the elongation cycle of the fatty acid synthase (FAS)–II pathway. This enzyme is NAD^+-specific and reduces the *trans* double bond between the positions C2 and C3 of a fatty acyl chain linked to the acyl carrier protein [14]. INH is a prodrug requiring the activation function of catalase-peroxidase (KatG) enzyme to generate the isonicotinoyl radical [15,16], which forms a covalent bond with NAD^+ to generate INH-NAD^+ adduct, a potent inhibitor of InhA [17]. Based on this inhibition mechanism, INH could be called as an indirect inhibitor of InhA.

However, high potency of INH for the TB treatment is reduced by

* Corresponding author. Pornpan Pungpo, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand.
** Corresponding author.
E-mail addresses: pornpan_ubu@yahoo.com (P. Pungpo), kurita@cs.tut.ac.jp (N. Kurita).

https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.02.011
1093-3263/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

drug resistance, which is caused from the mutations in KatG enzyme [18–20]. To overcome the drug resistance against INH, new derivatives, which directly inhibit the InhA enzyme without affecting on the activation by KatG, are expected to be promising agents against TB [21]. Because the INH resistance is associated with the KatG mutations, in a rational design of inhibitors against InhA, many types of heteroaryl benzamide derivatives were developed as the direct inhibitors against InhA, and their inhibitory effects on the InhA activity were investigated systematically by the physicochemical experiment [22]. The results indicated a wide range of their inhibitory effect; IC_{50} is in the range from 0.02 to 3.40 μM, although their chemical structures are similar to each other. The reason for this significant difference in IC_{50} cannot be explained by the difference in the structure of the derivatives, and it is necessary to investigate the specific interactions between InhA and the derivatives for elucidating the reason. The result is expected to provide valuable structural information toward the design of novel InhA inhibitors.

In the present study, we investigated the specific interactions between *M. tuberculosis* InhA and some heteroaryl benzamide derivatives, in order to clarify which residues of InhA mainly contribute to the binding with the derivatives, using *ab initio* molecular simulations based on protein-ligand docking, classical molecular mechanics (MM) optimization and *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations. In addition, we attempted to reveal which derivatives can bind more strongly with InhA and inhibit the aggregation of InhA. The present results provide useful information for proposing novel *anti*-TB drugs based on the heteroaryl benzamide derivatives.

2. Details of *ab initio* molecular simulations

2.1. Construction and optimization of InhA + derivative complexes in water

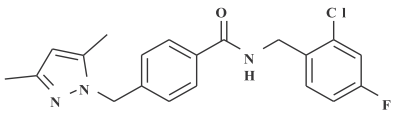
The chemical structures of the heteroaryl benzamide derivatives employed as inhibitors against InhA in the present study are shown in Fig. 1. The structure of the InhA + derivative-1 complex was determined by the X-ray crystal structure analysis, and the biological profiles of the derivative-1 were also investigated experimentally [22]. We therefore employed this derivative and investigated its binding properties with InhA, in order to check the accuracy of our present molecular simulations by the comparison between the simulated and the experimental results. In addition, the effect of 47 kinds of the derivatives on the InhA activity was widely investigated by the experiments of the same group [22]. Among these derivatives, we selected two derivatives shown in Fig. 1b and c, because their IC_{50} values are significantly different to each other, although there is no difference in chemical structures between them except for the chain between benzene and pyridine rings. It is noted that the derivative-2 is the most effective, while the derivative-3 is the least effective among the 47 derivatives investigated by the experiment [22]. These structures were fully optimized using the density functional theory (DFT) method (M062X/6-31G(d,p)) of the *ab initio* molecular orbital (MO) calculation program Gaussian09 (G09) [23]. To obtain charge parameters used in the MM force fields for these derivatives, the charge distributions of the optimized structures were evaluated by the restrained electrostatic potential (RESP) [24] analysis using the HF/6-31G(d) method of G09. It is noted that these charge distributions were used for the docking simulation as well as the MM optimizations, in order to accurately describe the electrostatic interactions between InhA and the derivatives.

The initial conformation of the derivative bound to InhA was predicted from the molecular docking simulations using the protein-ligand docking program Autodock4.2 [25]. The InhA structure for docking was downloaded from the protein databank (PDB ID: 4QXM [22]). We set the grid box of docking as the ligand-binding pocket of InhA is covered. The size of the grid box was $15 \times 15 \times 15$ Å^3, and the center of the grid box was set as the center of the derivative-1 in the PDB structure of the InhA + derivative-1 complex. In the docking simulations, InhA structure was fixed, while the structure of the heteroaryl benzamide derivative was freely relaxed, in order to obtain various types of structures for the docked derivative. The number of candidate structures created by Autodock4.2 was 200, and the threshold distance for clustering these structures was set as 2 Å.

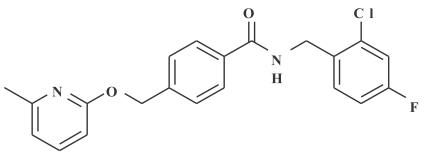
To obtain stable and low energy structures of the InhA + derivative complexes, the candidate structures obtained by the docking simulations were fully optimized using MM force fields in water. In the MM optimizations, about 2100 water molecules existing within 8 Å from the surface of the complex were considered explicitly, and the MM and molecular dynamics simulation program AMBER12 [26] was used for searching low energy structures. The AMBERFF99-SBLIN force field [27], the TIP3P model [28] and the general AMBER force field (GAFF) [29] were assigned for InhA, water molecules and the heteroaryl benzamide derivatives, respectively. The criterion for the convergence of the MM optimization was set as 0.001 kcal/mol/Å. Among the MM optimized structures, the most stable one was determined based on the total energy (TE) evaluated by the *ab initio* FMO calculations.

2.2. FMO calculations for InhA + derivative complexes

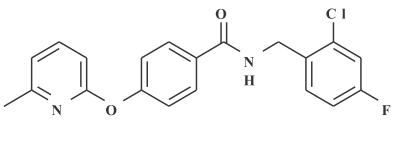
To elucidate the specific interactions and binding affinity between InhA and the heteroaryl benzamide derivatives, we



(a) derivative-1 (IC_{50} : 0.05 μM)



(b) derivative-2 (IC_{50} : 0.02 μM)



(c) derivative-3 (IC_{50} : 3.40 μM)

Fig. 1. Chemical structures and IC_{50} values of the heteraryl benzamide derivatives employed in the present study.

investigated electronic properties of the InhA + derivative complexes in explicit water molecules, using the *ab initio* FMO method [30]. It is noted that the water molecules existing within 10 Å from the derivative were considered explicitly, in order to describe accurately the effect of these water molecules on the specific interactions between InhA and the derivative. For all complexes, the number of water molecules is uniformed to be 132, because we determined the most stable structure of the complex based on the TEs evaluated by the *ab initio* FMO calculations. To predict the binding affinity between InhA and the derivative, the binding energy (BE) between InhA and the derivative was estimated from the TEs of the component structures using the following equation.

$$BE = TE\ (complex + waters) - TE\ (InhA + waters) - TE\ (derivative + waters) + TE\ (waters)$$

In the above calculations, we employed the structure of the solvated complex optimized by the classical MM method. From this structure, we extracted the structures of InhA + waters, derivative + waters and only waters, and the TEs of these structures as well as the solvated complex were evaluated by the *ab initio* FMO calculations.

In the FMO calculations, the MP2 [31,32]/6-31G method of the FMO calculation program ABINIT-MP Ver.6.0 [33] was used. Each amino acid residue of InhA, the derivative, the cofactor NAD^+ and each water molecule were assigned to a fragment in the FMO calculations, because this fragmentation enables to analyse the interactions between the derivative and each of InhA residues or the cofactor NAD^+ affected by the solvating water molecules. In addition, to highlight the important InhA residues or NAD^+ for the binding of the derivative, we analysed the inter fragment interaction energies (IFIE) [34] obtained by the FMO calculations.

3. Results and discussion

3.1. Stable structures of InhA + derivative complexes in water

To confirm the accuracy of the present docking simulations, we first docked the derivative-1 to the ligand-binding pocket of InhA to create 200 candidate structures of the InhA + derivative-1 complex, using the AutoDock4.2 program [25]. They were grouped into four clusters as listed in Table 1, which shows their lowest binding energies, numbers of candidate structures and conformations compared with that in the PDB structure (PDB ID: 4QXM [22]). Since the rank-1 cluster has 140 candidate structures and the lowest binding energy estimated by AutoDock4.2, this structure is expected to be more realistic. Therefore, we compared the representative structure of the rank-1 cluster with that of the PDB structure to confirm that the docked structure is almost the same as that in the PDB structure as shown in Fig. 2. The root-mean-square deviation (RMSD) between the docked and the observed X-ray conformations of the derivative-1 in the ligand-binding pocket of InhA was evaluated 0.2 Å, indicating the adequacy of the present docking simulations for the InhA + derivative-1 complex. On the other hand, Table 1 indicates that the conformations of the derivative-1 in the rank-2, 3 and 4 clusters are reverse to that in the PDB structure. Therefore, we employed the representative structure of the rank-1 cluster in the following MM and FMO calculations. It is noted that we could obtain the comparable conformation of the derivative-1 to that of the PDB structure by using the charge distribution of the derivative-1 obtained by the RESP analysis [24] in the docking simulation. When we employed the default charge parameter of AutoDock4.2, we could not obtain such comparable conformation of the derivative-1 for the InhA + derivative-1 complex.

As listed in Table 1, for the derivatives-2 and 3, the conformation of the rank-3 cluster is similar to that of the derivative-1 in the PDB structure. We therefore employed the representative structure of the rank-3 cluster for the InhA + derivative-2 and InhA + derivative-3 complexes and optimized them in water by the classical AMBER-MM method.

Table 1
Clustering of docked structures of the derivative to InhA obtained by AutoDock4.2. Clusters are ranked based on their lowest binding energy (LBE; kcal/mol). The number of candidate structures included in each cluster, the conformation of the representative structure in each cluster compared to that in the PDB structure [22] of the InhA + derivative-1 complex are listed.

Derivative	Rank	LBE	Number of structures	Conformation
1	1	−5.62	140	Similar
	2	−5.03	52	Reverse
	3	−4.74	1	Reverse
	4	−4.51	7	Reverse
2	1	−3.77	178	Reverse
	2	−3.68	16	Reverse
	3	−3.36	4	Similar
	4	−2.34	1	Reverse
	5	−2.06	1	Reverse
3	1	−3.64	44	Reverse
	2	−3.63	138	Reverse
	3	−3.31	18	Similar

3.2. Binding affinity and specific interactions between InhA and derivative

To predict the binding affinity between InhA and the derivative, we first evaluated BE for each derivative from the TEs calculated by the *ab initio* FMO method for the component structures. As listed in Table 2, the BEs for the three derivatives are in the correct order as compared with the IC_{50} values [22]; the larger BE correspond to the smaller IC_{50}, although the active derivative-1 displays the similar BE as the inactive derivative-3. To check the accuracy of the BEs, we

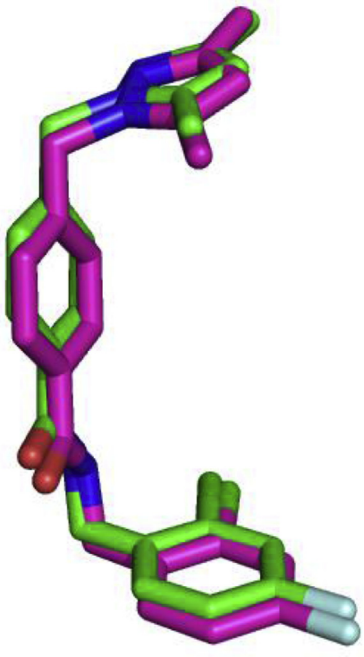


Fig. 2. Superimposition of the derivative-1 conformations in the docked structure (green) and the X-ray structure (pink) of InhA + derivative-1 complex.

Table 2
Total energies (kcal/mol) for the component structures of the solvated InhA + derivative complexes evaluated by the *ab initio* FMO method. Binding energies (BE; kcal/mol) between InhA and the derivative are also listed to be compared with the IC_{50} values for the derivatives obtained by the previous experiment [22].

Derivative	Total energies				BE	IC_{50} (μM)
	Complex + water	InhA + water	Derivative + water	water		
1	−72283525.8	−71299836.8	−6955131.7	−5971517.7	−75.0	0.05
2	−72319390.8	−71299432.4	−6991284.2	−5971430.8	−105.0	0.02
3	−72294974.4	−71299586.8	−6966874.8	−5971556.9	−69.6	3.40

also investigated the total IFIEs between the derivative and all InhA residues and NAD^+. As listed in the last line of Table 3, the value for the derivative-1 is almost the average of the values for the derivatives-2 and -3. Therefore, it is confirmed that the total IFIEs as well as the BEs are in the correct order as compared with the IC_{50} values for the three derivatives. In particular, the BE (−105.0 kcal/mol) for the derivative-2 is significantly larger than that (−69.6 kcal/mol) for the derivative-3, indicating that the derivative-2 has higher binding affinity than the derivative-3.

These large BEs of the order of 100 kcal/mol are unreliable. It is considered that these large BEs come mainly from the overestimation of the electrostatic interactions between the charged groups of InhA residue or NAD^+ and the derivative, because the interactions are usually overestimated in *ab initio* FMO calculations. To elucidate the effect of water molecules on BEs, we also investigated BEs without considering water molecules and obtained the BEs of −76.7 (derivative-1), −83.2 (derivative-2) and −67.1 kcal/mol (derivative-3), respectively. Therefore, it is confirmed that the order of BEs for the three derivatives is not changed by considering water molecules and that the derivative-2 has the highest binding affinity among the three derivatives.

We furthermore investigated the IFIEs between each residue of InhA or NAD^+ cofactor and the derivative, in order to elucidate the key interactions between them and the reason for the significant difference in binding affinity between the derivatives-2 and 3. The IFIEs evaluated for the derivatives are compared in Fig. 3, and Table 3 lists the InhA residues having strong attractive interaction with each of the derivatives, whose size of IFIE is larger than −10 kcal/mol. As shown in Fig. 3(a), the present FMO calculation demonstrates that the derivative-1 interacts most strongly with NAD^+ cofactor and Met98. This result is consistent with the experiment [22] showing that Met98 of InhA and NAD^+ cofactor are important for the binding between InhA and the derivative-1. In addition, it is elucidated from Fig. 3(b) and (c) that the derivatives-2 and 3 have similar IFIE profiles as the derivative-1. Table 3 indicates that Gly96 as well as Met98 and NAD^+ interact strongly with both the derivatives. Therefore, we concluded that NAD^+ cofactor, Met98 and Gly96 contribute mainly to the binding between InhA and the derivatives.

To make clear the reason for the significant difference in BEs between the derivatives-2 and 3, we analysed the difference in IFIEs for these derivatives. As shown in Fig. 3(d), the interaction energies between the derivative and NAD^+ cofactor, Ala198 and Pro99 of InhA are significantly different. These values of IFIEs are listed in Table 3, indicating that the derivative-2 interacts 11.5 kcal/mol stronger with NAD^+ cofactor than the derivative-3, and that the IFIEs between the derivative-2 and Ala198 and Pro99 are larger by 5.4 and 3.7 kcal/mol respectively, compared with those for the derivative-3. As a result, the BE of the derivative-2 is significantly (35.4 kcal/mol) larger than that of the derivative-3 as listed in Table 2.

We furthermore investigated the interacting structures between these InhA residues and the derivatives, in order to elucidate the reason for the difference in IFIEs. The crucial interactions of the highest active derivative-2 with the InhA residues existing around the ligand-binding pocket of InhA are shown in Fig. 4(a). The major interactions between InhA and the derivative-2 are hydrogen bonding interactions between the hydrogen atom of amide (−NH) group and the oxygen atom of the Met98 backbone at 1.93 Å distance, and between the hydrogen atom of the $-OCH_2-$ chain and the oxygen atom of the Gly96 backbone at 2.40 Å distance. In addition, we found electrostatic interactions between the nitrogen atom of pyridine ring of the derivative-2 and the hydroxyl (−OH) group of NAD^+ cofactor at 2.98 Å distance and between the hydrogen atom of the derivative-2 and the oxygen atom of the Ala198 backbone at 4.96 Å distance. The pyridine ring of the derivative-2 also contributes to the π−π stacking interaction between the derivative-2 and NAD^+ cofactor at 4.72 Å distance, and the electrostatic interaction between the oxygen atom of NAD^+ and the nitrogen atom of the pyridine ring is additionally formed. In fact, the present FMO calculation indicates that the IFIE between the derivative-2 and NAD^+ cofactor is −44.8 kcal/mol. Therefore, it is concluded that the pyridine ring of the derivative-2 is important for the strong binding between the derivative-2 and NAD^+ cofactor and contribute mainly to the interaction between the derivative-2 and NAD^+ cofactor.

Table 3
Interaction energies (IEs; kcal/mol) between the derivative and each amino acid residue of InhA as well as NAD^+ calculated by *ab initio* FMO method. The residues having strong attractive interaction (larger than −10 kcal/mol) with the derivative are listed. Total of IEs for all residues and NAD^+ are listed in the last line. The difference in IEs between the derivatives 2 and 3 is also listed.

Residue	Derivative 1	Derivative 2	Derivative 3	Difference between 2 and 3
Gly96	−11.7	−10.0	−8.8	−1.2
Met98	−19.3	−18.6	−19.0	0.4
Pro99	−0.5	−3.8	−0.1	−3.7
Met103	−0.4	−2.6	−3.1	0.5
Lys165	−0.3	−2.5	−2.4	−0.1
Thr196	−0.1	−1.7	−1.0	−0.7
Leu197	−2.9	−0.9	−1.3	0.4
Ala198	−2.6	−6.7	−1.3	−5.4
Ala201	−1.2	−0.7	−1.1	0.4
Ile202	−1.0	−1.6	−1.5	−0.1
NAD^+	−42.4	−44.8	−33.3	−11.5
Total	−101.0	−109.0	−87.8	−21.2

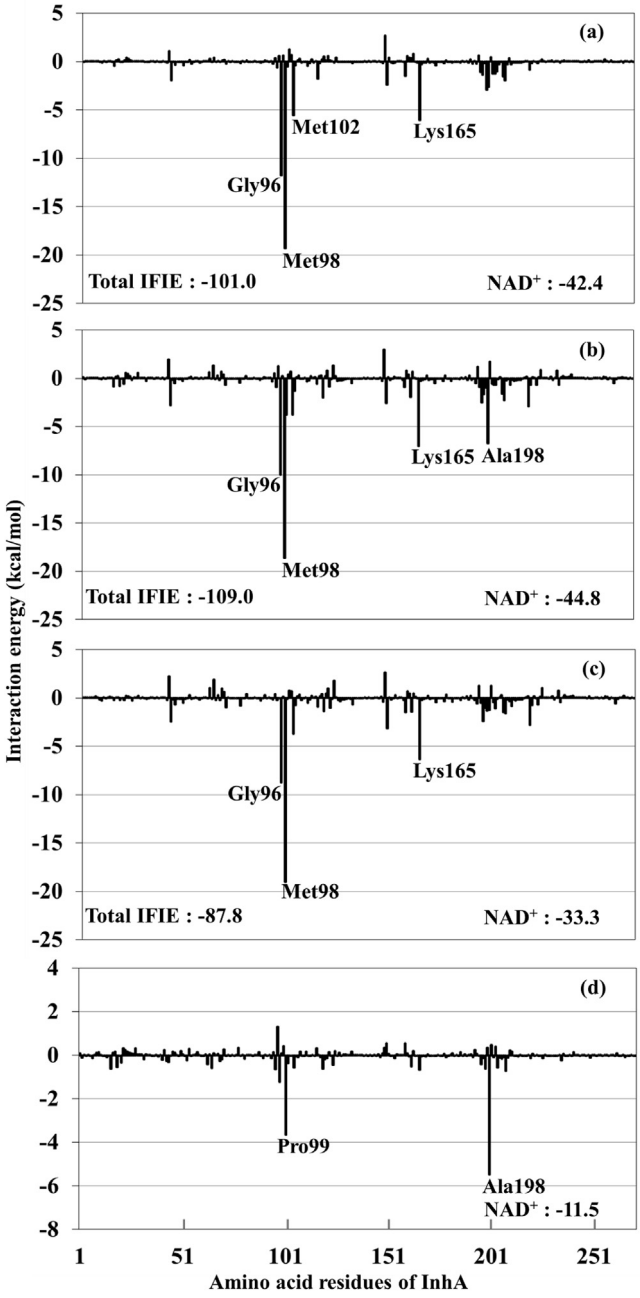


Fig. 3. IFIEs between each amino acid residue of InhA and the derivative; (a) derivative-1, (b) derivative-2, (c) derivative-3, and (d) the difference in IFIEs of (b) and (c).

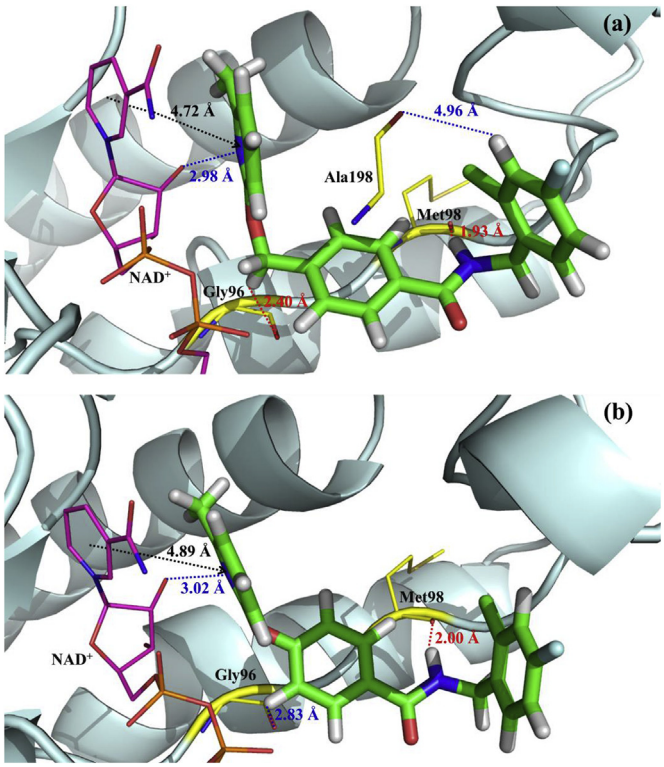


Fig. 4. Interacting structures between the InhA residues and the derivative; (a) derivative-2 and (b) derivative-3. Red, blue and black lines indicate hydrogen bonding, electrostatic and π-π interactions, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

On the other hand, as shown in Fig. 4(b), the derivative-3 has similar interacting structures with InhA as the derivative-2, although the distances between InhA residues or NAD^+ cofactor and the derivative-3 are slightly longer than those in the InhA + derivative-2 complex. As shown in Fig. 1, the derivative-2 has a $-OCH_2-$ group between its benzene and pyridine rings, while the derivative-3 has only oxygen atom between the rings. By replacing the $-OCH_2-$ group with an oxygen atom, the hydrogen bond between the derivative-2 and Gly96 is disappeared as shown in Fig. 4(b). In addition, the distance between the central benzene and the pyridine rings is shortened by the replacement, resulting in the separation of the pyridine ring from NAD^+ cofactor, as indicated in Fig. 4(a) and (b). Furthermore, the distance between the derivative-3 and Ala198 is significantly longer than that between the derivative-2 and Ala198. These differences in the interactions between the derivative and InhA residues or NAD^+ cofactor cause significant (35.4 kcal/mol) difference in BEs for the derivatives-2 and 3. Therefore, it is demonstrated that the $-OCH_2-$ group of the derivative-2 is important for its strong binding to the InhA + NAD^+ complex.

3.3. Proposal for novel potent inhibitors against InhA

As listed in Table 2, the derivative-2 has the highest activity and the largest binding energy to InhA. We therefore employed the derivative-2 as the lead compound (LC) to develop bioisosteres which would serve as more efficient InhA inhibitors. A series of heteroaryl benzamide derivatives were designed by replacing the important fragments of the derivative-2, using molecular replacements acquired from the SwissBioisostere database (http://www.swissbioisostere.ch) [35]. This database is a collection of information on 4.5 million of molecular sub-structural replacements and their information in biochemical assays created through the detection of matching molecular pairs and by the process of mining bioactivity data in the ChEMBL database. In the present study, we explored and analysed new information to propose novel InhA inhibitors as effective drugs available for treating tuberculosis. The exploration and development of novel InhA inhibitors were performed by expanding structure activity relationships (SAR) studies using physicochemical, bulky and bioisosteric replacements at the aromatic rings (A0 and B0 rings) of the derivative-2 as shown in Fig. 5, in order to increase the interaction between the derivative and InhA. Nine and five groups were considered for the replacement of the A0 and B0 rings of the derivative-2, respectively, and

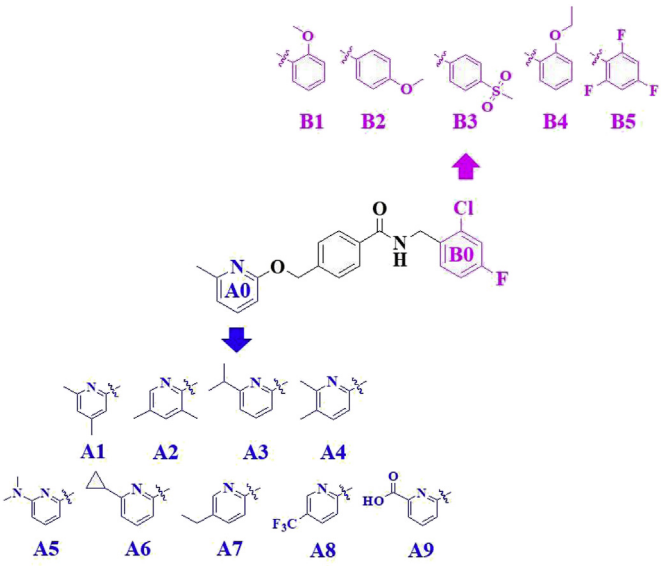


Fig. 5. Generation of novel derivatives based on the derivative-2: aromatic rings (A0 and/or B0) are replaced by the other group.

totally 14 new derivatives with a single replacement of the A0 or B0 ring were created. In addition, 45 derivatives with double replacements at both the rings were created. Totally 59 derivatives were created by use of the SwissBioisostere database [35].

These 59 derivatives were screened by the Lipinski's five rules [36]; molecular weight, rotatable bonds, H-bond acceptors, H-bond donors and LogP. As listed in Table 4, 15 derivatives meet the rules to be selected as candidate inhibitors. In addition, we checked if these derivatives meet the conditions of the absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET rules [37]) properties or not, using PreADMET software (https://preadmet.bmdrc.kr). PreADMET predicts the values of physically relevant descriptors and pharmaceutically important properties of ligands that can be compared with the recommended values of ideal drugs. In the present study, blood-brain barrier (BBB) penetration, plasma protein binding (PPB), human intestinal absorption (HIA), heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cell lines (Caco2) and toxicity to mouse and rat were considered. As listed in Table 5, it was confirmed that all of our proposed derivatives fulfill the conditions as ideal drugs. These 15 derivatives were docked to InhA and their binding properties were investigated precisely by *ab initio* FMO calculations.

Table 4
Our proposed novel inhibitors against InhA meeting Lipinski's five rules [36]; (1) molecular weight (MW) is less than 500 g/mol, (2) rotatable bonds is less than 10 bonds, (3) number of H-bond acceptors is less than 10, (4) number of H-bond donors is less than 5, and (5) LogP is less than 4.15.

Replaced groups	MW[1]	Rotatable bonds[2]	H-bond acceptors[3]	H-bond donors[4]	LogP[5]
A0/B4	376.45	9	4	1	2.87
A1/B1	376.45	8	4	1	2.87
A1/B2	376.45	8	4	1	2.87
A1/B4	390.47	9	4	1	3.08
A2/B1	376.45	8	4	1	2.87
A2/B2	376.45	8	4	1	2.87
A2/B4	390.47	9	4	1	3.08
A3/B1	390.47	9	4	1	3.08
A3/B2	390.47	9	4	1	3.08
A3/B4	404.50	10	4	1	3.29
A4/B1	376.45	8	4	1	2.87
A4/B2	376.45	8	4	1	2.87
A4/B4	390.47	9	4	1	3.08
A7/B1	376.45	9	4	1	2.87
A7/B4	390.47	10	4	1	3.08

Table 5
Our proposed novel inhibitors against InhA meeting the ADMET rules [37]. The different pharmacokinetic properties and their acceptable range; (1) Blood-brain barrier (BBB) is > 2.0 suggested high absorption to central nervous system (CNS), while BBB is < 0.1 indicates very low absorption, (2) Plasma protein binding (PPB) is >80% for strong protein binding, (3) Human intestinal absorption (HIA) calculated at pH 7.4 is between 0 and 20% for poor absorption, 20–70% for moderate absorption, 70–100% for fair absorption, (4) Caco2 permeability (nm/sec) is larger than 70 for high permeability, while is smaller than 4 for low permeability, and (5) toxicity for carcino-mouse and carcino-rat.

Replaced groups	ADME				Toxicity	
	BBB[1]	PPB[2]	HIA[3]	Caco2[4]	Carcino_mouse[5]	Carcino_rat[5]
A0/B4	0.09	89.19	96.22	51.86	negative	negative
A1/B1	0.12	89.26	96.22	49.62	negative	negative
A1/B2	0.11	88.71	96.22	50.58	negative	negative
A1/B4	0.21	89.34	96.31	53.03	negative	negative
A2/B1	0.20	89.96	96.22	47.61	negative	negative
A2/B2	0.18	89.29	96.22	48.41	negative	negative
A2/B4	0.36	89.81	96.31	52.88	negative	negative
A3/B1	0.36	90.27	96.31	51.21	negative	negative
A3/B2	0.33	89.70	96.31	52.04	negative	negative
A3/B4	0.65	90.04	96.41	53.72	negative	negative
A4/B1	0.12	89.61	96.22	49.62	negative	negative
A4/B2	0.11	88.92	96.22	50.58	negative	negative
A4/B4	0.21	89.59	96.31	53.03	negative	negative
A7/B1	0.16	90.26	96.22	48.94	negative	negative
A7/B4	0.28	89.93	96.31	52.86	negative	negative

Table 6
Result of docking simulations of novel derivatives to InhA. Created structures are grouped in several clusters, which are ranked based on their lowest binding energy (LBE; kcal/mol). The number of candidate structures included in each cluster, and the conformation of the derivative compared to that of the derivative-1 in the PDB structure of IhnA + derivative-1 are listed.

Derivative	Rank	LBE	Number of structures	Conformation
A0/B4	1	−5.96	99	Similar
A1/B1	2	−5.94	22	Similar
A1/B2	3	−4.85	8	Similar
A1/B4	1	−6.11	36	Similar
A2/B1	1	−6.69	69	Similar
A2/B2	2	−6.06	29	Similar
A2/B4	1	−6.80	68	Similar
A3/B1	1	−6.52	26	Similar
A3/B2	2	−5.70	5	Similar
A3/B4	1	−6.69	33	Similar
A4/B1	1	−6.60	62	Similar
A4/B2	1	−5.92	30	Similar
A4/B4	1	−6.53	56	Similar
A7/B1	1	−5.77	37	Similar
A7/B4	2	−5.56	43	Similar

3.4. Binding properties between InhA and our proposed novel derivatives

We first docked each of the 15 derivatives to the ligand-binding pocket of InhA. The created structures of the InhA + derivative complex were grouped into several clusters. Among these clusters, we selected the cluster with larger binding energy and a conformation similar to the derivative-1 in the InhA + derivative-1 complex observed by the X-ray analysis (PDB ID: 4QXM [22]). As listed in Table 6, most of the derivatives have similar conformations to the derivative-1, in the first or the second ranked cluster. These candidate structures of the InhA + derivative complexes were optimized by the classical AMBER-MM method, in which solvating water molecules existing within 8 Å from the surface of the complex were considered explicitly.

To predict the binding affinity between InhA and the novel derivative, we evaluated the BE of each derivative to InhA from the TEs calculated by the *ab initio* FMO method for the component structures. As listed in Table 7, our proposed derivatives A1/B4 and A4/B4 have significantly larger BE compared with the derivative-2, indicating the possibility of these derivatives as potent inhibitors against InhA. In addition, to confirm the accuracy of the BEs, we investigated the total IFIE between the derivative and all InhA residues and NAD^+ by the FMO method. As shown in Fig. 6, the values of BEs and total IFIEs correlate well to each other, although the total IFIE for one derivative (A3/B2) is underestimated. In order to clarify the reason for this result, we investigated the interactions

Table 7
Binding energies (kcal/mol) and total interaction energies (Total IFIE, kcal/mol) between InhA + NAD^+ and our proposed novel derivatives as well as the derivative-2 evaluated by the present *ab initio* FMO calculations.

Derivative	Binding energies	Total IFIE
Derivative-2	−105.0	−109.0
A0/B4	−101.3	−79.3
A1/B1	−98.7	−75.5
A1/B2	−112.1	−92.2
A1/B4	−134.5	−113.7
A2/B1	−100.6	−74.7
A2/B2	−106.6	−80.2
A2/B4	−99.8	−76.2
A3/B1	−103.0	−77.5
A3/B2	−96.2	−96.2
A3/B4	−113.0	−87.8
A4/B1	−121.2	−102.1
A4/B2	−125.3	−104.0
A4/B4	−140.3	−117.3
A7/B1	−85.9	−66.2
A7/B4	−93.2	−73.4

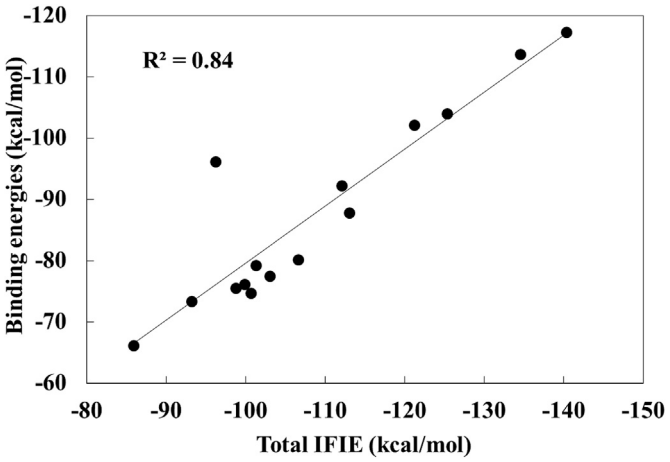


Fig. 6. Correlation between the total IFIEs and the binding energies between InhA + NAD^+ and the derivative evaluated by the present FMO calculations.

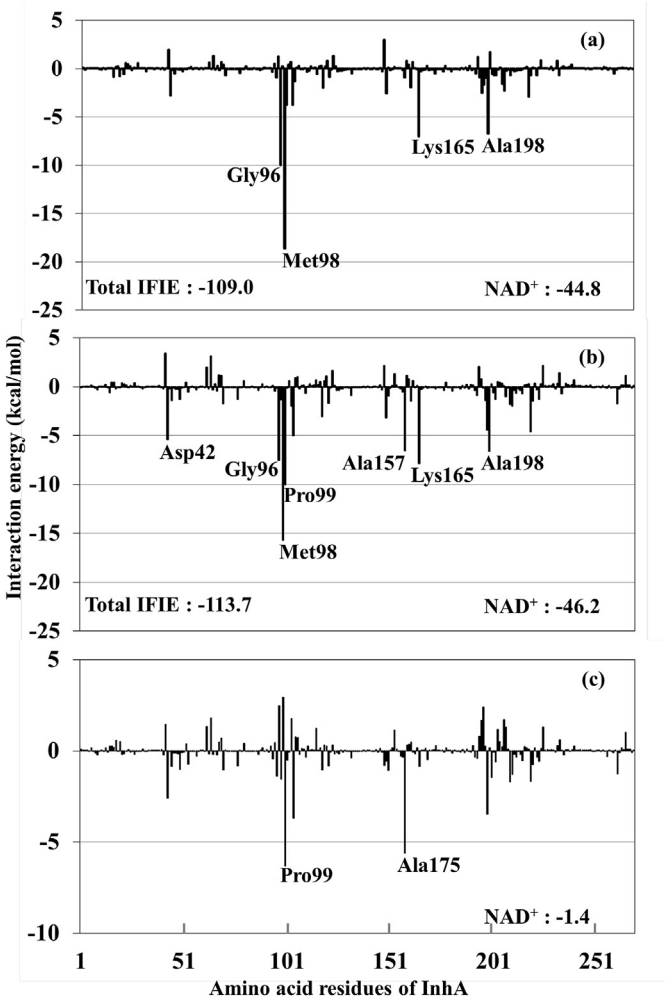


Fig. 7. IFIEs between each amino acid residue of InhA and the derivative; (a) derivative-2, (b) derivative A1/B4, and (c) the difference in IFIEs of (a) and (b).

between the derivative A3/B2 and some amino acid residues of InhA to find that the conformation of A3/B2 is significantly different from those for the other derivatives. This difference is likely to cause underestimation of total IFIE for the derivative A3/B2. The coefficient R^2 of correlation between BE and total IFIE is 0.84. Accordingly, it is expected that our proposed novel derivatives A1/B4 and A4/B4 can bind more strongly to the ligand-binding pocket of InhA than the existing derivative-2. Their IFIEs with each of the InhA residues as well as NAD^+ are compared with those of the derivative-2 in Figs. 7 and 8.

To elucidate the reason for the large BE of the derivative A1/B4, we investigated its specific interactions with InhA residues and NAD^+ by the *ab initio* FMO method. As shown in Fig. 7(a) and (b), the derivative A1/B4 has strong attractive interaction with Met98 as well as NAD^+ in the similar way as the derivative-2. To reveal the effect of the replacement of the A0 and B0 rings by A1 and B4, we moreover analysed the difference in IFIEs between the derivatives-2 and A1/B4. As shown in Fig. 7(c), the derivative A1/B4 binds more strongly to Pro99 and Ala157 of InhA compared with the derivative-2, resulting in the larger BE of the derivative A1/B4 than the derivative-2. The interacting structures between the derivative A1/B4 and the InhA residues and NAD^+ were investigated in detail, as shown in Fig. 9(a), which indicates that the NH group of the derivative A1/B4 forms a hydrogen bond with the backbone of

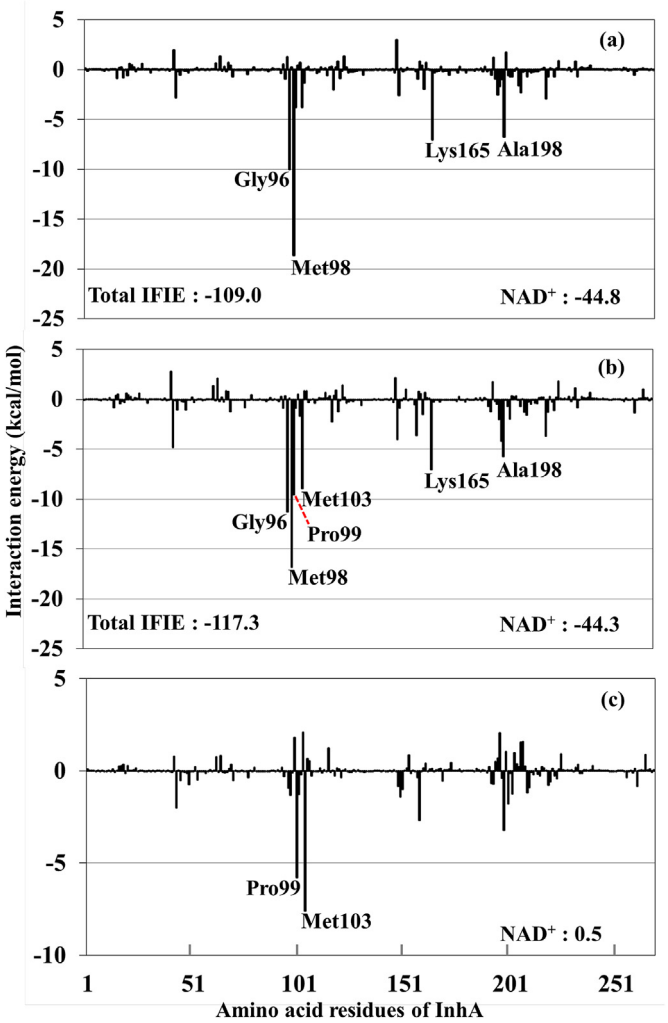


Fig. 8. IFIEs between each amino acid residue of InhA and the derivative; (a) derivative-2, (b) derivative A4/B4, and (c) the difference in IFIEs of (a) and (b).

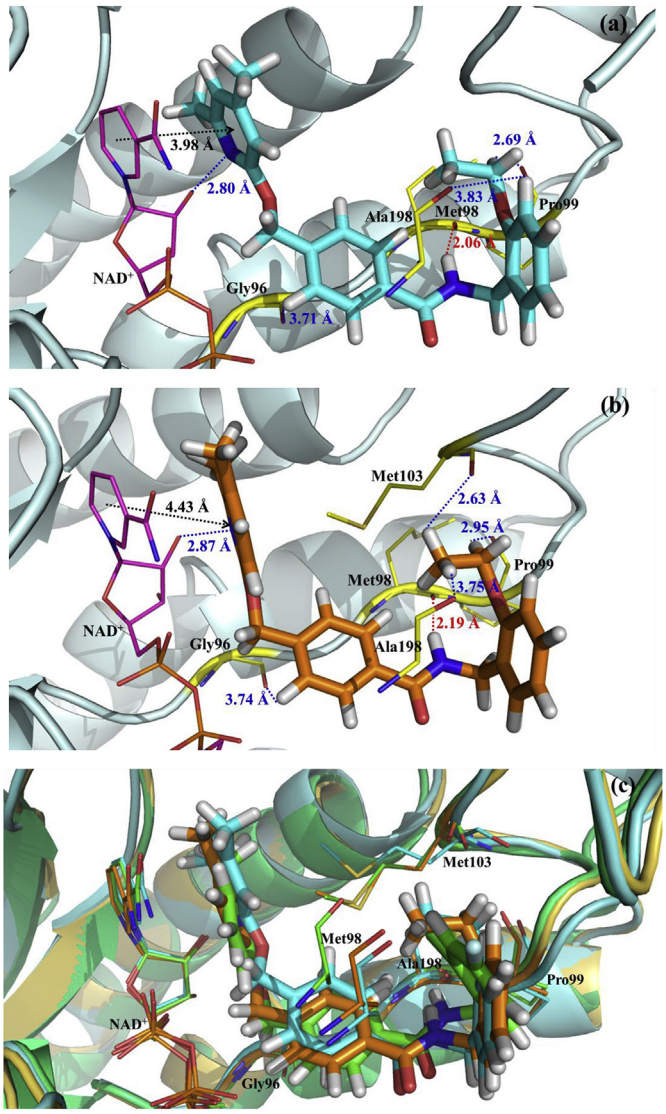


Fig. 9. Interacting structures between the InhA residues and the derivative; (a) derivative A1/B4, (b) derivative A4/B4, and (c) superimposition of derivative-2 (green color), derivative A1/B4 (blue color), and derivative A4/B4 (orange color). Red, blue and black lines indicate hydrogen bonding, electrostatic and π-π interactions, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Met98 at 2.06 Å distance. This interaction is considered to be a crucial interaction for strong binding of the derivative A1/B4 to InhA. In addition, the derivative A1/B4 has electrostatic interactions with Gly96 (3.71 Å), Pro99 (2.69 Å) and Ala198 (3.83 Å). It is noted that the derivative A1/B4 and the NAD^+ cofactor interact each other by the π−π interaction at 3.98 Å as well as the electrostatic interaction at 2.80 Å, resulting in very large (−46.2 kcal/mol) IFIE between them. Consequently, it was elucidated from Figs. 7(b) and 9(a) that the NAD^+ cofactor plays an important rule for attracting the derivative A1/B4 to the ligand-binding pocket of InhA.

The derivative A4/B4 has also large BE as listed in Table 7, and the IFIEs between the derivative and each residue of InhA or the NAD^+ cofactor are shown in Fig. 8(b). The derivative A4/B4 interacts strongly with the NAD^+ cofactor as well as Met98. To make clear the reason for the significant difference in BEs between the derivatives-2 and A4/B4, we analysed the difference in IFIEs for these derivatives. As shown in Fig. 8(c), the derivative A4/B4 binds more strongly to Pro99 and Met103 of InhA than the derivative-2. As a

result, the BE of the derivative A4/B4 is significantly (35.3 kcal/mol) larger than that of the derivative-2 as listed in Table 7. We furthermore investigated the interacting structures between the derivative A4/B4 and the InhA residues and NAD^+. As shown in Fig. 9(b), the derivative A4/B4 interacts with the NAD^+ cofactor by the $\pi-\pi$ interaction at 4.43 Å as well as the electrostatic interaction at 2.87 Å, resulting in very large (−44.3 kcal/mol) IFIE between them. The derivative A4/B4 also forms a hydrogen bond with the oxygen atom of the Met98 backboned at 2.19 Å distance, while there are electrostatic interactions between the derivative A4/B4 and Gly96 (3.74 Å), Pro99 (2.95 Å), Met103 (2.63 Å) and Ala198 (3.75 Å) residues of InhA.

From the above analysis of the specific interactions between InhA and our proposed derivatives, it is expected that some modifications of the derivative-2 such as the derivatives A1/B4 and A4/B4 can produce more potent inhibitors to cover the ligand-binding pocket of InhA. Fig. 9(c) indicates that the B4 ring of the derivatives A1/B4 and A4/B4, which is located on the right side of Fig. 9(c), is important for keeping this conformation, because Met98, Pro99 and Ala198 of InhA exist near the B4 ring. It is thus expected that if the interaction between the side chain of the B4 ring and InhA could be enhanced by adding some groups to the B4 ring, the modified derivative-2 may be an efficient inhibitor to cover the ligand-binding pocket composed of Met98, Pro99 and Ala198 residues of InhA.

4. Conclusions

In the present study, we investigated the specific interactions between InhA and several heteroaryl benzamide derivatives, using *ab initio* molecular simulations based on protein-ligand docking, classical MM optimizations and *ab initio* FMO calculations. Based on the results simulated, we proposed several novel derivatives as potent inhibitors against InhA and investigated their specific interactions with InhA and NAD^+ to elucidate the following points.

(1) The derivatives A1/B4 and A4/B4 shown in Fig. 5 bind most strongly to the InhA + NAD^+ complex to be potent inhibitors against InhA.
(2) The NAD^+ cofactor plays an important rule for attracting the derivative to the ligand-binding pocket of InhA.
(3) Met98, Gly96 and Pro99 residues of InhA mainly contribute to the binding between InhA and the derivatives.

Acknowledgments

The Thailand Research Fund (RSA5980057 and RGJ Advanced Programme RAP60K0009), the National Research Council of Thailand and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) are gratefully acknowledged for research supports. A part of this research was undertaken in activities of the student exchange program between Toyohashi University of Technology and Ubon Ratchathani University, which is supported by Japan Student Services Organization.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.02.011.

References

[1] World Health Organization, Global Tuberculosis Report, 2017. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. (Accessed 26 October 2018).
[2] C. Dye, M.A. Espinal, C.J. Watt, C. Mbiaga, B.G. Williams, Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis, J. Infect. Dis. 185 (2002) 1197–1202.
[3] C.Y. Chiang, R. Centis, G.B. Migliori, Drug-resistant tuberculosis: past, present, future, Respirology 15 (2010) 413–432.
[4] N.S. Shah, A. Wright, G.H. Bai, L. Barrera, F. Boulahbal, N. Martin-Casabona, F. Drobniewski, C. Gilpin, M. Havelkova, R. Lepe, R. Lumb, B. Metchock, F. Portaels, M.F. Rodrigues, S. Rusch-Gerdes, A. Van Deun, V. Vincent, K. Laserson, C. Wells, J.P. Cegielski, Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis, Emerg. Infect. Dis. 13 (2007) 380–387.
[5] M. Berry, O.M. Kon, Multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis: an emerging threat, Eur. Respir. Rev. 18 (2009) 195–197.
[6] B.R. Bloom, C.J. Murray, Tuberculosis: commentary on a reemergent killer, Science 257 (1992) 1055–1064.
[7] J. Chakaya, H. Getahun, R. Granich, D. Havlir, Confronting TB/HIV in the era of increasing anti-TB drug resistance, J. Int. AIDS Soc. 11 (2008) 6.
[8] W.M. El-Sadr, S.J. Tsiouris, HIV-associated tuberculosis: diagnostic and treatment challenges, Semin. Respir. Crit. Care Med. 29 (2008) 525–531.
[9] P. Nunn, A. Reid, K.M. De Cock, Tuberculosis and HIV infection: the global setting, J. Infect. Dis. 196 (2007) S5–S14.
[10] M.A. Aziz, A. Wright, A. Laszlo, A. Muynck, F. Portaels, A.V. Deun, C. Wells, P. Nunn, L. Blanc, M. Raviglione, Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance): an updated analysis, Lancet 368 (2006) 2142–2154.
[11] B. Lei, C. Wei, S. Tu, Action mechanism of antitubercular isoniazid, J. Biol. Chem. 275 (2000) 2520–2526.
[12] D.A. Rozwarski, G.A. Grant, D.H.R. Barton, W.R. Jacobs Jr., J.C. Sacchettini, Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*, Science 279 (1998) 98–102.
[13] M.C. Raviglione, I.M. Smith, XDR tuberculosis-Implications for global public health, N. Engl. J. Med. 356 (2007) 656–659.
[14] A. Quemard, A. Dessen, M. Sugantino, W.R. Jacobs, J.C. Sacchettini, J.S. Blanchard, Binding of catalase-peroxidase-activated isoniazid to wild-type and mutant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductases, J. Am. Chem. Soc. 34 (1996) 8235–8241.
[15] B. Saint-Joanis, H. Souchon, M. Wilming, K. Johnsson, P.M. Alzari, S.T. Cole, Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*, Biochem. J. 338 (1999) 753–760.
[16] B. Lei, C.J. Wei, S.C. Tu, Action mechanism of antitubercular isoniazid, J. Biol. Chem. 275 (2000) 2520–2526.
[17] X. Zhao, H. Yu, S. Yu, F. Wang, J.C. Sacchettini, R.S. Magliozzo, Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant, Biochemistry 45 (2006) 4131–4140.
[18] D.A. Rozwarski, C. Vilche`ze, M. Sugantino, R. Bittman, J.C. Sacchettini, Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD^+ and a C16 fatty acyl substrate, J. Biol. Chem. 274 (1999) 1558–1559.
[19] A.R. Baulard, J.C. Betts, J. Engohang-Ndong, S. Quan, R.A. McAdam, P.J. Brennan, C. Locht, G.S. Besrai, Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria, J. Biol. Chem. 275 (2000) 28326–28331.
[20] S.V. Ramaswamy, R. Reich, Shu-Jun Dou, L. Jasperse, X. Pan, A. Wanger, T. Quitugua, E.A. Graviss, Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, Antimicrob. Agents Chemother. 47 (2003) 1241–1250.
[21] K. Johnsson, P.G. Schultz, Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobscterium tuberculosis*, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 7425–7426.
[22] A. Guardia, G. Gulten, R. Fernandez, J. Gûmez, F. Wang, M. Convery, D. Blanco, M. Martinez, E. Perez-Herran, M. Alonso, F. Ortega, J. Rullas, D. Calvo, L. Mata, R. Young, J.C. Sacchettini, A. Mendoza-Losana, M. Remuiinan, L. Ballell Pages, J. Castro-Pichel, N-Benzyl-4-((heteroaryl)methyl)benzamides: a new class of direct NADH-dependent 2-trans enoyl–acyl carrier protein reductase (InhA) inhibitors with antitubercular activity, ChemMedChem 11 (2016) 687–701.
[23] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. calmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
[24] B.H. Besler, K.M. Merz Jr., P.A. Kollman, Atomic charges derived from semi-empirical methods, J. Comput. Chem. 11 (1990) 431–439.
[25] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity, J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785–2791.
[26] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Götz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek,

R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P.A. Kollman, AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.

[27] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J.L. Klepeis, R.O. Dror, D.E. Shaw, Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field, Proteins 78 (2010) 1950–1958.

[28] W.L. jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, J. Chem. Phys. 79 (1983) 926–935.

[29] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general Amber force field, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1157–1174.

[30] K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayashi, Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules, Chem. Phys. Lett. 313 (1999) 701–706.

[31] Y. Mochizuki, T. Nakano, S. Koikegami, S. Tanimori, Y. Abe, U. Nagashima, K. Kitaura, A parallelized integral-direct second-order Muller-Plesset perturbation theory method with a fragment molecular orbital scheme, Theor. Chem. Acc. 112 (2004) 442–452.

[32] Y. Mochizuki, S. Koikegami, T. Nakano, S. Amari, K. Kitaura, Large scale MP2 calculations with fragment molecular orbital scheme, Chem. Phys. Lett. 396 (2004) 473–479.

[33] Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, N. Tagushi, S. Tanaka, Higher-order correlated calculations based on fragment molecular orbital scheme, Theor. Chem. ACC. 130 (2011) 515–530.

[34] K. Fukuzawa, Y. Komeiji, Y. Mochizuki, A. Kato, T. Nakano, S. Tanaka, Intra- and inter-molecular interactions between cyclic-AMP receptor protein and DNA: *Ab initio* fragment molecular orbital study, J. Comput. Chem. 27 (2006) 948–960.

[35] M. Wirth, V. Zoete, O. Michielin, W.H.B. Sauer, SwissBioisostere: a database of molecular replacements for ligand design, Nucleic Acids Res. 41 (2013) D1137–D1143.

[36] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Adv. Drug Deliv. Rev. 46 (2001) 3–26.

[37] S.K. Lee, G.S. Chang, I.H. Lee, J.E. Chung, K.Y. Sung, K.T. No, The PreADME: pc-based program for batch prediction of adme properties, EuroQSAR 9 (2004) 5–10.

JCIM JOURNAL OF CHEMICAL INFORMATION AND MODELING

Article

Cite This: J. Chem. Inf. Model. 2020, 60, 226−234

pubs.acs.org/jcim

Discovery of New and Potent InhA Inhibitors as Antituberculosis Agents: Structure-Based Virtual Screening Validated by Biological Assays and X-ray Crystallography

Pharit Kamsri,[†] Chayanin Hanwarinroj,[‡] Naruedon Phusi,[‡] Thimpika Pornprom,[‡] Kampanart Chayajarus,[‡] Auradee Punkvang,[†] Nitima Suttipanta,[§] Potjanee Srimanote,[∥] Khomson Suttisintong,[⊥] Chomphunuch Songsiriritthigul,[#] Patchreenart Saparpakorn,[¶] Supa Hannongbua,[¶] Siriluk Rattanabunyong,[□] Supaporn Seetaha,[□] Kiattawee Choowongkomon,[□] Sanya Sureram,[■] Prasat Kittakoop,[■,○,●] Poonpilas Hongmanee,[△] Pitak Santanirand,[△] Zhaoqiang Chen,[▲] Weiliang Zhu,[▲] Rosemary A. Blood,[▽] Yuiko Takebayashi,[▽] Philip Hinchliffe,[▽] Adrian J. Mulholland,[▼] James Spencer,[▽] and Pornpan Pungpo*[,‡]

[†]Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, 48000 Nakhon Phanom, Thailand

[‡]Department of Chemistry, Faculty of Science and [§]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, 34190 Ubonratchathani, Thailand

[∥]Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, 12120 Pathumthani, Thailand

[⊥]National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park, 12120 Pathumthani, Thailand

[#]Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), 30000 Nakhon, Ratchasima, Thailand

[¶]Department of Chemistry, Faculty of Science and [□]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, 10900 Bangkok, Thailand

[■]Chulabhorn Research Institute, 10210 Bangkok, Thailand

[○]Chulabhorn Graduate Institute, Chemical Biology Program, Chulabhorn Royal Academy, 10210 Bangkok, Thailand

[●]Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology (EHT), CHE, Ministry of Education, 10300 Bangkok, Thailand

[△]Division of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, 10400 Bangkok, Thailand

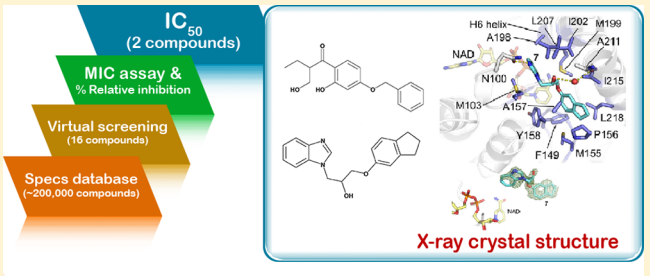
[▲]State Key Laboratory of Drug Research, Drug Discovery and Design Center, Shanghai Institute of Materia Medica, 201203 Shanghai, China

[▽]School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Biomedical Sciences Building, University Walk, BS8 1TD Bristol, United Kingdom

[▼]Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, BS8 1TS Bristol, United Kingdom

Supporting Information

ABSTRACT: The enoyl-acyl carrier protein reductase InhA of *Mycobacterium tuberculosis* is an attractive, validated target for anti-tuberculosis drug development. Moreover, direct inhibitors of InhA remain effective against InhA variants with mutations associated with isoniazid resistance, offering the potential for activity against MDR isolates. Here, structure-based virtual screening supported by biological assays was applied to identify novel InhA inhibitors as potential antituberculosis agents. High-speed Glide SP docking was initially performed against two conformations of InhA differing in the orientation of the active site Tyr158. The resulting hits were filtered for drug-likeness based on Lipinski's rule and avoidance of PAINS-like properties and finally subjected to Glide XP docking to improve accuracy. Sixteen compounds were identified and selected for in vitro biological assays, of which two (compounds **1** and **7**) showed MIC of 12.5 and 25 μg/mL against *M. tuberculosis* H37Rv, respectively. Inhibition assays against purified recombinant InhA determined IC_{50} values for these compounds of 0.38 and 0.22 μM, respectively. A crystal structure of the most potent compound, compound **7**, bound to InhA revealed the inhibitor to occupy a hydrophobic pocket implicated in binding the aliphatic portions of InhA substrates but distant from the NADH cofactor, i.e., in a site distinct from those occupied by the great majority of known InhA inhibitors. This compound provides an attractive starting template for ligand optimization aimed at discovery of new and effective compounds against *M. tuberculosis* that act by targeting InhA.



INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) remains a major worldwide public health problem,

Received: October 3, 2019
Published: December 10, 2019

Downloaded via NAKHON PHANOM UNIV on January 28, 2020 at 10:00:41 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

© 2019 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00918
J. Chem. Inf. Model. 2020, 60, 226−234

especially in areas of high population density and low- and middle-income countries. It is the leading cause of death by infectious disease and the ninth leading overall cause of death worldwide. World Health Organization (WHO) data identified 1.6 million TB deaths and 10 million new TB cases in 2017.[1] Although TB is considered treatable, this is threatened by the spread of drug-resistant strains; it is estimated that globally there are 4.9 million cases of patients infected with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) strains resistant to isoniazid and rifampicin, the two most important anti-TB agents. In 2017, 558 000 new cases of TB were identified that were resistant to rifampicin (RR-TB), the most effective first-line drug, with 82% of these MDR-TB. About 8% of TB patients worldwide are estimated to be infected with rifampicin-susceptible, isoniazid-resistant strains (HR-TB).[2]

The *M. tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase (*M. tuberculosis* InhA) is an attractive potential target for development of new antituberculosis drugs. InhA catalyzes the NADH-specific reduction of 2-*trans*-enoyl-ACP (Figure 1A) in the elongation cycle of the fatty acid synthase type II (FAS II) pathway, the final step of fatty acid biosynthesis in *M. tuberculosis*.[3,4] InhA is the primary target of isoniazid (INH), the second first-line drug for tuberculosis treatment.[5−7] However, the inhibitory activity of isoniazid is reduced by mutations either in InhA or, more commonly, in the KatG catalase-peroxidase responsible for converting the INH prodrug into its active form.[8−10] Thus, identifying inhibitors that directly bind to InhA without the requirement for activation by KatG (direct InhA inhibitors) may represent a valid strategy to overcome isoniazid resistance.[11,12] Hence multiple academic and pharmaceutical efforts have led to the discovery of direct InhA inhibitors.[13−18] However, most of the direct InhA inhibitors so far identified display good InhA inhibitory activity in vitro but poor activity against *M. tuberculosis*.[13,19−21]

The interactions of InhA with substrate, cofactor, and inhibitors have been extensively studied.[22] One outcome of these investigations is the identification of the active site residue Tyr158 as important both to stabilizing the substrate during the catalytic reaction of *M. tuberculosis* InhA and to the binding of direct InhA inhibitors.[3,4,23] Two different conformations of the Tyr158 side chain have been identified in binding of direct InhA inhibitors (Figure 1B), an "in" conformation associated with the ternary InhA complex (substrate/cofactor-bound form) and an "out" conformation resembling that observed in the binary InhA complex (cofactor-bound form).[19−24]

In the present work, we have applied structure-based virtual screening to select candidate InhA inhibitors from the compound library of the Specs database (www.specs.net), seeking to account for the mobility of Tyr158 by including both conformations of this residue in the screening workflow. This protocol identified two compounds that showed both inhibitory activity against *M. tuberculosis* cell growth and submicromolar inhibition of purified InhA in in vitro activity assays. A crystal structure for the complex of the most potent of these with InhA identified inhibitor binding in a hydrophobic active site pocket utilized in substrate binding and with Tyr158 in the in conformation. These findings demonstrate that these approaches can identify compounds with InhA inhibitory activity that are active against *M. tuberculosis*.

MATERIALS AND METHODS

Structure-Based Virtual Screening Approach. Structure-based virtual screening was employed to search the novel

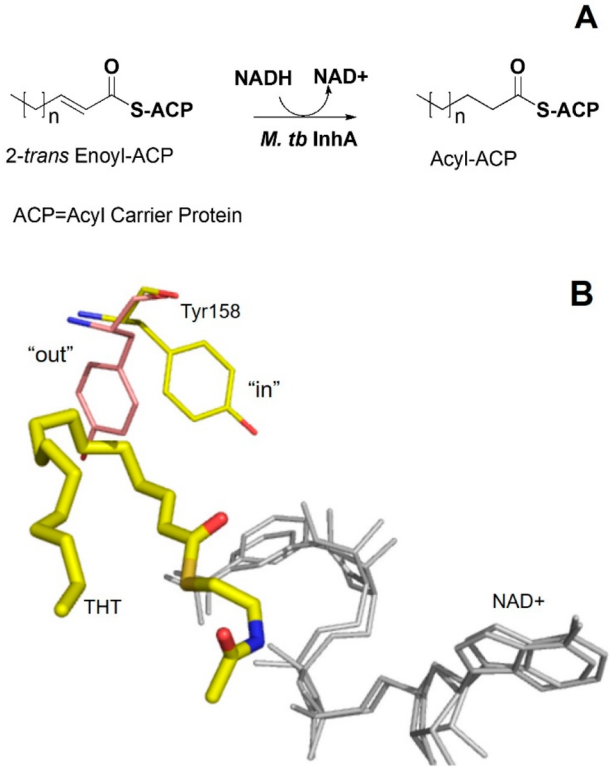


Figure 1. NADH-specific reduction of 2-*trans*-enoyl-ACP catalyzed by InhA (A), in and out conformations of Tyr158 side chain (B). Tyr158 in the in conformation (yellow) in the ternary InhA structure complexed with the C16 substrate analogue THT (*trans*-2-hexadecenoyl-(*N*-acetylcysteamine)-thioester (yellow carbon atom) and NAD^+ (gray) and Tyr158 in the out conformation (pink) in the binary InhA structure complexed with NAD^+ (gray). PDB codes of these structures are 1BVR[3] and 1ENY,[6] respectively.

