

# 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<sup>a</sup>, Riku Sato<sup>b</sup>, Takuya Ezawa<sup>b</sup>, Shogo Tomioka<sup>b</sup>, Chayanin Hanwarinroj<sup>a</sup>, Bandit Khamsri<sup>a</sup>, Pharit Kamsri<sup>c</sup>, Auradee Punkvang<sup>c</sup>, Pornpan Pungpo<sup>a,\*</sup>, Noriyuki Kurita<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

<sup>b</sup> Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Tempaku-cho, Toyohashi, Aichi, 441-8580, Japan

<sup>c</sup> 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<sup>+</sup>)-specific reduction of the 2-*trans*-enoyl-ACP in the elongation cycle of the fatty acid synthase (FAS)-II pathway. This enzyme is NAD<sup>+</sup>-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<sup>+</sup> to generate INH-NAD<sup>+</sup> 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](mailto:pornpan_ubu@yahoo.com) (P. Pungpo), [kurita@cs.tut.ac.jp](mailto:kurita@cs.tut.ac.jp) (N. Kurita).

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  $\mu M$ , 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  $15 \times 15 \times 15 \text{ \AA}^3$ , 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  $\text{\AA}$ .

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  $\text{\AA}$  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/ $\text{\AA}$ . 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

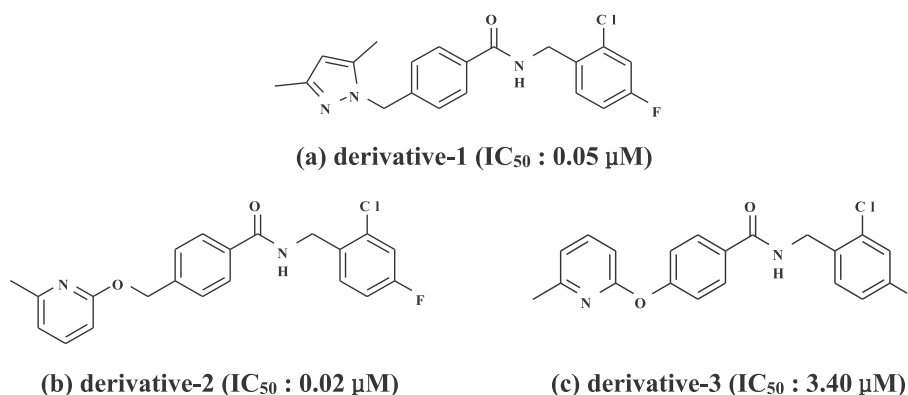


Fig. 1. Chemical structures and  $IC_{50}$  values of the heteraryl benzamide derivatives employed in the present study.

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.

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

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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> affected by the solvating water molecules. In addition, to highlight the important InhA residues or NAD<sup>+</sup> 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.

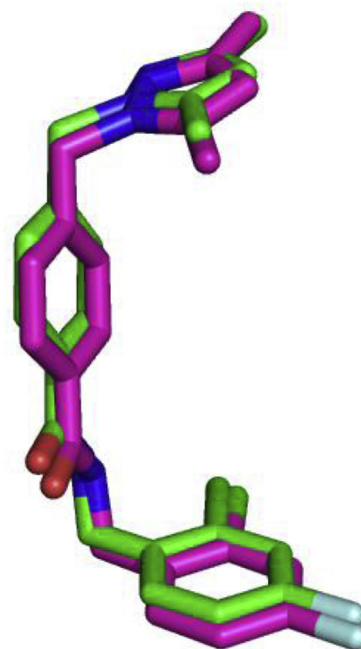
#### 3.2. Binding affinity and specific interactions between InhA and derivative

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<sub>50</sub> values [22]; the larger BE correspond to the smaller IC<sub>50</sub>, although the active derivative-1 displays the similar BE as the inactive derivative-3. To check the accuracy of the BEs, we

**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      |



**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<sub>50</sub> values for the derivatives obtained by the previous experiment [22].

| Derivative | Total energies  |              |                    |            | BE     | IC <sub>50</sub> (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<sup>+</sup>. 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<sub>50</sub> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> cofactor and Met98. This result is consistent with the experiment [22] showing that Met98 of InhA and NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> interact strongly with both the derivatives. Therefore, we concluded that NAD<sup>+</sup> cofactor, Met98 and Gly96 contribute mainly to the binding between InhA and the

derivatives.

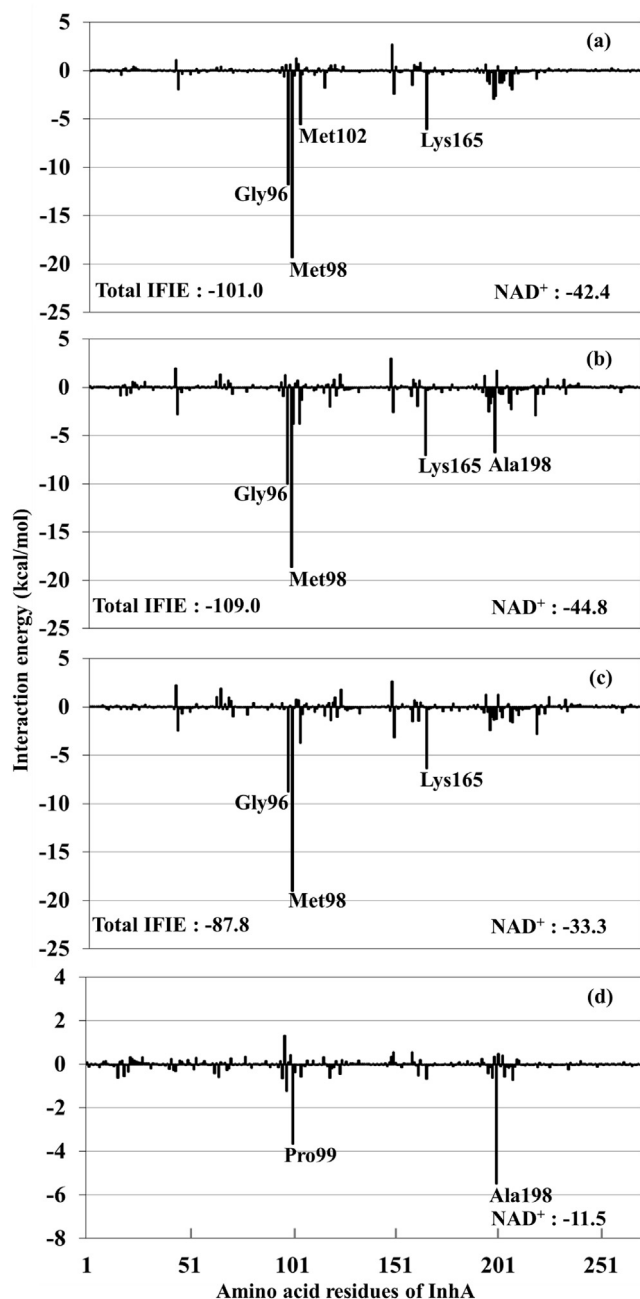
To make clear the reason for the significant difference in BEs between the derivatives-2 and 3, we analysed the difference in IFIEs for these derivatives. As shown in Fig. 3(d), the interaction energies between the derivative and NAD<sup>+</sup> cofactor, Ala198 and Pro99 of InhA are significantly different. These values of IFIEs are listed in Table 3, indicating that the derivative-2 interacts 11.5 kcal/mol stronger with NAD<sup>+</sup> 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<sub>2</sub>− 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> cofactor at 4.72 Å distance, and the electrostatic interaction between the oxygen atom of NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> cofactor and contribute mainly to the interaction between the derivative-2 and NAD<sup>+</sup> cofactor.

**Table 3**  
Interaction energies (IEs; kcal/mol) between the derivative and each amino acid residue of InhA as well as NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> are listed in the last line. The difference in IEs between the derivatives 2 and 3 is also listed.

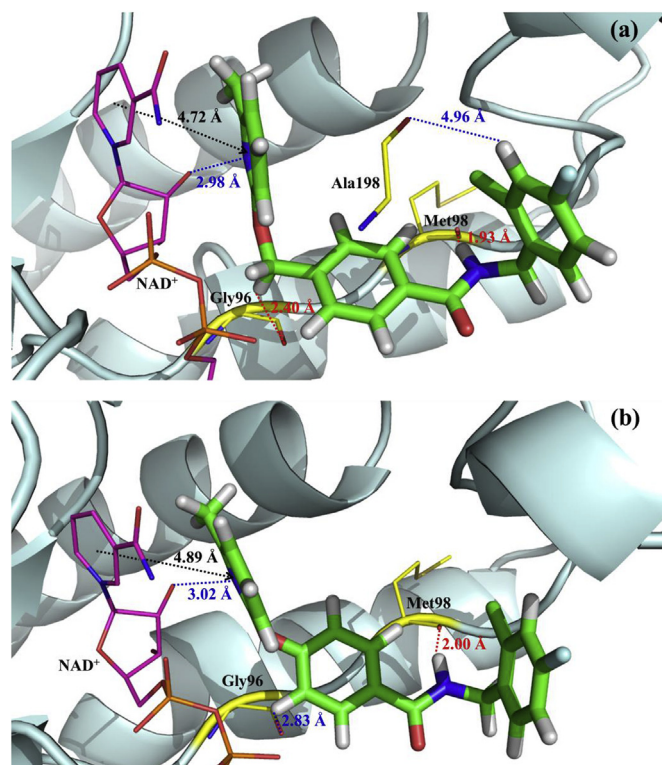
| Residue          | Derivative 1 | Derivative 2 | Derivative 3 | Difference between 2 and 3 |
|------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------------|
| Gly96            | −11.7        | −10.0        | −8.8         | −1.2                       |
| Met98            | −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 <sup>+</sup> | −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).

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<sup>+</sup> 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  $-\text{OCH}_2-$  group between its benzene and pyridine rings, while the derivative-3 has only oxygen atom between the rings. By replacing the  $-\text{OCH}_2-$  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<sup>+</sup> cofactor, as indicated in Fig. 4(a) and (b). Furthermore, the distance between the

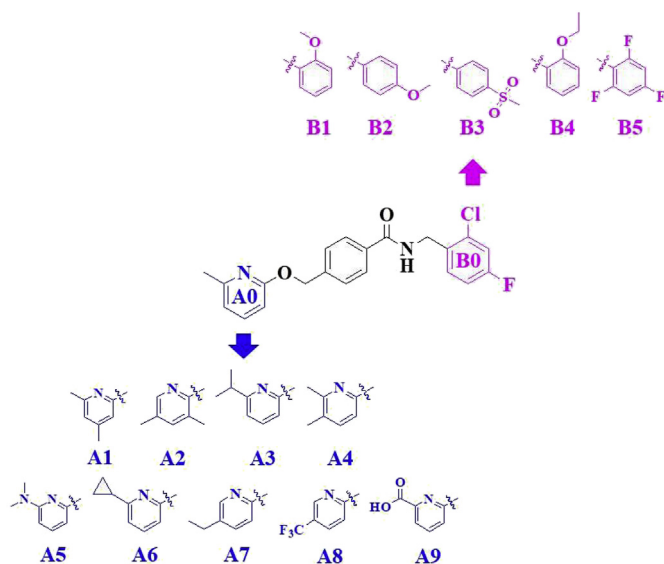


**Fig. 4.** Interacting structures between the InhA residues and the derivative; (a) derivative-2 and (b) derivative-3. Red, blue and black lines indicate hydrogen bonding, electrostatic and  $\pi$ - $\pi$  interactions, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend,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

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<sup>+</sup> cofactor cause significant (35.4 kcal/mol) difference in BEs for the derivatives-2 and 3. Therefore, it is demonstrated that the  $-\text{OCH}_2-$  group of the derivative-2 is important for its strong binding to the InhA + NAD<sup>+</sup> 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 <sup>1</sup> | Rotatable bonds <sup>2</sup> | H-bond acceptors <sup>3</sup> | H-bond donors <sup>4</sup> | LogP <sup>5</sup> |
|-----------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------|
| 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 <sup>1</sup> | PPB <sup>2</sup> | HIA <sup>3</sup> | Caco2 <sup>4</sup> | Carcino_mouse <sup>5</sup> | Carcino_rat <sup>5</sup> |
| 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 InhA + 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

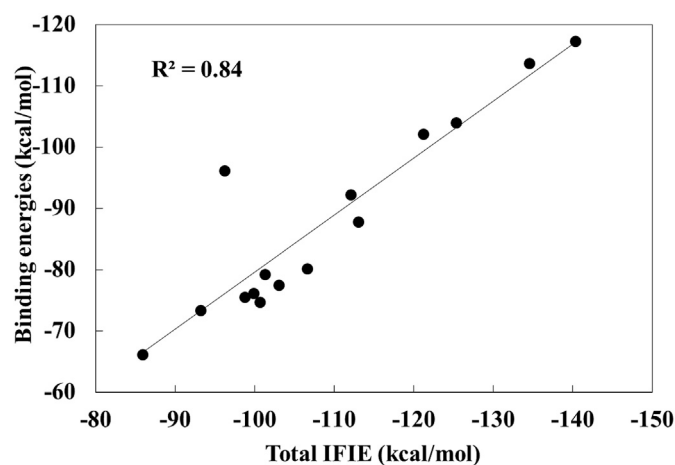
We first docked each of the 15 derivatives to the ligand-binding pocket of InhA. The created structures of the InhA + derivative complex were grouped into several clusters. Among these clusters, we selected the cluster with larger binding energy and a conformation similar to the derivative-1 in the InhA + 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

**Table 7**

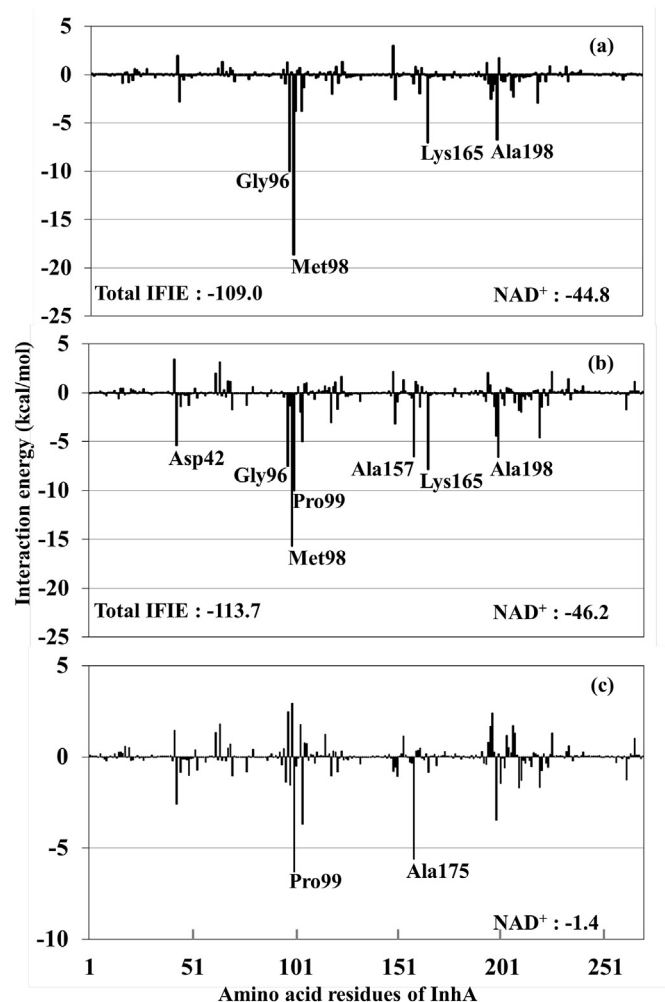
Binding energies (kcal/mol) and total interaction energies (Total IFIE, kcal/mol) between InhA + NAD<sup>+</sup> and our proposed novel derivatives as well as the derivative-2 evaluated by the present *ab initio* FMO calculations.

| 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<sup>+</sup> and the derivative evaluated by the present FMO calculations.

residues and NAD<sup>+</sup> 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



**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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  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

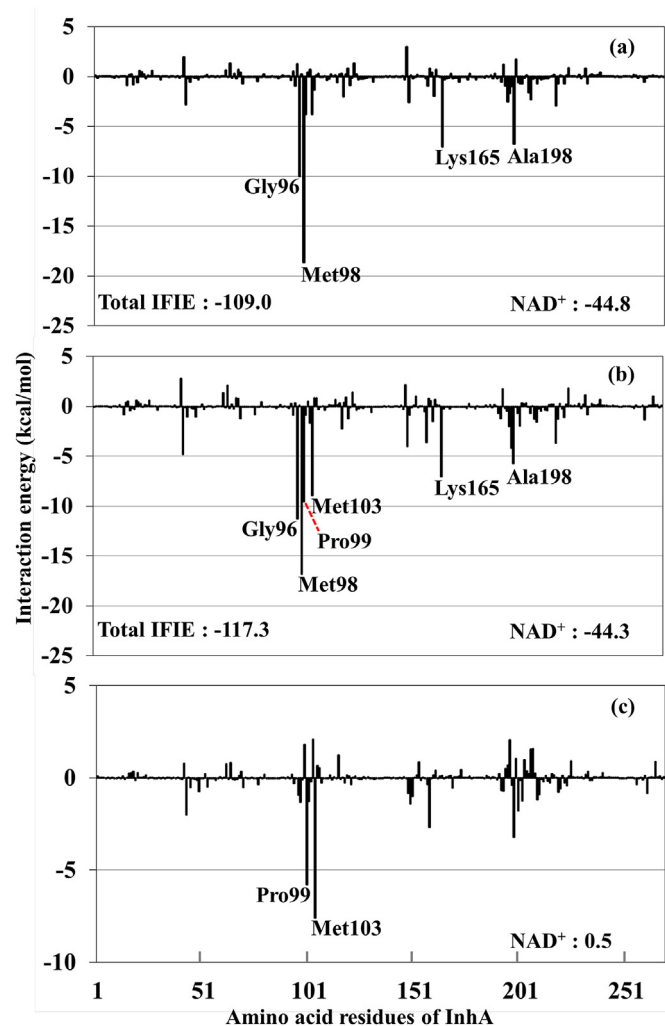


Fig. 8. IFIEs between each amino acid residue of InhA and the derivative; (a) derivative-2, (b) derivative A4/B4, and (c) the difference in IFIEs of (a) and (b).

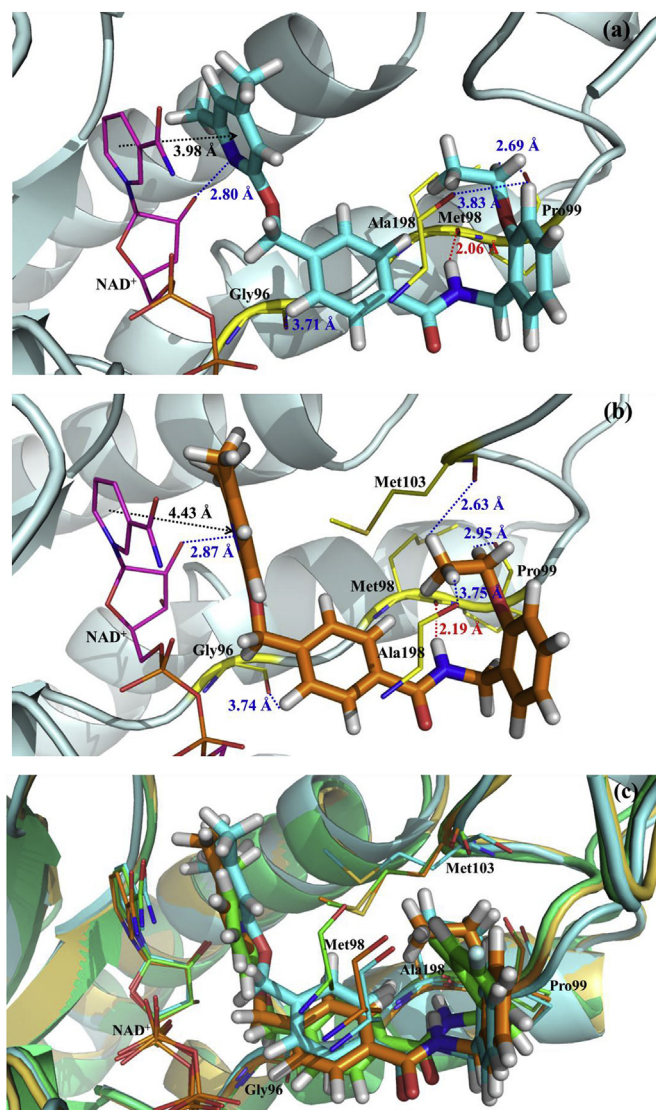


Fig. 9. Interacting structures between the InhA residues and the derivative; (a) derivative A1/B4, (b) derivative A4/B4, and (c) superimposition of derivative-2 (green color), derivative A1/B4 (blue color), and derivative A4/B4 (orange color). Red, blue and black lines indicate hydrogen bonding, electrostatic and  $\pi$ - $\pi$  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  $\text{NAD}^+$  cofactor interact each other by the  $\pi$ - $\pi$  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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  cofactor are shown in Fig. 8(b). The derivative A4/B4 interacts strongly with the  $\text{NAD}^+$  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<sup>+</sup>. As shown in Fig. 9(b), the derivative A4/B4 interacts with the NAD<sup>+</sup> 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 backbone 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<sup>+</sup> to elucidate the following points.