InhA inhibitors from a ligand library of Specs database (Figure 2). Initially, all small molecules (~200 000 compounds) contained in Specs database were docked to InhA-inTyr158 and InhA-outTyr158 receptors using the Glide program[25−27] with the standard precision (SP) mode to reduce the time-consuming. Then, the top 2000 compounds ranked by Glide SP score obtained from each receptor were selected for further steps. This is followed by the selection of compounds that showed good Glide SP scores for binding in both InhA-inTyr158 and InhA-outTyr158. Subsequently, the selection of Lipinski's rule of five[28,29] and pan-assay interference compounds (PAINS)[30] were employed as the drug-likeness filter. Then, all filtered compounds were docked to both InhA-inTyr158 and InhA-outTyr158 by using the extra precision (XP) mode that showed higher accuracy than the SP mode. Top compounds that show good Glide scoring function obtained from XP Glide docking (Glide XP score) in both InhA-inTyr158 and InhA-outTyr158 receptors were selected as the hit compounds. All hit compounds were subjected to biological assays.

Molecular Docking Calculations. Molecular docking calculations were performed by the Glide program.[25−27] InhA with the "in" and "out" conformations of Tyr158 (InhA-inTyr158 and InhA-outTyr158, respectively) were considered as receptors for virtual screening. InhA complexed with a diphenyl ether derivative (PT70) (PDB code: 2X23)[20] and that complexed with a *N*-((3*R*,5*S*)-1-(benzofuran-3-carbonyl)-5-(ethylcarbamoyl)pyrrolidin-3-yl)-3-ethyl-1-methyl-1*H*-pyra-

DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00918
J. Chem. Inf. Model. 2020, 60, 226−234

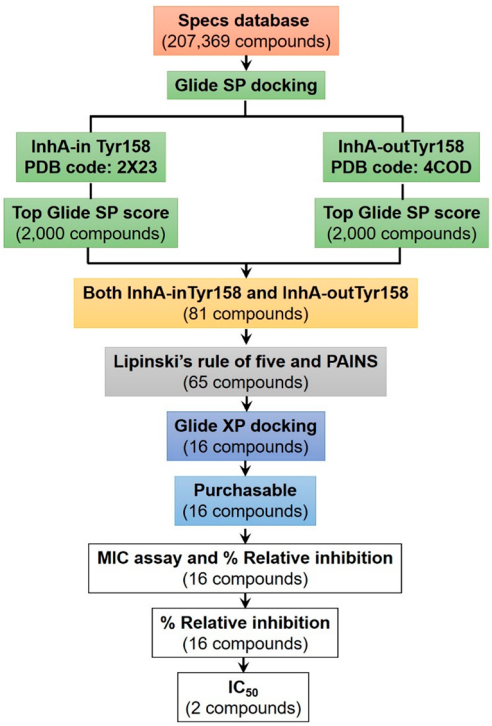


Figure 2. Virtual screening workflow for discovery of direct InhA inhibitors.

zole-5-carboxamide (KV1) (PDB code: 4COD)[21] were selected as the representative InhA-inTyr158 and InhA-outTyr158, respectively. The Protein Preparation Wizard Workflow integrated in the Maestro was employed to prepare receptor with PROPKA at pH 7.0 for amino acid protonation assignment. Then, receptors with OPLS-2005 force field were minimized with the heavy atoms restrained (rmsd of 0.3 Å). Small compounds were prepared with the LigPrep module provided in the Maestro program. The protonation states of compounds were generated with Epik at pH of 7.0 ± 2.0. Grid box was set by the default protocol and centered by the ligand.

Plasmid Expression for *M. tuberculosis* H37Rv InhA. To facilitate the expression of InhA enzyme, the InhA gene was amplified by forward primer 5′ATCATATGACAGGACTGGACGGC 3′ and reverse primer 5′ACGCCGGATCCTAGAGCATTTGG 3′ which introduced the 5′ *NdeI* restriction site and 3′ *Bam*HI restriction site. The slowdown PCR was used to amplify an 810 bp InhA amplicon. The amplicon was digested with *NdeI* and *Bam*HI and cloned to pET15b. The InhA-pET15b plasmid that contained hexa-histidine at *N*-terminal (InhA-6xHis enzyme) was transformed into *E. coli* BL21(DE3) for enzyme expression.

Overexpression and Purification of InhA Enzyme. Culture of BL21(DE3) cell carrying the wild type InhA was grown in 5 L of LB ampicillin (100 μg/mL) medium at 37 °C to an OD_{600} of 0.6 and subsequently induced with 50 μM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). After shaking at 250 rpm for 4 h at 29 °C, the bacterial cell was harvested by centrifugation at 4000 rpm for 10 min at 4 °C. The bacterial pellet was resuspended in 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, containing 500 mM NaCl. The bacterial cell was lysed by French press at 2000 psi and followed by centrifuging at 14 000 rpm for 30 min at 4 °C to remove cell debris. The supernatant was applied to Ni-NTA chromatography, and InhA was eluted by using a gradient of 250 mM imidazole. The fractions containing InhA were pooled and exchanged into 30 mM pierazine-1,4-bis (2-ethanesulfonic acid) (PIPES) buffer pH 6.8, containing 150 mM NaCl and 1 mM EDTA via PD-10 desalting columns equilibrated with PIPES 30 mM pH 6.8, 150 mM NaCl to remove imidazole. The elution fractions from desalting column were pooled and concentrated with Vivaspin centrifugal concentrator. Nanodrop was used to determine the concentration, and SDS-PAGE was used to analyze the purity of InhA. For protein crystallization, InhA was thrombin cleaved to remove the *N*-terminal His-tag prior to buffer exchange into 30 mM PIPES pH 6.8, 150 mM NaCl using a PD-10 desalting column.

Relative Inhibition of InhA Inhibitors. Triclosan, NADH, and DMSO were obtained from Sigma-Aldrich. Inhibitors were collected from the Specs database (www.specs.net). Stock solutions of the inhibitors were prepared in DMSO such that the final concentration of this cosolvent was constant at 1% (v/v) in the final volume of 100 μL for all kinetic reactions. The relative inhibition for InhA of selected compounds was evaluated in 200 μL of 30 mM PIPES buffer, pH 6.8 containing 1 mg/mL BSA, 50 μM NADH, 75 μM *trans*-2-dodecenoyl-CoA (DD-CoA), and 1 μM InhA inhibitor. The plate was shaken for 1 min, and finally the reactions were initiated by adding InhA at 15 nM final concentration. The mixer of InhA and NADH was preincubated at 25 °C for 5 min followed by the addition of compound and continually preincubated at 25 °C for 20 min. The reactions were started by adding 75 μM DD-CoA. The reaction was run for 10 min at 25 °C following the fluorescence intensity of NADH at excitation λ = 340 nm and emission λ = 420 nm. The fluorescence intensity of NADH of each well was recorded every 30 s. The relative inhibitory activity of each compound was expressed as % relative inhibition of InhA (initial velocity of the reaction) with respect to control reaction without the inhibitor as calculated in eq 1.

$$\%\ \text{relative inhibition} = 100 \times \left(\frac{F_{\text{compound}} - F_{\text{negative control}}}{F_{\text{positive control}} - F_{\text{negative control}}} \right) \quad (1)$$

F_{compound} is the fluorescence intensity of the enzymatic activity for each compound concentration, F_{positive} control is the fluorescence intensity of the enzyme activity in the absence of any compound, and F_{negative} control is the fluorescence intensity of the NADH oxidation in the absence of the enzyme. Positive control wells contained DMSO. Negative control wells did not contain InhA enzyme. Triclosan was used as the positive control. For those sample showing at least 60% inhibition, the follow-up verification was conducted in triple-triplicate in the IC_{50} determination mode.

IC_{50} Determination. Briefly, IC_{50} values were also determined in 96-well plates with the serial threefold dilution with assay buffer that contained DMSO of each inhibitor. The final condition of DMSO in the final assay was 1%. The IC_{50} value was determined by at least eight concentrations, with each triple-triplicate under saturation condition. The relative inhibition of InhA was calculated as described above. IC_{50} values were calculated from plots of enzyme activity versus the log of inhibitor concentration.

Antimycobacterial Assay. Microplate Alamar blue assay (MABA) was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against *M. tuberculosis* of hit compounds.

DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00918
J. Chem. Inf. Model. 2020, 60, 226−234

Hit compounds were dissolved in DMSO (Sigma) and subsequently diluted twofold in 100 mL of Middlebrook 7H9GC in the 96-well plate. A mycobacterial suspension was prepared in 0.04% Tween 80 and diluted with sterile distilled water to a turbidity of the McFarland no. 1. The suspension was then diluted 1:50 with 7H9GC, and 100 mL of this suspension was added to wells of microplates. After incubation at 37 °C for approximately 7 days, 12.5 mL of 20% Tween 80 and 20 mL of Alamar blue (SeroTec Ltd., Oxford, U.K.) were added to all wells. Growth of the organisms was determined after preincubation at 37 °C for 16−24 h by visual determination of a color change from blue to pink. The MIC is defined as the lowest concentration that prevents the color change. Triclosan (Sigma) was used as a standard drug. Clinical isolates of *M. tuberculosis* were obtained from a stock culture of Ramathibodi Hospital, Bangkok, Thailand, and they were obtained during routine diagnostic work (most cultures collected during 2000−2005). The ethics committee of Ramathibodi Hospital has approved the use of these clinical isolates for this study.

Crystallization, Data Collection, and Structure Solution. InhA crystals were grown under similar conditions as previously described[24,31] using sitting-drop vapor diffusion in 24-well plates (Hampton Research). Drops containing 1.5 μL of protein (13 mg/mL) and 1 μL of reservoir solution (17% w/v PEG 4000, 0.1 M ADA pH 6.8, 6 mM DMSO, 0.1 M ammonium acetate, 1% glycerol, 4.5 mM NAD^+) were equilibrated against 500 μL of reservoir solution. Trays were incubated at 19 °C, and crystals grew to their maximum size within 3−5 days. InhA complexed with compound 7 was obtained by soaking crystals overnight in 10 mM compound, 25% glycerol v/v, 17% w/v PEG 4000, 0.1 M ADA pH 6.8, 6 mM DMSO, 0.1 M ammonium acetate, 1% glycerol, and 4.5 mM NAD^+ at 4 °C. X-ray data were collected at 100 K on beamline I03 (Diamond Light Source, United Kingdom), integrated using XDS[32] in the Xia2[33] pipeline, and scaled using Aimless[34] in the CCP4 suite.[35] Crystallographic phases were solved using Phaser[36] with PDB 4BQP[24] as the starting model and six molecules in the asymmetric unit. Early rounds of refinement were completed in Refmac5[37] with modeling in Coot.[38] The ligand was generated using the ProDRG server[39] and then modeled using restraints generated in eLBOW in Phenix,[40] and the final structure completed by iterative rounds of model building and refinement in Coot and Phenix. Structure validation was assisted by MolProbity[41] and Phenix. Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb) with accession code 6R9W.

RESULTS AND DISCUSSION

Structure-Based Virtual Screening. The structure-based virtual screening workflow employed to identify direct InhA inhibitors is shown in Figure 2. After the top 2000 compounds, ranked by Glide SP score, were selected, 81 compounds that showed good Glide SP scores for InhA binding to both InhA-inTyr158 and InhA-outTyr158 conformations were collected. These were subsequently filtered by selection according to Lipinski's rule of five and against PAINS-like properties, yielding 65 compounds (Table S1). The binding affinities of these compounds to both InhA-inTyr158 and InhA-outTyr158 were further evaluated using the more accurate Glide XP mode. These compounds showed Glide XP scores for InhA-inTyr158 and InhA-outTyr158 binding in the ranges 5.1−10.2 and 5.6−9.3 kcal/mol, respectively. For comparison, the Glide XP scores of two comparator compounds binding to InhA-inTyr158 (2-(*o*-tolyloxy)-5-hexylphenol (PT70), PDB 2X23) and InhA-outTyr158 (*N*-((3*R*,5*S*)-1-(benzofuran-3-carbonyl)-5-(ethylcarbamoyl)pyrrolidin-3-yl)-3-ethyl-1-methyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (KV1) PDB 4COD) were −10.5 and −9.1 kcal/mol, respectively. Accordingly, the 16 compounds with the highest Glide XP scores for InhA-inTyr158(<−9.0 kcal/mol) and InhA-outTyr158 (<- 6.9 kcal/mol) were selected for biological evaluation (Table 1). The chemical structures of these compounds are provided (Table S2).

Antitubercular Activity. With the lower experimental cost and less administration for biosafety requirement, minimal inhibitory concentration (MIC) values for the 16 hit compounds were evaluated against the avirulent strain of *M. tuberculosis* (H37Ra) (Table 1). Most of these compounds showed no activity against *M. tuberculosis* H37Ra with MIC values more than 100 μg/mL. Importantly, compounds **1** and **7** (Figure 3) showed biological activity, with MIC values of 25 μg/mL. Accordingly, MIC values for compounds **1** and **7** against the virulent strain of *M. tuberculosis* (H37Rv) were determined. Compound **7** demonstrated equivalent MIC values against both *M. tuberculosis* strains (25 μg/mL), whereas MIC value against *M. tuberculosis* H37Rv of compound **1** is decreased by twofold in comparison with that against *M. tuberculosis* H37Ra (12.5 and 25 μg/mL, respectively). Therefore, compounds **1** and **7** screened from our present study are promising lead compounds for the further development of novel antituberculosis agents.

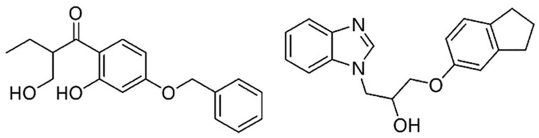
Table 1. Glide XP Docking Scores and in Vitro Biological Activities of Hit Compounds

	glide XP docking score (kcal/mol)		biological activity		
compounds	InhA-inTyr158	InhA-outTyr158	MIC[a] (μg/mL)	relative inhibition at 1 μM	IC_{50} (μM)
1	−10.9	−7.8	25	66	0.38 ± 0.98
2	−10.6	−7.0	>100	48	NT
3	−10.5	−7.2	>100	23	NT
4	−10.4	−8.3	>100	44	NT
5	−10.3	−7.6	>100	58	NT
6	−10.2	−7.3	>100	4	NT
7	−10.2	−7.1	25	62	0.22 ± 0.97
8	−10.1	−8.0	>100	44	NT
9	−9.9	−7.8	>100	21	NT
10	−9.7	−8.5	>100	45	NT
11	−9.6	−8.2	>100	50	NT
12	−9.4	−7.3	>100	48	NT
13	−9.3	−7.5	>100	57	NT
14	−9.3	−7.7	>100	58	NT
15	−9.2	−6.9	>100	14	NT
16	−9.0	−7.8	>100	35	NT
triclosan			50	70	0.60 ± 0.94
PT70[b]	−10.5	–	–	–	–
KV1[c]	–	−9.1	–	–	–

[a]MIC value determined against *M. tuberculosis* H37Ra. [b]Reference compound for Glide XP docking score in InhA-inTyr158 (PDB 2X23). [c]Reference compound for Glide XP docking score in InhA-outTyr158 (PDB 4COD).

***M. tuberculosis* InhA Inhibitory Activity.** The activities of the 16 hit compounds were next evaluated in vitro against purified recombinant *M. tuberculosis* InhA. Relative InhA inhibition at a final concentration of 1 μM was evaluated using the known InhA inhibitor triclosan[31] as a reference compound.

DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00918
J. Chem. Inf. Model. 2020, 60, 226−234



compound **1** compound **7**

Figure 3. Chemical structures of two active compounds against *M. tuberculosis* (compound **1** and compound **7**).

These experiments gave relative inhibition values for the 16 hit compounds in the range of 4−66%, compared to 70% for triclosan (Table 2). Although all 16 hit compounds displayed lower potency for InhA inhibition than triclosan, the two compounds compound **1** and compound **7** identified as active against *M. tuberculosis* H37Rv both showed relative inhibition values greater than 60%. These data suggest that antitubercular activity of these compounds is likely to arise from inhibition of InhA activity. These results motivated determination of IC_{50} values for InhA inhibition by these two compounds, in comparison with triclosan. The results are shown in Figure 4. Compound **1** and compound **7** showed IC_{50} values for InhA inhibition of 0.38 and 0.22 μM, respectively, compared to a value for triclosan of 0.60 μM (Table 1 and Figure 2). These data demonstrate that both compounds are active in both whole cell and enzyme inhibition assays.

Crystallographic Characterization of InhA Binding to Compound 7. Identification of active compounds motivated investigation of their modes of binding to InhA by X-ray crystallography. Purified recombinant InhA was crystallized in the presence of NADH in the previously reported C2 crystal[6] form by hanging-drop vapor diffusion and crystals exposed to inhibitors before freezing for diffraction data collection. Multiple diffraction experiments on soaked crystals yielded a single data set (diffracting to a resolution of 1.75 Å (Table 2)) which, after molecular replacement, contained positive difference ($F_o - F_c$) electron density, consistent with the structure of compound **7**, in maps for one of the six InhA molecules present in the crystallographic asymmetric unit. After refinement the real-space correlation coefficient (RSCC) value (calculated by Phenix)[40] for bound ligand was 0.897, indicating acceptable fit to the experimental electron density.[42] The average B-factor for the bound inhibitor was 31.66 Å^2, comparing favorably with a value of 33.64 Å^2 for the cofactor (most likely in the NAD$^+$ form) averaged across the 6 InhA molecules. Binding of compound **7** to the InhA active site is shown in Figure 5.

Compound **7** is bound in the InhA active site in an extended hydrophobic pocket, with the bicyclic indane contacting residues Phe149, Met155, Pro156, Ala157, Ile215, and Leu218, and the benzimidazole ring residues Met103, Ala198, Met199, Ile202, and Leu207. The inhibitor hydroxyl group makes a water-mediated hydrogen bond to the backbone carbonyl of Ala211. Tyr158 is clearly resolved as being in the in orientation; other molecules in the asymmetric unit feature Tyr158 in in (molecules B and D), out (molecules C and F), and dual (molecule E) conformations, indicating that Tyr158 can sample different rotamers in this crystal form. However, our observation of inhibitor bound only to a molecule with Tyr158 in the in conformation, coupled with the results of superpositions that indicate a clash between the Tyr158 out conformation and the inhibitor indane, strongly support the contention that compound **7** binds preferentially to InhA in the inTyr158 conformation. Surprisingly, the inhibitor binds some

Table 2. Crystallographic Data Collection and Refinement Statistics

Data Collection[a]	
beamline	DLS I03
space group	*C*2
molecules/ASU	6
cell dimensions	
a, *b*, *c* (Å)	100.90, 81.60, 189.42
α, β, γ (deg)	90.0, 95.52, 90.0
wavelength(s) (Å)	0.97624
resolution (Å)	43.32−1.75 (1.78−1.75)
R_{pim}	0.046 (0.389)
$CC_{1/2}$	0.997 (0.765)
$I/\sigma(I)$	10.1 (2.3)
completeness (%)	99.3 (98.4)
redundancy	6.9 (6.8)
Refinement	
resolution (Å)	43.317−1.75
no. reflections	152796
R_{work}/R_{free}	0.1871/0.2269
no. non-H atoms	
protein	11795
solvent	1031
inhibitor	23
NAD	264
B-factors	
protein	39.87
solvent	38.06
inhibitor	31.66
NAD	33.64
rms deviations	
bond lengths (Å)	0.017
bond angles (deg)	1.480
Ramachandran (%)	
outliers	0.00
favored	95.94
PDB code	6R9W

[a]Values in parentheses are for highest-resolution shell.

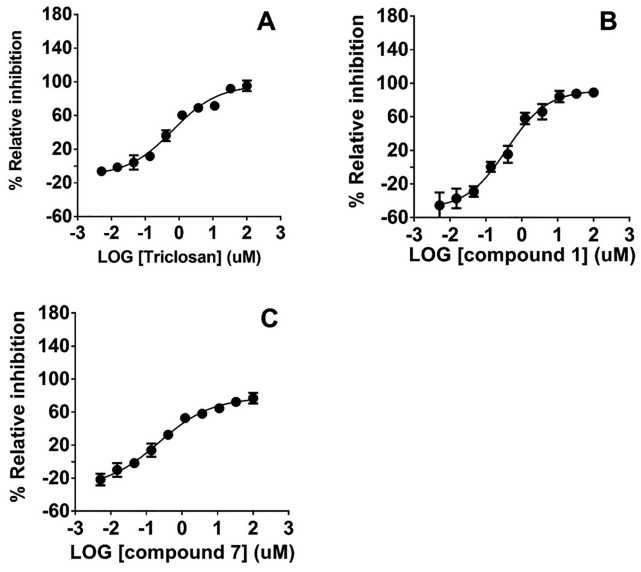


Figure 4. IC_{50} curves fitting for the inhibition of InhA by triclosan (A), compound **1** (B), and compound **7** (C) at various concentrations.

DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00918
J. Chem. Inf. Model. 2020, 60, 226−234

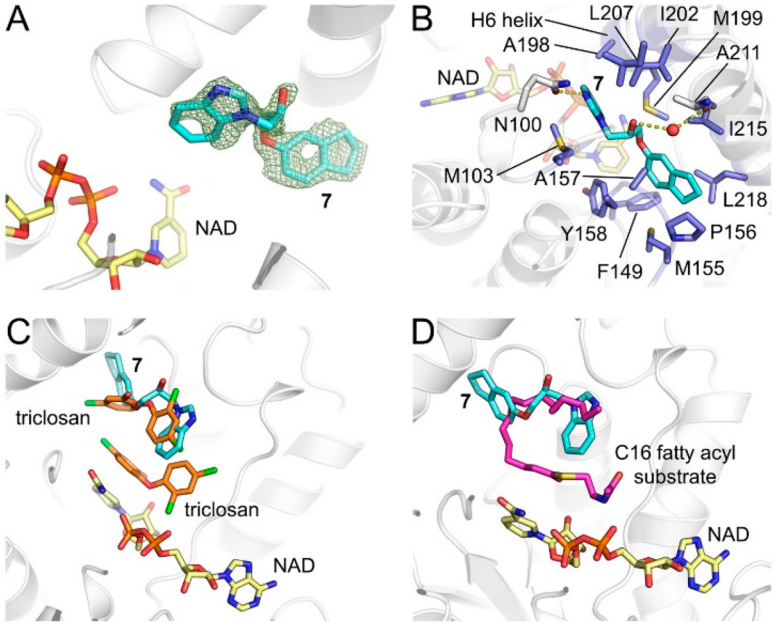


Figure 5. Structure of compound 7 bound to InhA and comparison to other InhA complexes. Compound 7 (cyan sticks) binds in the active site of InhA but does not interact with NAD^+ (yellow sticks). (A) Compound 7 defined by $F_o - F_c$ electron density (green mesh, contoured at 3σ) calculated after removal of ligand. (B) Binding of compound 7 is stabilized by close interaction with nine hydrophobic residues (labeled, blue sticks). (C) Comparison of compound 7 binding with the two previously determined binding sites for triclosan (PDB 1P45, orange sticks). (D) Comparison of compound 7 binding with a C16 fatty acyl substrate (PDB 1BVR, pink sticks).

distance away from the NAD^+ cofactor, with the closest approach being made by the benzimidazole group to the NAD^+ nicotinamide ring (6.97 Å) and diphosphate (6.58 Å). Interestingly, this mode of binding also differs from those obtained from Glide XP docking of compound 7 against either of the two conformations of InhA (InhA-inTyr158 and InhA-outTyr158). However, there is some partial overlap of the indane binding site with that of the conformation docked against InhA-inTyr158 and between the indane of the conformation docked against InhA-outTyr158 and the crystallographically observed benzimidazole binding site (Figure S1).

InhA has been the subject of extensive efforts aimed at discovery of direct inhibitors, with in consequence numerous crystal structures available for complexes of the enzyme with a range of ligands (for review, see Chollet et al.).[22] We therefore compared our inhibitor-bound structure with those of other InhA complexes, with the aim of identifying the extent to which the observed mode of binding of compound 7 relates to those described for other inhibitors. These comparisons identify the binding mode as most closely resembling that of the C16 substrate analogue THT (*trans*-2-hexadecenoyl-(*N*-acetylcysteamine)-thioester)) which adopts a U-shaped conformation with the cysteamine/thioester headgroup contacting the NADH cofactor and the distal end of the aliphatic tail making hydrophobic interactions with multiple residues (Met103, Phe149, Met161, Ala198, Met199, Ala201, Ile202, Leu207, Ile215, and Leu218) of which the majority also participate in compound 7 binding (PDB 1BVR).[3] Of inhibitor complex structures, the closest similarity is observed with triclosan binding to its second site (as described in PDB 1P45 in which two triclosan binding sites are observed).[43] However, triclosan and related diaryl ether inhibitors usually bind close to the NAD(H) cofactor, in the binding site utilized by the THT cysteamine group, and this second site is not normally occupied. Importantly, as well as (in common with the majority of InhA complexes) featuring Tyr158 in the in conformation, these structures also feature the H6 α helix (residues 196–206) in an open, but ordered, conformation. This region of the protein adopts a variety of conformations and is in some cases disordered, in the various InhA structures, and is implicated in substrate binding. These observations lead us to conclude that binding of compound 7 to InhA replicates that of substrate.

Of the multiple other InhA:inhibitor complex structures available, the great majority involve inhibitor interactions with cofactor, and the mode of binding observed here is not replicated. There is some partial overlap of compound 7 binding with elements of the binding sites of other inhibitor classes, for example, of the indane with the aliphatic tail of the alkylated diaryl ether 8PS (PDB 2B37),[31] the fluoroenyl group of the aryl carboxamide GENZ10850 (PDB 1P44),[43] the (4, 4-dimethyl)-cyclohexyl group of the 4-hydroxy-2-pyridones NITD-564/916 (PDB 4R9R, 4R9S),[18] the benzimidazole with the natural product pyridomycin (chain D of PDB 4BII),[44] or the 2-chloro-6-fluoro-benzyl group of the thiadiazole GSK625 (PDB 5JFO)[16] (Figure S2). However, none of these compounds replicate more than a small fraction of the interactions observed here. Equally, the binding site occupied by compound 7 does not overlap with those of cofactor-independent inhibitors such as the diazaborine AN12855[15] (Figure S2). Taken together, these comparisons indicate that compound 7 adopts an uncommon, substratelike binding mode that (with the sole exception of the second triclosan site) is not observed in other InhA inhibitors. Similarly, while a series of benzimidazole compounds have been reported to inhibit the equivalent enoyl ACP reductase FabI from *Francisella tularensis*, these bind with their benzimidazole moiety close to the cofactor in a binding site distinct from that of compound 7 (Figure S3).[45]

DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00918
J. Chem. Inf. Model. 2020, 60, 226−234

CONCLUSIONS

The work presented here demonstrates that structure-based virtual screening supported by subsequent biological assays can identify novel InhA inhibitors with potential to act as antituberculosis agents. The most active compound, compound **7**, shows encouraging inhibitory activity toward InhA, with an IC_{50} value of 0.22 μM that compares favorably with that of the widely used model compound triclosan (IC_{50} of 0.60 μM). Importantly, this compound also shows activity against *M. tuberculosis* H37Rv in antibacterial assays (MIC of 25 μg/mL) indicating some ability to penetrate mycobacterial cells. A crystal structure of the ternary complex of compound **7** bound to InhA in the presence of cofactor (NAD^+) identifies a mode of binding distinct from that of most other InhA inhibitors, replicating binding of the substrate acyl chain at a site distant from the catalytic center and NAD^+ binding site. These data justify further exploration and optimization of the lead compound as a potential antituberculosis agent.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.9b00918.

Glide XP scores of 65 compounds (Table S1) and chemical structures of 16 hit compounds (Table S2); orientations of compound 7 in the InhA binding site (Figure S1); comparisons of the binding site of InhA inhibitors with compound 7 with views from the active site of the InhA:7 crystal structure (Figure S2); comparison of compound 7 binding to InhA with a benimidazole inhibitor of the enoyl ACP reductase (FabI) from *Francisella tularensis* (Figure S3) (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com.

ORCID

Pharit Kamsri: 0000-0001-5233-3892
Auradee Punkvang: 0000-0002-0325-9179
Khomson Suttisintong: 0000-0002-8797-6959
Prasat Kittakoop: 0000-0002-5210-3162
Weiliang Zhu: 0000-0001-6699-5299
Philip Hinchliffe: 0000-0001-8611-4743
Adrian J. Mulholland: 0000-0003-1015-4567
James Spencer: 0000-0002-4602-0571
Pornpan Pungpo: 0000-0001-6278-7943

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Thailand Research Fund (RSA5980057), RGJ Advanced Programme (RAP60K0009), the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST) (SCA-CO-2560-4375TH), Young Scientist and Technologist Programme (YSTP) (SCA-CO-2561-7260-TH), and Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC). The financial support from Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0004/2554) to P.K. is gratefully acknowledged. We thank the Diamond Light Source for access to beamline I03 (Proposal 17212) that contributed to the results presented here, and the staff of the Diamond macromolecular crystallography village for their help. This work has been facilitated by the BrisSynBio Biosuite (U.K. Biotechnology and Biological Sciences (BBSRC) and Engineering and Physical Sciences (EPSRC) Research Councils, BB/L01386X/1) and the BBSRC ALERT14 equipment initiative (BB/M012107/1). A.J.M. and J.S. acknowledge funding from the BristolBridge antimicrobial resistance network (EPSRC EP/M027546/1). We thank CCP-BioSim (grant number EP/M022609/1) for funding. The University of Bristol is gratefully acknowledged for computational resource support for this research. Ubon Ratchathani University, NECTEC, and the University of Bristol are gratefully acknowledged for supporting this research.

REFERENCES

(1) World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2018. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed June 15, 2018).

(2) World Health Organization (WHO). WHO Treatment Guidelines for Isoniazid-Resistant Tuberculosis: Supplement to the WHO Treatment Guidelines for Drug-Resistant Tuberculosis. https://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/MDR_TB_2017.pdf (accessed June 15, 2018).

(3) Rozwarski, D. A.; Vilchèze, C.; Bittman, R.; Sacchettini, J. C.; Sugantino, M. 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.

(4) Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G. S. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 81−101.

(5) 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.

(6) 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.

(7) 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.

(8) Heym, B.; Alzari, P. M.; Honoré, N.; Cole, S. T. Missense Mutations in the Catalase-Peroxidase Gene, KatG, are Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **1995**, *15*, 235−245.

(9) Rouse, D. A.; Li, Z.; Bai, G. H.; Morris, S. L. Characterization of the KatG and InhA Genes of Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2472−2477.

(10) Blanchard, J. S. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 215−239.

(11) AlMatar, M.; Makky, E. A.; Var, I.; Kayar, B.; Köksal, F. Novel Compounds Targeting InhA for TB Therapy. *Pharmacol. Rep.* **2018**, *70*, 217−226.

(12) Parikh, S. L.; Xiao, G.; Tonge, P. J. Inhibition of InhA, the Enoyl Reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by Triclosan and Isoniazid. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7645−7650.

(13) Holas, O.; Ondrejcek, P.; Dolezal, M. *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase Inhibitors as Potential Antituberculotics: Development in the Past Decade. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2015**, *30*, 629−648.

(14) Pan, P.; Tonge, P. J. Targeting InhA, the FASII Enoyl-ACP Reductase: SAR Studies on Novel Inhibitor Scaffolds. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 672−693.

(15) Xia, Y.; Zhou, Y.; Carter, D. S.; McNeil, M. B.; Choi, W.; Halladay, J.; Berry, P. W.; Mao, W.; Hernandez, V.; O'Malley, T.; Korkegian, A.; Sunde, B.; Flint, L.; Woolhiser, L. K.; Scherman, M. S.;

DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00918
J. Chem. Inf. Model. 2020, 60, 226−234

Gruppo, V.; Hastings, C.; Robertson, G. T.; Ioerger, T. R.; Sacchettini, J.; Tonge, P. J.; Lenaerts, A. J.; Parish, T.; Alley, M. Discovery of A Cofactor-Independent Inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* InhA. *Life Sci. Alliance.* **2018**, *1*, No. e201800025.

(16) Martínez-Hoyos, M.; Perez-Herran, E.; Gulten, G.; Encinas, L.; Álvarez-Gómez, D.; Alvarez, E.; Ferrer-Bazaga, S.; García-Pérez, A.; Ortega, F.; Angulo-Barturen, I.; Rullas-Trincado, J.; Blanco Ruano, D.; Torres, P.; Castañeda, P.; Huss, S.; Fernández Menéndez, R.; González Del Valle, S.; Ballell, L.; Barros, D.; Modha, S.; Dhar, N.; Signorino-Gelo, F.; McKinney, J. D.; García-Bustos, J. F.; Lavandera, J. L.; Sacchettini, J. C.; Jimenez, M. S.; Martín-Casabona, N.; Castro-Pichel, J.; Mendoza-Losana, A. Antitubercular Drugs for An Old Target: GSK693 as a Promising InhA Direct Inhibitor. *EBioMedicine.* **2016**, *8*, 291−301.

(17) Guardia, A.; Gulten, G.; Fernandez, R.; Gómez, J.; Wang, F.; Convery, M.; Blanco, D.; Martínez, M.; Pérez-Herrán, E.; Alonso, M.; Ortega, F.; Rullás, J.; Calvo, D.; Mata, L.; Young, R.; Sacchettini, J. C.; Mendoza-Losana, A.; Remuiñán, M.; Ballell Pages, L.; Castro-Pichel, J. *N*-Benzyl-4-((heteroaryl)methyl)benzamides: A New Class of Direct NADH-Dependent 2-*trans* Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (InhA) Inhibitors with Antitubercular Activity. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 687−701.

(18) Manjunatha, U. H.; S. Rao, S. P.; Kondreddi, R. R.; Noble, C. G.; Camacho, L. R.; Tan, B. H.; Ng, S. H.; Ng, P. S.; Ma, N. L.; Lakshminarayana, S. B.; Herve, M.; Barnes, S. W.; Yu, W.; Kuhen, K.; Blasco, F.; Beer, D.; Walker, J. R.; Tonge, P. J.; Glynne, R.; Smith, P. W.; Diagana, T. T. Direct Inhibitors of InhA are Active Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 269ra3.

(19) Rožman, K.; Sosič, I.; Fernandez, R.; Young, R. J.; Mendoza, A.; Gobec, S.; Encinas, L. A New 'Golden Age' for the Antitubercular Target InhA. *Drug Discovery Today* **2017**, *22*, 492−502.

(20) Luckner, S. R.; Liu, N.; am Ende, C. W.; Tonge, P. J.; Kisker, C. A Slow, Tight Binding Inhibitor of InhA, the Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14330−14337.

(21) Encinas, L.; O'Keefe, H.; Neu, M.; Remuiñán, M. J.; Patel, A. M.; Guardia, A.; Davie, C. P.; Pérez-Macías, N.; Yang, H.; Convery, M. A.; Messer, J. A.; Pérez-Herrán, E.; Centrella, P. A.; Alvarez-Gómez, D.; Clark, M. A.; Huss, S.; O'Donovan, G. K.; Ortega-Muro, F.; McDowell, W.; Castañeda, P.; Arico-Muendel, C. C.; Pajk, S.; Rullás, J.; Angulo-Barturen, I.; Alvarez-Ruíz, E.; Mendoza-Losana, A.; Ballell Pages, L.; Castro-Pichel, J.; Evindar, G. Encoded Library Technology as a Source of Hits for the Discovery and Lead Optimization of a Potent and Selective Class of Bactericidal Direct Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* InhA. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1276−1288.

(22) Chollet, A.; Maveyraud, L.; Lherbet, C.; Bernardes-Génisson, V. An Overview on Crystal Structures of InhA Protein: Apo-Form, in Complex with Its Natural Ligands and Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 318−343.

(23) Parikh, S.; Moynihan, D. P.; Xiao, G.; Tonge, P. J. Roles of Tyrosine 158 and Lysine 165 in the Catalytic Mechanism of InhA, the Enoyl-ACP Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **1999**, *38*, 13623−13634.

(24) Shirude, P. S.; Madhavapeddi, P.; Naik, M.; Murugan, K.; Shinde, V.; Nandishaiah, R.; Bhat, J.; Kumar, A.; Hameed, S.; Holdgate, G.; Davies, G.; McMiken, H.; Hegde, N.; Ambady, A.; Venkatraman, J.; Panda, M.; Bandodkar, B.; Sambandamurthy, V. K.; Read, J. A. Methyl-Thiazoles: A Novel Mode of Inhibition with the Potential to Develop Novel Inhibitors Targeting InhA in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8533−8542.

(25) Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739−1749.

(26) Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177−6196.

(27) Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750−1759.

(28) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.

(29) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3−26.

(30) Baell, J. B.; Holloway, G. A. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719−2740.

(31) Sullivan, T. J.; Truglio, J. J.; Boyne, M. E.; Novichenok, P.; Zhang, X.; Stratton, C. F.; Li, H. J.; Kaur, T.; Amin, A.; Johnson, F.; Slayden, R. A.; Kisker, C.; Tonge, P. J. High Affinity InhA Inhibitors with Activity Against Drug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 43−53.

(32) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125−132.

(33) Winter, G. Xia2: An Expert System for Macromolecular Crystallography Data Reduction. *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43*, 186−190.

(34) Evans, P. R.; Murshudov, G. N. How Good are my Data and What is the Resolution? *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2013**, *69*, 1204−1214.

(35) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 Suite and Current Developments. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 235−242.

(36) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser Crystallographic Software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658−674.

(37) Murshudov, G. N.; Skubák, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. REFMAC5 for the Refinement of Macromolecular Crystal Structures. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355−367.

(38) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486−501.

(39) Schüttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. PRODRG: A Tool for High-Throughput Crystallography of Protein-Ligand Complexes. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1355−1363.

(40) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213−221.

(41) Chen, V. B.; Arendall, W. B., 3rd; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12−21.

(42) Smart, O. S.; Horský, V.; Gore, S.; Svobodová Vařeková, R.; Bendová, V.; Kleywegt, G. J.; Velankar, S. Validation of Ligands in Macromolecular Structures Determined by X-Ray Crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2018**, *74*, 228−236.

(43) Kuo, M. R.; Morbidoni, H. R.; Alland, D.; Sneddon, S. F.; Gourlie, B. B.; Staveski, M. M.; Leonard, M.; Gregory, J. S.; Janjigian, A. D.; Yee, C.; Musser, J. M.; Kreiswirth, B.; Iwamoto, H.; Perozzo, R.; Jacobs, W. R., Jr; Sacchettini, J. C.; Fidock, D. A. Targeting

DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00918
J. Chem. Inf. Model. 2020, 60, 226−234

Tuberculosis and Malaria Through Inhibition of Enoyl Reductase: Compound Activity and Structural Data. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20851−20859.
(44) Hartkoorn, R. C.; Pojer, F.; Read, J. A.; Gingell, H.; Neres, J.; Horlacher, O. P.; Altmann, K. H.; Cole, S. T. Pyridomycin Bridges the NADH- and Substrate-Binding Pockets of the Enoyl Reductase InhA. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 96−98.
(45) Mehboob, S.; Hevener, K. E.; Truong, K.; Boci, T.; Santarsiero, B. D.; Johnson, M. E. Structural and Enzymatic Analyses Reveal the Binding Mode of a Novel Series of *Francisella tularensis* Enoyl Reductase (FabI) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5933−5941.

DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00918
J. Chem. Inf. Model. 2020, 60, 226−234

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☑ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้
ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535
และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่	
วันที่รับคำขอ 27 ก.ย. 2562	เลขที่คำขอ 1901000115
วันที่ยื่นคำขอ 27 ก.ย. 2562	
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์ ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค และวิธีการสังเคราะห์สารประกอบดังกล่าว

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่ .....
ในจำนวน ..... คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ บุคคลธรรมดา ☐ นิติบุคคล ☑ หน่วยงานรัฐ ☐ มูลนิธิ ☐ อื่นๆ .....

3.1 สัญชาติ	ไทย
3.2 โทรศัพท์	02 564 7000
3.3 โทรสาร	

ชื่อ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
ที่อยู่ 111 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย
ตำบล/แขวง คลองหนึ่ง อำเภอ/เขต คลองหลวง จังหวัด ปทุมธานี รหัสไปรษณีย์ 12120 ประเทศ ไทย
อีเมล .....
☐ เลขประจำตัวประชาชน ☐ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☑ เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร 0 9 9 4 0 0 0 1 6 5 6 6 8 ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)
ในกรณีที่กรมฯ สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง ☐ อีเมลผู้ขอ ☑ อีเมลตัวแทน

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☑ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

5.1 ตัวแทนเลขที่	2180
5.2 โทรศัพท์	02 5647000:1316
5.3 โทรสาร	-

ชื่อ นาง รัชดา เรืองสิน
ที่อยู่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
ตำบล/แขวง คลองหนึ่ง อำเภอ/เขต คลองหลวง จังหวัด ปทุมธานี รหัสไปรษณีย์ 12120 ประเทศ ไทย
อีเมล ratchadar@nstda.or.th
เลขประจำตัวประชาชน 2 8 0 9 9 0 0 0 0 2 1 0 4 ☑ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ ชื่อและที่อยู่เดียวกับผู้ขอ
ชื่อ นาย คมสันต์ สุทธิสินทอง
ที่อยู่ 111 ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน
ตำบล/แขวง คลองหนึ่ง อำเภอ/เขต คลองหลวง จังหวัด ปทุมธานี รหัสไปรษณีย์ 12120 ประเทศ ไทย
อีเมล khomson@nanotec.or.th
เลขประจำตัวประชาชน 3 7 1 0 5 0 0 3 0 0 5 3 2 ☑ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
เลขที่ ..... วันยื่น ..... เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☐ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด เพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

สำหรับเจ้าหน้าที่

จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☑ กลุ่มวิศวกรรม
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ฟิสิกส์)

☐ กลุ่มเคมี
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เคมีเทคนิค)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ปิโตรเคมี)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เภสัชภัณฑ์)

สิทธิบัตรการออกแบบ
☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1)
☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2)
☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)

อนุสิทธิบัตร
☐ อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม)
☐ อนุสิทธิบัตร (เคมี)

8. การยื่นคำขอนอกราชอาณาจักร ☐ PCT ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				

8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย
☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้

9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด
วันแสดง ..... วันเปิดงานแสดง ..... ผู้จัด .....

10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ

10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ
.....	.....	.....
.....	.....	.....

11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา
☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ .....

12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ .....
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ..... ในการประกาศโฆษณา

13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย

ก. แบบพิมพ์คำขอ			3	หน้า
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์				
หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์			31	หน้า
ค. ข้อถือสิทธิ			10	หน้า
ง. รูปเขียน	-	รูป	-	หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์				
☐ รูปเขียน	-	รูป	-	หน้า
☐ ภาพถ่าย	-	รูป	-	หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์			1	หน้า

14. เอกสารประกอบคำขอ
☑ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
☑ หนังสือมอบอำนาจ
☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ
☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย
☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ
☑ เอกสารอื่นๆ

15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า
☑ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน
☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก .....

16. ลายมือชื่อ
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☑ ตัวแทน

รัชดา เรืองสิน

(นาง รัชดา เรืองสิน)
ตัวแทนสิทธิบัตร

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ใบต่อแนบท้าย แบบ สป/สผ/อสป/001-ก

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

2. นางสาวสมรลักษณ์ แจ่มแจ้ง เลขประจำตัวประชาชน 3259900191857 ตัวแทนเลขที่ 2227
3. นางสาวรัตนากร แสนศักดิ์ เลขประจำตัวประชาชน 1102000882673 ตัวแทนเลขที่ 2484
4. นายอานนท์ จินดาดวง เลขประจำตัวประชาชน 3100601784344 ตัวแทนเลขที่ 2521
5. นางสาววราภรณ์ นวลแปง เลขประจำตัวประชาชน 3550700046674 ตัวแทนเลขที่ 2524
6. นายสุธางค์ สวัสดี เลขประจำตัวประชาชน 1239900143732 ตัวแทนเลขที่ 2525

ลำดับที่ 2-6 อยู่ที่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 111 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120 ประเทศไทย

6. ผู้ประดิษฐ์

2. นาย ณรงค์พล แก้วจังหวัด เลขประจำตัวประชาชน 1739900161892
3. นาย เอกนรินทร์ ธนายุพงศ์ เลขประจำตัวประชาชน 1101401919356
4.นาย สหรัฐ เตชะพนาลัย เลขประจำตัวประชาชน 2819900025295

ลำดับที่ 2-4 อยู่ที่ 111 ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120 ประเทศไทย

5. นาย บุญรัตน์ ทารัตน์ เลขประจำตัวประชาชน 1340300086844
6. นางสาว ทิมพิกา พรพรม เลขประจำตัวประชาชน 1341100293723
7. นางสาว ศรสวรรค์ บาททอง เลขประจำตัวประชาชน 1339900519057
8. นางสาว พรพรรณ พึ่งโพธิ์ เลขประจำตัวประชาชน 3341601169924

ลำดับที่ 5-8 อยู่ที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 85 ถนนสถลมาร์ค ตำบลเมืองศรีไค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

9. นาย พฤทธิ์ คำศรี เลขประจำตัวประชาชน 1341500137257

อยู่ที่ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม 214 หมู่ 12 ตำบลหนองญาติ อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม 48000

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค และวิธีการสังเคราะห์สารประกอบดังกล่าว

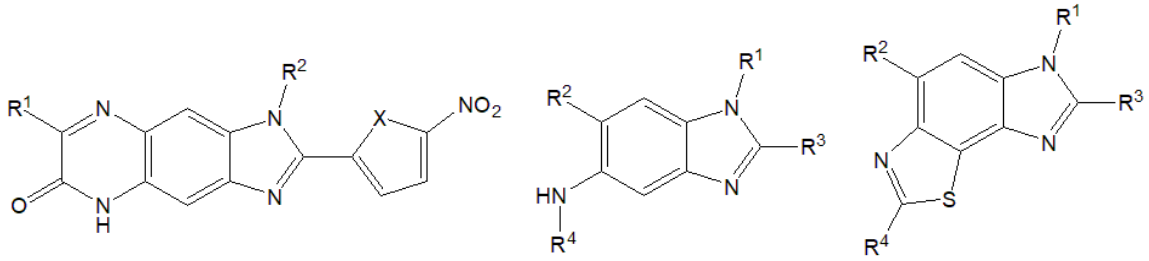
สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เคมีในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค และวิธีการสังเคราะห์สารประกอบดังกล่าว (Benzimidazoles containing phenol derivatives as anti-tuberculosis agents and their syntheses)

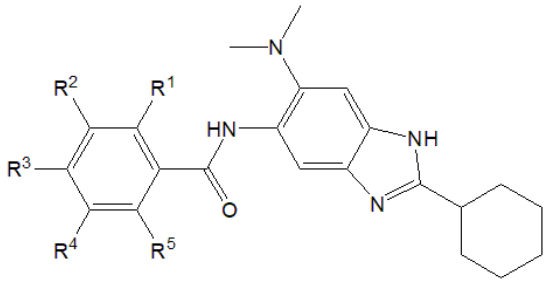
ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

วัณโรค (Tuberculosis, TB) เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญของโลก มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไมโครแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุการตายของประชากรโลกมากเป็นอันดับที่สองรองจากโรคเอดส์ จากรายงานขององค์การอนามัยโลกในปี 2015 ชี้ว่ามีคนมากกว่า 1.4 ล้านคนล้มป่วยด้วยวัณโรคทั่วโลก และเสียชีวิตอย่างน้อย 1.8 ล้านคน โดยผู้ติดเชื้อและเสียชีวิตส่วนมากอยู่ในประเทศกำลังพัฒนา องค์การอนามัยโลกได้จัดกลุ่มประเทศที่มีปัญหาวัณโรครุนแรง ได้แก่ (1) ปัญหาวัณโรคสูง (2) วัณโรคในผู้ติดเชื้อเอดส์ และ (3) วัณโรคดื้อยาหลายขนาน ซึ่งประเทศไทยก็ติดอยู่ 1 ใน 14 ประเทศของโลกที่มีปัญหาวัณโรค ทั้ง 3 ประการ วัณโรคจึงเป็นโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุหลักของปัญหาทางด้านสุขภาพของประชากรทั่วโลกทั้งในประเทศที่ด้อยการพัฒนาและประเทศที่กำลังพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรคชุกชุม ดังนั้นองค์การอนามัยโลกรวมทั้งประเทศไทยจึงให้ความสำคัญต่อการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางและพัฒนายาตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรควัณโรค ซึ่งมีความจำเป็นเร่งด่วนในการศึกษาวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากปัญหาการดื้อยาหลายขนาน (Multi-drug resistant, MDR) และการดื้อยารุนแรง (Extensively drug resistant, XDR) เพิ่มมากขึ้นทำให้ผู้ป่วยวัณโรคไม่ตอบสนองต่อยาหลักที่ใช้รักษาอยู่ ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางในการค้นหาและพัฒนายาใหม่ที่ใช้ในการรักษาโรควัณโรคจึงมีความจำเป็นที่ต้องทำอย่างต่อเนื่อง การรักษาโรควัณโรคแบ่งได้ตามเป้าหมายและกลไกการออกฤทธิ์ของยา กระบวนการการสังเคราะห์ทางชีวภาพของกรดไขมัน (Fatty acid biosynthesis) ของเชื้อ *M.tuberculosis* เป็นเป้าหมายสำคัญในยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนี้ จึงทำให้มีการค้นคว้าและพัฒนายาที่ใช้ในการยับยั้งกระบวนการนี้อย่างกว้างขวาง

Gong และคณะ (Gong, Y., et.al; European Journal of Medicinal Chemistry, **2014**, 75, 336-353) เปิดเผยการสังเคราะห์สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีโครงสร้างหลัก 3 โครงสร้าง ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไมโครแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* สำหรับใช้เป็นยาต้านวัณโรค ซึ่งพบว่าสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่ 5-ไนโตรฟูรานิล (5-nitrofuranyl) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรค (minimum inhibitory concentration, MIC) อยู่ที่ 0.049 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุด และสามารถกำจัดเชื้อวัณโรคได้ดีที่สุด



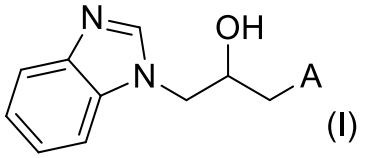
เอกสาร US9845296B2 เปิดเผยการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 2, 4 และ 6 (2,4,6-benzimidazole derivatives) ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไมโครแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* สำหรับใช้เป็นยาต้านวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง โดยอนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่ R^1, R^2, R^3, R^5 เป็นไฮโดรเจน (H) และ R^4 เป็นหมู่เมทิล ($-CH_3$) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรค (minimum inhibitory concentration, MIC) อยู่ที่ 0.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ดังนั้น ในการประดิษฐ์นี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะจัดเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีโครงสร้างแบบใหม่โดยมีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอล เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA, มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ต่ำ, แก้ปัญหาการดื้อยา และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านวัณโรคต่อไปในอนาคต

<u>ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์</u>

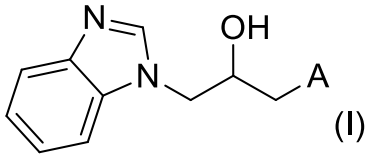
การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง (I)



(I)

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติก ไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือแบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group)

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



(I)

ก. ผสม 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และสารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:4 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

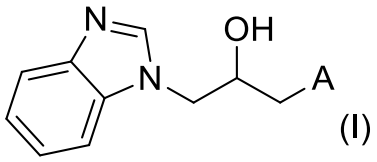
ข. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ค. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ข) และอนุพันธ์ของฟีนอล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:3 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 50 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ง. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ค) และเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (Tetrabutyl amonium fluoride, TBAF) ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:4 โดยโมล ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 60 นาที

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติก ไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือแบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group)

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



(I)

ก. ผสม 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และอนุพันธ์ของฟีนอล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ข. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซลในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือแบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group)

<u>การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์</u>

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านวัณโรค

ลักษณะการประดิษฐ์ใดๆ ที่ได้แสดงไว้ในที่นี้ ให้หมายความรวมถึงการประยุกต์เข้ากับลักษณะอื่นของการประดิษฐ์นี้ด้วย เว้นแต่ได้มีการระบุไว้เป็นอย่างอื่น

<u>คำจำกัดความ</u>

ศัพท์เทคนิค หรือ ศัพท์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในที่นี้ ให้มีนิยามตามที่เข้าใจโดยผู้มีความชำนาญในศิลปะวิทยาการในแขนงนี้ ยกเว้นว่าได้ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

เครื่องมือ อุปกรณ์ วิธีการ หรือสารเคมีใดๆที่ได้กล่าวถึงไว้ในที่นี้ ให้หมายถึงเครื่องมือ อุปกรณ์ วิธีการ หรือสารเคมีที่ปฏิบัติหรือใช้กันทั่วไปโดยผู้มีความชำนาญในศิลปะวิทยาการในแขนงนี้ ยกเว้นว่าได้ระบุไว้โดยชัดแจ้งว่าเป็น เครื่องมือ อุปกรณ์ วิธีการ หรือสารเคมีที่พิเศษ หรือ เฉพาะเจาะจงกับการประดิษฐ์นี้

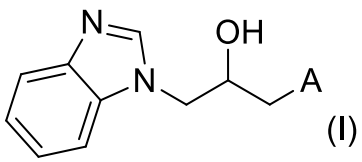
การใช้คำนามเอกพจน์ หรือ คำสรรพนามเอกพจน์ เมื่อใช้กับคำว่า “ประกอบด้วย” ในข้อถือสิทธิ หรือในรายละเอียดการประดิษฐ์ ให้หมายความถึง “หนึ่ง” และให้หมายความรวมถึง “หนึ่งหรือมากกว่า” “อย่างน้อยที่สุดหนึ่ง” และ “หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่ง” ด้วย

โดยตลอดของคำขอรับสิทธิบัตรฉบับนี้ คำว่า “ประมาณ” เป็นการใช้เพื่อระบุว่าค่าใดๆที่ปรากฏหรือแสดงในที่นี้ อาจเกิดการแปรผัน หรืออาจเบี่ยงเบนได้ โดยที่การแปรผันได้หรือความเบี่ยงเบนได้ดังกล่าวนั้นอาจเกิดโดยความคลาดเคลื่อนของอุปกรณ์ วิธีการที่ใช้หาค่าใดๆ หรือ โดยบุคคลผู้ใช้อุปกรณ์หรือดำเนินการตามวิธีการนั้นๆ

องค์ประกอบ และ/หรือ วิธีการทั้งหมดที่เปิดเผย และข้อถือสิทธิในคำขอนี้มีเจตนาให้ครอบคลุมถึงลักษณะของการประดิษฐ์ที่ได้จากการกระทำ การปฏิบัติ การดัดแปลง หรือเปลี่ยนแปลงปัจจัยใดๆ ที่ปราศจากการทำการทดลองที่แตกต่างจากการประดิษฐ์นี้อย่างมีนัยสำคัญ และได้มาซึ่งสิ่งที่มีคุณสมบัติ ประโยชน์ใช้สอย และทำให้เกิดผลทำนองเดียวกันกับลักษณะของการประดิษฐ์ปัจจุบัน ตามความเห็นของบุคคลที่มีความชำนาญในระดับสามัญในศิลปะหรือวิทยาการ ที่แม้จะมิได้ระบุในข้อถือสิทธิโดยเฉพาะเจาะจงก็ตาม ดังนั้นสิ่งที่แทนกันได้ หรือสิ่งที่คล้ายคลึงกันกับลักษณะของการประดิษฐ์ปัจจุบัน รวมถึงการดัดแปลง เปลี่ยนแปลงใดๆเพียงเล็กน้อย ที่ปรากฏเห็นได้อย่างชัดแจ้งต่อบุคคลที่มีความชำนาญในศิลปะวิทยาการแขนงนี้ ควรพิจารณาว่าอยู่ภายในเจตนา ขอบเขตและแนวคิดของการประดิษฐ์ ดังที่ปรากฏโดยข้อถือสิทธิที่แนบมาด้วย

ต่อไปนี้แสดงให้เห็นถึงรายละเอียดการประดิษฐ์โดยมิได้มีจุดประสงค์ที่จะจำกัดขอบเขตของการประดิษฐ์แต่อย่างใด

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง (I)



(I)

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือแบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group)

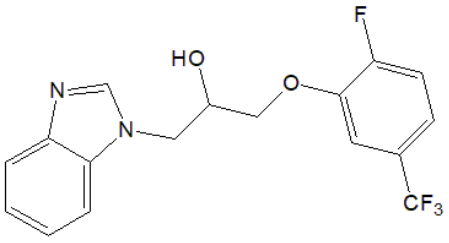
ในลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม เลือกได้จาก 4-โพรพิลฟีนอล (4-propylphenol), 3-โพรพิลฟีนอล (3-propylphenol), 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟีนอล (4-isopropyl-3-methyl phenol), 4-ไซโคลเฮกซิลฟีนอล (4-cyclohexylphenol), 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol), หรือ 5-อินดานอล (5-indanol)

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม คือ แนปทาลีน-2-ออล (naphthalene-2-ol)

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) คือ ซีซามอล (sesamol)

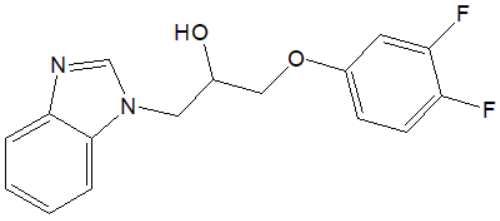
ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group) เลือกได้จาก 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล) ฟีนอล (2-Fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol), 3,4- ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol), 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol), หรือ เพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluoro phenol)

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (II)



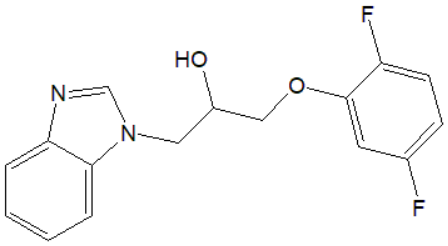
.....(II)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (III)



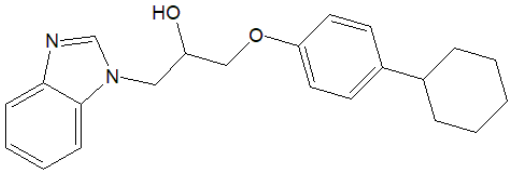
.....(III)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (IV)



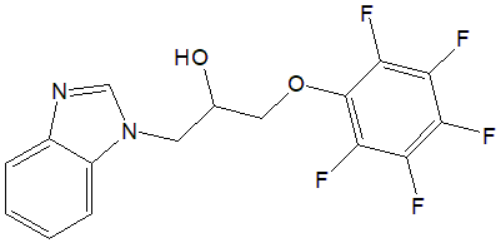
.....(IV)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (V)



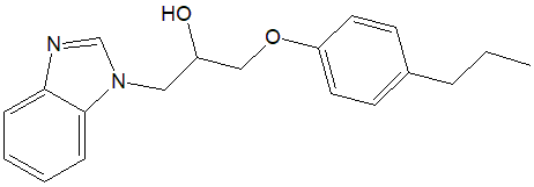
.....(V)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (VI)



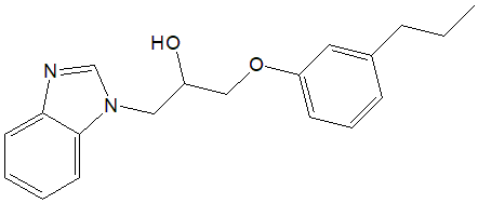
.....(VI)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (VII)



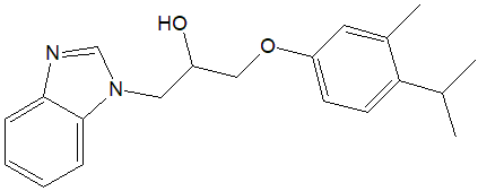
.....(VII)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (VIII)



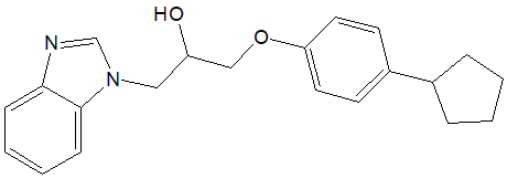
.....(VIII)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (IX)



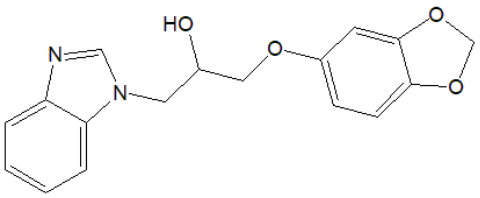
.....(IX)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (X)



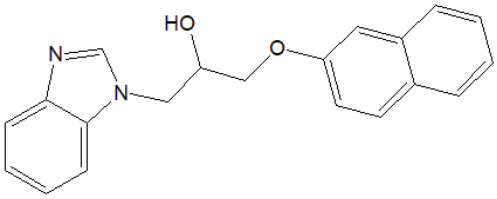
.....(X)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (XI)



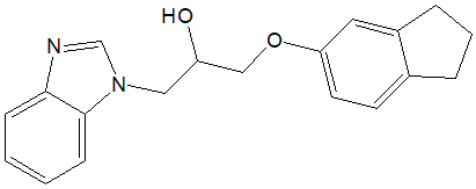
.....(XI)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (XII)



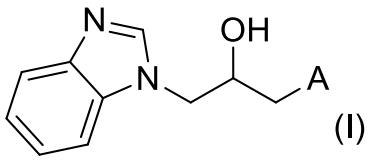
.....(XII)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (XIII)



.....(XIII)

ในอีกรูปแบบหนึ่งของการประดิษฐ์ การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



(I)

ก. ผสม 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และสารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:4 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ข. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ค. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ข) และอนุพันธ์ของฟีนอล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:3 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 50 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ง. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ค) และเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (Tetrabutyl amonium fluoride, TBAF) ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:4 โดยโมล ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 60 นาที

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือแบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่เฮเทอโร (hetero-substituted group)

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก), ข), ค), และ ง) ตัวทำละลายอินทรีย์ เลือกได้จาก ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), อะซิโตน (acetone), ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide), เอทานอล (ethanol), เมทานอล (methanol), อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile), เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran), เอทิล อะซิเตท (ethyl acetate), เฮกเซน(hexane), ไอโซโพรพานอล (isopropanol), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ค) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทานอล (ethanol)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ง) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran)

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก), ข), และ ค) ตัวเร่งปฏิกิริยา เลือกได้จาก อิมิดาโซล (imidazole), โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate), โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate), โซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride), โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide), ซีเซียมคาร์บอเนต (cesium carbonate), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ อิมิดาโซล (imidazole)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ สารผสมของซีเซียมคาร์บอเนต (cesium carbonate) และโซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ค) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 0 ถึง 25 องศาเซลเซียส

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ค) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 70 ถึง 90 องศาเซลเซียส

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ง) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 14 ถึง 20 ชั่วโมง

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 24 ชั่วโมง

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ค) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 16 ถึง 24 ชั่วโมง

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ง) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 10 ถึง 30 นาที

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) สารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) เลือกได้จาก ไตรเมทิลไซลิล คลอไรด์ (trimethylsilyl chloride, TMSCl), ไตรเอทิลไซลิล คลอไรด์ (triethylsilyl chloride, TESCl), เทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลไซลิลคลอไรด์ (tert-butyldimethylsilyl chloride, TBDMSCl), เทอเชียรีบิวทิลไดฟีนิลไซลิล คลอไรด์ (tert-butyldiphenylsilyl chloride,TBDPSCl), หรือ ไตรไอโซโพรพิลไซลิล คลอไรด์ (triisopropylsilyl chloride, TIPSCl)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) สารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) คือ เทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลไซลิลคลอไรด์ (tert-butyldimethylsilyl chloride, TBDMSCl)

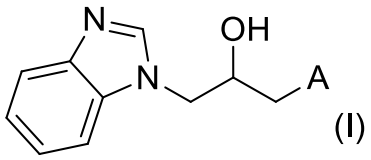
ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) อัตราส่วนโดยโมลของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล(1,3-dibromo-2-propanol) และสารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) อยู่ในช่วง 1:2 ถึง 1:3

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) อัตราส่วนโดยโมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซล อยู่ในช่วง 1.5:1 ถึง 2.5:1

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ค) อัตราส่วนโดยโมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ข) และ อนุพันธ์ของฟีนอล อยู่ในช่วง 1:1.5 ถึง 1:2.5

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ง) อัตราส่วนโดยโมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ค) และ เตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (tetrabutylamonium fluoride, TBAF) อยู่ในช่วง 1:2 ถึง 1:3 โดยโมล

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



(I)

ก. ผสม 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และอนุพันธ์ของฟีนอล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ข. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซลในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือแบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่เฮเทอโร (hetero-substituted group)

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) เลือกได้จาก 4-โพรพิลฟีนอล (4-propylphenol), 3-โพรพิลฟีนอล (3-propylphenol), 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟีนอล (4-isopropyl-3-methyl phenol), 4-ไซโคลเฮกซิลฟีนอล (4-cyclohexylphenol), 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol), หรือ 5-อินดานอล (5-indanol)

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group) คือ แนปทาลีน-2-ออล (naphthalene-2-ol)

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) คือ ซีซามอล (sesamol)

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group) เลือกได้จาก 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล) ฟีนอล (2-Fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol), 3,4- ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol), 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol), หรือ เพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluoro phenol)

ในอีกลักษณะหนึ่งการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) และ ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ เลือกได้จาก ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), อะซิโตน (acetone), ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide), เอทานอล (ethanol), เมทานอล (methanol), อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile), เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran), เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate), เฮกเซน(hexane), ไอโซโพรพานอล (isopropanol), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) ตัวทำละลายอินทรีย์ เลือกได้จาก เอทานอล (ethanol), หรือ อะซิโตน (acetone)

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide)

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) และ ข) ตัวเร่งปฏิกิริยา เลือกได้จาก อิมิดาโซล (imidazole), โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate), โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate), โซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride), โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide), ซีเซียมคาร์บอเนต (cesium carbonate), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate)

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride)

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 50 ถึง 85 องศาเซลเซียส

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 15 ถึง 20 ชั่วโมง

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 24 ชั่วโมง

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) อัตราส่วนโดยโมลของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และ อนุพันธ์ของฟีนอล อยู่ในช่วง 1:1 ถึง 2:1

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) อัตราส่วนโดยโมลระหว่างอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และ เบนซิมิดาโซล อยู่ในช่วง 1:1 ถึง 2:1

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล ที่ได้จากวิธีการตามดังที่ได้ระบุไว้

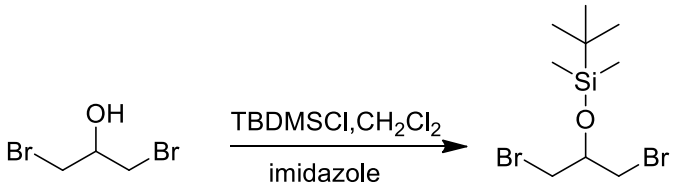
ในลักษณะใดๆของการประดิษฐ์ การใช้สารประกอบเบนซิมิดาโซล สำหรับยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ InhA เพื่อใช้เป็นสารต้านวัณโรค

ตัวอย่างการประดิษฐ์

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่มีการป้องกันหมู่แอลกอฮอล์โดยใช้เทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลไซลิลคลอไรด์ (tert-butyldimethylsilyl chloride, TBDMSCl) ได้เป็นอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอลโดยใช้ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวอย่างที่ 1 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์ เทอเชียรี-บิวทิล((1,3-ไดโบรโมโพรเพน-2-อิว)ออกซี)ไดเมทิลไซเลน (tert-butyl((1,3-dibromopropane-2-yl)oxy)dimethylsilane)

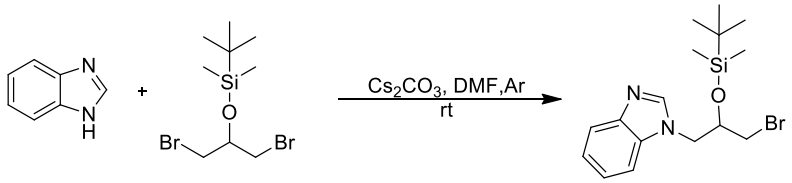


เติม1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และอิมิดาโซล (imidazole) (ประมาณ 13.35 กรัม) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) (ประมาณ 100

มิลลิลิตร) กวนสารผสมต่อเนื่องเป็นเวลาประมาณ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลไซลิลคลอไรด์ (TBDMSCl) (ประมาณ 22.17 กรัม) ลงไปในสารผสมแล้วทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 50 มิลลิลิตร) เพื่อหยุดปฏิกิริยา และนำสารละลายมาสกัดด้วยน้ำ (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำออกด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) จากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายภายใต้บรรยากาศจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวสีใส

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลโดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ของ นิวคลีโอไฟล์ ระหว่างเบนซิมิดาโซลและอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรเพนที่ได้จากตัวอย่างที่ 1

ตัวอย่างที่ 2 (การประดิษฐ์นี้)

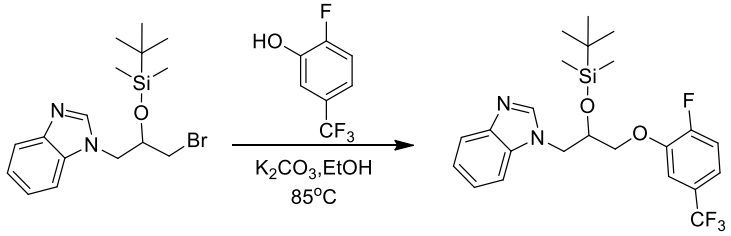


เติมเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) (ประมาณ 625 มิลลิกรัม) และซีเซียมคาร์บอเนต (Cs_2CO_3) (ประมาณ 3.45 กรัม) ลงในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) (ประมาณ 26 มิลลิลิตร) กวนทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่ได้จากตัวอย่างที่ 1 (ประมาณ 3.50 กรัม) ภายบรรยากาศที่มีแก๊สอาร์กอน (Ar) กวนสารผสมต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 50 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 70 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:1 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลโดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ของ นิวคลีโอไฟล์ (nuclephilic substitution) ระหว่างอนุพันธ์ของฟีนอลและอนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2

ตัวอย่างที่ 3 (การประดิษฐ์นี้)

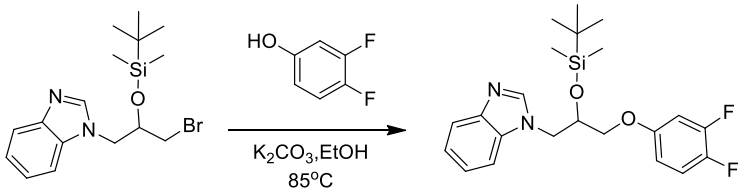
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วยหมู่ 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล) ฟีนอล (2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol)



เติม 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล) ฟีนอล (2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol) (ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 1.11 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 739 มิลลิกรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 25 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 70 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:1 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 4 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 3,4-ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol)

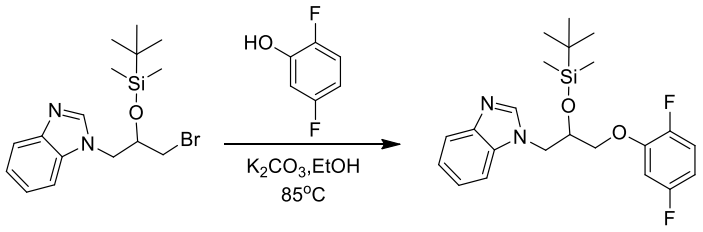


เติม 3,4-ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol) (ประมาณ 1.06 กรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 2.24 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 1.5 กรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 25 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85

องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 35 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 100 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 30:70 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 5 (การประดิษฐ์นี้)

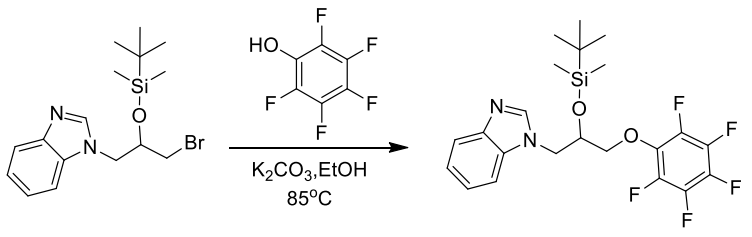
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol)



เติม 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol) (ประมาณ 704 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 1.51 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่การประดิษฐ์ 2 (ประมาณ 1 กรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 70 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 30:70 โดยปริมาตร (ethyl acetate:hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 6 (การประดิษฐ์นี้)

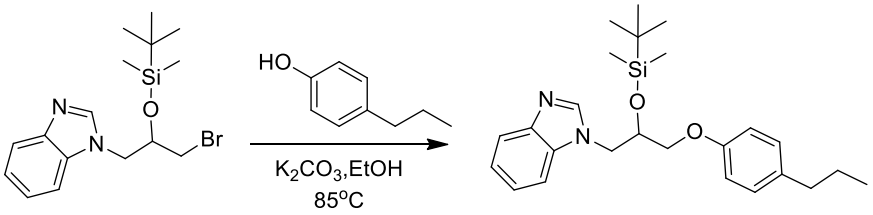
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย เพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluorophenol)



เติมเพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluorophenol) (ประมาณ 918 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 1.38 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 922 กรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 70 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 7 (การประดิษฐ์นี้)

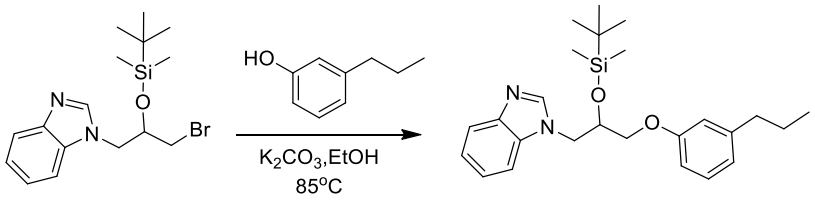
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 4-โพรพิลฟีนอล (4-propylphenol)



เติม 4-โพรพิลฟีนอล (4-propylphenol) (ประมาณ 737 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (ประมาณ 1.5 กรัม) (K_2CO_3) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 1 กรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 50 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เมทานอล ต่อ ไดคลอโรมีเทน 8:92 โดยปริมาตร (methanol:dichloromethane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 8 (การประดิษฐ์นี้)

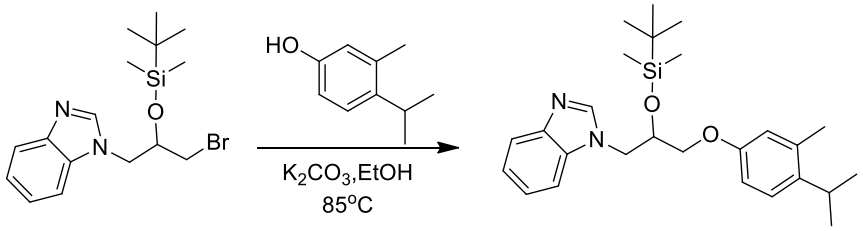
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 3-โพรพิลฟีนอล (3-propylphenol)



เติม 3-โพรพิลฟีนอล (3-propylphenol) (ประมาณ 250 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 676 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 500 มิลลิกรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 50 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 40:60 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 9 (การประดิษฐ์นี้)

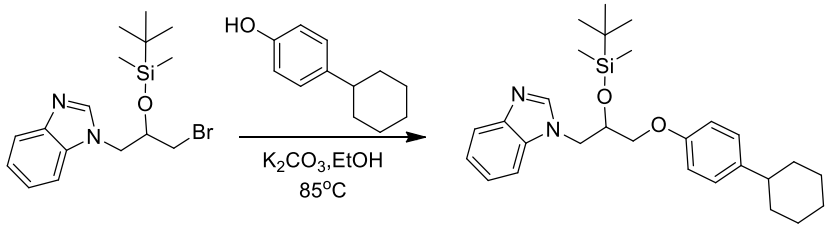
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟีนอล (4-isopropyl-3-methylphenol)



เติม 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟีนอล (4-isopropyl-3-methylphenol) (ประมาณ 813 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 1.5 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 1 กรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 25 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 60 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:1 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 10 (การประดิษฐ์นี้)

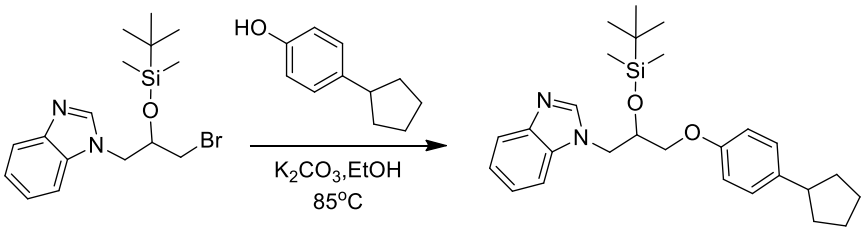
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 4-ไซโคลเฮกซิลฟีนอล (4-cyclohexylphenol)



เติม 4-ไซโคลเฮกซิลฟีนอล (4-cyclohexylphenol) (ประมาณ 174 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 274 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 183 มิลลิกรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 25 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:1 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 11 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol)



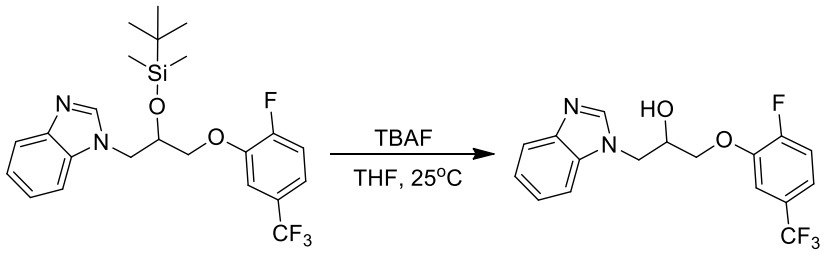
เติม 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol) (ประมาณ 1.00 กรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 1.70 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 1.14 มิลลิกรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 25 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม

แอมโมเนียมคลอไรด์ (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอททิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:1 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลโดยใช้ปฏิกิริยาการกำจัดหมู่ไซลิว ระหว่างอนุพันธ์ที่ได้จากตัวอย่างที่ 3-11 และหมู่เตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์

ตัวอย่างที่ 12 (การประดิษฐ์นี้)

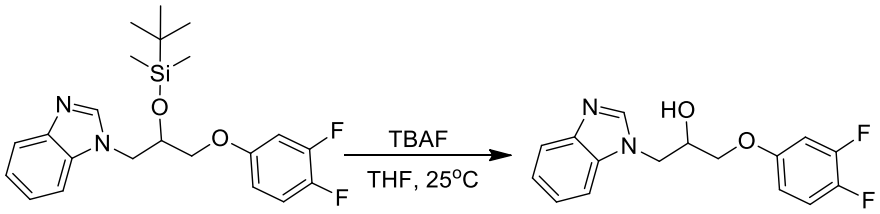
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 3 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์



เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 3 (ประมาณ 1.21 กรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 14 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที นำสารผสมที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

ตัวอย่างที่ 13 (การประดิษฐ์นี้)

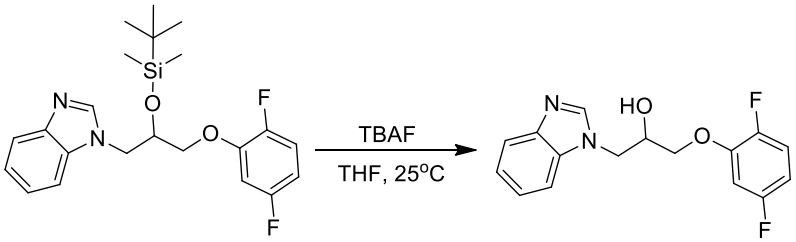
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 4 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์



เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 2 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 4 (ประมาณ 534 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลืองส้ม

ตัวอย่างที่ 14 (การประดิษฐ์นี้)

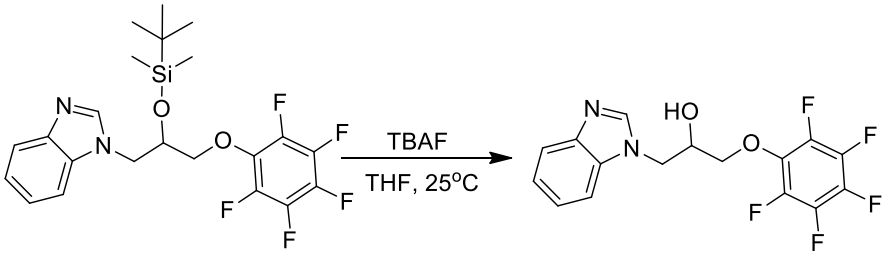
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 5 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์



เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 5 (ประมาณ 226 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีใส

ตัวอย่างที่ 15 (การประดิษฐ์นี้)

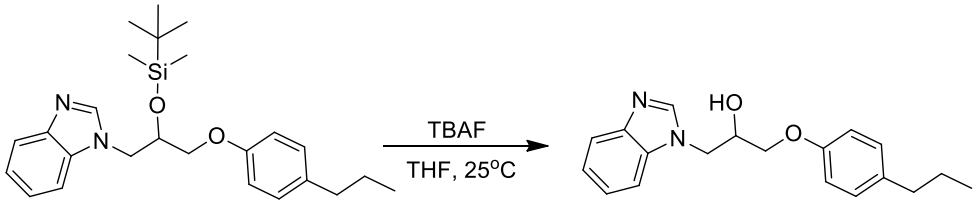
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 6 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์



เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 2.4 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 6 (ประมาณ 754 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

ตัวอย่างที่ 16 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 7 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์

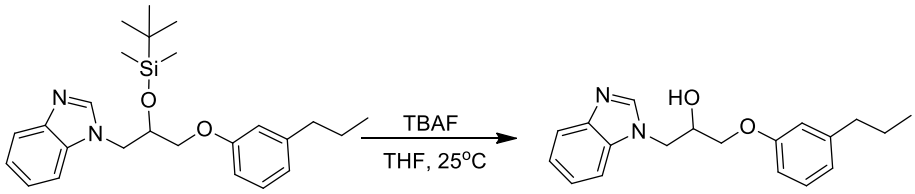


เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 7 (ประมาณ 164 มิลลิกรัม)ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วย

แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 17 (การประดิษฐ์นี้)

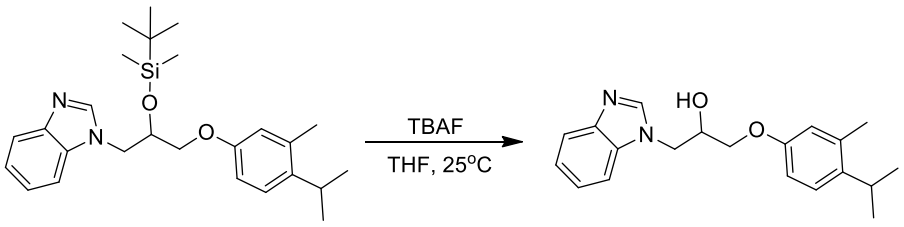
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 8 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์



เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 8 (ประมาณ 280 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวเหลือง

ตัวอย่างที่ 18 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 9 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์

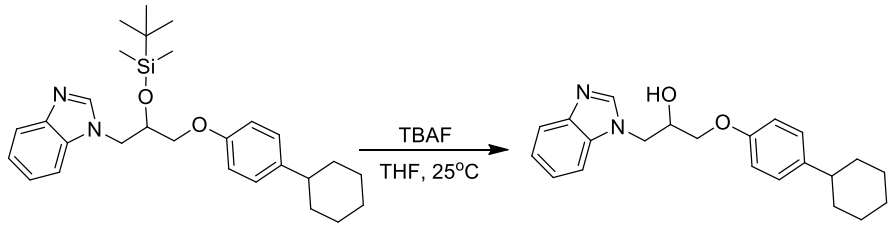


เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 0.77 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 9 (ประมาณ 226.2 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ

10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 19 (การประดิษฐ์นี้)

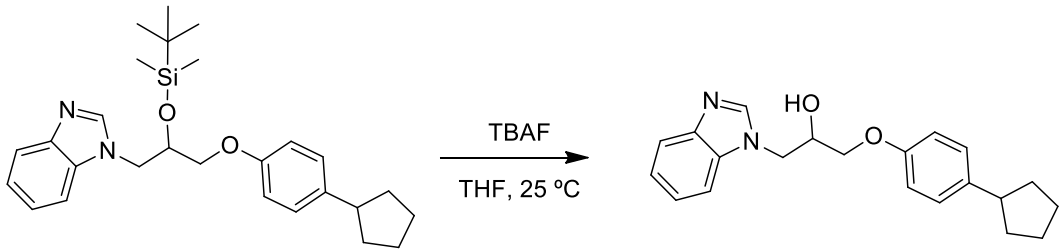
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 10 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์



เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 10 (ประมาณ 99 มิลลิกรัม)ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

ตัวอย่างที่ 20 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 11 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์

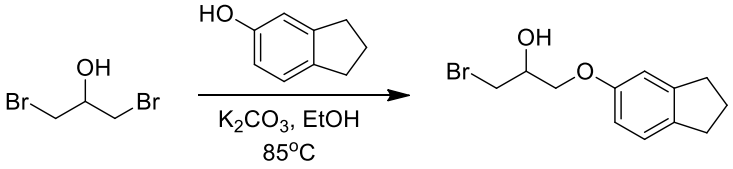


เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 11 (ประมาณ 96 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated NH_4Cl) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 1,3- ไดโบรโมโพรพานอลโดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ของ นิวคลีโอไฟล์ระหว่าง 1,3- ไดโบรโม-2-โพรพานอล และอนุพันธ์ของฟีนอล

<u>ตัวอย่างที่ 21 (การประดิษฐ์นี้)</u>

<u>การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่มีหมู่แทนที่เป็น 5-อินดานอล (5-indanol)</u>

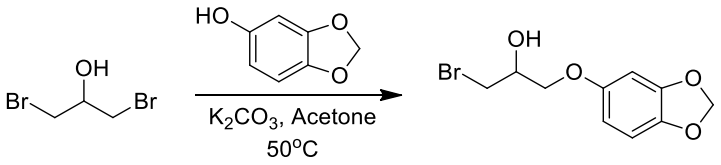


เติม 5-อินดานอล (5-indanol) (ประมาณ 1.00 กรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 6.08 กรัม) ลงในสารละลาย 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) (ประมาณ 1.15 มิลลิลิตร) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) และน้ำ (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย

เอททิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:9 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดใสไม่มีสี

ตัวอย่างที่ 22 (การประดิษฐ์นี้)

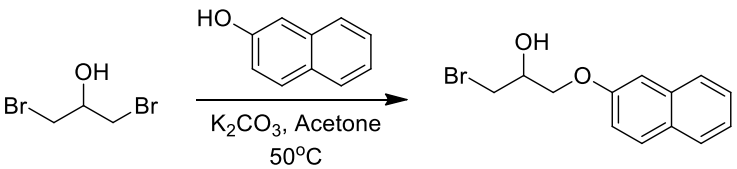
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่มีหมู่แทนที่เป็นซีซามอล (sesamol)



เติม ซีซามอล (sesamol) (ประมาณ 200 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 1.00 กรัม) ลงในสารละลาย 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) (ประมาณ 0.3 มิลลิลิตร) ที่อยู่ในตัวทำละลายอะซิโตน (acetone) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) และน้ำ (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอททิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 2:8 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดใสไม่มีสี

ตัวอย่างที่ 23 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 1,3 ไดโบรโมโพรพานอลที่มีหมู่แทนที่เป็น 2-แนปทาลีน-2-ออล (naphthalene-2-ol)



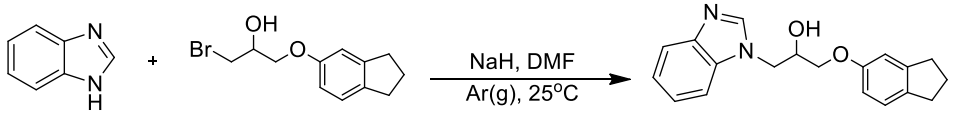
เติม แนปทาลีน-2-ออล (naphthalene-2-ol) (ประมาณ 500 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) (ประมาณ 1.40 กรัม) ลงในสารละลาย 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) (ประมาณ 0.70 มิลลิลิตร) ที่อยู่ในตัวทำละลายอะซิโตน (acetone) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึง

อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) และน้ำ (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอททิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:9 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดใสไม่มีสี

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลโดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ของ นิวคลีโอไฟล์ ระหว่างเบนซิมิดาโซล และอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโมโพรพานอลที่ถูกแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของฟีนอลในตัวอย่างที่ 21-23

ตัวอย่างที่ 24 (การประดิษฐ์นี้)

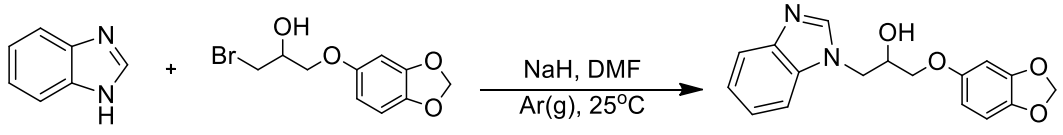
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วยหมู่ 5-อินดานอล (5-indanol) ที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอล



เติมเบนซิมิดาโซล (ประมาณ 100 มิลลิกรัม) และโซเดียมไฮไดรด์ (NaH) (ประมาณ 60 มิลลิกรัม) ลงในตัวทำละลายไดเมทิลฟอมาไมด์ (DMF) (ประมาณ 26 มิลลิลิตร) กวนทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโมร-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่ได้จากตัวอย่างที่ 21 (ประมาณ 287 มิลลิกรัม) ภายบรรยากาศที่มีแก๊สอาร์กอน (Ar) กวนสารผสมต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยตัวทำละลายเมทานอล (MeOH) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) และน้ำ (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

ตัวอย่างที่ 25 (การประดิษฐ์นี้)

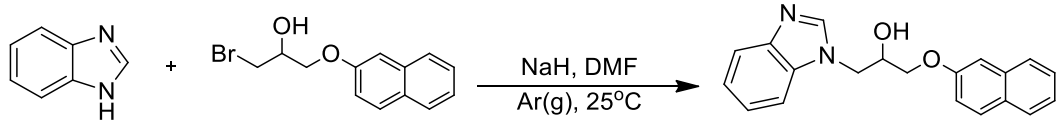
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วยหมู่ ซีซามอล (sesamol) ที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอล



เติมเบนซิมิดาโซล (ประมาณ 420 มิลลิกรัม) และโซเดียมไฮไดรด์ (NaH) (ประมาณ 129 มิลลิกรัม) ลงในตัวทำละลายไดเมทิลฟอมาไมด์ (DMF) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) กวนทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโมร-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่ได้จากตัวอย่างที่ 22 (ประมาณ 500 มิลลิกรัม) ภายบรรยากาศที่มีแก๊สอาร์กอน (Ar) กวนสารผสมต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยตัวทำละลายเมทานอล (MeOH) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ประมาณ 50 มิลลิลิตร) และน้ำ (ประมาณ 50 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

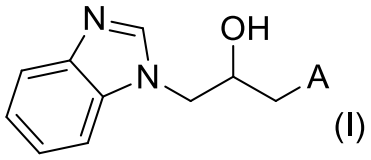
ตัวอย่างที่ 26 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วยหมู่ แนปทาลีน-2-ออล (naphthalene-2-ol) ที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอล

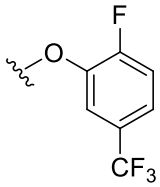
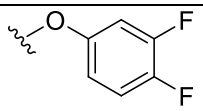
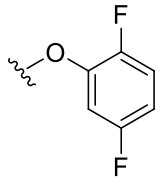
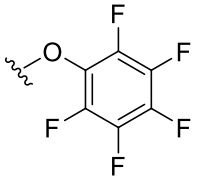
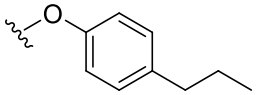
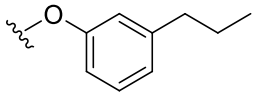
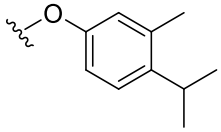
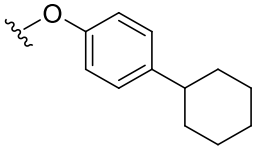
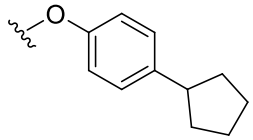


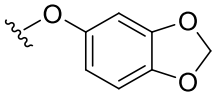
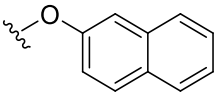
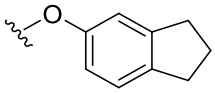
เติมเบนซิมิดาโซล (ประมาณ 100 มิลลิกรัม) และโซเดียมไฮไดรด์ (NaH) (ประมาณ 82 มิลลิกรัม) ลงในตัวทำละลายไดเมทิลฟอมาไมด์ (DMF) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) กวนทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโมร-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่ได้จากตัวอย่างที่ 23 (ประมาณ 500 มิลลิกรัม) ภายบรรยากาศที่มีแก๊สอาร์กอน (Ar) กวนสารผสมต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยตัวทำละลายเมทานอล (MeOH) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) และน้ำ (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

<u>ตารางที่ 1:</u> แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรคของอนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วยหมู่แทนที่แตกต่างกัน



(I)

สารประกอบ	หมู่แทนที่ (A)	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรค (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
II		25
III		50
IV		12.5
V		>100
VI		>100
VII		50
VIII		50
IX		25
X		50

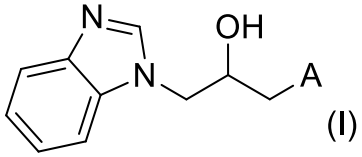
สารประกอบ	**หมู่แทนที่ (A)**	**ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรค (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**
XI		25
XII		>100
XIII		>100

<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถือสิทธิ

1. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง (I)



(I)

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือ แบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group)

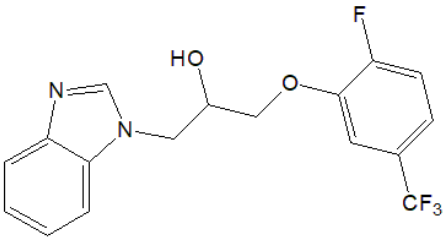
2. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) เลือกได้จาก 4-โพรพิลฟีนอล (4-propylphenol), 3-โพรพิลฟีนอล (3-propylphenol), 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟีนอล (4-isopropyl-3-methyl phenol), 4-ไซโคลเฮกซิลฟีนอล (4-cyclohexylphenol), 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol), หรือ 5-อินดานอล (5-indanol)

3. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group) คือ แนปทาลีน-2-ออล (naphthalene-2-ol)

4. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) คือ ซีซามอล (sesamol)

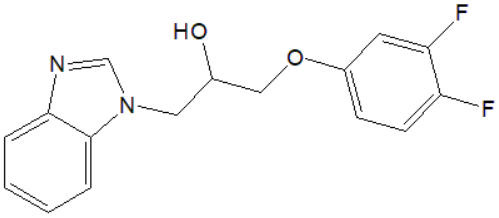
5. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group) เลือกได้จาก 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล) ฟีนอล (2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol), 3,4- ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol), 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol), หรือ เพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluoro phenol)

6. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (II)



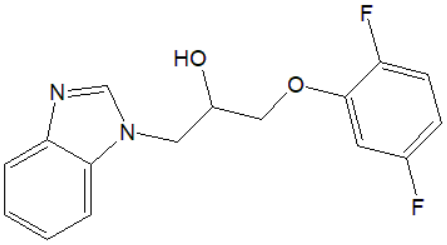
.....(II)

7. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (III)



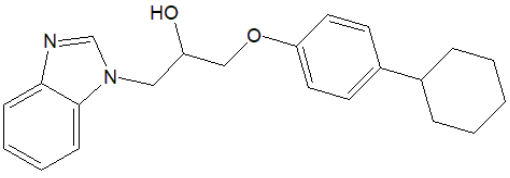
.....(III)

8. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (IV)



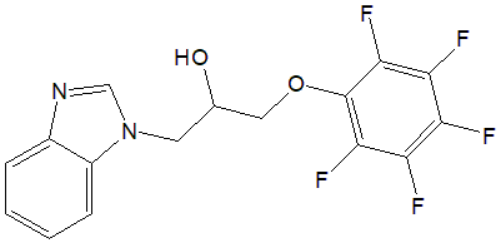
.....(IV)

9. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (V)



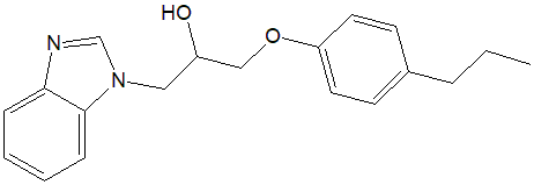
.....(V)

10. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (VI)



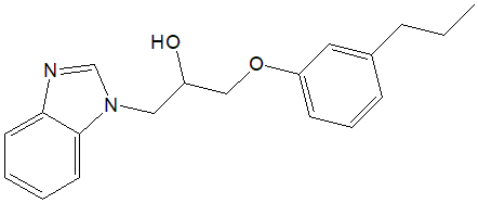
.....(VI)

11. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (VII)



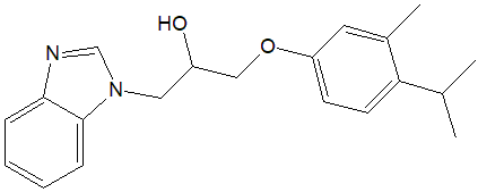
.....(VII)

12. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (VIII)



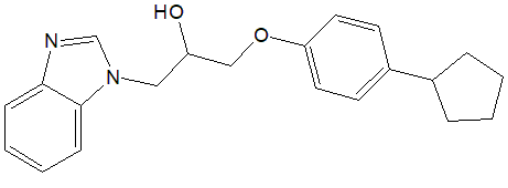
.....(VIII)

13. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (IX)



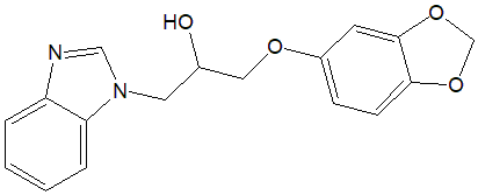
.....(IX)

14. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (X)



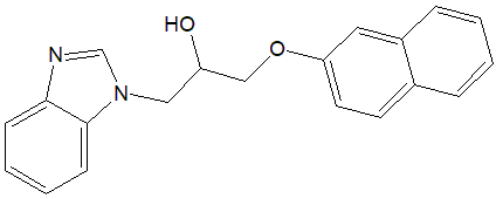
.....(X)

15. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (XI)



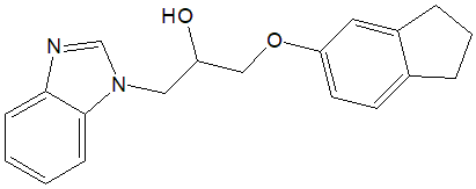
.....(XI)

16. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (XII)



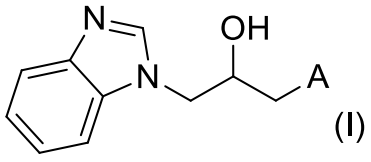
.....(XII)

17. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (XIII)



.....(XIII)

18. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



(I)

ก. ผสม 1,3-ไดโบรโมโพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และสารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:4 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ข. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ค. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ข) และอนุพันธ์ของฟีนอล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:3 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 50 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ง. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ค) และเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (Tetrabutyl amonium fluoride, TBAF) ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:4 โดยโมล ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 60 นาที

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือ แบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group)

19. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) เลือกได้จาก 4-โพรพิลฟีนอล (4-propylphenol), 3-โพรพิลฟีนอล (3-propylphenol), 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟีนอล (4-isopropyl-3-methyl phenol), 4-ไซโคลเฮกซิลฟีนอล (4-cyclohexylphenol), 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol), หรือ 5-อินดานอล (5-indanol)

20. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group) คือ แนปทาลีน-2-ออล (naphthalene-2-ol)

21. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) คือ ซีซามอล (sesamol)

22. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group) เลือกได้จาก 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล) ฟีนอล (2-Fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol), 3,4- ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol), 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol), หรือ เพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluoro phenol)

23. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก), ข), ค), และ ง) ตัวทำละลายอินทรีย์ เลือกได้จาก ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), อะซิโตน (acetone), ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide), เอทานอล (ethanol), เมทานอล (methanol), อะซิโตไนไตรล์

(acetonitrile), เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran), เอทิล อะซิเตท (ethyl acetate), เฮกเซน(hexane), ไอโซโพรพานอล (isopropanol), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว

24. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 23 โดยที่ ในขั้นตอน ก) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)

25. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 23 โดยที่ ในขั้นตอน ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide)

26. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 23 โดยที่ ในขั้นตอน ค) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทานอล (ethanol)

27. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 23 โดยที่ ในขั้นตอน ง) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran)

28. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก), ข), และ ค) ตัวเร่งปฏิกิริยา เลือกได้จาก อิมิดาโซล (imidazole), โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate), โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate), โซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride), โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide), ซีเซียมคาร์บอเนต (cesium carbonate), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว

29. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 28 โดยที่ ในขั้นตอน ก) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ อิมิดาโซล (imidazole)

30. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 28 โดยที่ ในขั้นตอน ข) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ สารผสมของ ซีเซียมคาร์บอเนต (cesium carbonate) และโซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride)

31. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 28 โดยที่ ในขั้นตอน ค) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate)

32. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 0 ถึง 25 องศาเซลเซียส

33. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ข) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส

34. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ค) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 70 ถึง 90 องศาเซลเซียส

35. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ง) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส

36. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 14 ถึง 20 ชั่วโมง

37. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ข) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 24 ชั่วโมง

38. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ค) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 16 ถึง 24 ชั่วโมง

39. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ง) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 10 ถึง 30 นาที

40. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก) สารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) เลือกได้จาก ไตรเมทิลไซลิล คลอไรด์ (trimethylsilyl chloride, TMSCl), ไตรเอทิลไซลิล คลอไรด์ (triethylsilyl chloride, TESCl), เทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลไซลิลคลอไรด์ (tert-butyldimethylsilyl chloride, TBDMSCl), เทอเชียรีบิวทิลไดฟีนิลไซลิล คลอไรด์ (tert-butyldiphenylsilyl chloride,TBDPSCl), หรือ ไตรไอโซโพรพิลไซลิล คลอไรด์ (triisopropylsilyl chloride ,TIPSCl)

41. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 40 โดยที่ ในขั้นตอน ก) สารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) คือ เทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลไซลิลคลอไรด์ (tert-butyldimethylsilyl chloride, TBDMSCl)

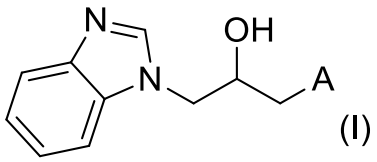
42. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก) อัตราส่วนโดยโมลของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และสารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) อยู่ในช่วง 1:2 ถึง 1:3

43. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ข) อัตราส่วนโดยโมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซล อยู่ในช่วง 1.5:1 ถึง 2.5:1

44. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ค) อัตราส่วนโดยโมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ข) และ อนุพันธ์ของฟีนอล อยู่ในช่วง 1:1.5 ถึง 1:2.5

45. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ง) อัตราส่วนโดยโมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ค) และ เตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (tetrabutylamonium fluoride, TBAF) อยู่ในช่วง 1:2 ถึง 1:3 โดยโมล

46. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



(I)

ก. ผสม 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และอนุพันธ์ของฟีนอล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ข. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซลในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือ แบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่เฮเทอโร (hetero-substituted group)

47. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) เลือกได้จาก 4-โพรพิลฟีนอล (4-propylphenol), 3-โพรพิลฟีนอล (3-propylphenol), 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟีนอล (4-isopropyl-3-methyl phenol), 4-ไซโคลเฮกซิลฟีนอล (4-cyclohexylphenol), 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol), หรือ 5-อินดานอล (5-indanol)

48. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group) คือ แนปทาลีน-2-ออล (naphthalene-2-ol)

49. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) คือ ซีซามอล (sesamol)

50. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group) เลือกได้จาก 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล) ฟีนอล (2-Fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol), 3,4- ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol), 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol), หรือ เพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluoro phenol)

51. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ก) และ ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ เลือกได้จาก ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), อะซิโตน (acetone), ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide), เอทานอล (ethanol), เมทานอล (methanol), อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile), เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran), เอทิล อะซิเตท (ethyl acetate), เฮกเซน(hexane), ไอโซโพรพานอล (isopropanol), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว

52. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 51 โดยที่ ในขั้นตอน ก) ตัวทำละลายอินทรีย์ เลือกได้จาก เอทานอล (ethanol), หรือ อะซิโตน (acetone)

53. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 51 โดยที่ ในขั้นตอน ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide)

54. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ก) และ ข) ตัวเร่งปฏิกิริยาเลือกได้จาก อิมิดาโซล (imidazole), โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate), โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate), โซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride), โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide), ซีเซียมคาร์บอเนต (cesium carbonate), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว

55. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 54 โดยที่ ในขั้นตอน ก) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate)

56. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 54 โดยที่ ในขั้นตอน ข) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride)

57. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ก) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 50 ถึง 85 องศาเซลเซียส

58. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ข) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส

59. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ก) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 15 ถึง 20 ชั่วโมง

60. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ข) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 24 ชั่วโมง

61. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ก) อัตราส่วนโดยโมลของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และอนุพันธ์ของฟีนอล อยู่ในช่วง 1:1 ถึง 2:1

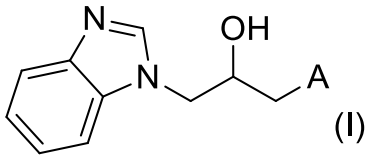
62. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ข) อัตราส่วนโดยโมลระหว่างอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และ เบนซิมิดาโซล อยู่ในช่วง 1:1 ถึง 2:1

63. สารประกอบเบนซิมิดาโซล ที่ได้จากวิธีการเตรียมตามข้อถือสิทธิที่ 18 ถึง 62 ข้อใดข้อหนึ่ง

64. การใช้สารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถือสิทธิที่ 1 ถึง 17 หรือ 63 ข้อใดข้อหนึ่ง สำหรับยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ InhA เพื่อใช้เป็นสารต้านวัณโรค

<u>บทสรุปการประดิษฐ์</u>

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล และวิธีการเตรียมของอนุพันธ์เบนซิมิดาโซลดังกล่าว ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง (I)



(I)

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือ แบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group)

PACCON 2018
Pure and Applied Chemistry International Conference

Molecular docking study of pyrrolyl benzohydrazide derivatives to explore the structure requirements of InhA inhibitors

Paptawan Thongdee[1], Bongkochawan Pakamwong[1], Kotchakorn Yotyiamkrae[1], Bunrat Tharat[1], Bundit Khamsri[1], Thitima Chuansupak[1], Naruedon Phusi[1], Chayanin Hanwarinroj[1], Kampanart Chayajarus[1], Pharit Kamsri[2], Auradee Punkvang[2], Nitima Suttipanta[3], Patchreenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Prasat Kittakoop[5], Ubonsree Leartsakulpanich[6], Khomson Suttisintong[7], James Spencer[8], Adrian Mulholland[9], Pornpan Pungpo[1]*

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
[2]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand*
[3]*Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
[4]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*
[5]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*
[6]*National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*
[7]*National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*
[8]*School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK*
[9]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol BS8 1TS, UK*
**E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com*

Abstract:

Enoyl ACP reductase, InhA has been identified as promising target for anti-tuberculosis development. This enzyme is the binding pocket of isoniazid, the first line drug for anti-tuberculosis agents. However, the potency of isoniazid is decreased due to the mutation of activation enzyme, KatG. Pyrrolyl benzohydrazide derivatives were designed as new InhA inhibitors with moderate activities against InhA and mycobacterial cell. Herein, we aim to develop new highly potent InhA inhibitors based on pyrrolyl benzohydrazide derivatives. Molecular docking calculations were used to elucidate the key interactions for binding of these inhibitors in InhA binding pocket. The obtained results showed that hydrogen bond interaction between ligand and Pro156, Tyr158, Ala198, Val203 and NAD^+ cofactor. Moreover, pi-pi interaction was improved the binding affinity of inhibitors in InhA binding site. The integrated results from docking in this work aided to rational design new and more potent InhA inhibitors in a series of pyrrolyl benzohydrazide as novel anti-tuberculosis agents.

1. Introduction

Enoyl-ACP reductase (ENR) catalyzes the last step of the elongation cycle in the synthesis of fatty acids. Fatty acid biosynthesis is essential for survival is mammals, plants, fungi and bacteria (the archaea make isoprenoid-based lipids).[1] ENR also known as InhA, it is enzyme of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) caused causative agent for tuberculosis (TB), an infection caused by the slow growing bacteria that frequently found in lungs, called pulmonary TB. The disease can also spread to other parts of the body, referred to as extra-pulmonary TB that may be latent or active. *M. tuberculosis* has been the major public health threat that remains to be the leading cause of mortality with malaria and AIDS, and infecting nearly eight million people worldwide, probably killing more than three million yearly[2]. Inhibition of the InhA is one of the most effective treatment of killing *M. tuberculosis*, as clinically demonstrated by

isoniazid, the most potent TB drug. Unfortunately, both multi-drug and extensively drug resistant (XDR) of *M. tuberculosis* isolates are resistant to isoniazid, predominantly due to mutations in KatG, the catalase peroxidase involved in the activation process of isoniazid. This problem led to extensive efforts to identify direct InhA inhibitors.[3] Pyrrolyl benzohydrazide derivatives were designed as new InhA inhibitors with moderate activities against InhA and mycobacterial cell. Herein, we aim to develop new highly potent InhA inhibitors based on pyrrolyl benzohydrazide derivatives. Presently, molecular docking calculations were used to elucidate the key interactions for binding of these inhibitors in InhA binding pocket.

2. Methods

Fifty-three structures and biological activities of inhibitors were obtained from literatures review.[2] The 3D structures were generated using GaussView 5.0.8 program (Gview). This results 3D structure from Gview leads to optimize by M062X/6-31G* method using Gaussian09 program.

2.1 Molecular docking studies

Molecular docking was done to clarify the binding mode of the compounds to provide straight forward information for further structural optimization.[2] Molecular docking calculations using Autodock 4.2 program was performed to predict the potent inhibitors in the InhA binding pocket. The X-ray crystal structure (PDB code: InhA2x23) was used as receptor for this calculation.

3. Results and Discussion

3.1 Interactions for binding of these Pyrrolyl benzohydrazide derivatives in InhA binding pocket by Molecular docking calculations

Molecular docking calculations were used to elucidate the key interactions for binding of these inhibitors in InhA binding pocket. The obtained results showed that the important interaction between ligand, amino acid and NAD^+ cofactor in InhA binding pocket are H-bond interaction and π-π interaction. In this literatures review, we study the structure and inhibition values of InhA at 50 μM. Table 1 shows the chemical structures and % inhibition value of compounds 1, 6, 51 and 52, respectively. Compounds 1, 51 and 52 show inhibition values are higher inhibitory activity than compound 6. Figure 1 shows the binding interactions of compounds 1, 6, 51 and 52.

As depicted in figure 1a, the six H-bond interactions green line) between compound 1 with Gly96, Val203, Leu218 residues and NAD^+ cofactor. In binding mode of compound 51, formed six H-bond interactions with Met103, Tyr158, Met161, Ala198 residues and NAD^+ cofactor in figure 1b. Figure 1c shows the results of docking, all seven H-bond interactions between compound 52 and Phe97, Pro156, Met161, Ala198, Ile202 residues and NAD^+ cofactor. Moreover, π-π interaction between ligand with Tyr158 residue was found (Figure 1d). Figure 1e, compound 6 showed the H-bond interaction with ligand formed Tyr158, Met161, Ala198 residues and NAD^+ cofactor.

3.2 Effect of R substituent from molecular docking calculations

Compounds 1 and 6 have the same general structures. Only R structure of compound 6 contained bromine atoms at R substituent, according to Table 1. The inhibition value of compound 1 higher than the inhibition value compound 6. On the other hand, the results of molecular docking of compound 6 was formed H-bond interaction more than compound 1. Compound 6 contained Br atoms at R substituent as compared to compound 1, these atoms must be affected to inhibitory activity. Compound 1 contained hydrogen atoms. Small size of compound 1 helped to recognize the orientation InhA binding site (Figure 1a). As compared to compound 6, the orientation of this compound is different (Figure 1e) as compared with compound 1. This result suggested that R substituent should be low electron density and size. The π-π interaction of compound 52 was

found as the crucial interaction to bind with InhA binding pocket. This interaction effected to inhibitory activity of InhA. So, inhibition may be related to the position and between ligand and amino acid and electrostatic interaction of bromine substituents.

Therefore, the important interaction between ligand, NAD^+ cofactor and amino acid is H-bond interaction and pi-pi interaction. Moreover, the substituent of new design compounds should be electron withdrawing group like F and Cl at R substituent and electron donating group such as CH_3 group at pyrrolyl.

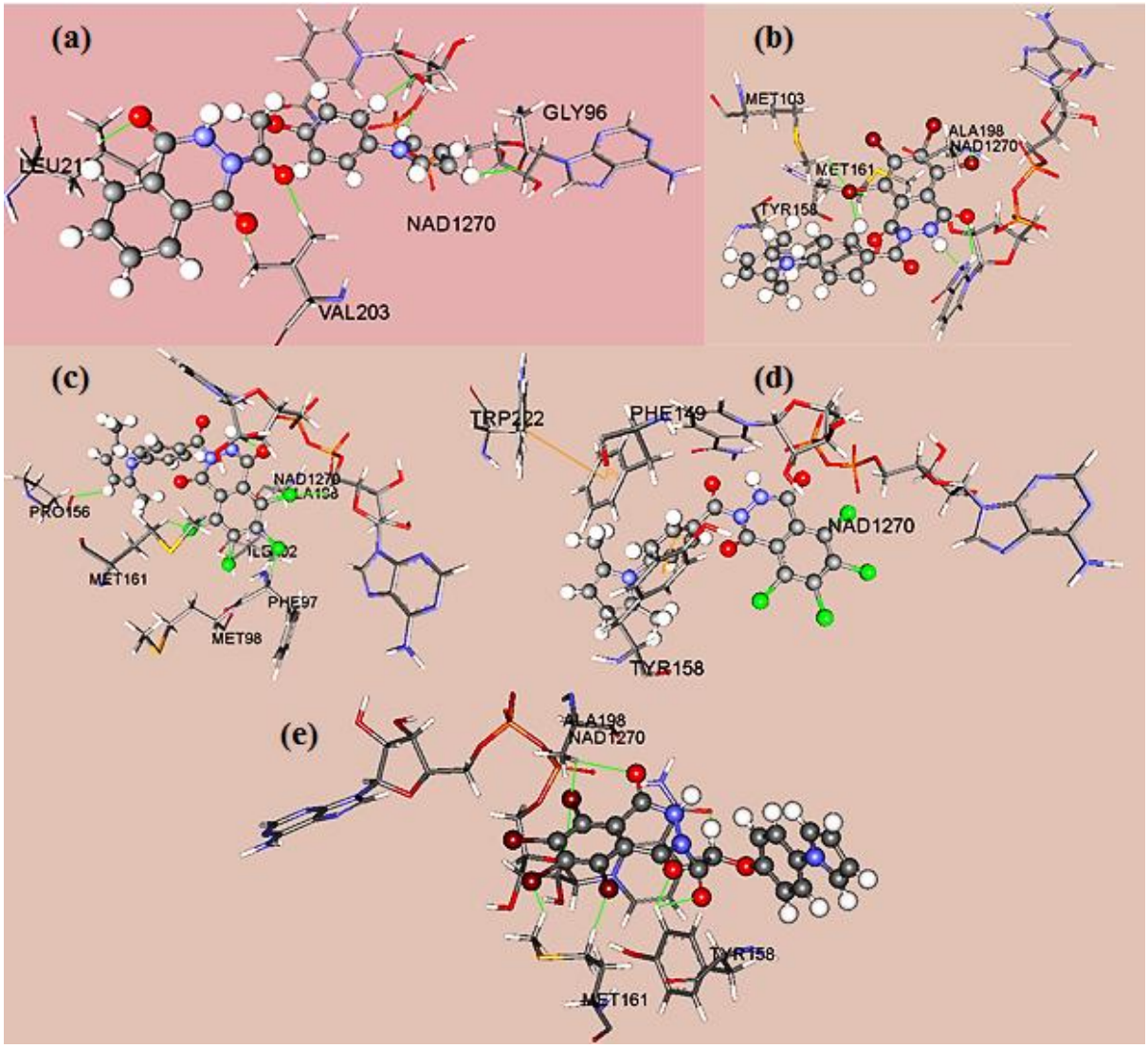
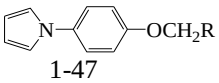
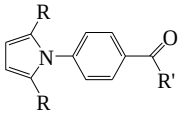


Figure 1. Docked mode of (a) compound 1 formed H-bond, (b) compound 51 formed H-bond, (c) compound 52 formed H-bond, (d) compound 52 formed π-π interaction and (e) compound 6 formed H-bond with inhibitors

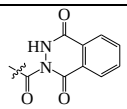
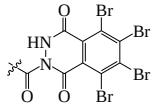
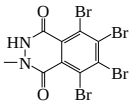
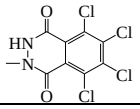
Table 1. The chemical structures and % inhibition value



1-47



48-53

Compound	R	R´	% Inhibition of InhA at 50 µM
1		-	63
6		-	11
51	CH_3		75
52	CH_3		76

4. Conclusion

Structure based drug design using molecular docking calculations was successfully elucidated to predict InhA inhibitors based on pyrrolyl benzohydrazide derivatives in InhA binding site. The results showed that selected compounds formed H-bond interactions with Gly96, Phe97, Met103, Pro156, Tyr158, Met161, Ala198, Ile202, Val203, Leu218 residues and NAD^+ cofactor. The π-π interaction was found as important interaction of InhA inhibitor. Accordingly, the obtained results from this work aid to rational design new pyrrolyl benzohydrazide derivatives as highly potent InhA inhibitors.

Acknowledgement

This research was supported by the Thailand Research Fund (RSA5980057) and the National Research Council of Thailand. Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Faculty of Science, Kasetsart University and NECTEC are gratefully acknowledged for supporting this research.

References

1. Massengo-Tiasse, R. P.; Cronan, J. E. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* , 1507–1517.
2. Joshi, S. D.; More, U. A.; Dixit, S. R.; Balmi, S. V.; Kulkarni, B. G.; Ullagaddi, G.; Lherbet, C.; Aminabhavi, T. M. *Bioorg. Chem.* **2017**, *75*, 181–200.
3. Manjunatha, U. H.; Rao, S. P. S.; Kondreddi, R. R.; Noble, C. G.; Camacho, L. R.; Tan, B. H.; Ng, S. H.; Ng, P. S.; Ma, N. L.; Lakshminarayana, S. B.; Herve, M.; Barnes, S. W.; Yu, W. X.; Kuhen, K.; Blasco, F.; Beer, D.; Walker, J. R.; Tonge, P. J.; Glynne, R.; Smith, P. W.; Diagana, T.T. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 1−9.
4. Shrinivas, D. J.; Sheshagiri R. D.; Pradeepkumar, M.; Kulkarni, V. H. *Indo Am. J. Pharm. Res.* **2016**, *6*, 4925–4933.
5. Xing, D.; Yi, L.; Yuan L. X.; Shi, M. A.; Jing, L.; Peng, S.; Xing L. J.; Shu Q. L. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 144.

PACCON 2018
Pure and Applied Chemistry International Conference

Rational design of PknB inhibitors in class of 4-oxo-crotonic acid derivatives as highly potent anti-tuberculosis agents

Chayanin Hanwarinroj[1], Naruedon Phusi[1], Kampanart Chayajarus[1], Pharit Kamsri[2], Auradee Punkvang[2], Nitima Suttipanta[3], Patchreenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Khomson Suttisintong[5], Prasat Kittakoop[6], James Spencer[7], Adrian Mulholland[8], Pornpan Pungpo[1]*

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
[2]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand*
[3]*Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
[4]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*
[5]*National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*
[6]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*
[7]*School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK*
[8]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol BS8 1TS, UK*
**E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com*

Abstract:

Protein serine/threonine kinase B (PknB) is an essential serine/threonine kinase of *M. tuberculosis*, plays an important role in a number of signalling pathways involved in cell division and metabolism. However, PknB inhibitors show less potency against whole cell. To develop protein kinase B inhibitors as new potential anti-tuberculosis agents in class of 4-oxo-crotonic acid derivatives, molecular docking calculations and molecular dynamic simulations (MD simulations) were applied to understand the crucial interactions, binding mode and binding energy of selected 4-oxo-crotonic acid derivatives. The results obtained from molecular docking calculations indicated that highly active compound form hydrogen bond interactions with back bone of Leu17, Val95, and Asp156 in the PknB binding pocket. Moreover, van der Waals interactions with Tyr94, Val95, and Met145 in the PknB binding pocket were crucial for binding affinity. The binding mode and binding energy of highly active compound obtained from MD simulations were employed to gain insight into the complex structures of the protein kinase B inhibitors and their binding energetics. The results can be helpful for further design a novel anti-tuberculosis drug design.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) caused by *M. tuberculosis* remains as a major world health problem. It is second only to HIV/AIDS as the biggest killer worldwide. In 2016, 10.4 million people worldwide suffered from TB and an estimated 1.7 million people death from TB.[1] In particular, standard regimens using existing drugs such as isoniazid (INH), the main drug for TB treatment, are ineffective because of increasing prevalence of drug-resistant tuberculosis such as multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB). The 2-*trans*-enoyl-ACP reductase (InhA) is an attractive target for designing novel antibacterial agents because this enzyme is not found in the mammalian system.[2,3] However, this target developed the resistance to isoniazid. Intensive research efforts are directed toward identification and development of novel InhA inhibitors, but most of the newly discovered InhA inhibitors show poor cellular activity against *M. tuberculosis*.[4] Accordingly, finding new drugs to treat TB as well as identifying new targets are an urgent priority. Protein kinase B (PknB) is a Ser/Thr protein kinase (STPK) and represents a signaling element involved in

mycobacterial physiology and virulence of *M. tuberculosis*. Protein kinase B has been considered as an attractive target for development of anti-TB agents because this enzyme is essential for bacterial growth and for survival of the pathogen within the host. A large number of PknB inhibitors have been screened and identified as potential anti-TB agents. Lead PknB inhibitors show promising enzyme potency and cellular activity against *M. tuberculosis*. Moreover, PknB inhibitors are able to target PknB outside of the *M. tuberculosis* cell, avoiding the problem of poor cell wall permeability.[5] Because of poor cell wall permeability, many anti-TB agents with promising enzyme potency show weak or no cellular activity against *M. tuberculosis* nowadays, substituted aminopyrimidine compounds have been synthesized as a new class of PknB inhibitor. Some of these compounds show the nanomolar enzyme binding affinity and micromolar minimum inhibitory concentrations against *M. tuberculosis*.[6] However, the detailed structure basis for binding of 4-oxo-crotonic acid compounds as PknB inhibitor is not well understood. Accordingly, molecular docking calculation and molecular dynamics simulations (MD simulation) were employed in this work to model the complex structures of substituted 4-oxo-crotonic acid in PknB inhibitors. The integrated results could be helpful for further design a novel and more potent anti-tuberculosis agents.

2. Materials and Methods

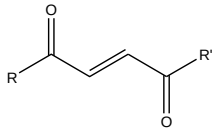
2.1 Biological data

Structures and biological activities of ninety 4-oxocrotonic acid derivatives were obtained from literature.[6] All derivatives were constructed by standard tools in Gaussview 5.08 program and then fully optimized by M06-2X/6-31G* method using Gaussian09 program.

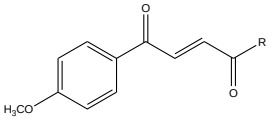
2.2 Molecular docking calculations

Molecular docking using the Autodock 4.2 program was employed with the aims of generating inhibitor enzyme complexes in this study. The available X-ray structure of PknB in a complex with 1,4-dihydroxy-5,8-bis({2[(hydroxyethyl)amino] ethyl}amino)-9,10-anthracenedione (PDB code 2FUM) was used as an initial structure of receptor for molecular docking calculations. The number of Genetic Algorithm (GA) runs was set to 200 run per ligand with the default search algorithm parameters. The docking protocols were validated based on the root-mean-square deviation (RMSD) value between the docked and observed X-ray conformations.

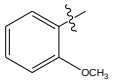
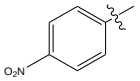
Table 1. Structure and biological activity of 4-oxocrotonic acid derivatives as PknB inhibitors



(a) cpd. 55 and cpd. 85



(b) cpd. 02

cpd.	R	R'	% inhibition at 20 μM
02	OCH_3	-	24.7±1.5
55		isopropyl	56.2±5.0
85		2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino] ethyl	87.9±5.3

2.3 Molecular dynamic simulations

Molecular dynamic simulation (MD simulations) were performed to predict the inhibitors in the PknB binding pocket. TIP3P water model and Na^+ were chosen to represent water for salvation and ions for neutralize system. To reduce the bad steric interactions of solvate water molecules and Na^+ ions of each system, the inhibitor-PknB complex was first minimized by 1,000 steps with atomic positions of solute species restraint with using force constant of 500 kcal/mol $Å^2$. Non-bonded cut-off was set to 8 Å. The threshold value of the energy-gradient for the convergence was set as 0.001 kcal/mol/ Å. Then, the whole system was minimized by 1,500 steps as the same conditions of water and ions minimization without restraining condition. Next, the

systems were gradually warmed up from 0 to 300 K in the first 20 ps followed by maintaining the temperature at 300 K in the last 10 ps with 2 fs time simulation steps in a constant volume boundary. The solute species were restrained to their initial coordinate structures with a weak force constant of 10 kcal/mol $Å^2$ during the temperature warming. This was followed by 70 ps of the position-restrained dynamics simulation with a restrain weight of 2 kcal/mol $Å^2$ at 300 K under an isobaric condition. Finally, 10 ns MD simulations without any restraints were performed using the same conditions. The root-mean square deviations (RMSDs) of the PknB enzyme and the inhibitors, and binding free energies were calculated to evaluate the binding affinities of inhibitors in PknB binding pocket using the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) methods.