- (1) The derivatives A1/B4 and A4/B4 shown in Fig. 5 bind most strongly to the InhA + NAD<sup>+</sup> complex to be potent inhibitors against InhA.
- (2) The NAD<sup>+</sup> cofactor plays an important role 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.jmngm.2019.02.011>.

#### References

- [1] World Health Organization, Global Tuberculosis Report, 2017. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](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 reemerging 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. Tsouris, 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.* 119 (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. Vilcheze, M. Sugantino, R. Bittman, J.C. Sacchettini, Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD<sup>+</sup> 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. Loch, 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 *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 7425–7426.
- [22] A. Guardia, G. Gulten, R. Fernandez, J. Gúmez, 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. Remuinián, L. Ballé 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. Scalmani, 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 flexibility, *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.

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

Pharit Kamsri,<sup>†</sup> Chayanin Hanwarinroj,<sup>‡</sup> Naruedon Phusi,<sup>‡</sup> Thimpika Pornprom,<sup>‡</sup> Kampanart Chayajarus,<sup>‡</sup> Auradee Punkvang,<sup>†</sup> Nitima Suttipanta,<sup>§</sup> Potjane Srimanote,<sup>||</sup> Khomson Suttisintong,<sup>⊥</sup> Chomphonuch Songsiririthigul,<sup>#</sup> Patchreenart Saparpakorn,<sup>¶</sup> Supa Hannongbua,<sup>¶</sup> Siriluk Rattanabunyong,<sup>□</sup> Supaporn Seetaha,<sup>□</sup> Kiattawee Choowongkamon,<sup>□</sup> Sanya Sureram,<sup>■</sup> Prasat Kittakoop,<sup>●</sup> Poonpilas Hongmanee,<sup>△</sup> Pitak Santanirand,<sup>△</sup> Zhaoqiang Chen,<sup>▲</sup> Weiliang Zhu,<sup>▲</sup> Rosemary A. Blood,<sup>▽</sup> Yuiko Takebayashi,<sup>▽</sup> Philip Hinchliffe,<sup>▽</sup> Adrian J. Mulholland,<sup>▼</sup> James Spencer,<sup>▼</sup> and Pornpan Pungpo<sup>\*,‡,§</sup>

<sup>†</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, 48000 Nakhon Phanom, Thailand

<sup>‡</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science and <sup>§</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, 34190 Ubonratchathani, Thailand

<sup>||</sup>Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, 12120 Pathumthani, Thailand

<sup>⊥</sup>National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park, 12120 Pathumthani, Thailand

<sup>#</sup>Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), 30000 Nakhon, Ratchasima, Thailand

<sup>¶</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science and <sup>□</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, 10900 Bangkok, Thailand

<sup>■</sup>Chulabhorn Research Institute, 10210 Bangkok, Thailand

<sup>○</sup>Chulabhorn Graduate Institute, Chemical Biology Program, Chulabhorn Royal Academy, 10210 Bangkok, Thailand

<sup>●</sup>Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology (EHT), CHE, Ministry of Education, 10300 Bangkok, Thailand

<sup>△</sup>Division of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, 10400 Bangkok, Thailand

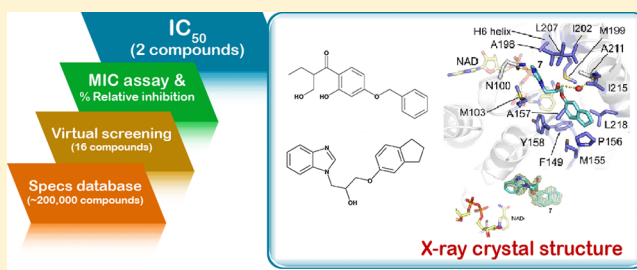
<sup>▲</sup>State Key Laboratory of Drug Research, Drug Discovery and Design Center, Shanghai Institute of Materia Medica, 201203 Shanghai, China

<sup>▽</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Biomedical Sciences Building, University Walk, BS8 1TD Bristol, United Kingdom

<sup>▼</sup>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  $\mu\text{g/mL}$  against *M. tuberculosis* H37Rv, respectively. Inhibition assays against purified recombinant InhA determined  $\text{IC}_{50}$  values for these compounds of 0.38 and 0.22  $\mu\text{M}$ , 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

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.<sup>1</sup> 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).<sup>2</sup>

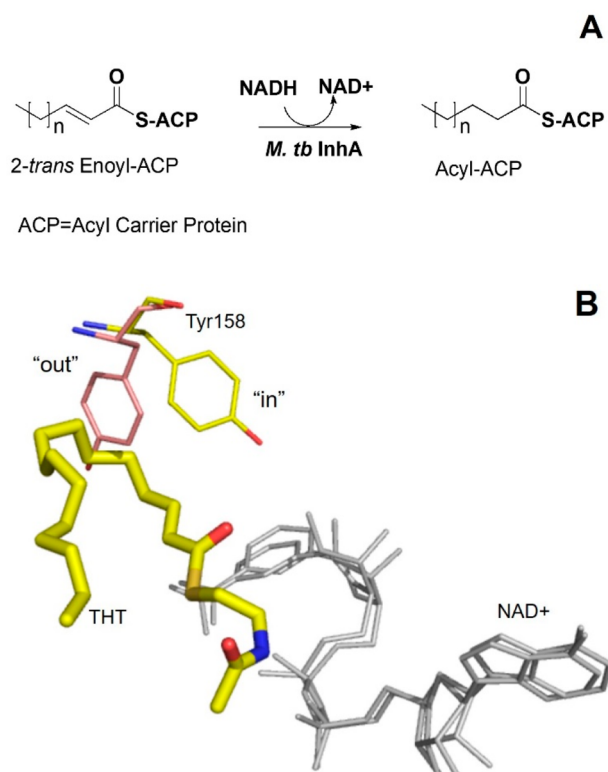
The *M. tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase (*M. tuberculosis* InhA) is an attractive potential target for development of new antituberculosis drugs. InhA catalyzes the NADH-specific reduction of 2-*trans*-enoyl-ACP (Figure 1A) in the elongation cycle of the fatty acid synthase type II (FAS II) pathway, the final step of fatty acid biosynthesis in *M. tuberculosis*.<sup>3,4</sup> InhA is the primary target of isoniazid (INH), the second first-line drug for tuberculosis treatment.<sup>5–7</sup> 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.<sup>8–10</sup> 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.<sup>11,12</sup> Hence multiple academic and pharmaceutical efforts have led to the discovery of direct InhA inhibitors.<sup>13–18</sup> However, most of the direct InhA inhibitors so far identified display good InhA inhibitory activity in vitro but poor activity against *M. tuberculosis*.<sup>13,19–21</sup>

The interactions of InhA with substrate, cofactor, and inhibitors have been extensively studied.<sup>22</sup> 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.<sup>3,4,23</sup> 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).<sup>19–24</sup>

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](http://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 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

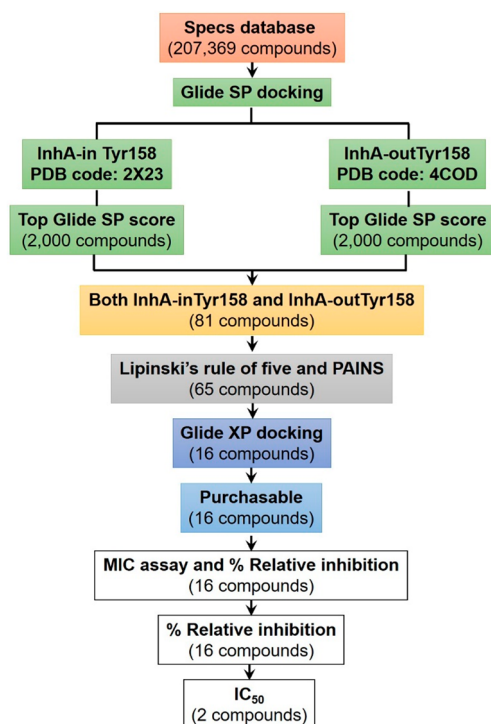


**Figure 1.** NADH-specific reduction of 2-*trans*-enoyl-ACP catalyzed by InhA (A), in and out conformations of Tyr158 side chain (B). Tyr158 in the in conformation (yellow) in the ternary InhA structure complexed with the C16 substrate analogue THT (*trans*-2-hexadecenoyl-(*N*-acetylcysteamine)-thioester (yellow carbon atom) and NAD<sup>+</sup> (gray) and Tyr158 in the out conformation (pink) in the binary InhA structure complexed with NAD<sup>+</sup> (gray). PDB codes of these structures are 1BVR<sup>3</sup> and 1ENY,<sup>6</sup> 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<sup>25–27</sup> 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<sup>28,29</sup> and pan-assay interference compounds (PAINS)<sup>30</sup> 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.<sup>25–27</sup> 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)<sup>20</sup> 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-





**Figure 2.** Virtual screening workflow for discovery of direct InhA inhibitors.

zole-5-carboxamide (KV1) (PDB code: 4COD)<sup>21</sup> 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  $7.0 \pm 2.0$ . 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'ATCATATGACAGGACTG-GACGGC 3' and reverse primer 5'ACGCCGGATCCTA-GAGCATTTGG 3' which introduced the 5' *NdeI* restriction site and 3' *BamHI* restriction site. The slowdown PCR was used to amplify an 810 bp InhA amplicon. The amplicon was digested with *NdeI* and *BamHI* 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<sub>600</sub> 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](http://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  $\lambda = 340$  nm and emission  $\lambda = 420$  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.

$$\begin{aligned} & \% \text{ relative inhibition} \\ &= 100 \times \left( \frac{F_{\text{compound}} - F_{\text{negative control}}}{F_{\text{positive control}} - F_{\text{negative control}}} \right) \end{aligned} \quad (1)$$

$F_{\text{compound}}$  is the fluorescence intensity of the enzymatic activity for each compound concentration,  $F_{\text{positive control}}$  is the fluorescence intensity of the enzyme activity in the absence of any compound, and  $F_{\text{negative control}}$  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<sub>50</sub> determination mode.

**IC<sub>50</sub> Determination.** Briefly, IC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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.

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<sup>24,31</sup> using sitting-drop vapor diffusion in 24-well plates (Hampton Research). Drops containing 1.5  $\mu$ L of protein (13 mg/mL) and 1  $\mu$ L 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<sup>+</sup>) were equilibrated against 500  $\mu$ L 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<sup>+</sup> at 4 °C. X-ray data were collected at 100 K on beamline I03 (Diamond Light Source, United Kingdom), integrated using XDS<sup>32</sup> in the Xia2<sup>33</sup> pipeline, and scaled using Aimless<sup>34</sup> in the CCP4 suite.<sup>35</sup> Crystallographic phases were solved using Phaser<sup>36</sup> with PDB 4BQP<sup>24</sup> as the starting model and six molecules in the asymmetric unit. Early rounds of refinement were completed in Refmac5<sup>37</sup> with modeling in Coot.<sup>38</sup> The ligand was generated using the ProDRG server<sup>39</sup> and then modeled using restraints generated in eLBOW in Phenix,<sup>40</sup> and the final structure completed by iterative rounds of model building and refinement in Coot and Phenix. Structure validation was assisted by MolProbity<sup>41</sup> and Phenix. Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank ([www.rcsb.org/pdb](http://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-out-Tyr158 (*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  $\mu$ g/mL. Importantly, compounds 1 and 7 (Figure 3) showed biological activity, with MIC values of 25  $\mu$ g/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  $\mu$ g/mL), whereas MIC value against

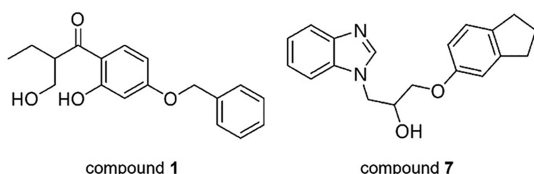
**Table 1. Glide XP Docking Scores and in Vitro Biological Activities of Hit Compounds**

| compounds         | glide XP docking score<br>(kcal/mol) |                | biological activity               |                                  |                             |
|-------------------|--------------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
|                   | InhA-inTyr158                        | InhA-outTyr158 | MIC <sup>a</sup><br>( $\mu$ g/mL) | relative inhibition at 1 $\mu$ M | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
| 1                 | –10.9                                | –7.8           | 25                                | 66                               | 0.38 $\pm$ 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 $\pm$ 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 $\pm$ 0.94             |
| PT70 <sup>b</sup> | –10.5                                | –              | –                                 | –                                | –                           |
| KV1 <sup>c</sup>  | –                                    | –9.1           | –                                 | –                                | –                           |

<sup>a</sup>MIC value determined against *M. tuberculosis* H37Ra. <sup>b</sup>Reference compound for Glide XP docking score in InhA-inTyr158 (PDB 2X23). <sup>c</sup>Reference compound for Glide XP docking score in InhA-outTyr158 (PDB 4COD).

*M. tuberculosis* H37Rv of compound 1 is decreased by twofold in comparison with that against *M. tuberculosis* H37Ra (12.5 and 25  $\mu$ g/mL, respectively). Therefore, compounds 1 and 7 screened from our present study are promising lead compounds for the further development of novel antituberculosis agents.

***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  $\mu$ M was evaluated using the known InhA inhibitor triclosan<sup>31</sup> as a reference compound.



**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  $\mu$ M, respectively, compared to a value for triclosan of 0.60  $\mu$ M (Table 1 and Figure 2). These data demonstrate that both compounds are active in both whole cell and enzyme inhibition assays.

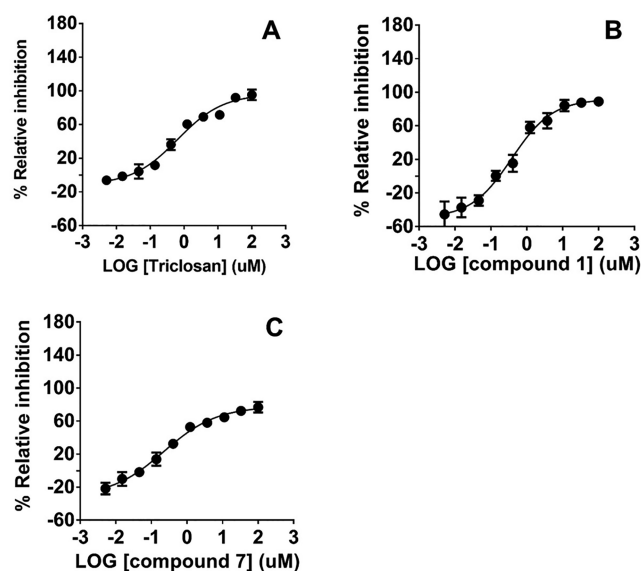
**Crystallographic Characterization of InhA Binding to Compound 7.** Identification of active compounds motivated investigation of their modes of binding to InhA by X-ray crystallography. Purified recombinant InhA was crystallized in the presence of NADH in the previously reported C2 crystal<sup>6</sup> 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)<sup>40</sup> for bound ligand was 0.897, indicating acceptable fit to the experimental electron density.<sup>42</sup> The average B-factor for the bound inhibitor was 31.66 Å<sup>2</sup>, comparing favorably with a value of 33.64 Å<sup>2</sup> for the cofactor (most likely in the NAD<sup>+</sup> 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

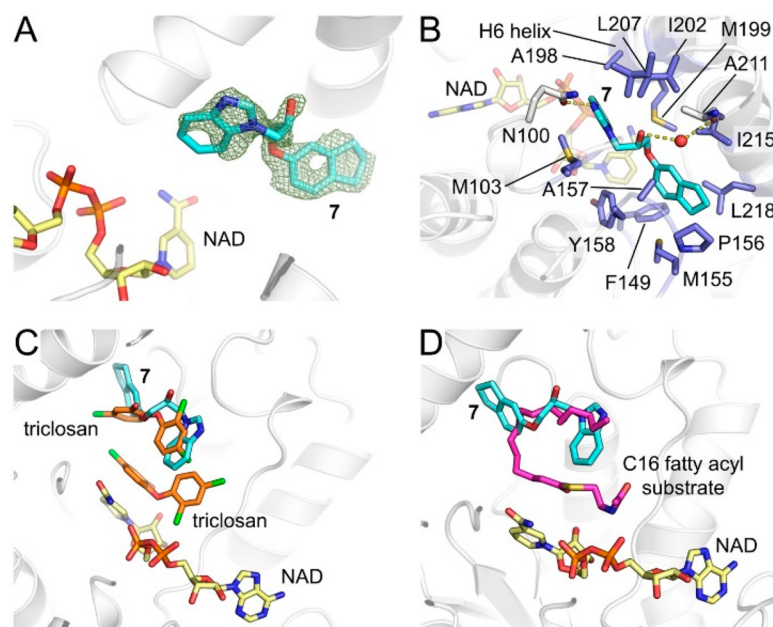
| Data Collection <sup>a</sup>        |                        |
|-------------------------------------|------------------------|
| beamline                            | DLS I03                |
| space group                         | C2                     |
| molecules/ASU                       | 6                      |
| cell dimensions                     |                        |
| <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)  | 100.90, 81.60, 189.42  |
| $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (deg) | 90.0, 95.52, 90.0      |
| wavelength(s) (Å)                   | 0.97624                |
| resolution (Å)                      | 43.32–1.75 (1.78–1.75) |
| $R_{\text{pim}}$                    | 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                 |
| $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$   | 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                   |

<sup>a</sup>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.





**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<sup>+</sup> (yellow sticks). (A) Compound 7 defined by  $F_o - F_c$  electron density (green mesh, contoured at  $3\sigma$ ) 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 1P4S, orange sticks). (D) Comparison of compound 7 binding with a C16 fatty acyl substrate (PDB 1BVR, pink sticks).

distance away from the NAD<sup>+</sup> cofactor, with the closest approach being made by the benzimidazole group to the NAD<sup>+</sup> 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.).<sup>22</sup> 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).<sup>3</sup> Of inhibitor complex structures, the closest similarity is observed with triclosan binding to its second site (as described in PDB 1P4S in which two triclosan binding sites are observed).<sup>43</sup> 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  $\alpha$  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),<sup>31</sup> the fluoroenyl group of the aryl carboxamide GENZ10850 (PDB 1P44),<sup>43</sup> the (4, 4-dimethyl)-cyclohexyl group of the 4-hydroxy-2-pyridones NITD-564/916 (PDB 4R9R, 4R9S),<sup>18</sup> the benzimidazole with the natural product pyridomycin (chain D of PDB 4BII),<sup>44</sup> or the 2-chloro-6-fluoro-benzyl group of the thiadiazole GSK625 (PDB 5JFO)<sup>16</sup> (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<sup>15</sup> (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).<sup>45</sup>



## 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  $\mu$ M that compares favorably with that of the widely used model compound triclosan ( $IC_{50}$  of 0.60  $\mu$ M). Importantly, this compound also shows activity against *M. tuberculosis* H37Rv in antibacterial assays (MIC of 25  $\mu$ g/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](mailto: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/](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](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.; Quemard, 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) Quemard, A.; Sacchettini, J. C.; Dessen, A.; Vilchèze, 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 Antitubercotics: 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.;

- 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.; Pérez-Herrán, 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.; Glynn, R.; Smith, P. W.; Diagona, 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-Ruiz, E.; Mendoza-Losana, A.; Ballell Pages, L.; Castro-Pichel, J.; Evidar, 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

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.





## 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 กย 2562 เลขที่คำขอ 1901606115  
 วันที่ยื่นคำขอ 27 กย 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

ชื่อ ..... สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ที่อยู่ ..... 111 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

ตำบล/แขวง ..... คลองหนึ่ง อำเภอ/เขต ..... คลองหลวง จังหวัด ..... ปทุมธานี รหัสไปรษณีย์ ..... 12120 ประเทศ ..... ไทย

อีเมล .....

☐ เลขประจำตัวประชาชน ☐ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☒ เลขประจำตัวเสียภาษีอากร 0-9 9 9 9 4 0 0 0 1 6 5 6 6 8 ☐ เพิ่มเติม (ดั่งแนบ)

ในกรณีที่กรณมา สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง ☐ อีเมลผู้ขอ ☒ อีเมลตัวแทน

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☒ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

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 (ดั่งแนบ)

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 (ดั่งแนบ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร

เลขที่ ..... วันยื่น ..... เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ

☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☐ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่าจะระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด เพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

## สำหรับเจ้าหน้าที่

จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

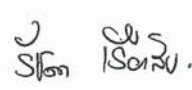
☒ กลุ่มวิศวกรรม  
 สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม)  
 สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า)  
 สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (อิเล็กทรอนิกส์)

☐ 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. การยื่นคำขออนุญาตนำเข้า <input type="checkbox"/> PCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |            |                    |                                                                                          | <input type="checkbox"/> เพิ่มเติม (ดังแนบ) |  |
| วันยื่นคำขอ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | เลขที่คำขอ | ประเทศ             | สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ                                                   | สถานะคำขอ                                   |  |
| 8.1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 8.2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 8.3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 8.4 <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย<br><input type="checkbox"/> ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ <input type="checkbox"/> ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้                                                                                     |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด<br>วันแสดง ..... วันเปิดงานแสดง ..... ผู้จัด .....                                                                                                                                                                                                          |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |            | 10.2 วันที่ฝากเก็บ |                                                                                          | 10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ                   |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน<br>นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา<br><input type="checkbox"/> อังกฤษ <input type="checkbox"/> ฝรั่งเศส <input type="checkbox"/> เยอรมัน <input type="checkbox"/> ญี่ปุ่น <input type="checkbox"/> อื่นๆ ..... |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ .....<br><input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ..... ในการประกาศโฆษณา                                                                                                                               |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |            |                    | 14. เอกสารประกอบคำขอ                                                                     |                                             |  |
| ก. แบบพิมพ์คำขอ 3 หน้า                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |            |                    | <input checked="" type="checkbox"/> เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร      |                                             |  |
| ข. รายละเอียดการประดิษฐ์<br>หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 31 หน้า                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |            |                    | <input type="checkbox"/> หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์              |                                             |  |
| ค. ข้อถ้อยสิทธิ 10 หน้า                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |            |                    | <input checked="" type="checkbox"/> หนังสือมอบอำนาจ                                      |                                             |  |
| ง. รูปเขียน - รูป - หน้า                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |            |                    | <input type="checkbox"/> เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ                                 |                                             |  |
| จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |            |                    | <input type="checkbox"/> เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย |                                             |  |
| <input type="checkbox"/> รูปเขียน - รูป - หน้า                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |            |                    | <input type="checkbox"/> เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ                               |                                             |  |
| <input type="checkbox"/> ภาพถ่าย - รูป - หน้า                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |            |                    | <input checked="" type="checkbox"/> เอกสารอื่นๆ                                          |                                             |  |
| ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า<br><input checked="" type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน<br><input type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก .....                                                                                                                                                                                      |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| 16. ลายมือชื่อ<br><input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input checked="" type="checkbox"/> ตัวแทน                                                                                                                                                                                                                                                                |            |                    |                                                                                          |                                             |  |
| <br><br>(นาง รัชดา เรืองสิน)<br>ตัวแทนสิทธิบัตร                                                                                                                                                                                                                                                 |            |                    |                                                                                          |                                             |  |

หมายเหตุ บุคคลยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ใบต่อแนบท้าย แบบ สป/สผ/อสป/001-ก

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

- |                            |                                  |                   |
|----------------------------|----------------------------------|-------------------|
| 2. นางสาวสมลักษณ์ แจ่มแจ้ง | เลขประจำตัวประชาชน 3259900191857 | ตัวแทนเลขที่ 2227 |
| 3. นางสาวรัตนกร แสนศักดิ์  | เลขประจำตัวประชาชน 1102000882673 | ตัวแทนเลขที่ 2484 |
| 4. นายอานนท์ จินดาดวง      | เลขประจำตัวประชาชน 3100601784344 | ตัวแทนเลขที่ 2521 |
| 5. นางสาววารานันท์ นวลแปง  | เลขประจำตัวประชาชน 3550700046674 | ตัวแทนเลขที่ 2524 |
| 6. นายสุธาส์ สวัสดิ์       | 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 ธนายพงศ์ | เลขประจำตัวประชาชน 1101401919356 |
| 4.นาย สหรัฐ เตชะพนาลัย     | เลขประจำตัวประชาชน 2819900025295 |

ลำดับที่ 2-4 อยู่ที่ 111 ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120 ประเทศไทย

- |                           |                                  |
|---------------------------|----------------------------------|
| 5. นาย บุญรัตน์ ทาร์ตัน   | เลขประจำตัวประชาชน 1340300086844 |
| 6. นางสาว ชิมพิกา พรพรม   | เลขประจำตัวประชาชน 1341100293723 |
| 7. นางสาว ศรสวรรค์ บาททอง | เลขประจำตัวประชาชน 1339900519057 |
| 8. นางสาว พรพรม พังโพธิ์  | เลขประจำตัวประชาชน 3341601169924 |

ลำดับที่ 5-8 อยู่ที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 85 ถนนสมเด็จร์ค ตำบลเมืองศรีโค อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

- |                    |                                  |
|--------------------|----------------------------------|
| 9. นาย พฤทธิ คำศรี | เลขประจำตัวประชาชน 1341500137257 |
|--------------------|----------------------------------|

อยู่ที่ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม 214 หมู่ 12 ตำบลหนองญาติ อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม 48000

## รายละเอียดการประดิษฐ์

### ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค และวิธีการสังเคราะห์สารประกอบดังกล่าว

### 5 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

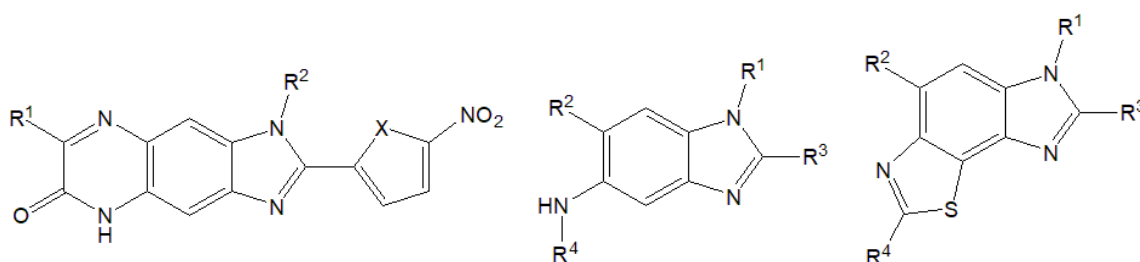
เคมีในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค และวิธีการสังเคราะห์สารประกอบดังกล่าว (Benzimidazoles containing phenol derivatives as anti-tuberculosis agents and their syntheses)

### ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

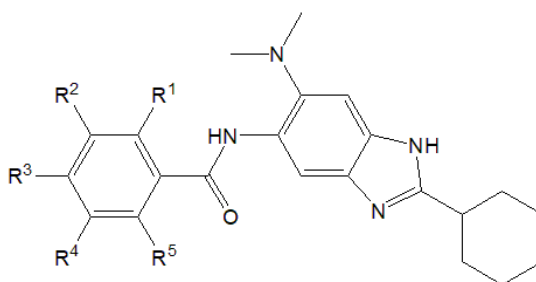
- 10           วัณโรค (Tuberculosis, TB) เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญของโลก มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไมโครแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุการตาย
- 15           ของประชากรโลกมากเป็นอันดับที่สองรองจากโรคเอดส์ จากรายงานขององค์การอนามัยโลกในปี 2015 ชี้ว่ามีคนมากกว่า 1.4 ล้านคนล้มป่วยด้วยวัณโรคทั่วโลก และเสียชีวิตอย่างน้อย 1.8 ล้านคน โดยผู้ติดเชื้อและเสียชีวิตส่วนมากอยู่ในประเทศกำลังพัฒนา องค์การอนามัยโลกได้จัดกลุ่มประเทศที่มีปัญหาวัณโรครุนแรง
- ได้แก่ (1) ปัญหาวัณโรคสูง (2) วัณโรคในผู้ติดเชื้อเอดส์ และ (3) วัณโรคดื้อยาหลายขนาน ซึ่งประเทศไทยก็
- ติดอยู่ 1 ใน 14 ประเทศของโลกที่มีปัญหาวัณโรค ทั้ง 3 ประการ วัณโรคจึงเป็นโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุหลัก
- ของปัญหาทางด้านสุขภาพของประชากรทั่วโลกทั้งในประเทศที่ด้อยการพัฒนาและประเทศที่กำลังพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรคชุกชุม ดังนั้นองค์การอนามัยโลกรวมทั้งประเทศไทยจึงให้
- ความสำคัญต่อการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางและพัฒนาายตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรควัณโรค ซึ่ง
- 20           มีความจำเป็นเร่งด่วนในการศึกษาวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากปัญหาการดื้อยาหลายขนาน (Multi-
- drug resistant, MDR) และการดื้อยารุนแรง (Extensively drug resistant, XDR) เพิ่มมากขึ้นทำให้ผู้ป่วยวัณโรค
- ไม่ตอบสนองต่อยาหลักที่ใช้รักษาอยู่ ดังนั้นการศึกษวิจัยเพื่อหาแนวทางในการค้นหาและพัฒนาายใหม่ที่ใช้
- ในการรักษาโรควัณโรคจึงมีความจำเป็นที่ต้องทำอย่างต่อเนื่อง การรักษาโรควัณโรคแบ่งได้ตามเป้าหมายและ
- กลไกการออกฤทธิ์ของยา กระบวนการการสังเคราะห์ทางชีวภาพของกรดไขมัน (Fatty acid biosynthesis)
- 25           ของเชื้อ *M.tuberculosis* เป็นเป้าหมายสำคัญในยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนี้ จึงทำให้มีการค้นคว้าและพัฒนาายที่ใช้
- ในการยับยั้งกระบวนการนี้อย่างกว้างขวาง



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



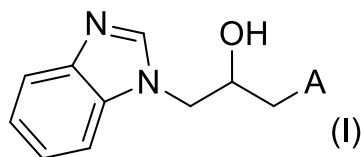
เอกสาร US9845296B2 เปิดเผยการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 2, 4 และ 6 (2,4,6-benzimidazole derivatives) ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไมโครแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* สำหรับใช้เป็นยาต้านวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง โดยอนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่  $R^1, R^2, R^3, R^4$  เป็นไฮโดรเจน (H) และ  $R^4$  เป็นหมู่เมทิล ( $-CH_3$ ) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรค (minimum inhibitory concentration, MIC) อยู่ที่ 0.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ดังนั้น ในการประดิษฐ์นี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะจัดเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีโครงสร้างแบบใหม่โดยมีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอล เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA, มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ, แก้ปัญหาการดื้อยา และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านวัณโรคต่อไปในอนาคต

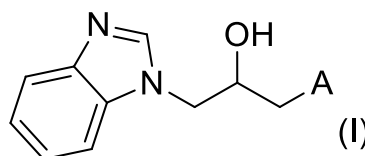
### ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง (I)



โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือแบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ฮาไลด์ (halide-substituted group)

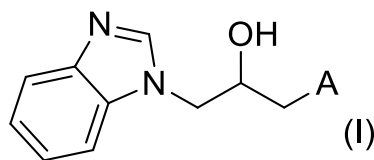
ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



- ก. ผสม 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และสารประกอบที่มีหมู่ซิลิล (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 ammonium 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), อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ฮาไลด์ (halide-substituted group)

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



- 5 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

10 โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติก ไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือแบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ฮาโลด์ (halide-substituted group)

### การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

15 การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ ImhA และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านวัณโรค

ลักษณะการประดิษฐ์ใดๆ ที่ได้แสดงไว้ในที่นี้ ให้ความหมายรวมถึงการประยุกต์เข้ากับลักษณะอื่นของการประดิษฐ์นี้ด้วย เว้นแต่ได้มีการระบุไว้เป็นอย่างอื่น

### คำจำกัดความ

20 ศัพท์เทคนิค หรือ ศัพท์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในที่นี้ ให้มีนิยามตามที่เข้าใจโดยผู้มีความชำนาญในศิลปะวิทยาการในแขนงนี้ ยกเว้นว่าได้ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

เครื่องมือ อุปกรณ์ วิธีการ หรือสารเคมีใดๆ ที่ได้กล่าวถึงไว้ในที่นี้ ให้ความหมายถึงเครื่องมือ อุปกรณ์ วิธีการ หรือสารเคมีที่ปฏิบัติหรือใช้กันทั่วไปโดยผู้มีความชำนาญในศิลปะวิทยาการในแขนงนี้ ยกเว้นว่าได้ระบุไว้โดยชัดแจ้งว่าเป็น เครื่องมือ อุปกรณ์ วิธีการ หรือสารเคมีที่พิเศษ หรือ เฉพาะเจาะจงกับการประดิษฐ์นี้



การใช้คำนามเอกพจน์ หรือ คำสรรพนามเอกพจน์ เมื่อใช้กับคำว่า “ประกอบด้วย” ในข้อถือสิทธิ หรือ ในรายละเอียดการประดิษฐ์ ให้ความความถึง “หนึ่ง” และให้ความความรวมถึง “หนึ่งหรือมากกว่า” “อย่างน้อยที่สุดหนึ่ง” และ “หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่ง” ด้วย

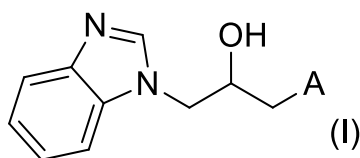
5 โดยตลอดของคำขอรับสิทธิบัตรฉบับนี้ คำว่า “ประมาณ” เป็นการใช้เพื่อระบุว่าค่าใดๆ ที่ปรากฏหรือแสดงในที่นี้ อาจเกิดการแปรผัน หรืออาจเบี่ยงเบนได้ โดยที่การแปรผันได้หรือความเบี่ยงเบนได้ดังกล่าวนี้ อาจเกิดโดยความคลาดเคลื่อนของอุปกรณ์ วิธีการที่ใช้หาค่าใดๆ หรือ โดยบุคคลผู้ใช้อุปกรณ์หรือดำเนินการตามวิธีการนั้นๆ

10 องค์ประกอบ และ/หรือ วิธีการทั้งหมดที่เปิดเผย และข้อถือสิทธิในคำขอนี้มีเจตนาให้ครอบคลุมถึงลักษณะของการประดิษฐ์ที่ได้จากการกระทำ การปฏิบัติ การดัดแปลง หรือเปลี่ยนแปลงปัจจัยใดๆ ที่ปราศจากการทำการทดลองที่แตกต่างจากการประดิษฐ์นี้อย่างมีนัยสำคัญ และได้มาซึ่งสิ่งที่มีคุณสมบัติ ประโยชน์ใช้สอย และทำให้เกิดผลทำนองเดียวกันกับลักษณะของการประดิษฐ์ปัจจุบัน ตามความเห็นของบุคคลที่มีความชำนาญในระดับสามัญในศิลปะหรือวิทยาการ ที่แม้จะมีได้ระบุในข้อถือสิทธิโดยเฉพาะเจาะจงก็ตาม ดังนั้นสิ่งที่แทนกันได้ หรือสิ่งที่คล้ายคลึงกันกับลักษณะของการประดิษฐ์ปัจจุบัน รวมถึงการดัดแปลง เปลี่ยนแปลงใดๆ เพียงเล็กน้อย ที่ปรากฏเห็นได้อย่างชัดเจนต่อบุคคลที่มีความชำนาญในศิลปะวิทยาการแขนงนี้ ควรพิจารณาว่าอยู่ภายในเจตนา ขอบเขตและแนวคิดของการประดิษฐ์ ดังที่ปรากฏโดยข้อถือสิทธิที่แนบมาด้วย

15

ต่อไปนี้จะแสดงให้เห็นถึงรายละเอียดการประดิษฐ์โดยมิได้มีจุดประสงค์ที่จะจำกัดขอบเขตของการประดิษฐ์แต่อย่างใด

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟินอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง (I)



20

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟินอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือแบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่ฮาโลได์ (halide-substituted group)

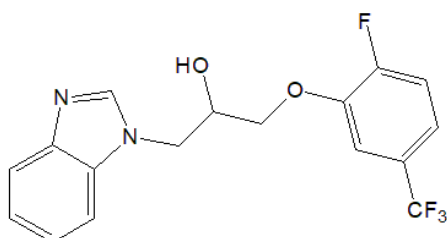
ในลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม เลือกได้จาก 4-โพรพิลฟีนอล (4-propylphenol), 3-โพรพิลฟีนอล (3-propylphenol), 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟีนอล (4-isopropyl-3-methyl phenol), 4-ไซโคลเฮกซิลฟีนอล (4-cyclohexylphenol), 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol), หรือ 5-อินดานอล (5-indanol)

5 ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม คือ แนปทาลิน-2-อล (naphthalene-2-ol)

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) คือ ซีซามอล (sesamol)

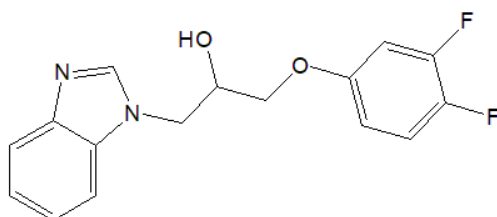
10 ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ฮาไลด์ (halide-substituted group) เลือกได้จาก 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล) ฟีนอล (2-Fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol), 3,4- ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol), 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol), หรือ เพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluoro phenol)

ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (II)



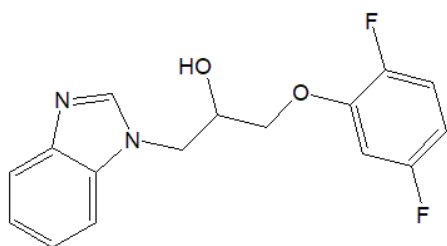
.....(II)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (III)



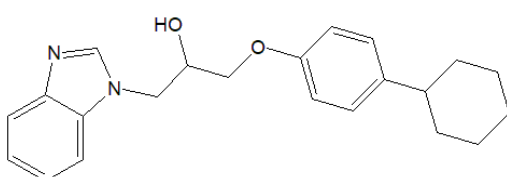
.....(III)

20 ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (IV)



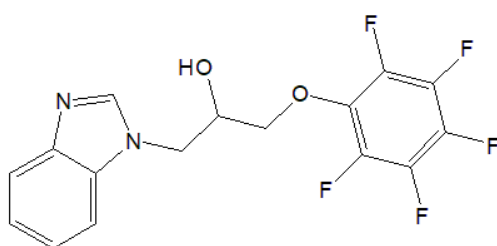
.....(IV)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (V)



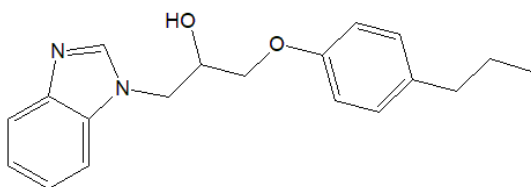
.....(V)

5 ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (VI)



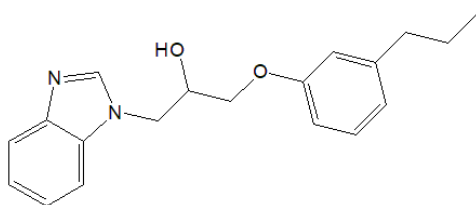
.....(VI)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (VII)



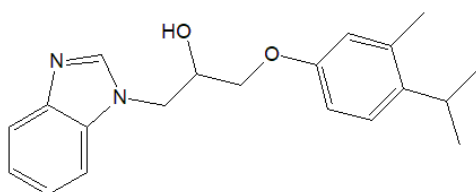
.....(VII)

10 ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (VIII)



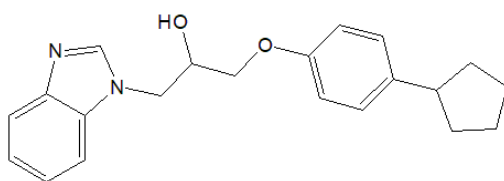
.....(VIII)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (IX)



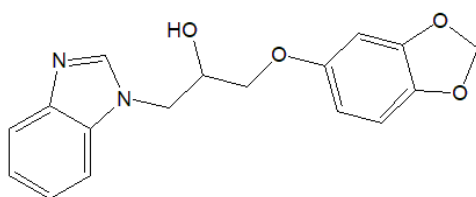
.....(IX)

5 ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (X)



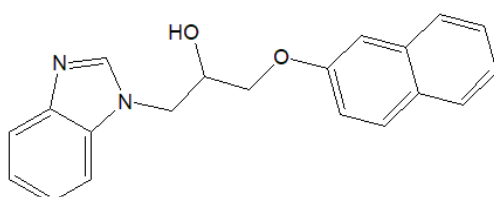
.....(X)

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (XI)



.....(XI)

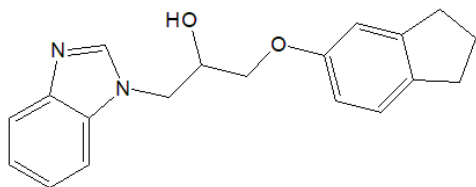
10 ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (XII)