3. Results and Discussion

3.1 Molecular docking calculations

3.1.1 Crucial interaction of selected inhibitors

High accuracy prediction of docking parameter in Autodock 4.2 program was validated based on the RMSD value between X-ray and docked structures. RMSD value is 1.09 Å. Therefore, binding mode of selected compounds in this study was predicted as the same parameters. The binding mode of highest active compound is cpd. 85 in PknB binding pocket is showed in Figure 1. The crucial binding interactions are hydrogen bond interaction between side chain of R substituent with backbone of Leu17, Val72, Tyr94 and Met155 residues, respectively. In addition, van der Waals interaction between side chain of R substituent and side chain of Val25, Lys40, Met92, Val95 and Asp156 residues were founded. The binding mode of moderate active compound is cpd. 55 is showed in Figure 2. The crucial binding interactions are hydrogen bond interaction between carbonyl group of core structure with side chain of Met92 residue. Moreover, van der Waals interactions were obtained between side chain of cpd. 55 with side chain of Val72, Gly97, Met145, Met155 and Asp156 residues, respectively. For less active compound, the crucial interactions are hydrogen bond interaction between C-O of R substituent with side chain of Leu17 residue. In addition, van der Waals interactions were found between core structure and side chain of Val72, Val95 and Met145 residues, respectively. The obtained results suggested the crucial interactions of 4-oxocrotonic acid in PknB binding pocket could be helpful for rational design new 4-oxocrotonic acid derivatives.

3.2 Molecular dynamic simulations

3.2.1 Structural stability during MD simulations

In order to calculate structural stability during MD simulation of cpd. 85 in PknB binding pocket, The RMSDs for all

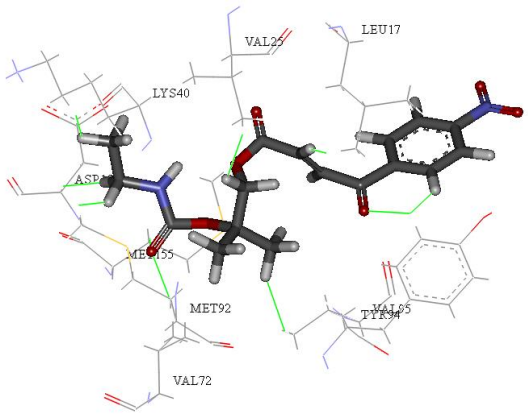


Figure 1. Crucial interactions of highest active compound (cpd. 85)

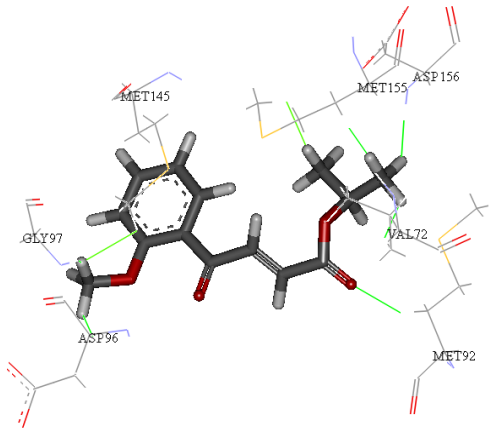


Figure 2. Crucial interactions of moderate active compound (cpd. 55)

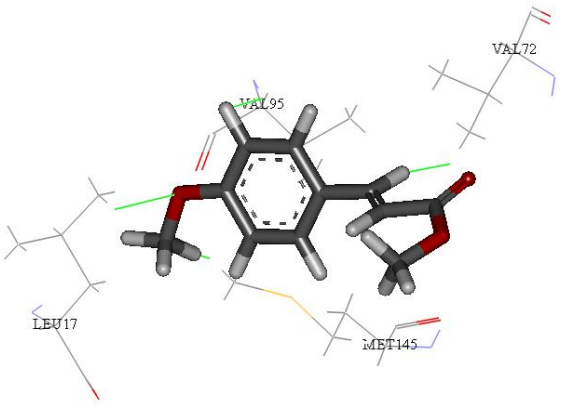


Figure 3. Crucial interactions of less active compound (cpd. 02)

atoms of solute species relative to the initial structure over the 10 ns of simulation times were calculated and plotted in Figure 4. The RMSD plots indicate that cpd. 85 reached equilibrium state after 5 ns. Therefore, the result obtained from MD simulations of cpd. 85 was reasonable for further analyze in more detail of binding free energy, binding mode and binding interaction. The binding free energy calculations were calculated by MM-PBSA method the result indicated that the calculated binding free energy of cpd. 85 was -13.29 kcal/mol (the binding energy obtained from experimental was -12.58 kcal/mol). The obtained result indicated that binding free energy calculations based on MM-PBSA method provide good value and closed to experimental binding free energy.

3.2.2 Binding mode and binding interactions of cpd. 85

The binding mode of cpd. 85 obtained from MD simulations formed four hydrogen bond interactions between hydrogen atom of R substituent with carbonyl group of Glu59, Glu93 residue and carbonyl group of core structure with side chain of Met145 residue, respectively. Moreover the hydrogen bond interaction between carbonyl group of R substituent with side chain of Asp156 residue was founded. The van der Waals interaction between side chain of R substituent and side chain of Val25 and Val95 residues were founded.

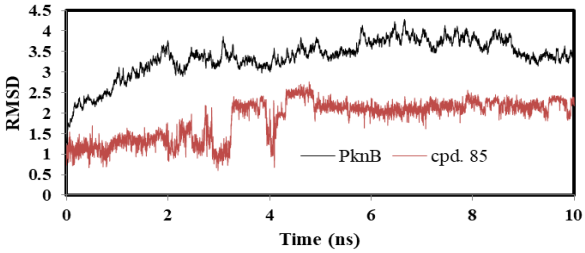


Figure 4. RMSD plots for the cpd. 85 in PknB binding pocket during MD simulation

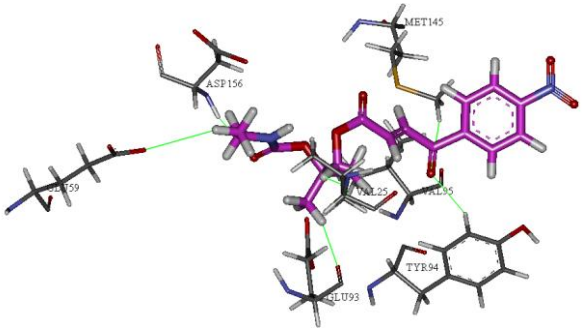


Figure 5. Crucial interactions of highest active compound (cpd. 85) obtained from MD simulations

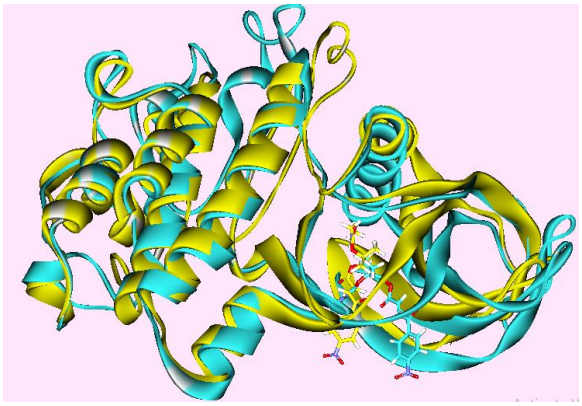


Figure 6. Superimposition of docked ligand (yellow) and the structure obtained from MD simulations (Cyan)

4. Conclusion

Molecular docking calculations and Molecular dynamic simulations were successfully to predict the binding mode binding interactions and binding free energy of 4-oxocrotonic acid derivatives as PknB inhibitors. Hydrogen bond interaction with Glu59, Glu98, Met145 and Asp156 are key amino acid residue for improve the biological activity of novel 4-oxocrotonic acid as anti *M. tuberculosis* agents.

Acknowledgements

This research was supported by the National Research Council of Thailand, the Thailand Research Fund (RSA5980057), the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST) (SCA-CO-2560-4375TH) to C. Hanwarinroj. Faculty of Science, Ubon Ratchathani University and NECTEC are gratefully acknowledged for supporting this research.

References

1. Global Tuberculosis Report 2014; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2016.
2. Campbell, J.W.; Cronan, J.E. *Annu Rev Microbiol.* **2001**, *55*, 305–332.
3. Heath, R.J.; Rock, C.O. *Curr Opin Investig Drugs.* **2004**, *5*, 146–153.
4. White, S.W.; Zheng, J.; Zhang, Y.M.; Rock, C.O. *Annu Rev Biochem.* **2005**, *74*, 791–831.
5. Lougheed, K.E.; Osborne, S.A.; Saxty, V.L.; Kettleborough, C.A.; Bryans, J.S.; Taylor, D.L.; Smerdon, S.J.; Buxton, R.S. Chugh, J.; Nott, T.J.; Patel, D.; Spivey,B.; Whalley, D.; Chapman, T.; Bouloc, N. *Tuberculosis* **2011**, *91*, 277–286.
6. Changliang, X.; Xiaoguang, B.; Jian, X.; Jinfeng, R.; Yun, X.; Ziqiang, L. Juxian, W.; Jingjing, S.; Liyan, Y.; Yucheng, W. *RSC Advances* **2017**, *7*, 4763–4775.

PACCON 2018
Pure and Applied Chemistry International Conference

Molecular modeling of InhA inhibitors in the class of benzimidazole derivatives as a novel anti-tuberculosis agents

Bunrat Tharat[1], Bongkochawan Pakanwong[1], Paptawan Thongdee[1], Kotchakorn Yotyiamkrae[1], Bundit Khamsri[1], Thitima Chuansupak[1], Naruedon Phusi[1], Chayanin Hanwarinroj[1], Kampanart Chayajaras[1], Thimpika Pornprom[1], Nitima Suttipanta[2], Pharit Kamsri[3], Auradee Punkvang[3], Patchreenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Prasat Kittakoop[5], Khomson Suttisintong[6], Adrian Mulholland[7], James Spencer[8], Pornpan Pungpo[1]*

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
[2]*Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
[3]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand*
[4]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*
[5]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*
[6]*National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*
[7]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, UK*
[8]*School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, UK*
**E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com*

Abstract:

Benzimidazole derivatives are good candidates for anti-tuberculosis agents that display a promising potency for inhibition of InhA. In this work, molecular docking calculations combined with bioisosteres were applied to get new potential structures of this series. This derivative has the same general structure but different in R substituent. Cpd05 was the highest active compound. Cpd32 and Cpd46 shown moderate active compounds. Cpd55 was less active compound. These compounds were classified based on the predicted binding affinity. To gain more details of binding interactions of new designed compounds, molecular dynamic simulations (MD) were performed on the designed inhibitors. The interactions of Cpd 05, Cpd32, Cpd46 and Cpd55 with amino acid surrounding the InhA binding pocket were analyzed. The hydrogen bond interactions were found as the crucial interactions for binding in the InhA binding site. These results lead to the synthesis of new series of benzimidazole derivatives.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the most common infectious diseases caused by *Mycobacterium tuberculosis*, TB kills two million people every year and it continues to be a major cause of morbidity and mortality all over the world. About one-third of the world's population is currently infected with TB. If the present trend continues, tuberculosis is likely to claim more than 30 million lives within the next decade. Five percent of all TB cases are now estimated to be multi-drug-resistant TB.[1] The enoyl-acyl carrier protein reductase of *Mycobacterium tuberculosis* is a key enzyme of the type II fatty acid synthesis system. It is involved in the production of mycolic acid and is a known target for isoniazid, an effective antibiotic for tuberculosis treatment.[2]

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.[3] Isoniazid (INH), a frontline drug for over 640 years used in the treatment of TB. As a prodrug, INH must be first activated by KatG, a catalase-peroxidase that oxidizes INH to an acyl-radical, which binds covalently to NAD^+, the co-substrate for InhA. The INH-NAD adduct functions as a potent inhibitor of InhA.[4] INH drug resistant tuberculosis caused by KatG mutation.

Hence, there is an urgent need to discover and develop new anti-TB agents that target novel biochemical pathways and to treat drug-resistant forms of the disease. Recently, molecular docking and molecular dynamics simulations have been performed to study the binding of benzimidazoles derivative onto the active site of InhA in an attempt to address the mycobacterial resistance against the drug. The integrated results should aid in the rational design of InhA inhibitors with high potential anti-tubercular activity.

2. Materials and Methods

The four chemical structure, docking score and binding energy of benzimidazole derivatives were shown in Table 1.The X-ray structure of InhA enzyme complexed with diphenyl ether was taken from Protein Data Bank (PDB code: 2X23). Chemical structures of these inhibitors were constructed using the standard tools available in GaussView 5.0.8 program and were then fully optimized using the *ab initio* (M062X/6-31G*) method implemented in Gaussian program. Molecular docking calculations was applied to obtain the binding mode of benzimidazoles derivatives using Autodock 4.2 program. Moreover, molecular dynamics simulations of Cpd05, Cpd33, Cpd46 and Cpd55 were performed for 30 ns to elucidate the binding mode and binding interactions into the InhA binding site.

3. Results and Discussion

3.1 Validation of the molecular docking calculations

Molecular docking calculations were employed to predict the potential binding mode of benzimidazole derivative in the InhA binding pocket. To ensure that the binding modes of InhA inhibitors obtained from molecular docking calculations are reliable, the docking parameters in Autodock 4.2 program were validated. The superimposition between the docked conformation and the X-ray crystal structure of diphenyl ether derivative is shown in Figure 1. The docked conformation of diphenyl ether derivative is close to the binding mode found in the X-ray crystal structure with rmsd of 0.61 Å, indicating that the docking parameters are reasonable to generate the binding mode of diphenyl ether derivative in the InhA binding pocket. Therefore, molecular docking calculations could be extended to search the binding modes of benzimidazole derivatives in the data set.

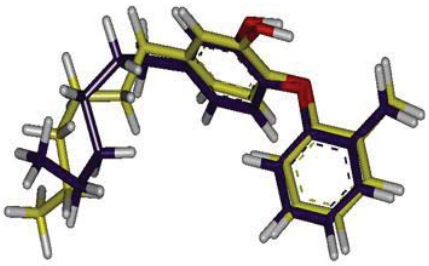
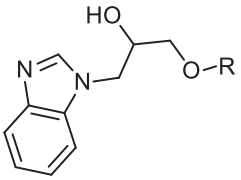
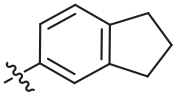
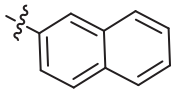
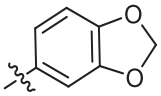
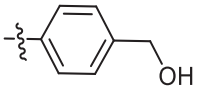


Figure 1. Superimposition of the X-ray crystal structure (carbon atoms colored by purple) and docked conformation (yellow) of diphenyl ether derivative in the InhA binding pocket

Table 1. The chemical structures, docking score and binding energy of benzimidazoles derivatives



Compound	R	Docking score kcal/mol	Binding energy kcal/mol
05		-11.97	-8.78
32		-11.46	-9.31
46		-11.33	-8.40
55		-11.21	-7.47

3.2. Molecular docking analysis of Cpd05, the highest active compound

Cpd05, the highest active compound from docking score (-11.97 kcal/mol) was selected to analyze the crucial interactions of benzimidazole derivative in InhA binding site. The obtained results show that Cpd05 formed hydrogen bond interaction between hydroxyl groups of ligand with oxygen atom of nicotinamide ribose cofactor (NAD^+). In addition, cation-π interactions between aromatic ring of Cpd05 with hydrogen atom of Lys165 residue and sigma-Pi interaction between aromatics ring of ligand with hydrogen atom of Met161 residue is shown in Figure 2. Moreover, hydrophobic interaction between hydrogen atom of ligand with hydrogen atom of Phe97, Met98, Met103, Ala157, Tyr158, Pro193, Val203 and Leu218 residues were founded.

3.3. Molecular docking analysis of Cpd32 and Cpd46, moderate active compounds

The binding mode and binding interactions of moderate InhA inhibitors of benzimidazole derivatives, Cpd32 and Cpd46 were investigated. The obtained results show that Cpd32 formed hydrogen bond interaction between oxygen atom and nitrogen atom of nicotinamide ribose cofactor (NAD^+) with hydroxyl group of ligand. In addition, hydrogen bond interactions between oxygen atoms of NAD^+ with hydrogen atom of ligand at R position are shown in Figure 3. Moreover, hydrophobic interactions between hydrogen atom of ligand with hydrogen atom of Phe97, Met98, Met103, Ala157, Tyr158, Pro193, Ala198, Val203 and Leu218 residues were founded.

For Cpd46, hydrogen bond interactions between oxygen atom of NAD^+ with hydrogen atom of ligand at R position and hydrogen bond interactions between oxygen atom of NAD^+ with hydroxyl group of ligand were found as crucial interaction for binding in InhA binding site. In addition, Cation-Pi interactions between aromatic ring of ligand with atom hydrogen of Lys165 residue and σ-π interaction between aromatic ring of ligand with hydrogen atom

of Met161 residue is shown in Figure 4. Moreover, hydrophobic interactions between hydrogen atom of ligand with hydrogen atom of Phe97, Met98, Met103, Phe149, Tyr158, Pro193, Ala198, Ile202, Val203 and Leu218 residues were founded.

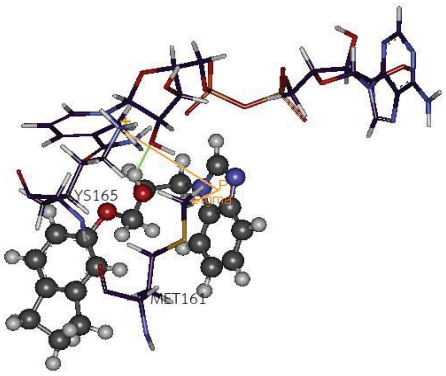


Figure 2. The binding mode of Cpd05 in InhA binding pocket obtained from molecular docking calculations

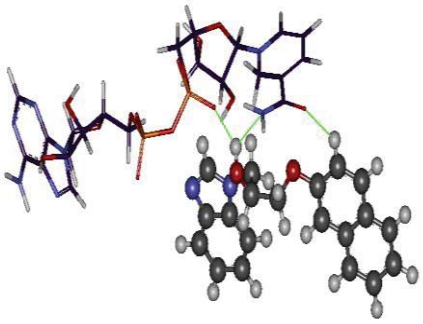


Figure 3. The binding mode of Cpd32 in InhA binding pocket obtained from molecular docking calculations

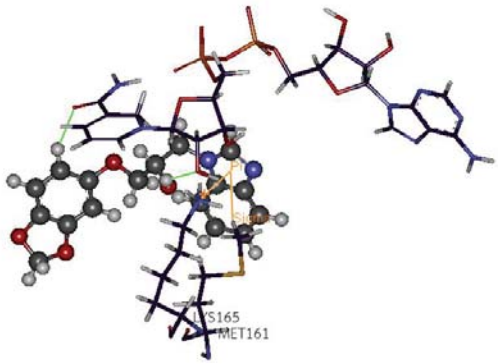


Figure 4. The binding mode of Cpd46 in InhA binding pocket obtained from molecular docking calculations

3.4. Molecular docking analysis of Cpd55, the less active compound

The lowest docking score (-11.21 kcal/mol) was classified as the less active compound of Cpd55. The obtained results show that Cpd55 formed hydrogen bond interactions between hydroxyl group on R substitute of ligand with Tyr158 and Pro156 residues. In addition, hydrogen bond interactions between oxygen atoms of NAD^+ with hydrogen atom of ligand were found as shown in Figure 5. Moreover, hydrophobic interactions between hydrogen atom of ligand with hydrogen atom of Phe97, Met98, Met103, Tyr158, Ile202, Val203 and Leu218 residues were founded.

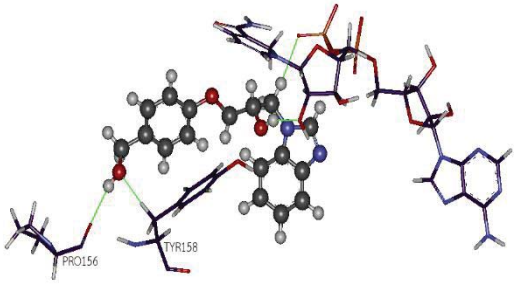


Figure 5. The binding mode of Cpd55 in InhA binding pocket obtained from molecular docking calculations.

3.5. System equilibration from molecular dynamics simulations

MD simulations of Cpd05, Cpd32, Cpd46, and Cpd55 bound with InhA were performed for 30 ns to evaluate the structural stability of the complexes and their binding strength. The RMSDs for all atoms of three different solute species (InhA, NAD^+, and ligand) over the 30 ns of simulation times were analyzed and plotted in Figure 6. The plateau characteristic of the RMSD plot over the simulation time is the criteria to indicate the equilibrium state of each solute species. Figure 6 showed that NAD^+ reaches the equilibrium state at the early time. However, RMSDs of all compounds are more fluctuated, particularly Cpd32. For Cpd05 and Cpd46 reach the equilibrium state after 5 ns (Figure 6a and 6c) Cpd32 reach the equilibrium state after

15 ns (Figure 6b) and Cpd55 reach the equilibrium state after 15 ns. (Figure 6d)

3.6. The binding modes of benzimidazole derivatives in InhA

The binding modes of Cpd05, Cpd32, Cpd46 and Cpd55 bound with InhA pocket observed from the simulations are illustrated in Figure 7. Cpd05 was found hydrogen bond interaction between hydrogen atom of Tyr158 residue with nitrogen atom of ligand. In addition, hydrogen bond interactions between oxygen atoms of NAD^+ with hydrogen atom of ligand (Figure 7e). Moreover, hydrophobic interactions between hydrogen atom of ligand Cpd05 with hydrogen atom of Met199, Ile202 and Leu207 residues, Cpd32 was found hydrogen bond interaction between oxygen atoms of Met98 residue with hydroxyl group of ligand. In addition, hydrogen bond interactions between oxygen atoms of NAD+ with hydrogen atom of ligand and Cation-Pi interaction between aromatic ring of ligand with nitrogen atom of Gly98 residue (Figure 7f).

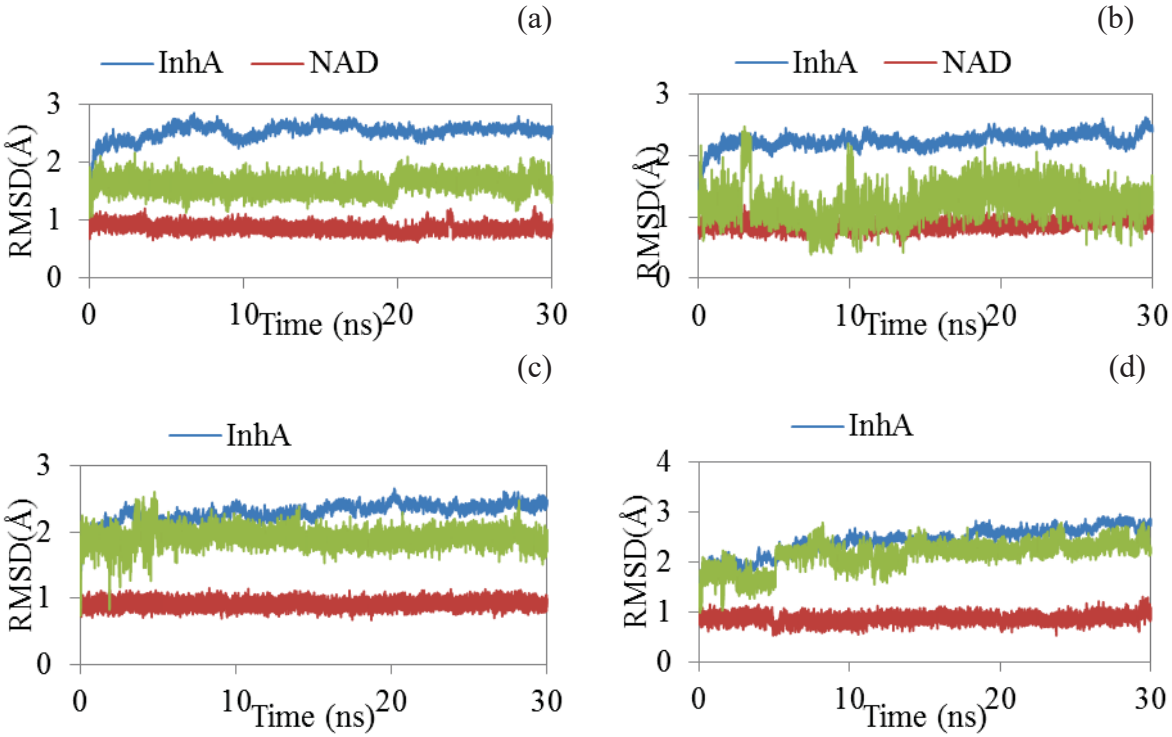


Figure 6. RMSD plots of compounds 05 (a), 32 (b), 46 (c), and 55 (d) complexes with InhA

In addition, hydrophobic interactions between hydrogen atom of ligand with hydrogen atom of Ala157, Met98, Met103 and Met161 residues were founded, For Cpd46 Hydrogen bond interaction between hydrogen atoms of Pro193 residue with hydroxyl group of ligand was found. In addition, hydrogen bond interactions between hydrogen atoms of NAD^+ with nitrogen atom of ligand. The π-π interaction between aromatic ring of ligand with aromatic ring of NAD^+ was founded (Figure 7g). Moreover, hydrophobic interactions between hydrogen atom of ligand with hydrogen atom of Phe149 and Ala198 residues, Cpd55 was found hydrogen bond interaction between hydrogen atoms of Phe149 residue with oxygen atom at hydroxyl group of ligand. In addition, hydrogen bond interactions between oxygen atoms of NAD^+ with hydrogen atom of ligand. (Figure 7h) Moreover, hydrophobic interactions between hydrogen atom of ligand with hydrogen atom of Met155, Leu207, Met199 and Ile202 residues were founded.

4. Conclusion

Molecular docking calculations and molecular dynamics simulations were performed on a series of benzimidazole derivatives to achieve a better understanding of the crucial interactions for binding affinity of these derivatives in the InhA binding pocket. The obtained results show the hydrogen bond interactions were found as the crucial interactions for binding. Moreover, the hydrophobic interaction, Pi-Pi interaction, cation-π interaction, σ-π interaction, and hydrophilic interactions of ligands with amino acid in InhA binding pocket were observed. This information leads to the design benzimidazole derivatives with effective in inhibiting InhA.

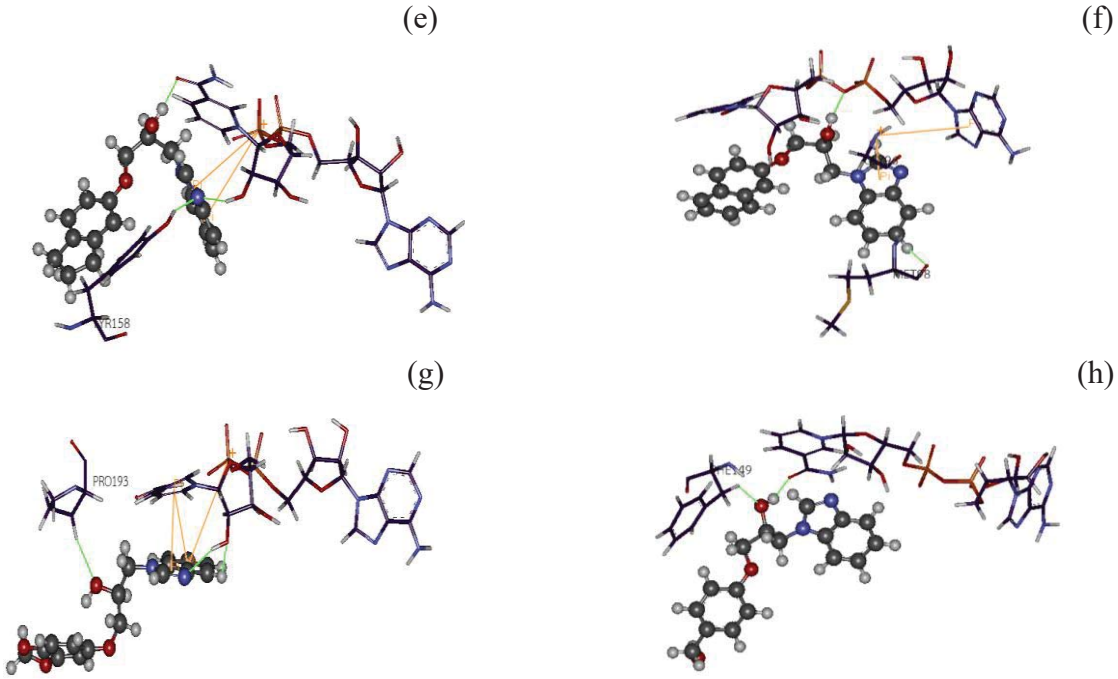


Figure 7. The binding mode of Cpd05 (e), Cpd32 (f), Cpd46 (g) and Cpd55 (h) in InhA binding pocket obtained from molecular dynamics simulations

Acknowledgements

This research was supported by the Thailand Research Fund (RSA5980057), RGJ Advanced Programme (RAP60K0009) and the National Research Council of Thailand. The financial support from Young Scientist and Technologist Program (YSTP) (SCA-CO-2560-4687-TH) to B. Tharat is gratefully acknowledged. Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, NANOTEC, Blue Crystal 4 (BC4), University of Bristol and NECTEC are gratefully acknowledged for supporting this research.

References

1. Theivendren, P.; Arumugam, S.; Subramanian A.; Shrinivas, D. J. *Drug. Discov. Ther*. **2016**, *10*, 188–194.
2. Yuya, I.; Shiho, A.; Yuji, K.; Masato, K.; Shunsuke, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1849–1856.
3. Auradee, P.; Patchreenart, S.; Supa, H.; Peter, W.; Pornpan, P. *Molecules* **2010**, *15*, 2791–2813.
4. Shrinivas, D.; J.; Uttam, A.; M.; Deepshikha, K.; Manoj, S.; K.; Mallikarjuna, N.; N.; Tejraj, M.; A. *Bioorg. Chem.* **2015**, *59*, 151–1670.

PACCON 2018
Pure and Applied Chemistry International Conference

In-silico aided inhibitor design of benzoimidazole-containing derivatives as novel direct InhA inhibitors

Pharit Kamsri[1]*, Auradee Punkvang[1], Patchreenart Saparpakorn[2], Supa Hannongbua[2], Sanya Sureram[3], Prasat Kittakoop[3], Nitima Suttipanta[4], Khomson Suttisintong[5], Adrian Mulholland[6], James Spencer[7], Potjanee Srimanote[8], Pornpan Pungpo[9]

[1]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand*
[2]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*
[3]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*
[4]*Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
[5]*National Nanotechnology Center, NSTDA, Pathum Thani 12120, Thailand*
[6]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK*
[7]*School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK*
[8]*Graduate Program, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani 12121, Thailand*
[9]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
**E-mail: pharit.kamsri@npu.ac.th*

Abstract:

Benzimidazole derivative has been identified as new potential lead InhA inhibitors based on virtual screening and biological assay evaluations. This compound exhibited the good enzyme assay (IC_{50}) and mycobacterial assay (MIC). To develop novel benzimidazole-containing derivatives based InhA inhibitors, *in silico* based virtual screening was performed on ChemBridge database. Our finding indicated that the **5928640** is a potential candidate to be a novel InhA inhibitor benzimidazole-containing hit for further design. Therefore, novel InhA inhibitors based on **5928640** derivatives were designed using bioisostere replacement combined with ADMET prediction and molecular docking calculations. MD simulations and waterswap calculations were applied to gain insight into the binding mode and key interactions for binding of **5928640** in InhA binding pocket. The obtained results revealed that hydrogen bond interaction between benzimidazole core with Tyr158 is the key interactions of new benzimidazole-containing derivatives. In addition, hydrophobic interactions could be considered as the contribution for stabilizing the InhA-ligand complex. Accordingly, the obtained results from this work aid to rational design of new benzimidazole-containing derivatives as new potential InhA inhibitors for mycobacterial drug development.

1. Introduction

Enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase or InhA of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) is potential attractive target for anti-tuberculosis drugs development. The InhA has been identified as the primary target of isoniazid (INH), the first-line drug of tuberculosis treatment. A prodrug, INH is activated to get the active radical by *M. tuberculosis* catalase peroxidase (KatG). Then, the active radical is covalently bound with nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) at the position 4, producing an active INH-NAD adduct. However, the inhibitory activity is reduced by the mutations effect of amino acid residues in KatG and InhA binding pockets, leading to the drug resistant of *M. tuberculosis*. However, it is still a valuable target to identify potential and selective inhibitor of InhA.[1-5] To overcome the drug resistant of *M. tuberculosis*, new inhibitors that directly bind with the InhA were developed.[6-8] However, low inhibitory activity based on mycobacterial whole assay of these lead compounds were reported.

Benzoimidazole derivatives have been developed as anti-tuberculosis agents with high effective against mycobacterial whole cell.[9-11] Therefore, we aim to identify

new InhA hits with highly specific with target enzyme and highly active mycobacterial whole cell based on benzoimidazole derivatives. Substructure search, ADMET predictions and molecular docking were employed to identify new specific InhA inhibitors. In addition, the structural stability of hit compounds in InhA binding site was investigated using molecular dynamics (MD) simulations. Bioisostere replacement combined with ADMET prediction were applied for rational design of new potent InhA inhibitors. The obtained results from this work aided to identify new InhA inhibitors based on benzoimidazole derivatives. The potential hits compounds of InhA inhibitors were proposed for InhA enzyme assay and mycobacterial whole cell assay to further develop new potent anti-tuberculosis agents.

2. Materials and Methods

2.1 Virtual screening approach

Ligand based virtual screening based on substructure search and ADMET predictions combined with molecular docking calculations were applied to identify novel InhA inhibitors based on benzoimidazole-containing derivatives. The small molecules from commercial database (ChemBridge database) were selected as ligand library for this virtual screening. ChemBridge database contained 1,300,000 compounds. InhA complexed with diphenyl ether (PDB code: 2X23) was downloaded from Protein databank and used as receptor for virtual screening.[12] To select the potential hit compounds of InhA inhibitors with good lead-like properties, ADMET prediction using SwissADME was employed.[13] Lead-likeness and no PAINS violation compounds were selected for molecular docking calculations. Molecular docking calculations using GOLD program with Goldscore was used to predict the docking score and binging mode of small benzoimidazole-containing molecules in InhA binding site.

2.2 MD simulations

The AMBER16 package was used for MD simulations to determine the structural stability and potential binding mode of InhA-hit complex. The ff14SB force field was used as parameter for InhA and General amber force field (GAFF) was applied as parameters for ligand and NAD^+ cofactor. All missing hydrogen atoms of InhA were added by LEaP module. Atomic partial ESP charges for ligand were obtained from the HF/6-31G(d) calculations. Complex structure was solvated by TIP3P waters. To neutralize the charge of solvated system, Na^+ ions were added. To reduce the bad steric interactions of water molecules and ions, the system was first minimized with atomic positions of solute species. Then, the whole system was optimized. Thereafter, the system was gradually warmed up from 0 to 300 K. The solute species were restrained to their initial coordinate structures. This was followed by the position-restrained dynamics simulation under an isobaric condition. Finally, 30 ns MD simulations without any restraints were performed using the same conditions.

2.3 Design of novel InhA inhibitors based on benzoimidazole-containing derivatives

Based on MD simulations, novel InhA inhibitors based on benzoimidazole-containing derivatives were design based on Bioisostere replacement that obtained from SwissBioisostere. ADMET prediction using SwissADME was used to predict the ADMET properties of new designed compounds.[13]

3. Results and Discussion

3.1 Virtual screening of new InhA inhibitors

In this work, three steps of virtual screening were performed to identify novel InhA inhibitors based on benzoimidazole-containing derivatives. First, substructure search based on benzoimidazole core structure was applied to obtain 9,420 derivatives of benzimidazole-containing from Chembridge database. To get good drug properties and good candidate for new

InhA inhibitors, ADMET prediction was applied. Using two criteria's,168 compounds were achieved based on lead-like properties and no PAINS violation. Molecular docking calculations were applied to predict binding mode and Goldscore of lead-like compounds. Based on Goldscore, the estimate binding affinity in InhA binding site, four compounds with Goldscore higher than 80 were selected as hit compounds (Table 1). Two series of benzoimidazole-containing hit compounds, 2-(1*H*-benzimi dazol-2-ylthio)acetamide (three compounds) and (1*H*-Benzimidazol-2-yl) methyl (one compound) derivatives were classified. Based on ADMET predictions as shown in Figure 2, we found that hit compounds are high GI absorption (Gastrointestinal Absorption), except **5914960**.

Unfortunately, low blood–brain barrier (BBB) permeation of all hits were obtained. **5928640** (2-(1*H*-benzimidazol-2-ylthio)-*N*-(4-methoxyphenyl)acetamide), the highest Goldscore with good ADMET prediction was considered as potential hit of InhA inhibitors. In addition, this compound might be easily to modify as high BBB permeation. Therefore, to obtain the novel InhA inhibitors based on benzoimidazole-containing derivatives with highly specific to InhA binding site, MD simulations of **5928640**-InhA complexed was applied to investigate the structural stability and binding mode in InhA binding site.

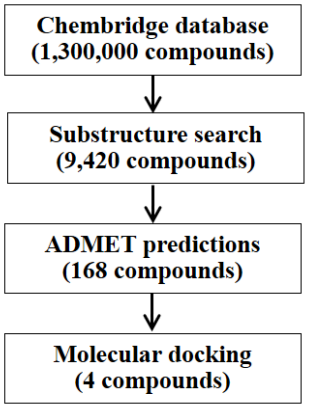
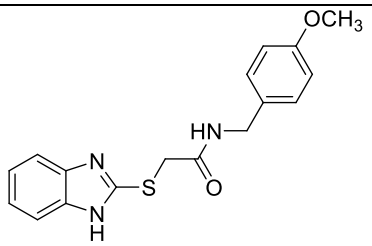
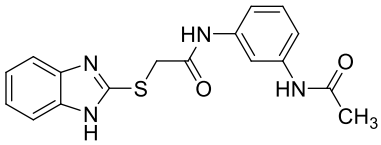
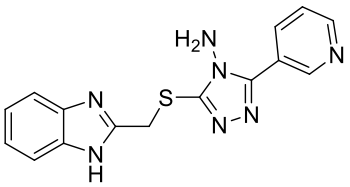
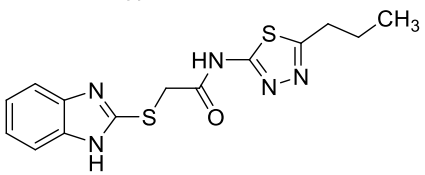


Figure 1. Virtual screening workflow

Table 1. Hit compounds based on benzoimidazole-containing derivative

ID	Goldscore	Structure
5928640	82.90	
6533900	81.33	
6659051	80.86	
5914960	80.04	

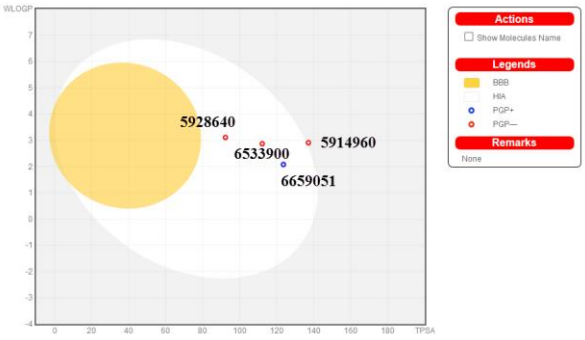


Figure 2. ADMET prediction of hit compounds

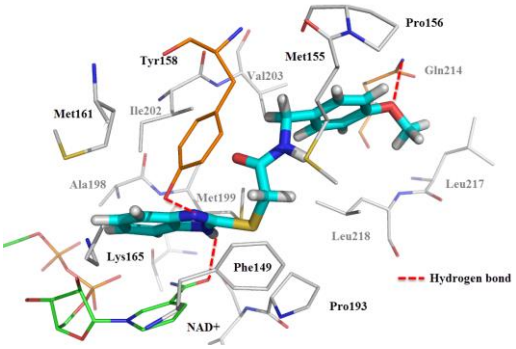


Figure 4. Binding mode and binding interaction of **5928640** in InhA binding site

3.2 Binding mode of InhA-5928640 complexed

To gain more insight into the binding characteristic of **5928640** in InhA binding site, MD simulations was carried out over 30ns of simulations time as showed in Figure 3. Based on RMSD plotted, the binding mode and binding interaction of **5928640** complexed with InhA were derived from MD simulations as displayed in Figure 4.

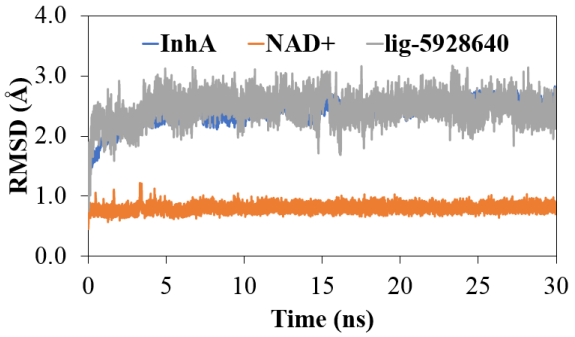


Figure 3. RMSD plotted of **5928640** complexed with InhA

5928640 is favorable to bind with InhA binding site *via* hydrogen bond interactions. Three hydrogen bond interactions were observed between **5928640** with NAD^+ cofactor and amino acid residues. Nitrogen atom and NH of benzoimidazole core formed hydrogen bond interactions with hydroxyl group of Tyr158 and an oxygen carbonyl on nicotinamide ring of NAD^+, respectively. In addition, an oxygen of methoxyl substituent on phenyl ring interacted with a NH amide sidechain of Gln214. The binding affinity of **5928640** was increased due to the pi-pi interaction of benzoimidazole ring with nicotinamide ring of NAD^+. Hydrophobic interactions between **5928640** with Ala198, Met199, Ile202, Val203 and Leu218 sidechain were observed.

3.3 Rational design of 5928640 derivatives

To obtain the novel InhA inhibitors based on benzoimidazole-containing derivatives, the integrated results from MD simulations with bioisostere replacement were considered. The 4-methoxyphenyl of **5928640** was located at hydrophobic binding site of InhA. This fragment was

Table 2. ADMET prediction of **5928640** derivatives

Molecule	TPSA	WLOGP	GI absorption	BBB permeant	Pgp substrate	CYP inhibitors				
						1A2	2C19	2C9	2D6	3A4
Triclosan	29.46	5.14	High	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	No
Diphenyl ether	29.46	6.09	High	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No
D01	83.08	3.13	High	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No
D02	83.08	2.88	High	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No
D03	83.08	2.55	High	No	No	Yes	No	No	No	No
D04	83.08	2.35	High	No	No	Yes	No	No	No	No
5928640	92.31	3.11	High	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

selected as replacement region of **5928640**. Therefore, 592 compounds of **5928640** derivatives were designed. Based on ADMET prediction, 110 compounds with high GI absorption and lead-like properties were obtained. Four compounds of **5928640** derivatives as shown in Table 2 were good candidates for InhA inhibitors with high predicted ADMET properties. These designed compounds were compared with two well-known InhA inhibitors, triclosan and diphenyl ether. D01, D02 are CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 and CYP2D6 inhibiters. These obtained results were comparable to diphenyl ether derivatives. However, novel InhA inhibitors based on this finding need to optimize to obtain high BBB permeation.

4. Conclusion

Virtual screening was successfully applied on ChemBridge database to identify novel InhA inhibitors based on benzoimidazole- containing derivatives. **5928640** were found as the most favorable to bind in InhA binding site based on Goldscore. Based on MD simulations, hydrogen bond interactions, pi-pi interactions and hydrophobic interactions were special characteristic for binding of **5928640** in InhA binding site. The MD simulations results combined with bioisostere replacement and with ADMET prediction were applied to design novel InhA inhibitors based on benzoimidazole-containing derivatives. Accordingly, the results obtained from this study aided to rational design novel InhA inhibitors as highly potential anti-tuberculosis agents.

Acknowledgements

This research was supported by RGJ Advanced Programme (RAP60K0009), the Thailand Research Fund (RSA5980057), the National Research Council of Thailand, the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), BristolBridge co-funded project, CCP-BioSim Project and EPSRC Council Global Challenges Research fund. Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Kasetsart University, Blue Crystal 4 (BC4), University of Bristol, and NECTEC are gratefully acknowledged for supporting this research.

References

1. Quémard, A.; Sacchettini, J.C.; Dessen, A.; Vilcheze, C.; Bittman, R.; Jacobs, W.R. Jr.; Blanchard, J.S., *Biochemistry* **1995**, *34(26)*, 8235–8241.
2. Vilchèze, C.; Wang, F.; Arai, M.; Hazbón, M.H.; Colangeli, R.; Kremer, L.; Weisbrod, T.R.; Alland, D.; Sacchettini, J.C.; Jacobs, WR Jr., *Nat. Med*. **2006**, *12*, 1027–1029.
3. Lei, B.; Wei, C.J.; Tu, S.C., J. *Biol. Chem*. **2000**, *275*, 2520–2526.
4. Quemard, A.; Dessen, A.; Sugantino, M.; Jacobs, W.R.; Sacchettini, J.C.; Blanchard, J.S., *J. Am. Chem. Soc*. **1996**, *118*, 1561–1562.
5. Tonge, P.J.; Kisker, C.; Slayden, R.A., *Curr. Top. Med. Chem*. **2007**, *7*, 489–498.
6. Lu, X,Y,; You, Q.D.; Chen, Y.D., *Mini Rev. Med. Chem*., **2010**, *10*, 181-192.
7. Inturi, B.; Pujar, G.V.; Purohit, M.N., *Arch. Pharm. (Weinheim)*., **2016**, *349*, 817–826.
8. Pan, P.; Tonge, P.J., *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 672–693.
9. Gong, Y.; Somersan Karakaya, S.; Guo, X.; Zheng, P.; Gold, B.; Ma, Y.; Little, D.; Roberts, J.; Warrier, T.; Jiang, X.; Pingle, M.; Nathan, C.F.; Liu, G., *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 336–353.
10. Keri, R.S.; Rajappa, C.K.; Patil, S.A.; Nagaraja, B.M., *Pharmacol. Rep*., **2016**, *68(6)*, 1254–1265.
11. Song, D.; Ma, S., *ChemMedChem*. **2016**, *11(7)*, 646–659.
12. Luckner, S.R.; Liu, N.; am Ende, C.W.; Tonge, P.J.; Kisker, C., *J. Biol. Chem*. **2010**, *285(19)*, 14330–14337.
13. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V., *Sci Rep*. **2017**, *7*, 42717.

RATIONAL DESIGN OF ASPERGILLUSIDONE A-F ISOLATED FROM MARINE-DERIVED FUNGUS ASPERGILLUS UNGUIS AS NEW PKNG INHIBITORS

[1]PHARIT KAMSRI, [2]AURADEE PUNKVANG, [3]PRASAT KITTAKOOP, [4]KHOMSON SUTTISINTONG, [5]PORNPAN PUNGPO

[1,2]Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand
[3]Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand
[4]National Nanotechnology Center, NSTDA, Pathum Thani 12120, Thailand
[5]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand
E-mail: [5]pornpan_ubu@yahoo.com

Abstract ─ Aspergillusidone A-F were isolated from marine-derived fungus Aspergillus unguis. Several inhibitory activities against potential target of these compounds were reported. To help biomedical science to find new inhibitory activity of Aspergillusidone A-F bioactive compounds against new potential targets, we aim to find new inhibitory activity against tuberculosis, the problem infection disease in Thailand. Molecular docking calculations was employed to model Aspergillusidone A-F complexed with M. tuberculosis PknG. The obtained results revealed that Aspergillusidone A was strongest bound to ATP binding site of M. tuberculosis PknG with docking score of -9.08 kcal/mol. Based on MD simulations followed by MM-GBSA interaction energy calculations, the crucial interactions of this compound are hydrogen bond interactions between Aspergillusidone A and Lys181, Glu233, Val235 and Arg242. In addition, molecular behavior Aspergillusidone A/PknG complexed was provided the key information to develop as highly specific PknG inhibitors. Therefore, the obtained results from this study guide to design the new potential bioactive compounds and biological assay evaluation against PknG and M. tuberculosis cell to find new anti-tuberculosis agents.

Index Terms ─ Aspergillusidone, biomedical science, PknG, tuberculosis, molecular modeling.

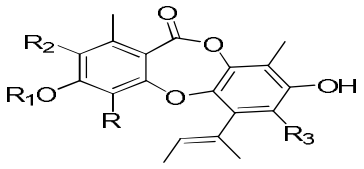
I. INTRODUCTION

M. tuberculosis serine/threonine protein kinases G, PknG has been identified as attractive target for anti-tuberculosis drug discovery. This enzyme involved in bacterial cell metabolic processes and preventing phagosome-lysosome fusion in host macrophages [1-4]. Moreover, sclerotiorin isolated from an endophytic fungus, *Penicillium sp.* Strain ZJ27 was reported as PknG inhibitor with an IC_{50} value of 76.5 mM, and acted as a non-competitive inhibitor [5]. Talaramide A bioactive compound isolated from endophytic fungus *Talaromycessp.* (HZ-YX1) showed promising inhibition of PknG activity with an IC_{50} value of 55 μM [6]. This result guided to search new natural products extracted from an endophytic fungus as PknG inhibitors and anti-tuberculosis agents. Many Thai natural products have been reported as potential anti-tuberculosis agents especially, multidrug resistant tuberculosis [7-8]. Aspergillusidone A-F were isolated from marine-derived fungus *Aspergillus unguis*. Chlorinated Aspergillusidone from the marine-derived fungus Aspergillus unguis CRI282-03 were reported as the aromatase inhibitors, an important therapeutic target for breast cancer treatment [9-11]. To help biomedical science to find new biological activity of Aspergillusidone bioactive compounds, we aim to apply structure based drug design approaches based on molecular docking calculations to identify the potential PknG inhibitors from isolated bioactive compounds of the endophytic fungus Aspergillus unguis. The novel *M. tuberculosis*PknG inhibitor was proposed.

II. MATERIALS AND METHODS

A. 3D structure ofAspergillusidone A-F

Structure of Aspergillusidone A-F [9,12] as shown in Figure 1 were contracted by standards tools implemented in Gaussview 3.07 and were then optimized by M06-2X/6-31G(d). The ligand Aspergillusidone A-F were prepared using LigPrep module to generate generate at most 32 conformations and one lowest energy ring conformation per ligand for docking study.



Aspergillusidone A: **R=H, R_1=H, R_2=H, R_3=COOH**
Aspergillusidone B: **R=Cl, R_1=Me, R_2=H, R_3=Cl**

Aspergillusidone C: R=H, R_1=H, R_2=Cl, R_3=Cl
Aspergillusidone D: R=H, R_1=H, R_2=Br, R_3=Br
Aspergillusidone E: R=H, R_1=H, R_2=Br, R_3=H
Aspergillusidone F: R=Br, R_1=H, R_2=H, R_3=Br

Fig. 1: Structure of Aspergillusidone A-F.

B. Molecular docking

Molecular docking calculations using Glide XP was applied to predict binding mode and estimate the binding energy of Aspergillusidone A-F in PknG binding pocket. The structure of PknG complexed with AX20017, an ATP competitive inhibitor of PknG was downloaded from the Protein Data Bank (PDB code: 2PZI). PknG structure was prepared with the Protein Preparation Wizard module.

C. MD simulations

MD simulations of highest docking score in PknG binding pockrt was performed for 10 ns. The ligand-enzyme complexe was obtained from molecular docking calculation in sections B. The AMBER12 package was used for all MD simulations to determine the potential binding mode, binding interactions and binding free energies. Amber03 force field was applied as parameter for PknG and General amber force field (GAFF) was applied as parameters for ligand. All missing hydrogen atoms of InhA were added by LEaP module. Atomic partial RESP charges for ligand were obtained from the M06-2X/6-31G(d) calculations. Complex structure was solvated by TIP3P waters in a truncated octahedral box extending up to 10 Å of solute species. To neutralize the charge of each solvated system, Na^+ ions were added. To reduce the bad steric interactions of water molecules and ions of each system, the system was first minimized by 1,000 steps with atomic positions of solute species restraint (using force constant of 500 kcal/mol $Å^2$). Non-bonded cut-off was set to 8 Å. The threshold value of the energy-gradient foe the convergence was set as 0.001 kcal/mol/ Å. Then, the whole system was optimized by 1,500 steps as the same conditions of water and ions optimization without restraining condition. Thereafter, the systems were gradually warmed up from 0 to 300 K in the first 20 ps followed by maintaining the temperature at 300 K in the last 10 ns with 2 fs time simulation steps in a constant volume boundary. The solute species were restrained to their initial coordinate structures with a weak force constant of 10 kcal/mol $Å^2$ during the temperature warming. This was followed by 70 ps of the position-restrained dynamics simulation with a restrain weight of 2 kcal/mol $Å^2$ at 300 K under an isobaric condition. Finally, 10 ns MD simulations without any restraints were performed using the same conditions. Binding free energy based on the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) and Normal-mode method were analyzed.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Molecular docking calculations

Docking score of Aspergillusidone A-F complexed with PknG derived from Glide XP docking was summarized in Table I. This result indicated that Aspergillusidone A is favorable to bind with PknG with docking score of -9.08 kcal/mol. Aspergillusidone A contained COOH at R_3 position which is different substituent as compared to other Aspergillusidone. This functional might be important for binding ofAspergillusidone A as compared to Aspergillusidone B-F in PknG binding site. To gain more details of binding mode and binding interactions, MD simulations of Aspergillusidone A complexed with PknG were performed.

Aspergillusidone	Docking score (kcal/mol)
A	-9.08
B	-6.35
C	-7.32
D	-6.39
E	-6.51
F	-7.65

Table I: Docking Score of Aspergillusidone A-F Isolated from *Aspergillus unguis* in PknG Binding Pocket

B. Stability of Aspergillusidone A complexed with PknG

This is binary complexed of Aspergillusidone A complexed with PknG. Two solute species including PknG and Aspergillusidone A were considered. To explore the dynamical stability of ligand/enxymecomplexe, root mean square deviations (RMSD) from the starting minimized structure of each solute species were analyzed as plotted in Figure 2. The obtained results showed that ligand/enzyme complexed reach equilibrium within 1 ns. Based on the RMSDs results, the data in terms of binding free energy and binding mode and binding interactions after an equilibrium state were analyzed.

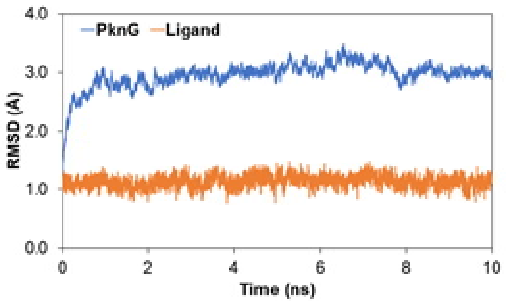


Fig. 2: RMSD of Aspergillusidone A complexed with PknG derived from MD simulations.

C. Binding free energy calculation

The binding free energy of Aspergillusidone A complexed with PknG derived from MM-PBSA and MM-GBSA methods were summarized in Table II. Based on the energy contributions, electrostatic interactions energy was lower than van der Waal interactions indicated that electrostatic interaction was main interaction in PknG binding site of Aspergillusidone A. Binding free energy (ΔG_{bind}) derived from two methods displayed similar results, -14.42 kcal/mol and -17.76 kcal/mol for MM-PBSA and MM-GBSA, respectively.

Contributions	Energy (kcal/mol)
ΔE_{vdW}	-33.35
ΔE_{ele}	-41.94
ΔE_{gas}	-75.29
$\Delta G_{solv(MM\text{-}PBSA)}$	44.75
$\Delta H_{(MM\text{-}PBSA)}$	-30.55
$\Delta G_{solv(MM\text{-}GBSA)}$	41.41
$\Delta H_{(MM\text{-}GBSA)}$	-33.88
$T\Delta S$	-16.13
$\Delta G_{bind(MM\text{-}PBSA)}$	-14.42
$\Delta G_{bind(MM\text{-}GBSA)}$	-17.76

Table II: Binding free energies of Aspergillusidone A in PknG binding pocket derived from MM-PBSA and MM-GBSA approaches

D. Binding interactions

The binding mode and binding interactions of Aspergillusidone A complexed with PknG were analyzed as shown in Figure 3. Based on interactions analysis, we found that hydrogen bond interactions between Aspergillusidone A and amino acid residues surrounding their binding site are crucial interactions. An oxygen at R_2 position bound with NH backbone of Val235. This hydrogen bonding showed highest hydrogen bond occupation with 95 %. This result was confirmed by the large interaction energy (Figure 4) of Val235 derived from MM-GBSA approach. At the same substituent, hydrogen atom act as hydrogen bond donor to from hydrogen bond interactions with an oxygen carbonyl of Glu233. At an oxygen carbonyl of Aspergillusidone A, 64 % hydrogen bond occupation was displayed to bind with NH_3^+sidechain of Lys181 and the large interaction energy was reported as shown in Figure 3 and 4. COOH of Aspergillusidone A act s hydrogen bond acceptors to form hydrogen bond interactions with Arg242 with hydrogen bond occupations of 28%. In addition, hydrophobic interactions were important for binding of Aspergillusidone A in PknG binding site. These results were displayed from the binding interaction energy in Figure 4. Binding interactions energy of Val179 and Ile292 were obtained. Side chains of these residues bound with methyl groups of Aspergillusidone A.

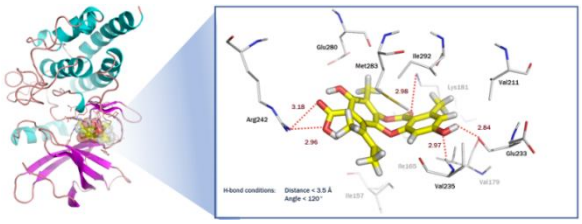


Fig. 3: Binding mode of Aspergillusidone A complexed with PknG derived from MD simulations.

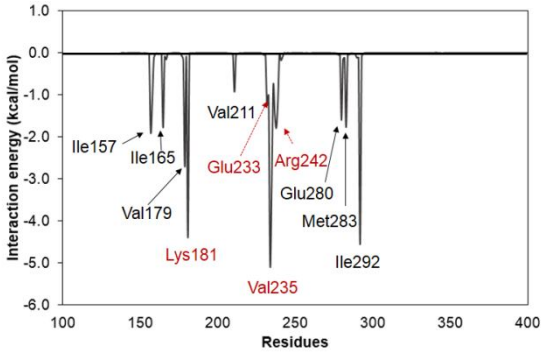


Fig. 4: RMSD of Aspergillusidone A complexed with PknG derived from MD simulations.

CONCLUSION

Molecular docking and MD simulations were successfully applied on Aspergillusidone A-F in *M. tuberculosis*PknG binding site. Aspergillusidone A was found as the most favorable to bind in PknG binding site. Hydrogen bond interactions with Lys181, Glu233, Val235 and Arg242 were founds as the crucial interactions for binding. In addition, hydrophobic interactions of Val179 and Ile292 residues were shown as the crucial interactions to improve binding interaction energy in PknG binding pocket. These results aid to help biomedical science for biological evaluation and identify this compound as new anti-tuberculosis agents.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Thailand Research Fund (RSA5980057 and MRG5980152), the National Research Council of Thailand, Higher Education Research Promotion and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCHCIC). P. Pungpo would like to thank the center of Excellent in Biomedical Science and Engineering, UbonRatchathani University, UbonRatchathani, Thailand. The Faculty of Science, UbonRatchathani University, Kasetsart University, Shanghai Institute of

Materia Medica(SIMM) and NECTEC are gratefully acknowledged for supporting this research.

REFERENCES

[1] R. Székely, F. Wáczek, I. Szabadkai, G. Németh, B. Hegymegi-Barakonyi, D. Eros, B. Szokol, J. Pató, D. Hafenbradl, J. Satchell, B. Saint-Joanis, S.T. Cole, L. Orfi, B.M. Klebl, G. Kéri, "A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signaling," Immunol. Lett., vol. 116, no. 2, pp. 225-231, 2008.

[2] N. Scherr, S. Honnappa, G. Kunz, P. Mueller, R. Jayachandran, F. Winkler, J. Pieters, M.O. Steinmetz, "Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 104, no. 29, pp. 12151-12156, 2007.

[3] A. Narayan, P. Sachdeva, K. Sharma, A.K. Saini, A.K. Tyagi, Y. Singh, "Serine threonine protein kinases of mycobacterial genus: phylogeny to function," Physiol. Genomics., vol. 29, no.1, pp. 66-75, 2007.

[4] M.N. Lisa, M. Gil, G. André-Leroux, N. Barilone, R. Durán, R.M. Biondi, P.M. Alzari, "Molecular basis of the activity and the regulation of the eukaryotic-like S/T protein kinase PknG from *Mycobacterium tuberculosis*," Structure, vol. 23, no. 6, pp. 1039-1048, 2015.

[5] D. Chen, S. Ma, L. He, P. Yuan, Z. She, Y. Lu, "Sclerotiorin inhibits protein kinase G from *Mycobacterium tuberculosis* and impairs mycobacterial growth in macrophages," Tuberculosis (Edinb)., vol. 103, pp. 37-43, 2017.

[6] S. Chen, L. He, D. Chen, R. Cai, Y. Long, Y. Lu, Z. She, "Talaramide A, an unusual alkaloid from the mangrove endophytic fungus *Talaromycessp.* (HZ-YX1) as an inhibitor of mycobacterial PknG," New J. Chem., vol.41, pp. 4273-4276, 2017.

[7] S. Sureram, S.P. Senadeera, P. Hongmanee, C. Mahidol, S. Ruchirawat, P. Kittakoop, "Antimycobacterial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from Tiliacoratriandra against multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*," Bioorg. Med. Chem. Lett., vol. 22, no. 8, pp. 2902-2905, 2012.

[8] D.U. Ganihigama, S. Sureram, S. Sangher, P. Hongmanee, T. Aree, C. Mahidol, S. Ruchirawat, P. Kittakoop, "Antimycobacterial activity of natural products and synthetic agents: pyrrolodiquinolines and vermelhotin as anti-tubercular leads against clinical multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*," Eur. J. Med. Chem., vol. 89, pp. 1-12, 2015.

[9] S. Sureram, S. Wiyakrutta, N. Ngamrojanavanich, C. Mahidol, S. Ruchirawat, P. Kittakoop, "Depsidones, aromatase inhibitors and radical scavenging agents from the marine-derived fungus *Aspergillus unguis* CRI282-03," Planta. Med. vol. 78, no. 6, pp. 582-588, 2012.