.....(XII)

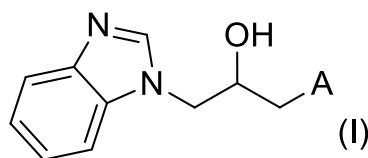


ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือสารประกอบที่มีโครงสร้าง (XIII)



.....(XIII)

ในอีกรูปแบบหนึ่งของการประดิษฐ์ การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



- 5 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
- 10 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) และอนุพันธ์ของฟินอล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:3 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 50 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ถึง 24 ชั่วโมง
- 15 ง. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ค) และเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (Tetrabutyl ammonium fluoride, TBAF) ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:4 โดยโมล ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 60 นาที

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟินอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือแบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), และอนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่เฮเทอโร (hetero-substituted group)

5      ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก), ข), ค), และ ง) ตัวทำละลายอินทรีย์ เลือกได้จาก ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), อะซิโตน (acetone), ไดเมทิลฟอร์มามิด (dimethylformamide), เอทานอล (ethanol), เมทานอล (methanol), อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile), เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran), เอทิล อะซิเตท (ethyl acetate), เฮกเซน (hexane), ไอโซโพรพานอล (isopropanol), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว

    ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)

    ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดเมทิลฟอร์มามิด (dimethylformamide)

10      ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ค) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทานอล (ethanol)

    ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ง) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran)

15      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)

20      ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ สารผสมของ ซีเซียมคาร์บอเนต (cesium carbonate) และ โซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride)

    ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ค) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate)

25      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

5 ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ง) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 14 ถึง 20 ชั่วโมง

10 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

15 ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) สารประกอบที่มีหมู่ซิลิล (silyl group) เลือกได้จาก ไตรเมทิลซิลิล คลอไรด์ (trimethylsilyl chloride, TMSCl), ไตรเอทิลซิลิล คลอไรด์ (triethylsilyl chloride, TESCl), เทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลซิลิลคลอไรด์ (tert-butyl dimethylsilyl chloride, TBDMSCl), เทอเชียรีบิวทิลไดฟีนิลซิลิล คลอไรด์ (tert-butyl diphenylsilyl chloride, TBDPSCl), หรือ ไตรไอโซโพรพิลซิลิล คลอไรด์ (triisopropylsilyl chloride, TIPSCl)

20 ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) สารประกอบที่มีหมู่ซิลิล (silyl group) คือ เทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลซิลิลคลอไรด์ (tert-butyl dimethylsilyl chloride, TBDMSCl)

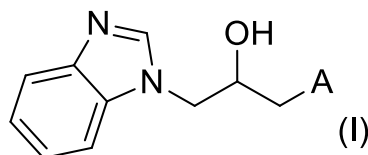
ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) อัตราส่วนโดยโมลของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และสารประกอบที่มีหมู่ซิลิล (silyl group) อยู่ในช่วง 1:2 ถึง 1:3

25 ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ข) อัตราส่วนโดยโมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซล อยู่ในช่วง 1.5:1 ถึง 2.5:1

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) อัตราส่วนโดยโมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ข) และ อนุพันธ์ของฟีนอล อยู่ในช่วง 1:1.5 ถึง 1:2.5

ในอีกลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ง) อัตราส่วนโดยโมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ค) และ เตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (tetrabutylammonium fluoride, TBAF) อยู่ในช่วง 1:2 ถึง 1:3 โดยโมล

ในอีกลักษณะหนึ่งของการประดิษฐ์ การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



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 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ข. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซลในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 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 แนปทาเลน-2-อล (naphthalene-2-ol)



ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) คือ ซีซามอล (sesamol)

5 ในลักษณะหนึ่งที่พึงประสงค์ของการประดิษฐ์ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ฮาไลด์ (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)

10 ในอีกลักษณะหนึ่งการประดิษฐ์ ในขั้นตอน ก) และ ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ เลือกได้จาก ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), อะซิโตน (acetone), ไดเมทิลฟอร์มามิด (dimethylformamide), เอทานอล (ethanol), เมทานอล (methanol), อะซิโตนไทรล์ (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 ไดเมทิลฟอร์มามิด (dimethylformamide)

15 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

20 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

25 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

5 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

10 ในลักษณะใดๆของการประดิษฐ์ การใช้สารประกอบเบนซิมิดาโซล สำหรับยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ InhA เพื่อใช้เป็นสารต้านวัณโรค

### ตัวอย่างการประดิษฐ์

15 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่มีการป้องกัน หมู่แอลกอฮอล์โดยใช้เทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลซิลิลคลอไรด์ (tert-butyldimethylsilyl chloride, TBDMSCl) ได้เป็นอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอลโดยใช้ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เป็นตัวทำละลาย อินทรีย์

#### ตัวอย่างที่ 1 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์ เทอเชียรี-บิวทิล((1,3-ไดโบรโมโพรเพน-2-อ็อกซี)ไดเมทิลซิลิเลน (tert-butyl((1,3-dibromopropane-2-yl)oxy)dimethylsilane)

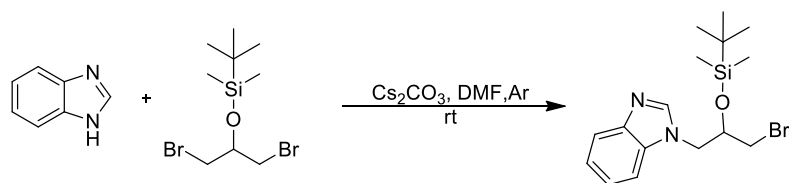


20 เติม 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และอิมิดาโซล (imidazole) (ประมาณ 13.35 กรัม) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) (ประมาณ 100

มิลลิลิตร) กวนสารผสมต่อเนื่องเป็นเวลาประมาณ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลซิลิลคลอไรด์ (TBDMSCl) (ประมาณ 22.17 กรัม) ลงไปในสารผสมแล้วทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 50 มิลลิลิตร) เพื่อหยุดปฏิกิริยา และนำสารละลายมาสกัดด้วยน้ำ (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำออกด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) จากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายภายใต้บรรยากาศจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวสีใส

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลโดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ของ นิวคลีโอไฟล์ ระหว่างเบนซิมิดาโซลและอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรเพนที่ได้จากตัวอย่างที่ 1

#### ตัวอย่างที่ 2 (การประดิษฐ์นี้)



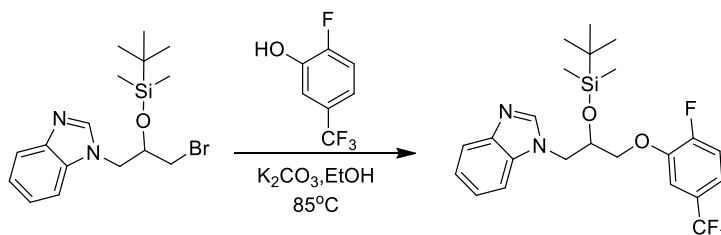
เติมเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) (ประมาณ 625 มิลลิกรัม) และซีเซียมคาร์บอเนต ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) (ประมาณ 3.45 กรัม) ลงในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) (ประมาณ 26 มิลลิลิตร) กวนทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่ได้จากตัวอย่างที่ 1 (ประมาณ 3.50 กรัม) ภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สอาร์กอน (Ar) กวนสารผสมต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 50 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) (ประมาณ 70 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตต ต่อ เฮกเซน 1:1 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลโดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ของ นิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ระหว่างอนุพันธ์ของฟีนอลและอนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2

ตัวอย่างที่ 3 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วยหมู่ 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล)

5 ฟีนอล (2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol)

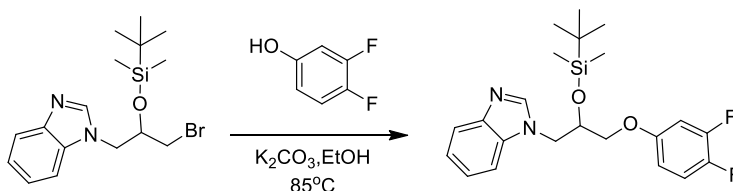


10 เติม 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล) ฟีนอล (2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol) (ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $K_2CO_3$ ) (ประมาณ 1.11 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 739 มิลลิกรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 15 มิลลิกรัม) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $NH_4Cl$ ) (ประมาณ 25 มิลลิกรัม) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) (ประมาณ 70 มิลลิกรัม) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $Na_2SO_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตต

15 ต่อ เฮกเซน 1:1 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 4 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 3,4-ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol)

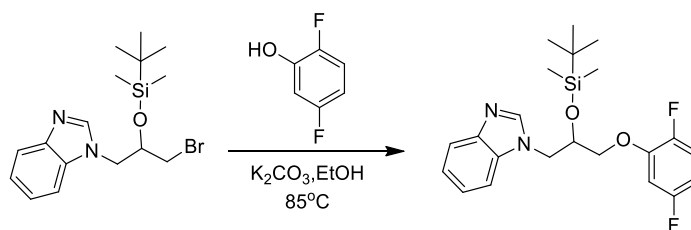


20 เติม 3,4-ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol) (ประมาณ 1.06 กรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $K_2CO_3$ ) (ประมาณ 2.24 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 1.5 กรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 25 มิลลิกรัม) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85

องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 35 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 100 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 30:70 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

#### ตัวอย่างที่ 5 (การประดิษฐ์นี้)

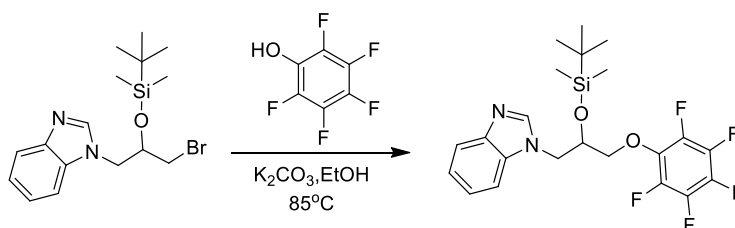
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol)



เติม 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol) (ประมาณ 704 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) (ประมาณ 1.51 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่การประดิษฐ์ 2 (ประมาณ 1 กรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 70 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 30:70 โดยปริมาตร (ethyl acetate:hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

#### ตัวอย่างที่ 6 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย เพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluorophenol)

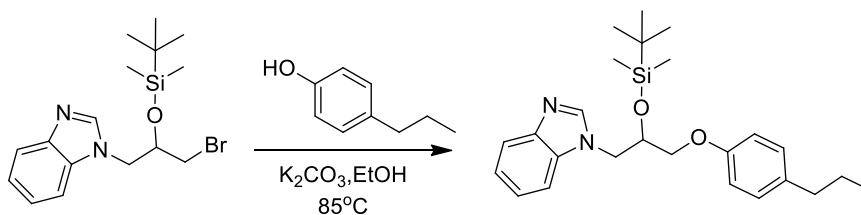




เติมเพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluorophenol) (ประมาณ 918 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $K_2CO_3$ ) (ประมาณ 1.38 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 922 กรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $NH_4Cl$ ) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 70 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $Na_2SO_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

#### ตัวอย่างที่ 7 (การประดิษฐ์นี้)

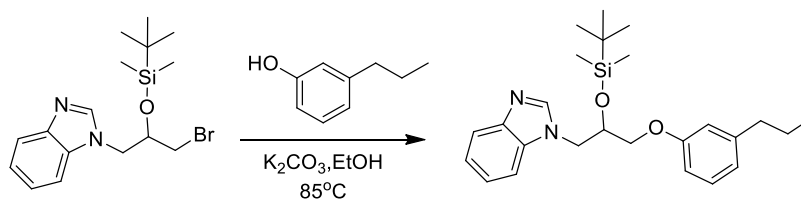
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 4-โพรพิลฟีนอล (4-propylphenol)



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 เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $Na_2SO_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เมทานอล ต่อ ไดคลอโรมีเทน 8:92 โดยปริมาตร (methanol:dichloromethane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

#### ตัวอย่างที่ 8 (การประดิษฐ์นี้)

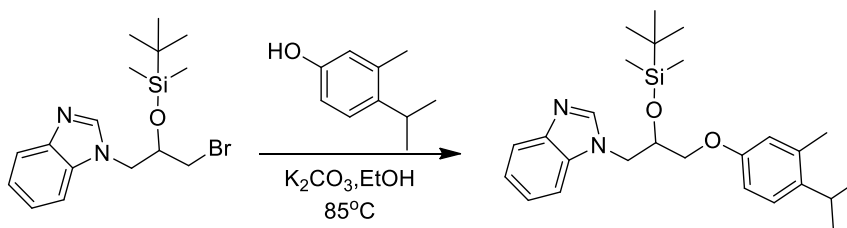
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 3-โพรพิลฟีนอล (3-propylphenol)



- 5 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 เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $Na_2SO_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 40:60 โดย
- 10 ปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

#### ตัวอย่างที่ 9 (การประดิษฐ์นี้)

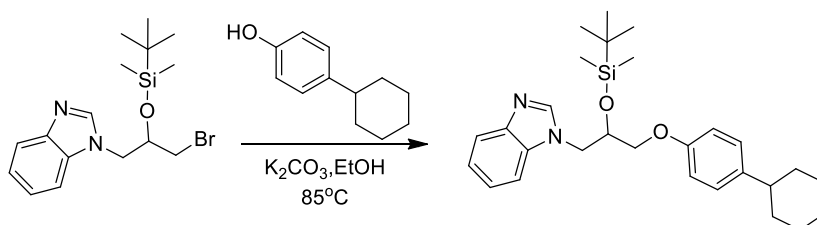
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟีนอล (4-isopropyl-3-methylphenol)



- 15 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) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัว
- 20 ทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 60 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $Na_2SO_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:1 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

ตัวอย่างที่ 10 (การประดิษฐ์นี้)

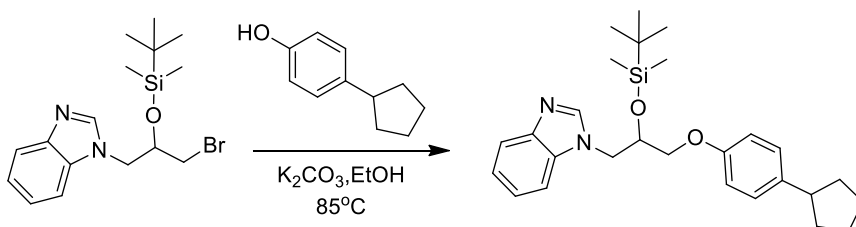
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 4-ไซโคลเฮกซิลฟีนอล (4-cyclohexylphenol)



- 5           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 เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $Na_2SO_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:1 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง
- 10

ตัวอย่างที่ 11 (การประดิษฐ์นี้)

- 15           การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วย 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol)



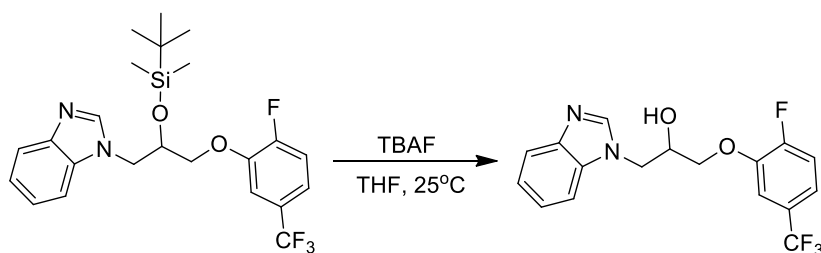
- เติม 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol) (ประมาณ 1.00 กรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $K_2CO_3$ ) (ประมาณ 1.70 กรัม) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 2 (ประมาณ 1.14 มิลลิกรัม) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 25 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม
- 20

แอมโมเนียมคลอไรด์ (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:1 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลโดยใช้ปฏิกิริยากำจัดหมู่ไซลิล ระหว่างอนุพันธ์ที่ได้จากตัวอย่างที่ 3-11 และหมู่เตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์

ตัวอย่างที่ 12 (การประดิษฐ์นี้)

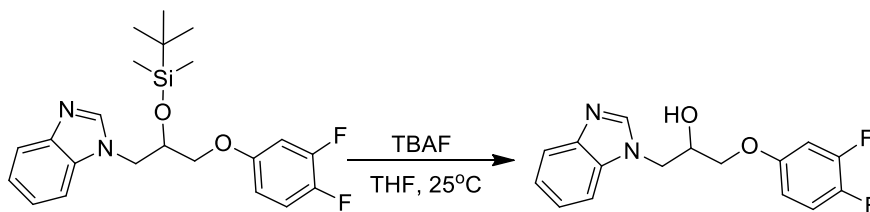
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 3 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์



เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 3 (ประมาณ 1.21 กรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 14 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที นำสารผสมที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

ตัวอย่างที่ 13 (การประดิษฐ์นี้)

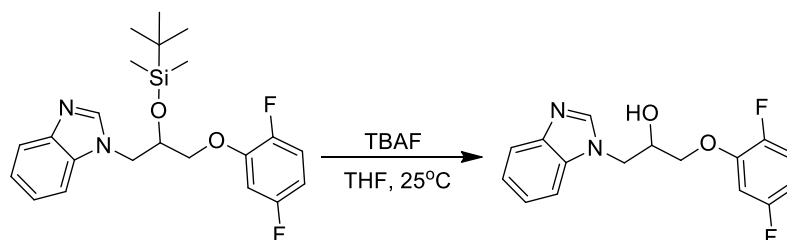
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 4 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์



เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 2 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดา  
โซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 4 (ประมาณ 534 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10  
มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการ  
เติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และมาสกัดด้วยตัวทำละลาย  
เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วย  
แอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี  
(column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็ง  
สีเหลืองส้ม

#### ตัวอย่างที่ 14 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 5 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิล  
แอมโมเนียมฟลูออไรด์

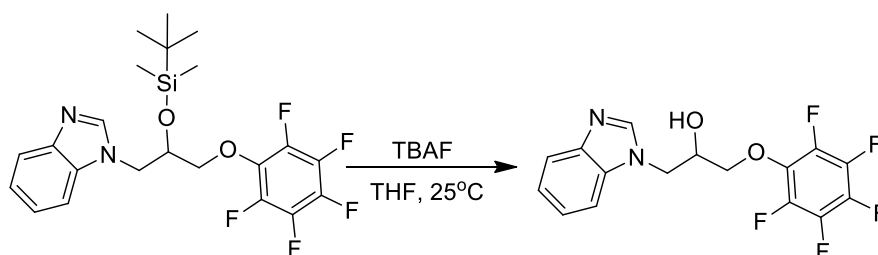


เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดา  
โซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 5 (ประมาณ 226 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10  
มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการ  
เติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย  
เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วย  
แอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี  
(column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็ง  
สีขาว



ตัวอย่างที่ 15 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 6 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์

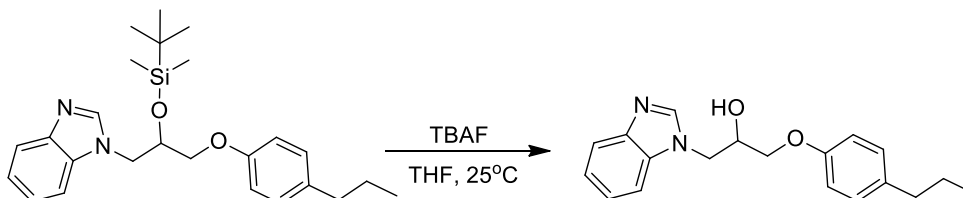


- 5           เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 2.4 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 6 (ประมาณ 754 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว
- 10

ตัวอย่างที่ 16 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 7 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์

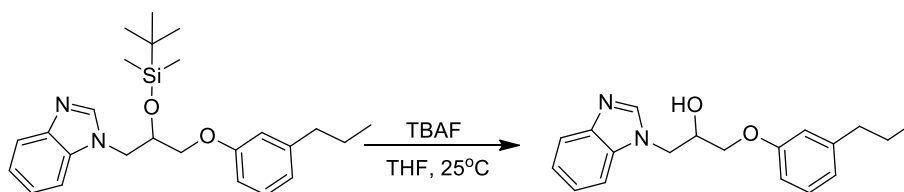
- 15           เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 7 (ประมาณ 164 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วย
- 20



แอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง

#### ตัวอย่างที่ 17 (การประดิษฐ์นี้)

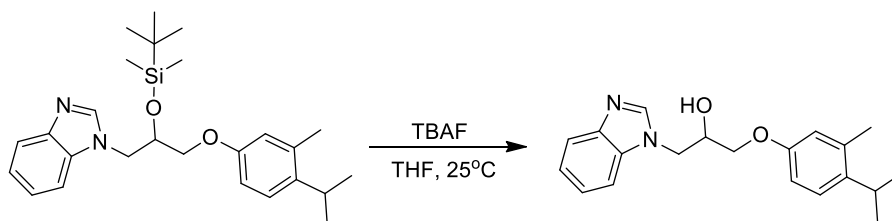
- 5            การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 8 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์