[10] R.W. Brueggemeier, J.C. Hackett, E.S. Diaz-Cruz, "Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer," Endocr. Rev., vol. 26, no. 3, pp. 331-345, 2005.

[11] F. Tomao, G. Spinelli, P. Vici, G. C. Pisanelli, G. Cascialli, L. Frati, P. B. Panici and S. Tomao, "Current role and safety profile of aromatase inhibitors in early breast cancer," Expert Rev. Anti-Infect. Ther., vol. 11, pp. 1253–1263, 2014.

[12] S. Sureram, C. Kesornpun, C. Mahidol, S. Ruchirawat, P. Kittakoop, "Directed biosynthesis through biohalogenation of secondary metabolites of the marine-derived fungus *Aspergillus unguis*," RSC Adv., vol. 3, pp. 1781-1788, 2013.

★★★

PACCON 2019
Pure and Applied Chemistry International Conference
TOGETHER FOR THE BENEFIT OF MANKIND
February 7 - 8, 2019 | BITEC, Bangkok, Thailand

Molecular docking calculations of novel pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives InhA inhibitors as anti-tuberculosis agents

Issaraporn Saenglum[1], Paptawan Tongdee[1], Naruedon Phusi[1], Chayanin Hanwarinroj[1], Thimpika Pornprom[1], Sornsawan Batthong[1], Kampanart Chayajarus[1], Kanchiyaphat Ariyachaokun[2], Pharit Kamsri[3], Auradee Punkvang[3], Patchreenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Khomson Suttisintong[5], Prasat Kittakoop[6], James Spencer[7], Adrian Mulholland[8] and Pornpan Pungpo[1]*

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*

[2]*Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*

[3]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand*

[4]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*

[5]*National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*

[6]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*

[7]*School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom*

[8]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, United Kingdom*

**E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com*

Abstract:

Mycobacterium tuberculosis remains to be the major cause for tuberculosis. Enzyme Enoyl-ACP reductase (InhA) of *Mycobacterium tuberculosis* is an enzyme which is important for the growth of bacteria. This work used molecular docking calculations to study the binding mode and the crucial interactions of novel pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives in InhA binding site. The obtained results show hydrogen bond interactions with Tyr 158 and cofactor NAD^+ of compound 25 Cation-Pi interactions between aromatic ring of compound 3 with hydrogen atom of Lys165 were obtained. In addition, sigma-Pi interaction between aromatics ring of compound 3 and hydrogen atom of Met161 are important for binding in the active site of InhA. Moreover, hydrophobic interaction between compound 1, compound 3 and compound 25 and Ala157, Ile202 Val203 and Leu218 residues were found. This information on the structure interaction between enzyme inhibitors and enzymes is important in the design and development of new drugs as anti-tuberculosis agents.

1. Introduction

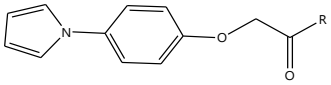
Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) is the causative agent of human *tuberculosis* (TB) and remains a major public menace[1]. The World Health Organization (WHO) estimated that there are 10.4 million new cases of TB and 1.4 million TB deaths annually[2]. Among the infected individuals 8.7 million develop active TB and nearly 1.4 million people die from the disease annually. The pandemic of AIDS has had a major impact on the worldwide TB problem. On one hand, HIV infection is the most potent risk factor for converting latent TB into the active, transmissible form, thus fueling the spread of TB; on the other hand, TB bacteria can accelerate the progress of AIDS infection[3]. The enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) is a key enzyme of the type II fatty acid synthesis (FAS) system [4]. InhA

is an enzyme which is important for the growth of bacteria *Mycobacterium tuberculosis*[4]. In previous research study pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives were developed and tested for inhibition of the biological activity showing anti-*Mycobacterium tuberculosis* and InhA inhibition activity. So, this work study molecular docking calculations to investigate the structural requirements and crucial binding interactions between pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives substances in binding site of InhA[5, 6, 7]. For development used as a prototype to study benzimidazole derivatives for use in the design of InhA inhibitors as anti-tuberculosis agents**.**

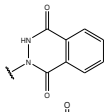
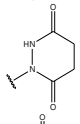
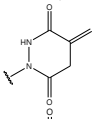
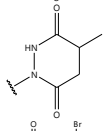
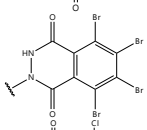
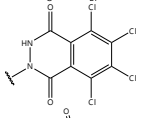
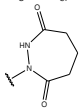
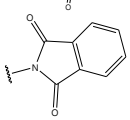
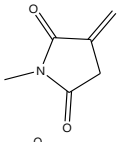
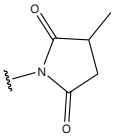
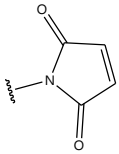
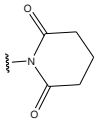
2. Materials and Methods

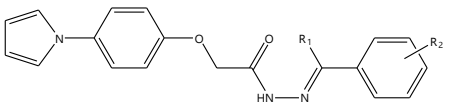
Structures and biological activities of pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives and InhA inhibitors against *M. tuberculosis* were taken from literatures[5, 6, 7] as shown in **Table 1**. The biological activities of these compounds are %Inhibition of InhA at 50 μM of biological data. The X-ray structure of InhA enzyme complexed with diphenyl ether was taken from Protein Data Bank (PDB code: 2X23). Chemical structures of these inhibitors were constructed using the standard tools available in GaussView 5.0.8 program and were then fully optimized using the ab initio (M062X/6-31G*) method implemented in Gaussian program. Molecular docking calculations were applied to obtain the binding mode of pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives using Autodock 4.2 program. The binding mode and binding interactions belong the InhA binding site.

Table 1. Structures and biological activities of InhA derivatives[5, 6, 7].

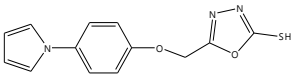


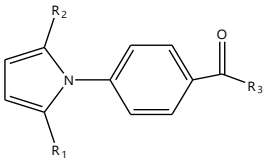
General structure of pyrrolyl benzohydrazide

Com.	R	%Inhibition of InhA at 50 μM
1		63
2		32
3		50
4		42
5		11
6		12
7		18
8		25
9		21
10		10
11		10
12		20

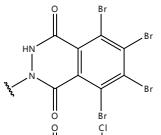
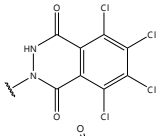
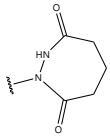
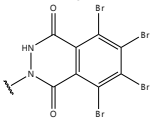
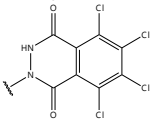
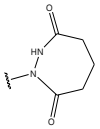


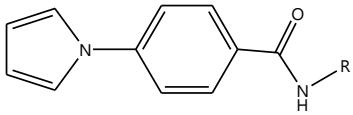
Com.	R1	R2	%Inhibition of InhA at 50 μM
13	H	4-OCH_3	21

14	H	2,4-OCH_3	37
15	H	3-Phenoxy	15
16	H	Indole-3-carboxaldehyde	19
17	CH_3	H	34
18	CH_3	4-Br	27
19	CH_3	4-NO_2	51
20			57



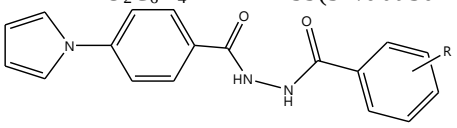
General structure of pyrrolyl benzohydrazide

Com.	R1,R2	R3	%Inhibition of InhA at 50 µM
21	H		72 (IC_{50}= 34.8± 2.1μM)
22	H		64
23	H		27
24	CH_3		75 (IC_{50}= 12.6± 2.8μM)
25	CH_3		76 (IC_{50}= 31.1± 2.4μM)
26	CH_3		13



General structure of benzamide derivative

Com.	R	%Inhibition of InhA at 50 µM
27	4-ClC_6H_4	99(29% at 50 nM)
28	3-FC_6H_4	99(27% at 50 nM)
29	2,3-ClC_6H_3	99(37% at 50 nM)
30	2-$NH_2C_6H_4$	99(31% at 50 nM)
31	2-$NO_2C_6H_4$	99(31% at 50 nM)



General structure of pyrrolyl benzohydrazide

Com.	R	%Inhibition of InhA at 50 µM
32	H	13
33	4-Br	38
34	4-NO_2	22
35	4-Cl	36
36	4-F	35
37	4-OH	29
38	4-OCH_3	13
39	3- OCH_3	31
40	3- CH_3	29
41	2- CH_3	12

3. Results & Discussion

3.1 Molecular docking analysis of compound 1 of pyrrolyl benzohydrazide derivative

Compound **1** come from biological activities were selected to analyze the crucial interactions pyrrolyl benzohydrazide derivative in InhA binding site. The obtained results is shown **Figure 1**. Hydrophobic interaction between hydrogen atoms of ligand with hydrogen atom of Pro156 and Leu218 residues were founded. Moreover, hydrogen bond interaction between hydrogen atoms of ligand with oxygen atoms of Ala157 Tyr158 and Pro193 residue was found.

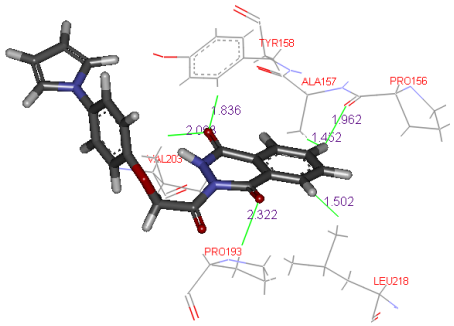


Figure 1 binding interactions of compound 1.

3.2 Molecular docking analysis of compound 3 of pyrrolyl benzohydrazide derivative

Compound **3**, pyrrolyl benzohydrazide derivative in InhA binding site. The obtained results show that compound **3** formed Cation-Pi interactions between aromatic ring of compound **3** and hydrogen atom of Lys165 residue and sigma-Pi interaction between aromatics ring of ligand and nitrogen atom of Met161 residue (**Figure 2**). For hydrophobic interaction were found between hydrogen atoms of ligand and hydrogen atom of Ala157 Tyr158 and Val203 residues. In addition, hydrogen bond interaction between hydrogen atom of ligand with oxygen atoms of Met155 Tyr158 and Val203 residue was found.

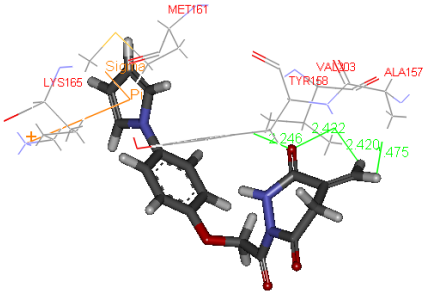


Figure 2 binding interactions of compound 3.

3.3 Molecular docking analysis of compound 22 of pyrrolyl benzohydrazide derivative

Compound **22** of pyrrolyl benzamide derivative have interactions in InhA binding site. For Compound **22** differ with Compound **25** at R1 and R2. The obtained results show that compound **22** formed Pi-Pi interactions between aromatic ring of compound **22** and aromatic ring of Phe149 Pi-Pi residue (**Figure 3**). Moreover, hydrophobic interaction between hydrogen atoms of ligand with hydrogen atom of Ile215 residue was found. Moreover, hydrogen bond interaction between hydrogen atom of ligand with oxygen atoms of Phe97 Met98 Met103 Tyr158 Met161 Ala198 and Ile202 residues were found.

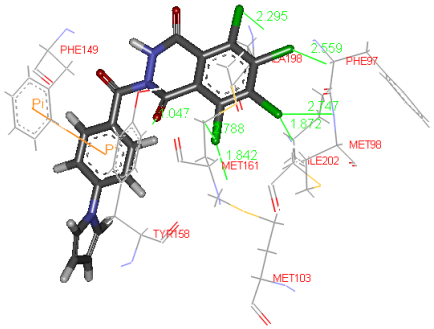


Figure 3. binding interactions of compound **22**.

3.4 Molecular docking analysis of compound 25, the highest active compound of pyrrolyl benzohydrazide derivative

Compound **25**, the highest active compound in pyrrolyl benzohydrazide derivative come from biological activities were selected to analyze the crucial interactions of pyrrolyl benzohydrazide derivative in InhA binding site. The obtained results show that compound **25** formed hydrogen bond interaction between hydroxyl groups of ligand with oxygen atom of nicotinamide ribose cofactor (NAD^+). In addition, Pi-Pi interactions between aromatic ring of compound **25** with aromatic ring of Tyr 158 residue (**Figure 4**). Moreover, hydrophobic interaction between hydrogen atoms of ligand with hydrogen atom of Ala158 Tyr158 Phe149 Val203 and Leu218 residues were found. Moreover, hydrogen bond interaction between hydrogen atom of ligand with oxygen atoms of Phe97 Met98 Met103 and Ile202 residues were found.

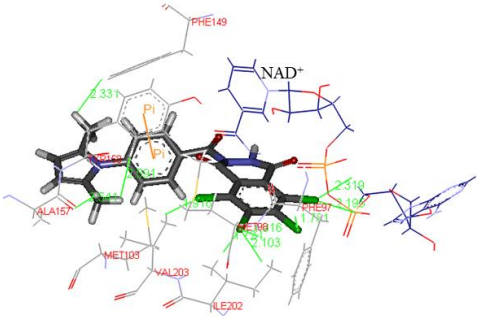


Figure 4. binding interactions of compound 25.

3.5 Molecular docking analysis of compound 28 of pyrrolyl benzamide derivative

Compound 28 of pyrrolyl benzamide derivative have interactions in InhA binding site. The results show that compound 28 formed Pi-cation interactions between aromatic ring and nitrogen atom of Lys165 residue (**Figure 5**). Pi-Pi interactions between aromatic ring and aromatic ring of Tyr158 residue. The hydrophobic interaction between hydrogen atoms of ligand with hydrogen atom of Phe149 and Val203 residue were found. Moreover, hydrogen bond interaction between fluorine atoms of ligand with hydrogen atoms of Leu215 and Leu218 residues were found.

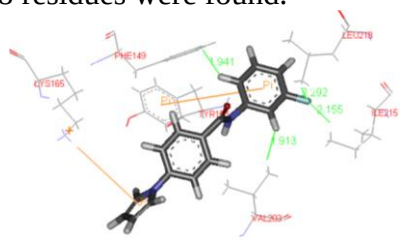


Figure 5. binding interactions of compound 28.

3.6 Molecular docking analysis of compound 29 of pyrrolyl benzamide derivative

Compound **29** of pyrrolyl benzamide derivative have interactions in InhA binding site. The results formed Pi-Pi interactions between aromatic ring with aromatic ring of Tyr149 residue (**Figure 6**). The halogen interaction between chlorine atoms of ligand with hydrogen atom of Met161 residue was found.

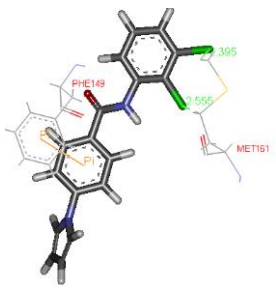


Figure 6. binding interactions of compound 29.

Rational design based on the study of molecular docking calculations when analyzing the conformation and interactions in the binding pocket of InhA for to higher activity. Compound **25** is highest was selected as template molecule design novel pyrrolyl benzohydrazide derivative. The substituent R1 and R2 should be large for to achieve hydrogen bond interaction and amino acid around even better. The substituent R1 should be a groups of hydrogen donor and have a small electron density to form hydrogen bond with carbonyl group of amino acids Ala157. The substituent R3 should be small, such as H, F, Br and Cl for to hydrogen bond, hydrophobic and halogen interactions with the phosphate of NADH and amino acids around.

In Compound **29** of pyrrolyl benzamide derivative has %Inhibition of InhA higher than compound 27, 28, 30, and 31. The substituent should be F, Br and Cl for to halogen interaction and amino acids around.

4. Conclusion

Molecular docking calculations investigate crucial interactions of pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives. Molecular docking calculations to get more understanding of the binding mode and the crucial derivatives in the InhA binding pocket. The results show the hydrogen bond interactions were found as the crucial interactions for binding. In addition, the hydrophobic interaction, Pi-Pi interaction, Cation-Pi interaction and Sigma-Pi interaction of ligands with amino acid in InhA binding pocket were observed. This information will lead to design to increase the efficiency of the substance of benzimidazole derivatives in InhA inhibitors as anti-tuberculosis agents.

Acknowledgements

This research was supported by TRF Research Career Development Grant (RSA) and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC). Thailand Graduate Institute of Science (TGIST) (SCA-CO-2561-6957TH) is gratefully acknowledged. Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, The Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, NANOTEC and NECTEC are gratefully acknowledged for supporting this research.

References

1. Yuji, K. S., A., Computational Medicinal Chemistry for Rational Drug Design: Identification of Novel Chemical Structures with Potential Anti-Tuberculosis Activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2014,** *14*, 176-188.
2. Report, W., Global Tuberculosis Control. **2018**.
3. Xin, H. A., A.; Robert, S.; Paul , R. O.M., Pyrrolidine Carboxamides as a Novel Class of Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase from Mycobacterium tuberculosis. *J of Medicinal Chemistry* **2006,** *49*, 6308-6323.
4. Richard, J. H. C., O. R., Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials. *NIH Public Access Author Manuscript* **2004,** *5*, 146-153.
5. Joshi, S. D.; More, U. A.; Dixit, S. R.; Balmi, S. V.; Kulkarni, B. G.; Ullagaddi, G.; Lherbet, C.; Aminabhavi, T. M., Chemical synthesis and in silico molecular modeling of novel pyrrolyl benzohydrazide derivatives: Their biological evaluation against enoyl ACP reductase (InhA) and Mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic chemistry* **2017,** *75*, 181-200;
6. Joshi, S. D.; Dixit, S. R.; Kulkarni, V. H.; Lherbet, C.; Nadagouda, M. N.; Aminabhavi, T. M., Synthesis, biological evaluation and in silico molecular modeling of pyrrolyl benzohydrazide derivatives as enoyl ACP reductase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* **2017,** *126*, 286-297;
7. Joshi, S. D.; Dixit, S. R.; Basha, J.; Kulkarni, V. H.; Aminabhavi, T. M.; Nadagouda, M. N.; Lherbet, C., Pharmacophore mapping, molecular docking, chemical synthesis of some novel pyrrolyl benzamide derivatives and evaluation of their inhibitory activity against enoyl-ACP reductase (InhA) and Mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic chemistry* **2018,** *81*, 440-453.

PACCON 2019
Pure and Applied Chemistry International Conference
TOGETHER FOR THE BENEFIT OF MANKIND
February 7 - 8, 2019 | BITEC, Bangkok, Thailand

Interaction and structural requirement of 4-thiazolidinone (rhodanine) inhibitors as potential anti-tuberculosis agents: MD simulations

Thimpika Pornprom[1] , Bandit Khamsri[1], Bongkochawan Pakamwong[1], PaptawanThongdee[1], Issaraporn Saenglam[1], Naruedon Phusi[1], Chayanin Hanwarinroj[1], Sornsawan Batthong[1], Kampanart Chayajarus[1], Kanchiyaphat Ariyachaokun[2], Pharit Kamsri[3], Auradee Punkvang[3], Patchreenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Khomson Suttisintong[5], Prasat Kittakoop[6], James Spencer[7], Adrian Mulholland[8], Pornpan Pungpo[1,*]

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*

[2]*Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*

[3]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand*

[4]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*

[5]*National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*

[6]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*

[7]*School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom*

[8]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, United Kingdom*

**E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com*

Abstract:

Mycobacterial enoyl-ACP-reductase (InhA) is an enzyme contributing in mycolic acids biosynthesis has been established as promising target of anti-tuberculosis drugs. In this study, 4-thiazolidinone (rhodanine) inhibitors were selected to study crucial interaction using molecular modelling techniques by molecular dynamics simulations. Molecular docking calculations were used to elucidate the key interactions for binding of these inhibitors in InhA binding pocket. The obtained results showed that hydrogen bond interaction between hydrogen atom of carboxylic group with Ser123 and electrostatic interactions with Phe97, Met98, and NAD^+ cofactor were found. Molecular dynamics simulations were performed to elucidate the binding interaction and binding free energy of 4-thiazolidinone (rhodanine) inhibitors. Hydrogen bond interactions were found as the crucial interactions for binding in the InhA binding site. Binding free energy calculations based on MM-PBSA method corresponded well to the experimental value. The integrated result obtained from this study aid to better understand on the structural basis of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives for rational design more potent InhA inhibitors as potential anti-tuberculosis agents.

1. Introduction

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), remains a major global health problem. In 2017, there were an estimated 10.4 million new TB patients worldwide, and the high mortality rate of TB is caused by its HIV co-infection as well as strong drug resistance of *M. tuberculosis*[1]. Drugs such as isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol are currently used for the treatment of TB, although there are many *M. tuberculosis* having resistance to these drugs. In addition, multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB), extensive drug-resistance TB (XDR-TB), and co-infection between *M. tuberculosis* and HIV (TB/HIV) are major problems in the treatment of TB[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]. Isoniazid (INH), a frontline drug for over 640 years used in the treatment of TB. As a prodrug, INH must be first activated by KatG, a catalase-peroxidase that oxidizes INH to an acyl-radical, which binds covalently to NADH, the co-substrate for InhA. The INH-NAD adduct functions as a potent inhibitor of InhA[3]. INH drug resistant tuberculosis is caused by KatG mutation. Hence, there is an urgent need to discover and develop new anti-TB agents that target novel biochemical pathways and to treat drug-resistant forms of the disease. 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives were developed as new potent anti-tuberculosis agents based on direct InhA inhibitors[4]. Recently, molecular docking has been performed to study the binding of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives onto the active site of InhA in an attempt to address the mycobacterial resistance against the drug. The integrated results should aid in the rational design of InhA inhibitors with high potential anti-tubercular activity.maximum length of full paper must not exceed six A4 pages.

2. Materials and Methods

Two chemical structures and their experimental biological activities of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives were selected from the literature as presented in **Figure 1**[4]. The biological activities of these compounds were expressed in terms of *M. tuberculosis* InhA IC_{50} in µM values. All chemical structures of these inhibitors were constructed using the standard tools available in GaussView 3.07 program and were then fully optimized using the M062X/6-31G* method implemented in Gaussian09 program. Molecular docking calculations using Autodock4.2 program was performed to predict potent inhibitors in the InhA binding pocket (PDB Code: 1P44).

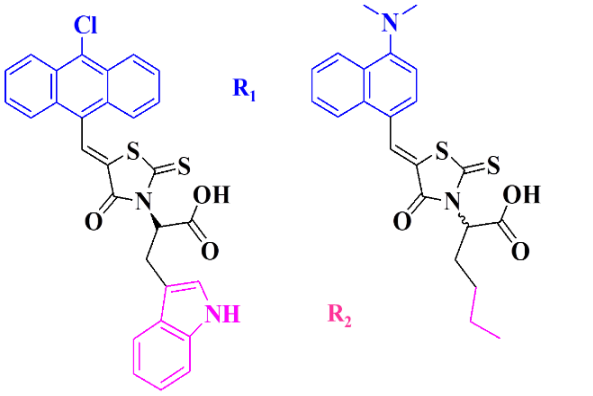


Figure 1. Chemical structures and IC_{50} values of the 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives employed in the present study.

Molecular dynamics simulations were performed to predict inhibitors in the InhA binding pocket. TIP3P water model and Na^+ were chosen to represent water for salvation and ions for neutralize system. To reduce the bad interactions of solvate water molecules and Na^+ ions of each system, the inhibitor-InhA complex was first minimized by 1,000 steps with atomic positions of solute species restraint with using force constant of 500 kcal/mol $Å^2$. Non-bonded cut-off was set to 8 Å. The threshold value of the energy-gradient foe the convergence was set as 0.001 kcal/mol/ Å. Then, the whole system was minimized by 1,500 steps as the same conditions of water and ions minimization without restraining condition. Next, the systems were gradually warmed up from 0 to 300 K in the first 20 ps followed by maintaining the temperature at 300 K in the last 10 ps with 2 fs time simulation steps in a constant volume boundary. The solute species were restrained to their initial

coordinate structures with a weak force constant of 10 kcal/mol $Å^2$ during the temperature warming. This was followed by 70 ps of the position-restrained dynamics simulations with a restrain weight of 2 kcal/mol $Å^2$ at 300 K under an isobaric condition. Finally, 30 ns molecular dynamics simulations without any restraints were performed using the same conditions. The root-mean square deviations (RMSDs) of the InhA enzyme and the inhibitors, binding interactions were analyzed based on the equilibrium state obtained. The binding energies were calculated to evaluate the binding affinities of inhibitors in InhA binding pocket using the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MM-PBSA)[5-8] and Normal-mode[9] methods. The single snapshot that showed the calculated binding energy closed to experimental binding energy was selected to analyze the binding mode and binding interactions.

3. Results & Discussion

3.1 Structural stability during MD simulations and binding energy calculations

To reveal the structural stability of simulation system, the RMSD values for the position of all solute species were separately analyzed. The RMSD plots for the four simulation systems over 30 ns are shown in **Figure 2**. Convergent RMSD plots indicated that the equilibrium state was reached for each system during this simulation period. As shown, the RMSDs for compound **1** and compound **2** in InhA converged after approximately 10 ns. To gain quantitative insights into the affinity for binding of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives in the InhA binding site, the binding energies of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives/InhA complexes were calculated by the MM-PBSA method, reported in **Table 1**. It is notable that the calculated binding energies of inhibitors are correct order as compared with the IC_{50} values. The obtain results could be successfully used to validate the MD procedure in this study. Therefore, we concluded that MD simulations reliably model binding modes of compounds **1** and **2** in the InhA pocket.

3.2 Binding mode and binding interactions of compounds

The crucial interactions of compound **1**, the highest active compound, with amino acids surrounding the binding pocket of InhA enzyme was analyzed, shown in **Figure 3** (a). The major interactions in the InhA binding pocket are hydrogen bond interactions as following details: (a) strong hydrogen bond interactions between hydrogen atom of carboxylic group of compound **1** with backbone of Ser123 (1.857 Å) can be observed. Electrostatic interactions between oxygen atom of hydroxyl (-OH) and carboxyl (C=O) in carboxylic with Phe97 and NAD^+ cofactor were observed, respectively. Moreover, the hydrogen atom of 1*H*-indole group of R_2 substituent has electrostatic interaction with backbone of Met98 residue in InhA binding pocket can be found. In contrast, for compounds **2** showing lowest active compound, important interactions of the inhibitors were significantly reduced.

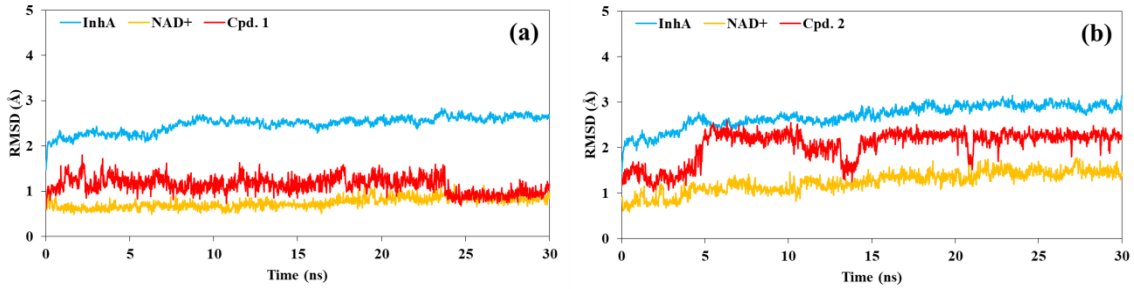


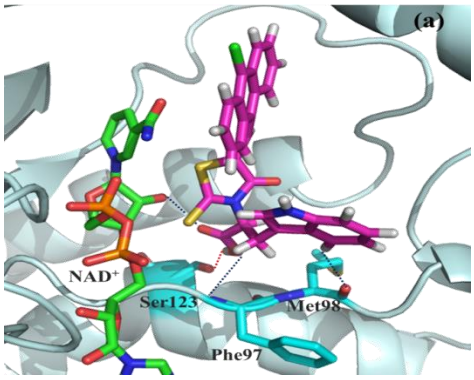
Figure 2. RMSD plots of (a) compound **1** and (b) compound **2** complexed with InhA.

Table 1. The calculated binding energies (kcal/mol) of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives calculated by MM-PBSA method.

Cpd.	Total energies				IC_{50}
	Complex	Receptor	Ligand	Binding energy	(μM)
1	-23255.73	-23182.42	-25.43	-47.87	2.9
2	-23229.38	-23124.44	-61.81	-43.12	24.4

As compared to compound **1**, strong hydrogen bond interaction between hydrogen atom of carboxylic group of compound **2** with backbone of Ala157 (2.075 Å) were found. Hydrogen atom of propane in R_2 substituent has electrostatic interaction with Met103 residue in InhA binding pocket can be found as shown in **Figure 3** (b).Based on the study of the interaction that occurs, compound 1 has hydrogen bond interaction distant shorter compound **2** this show stronger bond. The hydrogen bond interactions were found as the crucial interaction for binding in the InhA binding site and R_2 substituent has electrostatic interaction better compound 2 as shown in **Figure 3** for explain, so can predict interactions of inhibitors in InhA binding site.As compared the hydrogen bond interaction and electrostatic interaction of inhibitors in InhA binding site, it can be seen that these interactions in compound **1** are higher than compound **2**.

Therefore, this fragment is crucial for favorable IC_{50} values. In the carboxylic group of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives have hydrogen bond interactions between hydrogen atom of hydroxyl (-OH) part in carboxylic group with backbone of Ser123 and electrostatic interactions between hydrogen atom of carboxyl (C=O) with NAD^+ cofactor. Moreover, the R_2 substituent of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives have electrostatic interactions with Met98 and Met103 in InhA binding pocket.



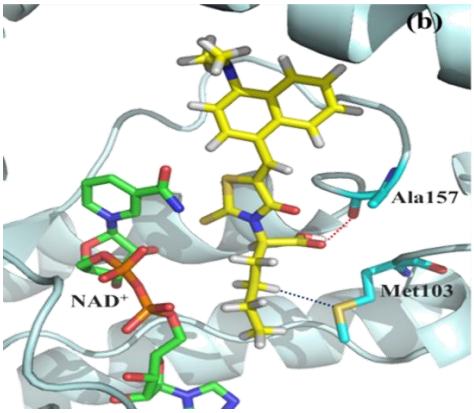


Figure 3. The binding mode of (a) compound **1** and (b) compound **2** in the InhA binding pocket. Red and blue lines indicate hydrogen bonding and electrostatic interactions, respectively.

4. Conclusion

Molecular dynamics simulations was successfully applied to investigate the key structural for binding of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives in the binding site of InhA. Hydrogen bond and hydrophobic interactions are crucial interactions for binding of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives in InhA binding site derived from molecular docking calculations. The information derived from this study guided to design new and more potent InhA inhibitors against *M. tuberculosis*.

Acknowledgements

This research was supported by his research was supported by the Health Systems Research Institute (HSRI.60.083 and the Thailand research fund (MRG6180147). The Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the financial support from Young Scientist and Technologist Programme (YSTP), National Science and Technology Development Agency (SCA-CO-2561-7260-TH) to Thimpika Pornprom is gratefully acknowledged. Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Faculty of Science, Kasetsart University, University of Bristol and NECTEC are gratefully acknowledged for supporting this research.

References

1. Organization, W. H, Global Tuberculosis eport, **2017**. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/(accessed October 26, 2018).
2. Punkvang, A.; Saparpakorn, P.; Hannongbua, S.; Wolschann, P.; Pungpo, P. 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.
3. Joshi, S.D.; More, U.A.; Koli, D.; Kulkarni, M.S.; Nadagouda, M.N.; Aminabhavi, T.M. Synthesis, evaluation and in silico molecular modeling of pyrroyl-1,3,4-thiadiazole inhibitors of InhA. *Bioorg. Chem*. **2015**, l59, 151-167.
4. Slepikas, L.; Chiriano, G.; Perozzo, R.; Tardy, S.; Kranjc, A.; Patthey-Vuadens, O.; Ouertatani-Sakouhi, H.; Kicka, S.; Harrison, C.F.; Scrignari, T.; Perron, K.; Hilbi, H.; Soldati, T.; Cosson, P.; Tarasevicius, E.; Scapozza, L. In Silico Driven Design and Synthesis of Rhodanine Derivatives as Novel Antibacterials Targeting the Enoyl Reductase InhA. *J. Med. Chem*. **2016**, 59, 10917-10928.
5. Homeyer, N.; Gohlke, H. Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area Method. *Mol. Inform.* **2012**, *31*, 114-122.
6. Hou, T.; Wang, J.; Li, Y.; Wang, W. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 69-82.
7. Junmei, W.; Tingjun, Hou.; Xiaojie, X. Recent Advances in Free Energy

Calculations with a Combination of Molecular Mechanics and Continuum Models. *Current Computer-Aided Drug Design*. **2006**, *2*, 287-306.

8. Junmei, W.; Paul, M.; Wei W.; Peter, A. K. Use of MM-PBSA in Reproducing the Binding Free Energies to Hiv-1 Rt of Tibo Derivatives and Predicting the Binding Mode to HIV-1 RT of Efavirenz by Docking and MM-PBSA. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5221-5230.
9. Martina, K.; Alex, B.; Alexey, L.K,; Joel, M.B. Normal Mode Analysis Using the Driven Molecular Dynamics Method. Ii. An Application to Biological Macromolecules. *J. Chem. Phys*. **2004**, *121*, 5646-5653.

THE CRUCIAL BINDING CHARACTERISTIC OF 4-THIAZOLIDINONE (RHODANINE) DERIVATIVES WITH INHA BASED ON MOLECULAR DOCKING CALCULATIONS

[1]THIMPIKA PORNPROM, [2]BANDIT KHAMSRI, [3]BONGKOCHAWAN PAKAMWONG, [4]PAPTAWAN THONGDEE, [5]ISSARAPORN SAENGLAM,[6]NARUEDON PHUSI,[7]CHAYANIN HANWARINROJ,[8]PHARIT KAMSRI, [9]AURADEE PUNKVANG, [10]PATCHREENART SAPARPAKORN, [11]SUPA HANNONGBUA, [12]KHOMSON SUTTISINTONG, [13]PRASAT KITTAKOOP, [14]JAMES SPENCER,[15]ADRIAN MULHOLLAND, [16]PORNPANPUNGPO

[1,2,3,4,5,6,7,16]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand
[8,9]Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhonphanom University, Nakhonphanom 48000, Thailand
[10,11]Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
[12]National Nanotechnology Center, Nstda, 111 Thailand Science Park, Klongluang, Pathumthani, Thailand
[13]Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand
[14]School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, Bs8 1td, United Kingdom
[15]Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, Bs8 1ts, United Kingdom
Email: [16]pornpan_ubu@yahoo.com

Abstract - Mycobacterium tuberculosis InhA has been identified to be one of the potentially underexploited drug targets in of anti-tuberculosis drug discovery. This research, molecular docking calculations using Autodock4.2 program was used to study the binding mode and binding interactions between 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives and InhA. The obtained results showed that the molecular docking calculation was reliable to predict the binding mode and binding interactions with RMSD of 0.47 angstrom. The crucial interactions of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives in the binding pocket are hydrogen bond interaction between R substituent with Tyr158, Glu219 and NAD^+ cofactor of InhA. Moreover, hydrophobic interactions with Met103, Met165, Ala157, Tyr158 and Met161 leading to increasing of InhA inhibitory activity. Therefore, molecular docking calculations aids to a better understand the structural basis of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives to rational design more potent InhA inhibitors as potential anti-tuberculosis agents.

Keywords - Mycobacterium tuberculosis, InhA, Molecular docking calculations.

I. INTRODUCTION

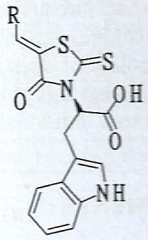
Tuberculosis (TB), caused by Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis), remains a major global health problem. In 2017, there were an estimated 10.4 million new TB patients worldwide, and the high mortality rate of TB is caused by its HIV co-infection as well as strong drug resistance of M. tuberculosis [1]. Drugs such as isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol are currently used for the treatment of TB, although there are manyM. tuberculosis having resistance to these drugs. In addition, multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB), extensive drug-resistance TB (XDR-TB), and co-infection between M. tuberculosis and HIV (TB/HIV) are major problems in the treatment of TB [1]. Antibiotics for TB treatment areclassified into two classes, first-line drugsand second-line drugs. First-line drugs aremainly bactericidal and combine a highdegree of efficacy with a relatively lowtoxicity to the patient during treatment.These drugs include isoniazid, rifampicin,streptomycin, ethambutol, pyrazinamide,and fluoroquinolones. Second-line drugsare mainly bacteriostatic, which havea lower efficacy and are usually more toxic.These drugs include para-aminosalicylicacid, ethionamide, and cycloserine [2].Isoniazid (INH), a frontline drug for over640 years used in the treatment of TB. As aprodrug, INH must be first activated byKatG, a catalase-peroxidase that oxidizesINH to an acyl-radical, which bindscovalently to NADH, the co-substrate forInhA. The INH-NAD adduct functions as a potent inhibitor of InhA [3].INH drug resistanttuberculosis is caused by KatG mutation. Hence, there is an urgent need to discover and develop new anti-TB agents that target novel biochemical pathways and to treat drug-resistant forms of the disease. 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives were developed as new potent anti-tuberculosis agents based on diractInhA inhibitors [4]. Recently, molecular docking has been performed to study the binding of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives onto the active site of InhA in anattempt to address the mycobacterialresistance against the drug. The integratedresults should aid in the rational design ofInhA inhibitors with high potential anti-tubercular activity.

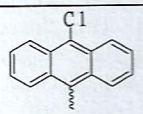
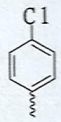
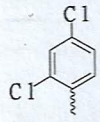
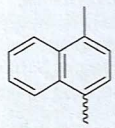
II. DETAILS EXPERIMENTAL

Four chemical structures and their experimental biological activities of 4-thiazolidinone (rhodanine)derivatives were selected from the literature as presented in Table 1[4]. The biological activities of these compounds were expressed in

terms of M. tuberculosisInhAIC_{50} in μM values. All chemical structures of these inhibitors were constructed using the standard tools available in GaussView 3.07 program and were then fully optimized using the M062X/6-31G** method implemented in Gaussian 09 program. Molecular docking calculations using Autodock4.2 program was performed to predict the potent inhibitors in the InhA binding pocket (PDB Code: 1P44).

Table1: Three chemical structures and their M. tuberculosis IC_{50} in μM values of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives.



Cpd.	R	IC_{50} (μM)
1		2.90
2		19.70
3		9.50
4		8.70

III. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Validation of the docking method

Molecular docking calculations using the Autodock4.2 program was employed in this study with the aims to generate the initial structure for binding mode and binding interaction study. The available X-ray crystal structure of InhAcomplexedwith InhA inhibitor (PDB code:1P44) was used as an initial structure of receptor for molecular docking calculations. The numbers of grid points in the x, y, and z dimensions with 36x36x36 $Å^3$ was used to define the 3D grid box size. The center of this box was placed in the crystal structure. The Lamarckian Genetic Algorithm was employed to generate the conformation of the InhA binding pocket. The numbers of GA runs were set to 100 with the default search algorithm parameters. The docking calculation was verified by the RMSD value between the docked and observed X-ray conformations in its pocket. The obtained results show that the molecular docking calculation was reliable to predict the binding mode and binding interactions with RMSD of 0.47 angstrom as shown in Fig. 1.

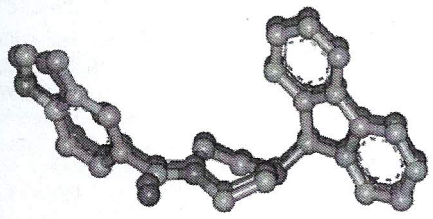


Fig.1. Superimposition of the docked ligand (green) and the X-ray structure of InhA inhibitor (red).

3.2. Molecular docking analysis of highest active compounds

Compound 1 were considered as highest active compound against InhA enzyme with biological activities IC_{50} range of 2.90 μM. Fig. 2 showed the binding orientation obtained from molecular docking calculations of compound 1 as highest active compounds. The docked conformation of compound 1 in InhA binding pocket formed the hydrogen bond interactions were found as the crucial interactions for binding in InhA binding site. 10-chloroanthracene Rsubstituent interacted with Tyr158 and Glu219, hydrogen atom of carboxylic group with NAD^+ cofactor as shown in Fig. 2. Moreover, hydrophobic interactions with Met103, Met165, Ala157, Tyr158 and Met161 were observed. Therefore, the crucial interaction obtained from molecular docking calculations is in agreement with the experimental results that showed the high potency for against InhA inhibitors.

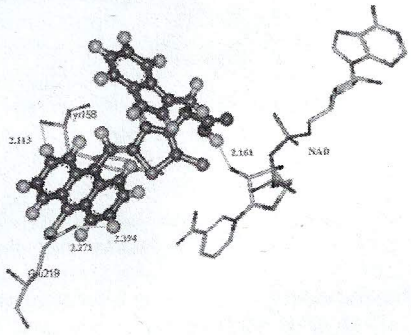


Fig. 2 The highest active compound 1 in InhA binding pocket.

3.3 The effects of R substituent

The interactions of compound 2 (IC_{50} of 19.70 μM), compound 3 (IC_{50} of 9.50 μM) and compound 4 (IC_{50} of 8.70 μM) with of amino acid surrounding the

binding pocket of InhA enzyme were investigated to study the effect of R substituent. 1-chlorobenzene R substituent of compound 2interacted with NAD^+ cofactor via hydrogen bond. Hydrogen interactions of 1,3-dichlorobenzene R substituent of compound 3 at carboxylic group with Pro193 and indole ring with Ala157were found. For compound 4, 1-methylnaphthalene R substituent formed hydrogen interaction with Pro156 and indole ring with NAD^+ cofactor. Additional hydrophilic interactions of 3 compounds with Met103, Ala157, Tyr158 and Met161 can be found were shown in Fig. 3.

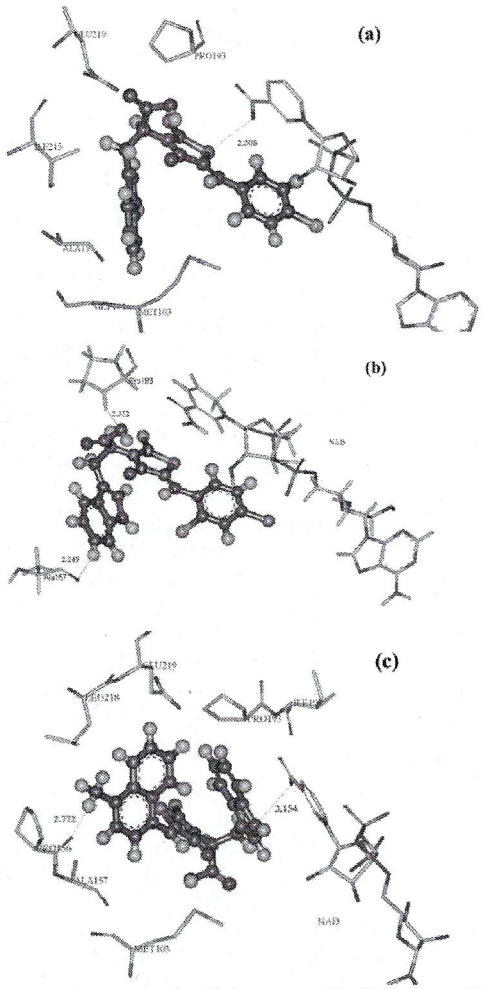


Fig. 3. The binding mode of (a) compound 2, (b) compound 3, and (c) compound 4 in the InhA binding pocket.

3.4 Key binding for improving biological activity

The effect of R position were compared between compound 2, compound 3 and compound 4. The result indicated that compound 3 and compound 4 are more hydrogen bond interactions than compound 2. R position large substituent and polarity were required to improve the biological activity against InhA of toberculosis. Therefore, new design compounds should be contained the substituent that they can interacted with amino acid surrounding InhA binding pocketby structural basis derived from molecular docking calculations.

CONCLUSIONS

Molecular docking calculations was successfully applied to investigate the key structural for binding of 4-thiazolidinone (rhodanine)derivatives in the binding site of InhA. Hydrogen bond and hydrophobic interactions are crucial interactions for binding of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives in InhAbinding site derived from molecular docking calculations. The information derived from this study guided to design new and more potent InhA inhibitors against M. tuberculosis.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported bythe Thailand Research Fund (RSA5980057)and the National Research Council ofThailand. The financial support from Young Scientist and Technologist program (YSTP), National Science and Technology Development Agency (SCA-CO-2561-7260-TH) to ThimpikaPornprom is gratefully acknowledged.Faculty of Science, UbonRatchathani University, Faculty of Science,Kasetsart University and NECTEC aregratefully acknowledged for supporting thisresearch.

REFERENCES

[1] World Health Organization, Global Tuberculosis Report,2017.http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed 26 October).

[2] A. Punkvang, P. Saparpakorn, S. Hannongbua, P. Wolschann, P. 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,vol.15,pp.2791–2813,2010.

[3] S. D. Joshi, U. A. More, D. Koli, M. S. Kulkarni, M. N. Nadagouda, T. M. Aminabhavi, "Synthesis, evaluation and in silico molecular modeling of pyrroyl-1,3,4-thiadiazole inhibitors of InhA" Bioorganic Chemistry,vol59,pp.151–167,2015.

[4] L. Slepikas, G. Chiriano, R. Perozzo, S. Tardy, A. Kranjc, O. Patthey-Vuadens, H. Ouertatani-Sakouhi, S. Kicka, C. F. Harrison,T. Scrignari, K. Perron, H. Hilbi,T. Soldati,P. Cosson,E. Tarasevicius, L. Scapozza, "In Silico Driven Design and Synthesis of Rhodanine Derivatives as Novel Antibacterials Targeting the EnoylReductaseInhA", Journal of Medicinal Chemistry,vol.59,pp.10917-10928,2016.

★★★

การออกแบบสารยับยั้งโดยอาศัยข้อมูลทางโครงสร้างของสารต้านวัณโรคตัวใหม่กับเอนไซม์ Enoyl-ACP Reductase ของสารอนุพันธ์1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy)propan-2-ol

Structure Based Inhibitor Design of Novel Anti-tuberculosis Agents of Enoyl-ACP Reductase Inhibitors in a Series of 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol derivatives

บุญรัตน์ ทารัตน์ [1]นฤดล ภูศรี[1] ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์[1] กัมปนาท ฉายจรัส[1] พฤทธิ์ คำศรี [2]อรดี พันกว้าง[2] ณรงค์พล แก้วจังหวัด[3] ศตวรรษ เดือนสว่าง[3] คมสันต์ สุทธิสินทอง[3] พัชรีนาถ ทรัพย์อากรณ์[4] สุภา หารหนองบัว[4] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[1]*

[1] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[2] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

[3] ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

[4] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

* E-mail : pornpan_ubu@yahoo.com

บทคัดย่อ

เอนไซม์ Enoyl-ACP Reductase (InhA) ของเชื้อไมโครแบคทรีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการพัฒนาสารรักษาวัณโรค ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งมาทำการศึกษาอันตรกิริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นระหว่างสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol กับโพรงเอนไซม์ InhA ที่เกิดขึ้น จากผลการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งแสดงถึงความสามารถในการจำลองรูปแบบการจับตัวกันของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่ให้ค่า RMSD เท่ากับ 0.610 อังสตรอม ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งที่ใช้มีความน่าเชื่อถือในการทำนายตำแหน่งการจัดวางตัวของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ในโพรงเอนไซม์ InhA เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ ได้แก่ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่หมู่แทนที่ตำแหน่ง R กับกรดอะมิโน Pro156, Tyr158 และ Val203 นอกจากนั้นยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Phe97, Met98, Met103 และ Ala198 จากข้อมูลที่ได้จึงนำไปสู่การออกแบบและพัฒนาโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ในอนาคต

คำสำคัญ : สารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol
สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

Abstract

Enoyl-ACP Reductase (InhA) of Mycobacterium tuberculosis is important enzyme for development anti-tuberculosis drugs. In this study molecular docking calculations were applied to elucidate the crucial interaction between 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol derivatives with enzyme InhA binding pocket. The obtained result indicated that the molecular docking calculations was reliable to predict the binding mode and binding interactions with RMSD of 0.61 angstrom. The crucial interactions of 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol derivatives in enzyme InhA binding pocket is hydrogen bond interaction at R position of ligand with Pro156, Tyr158 and Val203. Moreover, the hydrophobic interaction between InhA inhibitors with Phe97, Met98, Met103 and Ala198 was

founded. The obtained result could be help for rational design with more potent InhA inhibitors as potential anti-tuberculosis agents.

Keywords : 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol Derivatives, InhA inhibitors and Molecular Docking calculations

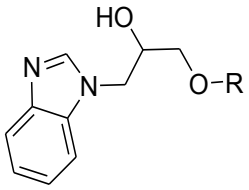
บทนำ

โรควัณโรคเป็นโรคติดต่อที่มีสาเหตุหลักจากเชื้อแบคทีเรียไมโครแบคทรีเรียม ทูเบอร์คูโลซิสและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนทั่วโลก จากสถิติในปี 2016 ขององค์การอนามัยโลก พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 2 ล้านคนต่อปีและมีผู้ป่วยเสียชีวิตปีละประมาณ 1.8 ล้านคน สำหรับสถานการณ์ในประเทศไทยนั้นองค์การอนามัยโลกจัดอันดับให้ไทยติดอันดับที่ 18 ในกลุ่ม 22 ประเทศทั่วโลกที่ยังไม่สามารถควบคุมวัณโรคได้ [http://www.who.int, 2017] ในปัจจุบันมียาที่ใช้ในการรักษาอยู่หลายชนิดแต่เนื่องจากปัญหาการดื้อยาทำให้ผู้ป่วยวัณโรคไม่ตอบสนองต่อตัวยาหลักที่ใช้รักษาในปัจจุบัน อีกทั้งยังมีการแพร่ระบาดของโรควัณโรคในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์อย่างรวดเร็ว ซึ่งทำให้ไม่สามารถทำการรักษาวัณโรคในผู้ป่วยกลุ่มนี้ด้วยวิธีมาตรฐานได้อีกต่อไป ดังนั้นแล้วจึงต้องมีการพัฒนาตัวยาใหม่อย่างเร่งด่วนเพื่อมาใช้ในการรักษาวัณโรค เอนไซม์ Enoyl-ACP reductase (InhA) เป็นเอนไซม์เป้าหมายในการออกฤทธิ์ของตัวยาไอโซไนอาซิด ซึ่งเป็นตัวยาสำคัญในการรักษาวัณโรค [Quemard, A.,1995 and Rozwarski, D.A.,1998] โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของกรดไขมันในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรคอย่างไรก็ตามการใช้ไอโซไนอาซิดยังมีปัญหาสำคัญคือการเกิดกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA พบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการรบกวนพันธะไฮโดรเจนที่ช่วยการจับของ NADH มีเสถียรภาพ และจากการศึกษาในเวลาต่อมายังพบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ KatG ด้วย [Dias, M. V.,2007] จึงทำให้มีหลายกลุ่มงานวิจัยพยายามที่จะพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ โดยไม่ต้องการกระบวนการกระตุ้นจากเอนไซม์ KatG [Tamara, D., et al.,2010] เพื่อใช้ เป็นยาในการรักษาวัณโรคแทนที่ตัวยาหลักไอโซไนอาซิด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการนำเอาระเบียบวิธีทางด้านการจำลองแบบโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการศึกษา ออกแบบและค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่โดยสนใจที่จะทำการพัฒนาสารอนุพันธ์ในกลุ่ม 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรควัณโรคได้สูงขึ้น โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง (molecular docking calculations) ซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่เกิดขึ้นในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA รวมถึงทำให้ทราบถึงรูปแบบการวางตัวและรูปแบบการจับกันของเอนไซม์กับสารยับยั้งที่อยู่ในโพรงการจับ โดยผู้วิจัยคาดหวังว่างานวิจัยนี้จะทำให้ได้สารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นเพื่อใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อแบคทีเรียไมโครแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส นอกจากนี้ยังทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญทางด้านโครงสร้างอันตรกิริยาที่สำคัญซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการออกแบบและพัฒนาสารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง

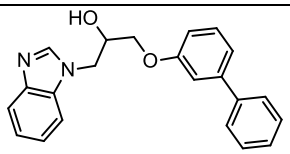
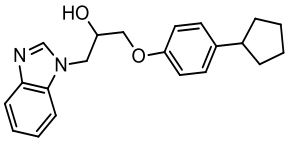
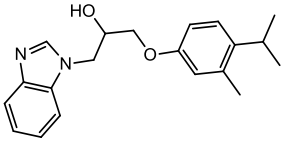
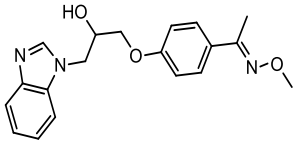
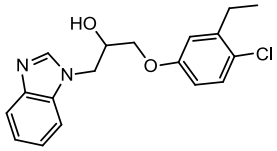
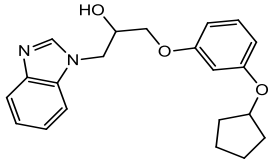
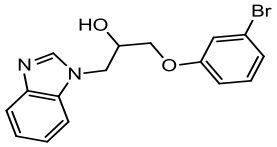
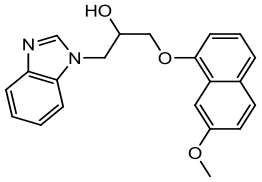
วิธีการวิจัย

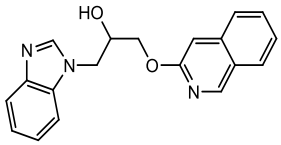
รวบรวมข้อมูลทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol โดยวิธีคัดสรรเสมือนจริงจากฐานข้อมูลสารเคมีและจากฐานข้อมูลผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของประเทศไทยจำนวน 9 โครงสร้าง ดังแสดงดังตารางที่ 1 จากนั้นทำการปรับโครงสร้างให้เสถียรที่สุดด้วยระเบียบวิธีการคำนวณเคมีควอนตัม ab-initio (M062X/6-31G*) โดยใช้ โปรแกรม Gaussius 09 ทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.02 ศึกษารูปแบบการจับตัวกันของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ภายในโพรงการจับเอนไซม์ InhA (PDB Code: 2X23) ด้วยวิธีการคำนวณการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งวิเคราะห์ผลการศึกษาและสรุปผลการศึกษา

ตารางที่ 1 โครงสร้างและค่าพลังงานอิสระ (docking score) ของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol



โครงสร้างทั่วไปของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol

จำนวนสาร	หมายเลขสาร	โครงสร้างสาร	ค่าพลังงานอิสระ (docking score)
1	3		-12.09
2	8		-11.85
3	9		-11.83
4	34		-11.43
5	38		-11.39
6	39		-11.39
7	60		-11.14
8	63		-11.12

9	71		-11.02

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1) ผลการตรวจสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.02

ผลจากการเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งของสารยับยั้งเชื้อวัณโรค ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA พบว่าให้ค่า RMSD เท่ากับ 0.61 อังสตรอม ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งที่ใช้มีความน่าเชื่อถือในการทำนายตำแหน่งการจัดวางตัวของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ในโพรงเอนไซม์ InhA

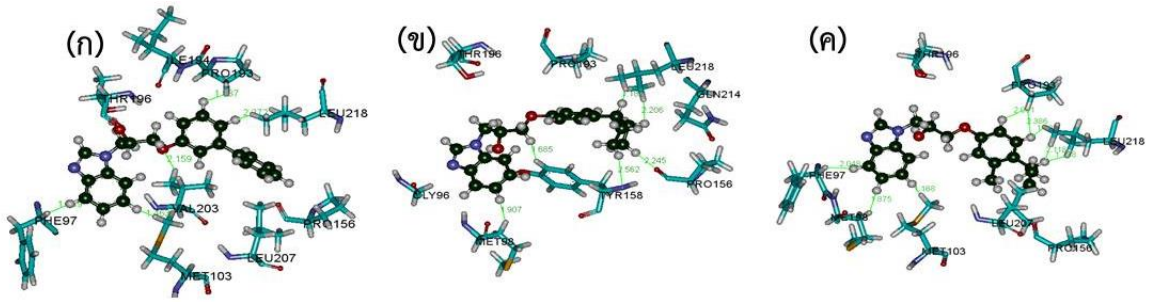
2) วิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ในโพรงเอนไซม์ InhA

2.1) สารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีค่าพลังงานอิสระ (docking score) สูง

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์)-1benzimidazol--1yl)-2)-3,-3dihydro--1h-inden--5yloxy) propan--2ol ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด คือ สารหมายเลข 3, 8 และ 9 ซึ่งมีค่าพลังงานอิสระ (docking score) คือ -12.09, -11.85 และ -11.83 มีตำแหน่งในการวางตัว ดังแสดงใน**รูปที่ 1** พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญดังนี้

สารหมายเลข 3 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ กรดอะมิโน Val203 และ Ala198 โดยเกิดระหว่าง อะตอมออกซิเจนของลิแกนด์สารหมายเลข 3 กับกรดอะมิโน Val203 และ Ala198 นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่าง อะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Met103, Phe97, Met98, Pro193, Phe149, Tyr158, Ala198, Val203, Leu207และ Leu218 สารหมายเลข 8 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Pro156 และ Tyr158 นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิด ไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Met103, Phe97, Met98, Met155, Phe149, Tyr158, Ala157, Ile202, Val203 และ Leu218 และสารหมายเลข 9 ไม่พบอันตรกิริยาแบบพันธะไฮโดรเจน แต่เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Met103, Phe97, Met98, Met155, Tyr158, Pro193, Ile202, Val203, IlE215 และ Leu218

จากการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ในกลุ่มที่มีค่า docking score สูง พบว่าสารหมายเลข 3 และสารหมายเลข 8 เกิดอันตรกิริยาแบบพันธะไฮโดรเจน ซึ่งพบว่าสารหมายเลข 3 จะเกิดอันตรกิริยาที่แข็งแรงกว่าสารหมายเลข 8 เนื่องจากสารหมายเลข 3 มีค่าพลังงานอิสระ (docking score) ที่สูงกว่าสารหมายเลข 8 สำหรับสารหมายเลข 9 พบว่ามีค่าพลังงานอิสระ (docking score) ที่ต่ำที่สุดในกลุ่มนี้จึงพบเฉพาะอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก



รูปที่ 1 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด (ก) สารหมายเลข 3 (ข) สารหมายเลข 8 และ (ค) สารหมายเลข 9 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

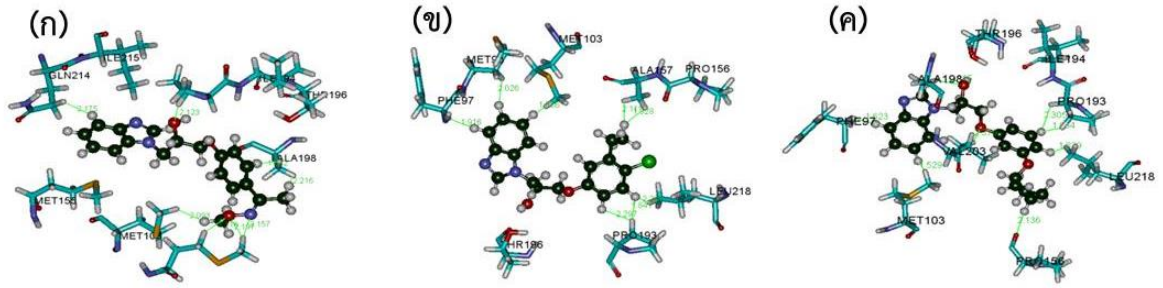
2.2) สารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีค่าพลังงานอิสระ (docking score) ปานกลาง

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง คือ สารหมายเลข 34, 38 และ 39 ซึ่งมีค่าพลังงานอิสระ (docking score) เท่ากับ -11.43, -11.39 และ -11.39 มีตำแหน่งในการวางตัว ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญดังนี้

สารหมายเลข 34 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ กรดอะมิโน Met161, Pro193 และ Val203 ระหว่างอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Met161 และ Pro193 และระหว่างอะตอมไนโตรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Met161 และ Val203 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Met103, Phe149, Met155, Tyr158, Ala198, Ile202 และ Val203

สารหมายเลข 38 เกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Met98, Phe97, Met103, Ala157, Tyr158, Pro193, Ile202 , Val203 และ Leu218 และสารหมายเลข 39 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ กรดอะมิโน Pro156, Ala198 และ Val203 ระหว่างอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Ala198 และ Val203 และเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน โดยเกิดระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับ กรดอะมิโน Pro156 นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิก ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Met98, Phe97, Met103, Tyr158, Ala157, Pro193, Val203 และ Leu218

จากการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ในกลุ่มที่มีค่าพลังงานอิสระ (docking score) ปานกลาง พบว่าสารหมายเลข 34 และสารหมายเลข 39 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน ซึ่งพบว่าสารหมายเลข 34 จะเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงที่สุด ส่งผลให้ค่าพลังงานอิสระ (docking score) ของสารหมายเลข 34 มีค่าสูงที่สุด



รูปที่ 2 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (ก) สารหมายเลข 34 (ข) สารหมายเลข 38 และ (ค) สารหมายเลข 39 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

2.3) สารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีค่าพลังงานอิสระ (docking score) ต่ำ

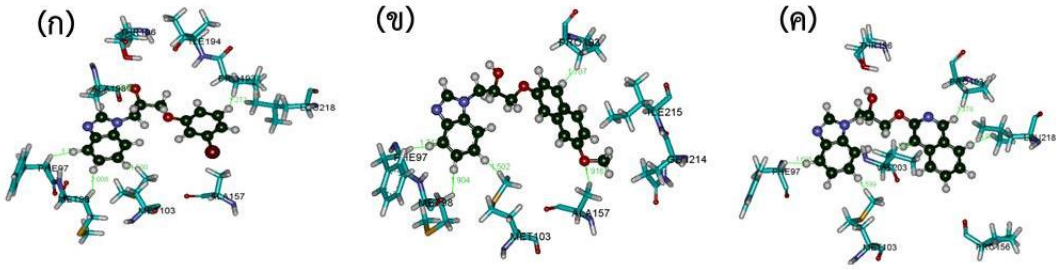
เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำคือ สารหมายเลข 60, 63 และ 71 ซึ่งมีค่าพลังงานอิสระ (docking score) เท่ากับ -11.14, -11.12 และ -11.02 ตามลำดับ มีตำแหน่งในการวางตัว ดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญดังนี้

สารหมายเลข 60 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ กรดอะมิโน Ala198 ระหว่างอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Ala198 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Phe97, Met98, Met103, Tyr158, Pro193, Ile202, Val203 และ Leu218

สารหมายเลข 63 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 1 ชนิด คือ กรดอะมิโน Ala157 ระหว่างอะตอมออกซิเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Ala157 นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Phe97, Met98, Met103, Phe149, Ala157, Pro193, Ala198, Val203 และ Leu218

และสารหมายเลข 71 เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของลิแกนด์กับกรดอะมิโน Phe97, Met98, Met103, Phe149, Tyr158, Pro193, Ala198, Val203 และ Leu218

จากการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan- 2-ol ในกลุ่มที่มีค่าพลังงานอิสระ (docking score) ต่ำ พบว่าสารในกลุ่มนี้เกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนเพียง 2 ตำแหน่ง คือ Ala157 และ Ala198 เนื่องจากสารยับยั้งในกลุ่มนี้มีค่าพลังงานอิสระ (docking score) ที่ต่ำและโครงสร้างของสารยับยั้งในกลุ่มนี้มีขนาดหมู่แทนที่ที่มีความเกะกะ จึงส่งผลให้พบอันตรกิริยาน้อย



รูปที่ 3 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (ก) สารหมายเลข 60 (ข) สารหมายเลข 63 และ (ค) สารหมายเลข 71 ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง

2.4) ความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol

จากผลการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งและการศึกษาอันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol กับเอนไซม์ InhA สามารถสรุปความต้องการของสารยับยั้งเพื่อนำไปสู่การออกแบบและพัฒนาสารยับยั้งให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น ซึ่งความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol พบว่ามีความต้องการทางโครงสร้างที่หมู่แทนที่ R ซึ่งจะต้องเป็นหมู่แทนที่ที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิก เช่น หมู่เมทิล หรือหมู่เอทิล และต้องเป็นหมู่มีความเกะกะค่อนข้างใหญ่ ซึ่งหมู่แทนที่ดังกล่าวอาจเป็นหมู่แทนที่ที่ทำให้อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นมีความแข็งแรงมากขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้ดีขึ้น

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการการออกแบบโมเลกุลโดยใช้การคำนวณของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณ โมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งจำนวน 9 โครงสร้าง ด้วยโปรแกรม Autodock 4.2 มีความสามารถในการทำนายรูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA โดยให้ค่า RMSD เท่ากับ 0.61 อังสตรอมซึ่งทำให้สามารถยืนยันได้ว่าระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งที่ใช้มีความน่าเชื่อถือในการอันตรกิริยาที่เฉพาะเจาะจง ของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ได้ ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า [Ganesh, S. P., et al., 2014] ดังนั้นผลการศึกษาที่ได้ทั้งหมดนี้สามารถใช้เป็นแนวทางเพื่อนำไปสู่การออกแบบสารต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ InhA และสามารถนำไปพัฒนายาตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อไมโครแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและสำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ โครงการสร้างปัญญาวิทย์ ผลิตนักเทคโน (YSTP) ของนายบุญรัตน์ ทารัตน์ (SCA-CO-2559-2443-TH) สำหรับเงินทุนสนับสนุนการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำหรับการสนับสนุนโปรแกรมและเครื่องมือในการคำนวณ

เอกสารอ้างอิง

Quemard, A.; Sacchettini, J.C.; Dessen, A.; Vilcheze, C.; Bittman, R.; Jacobs Jr, W.R.; Blanchard. (1995). *J.S. Biochemistry*, 34, 8235–8241.