- 10            เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 8 (ประมาณ 280 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวเหลือง
- 15

#### ตัวอย่างที่ 18 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 9 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์

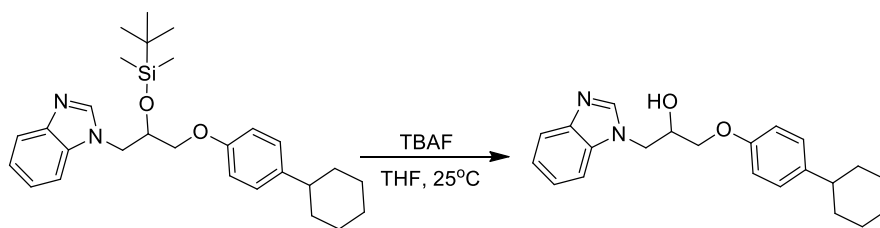


- 20            เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 0.77 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 9 (ประมาณ 226.2 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ

10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง

#### ตัวอย่างที่ 19 (การประดิษฐ์นี้)

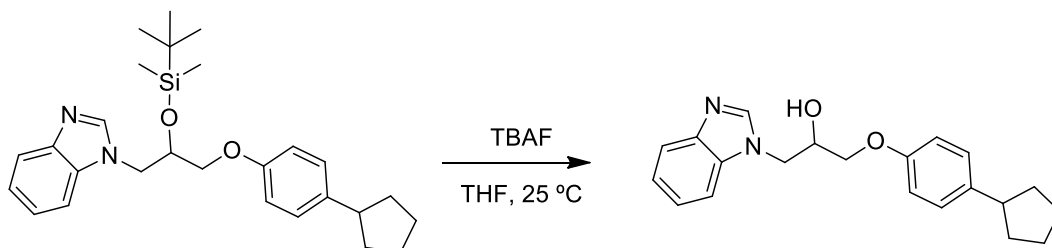
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 10 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์



เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 10 (ประมาณ 99 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

#### ตัวอย่างที่ 20 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลจากตัวอย่างที่ 11 ที่ถูกกำจัดหมู่ป้องกันออกด้วยเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์

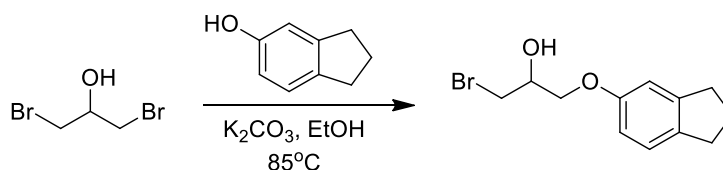


เติมเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (TBAF) (ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายเบนซิมิดาโซลที่ได้จากตัวอย่างที่ 11 (ประมาณ 96 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอลโดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ของ นิวคลีโอไฟล์ระหว่าง 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล และอนุพันธ์ของฟีนอล

ตัวอย่างที่ 21 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่มีหมู่แทนที่เป็น 5-อินดานอล (5-indanol)

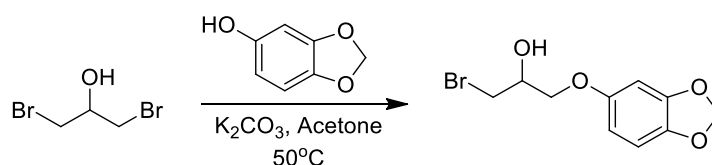


เติม 5-อินดานอล (5-indanol) (ประมาณ 1.00 กรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) (ประมาณ 6.08 กรัม) ลงในสารละลาย 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) (ประมาณ 1.15 มิลลิลิตร) ที่อยู่ในตัวทำละลายเอทานอล (EtOH) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) และน้ำ (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย

เอทิลอะซิเตต ต่อ เฮกเซน 1:9 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดใสไม่มีสี

ตัวอย่างที่ 22 (การประดิษฐ์นี้)

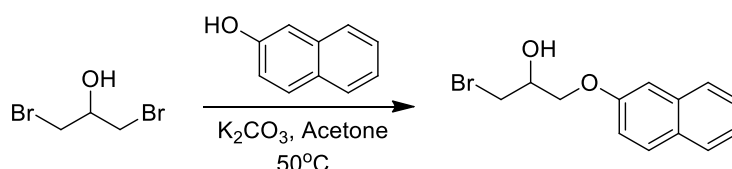
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่มีหมู่แทนที่เป็นซีซามอล (sesamol)



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 จากนั้นนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) และน้ำ (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $Na_2SO_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตต ต่อ เฮกเซน 2:8 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดใสไม่มีสี

ตัวอย่างที่ 23 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 1,3 ไดโบรโมโพรพานอลที่มีหมู่แทนที่เป็น 2-แนปทาไลน์-2-อล (naphthalene-2-ol)



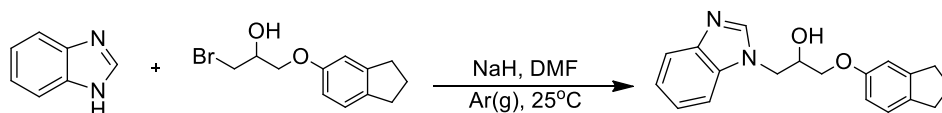
เติม แนปทาไลน์-2-อล (naphthalene-2-ol) (ประมาณ 500 มิลลิกรัม) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $K_2CO_3$ ) (ประมาณ 1.40 กรัม) ลงในสารละลาย 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) (ประมาณ 0.70 มิลลิลิตร) ที่อยู่ในตัวทำละลายอะซิโตน (acetone) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการกวนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง และทำการลดอุณหภูมิถึง

อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) และน้ำ (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮไดรต์ โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท ต่อ เฮกเซน 1:9 โดยปริมาตร (ethyl acetate : hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดใสไม่มีสี

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลโดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ของ นิวคลีโอไฟล์ ระหว่างเบนซิมิดาโซล และอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโมโพรพานอลที่ถูกแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของฟีนอลในตัวอย่างที่ 21-23

ตัวอย่างที่ 24 (การประดิษฐ์นี้)

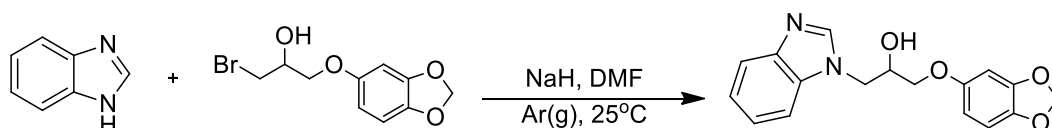
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วยหมู่ 5-อินดานอล (5-indanol) ที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอล



เติมเบนซิมิดาโซล (ประมาณ 100 มิลลิกรัม) และโซเดียมไฮไดรด์ (NaH) (ประมาณ 60 มิลลิกรัม) ลงในตัวทำละลายไดเมทิลฟอมาไมด์ (DMF) (ประมาณ 26 มิลลิลิตร) กวนทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่ได้จากตัวอย่างที่ 21 (ประมาณ 287 มิลลิกรัม) ภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สอาร์กอน (Ar) กวนสารผสมต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยตัวทำละลายเมทานอล (MeOH) (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) และนำสารละลายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) และน้ำ (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) 3 ครั้ง เก็บสารชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และกำจัดน้ำด้วยแอนไฮไดรต์ โซเดียมซัลเฟต (anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

ตัวอย่างที่ 25 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วยหมู่ ซีซามอล (sesamol) ที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอล

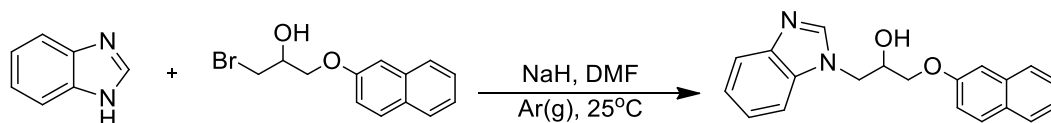




เติมเบนซิมิดาโซล (ประมาณ 420 มิลลิกรัม) และโซเดียมไฮไดรด์ (NaH) (ประมาณ 129 มิลลิกรัม) ลงในตัวทำละลายไดเมทิลฟอมาไมด์ (DMF) (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) กวนทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่ได้จากตัวอย่างที่ 22 (ประมาณ 500 มิลลิกรัม) ภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สอาร์กอน (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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

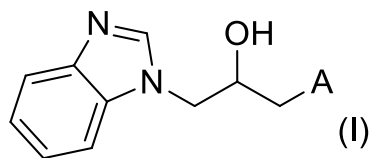
#### ตัวอย่างที่ 26 (การประดิษฐ์นี้)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วยหมู่ แนปทาไลน์-2-อล (naphthalene-2-ol) ที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนอล

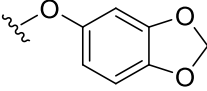
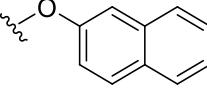
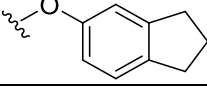


เติมเบนซิมิดาโซล (ประมาณ 100 มิลลิกรัม) และโซเดียมไฮไดรด์ (NaH) (ประมาณ 82 มิลลิกรัม) ลงในตัวทำละลายไดเมทิลฟอมาไมด์ (DMF) (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) กวนทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารอนุพันธ์ของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) ที่ได้จากตัวอย่างที่ 23 (ประมาณ 500 มิลลิกรัม) ภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สอาร์กอน (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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ทำการแยกให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว

**ตารางที่ 1:** แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรคของอนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลที่ประกอบด้วยหมู่แทนที่ที่แตกต่างกัน



| 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 (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| XI        |  | 25                                                                 |
| XII       |  | >100                                                               |
| XIII      |  | >100                                                               |

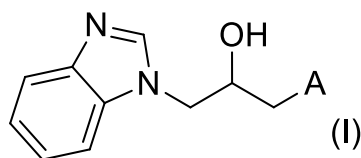
5

### วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

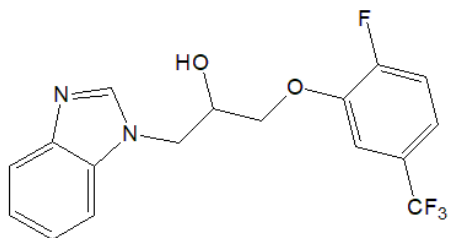
ข้อถ้อยสิทธิ

1. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟินอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง (I)



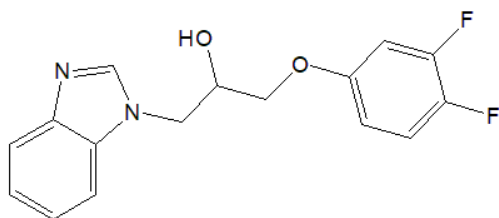
- 5 โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟินอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือ แบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group), และอนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่ฮาไลด์ (halide-substituted group)
- 10 2. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟินอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 1 โดยที่ อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) เลือกได้จาก 4-โพรพิลฟินอล (4-propylphenol), 3-โพรพิลฟินอล (3-propylphenol), 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟินอล (4-isopropyl-3-methyl phenol), 4-ไซโคลเฮกซิลฟินอล (4-cyclohexylphenol), 4-ไซโคลเพนทิลฟินอล (4-cyclopentylphenol), หรือ 5-อินดานอล (5-indanol)
- 15 3. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟินอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 1 โดยที่ อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group) คือ แนปทาเลน-2-อล (naphthalene-2-ol)
4. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟินอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 1 โดยที่ อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) คือ ซีซามอล (sesamol)
- 20 5. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟินอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 1 โดยที่ อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่ฮาไลด์ (halide-substituted group) เลือกได้จาก 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูอโรเมทิล) ฟินอล (2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol), 3,4-ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol), 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol), หรือ เพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluoro phenol)

6. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (II)



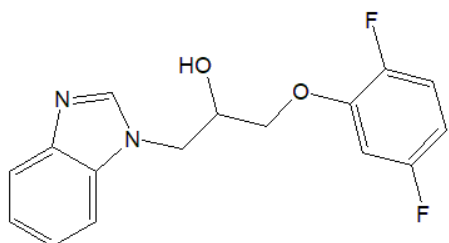
.....(II)

- 5 7. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (III)



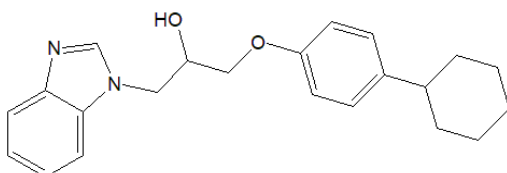
.....(III)

8. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (IV)



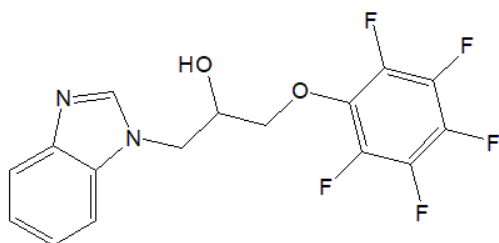
.....(IV)

- 10 9. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับต้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (V)



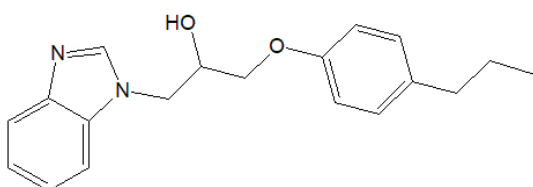
.....(V)

10. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับด้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (VI)



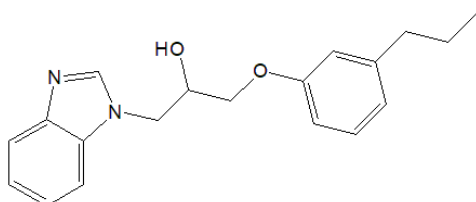
.....(VI)

11. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับด้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (VII)



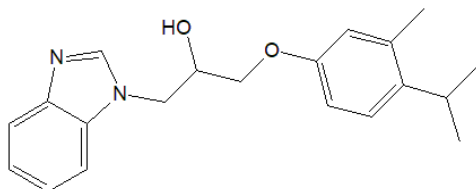
.....(VII)

12. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับด้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (VIII)



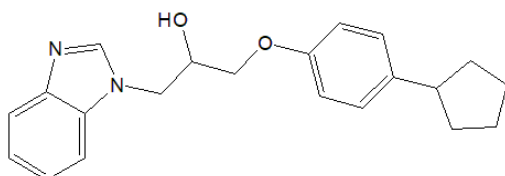
.....(VIII)

13. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับด้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (IX)



.....(IX)

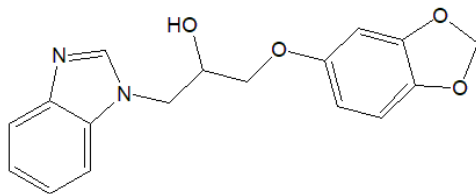
14. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับด้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (X)



.....(X)

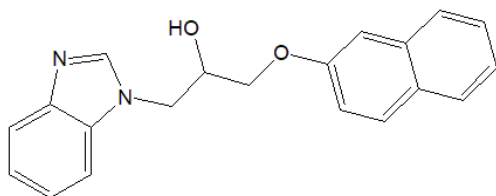


15. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับด้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (XI)



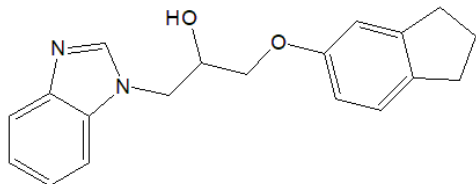
.....(XI)

16. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับด้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (XII)



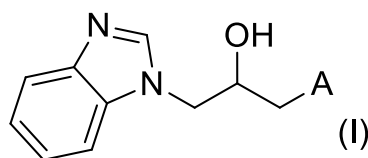
.....(XII)

17. สารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับด้านเชื้อวัณโรค ตามข้อถ้อยสิทธิ  
ที่ 1 โดยที่ สารประกอบเบนซิมิดาโซล คือ สารประกอบดังแสดงตามโครงสร้าง (XIII)



.....(XIII)

18. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟีนอล สำหรับด้านเชื้อวัณโรค ดัง  
แสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



ก. ผสม 1,3-ไดโบรโมโพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และสารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:4 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ข. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 3:1 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ก. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ข) และอนุพันธ์ของฟีนอล ในอัตราส่วน 1:1 ถึง 1:3 โดยโมล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 50 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ถึง 24 ชั่วโมง

5 ง. ผสมอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ค) และเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (Tetrabutyl ammonium 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), 10 อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxo group), และอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ฮาไลด์ (halide-substituted group)

19. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) เลือกได้จาก 4-โพรพิลฟีนอล (4-propylphenol), 3-โพรพิลฟีนอล (3-propylphenol), 4-ไอโซโพรพิล-3-เมทิลฟีนอล (4-isopropyl-3-methyl phenol), 15 4-ไซโคลเฮกซิลฟีนอล (4-cyclohexylphenol), 4-ไซโคลเพนทิลฟีนอล (4-cyclopentylphenol), หรือ 5-อินดานอล (5-indanol)

20. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group) คือ แนฟทาเลน-2-อล (naphthalene-2-ol)

21. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxo group) คือ ซีซามอล (sesamol)

22. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ฮาไลด์ (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 ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก), ข), ค), และ ง) ตัวทำละลายอินทรีย์เลือกได้จาก ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), อะซิโตน (acetone), ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide), เอทานอล (ethanol), เมทานอล (methanol), อะซิโตนไนไตรล์

(acetonitrile), เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran), เอทิล อะซิเตท (ethyl acetate), เฮกเซน(hexane), ไอโซโพรพานอล (isopropanol), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว

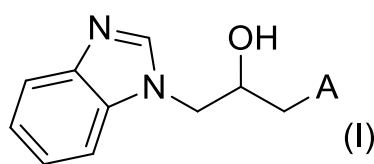
24. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 23 โดยที่ ในขั้นตอน ก) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)
- 5 25. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 23 โดยที่ ในขั้นตอน ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide)
26. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 23 โดยที่ ในขั้นตอน ค) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทานอล (ethanol)
- 10 27. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 23 โดยที่ ในขั้นตอน ง) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran)
28. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 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
- 15 29. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 28 โดยที่ ในขั้นตอน ก) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ อิมิดาโซล (imidazole)
30. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 28 โดยที่ ในขั้นตอน ข) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ สารผสมของ ซีเซียมคาร์บอเนต (cesium carbonate) และ โซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride)
- 20 31. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 28 โดยที่ ในขั้นตอน ค) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate)
32. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 0 ถึง 25 องศาเซลเซียส
33. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ข) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส

34. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 70 ถึง 90 องศาเซลเซียส
35. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ง) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส
- 5 36. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 14 ถึง 20 ชั่วโมง
37. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ข) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 24 ชั่วโมง
- 10 38. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ค) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 16 ถึง 24 ชั่วโมง
39. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ง) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 10 ถึง 30 นาที
- 15 40. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก) สารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) เลือกได้จาก ไตรเมทิลไซลิล คลอไรด์ (trimethylsilyl chloride, TMSCl), ไตรเอทิลไซลิล คลอไรด์ (triethylsilyl chloride, TESCl), เทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลไซลิลคลอไรด์ (tert-butyl dimethylsilyl chloride, TBDMSCl), เทอเชียรีบิวทิลไดฟีนิลไซลิล คลอไรด์ (tert-butyl diphenylsilyl chloride, TBDPSCl), หรือ ไตรไอโซโพรพิลไซลิล คลอไรด์ (triisopropylsilyl chloride, TIPSCl)
- 20 41. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 40 โดยที่ ในขั้นตอน ก) สารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) คือ เทอเชียรีบิวทิลไดเมทิลไซลิลคลอไรด์ (tert-butyl dimethylsilyl chloride, TBDMSCl)
42. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก) อัตราส่วนของ โมลของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และสารประกอบที่มีหมู่ไซลิล (silyl group) อยู่ในช่วง 1:2 ถึง 1:3
- 25 43. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ข) อัตราส่วนของ โมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และเบนซิมิดาโซล อยู่ในช่วง 1.5:1 ถึง 2.5:1

44. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ก) อัตราส่วนโดย  
โมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ข) และ อนุพันธ์ของฟีนอล อยู่ในช่วง 1:1.5 ถึง 1:2.5

45. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 โดยที่ ในขั้นตอน ง) อัตราส่วนโดย  
โมลของอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และ เตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (tetrabutylammonium  
fluoride, TBAF) อยู่ในช่วง 1:2 ถึง 1:3 โดยโมล

46. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ดังแสดงตามโครงสร้าง (I) ที่ประกอบรวมด้วยขั้นตอน



ก. ผสม 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และอนุพันธ์ของฟีนอล ใน  
อัตราส่วน 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 โดยมี  
ตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24  
ชั่วโมง

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟีนอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะลิฟาติก  
ไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง  
หรือ แบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว, อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), และ  
อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่เฮเทอโร (hetero-substituted group)

47. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะ  
ลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (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 ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่อะโร  
มาติก (aromatic group) คือ แนฟทาเลน-2-อล (naphthalene-2-ol)

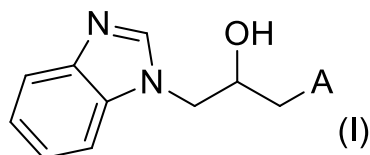
49. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) คือ ซีซามอล (sesamol)
50. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ อนุพันธ์ของฟีนอลที่มีหมู่ไฮไลด์ (halide-substituted group) เลือกได้จาก 2-ฟลูออโร-5-(ไตรฟลูออโรเมทิล) ฟีนอล (2-Fluoro-5-(trifluoromethyl)phenol), 3,4- ไดฟลูออโรฟีนอล (3,4-difluorophenol), 2,5-ไดฟลูออโรฟีนอล (2,5-difluorophenol), หรือ เพนตะฟลูออโรฟีนอล (pentafluoro phenol)
51. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ก) และ ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ เลือกได้จาก ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), อะซิโตน (acetone), ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide), เอทานอล (ethanol), เมทานอล (methanol), อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile), เตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran), เอทิล อะซิเตท (ethyl acetate), เฮกเซน (hexane), ไอโซโพรพานอล (isopropanol), หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว
52. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 51 โดยที่ ในขั้นตอน ก) ตัวทำละลายอินทรีย์ เลือกได้จาก เอทานอล (ethanol), หรือ อะซิโตน (acetone)
53. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 51 โดยที่ ในขั้นตอน ข) ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethylformamide)
54. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 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 ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 54 โดยที่ ในขั้นตอน ก) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate)
56. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 54 โดยที่ ในขั้นตอน ข) ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โซเดียมไฮไดรด์ (sodium hydride)
57. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ก) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 50 ถึง 85 องศาเซลเซียส

58. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ข) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส
59. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ก) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 15 ถึง 20 ชั่วโมง
- 5 60. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ข) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อยู่ในช่วง 20 ถึง 24 ชั่วโมง
61. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ก) อัตราส่วนโดยโมลของ 1,3-ไดโบรโม-2-โพรพานอล (1,3-dibromo-2-propanol) และอนุพันธ์ของฟีนอล อยู่ในช่วง 1:1 ถึง 2:1
- 10 62. วิธีการเตรียมสารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 46 โดยที่ ในขั้นตอน ข) อัตราส่วนโดยโมลระหว่างอนุพันธ์ที่ได้จากขั้นตอน ก) และ เบนซิมิดาโซล อยู่ในช่วง 1:1 ถึง 2:1
63. สารประกอบเบนซิมิดาโซล ที่ได้จากวิธีการเตรียมตามข้อถ้อยสิทธิที่ 18 ถึง 62 ข้อใดข้อหนึ่ง
64. การใช้สารประกอบเบนซิมิดาโซล ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 1 ถึง 17 หรือ 63 ข้อใดข้อหนึ่ง สำหรับยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ InhA เพื่อใช้เป็นสารต้านวัณโรค



### บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบเบนซิมิดาโซลที่มีหมู่แทนที่เป็นอนุพันธ์ฟินอล และวิธีการเตรียมของอนุพันธ์เบนซิมิดาโซลดังกล่าว ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านวัณโรค ดังแสดงตามโครงสร้าง (I)



5

โดยที่ A แสดงแทน อนุพันธ์ของฟินอล ที่เลือกได้จาก อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) แบบโซ่ตรง แบบโซ่กิ่ง หรือ แบบวง ทั้งที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม, อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่อะโรมาติก (aromatic group), อนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่ไดออกซี (dioxy group) และอนุพันธ์ของฟินอลที่มีหมู่ฮาโลได์ (halide-substituted group)

## Molecular docking study of pyrrolyl benzohydrazide derivatives to explore the structure requirements of InhA inhibitors

Paptawan Thongdee<sup>1</sup>, Bongkochawan Pakamwong<sup>1</sup>, Kotchakorn Yotiyamkrae<sup>1</sup>,  
Bunrat Tharat<sup>1</sup>, Bundit Khamisri<sup>1</sup>, Thitima Chuansupak<sup>1</sup>, Naruedon Phusi<sup>1</sup>,  
Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>, Kampanart Chayajarus<sup>1</sup>, Pharit Kamsri<sup>2</sup>, Auradee Punkvang<sup>2</sup>,  
Nitima Suttipanta<sup>3</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>, Prasat Kittakoo<sup>5</sup>,  
Ubonsree Leartsakulpanich<sup>6</sup>, Khomson Suttisintong<sup>7</sup>, James Spencer<sup>8</sup>, Adrian Mulholland<sup>9</sup>,  
Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University,  
Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>2</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

<sup>3</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>5</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>6</sup>National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, NSTDA, 111 Thailand Science Park,  
Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

<sup>7</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

<sup>8</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol,  
Bristol BS8 1TD, UK

<sup>9</sup>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<sup>+</sup> 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 in mammals, plants, fungi and bacteria (the archaea make isoprenoid-based lipids).<sup>1</sup> 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<sup>2</sup>. 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.<sup>3</sup> 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.<sup>2</sup> 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.<sup>2</sup> 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<sup>+</sup> cofactor in InhA binding

pocket are H-bond interaction and  $\pi$ - $\pi$  interaction. In this literatures review, we study the structure and inhibition values of InhA at 50  $\mu$ M. 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.

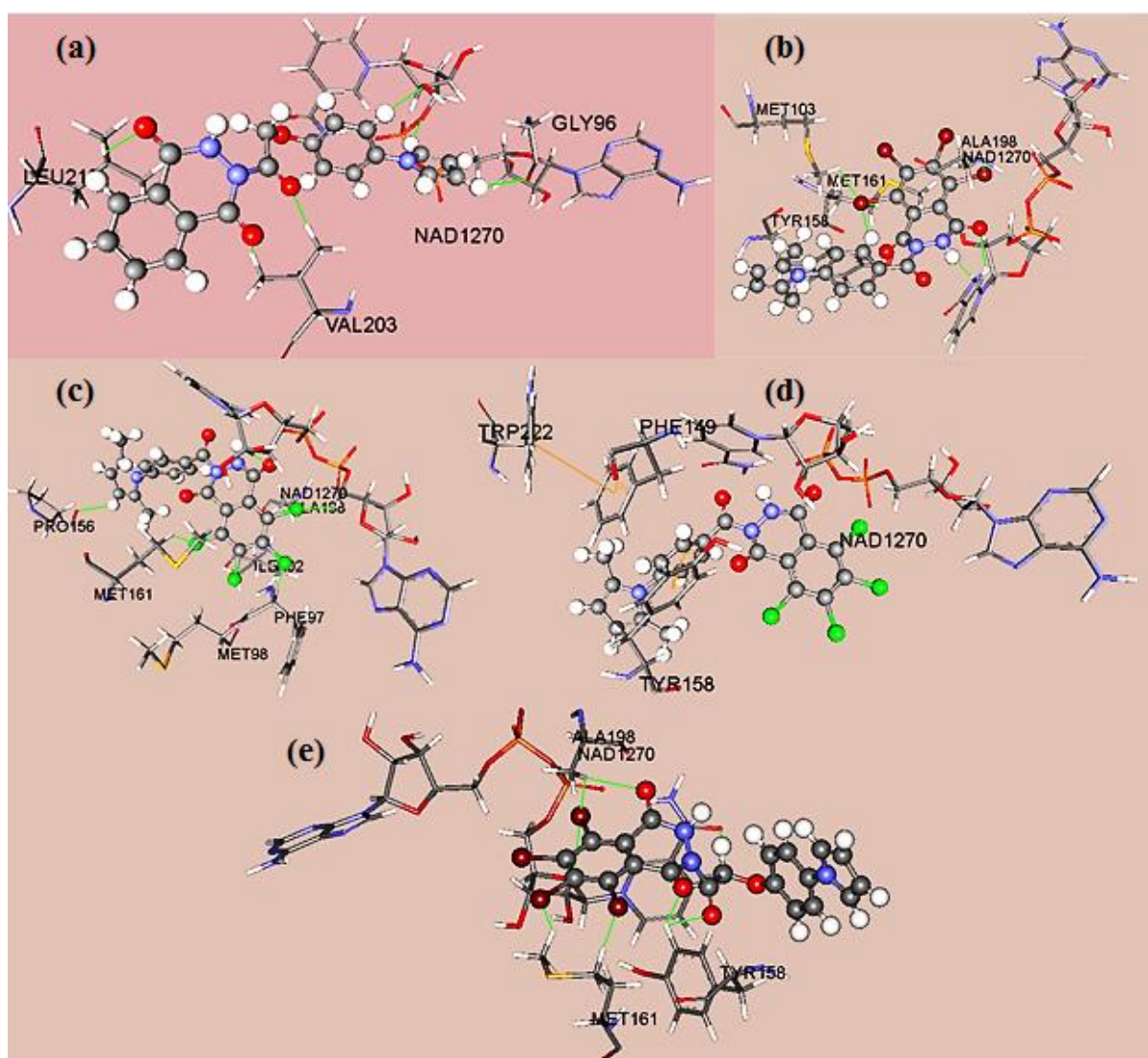
As depicted in figure 1a, the six H-bond interactions (green line) between compound 1 with Gly96, Val203, Leu218 residues and NAD<sup>+</sup> cofactor. In binding mode of compound 51, formed six H-bond interactions with Met103, Tyr158, Met161, Ala198 residues and NAD<sup>+</sup> cofactor in figure 1b. Figure 1c shows the results of docking, all seven H-bond interactions between compound 52 and Phe97, Pro156, Met161, Ala198, Ile202 residues and NAD<sup>+</sup> cofactor. Moreover,  $\pi$ - $\pi$  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<sup>+</sup> 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  $\pi$ - $\pi$  interaction of compound 52 was

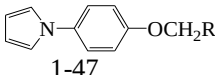
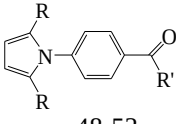
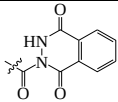
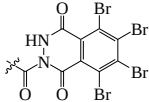
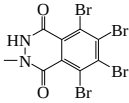
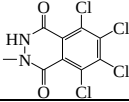
found as the crucial interaction to bind with InhA binding pocket. This interaction effected to inhibitory activity of InhA. So, inhibition may be related to the position and between ligand and amino acid and electrostatic interaction of bromine substituents.

Therefore, the important interaction between ligand, NAD<sup>+</sup> 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<sub>3</sub> 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  $\pi$ - $\pi$  interaction and (e) compound 6 formed H-bond with inhibitors

**Table 1.** The chemical structures and % inhibition value

| <br>1-47 |                                                                                   | <br>48-53 |                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Compound                                                                                  | R                                                                                 | R'                                                                                          | % Inhibition of InhA at 50 $\mu$ M |
| 1                                                                                         |  | -                                                                                           | 63                                 |
| 6                                                                                         |  | -                                                                                           | 11                                 |
| 51                                                                                        | CH <sub>3</sub>                                                                   |            | 75                                 |
| 52                                                                                        | CH <sub>3</sub>                                                                   |            | 76                                 |

#### 4. Conclusion

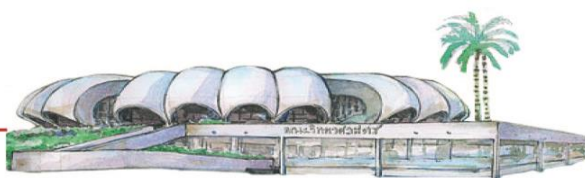
Structure based drug design using molecular docking calculations was successfully elucidated to predict InhA inhibitors based on pyrrolyl benzohydrazide derivatives in InhA binding site. The results showed that selected compounds formed H-bond interactions with Gly96, Phe97, Met103, Pro156, Tyr158, Met161, Ala198, Ile202, Val203, Leu218 residues and NAD<sup>+</sup> cofactor. The  $\pi$ - $\pi$  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

- Massengo-Tiasse, R. P.; Cronan, J. E. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 1507–1517.
- 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.
- 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.
- Shrinivas, D. J.; Sheshagiri R. D.; Pradeepkumar, M.; Kulkarni, V. H. *Indo Am. J. Pharm. Res.* **2016**, 6, 4925–4933.
- 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.



## Rational design of PknB inhibitors in class of 4-oxo-crotonic acid derivatives as highly potent anti-tuberculosis agents

Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>, Naruedon Phusi<sup>1</sup>, Kampanart Chayajarus<sup>1</sup>, Pharit Kamsri<sup>2</sup>, Auradee Punkvang<sup>2</sup>, Nitima Suttipanta<sup>3</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>, Khomson Suttisintong<sup>5</sup>, Prasat Kittakoo<sup>6</sup>, James Spencer<sup>7</sup>, Adrian Mulholland<sup>8</sup>, Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>2</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

<sup>3</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>5</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

<sup>6</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>7</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK

<sup>8</sup>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.<sup>1</sup> 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.<sup>2,3</sup> 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*.<sup>4</sup> 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.<sup>5</sup> 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*.<sup>6</sup> 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

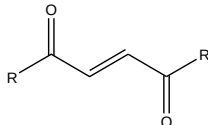
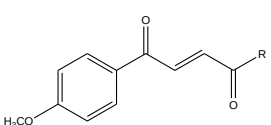
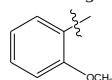
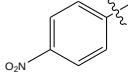
### 2.1 Biological data

Structures and biological activities of ninety 4-oxocrotonic acid derivatives were obtained from literature.<sup>6</sup> 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

**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 $\mu$ M |
| 02                                                                                 | OCH <sub>3</sub>                                                                   | -                                                                                   | 24.7 $\pm$ 1.5             |
| 55                                                                                 |  | isopropyl                                                                           | 56.2 $\pm$ 5.0             |
| 85                                                                                 |  | 2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]ethyl                                                 | 87.9 $\pm$ 5.3             |

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.

### 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<sup>+</sup> were chosen to represent water for solvation and ions for neutralize system. To reduce the bad steric interactions of solvate water molecules and Na<sup>+</sup> 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<sup>2</sup>. 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<sup>2</sup> 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<sup>2</sup> 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

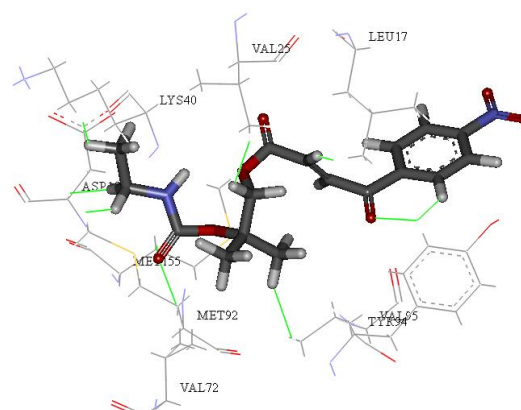
High accuracy prediction of docking parameter in Autodock 4.2 program was validated based on the RMSD value between X-ray and docked structures. RMSD value is 1.09 Å. Therefore, binding mode of selected compounds in this study was predicted as the same parameters. The binding mode of highest active compound 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.

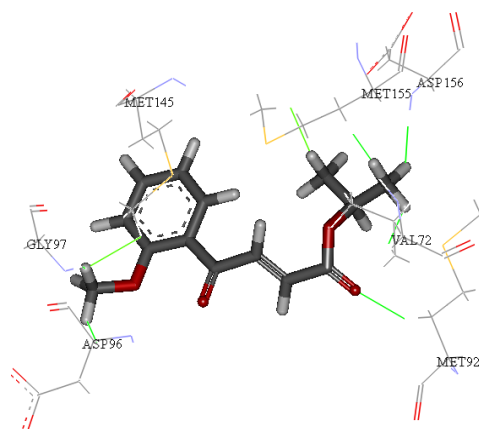
#### 3.2 Molecular dynamic simulations

##### 3.2.1 Structural stability during MD simulations

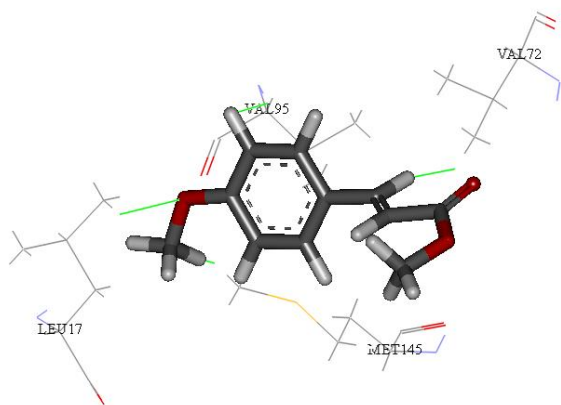
In order to calculate structural stability during MD simulation of cpd. 85 in PknB binding pocket, The RMSDs for all



**Figure 1.** Crucial interactions of highest active compound (cpd. 85)



**Figure 2.** Crucial interactions of moderate active compound (cpd. 55)

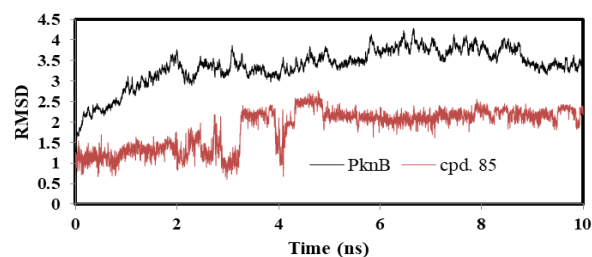


**Figure 3.** Crucial interactions of less active compound (cpd. 02)

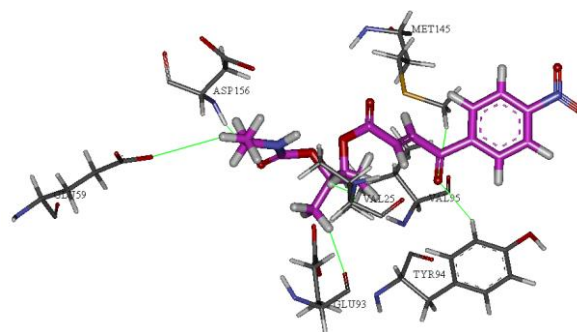
atoms of solute species relative to the initial structure over the 10 ns of simulation times were calculated and plotted in Figure 4. The RMSD plots indicate that cpd. 85 reached equilibrium state after 5 ns. Therefore, the result obtained from MD simulations of cpd. 85 was reasonable for further analyze 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

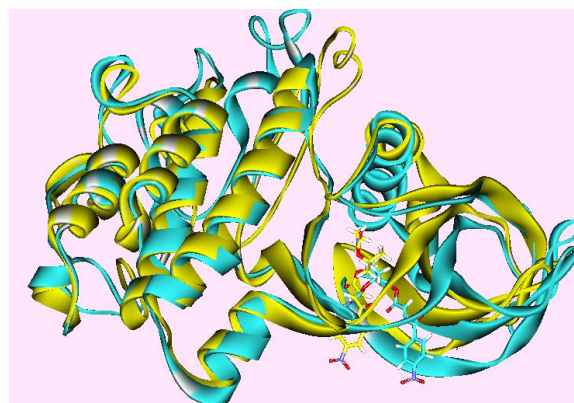
The binding mode of cpd. 85 obtained from MD simulations formed four hydrogen bond interactions between hydrogen atom of R substituent with carbonyl group of Glu59, Glu93 residue and carbonyl group of core structure with side chain of Met145 residue, respectively. Moreover the hydrogen bond interaction 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. Loughheed, 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.; Boulloc, 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.



## Molecular modeling of InhA inhibitors in the class of benzimidazole derivatives as a novel anti-tuberculosis agents

Bunrat Tharat<sup>1</sup>, Bongkochawan Pakanwong<sup>1</sup>, Paptawan Thongdee<sup>1</sup>,  
Kotchakorn Yotyiamkrae<sup>1</sup>, Bundit Khamsri<sup>1</sup>, Thitima Chuansupak<sup>1</sup>, Naruedon Phusi<sup>1</sup>,  
Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>, Kampanart Chayajaras<sup>1</sup>, Thimpika Pornprom<sup>1</sup>, Nitima Suttipanta<sup>2</sup>,  
Pharit Kamsri<sup>3</sup>, Auradee Punkvang<sup>3</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>,  
Prasat Kittakoop<sup>5</sup>, Khomson Suttisintong<sup>6</sup>, Adrian Mulholland<sup>7</sup>, James Spencer<sup>8</sup>,  
Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University,  
Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>3</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>5</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>6</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

<sup>7</sup>Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, UK

<sup>8</sup>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.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

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.<sup>3</sup> 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<sup>+</sup>, the co-substrate for InhA. The INH-NAD adduct functions as a potent inhibitor of InhA.<sup>4</sup> 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.

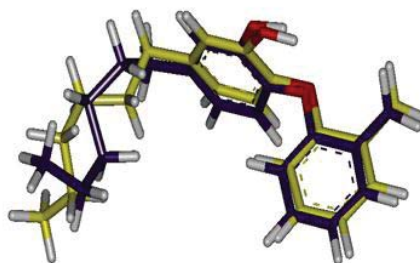
## 2. Materials and Methods

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<sup>\*</sup>) 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<br>kcal/mol | Binding energy<br>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 ( $\text{NAD}^+$ ). In addition, cation- $\pi$  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.

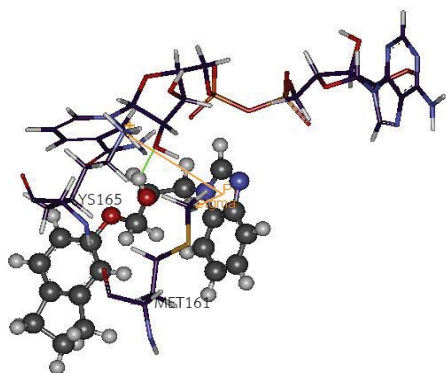
### 3.3. Molecular docking analysis of Cpd32 and Cpd46, moderate active compounds

The binding mode and binding interactions of moderate InhA inhibitors of benzimidazole derivatives, Cpd32 and

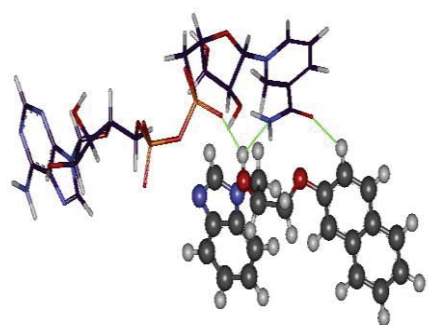
Cpd46 were investigated. The obtained results show that Cpd32 formed hydrogen bond interaction between oxygen atom and nitrogen atom of nicotinamide ribose cofactor ( $\text{NAD}^+$ ) with hydroxyl group of ligand. In addition, hydrogen bond interactions between oxygen atoms of  $\text{NAD}^+$  with 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  $\text{NAD}^+$  with hydrogen atom of ligand at R position and hydrogen bond interactions between oxygen atom of  $\text{NAD}^+$  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  $\sigma$ - $\pi$  interaction between aromatic ring of ligand with hydrogen atom

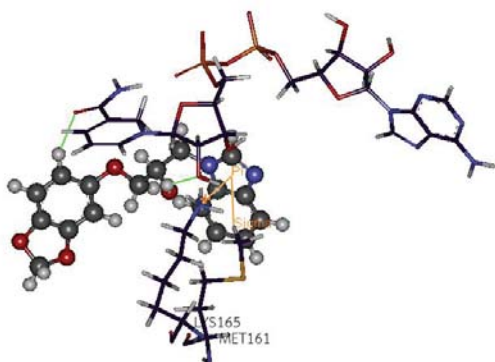
of Met161 residue is shown in Figure 4. Moreover, hydrophobic interactions between hydrogen atom of ligand with hydrogen atom of Phe97, Met98, Met103, Phe149, Tyr158, Pro193, Ala198, Ile202, Val203 and Leu218 residues were founded.



**Figure 2.** The binding mode of Cpd05 in InhA binding pocket obtained from molecular docking calculations



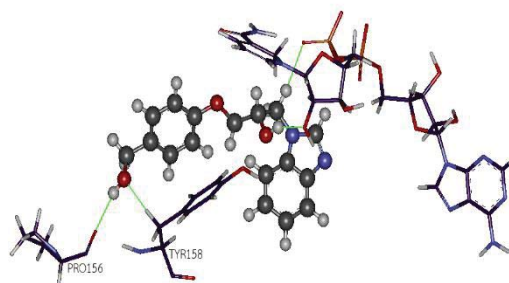
**Figure 3.** The binding mode of Cpd32 in InhA binding pocket obtained from molecular docking calculations



**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  $\text{NAD}^+$  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,  $\text{NAD}^+$ , 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  $\text{NAD}^+$  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



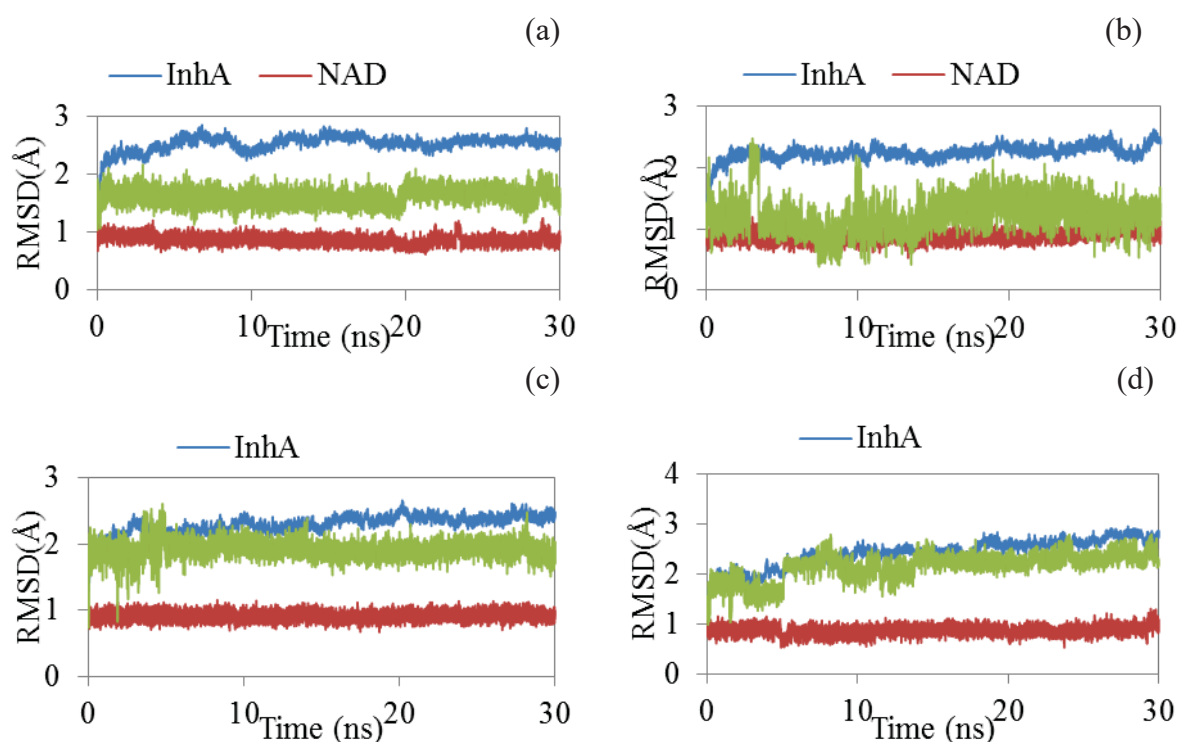
15 ns (Figure 6b) and Cpd55 reach the equilibrium state after 15 ns. (Figure 6d)

### 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<sup>+</sup>

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<sup>+</sup> 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

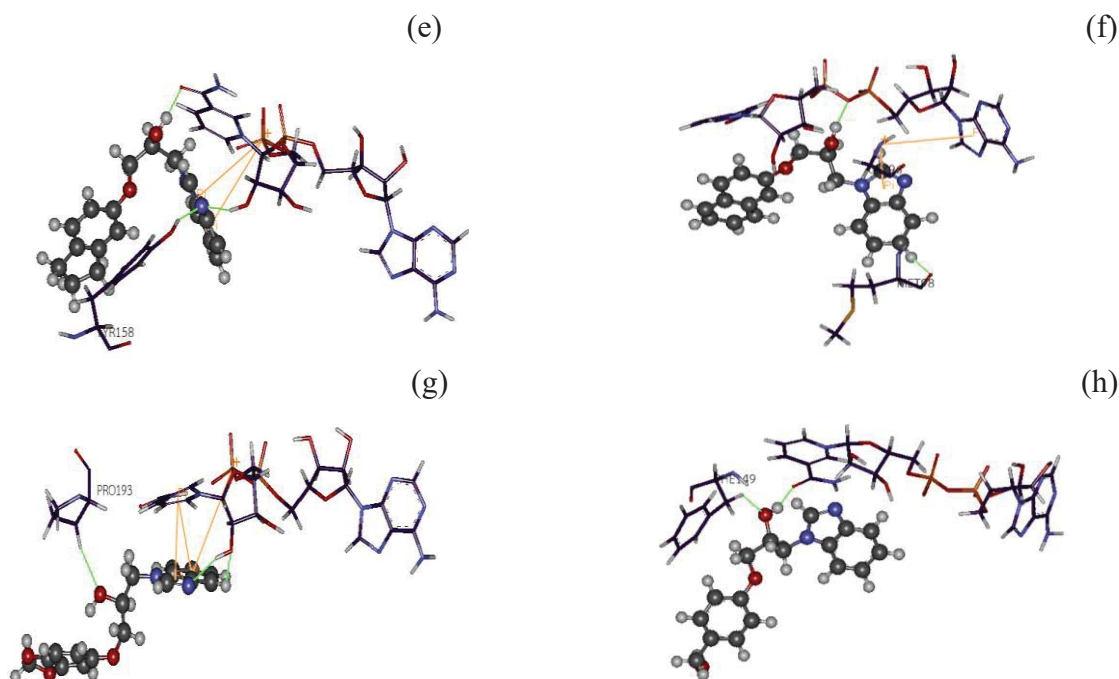
In addition, hydrophobic interactions between hydrogen atom of ligand with hydrogen atom of Ala157, Met98, Met103 and Met161 residues were founded. For Cpd46 Hydrogen bond interaction between hydrogen atoms of Pro193 residue with hydroxyl group of ligand was found. In addition, hydrogen bond interactions between hydrogen atoms of NAD<sup>+</sup> with nitrogen atom of ligand. The  $\pi$ - $\pi$  interaction between aromatic ring of ligand with aromatic ring of NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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- $\pi$  interaction,  $\sigma$ - $\pi$  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.



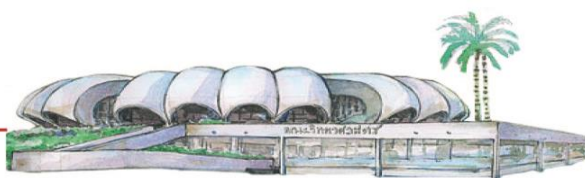
**Figure 7.** The binding mode of Cpd05 (e), Cpd32 (f), Cpd46 (g) and Cpd55 (h) in InhA binding pocket obtained from molecular dynamics simulations

#### 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.



## ***In-silico* aided inhibitor design of benzoimidazole-containing derivatives as novel direct InhA inhibitors**

Pharit Kamsri<sup>1\*</sup>, Auradee Punkvang<sup>1</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>2</sup>, Supa Hannongbua<sup>2</sup>, Sanya Sureram<sup>3</sup>, Prasat Kittakoop<sup>3</sup>, Nitima Suttipanta<sup>4</sup>, Khomson Suttisintong<sup>5</sup>, Adrian Mulholland<sup>6</sup>, James Spencer<sup>7</sup>, Potjanee Srimanote<sup>8</sup>, Pornpan Pungpo<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>3</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>4</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>5</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, Pathum Thani 12120, Thailand

<sup>6</sup>Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK

<sup>7</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK

<sup>8</sup>Graduate Program, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani 12121, Thailand

<sup>9</sup>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<sub>50</sub>) 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<sup>+</sup>) 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.<sup>1-5</sup> To overcome the drug resistant of *M. tuberculosis*, new inhibitors that directly bind with the InhA were developed.<sup>6-8</sup> 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.<sup>9-11</sup> 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.<sup>12</sup> To select the potential hit compounds of InhA inhibitors with good lead-like properties, ADMET prediction using SwissADME was employed.<sup>13</sup> 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 binding 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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.<sup>13</sup>

## **3. Results and Discussion**

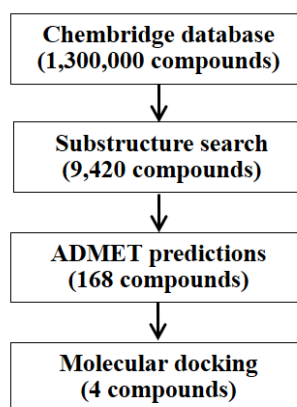
### **3.1 Virtual screening of new InhA inhibitors**

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*-benzimidazol-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.

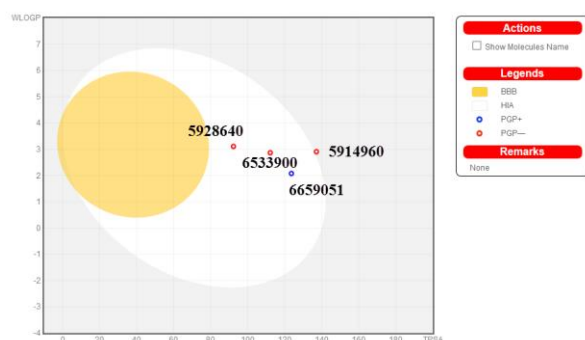


**Figure 1.** Virtual screening workflow

**Table 1.** Hit compounds based on benzoimidazole-containing derivative

| ID      | Goldscore | Structure |
|---------|-----------|-----------|
| 5928640 | 82.90     |           |
| 6533900 | 81.33     |           |
| 6659051 | 80.86     |           |
| 5914960 | 80.04     |           |

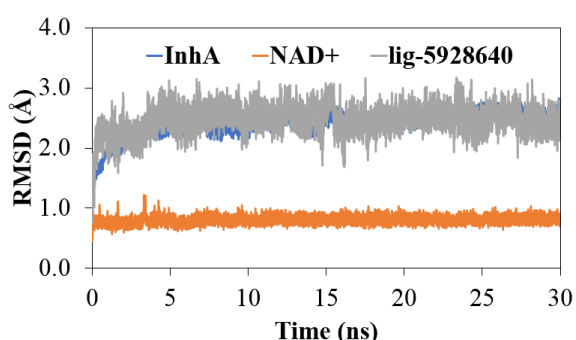




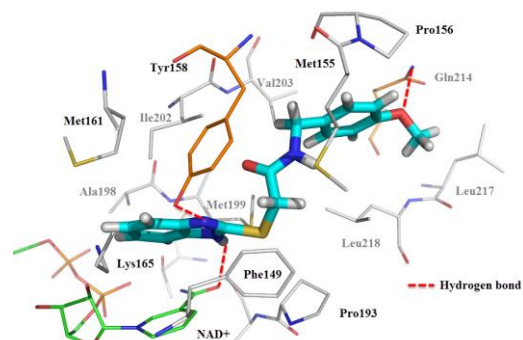
**Figure 2.** ADMET prediction of hit compounds

### 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



**Figure 4.** Binding mode and binding interaction of **5928640** in InhA binding site

**5928640** is favorable to bind with InhA binding site *via* hydrogen bond interactions. Three hydrogen bond interactions were observed between **5928640** with NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup>. 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 inhibitors. 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, W.R. 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.; Warriar, 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

<sup>1</sup>PHARIT KAMSRI, <sup>2</sup>AURADEE PUNKVANG, <sup>3</sup>PRASAT KITTA KOOP, <sup>4</sup>KHOMSON SUTTISINTONG, <sup>5</sup>PORN PAN PUNGPO

<sup>1,2</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

<sup>3</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>4</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, Pathum Thani 12120, Thailand

<sup>5</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand

E-mail: <sup>5</sup>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

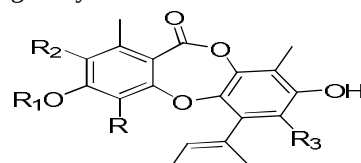
*M. tuberculosis* serine/threonine protein kinases G, PknG has been identified as attractive target for anti-tuberculosis drug discovery. This enzyme involved in bacterial cell metabolic processes and preventing phagosome-lysosome fusion in host macrophages [1-4]. Moreover, sclerotiorin isolated from an endophytic fungus, *Penicillium sp.* Strain ZJ27 was reported as PknG inhibitor with an IC<sub>50</sub> value of 76.5 mM, and acted as a non-competitive inhibitor [5]. Talaramide A bioactive compound isolated from endophytic fungus *Talaromycesp.* (HZ-YX1) showed promising inhibition of PknG activity with an IC<sub>50</sub> 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 of Aspergillusidone A-F

Structure of Aspergillusidone A-F [9,12] as shown in Figure 1 were constructed by standard 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<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=COOH

Aspergillusidone B: R=Cl, R<sub>1</sub>=Me, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=Cl

Aspergillusidone C: R=H, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Cl, R<sub>3</sub>=Cl  
 Aspergillusidone D: R=H, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Br, R<sub>3</sub>=Br  
 Aspergillusidone E: R=H, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Br, R<sub>3</sub>=H  
 Aspergillusidone F: R=Br, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=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 pocket was performed for 10 ns. The ligand-enzyme complex 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<sup>+</sup> 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<sup>2</sup>). 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 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<sup>2</sup> 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<sup>2</sup> 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

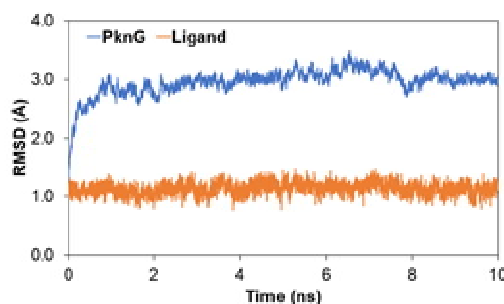
Docking score of Aspergillusidone A-F complexed with PknG derived from Glide XP docking was summarized in Table I. This result indicated that Aspergillusidone A is favorable to bind with PknG with docking score of -9.08 kcal/mol. Aspergillusidone A contained COOH at R<sub>3</sub> position which is different substituent as compared to other Aspergillusidone. This functional might be important for binding of Aspergillusidone 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/enzyme complex, 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 ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) derived from two methods displayed similar results, -14.42 kcal/mol and -17.76 kcal/mol for MM-PBSA and MM-GBSA, respectively.

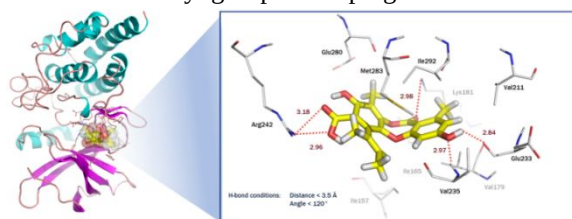
| Contributions                            | Energy (kcal/mol) |
|------------------------------------------|-------------------|
| $\Delta E_{\text{vdW}}$                  | -33.35            |
| $\Delta E_{\text{ele}}$                  | -41.94            |
| $\Delta E_{\text{gas}}$               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

**Table II: Binding free energies of Aspergillusidone A in PknG binding pocket derived from MM-PBSA and MM-GBSA approaches**

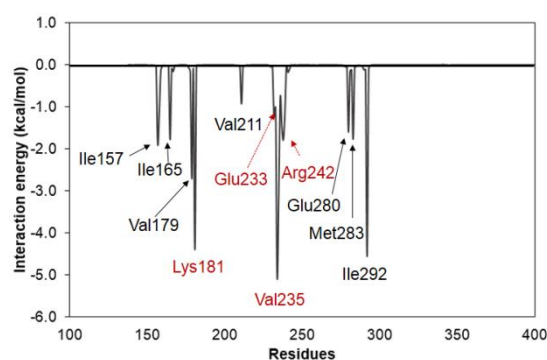
### D. Binding interactions

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<sub>2</sub> 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 form 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<sub>3</sub><sup>+</sup> 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. Wączek, 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 *Talaromycesp.* (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 *Tiliacora triandra* 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 vermehotin 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. Casciulli, 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.

★ ★ ★

## Molecular docking calculations of novel pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives InhA inhibitors as anti-tuberculosis agents

Issaraporn Saenglum<sup>1</sup>, Paptawan Tongdee<sup>1</sup>, Naruedon Phusi<sup>1</sup>, Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>, Thimpika Pornprom<sup>1</sup>, Sornsawan Batthong<sup>1</sup>, Kampanart Chayajarus<sup>1</sup>, Kanchiyaphat Ariyachaokun<sup>2</sup>, Pharit Kamsri<sup>3</sup>, Auradee Punkvang<sup>3</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>, Khomson Suttisintong<sup>5</sup>, Prasat Kittakoop<sup>6</sup>, James Spencer<sup>7</sup>, Adrian Mulholland<sup>8</sup> and Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>2</sup>Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>3</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>5</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

<sup>6</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>7</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom

<sup>8</sup>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<sup>+</sup> 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<sup>1</sup>. The World Health Organization (WHO) estimated that there are 10.4 million new cases of TB and 1.4 million TB deaths annually<sup>2</sup>. Among the infected individuals 8.7 million develop active TB and nearly 1.4 million people die from the disease annually.