Rozwarski, D.A.; Grant, G.A.; Barton, D.H.; Jacobs Jr, W.R.; Sacchettini. (1998). *J.C. Science*. 279, 98–102.

Dias, M. V.; Vasconcelos, I. B.; Prado, A. M.; Fadel, V.; Basso, L. A.; Jr. W. F.; de Azevedo; Santos, D. S. Struct. (2007). *Journal of Biol*. 159, 369.

Ganesh S. Pedgaonkar. Jonnalagadda Padma Sridevi.; Variam Ullas Jeankumar.; Shalini Saxena.; Parthiban Brindha Devi.; Janupally Renuka.; Perumal Yogeeswari.; Dharmarajan Sriram. (2014). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 86, 613–627.

Tamara Delainea, Vania Bernardes-Genissona, Annaik Quemardb, Patricia Constantc, Bernard Meunierd, Jean Bernadoua. (2010). *European Journal of Medicinal Chemistry*,45, 4554–4561.

การค้นหาสารยับยังเอนไซม์ PknG ตัวใหม่เพื่อใช้เป็นสารต้านวัณโรคบนพื้นฐานโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีน: การคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้าง

Identifications of New PknG Inhibitors as Anti-tuberculosis Agents Based on 2-aminopyrimedine Derivatives: Structure Based Virtual Screening

พฤทธิ์ คำศรี[1] อรดี พันธ์กว้าง[1] พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากร[2] สุภา หารหนองบัว[2] Zhaoqiang Chen[3] Weiliang Zhu[3] สัญญา สุเรรัมย์[4] ประสาท กิตตะคุปต์[4] คมสันต์ สุทธิสินทอง[5] นิธิมา สุทธิพันธุ์[6] กัมปนาท ฉายจรัส[7] อินทุอร อัปปะมะโต[7] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[7]*

[1] สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม 214 ถนนนิตโย อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม 48000

[2] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวง ลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

[3] Drug Discovery and Design Center, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, 555 Zuchongzhi Rd, Shanghai 201203, China

[4] สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ถนนวภาวดี-รังสิต เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210

[5] ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) 111 ถนนพหลโยธิน, ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี, 12120

[6] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 85 ถนนสถลมาร์ค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

[7] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 85 ถนนสถลมาร์ค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

* E-mail : pornpan_ubu@yahoo.com

บทคัดย่อ

การพัฒนาสารต้านวันโรคยังมีความจำเป็นเร่งด่วนเนื่องจากปัญหาการดื้อยาของเชื้อวัณโรค ยาตัวใหม่ที่ทำให้ระยะเวลาในการรักษาสั้นลงเป็นสิ่งที่ต้องการในการรักษา ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้างโดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งในการคัดเลือกสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่โดยมีโครงสร้างเป็นสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริดีน จากการศึกษาได้สารทั้งหมด 23 โครงสร้างแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มมีค่าพลังงานอิสระจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งในการจับที่ต่ำกว่า -8.00 kcal/mol อันตรกิริยาที่สำคัญคือพันธะไฮโดรเจนที่เกิดกับกรดอะมิโน กลูตามิก 233 และกรดอะมิโนวาลีน 235 ผลที่ได้จากการศึกษานี้นำไปสู่การพัฒนาเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ PknG เพื่อเป็นสารต้านวัณโรค

คำสำคัญ : สารต้านวัณโรค สารยับยั้งเอนไซม์ PknG การคัดสรรเสมือนจริง 2-อะมิโนไพริดีน

Abstract

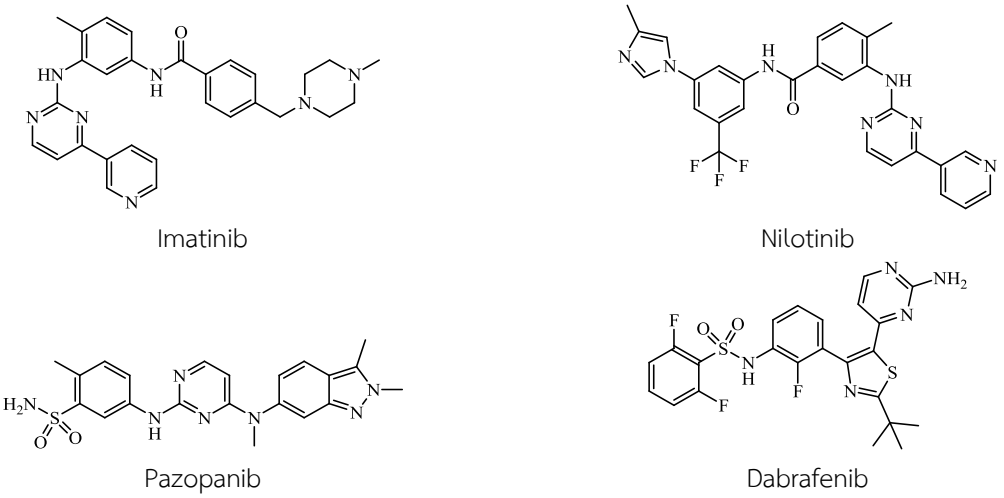
Development of new anti-tuberculosis agents is urgently required due to drug resistant tuberculosis problems. New drugs that effected to short duration of treatment timeline are required. This work, structure based drug design using molecular docking calculations was applied to screen new PknG inhibitors in a series of 2-aminopyridine derivatives. Twenty-three compounds with different five structures were obtained based on docking free energy lower than -8.00 kcal/mol. The crucial interactions were hydrogen bond interaction of new compounds with Glu233 and Val235. The obtained results from this study lead to develop novel PknG inhibitors as anti-tuberculosis agents.

Keywords : anti-tuberculosis agents, PknG inhibitors, Virtual screening, 2-aminopyridine

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคที่มีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อไมโครแบคที่เรียที่มีชื่อว่า *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาหลักในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาและมีรายได้น้อย ในปี 2015 มีจำนวณของผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ทั้งหมด 10.4 ล้านคนและมีผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมด 1.4 ล้านคน (WHO, 2016) โดยสำหรับการติดต่อของวัณโรคนั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณความหนาแน่นของประชากร สำหรับยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามประสิทธิภาพ ได้แก่ยาในกลุ่มของ First-line และยาในกลุ่ม second และ third-line ซึ่งเป็นตัวยาที่มีการใช้ในการรักษามามากกว่า 40 ปี (Chetty et al., 2017) แต่อย่างไรก็ตามการดื้อยาในการรักษาวัณโรคจึงเป็นปัญหาหลักในการรักษาในปัจจุบัน รวมทั้งการเกิดปัญหาร่วมกันกับโรคเอดส์ ซึ่งปัญหาเหล่านี้ทำให้ตัวยารักษาวัณโรคในปัจจุบันไม่สามารถใช้ในการรักษาวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการพัฒนาตัวยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงและสามารถแก้ไขปัญหาการดื้อยาได้จึงเป็นที่ต้องการในการรักษาวัณโรค โดยตัวยาตัวใหม่ที่ใช้ในการรักษาจะต้องสามารถที่จะรักษาวัณโรคที่มีการดื้อยาได้ มีระยะเวลาที่ใช้ในการรักษาสั้นลง ลดลงปริมาณและความถี่ในการใช้ยาในการรักษา อันตรกิริยาระหว่างยา-ยาที่ลดลงและมีราคาถูก (Shehzad et al., 2013)

เอนไซม์ไคเนส (Kinase enzyme) เป็นอีกกลุ่มเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายในการพัฒนายารักษาโรคและประสบความสำเร็จในการใช้ในการรักษาโรค โดยเฉพาะมะเร็งและอีกหลายๆโรค (Kana et al., 2014; Klebl and Muller, 2005; Schreiber, Res and Matter, 2009) จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างเอนไซม์ไคเนสที่พบในเชื้อวัณโรคมีลักษณะที่เฉพาะ จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการพัฒนาสารยับยั้งและยาในการรักษาวัณโรคโดยที่มีความจำเพาะคือทำให้ระระเวลา ที่ใช้ในการรักษาสั้นลง จึงได้รับความสนใจในการพัฒนายารักษาวัณโรคเอนไซม์ PknG เป็นอีกเอนไซม์ไคเนสเป้าหมายสำหรับการพัฒนาสารยับยั้งวัณโรคและมีสารกลุ่มงานวิจัยพยายามที่จะพัฒนาสารยับยั้งในกลุ่มของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ได้แก่สารอนุพันธ์เบนโซไตรเอโซล (Székely et al., 2008; Magnet et al., 2010; Sipos et al., 2015; Scherr et al., 2007;) สารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีน (Anand et al., 2012) และกลุ่มอื่นๆ (Singh et al., 2015) รวมทั้งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ Sclerotiorin (Chen et al., 2017) จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าสารในกลุ่มของอะมิโนไพริมิดีนถูกพัฒนาเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไคเนสเป็นจำนวนมากและเป็นตัวยาที่ใช้ในการรรักษาโรคต่างๆดังรูปที่ 1 ดังนั้นการพัฒนาสารในกลุ่มของอะมิโนไพริมิดีนจึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ PknG และนอกจากนี้งานวิจัยของ Anand ได้พัฒนาโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีน ซึ่งมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง ดังนั้นแล้วในงานวิจัยนี้จึงสนใจในการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ PknG กลุ่มใหม่โดยมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น 2-อะมิโนไพริมิดีน ซึ่งผลจากการศึกษาได้สารโครสร้างใหม่ที่คาดว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงและพัฒนาเป็นยารักษาวัณโรคดื้อยาในอนาคต



รูปที่ 1 ตัวอย่างสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีน ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มของไคเนสที่เป็นยาในปัจจุบัน

วิธีการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้างโดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งโดยมีขั้นตอนของการคัดสรรดังนี้

1. การเตรียมฐานข้อมูลโครงสร้างสารเคมีของสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีนทั้งหมด 1,837 โครงสร้างที่ได้จากระเบียบวิธี Sub structure search โดยอาศัย Ligand preparation ในโปรแกรม Glide (Friesner et al., 2004 and 2006; Halgren et al., 2004)

2. การบ่งชี้บริเวณการจับของเอนไซม์เป้าหมาย PknG สำหรับในงานวิจัยนี้การบ่งชี้บริเวณของโพรงการจับนั้นได้อาศัยข้อมูลการจับของสารยับยั้งเอนไซม์เป้าหมายจากโครงสร้างเอกซเรย์ 2PZI ซึ่งเป็นโครงสร้างของเอนไซม์ PknG ที่จับกับสารยับยั้ง AX20017 ในการบ่งชี้บริเวณการออกฤทธิ์ในการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG สำหรับการศึกษาการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งและการคัดสรรเสมือนจริง

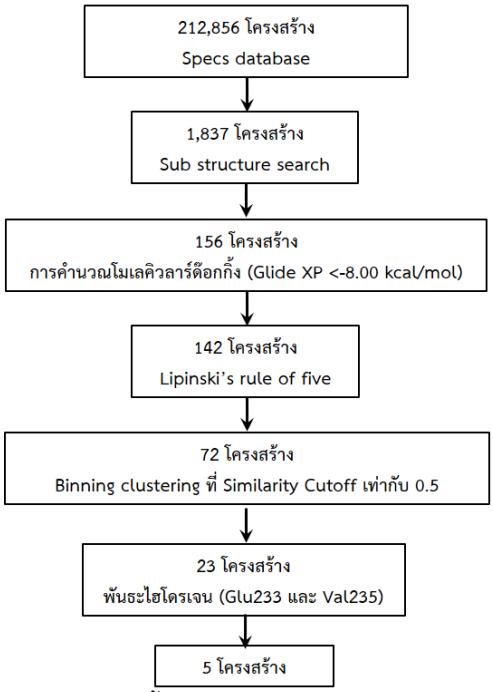
3. การคัดสรรเสมือนจริงโดยใช้การคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งและการคำนวณค่าพลังงานในการจับโดยมีขั้นตอนแสดงดังรูปที่ 2 โดยเริ่มจากการนำเอาโครงสร้างทั้งหมดที่ได้จากระเบียบวิธี Sub structure search และเตรียมด้วยวิธี Ligand preparation ไปคำนวณการวางตัวและพลังงานในการจับโดยใช้โปรแกรม Glide โดยใช้การคำนวณพลังงานในการจับแบบ Glide XP

4. หลังจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งเลือกโครงสร้างที่มีค่าพลังงานน้อยกว่า -8.00 kcal/mol มาใช้ในการพิจารณาโครงสร้างโดยอาศัย Lipinski's rule of five การแบ่งกลุ่มโครงสร้างโดยใช้ Binning clustering ที่ Similarity Cutoff เท่ากับ 0.5 และการพิจารณาอันตรกิริยาที่สำคัญในโพรงการจับตามลำดับ

ผลการวิจัย

1. การคัดสรรเสมือนจริง

เพื่อเป็นการยืนยันการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไคเนส (kinase) ของสารในกลุ่มของสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีนเพื่อพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG และสารต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพสูง โครงสร้างของ 2-อะมิโนไพริมิดีนถูกใช้เป็นต้นแบบในการค้นหาที่มีการใช้ในการรักษาโรคในปัจจุบันจากฐานข้อมูล Drugbank ซึ่งพบว่ามีตัวยาทั้งหมด 8 ตัวที่เป็นยารักษาโรคและมีเป้าหายในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไคเนส ได้แก่ Imatinib, Nilotinib, Pazopanib, Dabrafenib, Ceritinib, Osimertinib, Ribociclib และ Olmutinib ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่สารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีนจะสามารถพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในการรักษาได้ในอนาคต โดยขั้นตอนการคัดสรรเสมือนจริงแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ขั้นตอนการคัดสรรเสมือนจริง

วิธีการคัดสรรเสมือนจริงในการศึกษานี้เริ่มจากวิธี Sub structure search ในฐานข้อมูลสารเคมี Specs ได้สารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีนทั้งหมด 1,837 โครงสร้าง และคำนวณการวางตัวของสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีนทั้งหมดในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้ง (Glide XP) โดยพบว่ามีสารทั้งหมด 156 โครงสร้างที่มีพลังงานในการจับจากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งที่ต่ำกว่า -8.00 kcal/mol และเพื่อให้ได้โครงสร้างสารที่เหมาะสำหรับการออกฤทธิ์เป็นยาและพัฒนาโครงสร้างสารยับยั้งให้เป็นยาได้ Lipinski's rule of five จึงถูกใช้ในการพิจารณาโครงสร้างของสารสนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีนพบว่ามีสารทั้งหมด 142 โครงสร้างมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการออกฤทธิ์เป็นยา หลังจากนั้นใช้ Binning clustering ที่ Similarity Cutoff เท่ากับ 0.5 และเลือกสารยับยั้งที่มีค่าพลังงานในการจับที่ต่ำที่สุดในแต่ละกลุ่มได้โครงสร้างสารแบ่งตามกลุ่มทั้งหมด 78 โครงสร้างและเมื่อพิจารณาถึงอันตรกิริยาที่สำคัญภายในโพรงการจับของเอนไซม์ PknG กับสารยับยั้ง Tetrahydrobenzothiophene (AX20017) และวงอะดีนีนของ ATP ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์ PknG ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) โดยพบโครงสร้างที่มีพันธะไฮโดรเจนทั้ง 2 ตำแหน่ง จำนวน 23 โครงสร้างดังตารางที่ 1 ซึ่งสารเหล่านี้มีความเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PknG และสารต้านโรควัณโรคต่อไป

ตารางที่ 1 สารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีนชนิดใหม่ที่นำเสนอจากระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริง

Hit No	IDNUMBER	docking score (kcal/mol)	Hit No	IDNUMBER	docking score (kcal/mol)
1	AJ-292/14921003	-9.58	13	AO-476/43362695	-8.61
2	AT-417/43484907	-9.26	14	AE-848/32001037	-8.52
3	AK-105/40693577	-9.15	15	AG-664/36602004	-8.50
4	AN-465/43460979	-9.09	16	AJ-292/08600008	-8.47
5	AE-413/20090042	-9.04	17	AN-465/43461088	-8.44
6	AO-555/14497001	-8.98	18	AH-262/31956054	-8.31
7	AG-401/41015807	-8.97	19	AK-968/11781368	-8.22
8	AG-401/43410761	-8.94	20	AJ-292/40871953	-8.19
9	AP-653/41545019	-8.84	21	AN-465/43479889	-8.19
10	AG-205/36992131	-8.79	22	AN-584/43409796	-8.10
11	AG-205/37175017	-8.69	23	AG-205/11316021	-8.01
12	AR-682/43286375	-8.64			

2. ลักษณะการวางตัวและอันตรกิริยาในการจับของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริง

จากการคัดสรรเสมือนจริงพบว่าสาร 23 โครงสร้างที่คาดว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ PknG ที่สูงแบ่งตามลักษณะโครงสร้างพื้นฐานโดยอาศัยโครงสร้างที่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกับกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) ได้ทั้งหมด 5 กลุ่มดังนี้ 2-อะมิโนไพริมิดีน, 2,4-ไดอะมิโนไพริมิดีน, 3-อะมิโนไพราโซล, 4-อะมิโนไพริมิดีน และ3-อะมิโน-[1,2,4]-ไตรเอโซโล-[1,5-a]-ไพริมิดีน โดยที่สารยับยั้งที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มมีการวางตัวและอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นดังรูปที่ 3

2.1 การวางตัวและอันตรกิริยาของ 2-อะมิโนไพริมิดีน

สารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีน เป็นกลุ่มโครงสร้างที่พบได้มากที่สุด โดยมีทั้งหมด 16 โครงสร้าง โดยอันตรกิริยาหลักที่เกิดขึ้นคือ อะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 หรือ 3 ในวงไพริมิดีนเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH backbone ของกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) และหมู่อะมิโนของ 2-อะมิโนไพริดีนไพริมิดีนเกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิล (O=C backbone) กรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) สารหมายเลข AJ-292/14921003 เป็นสารที่มีค่าพลังงานในการจับต่ำที่สุดในกลุ่มนอกจากจะเกิดพันธะไฮโดรเจนใน 2 ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่กล่าวมาแล้ว ยังพบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญคือ

พันธะฮาโลเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่คลอโร (Cl) กับหมู่ NH_3^+ ของกรดอะมิโนไลซีน 241 (Lys241) นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโพบิกทีเกิดขึ้นระหว่างสารยับยั้ง AJ-292/14921003 กับกรดอะมิโนไอโซลิวซีน 157 (Ile157) กรดอะมิโนอะลานีน 158 (Ala158) กรดอะมิโนไอโซลิวซีน 165 (Ile165) กรดอะมิโนวาลีน 179 (Val179) กรด อะมิโนเมทไธโอนีน 232 (Met232) กรดอะมิโนไทโรซีน 234 (Tyr234) กรดอะมิโนกลูตามิก 280 (Glu280) กรดอะมิโนเมทไธโอนีน 283 (Met283) และกรดอะมิโนไอโซลิวซีน 292 (Ile292)

2.2 การวางตัวและอันตรกิริยาของ 2,4-ไดอะมิโนไพริมิดีน

2,4-ไดอะมิโนไพริมิดีนเป็นกลุ่มของสารอนุพันธ์ที่พบได้มากเป็นอันดับที่ 2 รองจากสารในกลุ่มของ 2-อะมิโนไพริมิดีน ซึ่งพบโครสร้างทั้งหมด 4 โครสร้างโดยอันตรกิริยาที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คือพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 หรือ 3 ในวงไพริมิดีนเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH backbone ของกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) และหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 2 และ 4 และเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกับอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิล (O=C backbone) กรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) โดยสารหมายเลข AK-105/40693577 เป็นสารที่มีค่าพลังงานในการจับต่ำที่สุดในกลุ่ม นอกจากจะเกิดพันธะไฮโดรเจน 3 ตำแหน่งกับกรด อะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) ยังพบพันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่างหมู่คาร์บอนิลของสารยับยั้งกับอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิล (O=C backbone) กรดอะมิโนกลูตามิก 280 (Glu280) และพันธะแคทไอออน-ไพระหว่างวงฟีนิลกับกรดอะมิโนไลซีน 241 (Lys241) นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นกับกรดอะมิโนที่อยู่ในโพรงการจับของสารยับยั้ง

2.3 การวางตัวและอันตรกิริยาของ 3-อะมิโนไพราโซล

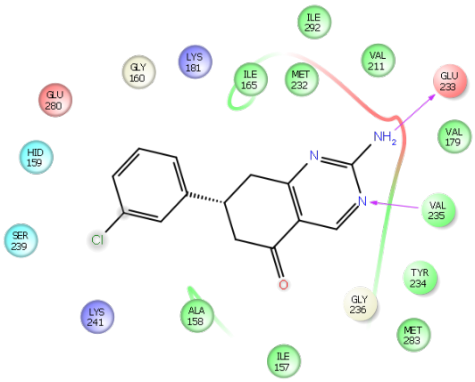
3-อะมิโนไพราโซลที่พบว่ามีค่าพลังงานในการจับที่ต่ำมี 1 โครงสร้างคือสารหมายเลข AO-555/14497001 ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) ดังนี้ หมู่ NH และอะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 2 ของวงไพราโซลเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH และคาร์บอนิลของกรดอะมิโรวาลีน 235 (Val235) ส่วนหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 3 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโพบิกทีเกิดขึ้นระหว่างสารยับยั้งตรงบริเวณของ 4,6-ไดเมทอกซีไพริมิดีน กับกรดอะมิโนไอโซลิวซีน 157 (Ile157) กรดอะมิโนอะลานีน 158 (Ala158) กรดอะมิโนเมทไธโอนีน 283 (Met283) และกรดอะมิโนไอโซลิวซีน 292 (Ile292)

2.4 การวางตัวและอันตรกิริยาของ 4-อะมิโนไพริมิดีน

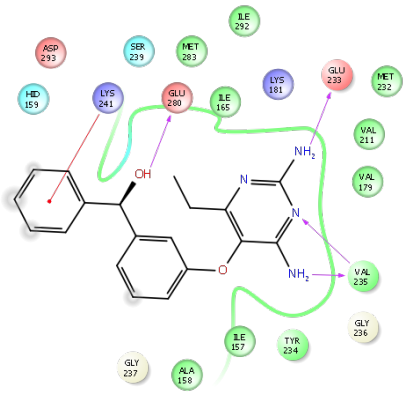
สารอนุพันธ์ในกลุ่มของ 4-อะมิโนไพริมิดีน ที่มีค่าพลังงานในการจับที่ได้จากการศึกษานี้มี 1 โครงสร้างคือ AO-476/43362695 ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) ดังนี้ อะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 3 ของวงไพริมิดีนเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH และคาร์บอนิลของกรดอะมิโรวาลีน 235 (Val235) และหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 4 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นระหว่างวงไพโรลิดีนกับกรดอะมิโนอะลานีน 158 (Ala158)

2.5 การวางตัวและอันตรกิริยาของ 3-อะมิโน-[1,2,4]-ไตรเอโซโล-[1,5-a]-ไพริมิดีน

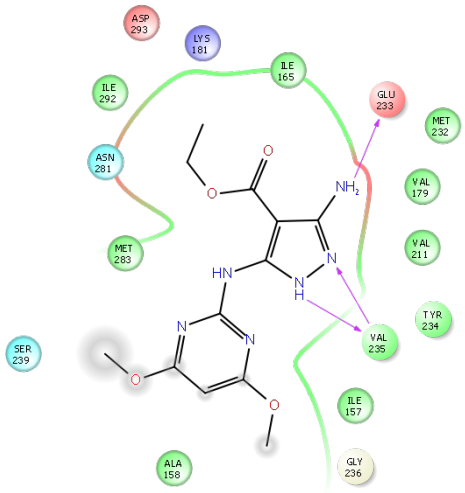
3-อะมิโน-[1,2,4]-ไตรเอโซโล-[1,5-a]-ไพริมิดีนซึ่งพบได้ 1 โครงสร้างที่มีค่าพลังงานในการจับที่ต่ำคือ AK-968/11781368 โดยอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นคือ อะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 4 ของวงไตรเอโซลเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH และคาร์บอนิลของกรดอะมิโรวาลีน 235 (Val235) และหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 3 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) นอกจากนี้แล้วยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างกรดอะมิโนไอโซลิวซีน 157 (Ile157) กรดอะมิโนอะลานีน 158 (Ala158) และกรดอะมิโนเมทไธโอนีน 283 (Met283)



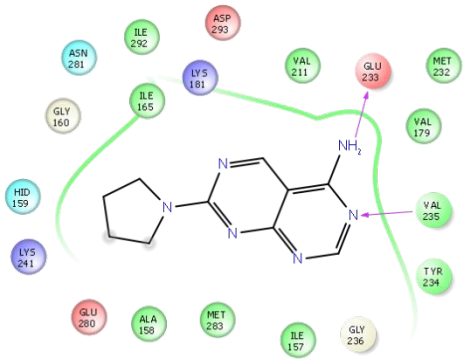
2-อะมิโนไพริมิดีน (AJ-292/14921003)
-9.58 kcal/mol



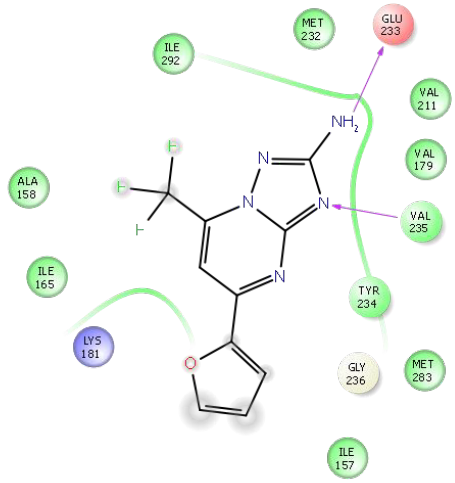
2,4-ไดอะมิโนไพริมิดีน (AK-105/40693577)
-9.15 kcal/mol



3-อะมิโนไพราโซล (AO-555/14497001)
-8.98 kcal/mol



4-อะมิโนไพริมิดีน (AO-476/43362695)
-8.61 kcal/mol



3-อะมิโน-[1,2,4]-ไตรเอโซโล-[1,5-a]-ไพริมิดีน (AK-968/11781368)
-8.22 kcal/mol

รูปที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่ทั้ง 5 กลุ่มโครงสร้างที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริง

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดสรรเสมือนจริงเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG ในกลุ่มสารอนุพันธ์ 2-อะมิโรไพริมิดีน ซึ่งพบว่ามีสารทั้งหมด 23 โครงสร้างที่มีค่าพลังงานในการจับกับเอนไซม์เป้าหมายต่ำกว่า -8.00 kcal/mol ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าสารเหล่านี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะโครงสร้างทั่วไปแล้วสามารถที่จะแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มโครงสร้าง ซึ่งสารที่ได้จากการศึกษานี้นำไปสู่การพัฒนาโครงสร้างสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ชนิดใหม่เพื่อพัฒนาไปเป็นยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (RSA5980057) และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติสำหรับเงินทุนสนับสนุนการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบัน Shanghai Institute of Materia Medica และศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำหรับการสนับสนุนโปรแกรมและเครื่องมือในการคำนวณ

เอกสารอ้างอิง

Anand, N., Singh, P., Sharma, A., Tiwari, S., Singh, V., Singh, D.K., Srivastava, K.K., Singh, B.N., Tripathi, R.P. (2012). Synthesis and evaluation of small libraries of triazolylmethoxy chalcones, flavanones and 2-aminopyrimidines as inhibitors of mycobacterial FAS-II and PknG. *Bioorg Med Chem*. 20(17), 5150-5163.

Chen, D., Ma, S., He, L., Yuan, P., She, Z., Lu, Y. (2017). Sclerotiorin inhibits protein kinase G from *Mycobacterium tuberculosis* and impairs mycobacterial growth in macrophages. *Tuberculosis (Edinb)*. 103, 37-43.

Chetty, S., Ramesh, M., Singh-Pillay, A., Soliman, M.E.S. (2017). Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 27, 370–386.

Friesner, R.A., Murphy, R.B., Repasky, M.P., Frye, L.L., Greenwood, J.R., Halgren, T.A., Sanschagrin, P.C., Mainz, D.T. (2006). Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem*. 49, 6177–6196.

Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shaw, D.E., Shelley, M., Perry, J.K., Francis, P., Shenkin, P.S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem*. 47, 1739–1749.

Halgren, T.A., Murphy, R.B., Friesner, R.A., Beard, H.S., Frye, L.L., Pollard, W.T., Banks, J.L. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem*. 47, 1750–1759.

Kana, B.D., Karakousis, P.C., Parish T. and Dick, T. (2014) Future target-based drug discovery for tuberculosis. *Tuberculosis (Edin*b), 94(6), 551-556.

Klebl, B.M. and Muller, G. (2005). Second-generation kinase inhibitors. *Expert. Opin. Ther. Targets*. 9, 975–993.

Magnet, S., Hartkoorn, R.C., Székely, R., Pató, J., Triccas, J.A., Schneider, P., Szántai-Kis, C., Orfi, L., Chambon, M., Banfi, D., Bueno, M., Turcatti, G., Kéri, G., Cole, S.T. (2010). Leads for antitubercular compounds from kinase inhibitor library screens. *Tuberculosis (Edinb)*. 90(6), 354-360.

Scherr, N., Honnappa, S., Kunz, G., Mueller, P., Jayachandran, R., Winkler, F., Pieters, J., Steinmetz, M.O. (2007). Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104(29), 12151-12156.

Schreiber, M., Res, I. and Matter, A. (2009). Protein kinases as antibacterial targets. *Curr. Opin. Cell Biol*. 21, 325–330.

Shehzad, A., Rehman, G., Ul-Islam, M., Khattak, W.A., Lee, Y.S., Braz. (2013). *J. Infect. Dis*. 17(1), 74-81.

Singh, N., Tiwari, S., Srivastava, K.K., Siddiqi, M.I. (2015) Identification of Novel Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* PknG Using Pharmacophore Based Virtual Screening, Docking, Molecular Dynamics Simulation, and Their Biological Evaluation. *J. Chem. Inf. Model*. ;55(6), 1120-1129.

Sipos, A., Pató, J., Székely, R., Hartkoorn, R.C., Kékesi, L., Orfi, L., Szántai-Kis. C., Mikušová, K., Svetlíková, Z., Korduláková, J., Nagaraja, V., Godbole, A.A., Bush, N., Collin, F., Maxwell, A., Cole, S.T., Kéri, G. (2015). Lead selection and characterization of antitubercular compounds using the Nested Chemical Library. *Tuberculosis (Edinb).* 95, Suppl 1, S200-206.

Székely, R., Wáczek, F., Szabadkai, I., Németh, G., Hegymegi-Barakonyi, B., Eros, D., Szokol, B., Pató, J., Hafenbradl, D., Satchell, J., Saint-Joanis, B., Cole, S.T/, Orfi, L., Klebl, B.M., Kéri, G. (2008) *A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signalling*. Immunol. Lett. 116(2), 225-231.

World Health Organization (2016), *Global tuberculosis report 2016*. สืบค้นเมื่อ 1 เมษายน, 2560, เข้าถึงจาก http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1.

การอธิบายข้อมูลทางโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA สำหรับสารต้านโรควัณโรค: การออกแบบสารยับยั้งโดยอาศัยข้อมูลทางลิแกนด์และข้อมูลทางโครงสร้าง

Elucidating the structural basis of InhA inhibitors for anti-tuberculosis agents: Ligand and structure based drug design approaches

นฤดล ภูศรี[1] ฑิมพิกา พรพรม[1] ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์[1] บัณฑิต คำศรี[1] บงกชวรรณ พาคำวงค์[1]
ภาพตะวัน ทองดี[1] กัมปนาท ฉายจรัส[1] นิธิมา สุทธิพันธ์[2] พฤทธิ์ คำศรี[3] อรดี พันธ์กว้าง[3] พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์[4]
สุภา หารหนองบัว[4] พจนีย์ ศรีมาโนชญ์[5] คมสันต์ สุทธิสินทอง[6] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[1]*
[1] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[2] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[3] สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม
[4] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[5] คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
[6] ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย
* E-mail : pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาระเบียบวิธีการทางด้านการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาและปรับเปลี่ยนสารยับยั้งของโมเลกุลเป้าหมายชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในการยับ เอนไซม์อีโนอิลเอซีพีรีดักเตส หรือเอนไซม์ InhA ของเชื้อ*ไมโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลสิส* ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายในการออกฤทธิ์ยับยั้งของตัวยาหลักในการรักษาโรควัณโรคอย่างยาไอโซไนอาซิด ซึ่งการดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดเกี่ยวเนื่องจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA ในการพัฒนายาต้านโรควัณโรคซึ่งสารยับยั้งโรควัณโรคที่ถูกนำมาทำการศึกษาในการพัฒนาสารยับยั้งเชื้อโรควัณโรคคือ สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ของเชื้อ*ไมโครแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลสิส* ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติถูกประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาข้อมูลที่สำคัญของตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ทำให้ทราบถึงรูปแบบการวางตัวในโพรงการจับของตัวยับยั้งอันตรกิริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นในโพรงการจับและความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA ซึ่งเป็นแนวทางในการออกแบบตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA มีศักยภาพสูงขึ้น

คำสำคัญ : สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide การคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติ

Abstract

In this research, computer aided molecular design approaches were applied to investigate and optimization of novel drug targets due to high potential. Enoyl-ACP reductase (InhA) of *Mycobacterium tuberculosis*, has been shown to be the primary target of the isoniazid. The isoniazid resistance arises from the mutations of InhA. The developing new and more potent anti-tuberculosis agents, which are selected the heteroaryl benzamide derivative as potential anti-tuberculosis agents active against *Mycobacterium tuberculosis* InhA. Molecular docking calculations, molecular dynamics (MD) simulations and three dimensional quantitative structure activity relationships (3 D-QSAR) were applied to elucidate the important information of InhA inhibitors. Therefore, the important information from this studies were applied to understand the binding mode of inhibitors in binding pocket, the crucial interactions of inhibitors in binding pocket

and the structure requirements of heteroaryl benzamide derivatives as InhA inhibitors provided guidelines for the design of new and more potent InhA inhibitors.

Keywords : Heteroaryl Benzamide Derivatives, Molecular Docking Calculations, Molecular Dynamics Simulations, Three Dimensional Quantitative Structure Activity Relationship

บทนำ

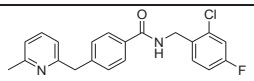
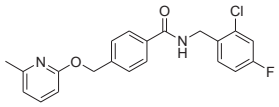
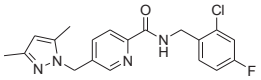
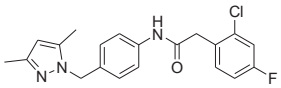
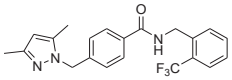
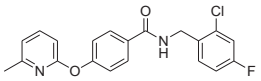
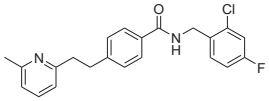
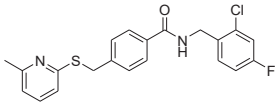
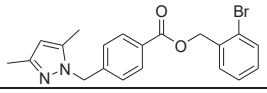
โรควัณโรคเป็นโรคติดต่อที่มีสาเหตุหลักมาจากเชื้อแบคทีเรีย*ไมโครแบคทรีเรียมทูเบอร์คูโลซิส*และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนทั่วโลก ปัจจุบันสถานการณ์ในประเทศไทยองค์การอนามัยโลกได้จัดอันดับให้ไทยอยู่ในกลุ่มประเทศที่ยังไม่สามารถควบคุมวัณโรคได้ (World Health Organization, http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) การรักษาวัณโรคในปัจจุบันต้องใช้ยาในการรักษาด้วยกันอย่างน้อย 2 ชนิดขึ้นไป โดยมีไอโซไนอาซิด (Isoniazid หรือ INH) เป็นยาหลัก 1 ชนิดแล้วใช้ยาตัวอื่นๆ ร่วมด้วย (Graham, A. W. et al., 2005) เอนไซม์ Enoyl-ACP reductase (InhA) เป็นเอนไซม์เป้าหมายในการออกฤทธิ์ของตัวยาไอโซไนอาซิด ซึ่งเป็นตัวยาสำคัญในการรักษาวัณโรค (Rozwarski, D. A. et al., 1998) โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสายโซ่กรดไขมันใน FAS II patway ในกระบวนการการการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรค อย่างไรก็ตามการใช้ไอโซไนอาซิดยังมีปัญหาสำคัญคือการเกิดกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA พบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการรบกวนพันธะไฮโดรเจนที่ช่วยการจับของ Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) มีเสถียรภาพและจากการศึกษาในเวลาต่อมายังพบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ catalase-peroxidase (KatG) ด้วย (Rozwarski, D. A. et al., 1999) จึงทำให้มีหลายกลุ่มงานวิจัยพยายามที่จะพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่โดยไม่ต้องการกระบวนการกระตุ้นจากเอนไซม์ KatG (Frisch, M. J. et al., 2009) จากข้อมูลที่ได้เหล่านี้ทำให้เข้าถึงกลไกการดื้อยาซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการออกแบบตัวยาที่มีศักยภาพสูงในการรักษาโรควัณโรคเพื่อพัฒนาตัวยับยั้งให้มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ InhA ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการนำเอาระเบียบวิธีทางด้านการจำลองแบบโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาออกแบบและค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่โดยสนใจที่จะทำการพัฒนาสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรควัณโรคได้สูงขึ้น โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง การจำลองพลวัติเชิงโมเลกุล และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่าคัมมันตภาพการยับยั้งซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงรูปแบบการวางตัวและอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่เกิดขึ้นในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA โดยผู้วิจัยคาดหวังว่างานวิจัยนี้จะทำให้ได้สารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นเพื่อใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อแบคทีเรีย*ไมโครแบคทีเรียมทูเบอร์คูโลซิส* นอกจากนี้ยังทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญทางด้านโครงสร้าง อันตรกิริยาที่สำคัญซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการออกแบบและพัฒนาสารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง

วิธีการวิจัย

รวบรวมข้อมูลทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ดังแสดงดัง**ตารางที่ 1** จากนั้นทำการปรับโครงสร้างให้เสถียรด้วยระเบียบวิธีการคำนวณเคมีควอนตัม *ab initio* (M062X/6-31G*) โดยใช้โปรแกรมGaussius 09 (Frisch, M. J. et al., 2009) ทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.2 (Morris, G. M. et al., 2009) ศึกษารูปแบบการจับตัวกันของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ภายในโพรงการจับเอนไซม์ InhA (PDB Code: 4QXM) (Guardia, A. et al., 2016) ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง ศึกษาสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์เพื่ออธิบายและทำนายกระบวนการสำคัญทางชีวเคมีในธรรมชาติ ทำการคำนวณหาค่าพลังงานการจับอิสระของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ภายในโพรงการจับเอนไซม์ InhA โดยใช้วิธี MM-PBSA (Wang, J. et al., 2001; Kaledin, M. et al., 2004; Wang, J. et al., 2006; Hou, T. et al., 2011) ด้วยระเบียบวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล และศึกษาความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์

heteroaryl benzamide เพื่อเพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งด้วยระเบียบวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพการยับยั้ง วิเคราะห์และสรุปผลที่ได้จากการศึกษาในแต่ละระเบียบวิธีการศึกษา เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการออกแบบโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีค่ากัมมันตภาพสูงขึ้นในการยับยั้งเอนไซม์ InhA

ตารางที่ 1 โครงสร้างและค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA (IC_{50}) ของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide (Guardia, A. et al., 2016)

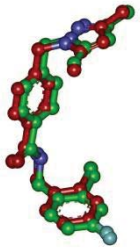
สารหมายเลข	โครงสร้าง	IC_{50} (μM)
17		0.05
19		0.02
21		0.19
22		0.04
25		1.00
33		3.40
34		1.55
35		0.26
38		6.10

ผลการวิจัย

1) ผลการศึกษาสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

1.1) ผลการตรวจสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.2

ผลจากการเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม พบว่าในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคให้ค่า RMSD เท่ากับ 0.50 อังสตรอม จากการซ้อนทับกันของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ระหว่างโครงสร้างผลึกทางเอ็กซเรย์กับโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค พบว่าทั้งสองโครงสร้างมีตำแหน่งการวางตัวที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงใน**รูปที่ 1**

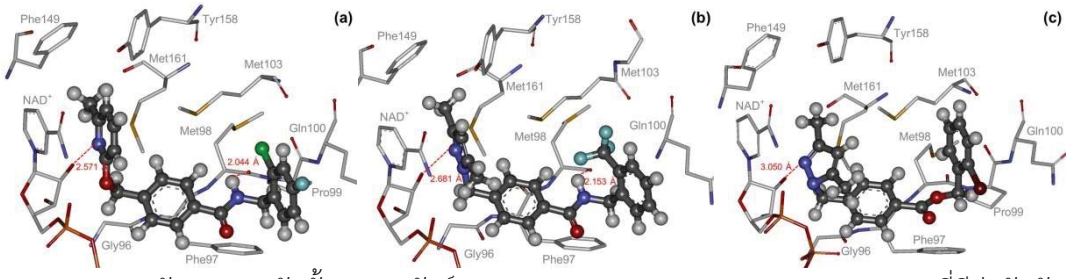


รูปที่ 1 การซ้อนทับกันของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ระหว่างลิแกนด์ผลึกทางเอ็กซเรย์ (สีเขียว) และโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณ (สีแดง) ของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ชนิดดั้งเดิม

1.2) วิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในโพรงเอนไซม์ InhA

สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA สูงที่สุด เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดคือ **สารหมายเลข 19** มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02 μM มีรูปแบบการวางตัว แสดงดังใน**รูปที่ 2 (a)** พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 มีระยะห่าง 2.044 อังสตรอม และอะตอมไนโตรเจนของวงไพริดีนกับหมู่ไฮดรอกซิลของโคแฟเตอร์ NAD^+ มีระยะห่าง 2.571 อังสตรอม นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Phe97, Phe149, Tyr158 และ Met161 สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA ปานกลาง เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง คือ **สารหมายเลข 25** ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 1.00 μM มีรูปแบบการวางตัว ดังแสดงใน**รูปที่ 2 (b)** พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมของออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 โดยมีระยะห่าง 2.153 อังสตรอม และอะตอมไนโตรเจนของวง 3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl กับหมู่ไฮดรอกซิลของโคแฟเตอร์ NAD^+ มีระยะห่าง 2.681 อังสตรอม นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Phe97, Phe149, Tyr158 และ Met199 สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA ต่ำสุด เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำสุด คือ **สารหมายเลข 38** ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 6.10 μM มีรูปแบบการวางตัว แสดงดังใน**รูปที่ 2 (c)** พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไนโตรเจนของวง 3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl กับหมู่ไฮดรอกซิลของโคแฟเตอร์ NAD^+ มีระยะห่าง 3.050 อังสตรอม นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Tyr158, Met161, Ala198, Met199 และ Ile202

จากการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ปานกลาง และต่ำสุด พบว่า**สารหมายเลข 19** และ**สารหมายเลข 25** ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดและปานกลาง ตามลำดับ ซึ่ง**สารหมายเลข 19** เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงมากกว่า**สารหมายเลข 25** จึงส่งผลให้**สารหมายเลข 19** มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ที่สูงกว่า**สารหมายเลข 25** และ**สารหมายเลข 38** เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนจำนวนน้อยกว่าและไม่แข็งแรง จึงส่งผลให้**สารหมายเลข 38** มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ต่ำที่สุด

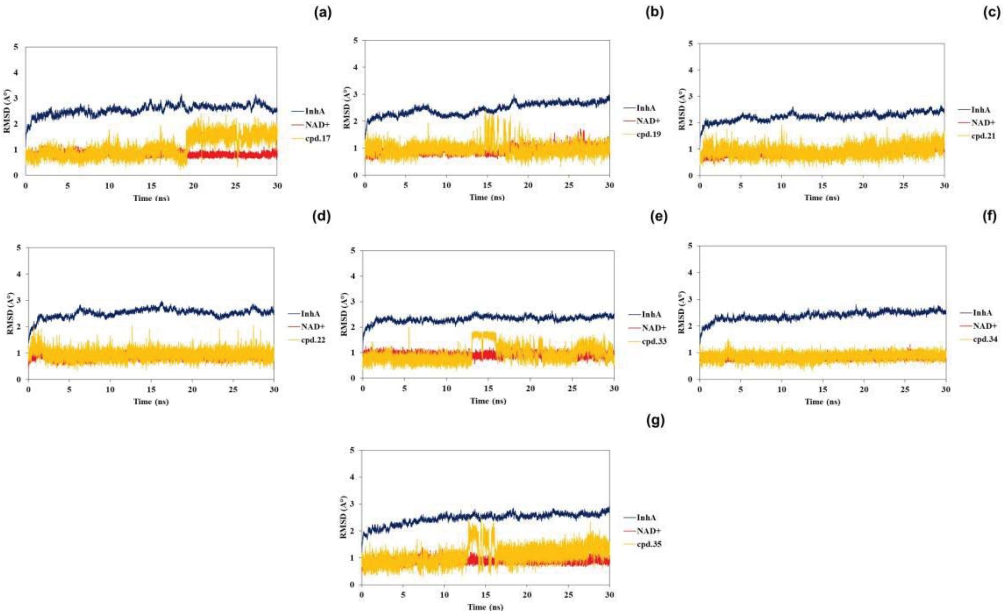


รูปที่ 2 รูปแบบการจับของสารยับยั้งสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide **สารหมายเลข 19** ที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA สูง (a) **สารหมายเลข 25** ที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA ปานกลาง (b) และ**สารหมายเลข 38** ที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA ต่ำ (c) ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

2) ผลการศึกษาสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ด้วยระเบียบวิธีวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

2.1) ความเสถียรภาพและการคำนวณหาค่าพลังงานการจับอิสระของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA

จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลโดยการคำนวณ RMSD ของทุกอะตอมของเอนไซม์ InhA โคแฟกเตอร์ NAD^+ และสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide พบว่าในแต่ระบบมีการเปลี่ยนของสารประกอบ เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างจากโครงสร้างเริ่มต้น ดังแสดงใน**รูปที่ 3** จะเห็นได้ว่าโครงสร้างเอนไซม์ InhA โคแฟกเตอร์ NAD^+ และสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในทุกระบบมีค่า RMSD ค่อนข้างเสถียรตั้งแต่เวลา 2 ns จนถึง 30 ns และมีค่า RMSD เฉลี่ยในช่วง 0.5-3.0 อังสตรอม ดังนั้นผู้วิจัยได้นำเอาค่าเฉลี่ยในช่วงเวลา 5 ns สุดท้ายมาทำการคำนวณหาค่าพลังงานการจับอิสระของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ดังแสดงใน**ตารางที่ 2** และเมื่อทำการฟลอตกราฟหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังการจับอิสระที่ได้จากการทดลองและการคำนวณ พบว่า ได้ค่าความสัมพันธ์ (r^2) 0.8642 ดังแสดงใน**รูปที่ 4**

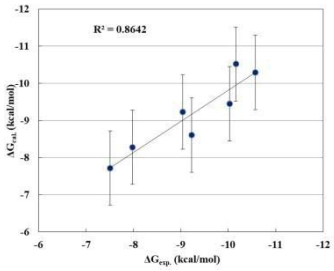


รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของ**สารหมายเลข 17** (a) **สารหมายเลข 19** (b) **สารหมายเลข 21** (c) **สารหมายเลข 22** (d) **สารหมายเลข 33** (e) **สารหมายเลข 34** (f) และ**สารหมายเลข 35** (g)

ตารางที่ 2 การคำนวณค่าพลังงานการจับอิสระในหน่วย kcal/mol โดยวิธี MM-PBSA (n=100 snapshot)

สารหมายเลข	IC_{50} (μM)	ΔH	TΔS	ΔG_{cal}	ΔG_{exp} [a]
17	0.05	-31.26±3.61	-21.82±5.47	-9.45±3.85	-10.03
19	0.02	-30.34±3.03	-20.05±4.43	-10.29±3.62	-10.57
21	0.19	-29.61±3.48	-21.00±4.85	-8.61±3.67	-9.23
22	0.04	-38.93±3.22	-28.41±4.58	-10.52±3.51	-10.16
33	3.40	-34.07±3.33	-26.35±6.33	-7.72±5.22	-7.51
34	1.55	-39.88±4.00	-31.60±5.22	-8.28±4.01	-7.98
35	0.26	-34.75±3.36	-25.52±4.69	-9.23±3.56	-9.04

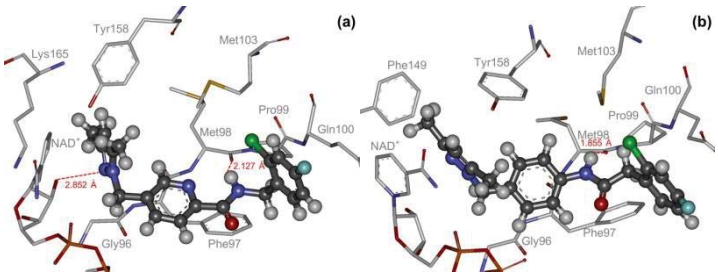
[a] ΔG_{exp}=RT ln[IC_{50}], เมื่อ R = 1.988 cal/mol K และ T = 300 K



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานการจับอิสระจากการทดลองและค่าพลังงานการจับจากการคำนวณ

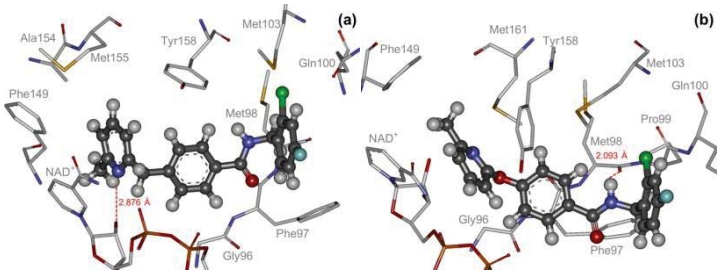
2.2) ตำแหน่งการวางตัวและอันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA

ตำแหน่งการวางตัวระหว่างสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันตรงตำแหน่งของ picolinamide ของ**สารหมายเลข 21** และ *N*-phenylformamide ของ**สารหมายเลข 22** จะเห็นได้ว่ามีตำแหน่งการวางตัวของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่แตกต่างกัน **สารหมายเลข 21** มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.19 μM มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังใน**รูปที่ 5 (a)** เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 ด้วยระยะห่าง 2.127 อังสตรอม และอะตอมไนโตรเจนของวง 3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl กับหมู่ไฮดรอกซิลของโคแฟกเตอร์ NAD^+ ระยะห่าง 2.852 อังสตรอม นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Met161 **สารหมายเลข 22** มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.04 μM มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังใน**รูปที่ 5 (b)** จากผลการศึกษาพบ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 ระยะห่าง 1.855 อังสตรอม และพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Met161, Ala198 และ Ala201 จาก**สารหมายเลข 21** และ**สารหมายเลข 22** ที่มีความแตกต่างกันระหว่างหมู่ picolinamide และ *N*-phenylformamide ตามลำดับ ส่งผลให้มีตำแหน่งการวางตัวของสารทั้งสองหมายเลขและประประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA แตกต่างกัน จากผลการศึกษา พบว่า **สารหมายเลข 22** เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงและอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่มากกว่า**สารหมายเลข 21** จึงส่งผลให้**สารหมายเลข 22** มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ดีกว่า**สารหมายเลข 21**



รูปที่ 5 ตำแหน่งการวางตัวและอันตรกิริยาของ**สารหมายเลข 21** (a) และ**สารหมายเลข 22** (b) ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA

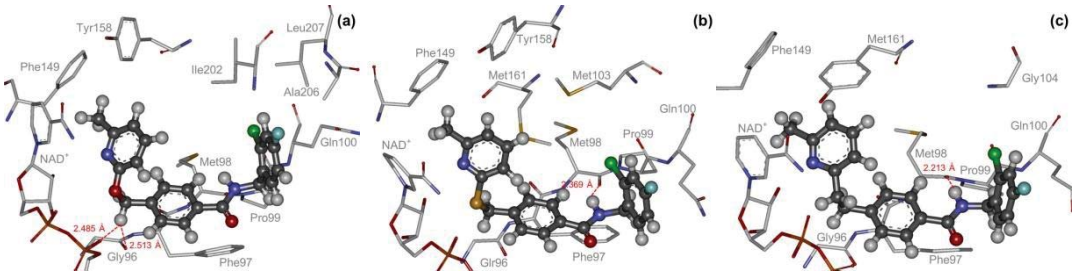
ตำแหน่งการวางตัวระหว่างสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันตรงตำแหน่งของหนึ่งอะตอมในสายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน **สารหมายเลข 17** สายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน คือ มีเทน (-CH_2-) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.05 µM และ**สารหมายเลข 33** สายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน คือ อะตอมออกซิเจน (-O-) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 3.40 µM และสารทั้งสองหมายเลขมีตำแหน่งการวางตัวดังแสดงใน**รูปที่ 6** จากผลการศึกษา พบว่า **สารหมายเลข 17** เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไอโดรเจนของวงไพริดีนกับโคแฟกเตอร์ NAD^+ ระยะห่าง 2.876 อังสตรอม และอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Met98, Met161, Leu197 และ Ala201 สำหรับ**สารหมายเลข 33** เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 ด้วยระยะห่าง 2.093 อังสตรอม และยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Tyr158 และ Leu207 จากผลการศึกษา พบว่า **สารหมายเลข 17** เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่มากกว่า**สารหมายเลข 33** ดังนั้นจึงส่งผลให้**สารหมายเลข 17** มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้ดีกว่า**สารหมายเลข 33**



รูปที่ 6 ตำแหน่งการวางตัวและอันตรกิริยาของ**สารหมายเลข 17** (a) และ**สารหมายเลข 33** (b) ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA

ตำแหน่งการวางตัวระหว่างสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันตรงตำแหน่งของสองอะตอมในสายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน **สารหมายเลข 19** สายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน คือ เมธทาโนน (-OCH_2-) มีค่า IC_{50} 0.02 µM พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของเมธทาโนน (-OCH_2-) กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Gly96 และโคแฟกเตอร์ NAD^+ ระยะห่าง 2.513 และ 2.485 อังสตรอม ตามลำดับ นอกจากนั้นยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Tyr158, Met161 และ Ala198 **สารหมายเลข 35** สายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน คือ เมธทิลไทโอ (-SCH_2-) มีค่า IC_{50} 0.26 µM จากการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญ พบว่า เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 ระยะห่าง 2.369 อังสตรอม นอกจากนั้นยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Met161 และ Ile202 **สารหมายเลข 34** สายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน คือ อีเทน (-CH_2CH_2-) มีค่า IC_{50} 1.55 µM พบว่า เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 ระยะห่าง 2.213 อังสตรอม และอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับ

กรดอะมิโน Phe149 และ Met199 จากผลการศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นของสารทั้งสามหมายเลข พบว่า **สารหมายเลข 19** ที่เป็นสารโซ่ประกอบด้วยอะตอมที่มีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูงจะเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่มากกว่า**สารหมายเลข 35** และ**สารหมายเลข 34** ดังนั้นจึงส่งผลให้**สารหมายเลข 19** มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้ดีกว่า**สารหมายเลข 35** และ**สารหมายเลข 34**



รูปที่ 7 ตำแหน่งการวางตัวและอันตรกิริยาของ**สารหมายเลข 19** (a) **สารหมายเลข 35** (b) และ**สารหมายเลข 34** (c) ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA

3) ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสามมิติของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งด้วย ระเบียบวิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (CoMSIA) โดยศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเชื้อเอนไซม์ InhA ของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide จำนวน 39 โครงสร้าง โดยแยกเป็นชุดสร้างแบบจำลอง (training set) จำนวน 33 โครงสร้าง และชุดทดสอบ (test set) 6 โครงสร้าง พบว่า แบบจำลอง CoMSIA ที่ดีที่สุด คือ แบบจำลองที่มีค่า r_{cv}^2 และค่า r^2 เท่ากับ 0.500 และ 0.965 ตามลำดับ ซึ่งมีส่วนร่วมของสนามสเตอริก สนามอิเล็กโตร-สแตติก สนามไฮโดรโฟบิก และสนามไฮโดรเจนแอคเซปเตอร์ เป็น 10.0 %, 395 %, 31.6 % และ 18.9 % ตามลำดับ ดังแสดงใน**ตารางที่ 3** ผลการศึกษานี้ ค่าความสามารถในการทำนาย (predictive ability) ของแบบจำลองที่ได้ต่ำกว่า 0.600 แสดงให้เห็นว่าแบบจำลอง CoMSIA ที่ได้นี้ไม่สามารถอธิบายความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและไม่สามารถนำไปใช้ในการออกแบบสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้นได้

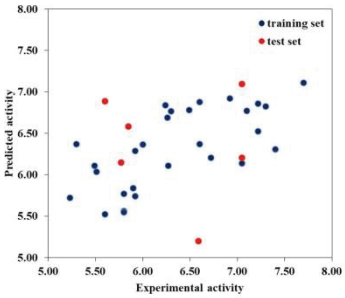
ตารางที่ 3 ผลทางสถิติของแบบจำลอง CoMSIA ของอนุพันธ์ heteroaryl benzamide

model	Statistical parameters						
	r_{cv}^2	r^2	N	S_{press}	SEE	F	Fraction
S/E/H/A	0.500	0.965	5	0.556	0.151	100.608	10.0/39.5/31.6/18.9

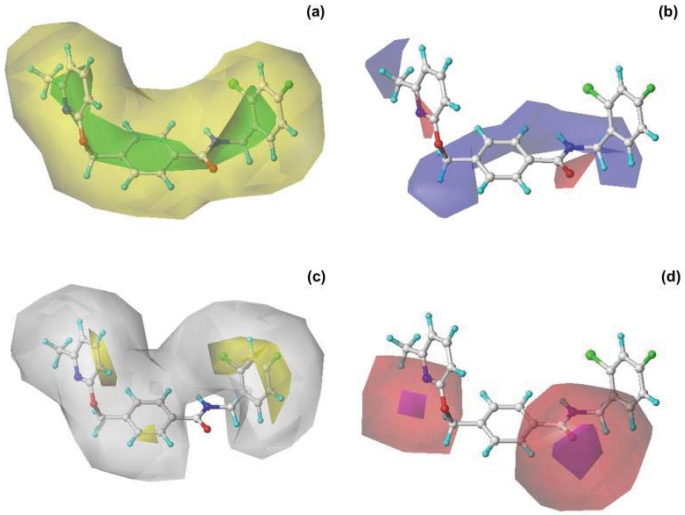
r_{cv}^2; non-cross-validation, r^2; cross-validation, N; Optimum number of components, S_{press}; Standard error of prediction, SEE; Standard error of estimate, F; F Value, S; steric field, E; electrostatic field, H; Hydrophobic field, D; Hydrogen Donor field, A; Hydrogen Acceptor field

จากแบบจำลอง CoMSIA ของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่ดีที่สุด พบว่า ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่ได้จากการทำนายไม่ใกล้เคียงกับการทดลองแสดงโดยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจากการทดลองและการทำนาย ดังแสดงใน**รูปที่ 8** ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าแบบจำลอง QSAR ของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ไม่มีความน่าเชื่อถือเพียงพอในการทำนายค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจากการคำนวณและผลแผนภาพคอนทัวร์ใน**รูปที่ 9** ไม่สามารถชี้แนะถึงความต้องการทางโครงสร้างที่สำคัญของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ได้ เนื่องจากแผนภาพคอนทัวร์ที่ได้ของสนามสเตอริก สนามไฮโดรโฟบิก และสนามไฮโดรเจนแอคเซปเตอร์ นั้นมีลักษณะที่ใหญ่และไม่แยกเป็น

แต่ละความต้องการทางโครงสร้าง ดังนั้นจึงไม่สามารถที่จะชี้แนะถึงความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ได้



รูปที่ 8 กราฟที่พลอตระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่ได้จากการทดลองกับค่าจากการทำนายของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ด้วยวิธี CoMSIA



รูปที่ 9 แผนภาพคอนทัวร์ CoMSIA ในสนามสเตอริก (**a**) สนามอิเล็กโตรสแตติก (**b**) สนานไฮโดรโฟบิก (**c**) และสนามโฮโดรเจนแอคเซปเตอร์ (**d**)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการออกแบบโมเลกุลด้วยคอมพิวเตอร์โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง ระเบียบวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลและการศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสามมิติของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ทำให้เข้าใจถึงรูปแบบการวางตัวและอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นของโครงสร้างที่มีผลต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA นอกจากนี้ พบว่ากรดอะมิโน Met98 คือกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญกับสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นแนวทางสำคัญสำหรับการออกแบบสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นเพื่อใช้เป็นสารต้านเชื้อ*ไมโครแบคทีเรียมทูเบอร์คูโลซิส*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (**RSA**5980057) ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (**PERCH-CIC**) สำหรับเงินทุนสนับสนุนทุนการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติสำหรับการสนับสนุนโปรแกรมและเครื่องมือในการคำนวณ

เอกสารอ้างอิง

Frisch, M. J. et al., (2009). Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc. *Wallingford CT*.

Graham, A. W. et al., (2005). Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nature Reviews Immunology published*, 5(8), 661-667.

Guardia, A. et al., (2016). N-Benzyl-4-((heteroaryl)methyl)benzamides: A New Class of Direct NADH-Dependent 2-trans Enoyl–Acyl Carrier Protein Reductase (InhA) Inhibitors with Antitubercular Activity. *ChemMedChem*, 11(7), 687-701.

Hou, T. et al., (2011). Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(1), 69-82.

Kaledin, M. et al., (2004). Normal Mode Analysis Using the Driven Molecular Dynamics Method. Ii. An Application to Biological Macromolecules. *The Journal of Chemical Physics*, 121(12), 5646-5653.

Morris, G. M. et al., (2009). Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(1), 2785-2791.

Nadine, H. and Holger, G. (2012). Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area Method. *Molecular Informatics*, 31(1), 114-122.

Rozwarski, D. A. et al., (1998). Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 279(53747), 98-102.

Rozwarski, D. A. et al., (1999). Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD^+ and a C16 fatty acyl substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15582-15589.

Wang, J. et al., (2001). Use of Mm-Pbsa in Reproducing the Binding Free Energies to Hiv-1 Rt of Tibo Derivatives and Predicting the Binding Mode to HIV-1 RT of Efavirenz by Docking and MM-PBSA. *Journal of the American Chemical Society*, 123(22), 5221-5230.

Wang, J. et al., (2006). Recent Advances in Free Energy Calculations with a Combination of Molecular Mechanics and Continuum Models. *Current Computer-Aided Drug Design,* 2(3), 287-306.

World Health Organization. (2017). *Global Tuberculosis Report 2017*. accessed April 26, 2018. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

การออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณของสารอนุพันธ์ 4 aminoquinolone piperidine amide ซึ่งมีศักยภาพสูงในการยับยั้งโรควัณโรค

Computer Aided Molecular Design of 4-aminoquinolone piperidine amides Derivatives as Highly Potent Anti-Tuberculosis Agents

ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์[1*] นฤดล ภูศรี[1] พฤทธิ์ คำศรี[2] อรดี พันกว้าง[2] กัมปนาท ฉายจรัส[1] นิธิมา สุทธิพันธุ์[3]
พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์[4] สุภา หารหนองบัว[4] คมสันต์ สุทธิสินทอง[5] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[1*]
[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม
[3]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[4]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[5]ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย
[*]E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

บทคัดย่อ

โรควัณโรคเกิดจากเชื้อไมโครแบคทีเรียมทูเบอร์คูโลซิส (Mycobacterium tuberculosis) เอนไซม์ดีคาร์พรีนิลฟอสโฟริล-เบต้า-ดี-ไรโบส-2-อิพิเมอเรส (DprE1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ arabinogalactan ที่ผนังเซลล์ของไมโครแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส และยังถูกค้นพบว่าเป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับการพัฒนาเป็นยับยั้งโรควัณโรค สารอนุพันธ์ 4 aminoquinolone piperidine amide เป็นสารยับยั้งโรควัณโรคชนิดนอนโควาเลนต์ สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ถูกพัฒนาเพื่อเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 อย่างไรก็ตาม สารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ชนิดพัฒนาขึ้นมายังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ระเบียบวิธี 3D-QSAR การคำนวณโมเลคูลาร์ด็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล และการคำนวณ fragment molecular orbital (FMO) ถูกประยุกต์ใช้เพื่อทำให้ทราบถึงความต้องการทางโครงสร้างและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้เข้าใจถึงความต้องการทางโครงสร้างรูปแบบการจับ และอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide เพื่อใช้เป็นแนวทางในการออกแบบสารยับยั้งโรควัณโรคให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

คำสำคัญ : เอนไซม์ดีคาร์พรีนิลฟอสโฟริล-เบต้า-ดี-ไรโบส-2-อิพิเมอเรส ไมโครแบคทีเรียมทูเบอร์คูโลซิส 3D-QSAR การคำนวณโมเลคูลาร์ด็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล การคำนวณ fragment molecular orbital

Abstract

Tuberculosis (TB) is caused by Mycobacterium tuberculosis. Decaprenyl phosphoryl-β-D-ribose oxidase (DprE1) involved in arabinogalactan biosynthesis partway of *M. tuberculosis* cell wall has been identified as a promising target for anti-tuberculosis drug developments. A group of 4 aminoquinolone piperidine amide derivatives were identified as noncovalent DprE1 inhibitors. These compounds were modified to increase their inhibitory activities against DprE1 as well as *M. tuberculosis*. However, these DprE1 enzyme inhibitors are not efficient. Therefore, in this research 3D-QSAR, molecular docking calculations, molecular dynamic simulations, and fragment molecular orbitals were performed to elucidate the structural requirements and crucial interaction of 4 aminoquinolone piperidine amide derivatives. These results lead to better understanding of the

structural requirement of 4-aminoquinolone piperidine amide derivatives for designing effective anti-tuberculosis agents.

Keywords : Decaprenyl phosphoryl-β-D-ribose oxidase (DprE1), *M. tuberculosis*, 3D-QSAR Molecular Docking Calculations, Molecular Dynamic Simulations, Fragment Molecular Orbitals Approach

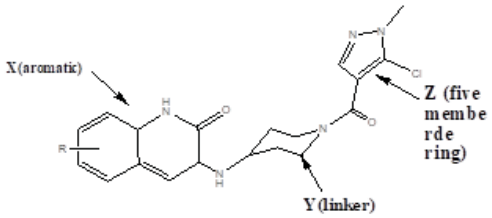
บทนำ

ปัจจุบันวัณโรคเป็นโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุหลักการตายของประชากรทั่วโลก เนื่องจากปัญหาการดื้อยาทำให้ผู้ป่วยวัณโรคไม่ตอบสนองต่อตัวยาหลักที่ใช้รักษาในปัจจุบัน [1] อีกทั้งยังมีการแพร่ระบาดของโรควัณโรคในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์อย่างรวดเร็ว ซึ่งการรักษาวัณโรคในผู้ป่วยกลุ่มนี้มีความซับซ้อนมากขึ้นไม่สามารถรักษาด้วยวิธีมาตรฐานได้อีกต่อไป ดังนั้น การแพร่ระบาดของวัณโรคจึงยังคงมีอยู่ในปัจจุบันและยังเป็นปัญหาหลักทางด้านสุขภาพของประชากรทั่วโลกโดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา จากปัญหาการดื้อยาของวัณโรคทำให้ตัวยาที่ใช้ในปัจจุบันไม่สามารถใช้รักษาวัณโรคได้อีกต่อไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาและพัฒนายาตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งวัณโรค กลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนายาตัวใหม่คือการค้นหาตัวยาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่จำเป็นของเชื้อแบคทีเรีย *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุของวัณโรค โดยมีหลักการคือ ยาที่พัฒนาขึ้นมาได้ควรจะมีกลไกการออกฤทธิ์ใหม่หรือสามารถจับกับเป้าหมายใหม่ หรือยาที่พัฒนาขึ้นมาสามารถจับกับเป้าหมายเก่าได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เอนไซม์ DprE1 เป็นสารยับยั้งเชื้อวัณโรคชนิดใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้พบในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ decaprenylphosphoryl-d-arabinose (DPA) ในผนังเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาอิพิเมอไรเซชัน [2] ทำให้เอนไซม์ DprE1 เป็นส่วนประกอบสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์ ดังนั้นจึงทำให้เอนไซม์ DprE1 เป้าหมายสำคัญที่จะทำการพัฒนาไปเป็นยารักษาวัณโรคตัวใหม่ที่มีศักยภาพสูงได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำเอาระเบียบวิธีทางด้านการจำลองแบบโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการศึกษา ออกแบบและค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 โดยสนใจที่จะทำการพัฒนาสารอนุพันธ์ในกลุ่มของ 4-aminoquinolone piperidine amide ให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรควัณโรคได้สูงขึ้น โดยในงานวิจัยนี้ได้นำเอาวิธีการจำลองแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณ โดยใช้ระเบียบวิธีการออกแบบโมเลกุลเชิงโครงสร้าง (Structure based drug design) และระเบียบวิธีการออกแบบโมเลกุลเชิงลิแกนด์ (Ligand based drug design) ซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงความต้องการทางโครงสร้าง รูปแบบการจับ และอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างเอนไซม์กับสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในโพรงการจับ โดยใช้ระเบียบวิธี 3D-QSAR การคำนวณโมเลคูลาร์ด็อกกิ้ง และการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล มาใช้ในการศึกษาเพื่อออกแบบสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ที่สูงขึ้น โดยผู้วิจัยคาดหวังว่างานวิจัยนี้จะทำให้ได้สารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์ DprE1 และเชื้อแบคทีเรีย *M. Tuberculosis* นอกจากนี้ยังทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญทางด้านโครงสร้าง อันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างสารยับยั้งกับเอนไซม์ ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการออกแบบและพัฒนาสารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง

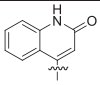
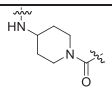
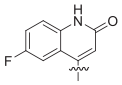
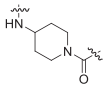
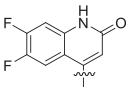
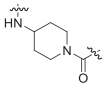
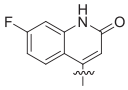
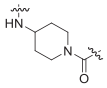
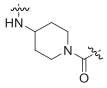
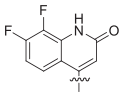
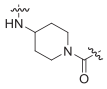
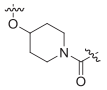
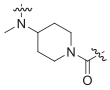
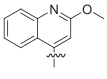
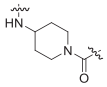
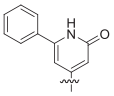
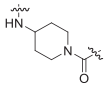
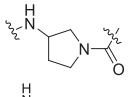
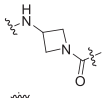
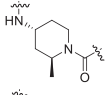
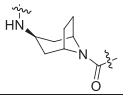
วิธีการวิจัย

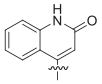
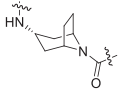
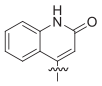
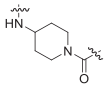
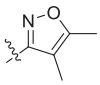
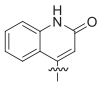
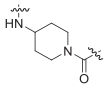
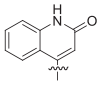
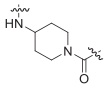
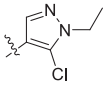
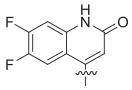
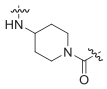
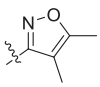
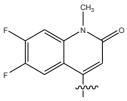
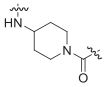
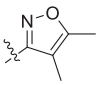
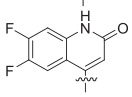
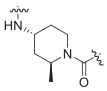
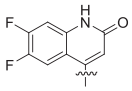
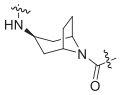
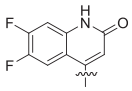
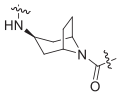
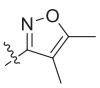
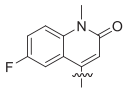
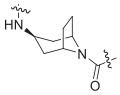
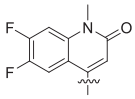
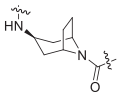
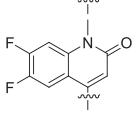
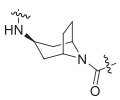
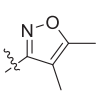
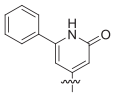
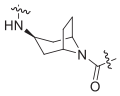
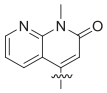
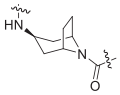
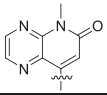
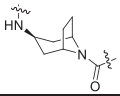
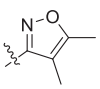
1. รวบรวมโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide



โครงสร้างทั่วไปของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide

ตารางที่ 1 โครงสร้างและค่ากัมมันตภาพทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ทั้ง 29 โครงสร้าง

No	X (Aromatic ring)	Y (Linker)	Z (Five membered ring)	IC_{50} (μM)	$\log(1/IC_{50})$
1*				0.04	7.40
2				0.005	8.30
3				0.006	8.22
4				0.007	8.15
5				0.011	7.96
6				0.009	8.25
7				8	5.10
8				18	4.74
9*				78	4.11
10				3	5.52
11				4.7	5.33
12				1.8	5.74
13				0.026	7.59
14				0.030	7.52

No	X (Aromatic ring)	Y (Linker)	Z (Five membered ring)	IC_{50} (μM)	$log(1/IC_{50})$
15				43	4.37
16				<0.006	8.22
17*				0.011	7.96
18				0.045	7.45
19				0.018	7.74
20				0.038	7.42
21				0.021	7.68
22				0.009	8.05
23				0.007	8.15
24				0.012	7.92
25				0.008	8.10
26				0.017	7.77
27				0.058	7.53
28				0.026	7.59
29*				0.183	6.74

*test set

2. การศึกษาความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ด้วยระเบียบวิธี 3D-QSAR

การศึกษาความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide โดยใช้ระเบียบวิธี 3D-QSAR (CoMSIA) ในงานวิจัยนี้สารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ทั้งสิ้น 29 โครงสร้างถูกทำการปรับเสถียรด้วยโปรแกรม Guassian 09 และทำการ alignment ด้วยโปรแกรม MOE โดยทำ

การแบ่งสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ออกเป็น 2 กลุ่มคือ training จำนวน 25 โครงสร้าง และ test set จำนวน 4 โครงสร้าง จากนั้นทำการคำนวณโดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์ PLS แล้วทำการแปลผลสมการในรูปแบบแผนภาพคอนทัวร์

3. การคำนวณโมเลคูลาร์ด็อกกิ้ง

รวบรวมข้อมูลทางโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของเอนไซม์ DprE1 ของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ซึ่งแสดงดังตารางที่ 1 จากการสืบค้นเอกสารบนฐานข้อมูลต่างๆ ปรับโครงสร้างให้เสถียรที่สุดด้วยระเบียบวิธีการคำนวณเคมีควอนตัม ab-initio (M062X/6-31G*) โดยใช้โปรแกรม Gaussius 09 ทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.02 ศึกษารูปแบบการจับตัวกันของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ภายในโพรงการจับเอนไซม์ DprE1 (PDB Code: 4P8L) ด้วยวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง วิเคราะห์ผลการศึกษาและสรุปผลการศึกษา

4. การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

การศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตเชิงโมเลกุลด้วยวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน (molecular dynamics simulatioNS) ดูค่าการจับของสารยับยั้งกับเป้าหมายด้วยโปรแกรม AMBER12 ระบบที่ศึกษาเป็นแบบ Canonical การศึกษาทั้งหมดได้กำหนดให้ปริมาตรของระบบคงที่ และอุณหภูมิคงที่ที่ 300 K เป็นตัวควบคุม โดยใช้ ff03 สำหรับพารามิเตอร์ที่อธิบายโปรตีน ใช้ RESP จากการคำนวณโดยวิธี M062X/6-31G* โมเลกุลของน้ำชนิด TIP3P ได้ถูกเติมเข้าไปในทุกระบบที่ใช้ในการศึกษาโมเลคิวลาร์ ไดนามิกส์ ซิมูเลชัน ในการกำหนดสนามแรงของลิแกนด์ และได้มีการกำหนด non-bonded cutoff ให้มีค่าเท่ากับ 10 Å และใช้ SHAKE method ช่วยในการ constrain อะตอมทั้งหมด สำหรับ time step ที่ใช้มีค่าเท่ากับ 2 fs ค่าพลังงานในการจับของสารยับยั้งที่จับกับเอนไซม์ เป้าหมาย คำนวณโดยระเบียบวิธี MM-PBSA

5. การคำนวณ fragment molecular orbital (FMO)

การคำนวณ FMO โดยใช้ระเบียบวิธี MP2 / 6-31G* เพื่อศึกษาโครงสร้างทางอิเล็กทรอนิกส์และอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างเอนไซม์ DprE1 กับสารยับยั้ง โดยใช้โปรแกรม *ab initio* FMO ABINIT-MP ver.6.0 เพื่อลดระยะเวลาในการคำนวณ จึงใช้โมเลกุลของน้ำภายในระบบของแต่ละลิแกนด์ที่ 8 Å (78 โมเลกุล) สำหรับการคำนวณ FMO การจับกันระหว่างกรดอะมิโนแต่ละตัวและลิแกนด์ สามารถใช้อธิบายถึงอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่าง fragment ของ DprE1 และลิแกนด์ ในขณะที่ FAD หรือโคแฟกเตอร์ ถูกแบ่งออกเป็นสามส่วนคือ flavin ring, diphosphate ที่เชื่อมโยงกับ D-ribital และ adenine deoxyribose ประจุของ DprE1, FAD และลิแกนด์คือ 0, -2 และ 0 ตามลำดับ พลังงานอันตรกิริยาของแต่ละส่วน (IFIE) เป็นพลังงานที่เกิดขึ้นระหว่างอันตรกิริยาของเอนไซม์ DprE1 โคแฟกเตอร์ ลิแกนด์ และโมเลกุลของน้ำ [4] ผลที่ได้จากการศึกษาด้วยระเบียบวิธี FMO calculations จะได้พลังงานอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์ DprE1 กับสารยับยั้งในระดับอิเล็กตรอน นอกจากนี้พลังงานรวม (TEs) ของโปรตีนโคแฟกเตอร์ และ ลิแกนด์ถูกนำมาคำนวณเพื่อหาพลังงานในการจับ (BE) โดยพลังงานในการจับสามารถหาได้จากสมการที่ 1 และ 2

$$BE = TE_{complex} - TE_{receptor} - TE_{ligand} - TE_{water} \quad (1)$$

$$BE = TE(DprE1 + FAD+ + AQ + water) - TE(DprE1 + FAD+ + water) - TE(AQ + water) + TE(water) \quad (2)$$

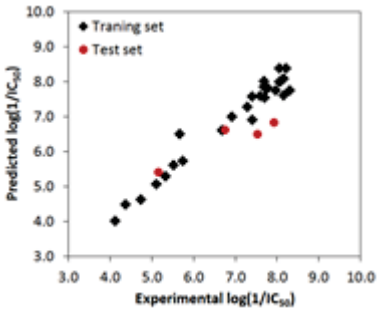
ผลการวิจัย

1. การศึกษาความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ด้วยระเบียบวิธี 3D-QSAR

ผลที่ได้จากการศึกษาความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ด้วยระเบียบวิธี 3D-QSAR พบว่าแบบจำลองที่ดีที่สุดมีค่าความสามารถในการทำนายเท่ากับ 0.62 ประกอบไปด้วยตัวอธิบายโมเลกุลคือ สนาม steric, สนาม electrostatic, สนาม hydrophobic และสนาม H-bond donor ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การมีส่วนร่วม คือ 8.2 % 37.9 %, 22.5 % และ 31.1 %, ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ตารางแสดงค่าสถิติของแบบจำลอง QSAR

แบบจำลอง	พารามิเตอร์เชิงสถิติ						เปอร์เซ็นต์การมีส่วนร่วม
	q^2	r^2	N	S	SEE	F	
S/E/H/D	0.62	0.96	6	0.92	0.31	76.52	8.2/37.9/22.5/31.1



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัมมันตภาพทางชีวภาพที่ได้จากการคำนวณและค่าที่ได้จากการทดลอง

การแปลผลสมการ

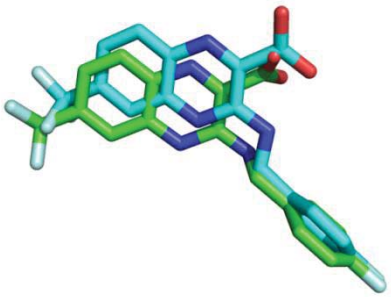
ผลการศึกษาคอมเซียจะแสดงอันตรกิริยาของตัวยับยั้งที่มีผลต่อเอนไซม์ DprE1 พบว่าคอนทัวร์ steric **(**รูป 3 ก.**)** บริเวณคอนทัวร์สีเหลืองคือไม่ชอบความเกะกะ ผลจากการศึกษาพบคอนทัวร์สีเหลืองที่บริเวณรอบหมู่เอริล แสดงว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ควรเป็นหมู่ขนาดเล็ก คอนทัวร์ electrostatic **(**รูปที่ 3 ข.**)** พบว่าคอนทัวร์สีแดงที่บริเวณวงเอริล แสดงว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ควรมีคุณสมบัติเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน คอนทัวร์ hydrophobic **(**รูปที่ 3 ค.**)** แสดงให้เห็นว่ามีคอนทัวร์สีเทาที่บริเวณวงอะโรมาติกและวงเอริล ดังนั้นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ควรมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก คอนทัวร์ H-bond donor (รูปที่ 3 ง.) พบว่ามีคอนทัวร์มีฟ้าขึ้นที่ตำแหน่งไนโตรเจนของวงอะโรมาติก จากผลการศึกษาความต้องการโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide สามารถสรุปได้ว่าหมู่แทนที่ของสารยับยั้งตัวใหม่ควรมีคุณสมบัติเป็นหมู่แทนที่ขนาดเล็ก มีคุณสมบัติเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนและมีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่สูงเพื่อทำให้สารยับยั้งตัวใหม่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ได้ดีขึ้น

รูปที่ 2 แผนภาพคอนทัวร์ (ก) สนาม steric **(**ข**)** สนาม electrostatic
(ค) สนาม hydrophobic **(**ง**)** สนาม H-bond donor

2. การคำนวณโมเลคูลาร์ด็อกกิ้ง

2.1. ผลการตรวจสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.02

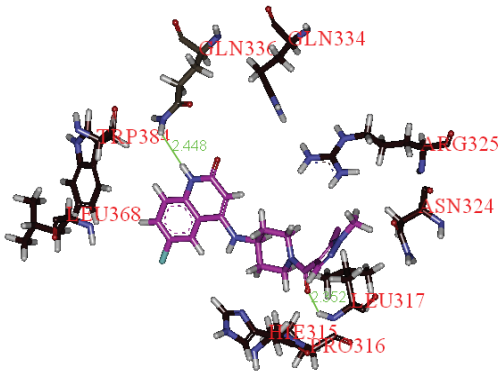
ผลจากการเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 พบว่าในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 ของเชื้อวัณโรคให้ค่า RMSD เท่ากับ 1.15 อังสตรอม จากการซ้อนทับกันระหว่างโครงสร้างผลึกทางเอ็กซเรย์กับโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 พบว่าทั้งสองโครงสร้างมีตำแหน่งการวางตัวใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ลิแกนด์ผลึกทางเอ็กซเรย์ (สีเขียว) และโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณ (สีฟ้า) ของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1

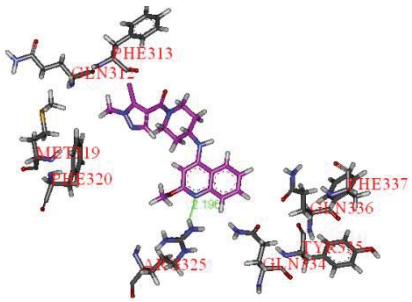
2.2 การวิเคราะห์อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด คือ สารหมายเลข **2** ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.005 µM มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 4 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณอะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติกกับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน Gln336 และหมู่คาร์บอกซิลิกของหมู่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโน Leu317 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาแบบไพของวงอะโรมาติกกับวงอะโรมาติกของโคแฟคเตอร์ (FAD)



รูปที่ 4 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide สารหมายเลข **2** ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 ที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

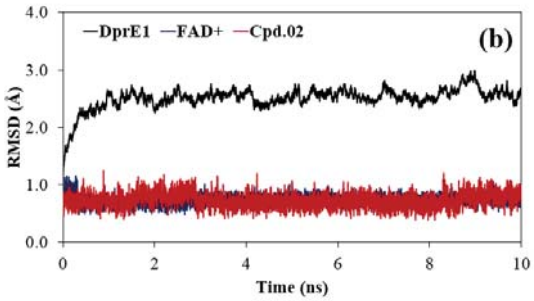
เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำสุด คือ สารหมายเลข **9** ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 78 µM มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 5 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณอะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติกกับกรดอะมิโน Arg325 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาแบบไพของวงอะโรมาติกกับวงอะโรมาติกของโคแฟคเตอร์



รูปที่ 5 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide สารหมายเลข **9** ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 ที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

3. การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล (Molecular dynamic stimulation model)

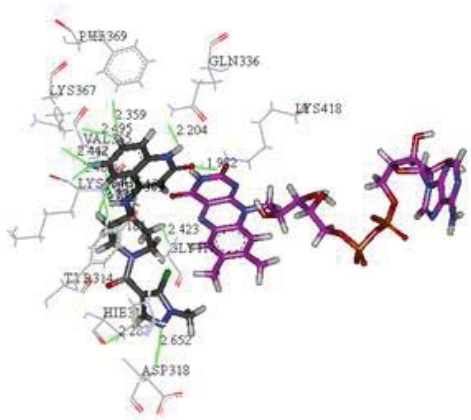
เพื่อตรวจสอบความน่าเชื่อถือของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 ด้วยระเบียบวิธีการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล ผลจากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการพล็อตกราฟ RMSD ระหว่างเอนไซม์ DprE1 โคแฟกเตอร์ และสารหมายเลข **2** พบว่าระบบเข้าสู่สมดุลหลังจากผ่านไป 2 ns ดังแสดงในรูปที่ 6 จากรูปพบว่าระบบมีความเสถียรและมีความน่าเชื่อถือสำหรับนำไปศึกษารูปแบบการจับและรูปแบบการวางตัวและการคำนวณพลังงานการจับ



รูปที่ 6 แสดง RMSD ของสารหมายเลข **2** ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1

1. การวิเคราะห์อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 ด้วยระเบียบการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดคือสารหมายเลข **2** ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.005 μM มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 7 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญคือ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณอะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติกกับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน Gln336 และหมู่คาร์บอกซิลิกของหมู่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโน Leu317 และ Lys418 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาแบบไพของวงอะโรมาติกกับวงอะโรมาติกของโคแฟคเตอร์ซึ่งสอดคล้องกับรูปที่ 4

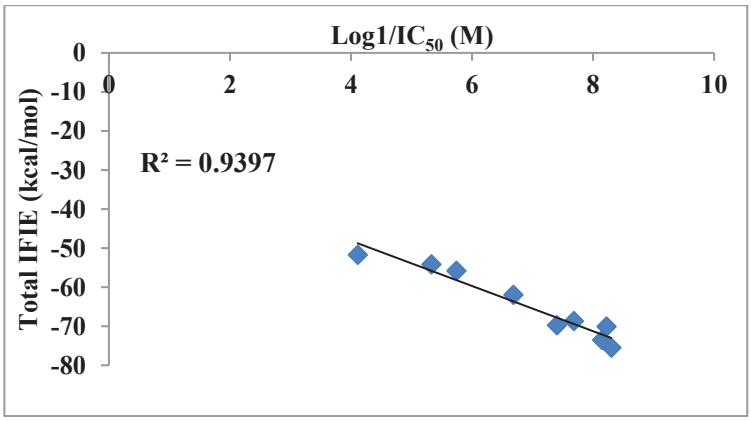


รูปที่ 7 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide สารหมายเลข **2** ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 ที่ได้การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

4. พลังงานอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์ DprE1 กับสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amides (Total IFIE) /kcal/mol

ตารางที่ 3 พลังงานอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์ DprE1 กับสารยับยั้งที่ได้จากการคำนวณโดยระเบียบวิธี Fragment molecular orbitals

Compound	Log1/IC_{50}	Total IFIE (kcal/mol)
1	7.40	-69.7
2	8.30	-75.5
3	8.22	-70.1
4	8.15	-73.5
9	4.11	-51.7
11	5.33	-54.1
12	5.74	-55.7
15	6.68	-62.0
16	7.68	-68.7



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานอันตรกิริยา (total IFIE) กับค่ากัมมันตภาพทางชีวภาพที่ได้จากการทดลอง (IC_{50})

พลังงานในการจับระหว่างเอนไซม์ DprE1 กับสารยับยั้งที่ได้จากการศึกษาด้วยระเบียบวิธี FMO แสดงดังตารางที่ 3 จากตารางที่ 23 พบว่าสารหมายเลข **2** ให้ค่าพลังงานในการจับต่ำที่สุด จากนั้นทำการพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานในการจับกับค่ากัมมันตภาพทางชีวภาพที่ได้จากการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.94 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าผลการศึกษาที่ได้มีความน่าเชื่อถือและสามารถใช้อธิบายแนวโน้มของค่ากัมมันตภาพทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาการออกแบบโมเลกุลโดยใช้การคำนวณของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide โดยใช้ระเบียบวิธี 3D-QSAR การคำนวณโมเลคูลาร์ด๊อกกิ้ง และการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล เพื่อใช้ในการพัฒนาประสิทธิภาพของสารอนุพันธ์เหล่านี้ในการยับยั้งเอนไซม์ DprE1 พบว่าหมู่แทนที่ของสารยับยั้งตัวใหม่ควรมีคุณสมบัติเป็นหมู่แทนที่ขนาดเล็ก มีคุณสมบัติเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนและมีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่สูงเพื่อทำให้สารยับยั้งตัวใหม่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ได้สูงขึ้น ผลจากการศึกษาอันตรกิริยาที่สำคัญและรูปแบบการจับของสารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งด้วยโปรแกรม Autodock 4.02 มีความสามารถในการทำนายรูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 โดยให้ค่า RMSD ระหว่างโครงสร้างผลึกทางเอ็กเรย์กับโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 1.15 อังสตรอม จากค่าที่ได้ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งที่ใช้มีความน่าเชื่อถือในระดับหนึ่ง ในการทำนายตำแหน่งการจัดวางตัวของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโพรงการจับเอนไซม์ DprE1และสามารถบ่งบอกอันตรกิริยาที่เฉพาะเจาะจงของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณอะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติกกับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน Gln336 และหมู่คาร์บอกซิลิกของหมู่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโน Leu317 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาแบบไพของวงอะโรมาติกกับวงอะโรมาติกของโคแฟคเตอร์ ผลการศึกษาการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 พบว่าเมื่อทำการพล็อตกราฟ RMSD ระหว่างเอนไซม์ DprE1 โคแฟกเตอร์ และสารหมายเลข 2 พบว่าระบบเข้าสู่สมดุลหลังจากผ่านไป 2 ns พบว่าระบบมีความเสถียรและมีความน่าเชื่อถือสำหรับนำไปศึกษารูปแบบการจับและรูปแบบการวางตัวทำการคำนวณพลังงานการจับเมื่อนำโครงสร้างที่ได้จากการศึกษาการจำลองแบบพลวัติเชิงโมเลกุลไปเป็นโครงสร้างเริ่มต้นสำหรับการศึกษา FMO ทำให้เข้าใจถึงรูปแบบของโครงสร้างที่มีผลต่อค่ากัมมันตภาพทางชีวภาพของสารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ในระดับอิเล็กตรอนได้ อีกทั้งโครงสร้างระหว่างเอนไซม์ DprE1 กับลิแกนด์ที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี FMO ให้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ นอกจากนี้พบว่ากรดอะมิโน Lys418 คือกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญกับสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amides ดังนั้น ผลการศึกษาที่ได้ทั้งหมดนี้สามารถให้ข้อมูลทางโครงสร้างที่เป็นประโยชน์ในระดับโมเลกุล ซึ่งเป็นแนวทางนำไปสู่การออกแบบสารต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ที่สูงขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติสำหรับเงินทุนสนับสนุนการวิจัย ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำหรับเงินทุนสนับสนุนทุนการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ Toyohashi University of Technology และศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติสำหรับการสนับสนุนโปรแกรมและเครื่องมือในการคำนวณ

เอกสารอ้างอิง

[1] https://www.medicalnewstoday.com/articles/8856.php (สืบค้นเมื่อ 30/4/61)

[2] Naik, M.; Humnabadkar, V.; Tantry, S. J.; Panda, M.; Narayan, A.; Guptha, S.; Panduga, V.; Manjrekar, P.; Jena, L. K.; Koushik, K.; Shanbhag, G.; Jatheendranath, S.; Manjunatha, M. R.; Gorai, G.; Bathula, C.; Rudrapatna, S.; Achar, V.; Sharma, S.; Ambady, A.; Hegde, N.; Mahadevaswamy, J.; Kaur, P.; Sambandamurthy, V. K.; Awasthy, D.; Narayan, C.; Ravishankar, S.; Madhavapeddi, P.; Reddy, J.; Prabhakar, K.; Saralaya, R.; Chatterji, M.; Whiteaker, J.; McLaughlin, B.; Chiarelli, L. R.; Riccardi, G.; Pasca, M.R.; Binda, C.; Neres, J.; Dhar, N.; Signorino-Gelo, F.; McKinney, J. D.; Ramachandran, V.; Shandil, R.; Tommasi, R.; Iyer, P.S.; Narayanan, S.; Hosagrahara, V.; Kavanagh, S.; Dinesh, N.; Ghorpade, S. R. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 5419–5434.

[3] Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, N. Taguchi, S. Tanaka, , *Theor. Chem. Acc.*, 2011, 130, 515–530.

[4] K. Fukuzawa, T. Nakano, A. Kato, Y. Mochizuki, S. Tanaka, *J. Comp. Chem.*, 2006, 6, 185–198.

การศึกษารูปแบบการจับและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ Pyrrolyl Benzohydrazide โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งและการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล

Elucidating of Binding Modes and Crucial Interactions of Pyrrolyl Benzohydrazide using Molecular Docking Calculations and Molecular Dynamic Simulations Approaches

ภาพตะวัน ทองดี[1] ทิมพิกา พรพรม[1] บัณฑิต คำศรี[1] บงกชวรรณ พาคำวงค์[1] นฤดล ภูศรี[1]
ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์[1] กัมปนาท ฉายจรัส[1] พฤทธิ์ คำศรี[2] อรดี พันธ์กว้าง[2] พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์[3]
สุภา หารหนองบัว[3] พจนีย์ ศรีมาโนชญ์[4] คมสันต์ สุทธิสินทอง[5] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[1*]
[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม
[3]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[4]คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
[5]ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย
[*]E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

บทคัดย่อ

M. tuberculosis เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการเกิดวัณโรคซึ่งมี Enoyl ACP reductase (ENR) หรือ InhA เป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบหลักของแบคทีเรีย ดังนั้นเอนไซม์ InhA จึงเป็นเป้าหมายในการพัฒนาเพื่อยับยั้งวัณโรค ปัจจุบันมียาไอโซไนอะซิด เป็นยายับยั้ง *M. tuberculosis* แต่พบว่าเมื่อใช้ยาไอโซ-ไนอะซิดต่อเนื่องจะเกิดการดื้อยาซึ่งสาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของ KatG งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยมีอนุพันธ์ของ Pyrrolyl benzohydrazide เป็นพื้นฐานและใช้วิธีโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งเพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารกลุ่มยับยั้งกับ InhA เป้าหมาย ซึ่งพบว่าสารยับยั้งเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนใน InhA ได้แก่ พันธะไฮโดรเจนที่ Pro156 Tyr158 Ala198 Val203 และโคแฟกเตอร์ NAD^+ และพันธะไพซึ่งเป็นอันตรกิริยาที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพระหว่างสารกลุ่มยับยั้งและโมเลกุล InhA ได้และใช้วิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่ทำให้โครงสร้างเสถียรที่สุด ซึ่งจากการวิเคราะห์ร่วมกันสามารถนำมาออกแบบโครงสร้างใหม่เพื่อยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้อย่างสมเหตุสมผล

คำสำคัญ : วัณโรค โมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง วิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล

Abstract

M. tuberculosis is a cause of tuberculosis. The Enoyl ACP reductase (ENR) or InhA. InhA is an important enzyme for synthesis fatty acid of a bacteria cell. Nowadays, isoniazid (INH) is a drug target for treatment of active tuberculosis infections, but mutation of KatG to resistance INH. In this study, molecular docking calculations and molecular dynamic simulations were applied to elucidate the binding modes and crucial interactions between pyrrolyl benzohydrazide derivatives in InhA binding pocket. The obtained results provided that hydrogen bond interaction between ligand and Pro156, Tyr158, Ala198, Val203 and NAD^+ cofactor. Moreover, pi-pi interaction was improved the binding affinity of inhibitors in InhA binding site. The integrated results obtained from this study aided by the rational design of new and more potent InhA inhibitors.

Keywords : Tuberculosis, Molecular Docking Calculations, Molecular Dynamics Simulations

บทนำ

วัณโรค (tuberculosis) ถือเป็นโรคติดต่อร้ายแรงอันดับสองของโลก โดยในประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรคมากที่สุด 1 ใน 14 ประเทศของโลกและมีการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ค่าเฉลี่ยสูงกว่าโลกถึง 1.3 เท่า และคาดว่าผู้ป่วยรายใหม่ที่มีประมาณ 120,000 รายต่อปีจะมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึง 12,000 (konkao, http:// www. konkao.net/read.php?id=26124) ซึ่งการเสียชีวิตที่มาจากหลายปัจจัยทั้งด้านการเข้าไม่ถึงการบริการรักษาและการรักษาที่มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอเนื่องจากเกิดการดื้อยา

วัณโรคมีสาเหตุหลักจาก *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในระบบทางเดินหายใจจึงมักพบวัณโรคในปอด [He X et al. (2007)] รายงานว่า *M. tuberculosis* เป็นแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์หนาที่ประกอบไปด้วยกรดไมโคลิก (mycolic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ใช้เอนไซม์ Enoyl ACP reductase (ENR) หรือ InhA ในการสังเคราะห์กรดไขมันเหล่านี้ ปัจจุบันในการรักษาวัณโรคใช้ยาไอโซไนอะซิด (isoniazid, INH) ที่ทำงานร่วมกับ KatG เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน [Gaurava S. et al. (2017)] รายงานว่าเมื่อใช้ยาไอโซไนอะซิดต่อเนื่องจะทำให้เกิดการดื้อยาในผู้ป่วยโดยมีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ใช้สังเคราะห์เอนไซม์ InhA และการกลายพันธุ์ของ KatG ส่งผลให้การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและอะมิโนของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นเมื่อทราบถึงสาเหตุของการดื้อยาจึงทำให้สามารถนำมาออกแบบและพัฒนาสารยับยั้ง InhA ได้

[Shrinivas D. J. et al. (2017)] รายงานว่ายาไอโซไนอะซิดเป็นกลุ่มยาที่มีอนุพันธ์ของ Pyrrolyl benzohydrazide เป็นพื้นฐาน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงนำโครงสร้างกลุ่มอนุพันธ์ของ Pyrrolyl benzohydrazide มาศึกษาคุณสมบัติเพื่อออกแบบและพัฒนาสำหรับเป็นโมเลกุลสารยับยั้ง InhA โดยคุณสมบัติที่ศึกษา ได้แก่ การศึกษาอันตรกิริยาด้วยวิธีโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง (molecular docking calculations) และศึกษาการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics simulation) เพื่อศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่ทำให้โครงสร้างเสถียรที่สุด ซึ่งจากผลการศึกษาคาดว่าจะนำไปสู่การออกแบบสารตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพและยับยั้งการดื้อยาได้

วิธีการวิจัย

1. นำโครงสร้างของอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide จำนวน 53 โครงสร้างจากการทบทวนวรรณกรรมและเลือกโครงสร้างที่ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ดีและเหมาะสมที่แสดงดังตารางที่ 1

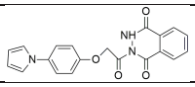
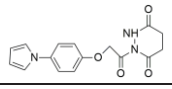
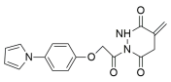
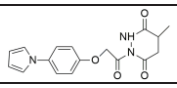
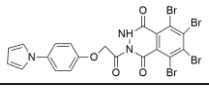
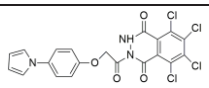
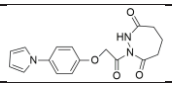
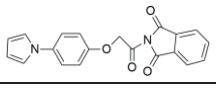
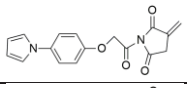
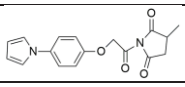
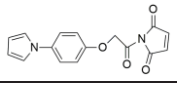
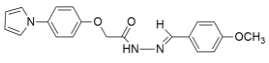
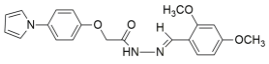
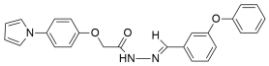
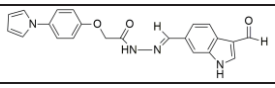
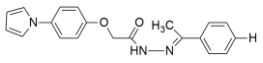
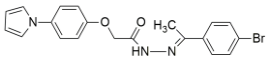
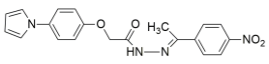
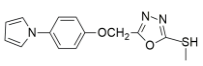
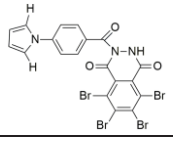
2. ศึกษาแบบจำลองเชิงโมเลกุลโครงสร้าง 3 มิติ โดยใช้ GaussView 5.0.8 program

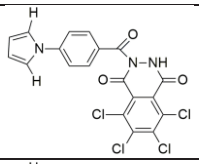
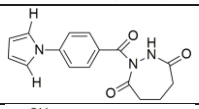
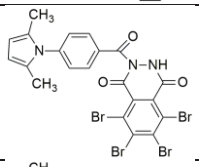
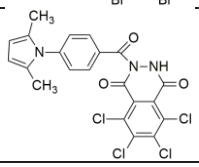
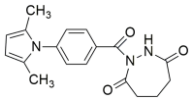
3. ทำการปรับเสถียรโครงสร้าง 3 มิติ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของโครงสร้างสารโดยใช้ Gaussian program และเข้าสู่การทำโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งโดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2 (PDB code: 2X23)

4. วิเคราะห์อันตรกิริยาของโครงสร้างจากตารางที่ 1 และเลือกโครงสร้างที่ได้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูง กลางและต่ำมาพิจารณาความแตกต่างของอันตรกิริยาเพื่อนำไปออกแบบโมเลกุลตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

5. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เสถียรที่สุดที่เวลาต่างๆ ด้วยโปรแกรม AMBER12 โดยที่โครงสร้างของเอนไซม์เป้าหมายที่จับกับสารยับยั้งจากระเบียบวิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลนี้ได้ทำการศึกษาระบบที่ศึกษาเป็นแบบ canonical โดยที่ตลอดเวลาการศึกษาทั้งหมดได้กำหนดให้ปริมาตรของระบบคงที่และอุณหภูมิคงที่ที่ 300 เคลวิน เป็นตัวควบคุม โดยใช้ ff03 สำหรับพารามิเตอร์ที่อธิบายโปรตีน ใช้ RESP จากการคำนวณโดยวิธี M062X/6-31G* โมเลกุลของน้ำชนิด TIP3P ได้ถูกเติมเข้าไปในทุกระบบที่ใช้ในการศึกษาวิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลในการกำหนด สนามแรงของลิแกนด์และได้มีการกำหนด non-bonded cutoff ให้มีค่าเท่ากับ 10 Å และใช้ SHAKE method ช่วยในการ constrain อะตอมทั้งหมด สำหรับ time step ที่ใช้มีค่าเท่ากับ 2 fs ค่าพลังงานในการจับของสารยับยั้งที่จับกับเอนไซม์เป้าหมาย คำนวณโดยระเบียบวิธี MM-PBSA

ตารางที่ 1 โครงสร้างของอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide

Comp.	โครงสร้าง	% Inhibition at 50 μM
1		63
2		32
3		50
4		42
5		11
6		12
7		18
8		25
9		21
10		10
11		10
12		21
13		37
14		15
15		19
16		34
17		27
18		51
19		57
20		72

Comp.	โครงสร้าง	% Inhibition at 50 μM
21		64
22		27
23		75
24		76
25		13

ผลการวิจัย

1. การศึกษาโดยใช้วิธีโมเลกุลาร์ด๊อกกิ้ง

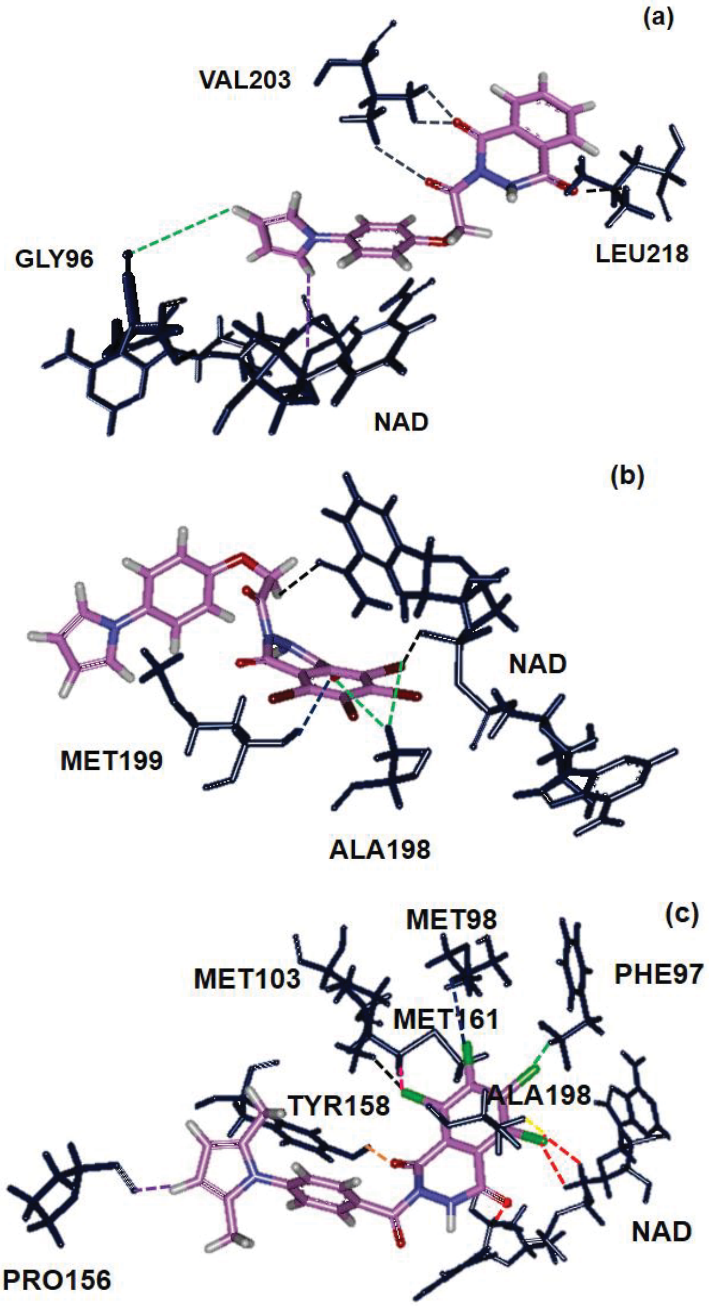
การศึกษาแบบจำลองเชิงโมเลกุลโดยใช้วิธีโมเลกุลาร์ด๊อกกิ้งเพื่อทำนายลักษณะการวางตัวและการเกิดอันตรกิริยาของสารยับยั้งกับโมเลกุล InhA

การเกิดอันตรกิริยาที่กรดอะมิโนต่างๆ โดยอันตรกิริยาที่เกิดได้แก่ พันธะไฮโดรเจนและพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งพันธะไฮโดรเจนเกิดจากสารยับยั้งกับโมเลกุลเป้าหมาย Gly96 Phe97 Met98 Met103 Pro156 Tyr158 Met161 Ala198 Met199 Val203 Leu218 และโคแฟกเตอร์ NAD^+ แสดงดังรูปที่ 1 และการเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างสารยับยั้งกับโมเลกุลเป้าหมายต่าง ๆ ได้แก่ กรดอะมิโน Tyr158 Lys165 Leu218 และ โคแฟกเตอร์ NAD^+ แสดงดังรูปที่ 2

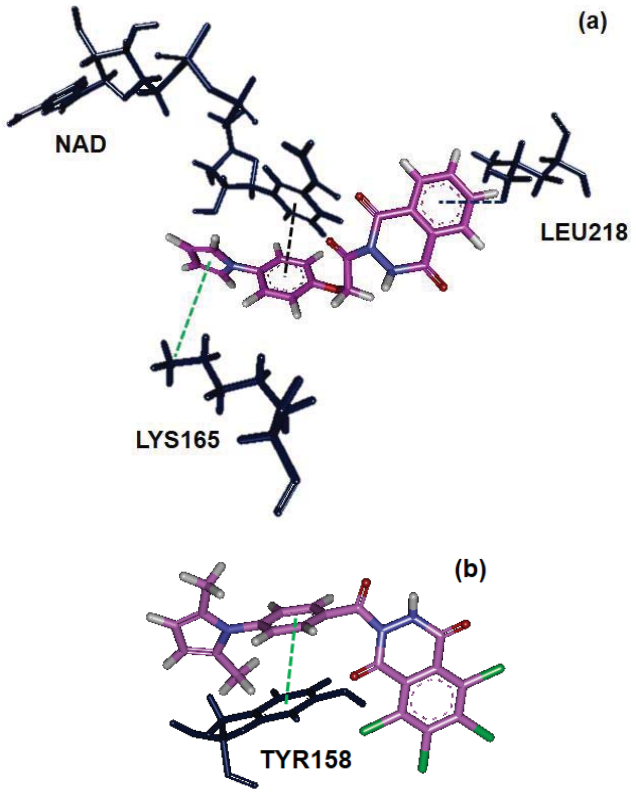
การเกิดพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) พันธะไฮโดรเจนเป็นอันตรกิริยาที่ดึงดูดกันระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมอื่น ๆ ที่มีอิเล็กโทรเนกาติวิตี (electronegativity) สูงกว่า ซึ่งการพิจารณาการเกิดพันธะไฮโดรเจนของสารยับยั้งกับกรดอะมิโนของโมเลกุล InhA จากระยะห่างและมุมของพันธะทั้งสอง โดยโครงสร้างที่ 24 1 และ 5 คือโครงสร้างที่มีค่าการยับยั้งสูง กลางและต่ำตามลำดับโดยโครงสร้างที่ 5 มีค่าการยับยั้งคือ 63 เปอร์เซ็นต์ และพบพันธะไฮโดรเจน 6 พันธะ ระหว่างโครงสร้างที่ 1 และโมเลกุลเป้าหมายดังนี้ อะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Gly96 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมไฮโดรเจนโครงสร้างที่ 1 ระยะห่าง 2.478 Å (เส้นสีเขียว) กรดอะมิโน Val203 เกิด 3 พันธะไฮโดรเจนระยะห่าง 1.893, 2.491 และ 2.110 Å กับอะตอมออกซิเจนตำแหน่งที่ต่างกันของโครงสร้างที่ 1 (เส้นสีน้ำเงิน) อะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน Leu218 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนในโครงสร้างที่ 1 ระยะห่าง 1.893 Å (เส้นสีดำ) และโคแฟกเตอร์ NAD^+ เกิดพันธะไฮโดรเจนจากโครงสร้างที่ 1 ของอะตอมออกซิเจนและอะตอมไฮโดรเจน ระยะห่าง 2.101 Å (เส้นสีม่วง) แสดงดังรูปที่ 1a การเกิดพันธะไฮโดรเจนของโครงสร้างที่ 5 ที่มีค่าการยับยั้ง 11 เปอร์เซ็นต์โดยการเกิดอันตรกิริยาแสดงดังรูปที่ 2 พบพันธะไฮโดรเจน 5 พันธะ ดังนี้ กรดอะมิโน Ala198 เกิด 2 พันธะไฮโดรเจนกับโครงสร้างที่ 5 จากอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน Ala198 และอะตอมโบรมีนกับอะตอมออกซิเจนของโครงสร้างที่ 5 มีระยะห่าง 2.105 Å และ 2.475 Å ตามลำดับ (เส้นสีเขียว) เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน Met199 และอะตอมออกซิเจนของโครงสร้างที่ 5 ระยะห่าง 2.361 Å (เส้นสีน้ำเงิน) และอะตอมออกซิเจนทั้ง 2 อะตอมของโคแฟกเตอร์ NAD^+ เกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมไฮโดรเจนและอะตอมโบรมีนของโครงสร้างที่ 5 ระยะห่างคือ 2.138 Å และ 2.353 Å ตามลำดับ (เส้นสีดำ) และโครงสร้างที่ 24 คือโครงสร้างที่มีค่าการยับยั้งในกลุ่มสูง คือ 76 เปอร์เซ็นต์ และพบพันธะไฮโดรเจนทั้งหมด 10 พันธะ แสดงดังรูปที่ 1c โครงสร้างที่ 24 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Phe97 ระหว่างอะตอมไฮโดรเจนและอะตอมคลอรีนระยะห่าง 1.743 Å (เส้นสีเขียว) อะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน Met98 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมคลอรีนของโครงสร้างที่ 24 ระยะห่าง 2.058 Å (เส้นสีน้ำเงิน) กรดอะมิโน Met103 ที่อะตอมไฮโดรเจนเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโครงสร้างที่ 24 ของอะตอมคลอรีนระยะห่าง 2.096 Å (เส้นสีดำ) อะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Pro156 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมไฮโดรเจนของโครงสร้างที่ 24 ระยะห่าง 2.383 Å (เส้นสีม่วง) การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน Tyr158 และอะตอมออกซิเจนของโครงสร้างที่ 24 ระยะห่าง 1.225 Å (เส้นสีส้ม) อะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน Met161 เกิดพันธะไฮโดรเจนระยะห่าง 2.339 Å กับอะตอมคลอรีนของโครงสร้างที่ 24 (เส้นสีชมพู) อะตอมไฮโดรเจนของกรดอะมิโน Ala198 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมคลอรีนของโครงสร้างที่ 24 ระยะห่าง 2.150 Å (เส้นสีเหลือง) และโคแฟกเตอร์ NAD^+ เกิด 3 พันธะไฮโดรเจนจากอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนและอะตอมคลอรีน 2 อะตอมที่ตำแหน่งต่างกัน ระยะห่าง 1.595 2.332 และ 2.276 Å ตามลำดับ (เส้นสีแดง)

การวางตัวของสารยับยั้งและโมเลกุลInhA ที่ทำให้เกิดพันธะโคเวนเลนต์ ได้แก่ อันตรกิริยาระหว่างแคทไอออน-พันธะไพ อันตรกิริยาระหว่างพันธะซิกมา-พันธะไพและอันตรกิริยาระหว่างพันธะไพ-พันธะไพ ซึ่งมีเพียงโครงสร้างที่ 1 และ 24 ที่เกิดพันธะโคเวเลนต์กับกรดอะมิโนและโคแฟกเตอร์ NAD^+ ของโมเลกุล InhA แสดงดังรูปที่ 2 โดยโครงสร้างที่ 1 พบอันตรกิริยาจากไอออนบวกของอะตอมไนโตรเจนที่กรดอะมิโน Lys165 กับพันธะไพของวงไพรอล (pyrrole) ในโครงสร้างที่ 1 (เส้นสีเขียว) เกิดพันธะซิกมาของอะตอมไฮโดรเจนในกรดอะมิโน

Leu218 และพันธะไพของวงเบนซีน (benzene ring) ของโครงสร้างที่ 1 (เส้นสีน้ำเงิน) และเกิดพันธะไพ-พันธะไพระหว่างวงเบนซีนของโคแฟกเตอร์ NAD^+ และโครงสร้างที่ 1 (เส้นสีดำ) แสดงดังรูป 2a และโครงสร้างที่ 24 เกิดพันธะไพ-พันธะไพจากวงเบนซีนของกรดอะมิโน Tyr158 และโครงสร้างที่ 24 ดังรูปที่ 2b



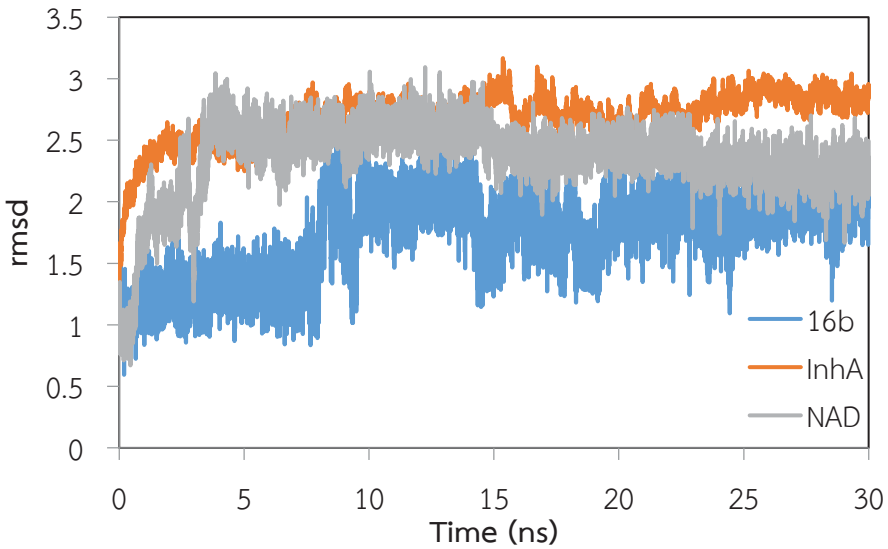
รูปที่ 1 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนของโมเลกุล InhA และโคแฟกเตอร์ NAD^+ กับ (a) โครงสร้าง 1 (b) โครงสร้าง 5 และ (c) โครงสร้าง 24



รูปที่ 2 การเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างกรดอะมิโนของโมเลกุล InhA และโคแฟกเตอร์ NAD^+ กับ (a) โครงสร้าง 1 และ (b) โครงสร้าง 24

2. การศึกษาวิธีการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

ศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนไปตามเวลาที่สนใจที่ทำให้โครงสร้างเสถียรจากรูปที่ 3 คือโครงสร้าง 24 ที่มีค่าการยับยั้งอยู่ในกลุ่มสูงและพบว่าเมื่อรันไป 25 นาโนวินาที โครงสร้างได้ค่า RMSD ใกล้เคียงกันนั้นแสดงถึงว่าโครงสร้างมีความเสถียรและนำโครงสร้างที่ 25 นาโนวินาที มาวิเคราะห์อันตรกิริยาซึ่งคาดว่าเป็นงานที่จะทำต่อไป



รูปที่ 3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างตามระยะเวลาที่สนใจ

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการวางตัวโดยวิธีโมเลกุลาร์ด๊อกกิ้งของสารยับยั้งและโมเลกุลเป้าหมายโดยพิจารณาจากโครงสร้างทั้งหมดและนำมาแสดงการวางตัวและอันตรกิริยาของสารยับยั้งตามค่าการยับยั้งเป็นกลุ่มได้แก่ ค่าการยับยั้งสูง กลางและต่ำ ซึ่งพบว่าโครงสร้างที่ 24 ที่ได้ค่าการยับยั้งสูงเกิดอันตรกิริยาทั้งพันธะไฮโดรเจน 10 พันธะและพันธะไพ-พันธะไพ 1 พันธะ โครงสร้างที่ 1 พบพันธะไฮโดรเจน 6 พันธะและพันธะโคเวเลนต์ 3 พันธะ ซึ่งโครงสร้างที่ 1 ค่าการยับยั้งอยู่ในกลุ่มกลางและโครงสร้างที่ 5 มีค่าการยับยั้งอยู่ในกลุ่มต่ำและพบเพียงพันธะไฮโดรเจน 5 พันธะเท่านั้น ซึ่งทั้งนี้คาดว่าโครงสร้างที่ 24 มีหมู่แทนที่เมทิล (CH_3) เกาะที่วงไพรอลทำให้เกิดอันตรกิริยาสูงและนอกจากนี้มีอะตอมโบรมีนเกาะที่วงเบนซีนอีกด้วยแต่ในโครงสร้างที่ 5 มีอะตอมโบรมีนเช่นเดียวกันแต่มีอันตรกิริยาน้อยซึ่งทั้งนี้อาจเกิดจากการวางตัวของโครงสร้างหรือการไม่มีหมู่แทนที่ของเมทิล ทั้งนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่เวลาสนใจโดยวิธีการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล ซึ่งพบว่าโครงสร้างที่ 24 เสถียรที่ 25 นาโนวินาที ทั้งนี้จะนำโครงสร้างมาที่ 25 นาโนวินาที มาศึกษาอันตรกิริยาและนำโครงสร้างอื่นๆ มาศึกษาด้วยวิธีการนี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (RSA5980057) ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำหรับเงินทุนสนับสนุนทุนการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติสำหรับการสนับสนุนโปรแกรมและเครื่องมือในการคำนวณ

เอกสารอ้างอิง

[1] Gaurava S. et al. (2017). Molecular investigation of active binding site of isoniazid (INH) and insight into resistance mechanism of S315T-MtKatG in Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis,* 2017(105), 18-27.

[2] http:// www. konkao.net/read.php?id=26124 (สืบค้นเมื่อ 28/4/2561)

[3] Shrinivas D. J. et al. (2017). Chemical synthesis and in silico molecular modeling of novel pyrrolyl benzohydrazide derivatives: Their biological evaluation against enoyl ACP reductase (InhA) and Mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic Chemistry*, 2017(75), 181-200.

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพทางชีวภาพเชิงสามมิติ และการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งของสารอนุพันธ์ Pyrrolyl Benzohydrazide และ Pyrrolyl Benzamide เพื่อการยับยั้งเชื้อวัณโรค

อิสราภรณ์ เสียงล้ำ[1] นฤดล ภูศรี[1] ชญาณิลห์ หาญวลินโรน์[1] ฑิมพิกา พรพรม[1] กัมปนาท ฉายจรัส[1] กัลย์ชิญาภัท อริยะเชาว์กุล[2] พฤทธิ์ คำศรี[3] อรดี พันกว้าง[3] สุภา หารหนองบัว[4] พัชรีนาถ ทรัพย์อากรณ์[4] คมสันต์ สุทธิสินทอง[5] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์ [1*]

[1]ภาควิชาเคมี สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สาขาสาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[3]ภาควิชาเคมี สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

[4]ภาควิชาเคมี สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[5] ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช)

[*]E-mail : pornpan_ubu@yahoo.com

บทคัดย่อ

เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) เป็นสาเหตุหลักของวัณโรค (TB) โดย InhA เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* งานนี้ศึกษา 3D QSAR และศึกษาอันตรกิริยาด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง เพื่อศึกษาความต้องการทางโครงสร้าง รูปแบบการจับและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ benzohydrazide pyrrolyl และ pyrrolyl benzamide ในโพรงการจับ InhA จากผลศึกษาแสดงอันตรกิริยาแบบพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Gly96 และ Met161 กับสารหมายเลข 18 ยังมีการเกิดอันตรกิริยาแบบพันธะไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติก Tyr158 และไพ–แคทไอออน เกิดอันตรกิริยาแบบระหว่างวงอะโรมาติกกับอะตอมไฮโดรเจนของ Phe149 นอกจากนี้ยังพบว่ามีอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิกระหว่างสารหมายเลข18 23 และ 32 กับ Gly96, Phe97, Ala157, Tyr158, Met161, Ala198, Val203 และ Ile215 ข้อมูลสำคัญของอันตรกิริยาระหว่างสารยับยั้งกับเอนไซม์ และความต้องการทางโครงสร้างที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความสำคัญในการออกแบบและพัฒนายาตัวใหม่เพื่อใช้ในการต้านเชื้อวัณโรค

คำสำคัญ : เชื้อวัณโรค 3D QSAR การคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง InhA

Investigation of 3D- Quantitative Structure Activity Relationship and Molecular Docking Calculations of Pyrrolyl Benzohydrazide and Pyrrolyl Benzamide Derivatives as Anti-Tuberculosis Agents

Issaraporn Saenglum[1] Naruedon Phusi[1] Chayanin Hanwarinroj[1] Thimpika Pornprom[1] Kampanart Chayajarus[1] Kanchiyaphat Ariyachaokun[2] Pharit Kamsri[3] Auradee Punkvang[3] Patchreenart Saparpakorn[4] Supa Hannongbua[4] Khomson Suttisintong[5] and Pornpan Pungpo[1]*

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

[2]Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

[3]Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University

[4]Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

[5]National Nanotechnology Center, NSTDA

*E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com

Abstract

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) is the causative agent of human tuberculosis (TB) and remains a major public menace. InhA is an enzyme which is important for the growth of bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. This work 3D QSAR and molecular docking calculations were investigated. To study structural requirements, the binding mode and the crucial interactions of novel pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives in InhA binding site. The obtained results showed hydrogen bond interactions between Gly96 and Met161 with compound 18, Pi-Pi interactions between aromatic ring Tyr158 and Pi-cation interactions

between aromatic ring with hydrogen atom of Phe149. Moreover, hydrophobic interactions between compound 18, compound 23 and compound 32 and Gly96, Phe97, Ala157, Tyr158, Met161, Ala198, Val203 and Ile215 residues were found. These information on the structure interactions between enzyme inhibitors with enzymes and structural requirements are valuable and important for the design process and the development of new drugs as anti-tuberculosis agents.

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis*, 3D QSAR, molecular docking calculations, InhA

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุหลักของการตายของประชากรทั่วโลกในปัจจุบัน และมีจำนวนของผู้ป่วยรายใหม่ที่เพิ่มขึ้นทุกปี เป็นปัญหาหลักที่สำคัญในประเทศที่กำลังพัฒนา ด้อยพัฒนาและประเทศที่มีความหนาแน่นของประชากรสูง (Salla A Munro 2007) เอนไซม์ Enoyl-ACP reductase (InhA) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *M. tuberculosis* เนื่องจากเอนไซม์นี้เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่ทำหน้าในการสังเคราะห์กรดไขมัน mycolic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียวัณโรคก่อโรค (Drugs., 2004) นอกจากนี้ยังเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรควัณโรคของตัวยาหลักที่ใช้ในการรักษาคือยาไอโซไนอาซิด แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการรักษาโรควัณโรคของตัวยาไอโซไนอาซิดจะลดลง เนื่องจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ KatG ที่ทำหน้าที่กระตุ้นตัวยาไอโซไนอาซิดให้อยู่ในรูปอนุมูลอิสระเพื่อจับกับ NAD^+ โคแฟกเตอร์ให้อยู่ในรูป adduct ที่จะสามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้ ซึ่งเป็นการยับยั้งด้วยวิธีทางอ้อม จากงานวิจัยก่อนหน้านี้มีการศึกษาสารอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide และ pyrrolyl benzamide และออกแบบเพื่อทำการสังเคราะห์พบว่าให้ผลดีในการยับยั้งโรควัณโรคในทางตรงโดยไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ KatG (Joshi, Dixit, et al., 2017) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความต้องการที่จะนำสารอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide และ pyrrolyl benzamide มาศึกษาเพื่อใช้ออกแบบและเป็นตัวต้นแบบในการยับยั้งเชื้อวัณโรคและเอนไซม์ InhA

วิธีการวิจัย

โครงสร้างเริ่มต้นของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ทั้งหมดได้จากการสร้างโดยใช้โปรแกรมโมเลกุลาร์โมเดลลิ่ง Gausview จากนั้นทำการคำนวณปรับโครงสร้างที่เสถียรที่สุด (full geometrical optimization) ด้วยระเบียบวิธี *Ab initio* M062X/6-31G* (Jena, Waghmare, Kashikar, Kumar, & Harinath, 2014) เมื่อทำการคำนวณในขั้นตอนนี้เสร็จแล้ว จะได้โครงสร้างที่เสถียรแต่ละโมเลกุล จากนั้นนำโครงสร้างเหล่านี้ไปใช้ในการคำนวณด้วยวิธีการโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสามมิติ (3D-QSAR) โดยโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA แสดงดังตารางที่ 1

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างสมบัติทางโครงสร้างโมเลกุลกับค่ากัมตภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพแบบสามมิติ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบ 3D-QSAR ใช้วิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (Comparative Similarity Index Analysis, CoMSIA) (Ahamad, Islam, Ahmad, Dwivedi, & Hassan, 2019) ซึ่งเป็นวิธีด้าน Computer-Aided Molecular Design ขั้นตอนสำคัญในการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีนั้นอาจแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. การวางโมเลกุล (Alignment rule)

ในวิธีการวิเคราะห์นั้นจะวางโมเลกุลทุก ๆ โครงสร้างภายในกล่องซึ่งมีขนาดที่กำหนด ทั้งนี้ขั้นตอนนี้จัดว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด โดยในการศึกษานี้จะใช้วิธีการวางโมเลกุลด้วยวิธีการนำเอารูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide และ pyrrolyl benzamide โดยใช้วิธีการวางตัวซ้อนทับของโพรงการจับของตัวจับ

2. การวิเคราะห์โดยวิธีคอมเซีย (CoMSIA Analysis)

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

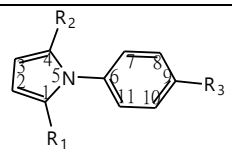
3. การแปรผล (Interpretation)

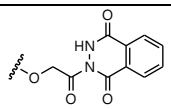
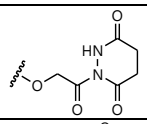
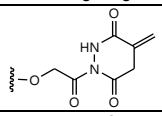
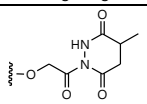
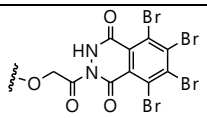
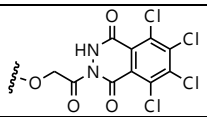
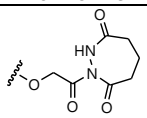
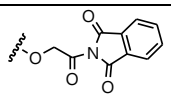
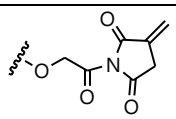
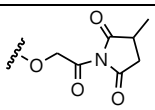
การประเมินผลว่าแบบจำลองใดที่ให้ผลการทำนายค่ากัมมันตภาพดีที่สุดนั้นจะอาศัยค่าความสามารถในการทำนาย (Predictive ability, q^2) เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาโดยค่า q^2 ควรมีค่าสูงกว่า 0.6 และการแปรผลจะแสดงในรูปของภาพคอนทัวร์ของสัมประสิทธิ์ (coefficient contour map)

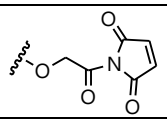
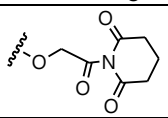
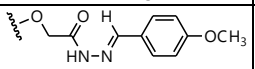
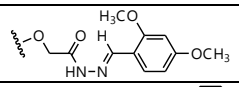
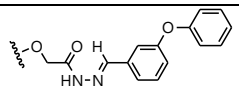
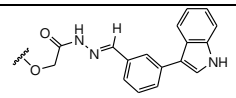
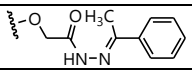
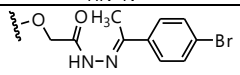
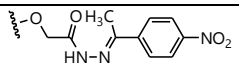
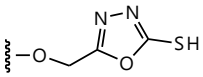
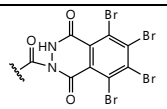
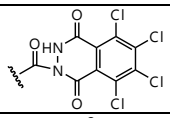
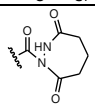
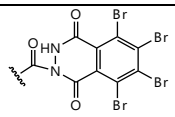
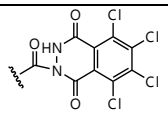
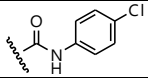
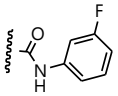
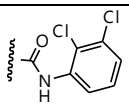
การศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง

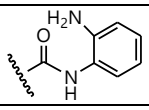
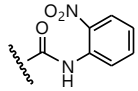
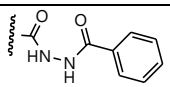
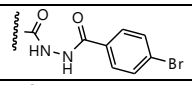
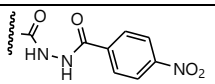
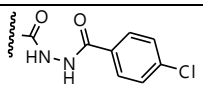
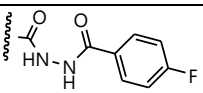
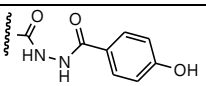
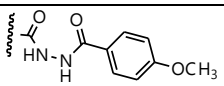
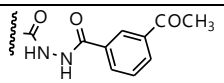
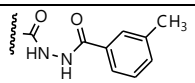
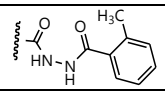
โครงสร้างผลึก (X-ray crystallography) ของ InhA รหัส 2X23 ถูกนำมาใช้ศึกษาอันตริกิริยาที่สำคัญในโพรงการจับ InhA ของสารอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide และ pyrrolyl benzamide ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นวิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญ

ตารางที่ 1 แสดงโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide และ pyrrolyl benzamide (Joshi et al., 2018; Joshi, Dixit, et al., 2017; Joshi, More, et al., 2017)



สาร	R1	R2	R3	MIC (μ/mL)	ค่ากัมมตภาพในการยับยั้ง
1*	H	H		1.6	5.35
2	H	H		1.6	5.29
3	H	H		1.6	5.31
4	H	H		1.6	5.31
5	H	H		50	4.13
6*	H	H		50	4.00
7	H	H		1.6	5.31
8	H	H		1.6	5.34
9	H	H		1.6	5.29
10	H	H		50	3.80

11	H	H		50	3.77
12	H	H		1.6	5.29
13	H	H		1.6	5.34
14	H	H		1.6	5.37
15	H	H		3.12	5.12
16	H	H		3.12	5.14
17	H	H		1.6	5.32
18	H	H		1.6	5.41
19	H	H		1.6	5.37
20*	H	H		1.6	5.23
21	H	H		6.25	5.01
22	H	H		6.25	4.88
23	H	H		3.12	4.98
24	CH_3	CH_3		3.12	5.34
25	CH_3	CH_3		3.12	5.20
26*	CH_3	CH_3		6.25	4.72
27	H	H		6.25	4.81
28	H	H		3.12	4.95
29	H	H		3.12	5.03

30	H	H		3.12	4.95
31	H	H		3.12	4.99
32*	H	H		50	3.79
33	H	H		3.125	5.09
34	H	H		12.5	4.45
35	H	H		6.25	4.74
36	H	H		12.5	4.41
37	H	H		12.5	4.41
38	H	H		12.5	4.43
39	H	H		12.5	4.44
40	H	H		12.5	4.41
41*	H	H		12.5	4.41

หมายเหตุ :* test set

ผลการวิจัย

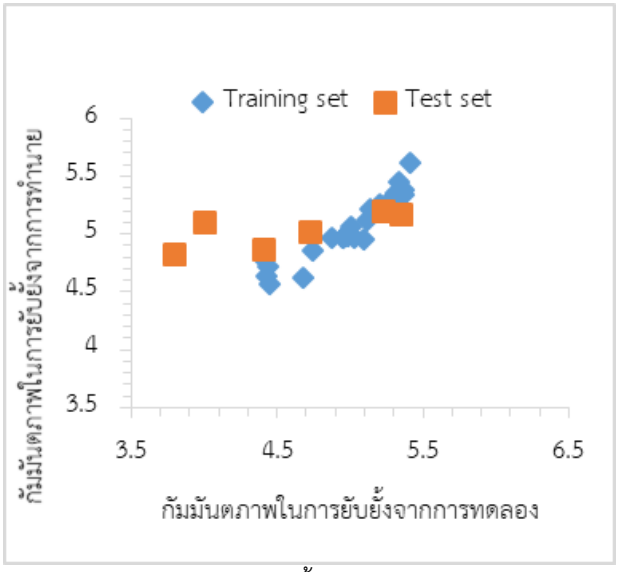
การศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างสมบัติทางโครงสร้างโมเลกุลกับค่ากัมตภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพแบบสามมิติ

ผลการศึกษา CoMSIA model ของสารอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide และ pyrrolyl benzamide จำนวน 41 โครงสร้าง โดยเป็น training set จำนวน 35 โครงสร้าง test set 6 โครงสร้าง และ outlier 3 โครงสร้าง ดังตารางที่ 2 พบว่าแบบจำลอง CoMSIA ที่ดีที่สุด คือ แบบจำลองที่มีค่า q^2 และค่า r^2 เท่ากับ 0.722 และ 0.959 ตามลำดับ ซึ่งมีอัตราส่วนการมีส่วนร่วมของ สนามสเตอริก สนามอิเล็กโตรสแตติก สนามไฮโดรโฟบิก และสนามการให้โปรตอน คือ 4.09%, 12.06%, 11.46% และ 10.97% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ผลการศึกษาของแบบจำลอง CoMSIA model ที่ได้นี้ สามารถอธิบายความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide และ pyrrolyl benzamide ได้ และเมื่อทำการทดสอบการทำนายค่ากัมมตภาพในการยับยั้งที่ได้จาก CoMSIA model พบว่ามีความน่าเชื่อถือดังแสดงในรูปที่ 1(Ahamad et al., 2019)

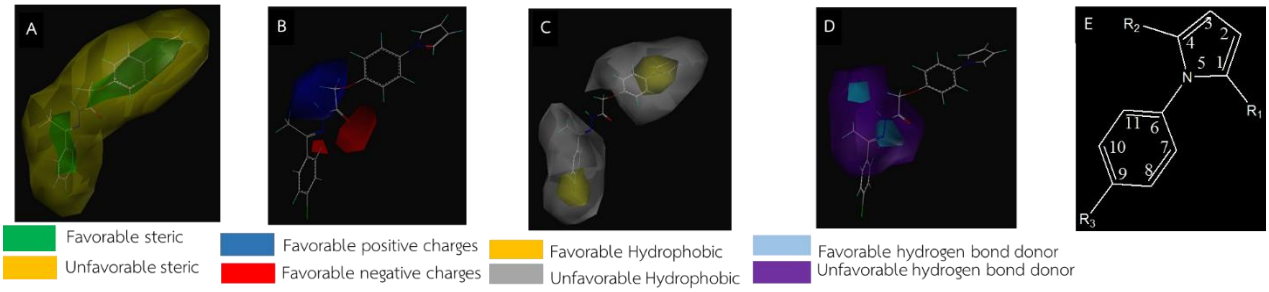
ตารางที่ 2 ค่าทางสถิติของการศึกษาแบบจำลอง CoMSIA model

Field type	q^2	r^2	N	S	SSE	F	อัตราการมีส่วนร่วม
S/E/H/HD	0.722	0.959	5	0.198	0.077	98.701	4.09%/ 12.06%/ 11.46%/ 10.97%

หมายเหตุ : q^2 คือ Predictive ability; N คือ optimum number of components; s คือstandard error of prediction; SEE คือ standard error of estimate; Fคือ F-test value; S คือ steric field; E คือ electrostatic field; H คือ hydrophobic field; HD คือhydrogen donor field; HA คือ hydrogen acceptor field



รูปที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์สารอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide และ pyrrolyl benzamide ที่ได้จากการทดลองและทำนายโดยแบบจำลอง CoMSIA



รูปที่ 2 แผนภาพคอนทัวร์สนามสเตอริก (A) สนามอิเล็กโตรสแตติก (B) สนามไฮโดรโฟบิก (C) สนามการให้โปรตอน (D) ที่ได้จากแบบจำลอง CoMSIA ที่ดีที่สุด และ โครงสร้างทั่วไปของสารอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide และ pyrrolyl benzamide

Model ที่ดีที่สุดนำมาทำนายแผนภาพคอนทัวร์ของสารหมายเลข 18 เนื่องจากมีค่ากัมมตภาพในการยับยั้งสูงสุด รูปที่ 2 แผนภาพคอนทัวร์สามารถแปรผลได้เพียงแผนภาพคอนทัวร์สนามอิเล็กโตรสแตติก ส่วนแผนภาพคอนทัวร์สนามสเตอริก แผนภาพคอนทัวร์สนามไฮโดรโฟบิก และ แผนภาพคอนทัวร์สนามการให้โปรตอน ไม่สามารถนำมาแปรผลได้เนื่องจากมีการซ้อนทับกันของสีคอนทัวร์

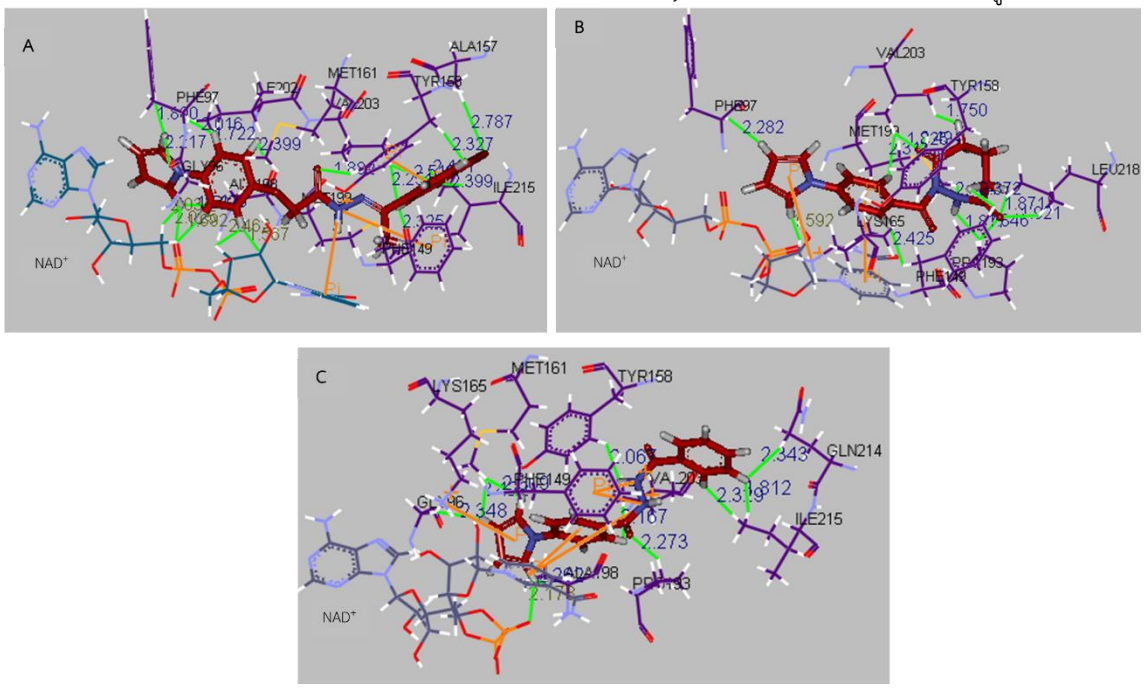
พิจารณา R1 ซึ่งอยู่ใกล้ C1 โดยบริเวณC1 อยู่ใกล้คอนทัวร์สีแดงขนาดเล็กแสดงว่าหมู่แทนที่ R1 จะต้องเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนจึงจะทำให้ C1 มีความเป็น negative charge หมู่ให้อิเล็กตรอนได้แก่ H, CH_3, CH_2CH_3 เป็นต้น

พิจารณา R3 คอนทัวร์สีน้ำเงินขนาดใหญ่แสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนจึงมีความเป็นpositive charge หมู่ให้อิเล็กตรอนได้แก่ H, CH_3, CH_2CH_3 เป็นต้น คอนทัวร์สีแดงขนาดใหญ่แสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนแสดงว่าบริเวณนั้นชอบความเป็น negative charge หมู่ดึงอิเล็กตรอนได้แก่ O และ S เป็นต้น และคอนทัวร์สีแดงขนาดเล็กแสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนแสดงว่าบริเวณนั้นชอบความเป็น negative charge หมู่ดึงอิเล็กตรอนได้แก่ F, Cl และ Br เป็นต้น

การศึกษาอันตรกิริยาด้วยระเบียบวิธีโมเลคูลาร์ด็อกกิ้ง

ผลของอันตรกิริยาสารหมายเลข 18, 23 และ 32 ในโพรงการจับของ InhA (Schroeder, Basso, Santos, & de Souza, 2005; Sink et al., 2015) พบว่าสารหมายเลข 18 นี้เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Phe97, Ala157, Tyr158, Ala198, Val203 และIle215 มีการเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Gly96 และMet161 เกิดอันตรกิริยาแบบพันธะไพ-ไพ และไพ – แคทไอออน กับกรดอะมิโน Tyr158 และ Phe149 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับไพ – แคทไอออนกับโคแฟกเตอร์ ส่วนสารหมายเลข 23 เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Phe97, Phe149,

Tyr158, Ala198 และVal203 มีการเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Tyr158, Pro193 และ Leu218 เกิดอันตรกิริยาแบบพันธะไพ-ไพ และไพ – แคทไอออน กับกรดอะมิโน โคแฟกเตอร์ และ Lys165 ตามลำดับ(Sink et al., 2015) นอกจากนี้ยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับโคแฟกเตอร์ และสารหมายเลข 32 เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Gly96, Tyr158, Met161, Ala198, Val203 และIle215 มีการเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Pro193 เกิดอันตรกิริยาแบบพันธะไพ-ไพโคแฟกเตอร์ และไพ – แคทไอออนกับกรดอะมิโน Lys165 และโคแฟกเตอร์ แสดงดังรูป 3



รูปที่ 3 ลักษณะการวางตัวในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA สารหมายเลข 18 (A) สารหมายเลข 23 (B) และสารหมายเลข 32 (C)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลของแบบจำลอง 3D-QSAR CoMISA พบว่ามีความต้องการทางโครงสร้างคือบริเวณ C1 จะต้องเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนจึงจะทำให้ C1 มีความเป็น negative charge ที่บริเวณ R3 คอนทัวร์สีน้ำเงินขนาดใหญ่ที่หมู่คาร์บอนิลแสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนจึงมีความเป็น positive charge คอนทัวร์สีแดงขนาดใหญ่ที่ตำแหน่งออกซิเจนที่หมู่คาร์บอนิลแสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนแสดงว่าบริเวณนั้นชอบความเป็น negative charge นอกจากนี้ยังเกิดคอนทัวร์สีแดงขนาดเล็กที่ตำแหน่งไฮโดรเจนในบริเวณวงเบนซีน แสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนแสดงว่าบริเวณนั้นชอบความเป็น negative charge เมื่อนำพิจารณาผลจากการศึกษารูปแบบการจับของสารสารอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide และ pyrrolyl benzamide ในโพรง InhA พบว่ามีอันตรกิริยาที่สำคัญได้แก่ ไฮโดรโฟบิก พันธะไฮโดรเจน พันธะไพ-ไพ และไพ – แคทไอออนกับกรดอะมิโนและโคแฟกเตอร์ จากการจำลองแบบและการออกแบบโมเลกุลในการศึกษานี้ช่วยให้เข้าใจความต้องการทางโครงสร้างที่สำคัญในการยับยั้งเป้าหมายของโรควัณโรค ซึ่งในการศึกษานี้จะนำไปสู่การออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่ที่ช่วยให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่าสารต้นแบบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นกลาง (เมธีวิจัย สกว.) ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สำหรับการสนับสนุน ขอบคุณโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) (SCA-CO-2561-6957TH) สำหรับเงินทุนสนับสนุน ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาอุบลราชธานี ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (NANOTEC) และศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ(NECTEC) อนุเคราะห์เครื่องมือและอำนวยความสะดวกในการทำปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

1. Ahamad, S., Islam, A., Ahmad, F., Dwivedi, N., & Hassan, M. I. (2019). 2/3D-QSAR, molecular docking and MD simulation studies of FtsZ protein targeting benzimidazoles derivatives. *Comput Biol Chem, 78*, 398-413. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.12.017
2. Drugs., C. O. I. (2004). Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials. 146–153.
3. Jena, L., Waghmare, P., Kashikar, S., Kumar, S., & Harinath, B. C. (2014). Computational approach to understanding the mechanism of action of isoniazid, an anti-TB drug. *Int J Mycobacteriol, 3*(4), 276-282. doi: 10.1016/j.ijmyco.2014.08.003
4. Joshi, S. D., Dixit, S. R., Basha, J., Kulkarni, V. H., Aminabhavi, T. M., Nadagouda, M. N., & Lherbet, C. (2018). Pharmacophore mapping, molecular docking, chemical synthesis of some novel pyrrolyl benzamide derivatives and evaluation of their inhibitory activity against enoyl-ACP reductase (InhA) and Mycobacterium tuberculosis. *Bioorg Chem, 81*, 440-453. doi: 10.1016/j.bioorg.2018.08.035
5. Joshi, S. D., Dixit, S. R., Kulkarni, V. H., Lherbet, C., Nadagouda, M. N., & Aminabhavi, T. M. (2017). Synthesis, biological evaluation and in silico molecular modeling of pyrrolyl benzohydrazide derivatives as enoyl ACP reductase inhibitors. *Eur J Med Chem, 126*, 286-297. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.11.032
6. Joshi, S. D., More, U. A., Dixit, S. R., Balmi, S. V., Kulkarni, B. G., Ullagaddi, G., . . . Aminabhavi, T. M. (2017). Chemical synthesis and in silico molecular modeling of novel pyrrolyl benzohydrazide derivatives: Their biological evaluation against enoyl ACP reductase (InhA) and Mycobacterium tuberculosis. *Bioorg Chem, 75*, 181-200. doi: 10.1016/j.bioorg.2017.09.008
7. Salla A Munro , S. A. L., Helen J Smith, Mark E Engel, Atle Fretheim, Jimmy Volmink. (2007). Patient Adherence to Tuberculosis Treatment: A Systematic Review of Qualitative Research. *4*, 1230-1244. doi: 10.1371/journal.pmed.0040238.g001
8. Schroeder, E. K., Basso, L. A., Santos, D. S., & de Souza, O. N. (2005). 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, 89*(2), 876-884. doi: 10.1529/biophysj.104.053512
9. Sink, R., Sosic, I., Zivec, M., Fernandez-Menendez, R., Turk, S., Pajk, S., . . . Gobec, S. (2015). Design, synthesis, and evaluation of new thiadiazole-based direct inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase (InhA) for the treatment of tuberculosis. *J Med Chem, 58*(2), 613-624. doi: 10.1021/jm501029r

P10

Computational investigation of quinazoline analogues as PknB inhibitors for tuberculosis treatment through combined QSAR, molecular docking and molecular dynamics simulation

Chayanin Hanwarinroj[1], Naruedon Phusi[1],Thimpika Pornprom [1], Kanchiyaphat Ariyachaokun[2], Pharit Kamsri[3], Auradee Punkvang[3], Patchreenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Khomson Suttisintong[5], Prasat Kittakoop[6], James Spencer[7], Adrian Mulholland[8] and Pornpan Pungpo[1*]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand
[2]Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand
[3]Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom, 48000, Thailand
[4]Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900 Thailand
[5]National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand
[6]Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand
[7]School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom
[8]Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, United Kingdom
*E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com

Serine/threonine protein kinase protein kinase B (PknB) of *Mycobacterium tuberculosis* with possible roles in a number of signaling pathways involved in cell division and metabolism. This enzyme has been identified as tuberculosis drug development target. In this study, HQSAR and 3D QSAR CoMSIA were applied to understand the structural requirement of quinazoline based PknB inhibitors. In addition, molecular dynamics simulations (MD simulations) were performed to evaluate the binding affinity in a series of quinazoline derivatives. The result indicated that the best QSAR models show reliable predictive ability. The predicted biological activity corresponded well to experimental result. MD simulation showed good correlation between experimental and calculated binding free energy using MM-PBSA, MM-GBSA and waterswap calculations. Moreover, hydrogen bond interactions and hydrophobic interactions are crucial interactions between quinazoline derivatives in PknB binding pocket. Based on the integrated results, it successfully provide fruitful information for design of novel PknB inhibitors with highly and more potent as anti-tuberculosis agents.

Molecular Docking Calculations of Novel Pyrrolyl Benzohydrazide and Pyrrolyl Benzamide Derivatives InhA Inhibitors as Anti-Tuberculosis Agents

Issaraporn Saenglum[1], Paptawan Tongdee[1], Naruedon Phusi[1], Chayanin Hanwarinroj[1], Thimpika Pornprom[1], Kampanart Chayajarus[1], Kanchiyaphat Ariyachaokun[2], Pharit Kamsri[3], Auradee Punkvang[3], Patchreenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Khomson Suttisintong[5], Prasat Kittakoop[6], James Spencer[7], Adrian Mulholland[8] and Pornpan Pungpo[1]*

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*

[2]*Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*

[3]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand*

[4]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*

[5]*National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*

[6]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*

[7]*School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom*

[8]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, United Kingdom*

**E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com*

Mycobacterium tuberculosis remains to be the major cause for tuberculosis. Enzyme Enoyl-ACP reductase (InhA) of *Mycobacterium tuberculosis* is an enzyme which is important for the growth of bacteria. This work used molecular docking calculations to study the binding mode and the crucial interactions of novel pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives in InhA binding site. The obtained results show that H-bonding interactions with Tyr 158 and cofactor NAD^+ of compound 25. Cation-Pi interactions between aromatic ring of compound 3 with hydrogen atom of Lys165 was obtained. In addition, sigma-Pi interaction between aromatics ring of compound 3 with hydrogen atom of Met161 are important for binding in the active site of InhA. Moreover, hydrophobic interaction between ligand and Pro156, Ala157, Ile202 Val203 and Leu218 residues were found of compound 1, compound 3 and compound 25. This information on the structure interaction between enzyme inhibitors and enzymes is important in the design and development of new drugs tuberculosis inhibitors.

Keywords: InhA; Docking; Pyrrolyl benzohydrazide derivatives; Pyrrolyl benzamide derivatives

© The 2019 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2019)

Interaction and Structural Requirement of 4-Thiazolidinone (Rhodanine) Inhibitors as Potential Anti-Tuberculosis Agents: MD Simulations, Molecular Docking Calculations and 3D-QSAR

Thimpika Pornprom[1], Bandit Khamsri[1], Bongkochawan Pakamwong[1], PaptawanThongdee[1], Issaraporn Saenglam[1], Naruedon Phusi[1], Chayanin Hanwarinroj[1], Kampanart Chayajarus[1], Kanchiyaphat Ariyachaokun[2], Pharit Kamsri[3], Auradee Punkvang[3], Patchreenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Khomson Suttisintong[5], Prasat Kittakoop[6], James Spencer[7], Adrian Mulholland[8], Pornpan Pungpo[1,*]

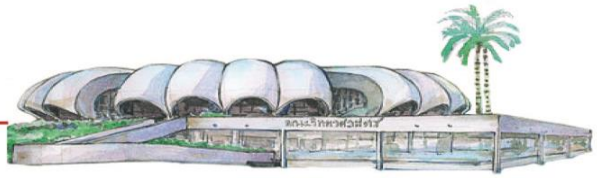
[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
[2]*Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
[3]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand*
[4]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*
[5]*National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*
[6]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*
[7]*School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom*
[8]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, United Kingdom*
**Email: pornpan_ubu@yahoo.com*

Mycobacterial enoyl-ACP-reductase (InhA) is an enzyme contributing in mycolic acids biosynthesis has been established as promising target of anti-tuberculosis drugs. In this study, 4-thiazolidinone (rhodanine) inhibitors were selected to study the structural requirement and crucial interaction using molecular modelling techniques including 3D-QSAR CoMSIA approach, molecular docking calculations and molecular dynamics simulations. Molecular docking calculations were used to elucidate the key interactions for binding of these inhibitors in InhA binding pocket. The obtained results showed that hydrogen bond interaction between R substituent with Tyr158, Glu219 and NAD^+ cofactor were found. 3D-QSAR CoMSIA study was applied to investigate the structural requirement of 4-thiazolidinone (rhodanine) inhibitors with reliable predictive ability (q^2). Molecular dynamics simulations were performed to elucidate the binding interaction and binding free energy of 4-thiazolidinone (rhodanine) inhibitors. Hydrogen bond interactions were found as the crucial interactions for binding in the InhA binding site. Binding free energy calculations based on MM-PBSA method corresponded well to the experimental value. The integrated result obtained from this study aid to better understand on the structural basis of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives for rational design more potent InhA inhibitors as potential anti-tuberculosis agents.

Keywords: Enoyl-ACP-reductase (InhA); 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives; Molecular dynamics simulations; Molecular docking calculations; 3D-QSAR

© The 2019 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2019)

PACCON 2018
Pure and Applied Chemistry International Conference



Rational design of PknB inhibitors in class of 4-oxo-crotonic acid derivatives as highly potent anti-tuberculosis agents

Chayanin Hanwarinroj,[1] Naruedon Phusi,[1] Pharit Kamsri,[2] Auradee Punkvang,[2] Patchareenart Saparpakorn,[3] Supa Hannongbua,[3] Khomson Suttisintong,[4] and Pornpan Pungpo[1*]

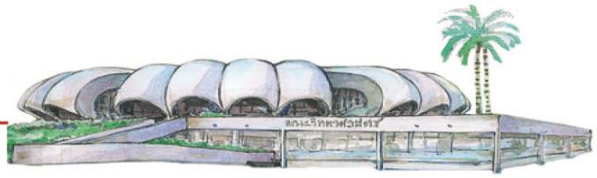
[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University*
[2]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University*
[3]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University*
[4]*National Nanotechnology Center, 114 Thailand Science Park, Pathumthani, Thailand*
**E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)*

Abstract: Protein serine/threonine kinase B (PknB) is an essential serine/threonine kinase of *M. tuberculosis*, plays an important role in a number of signalling pathways involved in cell division and metabolism. However, PknB inhibitors show less potency against whole cell. To develop protein kinase B inhibitors as new potential anti-tuberculosis agents in class of 4-oxo-crotonic acid derivatives, molecular docking calculations and molecular dynamic simulations (MD simulations) were applied to understand the crucial interactions, binding mode and binding energy of selected 4-oxo-crotonic acid derivatives. The results obtained from molecular docking calculations indicated that highly active compound form hydrogen bond interactions with back bone of Leu17 Val95 and Asp156 in the PknB binding pocket. Moreover, Van der Waals interactions with Tyr94 Val95 and Met145 in the PknB binding pocket were crucial for binding affinity. The binding mode and binding energy of highly active compound obtained from MD simulations was observed. The result can help for further design a novel anti-tuberculosis drug design.

Keywords: Protein serine/threonine kinase B; Anti-tuberculosis agents; Molecular docking calculations; Molecular dynamic simulations

© The 2018 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2018)

PACCON 2018
Pure and Applied Chemistry International Conference



Molecular docking and 3D-QSAR study of pyrrolyl benzohydrazide derivatives to explore the structure requirements of InhA inhibitors

Paptawan Thongdee[1], Bongkochawan Pakamwong[1], Kotchakorn Yotyiamkrae[1], Bunrat Tharat[1], Bundit Khamsri[1], Thitima Chuansupak[1], Naruedon Phusi[1], Chayanin Hanwarinroj[1], Kampanart Chayajarus[1], Pharit Kamsri[2], Auradee Punkvang[2], Nitima Suttipanta[3], Patchreenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Prasart Kittakoop[5], Ubonsree Leartsakulpanich[6], Khomson Suttisintong[7], James Spencer[8], Adrian Mulholland[9] and Pornpan Pungpo[1*]

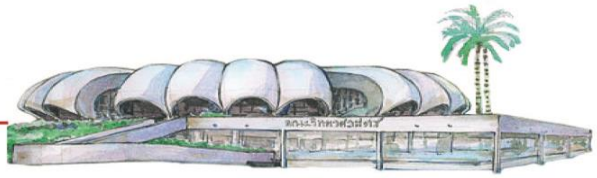
[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand*
[2]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom, 48000, Thailand*
[3]*Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand*
[4]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900 Thailand*
[5]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*
[6]*National Center for Genetic Engineering and Biotechnology , NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*
[7]*National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*
[8]*School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom*
[9]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, United Kingdom*
**E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com*

Abstract: Enoyl ACP reductase, InhA has been identified as promising target for anti-tuberculosis development. This enzyme is the binding pocket of isoniazid, the first line drug for anti-tuberculosis agents. However, the potency of isoniazid is decreased due to the mutation of activation enzyme, KatG. Pyrrolyl benzohydrazide derivatives were designed as new InhA inhibitors with moderate activities against InhA and mycobacterial cell. Herein, we aim to develop new highly potent InhA inhibitors based on pyrrolyl benzohydrazide derivatives. Molecular docking calculations were used to elucidate the key interactions for binding of these inhibitors in InhA binding pocket. The obtained results showed that hydrogen bond interaction between ligand and Pro156, Tyr158, Ala198, Val203 and NAD^+ cofactor. Moreover, pi-pi interaction and hydrophobic interactions were improved the binding affinity of inhibitors in InhA binding site. Reiliable 3D-QSAR model was obtained based on q^2 value. The structural requirement of pyrrolyl benzohydrazide derivatives were investigated based on QSAR contour maps. The integrated results from docking and QSAR in this work aided to rational design new and more potent InhA inhibitors in a series of pyrrolyl benzohydrazide as novel anti-tuberculosis agents.

Keywords: Pyrrolyl benzohydrazide; InhA inhibitors; 3D-QSAR

© The 2018 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2018)

PACCON 2018
Pure and Applied Chemistry International Conference



Molecular modeling, design and synthesis of InhA inhibitors in the class of Benzimidazole derivatives as a novel Anti-tuberculosis agents

Bunrat Tharat[1], Bongkochawan Pakanwong[1], Paptawan Thongdee[1], Kotchakorn Yotyiamkrae[1], Bundit Khamsri[1], Thitima Chuansupak[1], Naruedon Phusi[1], Chayanin Hanwarinroj[1], Kampanart Chayajaras[1], Nitima Suttipanta[2], Pharit Kamsri[3], Auradee Punkvang[3], Patchreenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4],Prasart Kittakoop[5], Khomson Suttisintong[6], Adrian Mulholland[7], James Spencer[8] and Pornpan Pungpo[1,*]

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand*

[2]*Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190*

[3]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom, 48000, Thailand*

[4]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900 Thailand*

[5]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*

[6]*National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand*

[7]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, United Kingdom*

[8]*School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom*

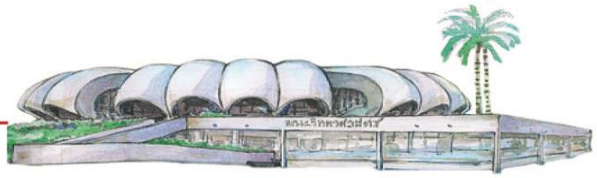
**E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com*

Abstract: Benzimidazole derivatives are good candidates for anti-tuberculosis agents that display a promising potency for inhibition of InhA. In this work, molecular docking combined with bioisoester was applied to modification to gain new potential structure of this series. This derivative has to same general structure but different R substituent. Cpd05 was highest active compound, Cpd32 and Cpd46 were moderate active compounds and Cpd55 was less active compound were classified based on the predicted binding affinity. To gain more details of binding interactions new designed compounds, Molecular dynamic simulation of inhibitor-InhA was employed. The interactions Cpd 05, Cpd32, Cpd46 and Cpd55 with of amino acid surrounding the binding pocket of InhA enzyme were analyzed. Hydrogen bond interactions were found as the crucial interactions for binding in InhA binding site. These results lead to synthesis new series of benzimidazole derivatives. The biological activity of new synthesized compounds will be consecutively evaluated.

Keywords: Benzimidazole; InhA inhibitors; Molecular docking; Molecular dynamic simulation

© The 2018 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2018)

PACCON 2018
Pure and Applied Chemistry International Conference



In-silico Aided Inhibitor Design of Benzoimidazole-containing Derivatives as Novel Direct InhA Inhibitors

Pharit Kamsri[1,*], Auradee Punkvang[1], Patchreenart Saparpakorn[2], Supa Hannongbua[2], Sanya Sureram[3], Prasat Kittakoop[3], Nitima Suttipanta[4], Khomson Suttisintong[5], Adrian Mulholland[6], James Speccer[7], Pornpan Pungpo[8]

[1]*Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand*
[2]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*
[3]*Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand*
[4]*Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand*
[5]*National Nanotechnology Center, NSTDA, Pathum Thani 12120, Thailand*
[6]*Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK*
[7]*School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK*
[8]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*
**E-mail: pharit.kamsri@npu.ac.th*

Benzimidazole derivative has been identified as new potential lead InhA inhibitors based on virtual screening and biological assay evaluations. This compound exhibited the good enzyme assay (IC_{50}) and mycobacterial assay (MIC). To develop novel benzimidazole-containing derivatives based InhA inhibitors, *in silico* based virtual screening was performed on ChemBridge database. Our finding indicated that the **5928640** is a potential candidate to be a novel InhA inhibitor benzimidazole-containing hit for further design. Therefore, novel InhA inhibitors based on **5928640** derivatives were designed using bioisostere replacement combined with ADMET prediction and molecular docking calculations. MD simulations and waterswap calculations were applied to gain insight into the binding mode and key interactions for binding of **5928640** as well as the new designed **5928640** derivatives. The obtained results revealed that hydrogen bond interaction between benzimidazole core with Tyr158 is the key interactions of new benzimidazole-containing derivatives. In addition, hydrophobic interactions could be considered as the contribution for stabilizing the InhA-ligand complex. Accordingly, the obtained results from this work aid to rational design of new benzimidazole-containing derivatives as new potential InhA inhibitors for mycobacterial drug development.

Keywords: Benzimidazole-containing derivatives, InhA inhibitors, MD simulations, Waterswap calculations

© The 2018 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2018)

Elucidating the Key Structural Features of 1)-Benzimidazol-1-yl-(3)-2,3-Dihydro-1*H*-inden-5-yloxy (Propan-2-ol of Enoyl-ACP Reductase Inhibitor as a Novel Anti-tuberculosis Agents using Molecular Docking Calculations and Molecular Dynamic Simulations

Bunrat Tharat[1]
bunrat30353@gmail.com

Naruedon Phusi[1], Chayanin Hanwarinroj[1], Kampanart Chayajaras[1], Nitima Suttipanta[2], Pharit Kamsri[3], Auradee Punkvang[3], Patchareenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Khomson Suttisintong[5]

Pornpan Pungpo[1]*
pornpan_ubu@yahoo.com

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand
[2]Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Thailand
[3]Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom, Thailand
[4]Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand
[5]National Nanotechnology Center, NSTDA, Thailand

1) -benzimidazol-1-yl-(3) -2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yloxy (propan-2-ol was discovered as novel anti-tuberculosis agent by structure based virtual screening onto enoyl-ACP reductase)InhA (binding site and mycobacterial whole cell assay .Here, this compound was used as the template for developing of highly potent anti-tuberculosis agents .In this study, bioisosterism was applied to modify the structure of 2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yloxy ring and molecular docking calculations was applied as screening tools to obtain new structures of 1) -benzimidazol-1-yl-(3) -2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yloxy (propan-2-ol derivatives . The obtained results show that 72 novel compounds were highly predicted binding energy in InhA binding site than template compound . Moreover, molecular dynamic simulations were applied to elucidate the binding mode and binding interactions into the InhA binding site . The crucial interaction of highly active compound formed hydrogen bond interactions between hydroxyl group with hydroxyl group of nicotinamide ribose cofactor and Tyr158 . The binding affinity of highly active compound was improved by hydrophobic interactions of modified substituents onto 2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yloxy ring with amino acid surrounding binding site .Accordingly, the obtained results aid to understand the crucial interactions of 1)-benzimidazol-1-yl-(3)-2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yloxy (propan-2-ol derivatives of InhA inhibitors and provide information structure concept for designing of novel compounds with better potency against *M .tuberculosis.*

Keywords: anti-tuberculosis agents, enoyl-ACP reductase, molecular docking calculations, molecular dynamic simulations

Binding Mode of Bioactive Compounds of Marine-Derived Fungus *Aspergillus unguis* in *M. tuberculosis* PknG Binding Site : Structure Based Drug Design

Pharit Kamsri, Auradee Punkvang
Division of Chemistry, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand
pharit.kamsri@npu.ac.th

Patchreenart Saparpakorn, Supa Hannongbua
Department of Chemistry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Zhaoqiang Chen, Weiliang Zhu
Drug Discovery and Design Center, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Sanya Sureram, Prasart Kittakoop
Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

Nitima Suttipanta
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand

Pornpan Pungpo*
Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand
pornpan_ubu@yahoo.com

Mycobacterium tuberculosis Serine/Threonine Protein Kinase G, PknG has been focused as attractive target for anti-tuberculosis drug development . This enzyme involves in signal transduction partway that is essential to promote mycobacterial survival within macrophages. Herein, we aim to develop new anti-tuberculosis agents based on PknG inhibitors with short treatment durations from Thai natural products. Bioactive compounds which isolated from marine-derived fungus *Aspergillus unguis* were docked into PknG binding pocket to elucidate the binding mode, binding interactions, and binding affinity .The obtained result based on docking score suggested that aspergillusidone A was strongest bound to PknG active site with docking score of -9.08 kcal/mol .Based on MD simulations, hydrogen bond interactions of hydroxyl group with carbonyl backbone of Glu233 and Val235 were found as the crucial rule for binding in PknG binding site .In addition, molecular behavior aspergillusidone A/PknG complex was provided the key information to develop highly specific PknG inhibitors from bioactive compounds . Therefore, the obtained results from this study guide to design the new potential bioactive compounds and biological assay evaluation against PknG .

Keywords: PknG inhibitors, natural products, molecular docking

การอธิบายข้อมูลทางโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA สำหรับสารต้านโรควัณโรค: การออกแบบสารยับยั้งโดยอาศัยข้อมูลทางลิแกนด์และข้อมูลทางโครงสร้าง

นฤดล ภูศรี[1] ฑิมพิกา พรพรม[1] ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์[1] บัณฑิต คำศรี[1] บงกชวรรณ พาคำวงค์[1] ภาพตะวัน ทองดี[1]
กัมปนาท ฉายจรัส[1] นิธิมา สุทธิพันธ์[2] พฤทธิ์ คำศรี[3] อรดี พันธ์กว้าง[3] พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์[4]
สุภา หารหนองบัว[4] พจนีย์ ศรีมาโนชญ์[5] คมสันต์ สุทธิสินทอง[6] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[1]*
[1] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[2] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[3] สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม
[4] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[5] คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
[6] ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย
* E-mail : pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาระเบียบวิธีการทางด้านการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาและปรับเปลี่ยนสารยับยั้งของโมเลกุลเป้าหมายชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในการยับ เอนไซม์อีโนอิลเอซีพีรีดักเตส หรือเอนไซม์ InhA ของเชื้อ*ไมโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลสิส* ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายในการออกฤทธิ์ยับยั้งของตัวยาหลักในการรักษาโรควัณโรคอย่างยาไอโซไนอาซิด ซึ่งการดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดเกี่ยวเนื่องจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA ในการพัฒนายาต้านโรควัณโรคซึ่งสารยับยั้งโรควัณโรคที่ถูกนำมาทำการศึกษาในการพัฒนาสารยับยั้งเชื้อโรควัณโรคคือ สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ของเชื้อ*ไมโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลสิส* ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุลและการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติถูกประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาข้อมูลที่สำคัญของตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ทำให้ทราบถึงรูปแบบการวางตัวในโพรงการจับของตัวยับยั้งอันตรกิริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นในโพรงการจับและความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA ซึ่งเป็นแนวทางในการออกแบบตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA มีศักยภาพสูงขึ้น

คำสำคัญ : สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide การคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติ

Elucidating the Structural Basis of InhA Inhibitors for Anti-Tuberculosis Agents: Ligand and Structure Based Drug Design Approaches

Naruedon Phusi[1], Thimpika Pornprom[1], Chayanin Hanwarinroj[1], Bundit Khamsri[1], Bongkochawan Pakamwong[1], Paptawan Thongdee[1], Thitima Chuansupak[1], Kampanart Chayarus[1], Nitima Suttipanta[2], Pharit Kamsri[3], Auradee Punkvang[3], Patchareenart Saparpakorn[4], Supa Hannongbua[4], Potjanee Srimanote[5], Khomson Suttisintong[6] and Pornpan Pungpo[1]*

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

[2] Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University

[3] Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University

[4] Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

[5] Faculty of Allied Health Science, Thammasat University

[6] National NANO Technology Center, Thailand Science Park

* E-mail : pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

Abstract

In this research, computer aided molecular design approaches were applied to investigate and optimization of novel drug targets due to high potential. Enoyl-ACP reductase (InhA) of *Mycobacterium tuberculosis*, has been shown to be the primary target of the isoniazid. The isoniazid resistance arises from the mutations of InhA. The developing new and more potent anti-tuberculosis agents, which are selected the heteroaryl benzamide derivative as potential anti-tuberculosis agents active against *Mycobacterium tuberculosis* InhA. Molecular docking calculations, molecular dynamics (MD) simulations and three dimensional quantitative structure activity relationships (3 D-QSAR) were applied to elucidate the important information of InhA inhibitors. Therefore, the important information from this studies were applied to understand the binding mode of inhibitors in binding pocket, the crucial interactions of inhibitors in binding pocket and the structure requirements of heteroaryl benzamide derivatives as InhA inhibitors provided guidelines for the design of new and more potent InhA inhibitors.

Keywords : Heteroaryl Benzamide Derivatives, Molecular Docking Calculations, Molecular Dynamics Simulations, Three Dimensional Quantitative Structure Activity Relationship

การออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณของสารอนุพันธ์ 4 aminoquinolone piperidine amide ซึ่งมีศักยภาพสูงในการยับยั้งโรควัณโรค

ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์[1*] นฤดล ภูศรี[1] พฤทธิ์ คำศรี[2] อรดี พันกว้าง[2] กัมปนาท ฉายจรัส[1] นิธิมา สุทธิพันธุ์[3]
พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์[4] สุภา หารหนองบัว[4] คมสันต์ สุทธิสินทอง[5] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[1*]
[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม
[3]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[4]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[5]ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย
[*]E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

บทคัดย่อ

โรควัณโรคเกิดจากเชื้อไมโครแบคทีเรียมทูเบอร์คูโลซิส (Mycobacterium tuberculosis) เอนไซม์ดีคาร์พรีนิลฟอสโฟริล-เบต้า-ดี-ไรโบส-2-อิพิเมอเรส (DprE1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ arabinogalactan ที่ผนังเซลล์ของไมโครแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส และยังถูกค้นพบว่าเป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับการพัฒนาเป็นยับยั้งโรควัณโรค สารอนุพันธ์ 4 aminoquinolone piperidine amide เป็นสารยับยั้งโรควัณโรคชนิดนอนโควาเลนต์ สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ถูกพัฒนาเพื่อเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 อย่างไรก็ตาม สารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ชนิดพัฒนาขึ้นมายังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ระเบียบวิธี 3D-QSAR การคำนวณโมเลคูลาร์ด็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล และการคำนวณ fragment molecular orbital (FMO) ถูกประยุกต์ใช้เพื่อทำให้ทราบถึงความต้องการทางโครงสร้างและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้เข้าใจถึงความต้องการทางโครงสร้าง รูปแบบการจับ และอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide เพื่อใช้เป็นแนวทางในการออกแบบสารยับยั้งโรควัณโรคให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

คำสำคัญ : เอนไซม์ดีคาร์พรีนิลฟอสโฟริล-เบต้า-ดี-ไรโบส-2-อิพิเมอเรส ไมโครแบคทีเรียมทูเบอร์คูโลซิส 3D-QSAR การคำนวณโมเลคูลาร์ด็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล การคำนวณ fragment molecular orbital

Computer Aided Molecular Design of 4-aminoquinolone piperidine amides Derivatives as Highly Potent Anti-Tuberculosis Agents

Chayanin Hanwarinroj[1*] Naruedon Phusi[1] Pharit Kamsri[2] Auradee Punkvang[2] Patchareenart Saparpakorn[3] Supa Hannongbua[3] Khomson Suttisintong[4] and Pornpan Pungpo[1*]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University

[3]Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

[4] National Nanotechnology Center, 114 Thailand Science Park, Pathumthani, Thailand

[*]E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

Abstract

Tuberculosis (TB) is caused by Mycobacterium tuberculosis. Decaprenyl phosphoryl-β-D-ribose oxidase (DprE1) involved in arabinogalactan biosynthesis partway of *M. tuberculosis* cell wall has been identified as a promising target for anti-tuberculosis drug developments. A group of 4 aminoquinolone piperidine amide derivatives were identified as noncovalent DprE1 inhibitors. These compounds were modified to increase their inhibitory activities against DprE1 as well as *M. tuberculosis*. However, these DprE1 enzyme inhibitors are not efficient. Therefore, in this research 3D-QSAR, molecular docking calculations, molecular dynamic simulations, and fragment molecular orbitals were performed to elucidate the structural requirements and crucial interaction of 4 aminoquinolone piperidine amide derivatives. These results lead to better understanding of the structural requirement of 4-aminoquinolone piperidine amide derivatives for designing effective anti-tuberculosis agents.

Keywords : Decaprenyl phosphoryl-β-D-ribose oxidase (DprE1), *M. tuberculosis*, 3D-QSAR Molecular Docking Calculations, Molecular Dynamic Simulations, Fragment Molecular Orbitals Approach

การศึกษารูปแบบการจับและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ Pyrrolyl benzohydrazide โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งและการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล

ภาพตะวัน ทองดี[1] ฑิมพิกา พรพรม[1] บัณฑิต คำศรี[1] บงกชวรรณ พาคำวงค์[1] นฤดล ภูศรี[1]
ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์[1] กัมปนาท ฉายจรัส[1] พฤทธิ์ คำศรี[2] อรดี พันธ์กว้าง[2] พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์[3]
สุภา หารหนองบัว[3] พจนีย์ ศรีมาโนชญ์[4] คมสันต์ สุทธิสินทอง[5] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[1*]
[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม
[3]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[4]คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
[5]ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย
[*]E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

บทคัดย่อ

M. tuberculosis เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการเกิดวัณโรคซึ่งมี Enoyl ACP reductase (ENR) หรือ InhA เป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบหลักของแบคทีเรีย ดังนั้นเอนไซม์ InhA จึงเป็นเป้าหมายในการพัฒนาเพื่อยับยั้งวัณโรค ปัจจุบันมียาไอโซไนอะซิด เป็นยายับยั้ง *M. tuberculosis* แต่พบว่าเมื่อใช้ยาไอโซ-ไนอะซิดต่อเนื่องจะเกิดการดื้อยาซึ่งสาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของ KatG งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยมีอนุพันธ์ของ Pyrrolyl benzohydrazide เป็นพื้นฐานและใช้วิธีโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งเพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารกลุ่มยับยั้งกับ InhA เป้าหมาย ซึ่งพบว่าสารยับยั้งเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนใน InhA ได้แก่ พันธะไฮโดรเจนที่ Pro156 Tyr158 Ala198 Val203 และโคแฟกเตอร์ NAD^+ และพันธะไพซึ่งเป็นอันตรกิริยาที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพระหว่างสารกลุ่มยับยั้งและโมเลกุล InhA ได้และใช้วิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่ทำให้โครงสร้างเสถียรที่สุด ซึ่งจากการวิเคราะห์ร่วมกันสามารถนำมาออกแบบโครงสร้างใหม่เพื่อยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้อย่างสมเหตุสมผล

คำสำคัญ : วัณโรค โมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง วิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล

Elucidating of Binding Modes and Crucial Interactions of Pyrrolyl Benzohydrazide using Molecular Docking Calculations and Molecular Dynamic Simulations Approaches

Paptawan Thongdee,[1] Thimpika Pornprom,[1] Bandit Khamsri,[1] Bongkochawan Pakamwong,[1] Naruedon Phusi,[1] Chayanin Hanwarinroj,[1] Kampanart Chayajarus,[1] Pharit Kamsri,[2] Auradee Punkvang,[2] Patchareenart Saparpakorn,[3] Supa Hannongbua,[3] Potjanee Srimanote,[4] Khomson Suttisintong[5] and Pornpan Pungpo[1*]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University

[3]Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

[4]Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus

[5]National Nanotechnology Center, 114 Thailand Science Park, Pathumthani, Thailand

[*]E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

Abstract

M. tuberculosis is a cause of tuberculosis. The Enoyl ACP reductase (ENR) or InhA. InhA is an important enzyme for synthesis fatty acid of a bacteria cell. Nowadays, isoniazid (INH) is a drug target for treatment of active tuberculosis infections, but mutation of KatG to resistance INH. In this study, molecular docking calculations and molecular dynamic simulations were applied to elucidate the binding modes and crucial interactions between pyrrolyl benzohydrazide derivatives in InhA binding pocket. The obtained results provided that hydrogen bond interaction between ligand and Pro156, Tyr158, Ala198, Val203 and NAD^+ cofactor. Moreover, pi-pi interaction was improved the binding affinity of inhibitors in InhA binding site. The integrated results obtained from this study aided by the rational design of new and more potent InhA inhibitors.

Keywords : Tuberculosis, Molecular Docking Calculations, Molecular Dynamics Simulations

การออกแบบยาโดยอาศัยโครงสร้างของสารอนุพันธ์ควินาโซลิน ซึ่งเป็นการยับยั้งโรควัณโรคที่มีศักยภาพสูง: การคำนวณโมเลคูลาร์ด๊อกกิ้ง

ฑิมพิกา พรพรม[1] บัณฑิต คำศรี[1] บงกชวรรณ พาคำวงค์[1] ภาพตะวัน ทองดี[1] นฤดล ภูศรี[1] ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์[1] กัมปนาท ฉายจรัส[1] นิธิมา สุทธิพันธุ์[2] พฤทธิ์ คำศรี[3] อรดี พันธ์กว้าง[3] พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากรณ์[4] สุภา หารหนองบัว[4] พจนีย์ ศรีมาโนชญ์[5] คมสันต์ สุทธิสินทอง[6] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[1*]

[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[2]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[3]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

[4]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[5]คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

[6]ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

[*]E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

บทคัดย่อ

เอนไซม์ PknB ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญของเชื้อวัณโรค *M. tuberculosis* มีบทบาทสำคัญหลายวิธีในการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์และกระบวนการเมตาบอลิซึม อย่างไรก็ตามจนถึงตอนนี้ สารยับยั้ง PknB ศักยภาพต่ำในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ เพื่อพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ตัวใหม่ที่มีศักยภาพในการเป็นสารยับยั้งโรควัณโรค ระเบียบวิธีการออกแบบโมเลกุลโดยอาศัยโครงสร้างของตัวจับ การคำนวณโมเลคูลาร์ด๊อกกิ้งถูกประยุกต์ใช้ เพื่อทำให้เข้าใจถึงอันตรกิริยาที่สำคัญ และรูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ควินาโซลิน ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ผลจากการศึกษาพบว่าระเบียบวิธีการคำนวณโมเลคูลาร์ด๊อกกิ้งให้ค่าความน่าเชื่อถือจากการคำนวณโดยพิจารณาจากค่า RMSD ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.27 อังสตรอม เมื่อทำการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ควินาโซลินพบว่า เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Leu17 Val95 Gly97 และ Asp102 ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB นอกจากนี้ ยังพบอันตรกิริยาแบบแวนเดอวาลส์กับกรดอะมิโน Val25 Val98 และ Ala142 ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากผลการศึกษาวิธีการคำนวณโมเลคิวลาร์ด๊อกกิ้งทำให้เข้าใจถึงความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ควินาโซลินสำหรับการออกแบบสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งวัณโรคที่สูงขึ้น

คำสำคัญ : สารอนุพันธ์ควินาโซลิน ไมโครแบคทีเรียมทูเบอร์คูโลซิส การคำนวณโมเลคูลาร์ด๊อกกิ้ง

Structure Based Drug Design of Quinazoline Derivatives as Highly Potent Anti-Tuberculosis Agents : Molecular Docking Calculations

Thimpika Pornprom,[1] Bandit Khamsri,[1] Bongkochawan Pakamwong,[1] Paptawan Thongdee[1]
Naruedon Phusi[1] Chayanin Hanwarinroj,[1] Kampanart Chayajarus,[1] Nitima Suttipanta,[2]
Pharit Kamsri,[3] Auradee Punkvang,[3] Patchareenart Saparpakorn,[4] Supa Hannongbua,[4]
Potjanee Srimanote,[5] Khomson Suttisintong[6] and Pornpan Pungpo[1*]
[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University
[2]Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University
[3]Department of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University
[4]Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University
[5]Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus
[6]National Nanotechnology Center, 114 Thailand Science Park, Pathumthani, Thailand
[*]E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

Abstract

PknB, an essential serine/threonine kinase of *M. tuberculosis*, plays an important role in a number of signaling pathways involved in cell division and metabolism. However, up to now, PknB inhibitors show less potency against whole cell. To develop protein kinase inhibitors as new potential anti-tuberculosis agents, structure based drug design based on molecular docking calculations was applied to understand the crucial interactions and binding mode of quinazoline derivatives as PknB inhibitors. Molecular docking calculations were evaluated in terms of the root mean square deviation (RMSD) between the docked and observed X-ray conformations of PknB inhibitor in its binding pocket. The RMSD value with 1.27 angstrom was deemed acceptable. For all compounds, the ligand pose with the lowest final docked energy was selected as the best binding mode of these potential PknB inhibitors. The results indicated that highly potent inhibitors showed important hydrogen bond interactions with back bone of Leu17 Val95 Gly97 and Asp102 in the PknB binding pocket. Moreover, Van der Waals interactions with Val25 Val98 and Ala142 in the PknB binding pocket were crucial for binding affinity. Therefore, molecular docking calculations aids to a better understanding of structural requirements of quinazoline derivatives for rational design with more potent PknB inhibitors as potential anti-tuberculosis agents.

Keywords : Quinazoline Derivatives, *M. tuberculosis*, Molecular Docking Calculations