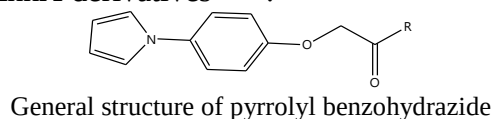
The pandemic of AIDS has had a major impact on the worldwide TB problem. On one hand, HIV infection is the most potent risk factor for converting latent TB into the active, transmissible form, thus fueling the spread of TB; on the other hand, TB bacteria can accelerate the progress of AIDS infection<sup>3</sup>. The enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) is a key enzyme of the type II fatty acid synthesis (FAS) system [4]. InhA

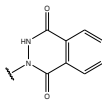
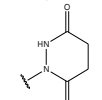
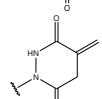
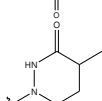
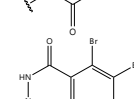
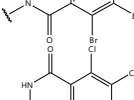
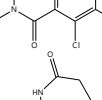
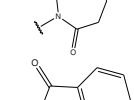
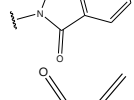
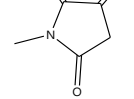
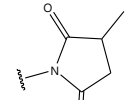
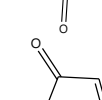
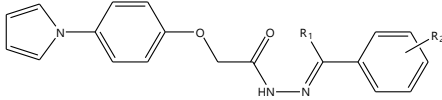
is an enzyme which is important for the growth of bacteria *Mycobacterium tuberculosis*<sup>4</sup>. In previous research study pyrrolyl benzohydrazide and pyrrolyl benzamide derivatives were developed and tested for inhibition of the biological activity showing anti-*Mycobacterium tuberculosis* and 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<sup>5, 6, 7</sup>. 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<sup>5, 6, 7</sup> as shown in **Table 1**. The biological activities of these compounds are %Inhibition of InhA at 50  $\mu$ M 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.

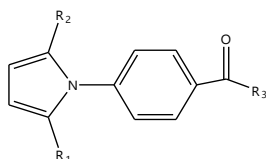
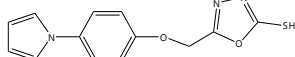
**Table 1.** Structures and biological activities of InhA derivatives<sup>5, 6, 7</sup>.



| Com.                                                                                 | R                                                                                    | %Inhibition of InhA at 50<br>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<br>InhA at 50 μM |
| 13                                                                                   | H                                                                                    | 4-OCH <sub>3</sub>              | 21                              |

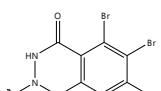
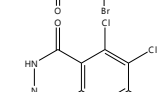
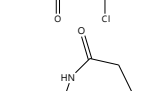
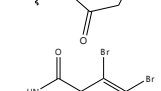
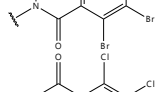
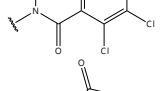


|    |                 |                         |    |
|----|-----------------|-------------------------|----|
| 14 | H               | 2,4-OCH <sub>3</sub>    | 37 |
| 15 | H               | 3-Phenoxy               | 15 |
| 16 | H               | Indole-3-carboxaldehyde | 19 |
| 17 | CH <sub>3</sub> | H                       | 34 |
| 18 | CH <sub>3</sub> | 4-Br                    | 27 |
| 19 | CH <sub>3</sub> | 4-NO <sub>2</sub>       | 51 |
| 20 |                 |                         | 57 |



General structure of pyrrolyl benzohydrazide

| Com. | R1,R2 | R3 | %Inhibition of InhA at 50 $\mu$ M |
|------|-------|----|-----------------------------------|
|------|-------|----|-----------------------------------|

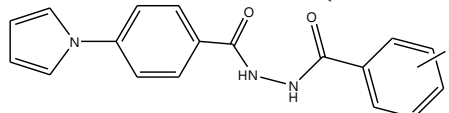
|    |                 |                                                                                     |                                                   |
|----|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 21 | H               |   | 72<br>(IC <sub>50</sub> = 34.8 $\pm$ 2.1 $\mu$ M) |
| 22 | H               |  | 64                                                |
| 23 | H               |  | 27                                                |
| 24 | CH <sub>3</sub> |  | 75<br>(IC <sub>50</sub> = 12.6 $\pm$ 2.8 $\mu$ M) |
| 25 | CH <sub>3</sub> |  | 76<br>(IC <sub>50</sub> = 31.1 $\pm$ 2.4 $\mu$ M) |
| 26 | CH <sub>3</sub> |  | 13                                                |

General structure of benzamide derivative

| Com. | R | %Inhibition of InhA at 50 $\mu$ M |
|------|---|-----------------------------------|
|------|---|-----------------------------------|

|    |                                   |                  |
|----|-----------------------------------|------------------|
| 27 | 4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 99(29% at 50 nM) |
| 28 | 3-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>  | 99(27% at 50 nM) |

|    |                                                 |                  |
|----|-------------------------------------------------|------------------|
| 29 | 2,3-ClC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>             | 99(37% at 50 nM) |
| 30 | 2-NH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 99(31% at 50 nM) |
| 31 | 2-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | 99(31% at 50 nM) |



General structure of pyrrolyl benzohydrazide

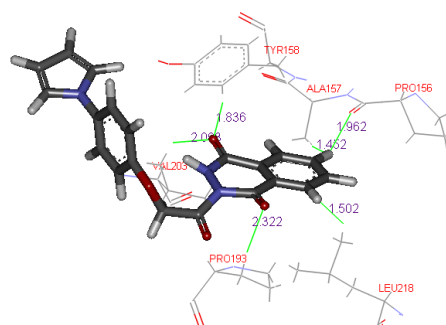
| Com. | R | %Inhibition of InhA at 50 $\mu$ M |
|------|---|-----------------------------------|
|------|---|-----------------------------------|

|    |                     |    |
|----|---------------------|----|
| 32 | H                   | 13 |
| 33 | 4-Br                | 38 |
| 34 | 4-NO <sub>2</sub>   | 22 |
| 35 | 4-Cl                | 36 |
| 36 | 4-F                 | 35 |
| 37 | 4-OH                | 29 |
| 38 | 4-OCH <sub>3</sub>  | 13 |
| 39 | 3- OCH <sub>3</sub> | 31 |
| 40 | 3- CH <sub>3</sub>  | 29 |
| 41 | 2- CH <sub>3</sub>  | 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.

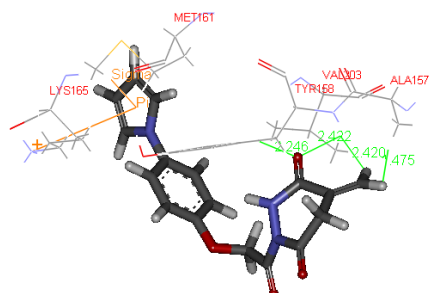


**Figure 1** binding interactions of compound 1.



### 3.2 Molecular docking analysis of compound 3 of pyrrolyl benzohydrazide derivative

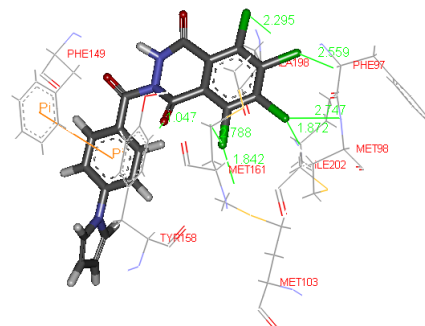
Compound 3, pyrrolyl benzohydrazide derivative in InhA binding site. The obtained results show that compound 3 formed Cation-Pi interactions between aromatic ring of compound 3 and hydrogen atom of Lys165 residue and sigma-Pi interaction between aromatics ring of ligand and nitrogen atom of Met161 residue (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

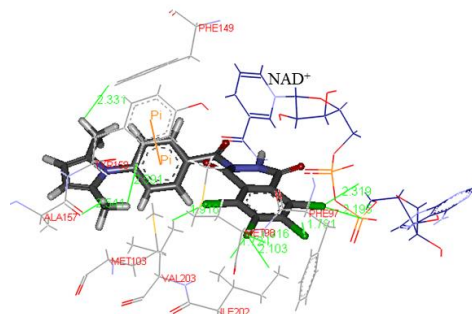
Compound 22 of pyrrolyl benzamide derivative have interactions in InhA binding site. For Compound 22 differ with Compound 25 at R1 and R2. The obtained results show that compound 22 formed Pi-Pi interactions between aromatic ring of compound 22 and aromatic ring of Phe149 Pi-Pi residue (Figure 3). Moreover, 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

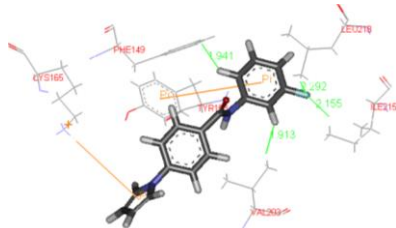
Compound 25, the highest active compound in pyrrolyl benzohydrazide derivative come from biological activities were selected to analyze the crucial interactions of pyrrolyl benzohydrazide derivative in InhA binding site. The obtained results show that compound 25 formed hydrogen bond interaction between hydroxyl groups of ligand with oxygen atom of nicotinamide ribose cofactor ( $\text{NAD}^+$ ). 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

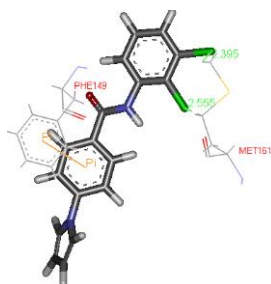
Compound 28 of pyrrolyl benzamide derivative have interactions in InhA binding site. The results show that compound 28 formed Pi-cation interactions between aromatic ring and nitrogen atom of Lys165 residue (**Figure 5**). Pi-Pi interactions between aromatic ring and aromatic ring of Tyr158 residue. 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.

## Interaction and structural requirement of 4-thiazolidinone (rhodanine) inhibitors as potential anti-tuberculosis agents: MD simulations

Thimpika Pornprom<sup>1</sup>, Bandit Khamsri<sup>1</sup>, Bongkochawan Pakamwong<sup>1</sup>,  
PaptawanThongdee<sup>1</sup>, Issaraporn Saenglam<sup>1</sup>, Naruedon Phusi<sup>1</sup>, Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>,  
Sornsawan Batthong<sup>1</sup>, Kampanart Chayajarus<sup>1</sup>, Kanchiyaphat Ariyachaokun<sup>2</sup>, Pharit  
Kamsri<sup>3</sup>, Auradee Punkvang<sup>3</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>, Khomson  
Suttisintong<sup>5</sup>, Prasat Kittakoop<sup>6</sup>, James Spencer<sup>7</sup>,  
Adrian Mulholland<sup>8</sup>, Pornpan Pungpo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>2</sup>Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>3</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>5</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

<sup>6</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>7</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom

<sup>8</sup>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<sup>+</sup> 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*<sup>1</sup>. Drugs such as isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol are currently used for the

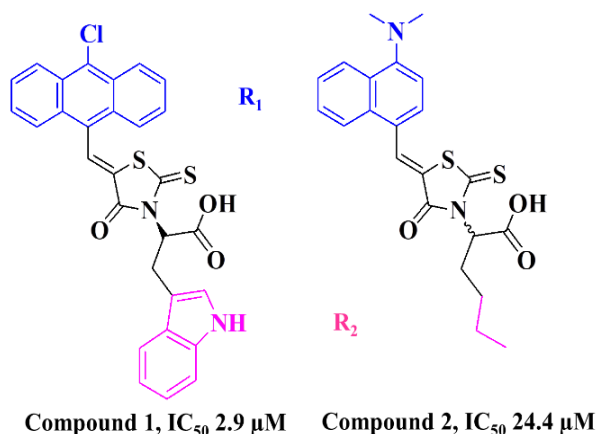
treatment of TB, although there are many *M. tuberculosis* having resistance to these drugs. In addition, multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB), extensive drug-resistance TB (XDR-TB), and co-infection between *M. tuberculosis* and HIV (TB/HIV) are major problems in the treatment of TB<sup>1</sup>. 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<sup>2</sup>. 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<sup>3</sup>. 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<sup>4</sup>. 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**<sup>4</sup>. The biological activities of these compounds were expressed in terms of *M. tuberculosis* InhA IC<sub>50</sub> in  $\mu\text{M}$  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<sub>50</sub> 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<sup>+</sup> were chosen to represent water for solvation and ions for neutralize system. To reduce the bad interactions of solvate water molecules and Na<sup>+</sup> 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<sup>2</sup>. 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<sup>2</sup> 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<sup>2</sup> 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)<sup>5-8</sup> and Normal-mode<sup>9</sup> 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

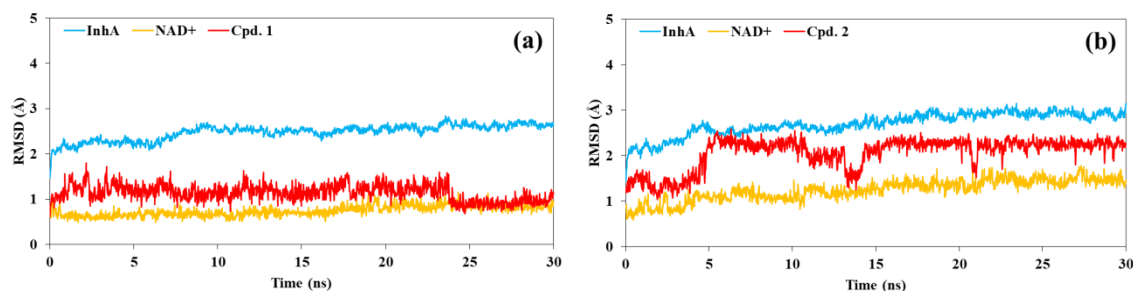
#### 3.1 Structural stability during MD simulations and binding energy calculations

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<sub>50</sub> 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<sup>+</sup> cofactor were observed, respectively. Moreover, the hydrogen atom of 1*H*-indole group of R<sub>2</sub> 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.

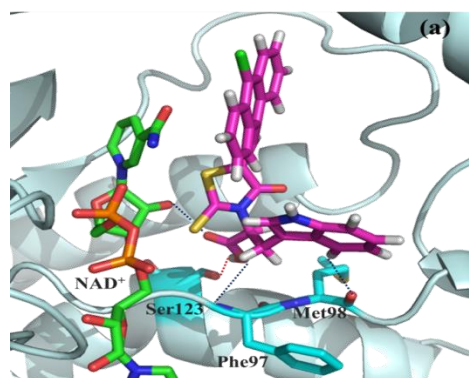
**Table 1.** The calculated binding energies (kcal/mol) of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives calculated by MM-PBSA method.

| Cpd. | Total energies |           |        |                | IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) |
|------|----------------|-----------|--------|----------------|--------------------------------|
|      | Complex        | Receptor  | Ligand | Binding energy |                                |
| 1    | -23255.73      | -23182.42 | -25.43 | -47.87         | 2.9                            |
| 2    | -23229.38      | -23124.44 | -61.81 | -43.12         | 24.4                           |

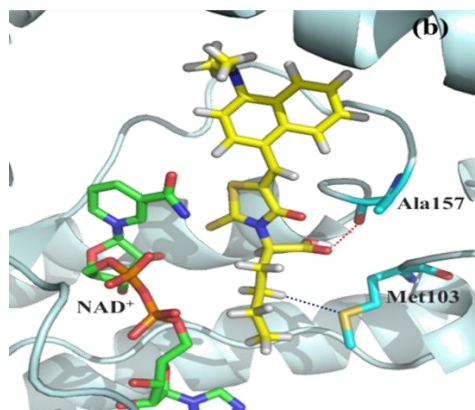
As compared to compound **1**, strong hydrogen bond interaction between hydrogen atom of carboxylic group of compound **2** with backbone of Ala157 (2.075 Å) were found. Hydrogen atom of propane in R<sub>2</sub> substituent has electrostatic interaction with Met103 residue in InhA binding pocket can 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<sub>2</sub> 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<sub>50</sub> 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<sup>+</sup> cofactor. Moreover, the R<sub>2</sub> 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 report, **2017**. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](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 pyrrolyl-1,3,4-thiadiazole inhibitors of InhA. *Bioorg. Chem.* **2015**, 159, 151-167.
4. Slepikas, L.; Chiriano, G.; Perozzo, R.; Tardy, S.; Kranjc, A.; Patthey-Vuadens, O.; Ouertatani-Sakouhi, H.; Kicka, S.; Harrison, C.F.; Scignari, 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

<sup>1</sup>THIMPIKA PORNPROM, <sup>2</sup>BANDIT KHAMSR, <sup>3</sup>BONGKOCHAWAN PAKAMWONG, <sup>4</sup>PAPTAWAN THONGDEE, <sup>5</sup>ISSARAPORN SAENGLAM, <sup>6</sup>NARUEDON PHUSI, <sup>7</sup>CHAYANIN HANWARINROJ, <sup>8</sup>PHARIT KAMSRI, <sup>9</sup>AURADEE PUNKVANG, <sup>10</sup>PATCHREENART SAPARPAKORN, <sup>11</sup>SUPA HANNONGBUA, <sup>12</sup>KHOMSON SUTTISINTONG, <sup>13</sup>PRASAT KITTA KOOP, <sup>14</sup>JAMES SPENCER, <sup>15</sup>ADRIAN MULHOLLAND, <sup>16</sup>PORNPANPUNGPO

<sup>1,2,3,4,5,6,7,16</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand

<sup>8,9</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhonphanom University, Nakhonphanom 48000, Thailand

<sup>10,11</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>12</sup>National Nanotechnology Center, Nstda, 111 Thailand Science Park, Klongluang, Pathumthani, Thailand

<sup>13</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>14</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, Bs8 1td, United Kingdom

<sup>15</sup>Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, Bs8 1ts, United Kingdom  
Email: <sup>16</sup>pornpan\_ubu@yahoo.com

**Abstract** - Mycobacterium tuberculosis InhA has been identified to be one of the potentially underexploited drug targets in 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<sup>+</sup> 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 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 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.

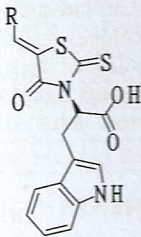
## II. DETAILS EXPERIMENTAL

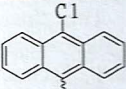
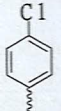
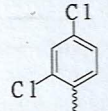
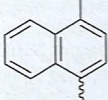
Four chemical structures and their experimental biological activities of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives were selected from the literature as presented in Table 1 [4]. The biological activities of these compounds were expressed in



terms of *M. tuberculosis* InhA  $IC_{50}$  in  $\mu M$  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  $\mu M$  values of 4-thiazolidinone (rhodanine) derivatives.



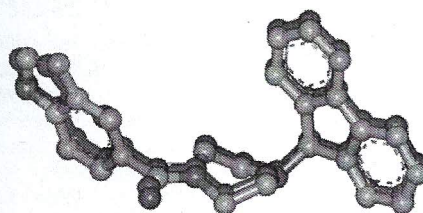
| Cpd. | R                                                                                   | $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1    |    | 2.90                  |
| 2    |  | 19.70                 |
| 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 InhA complexed with 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  $36 \times 36 \times 36 \text{ \AA}^3$  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

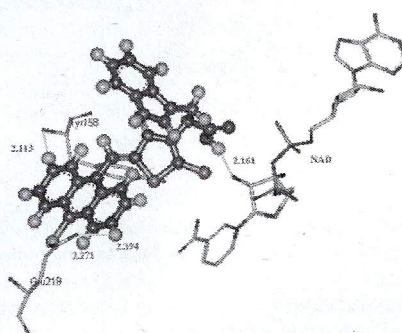
the default search algorithm parameters. The docking calculation was verified by the RMSD value between the docked and observed X-ray conformations in its pocket. The obtained results show that the molecular docking calculation was reliable to predict the binding mode and binding interactions with RMSD 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  $2.90 \mu M$ . 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  $19.70 \mu M$ ), compound 3 ( $IC_{50}$  of  $9.50 \mu M$ ) and compound 4 ( $IC_{50}$  of  $8.70 \mu M$ ) 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 2 interacted with NAD<sup>+</sup> cofactor via hydrogen bond. Hydrogen interactions of 1,3-dichlorobenzene R substituent of compound 3 at carboxylic group with Pro193 and indole ring with Ala157 were found. For compound 4, 1-methylnaphthalene R substituent formed hydrogen interaction with Pro156 and indole ring with NAD<sup>+</sup> cofactor. Additional hydrophilic interactions of 3 compounds with Met103, Ala157, Tyr158 and Met161 can be found were shown in Fig. 3.

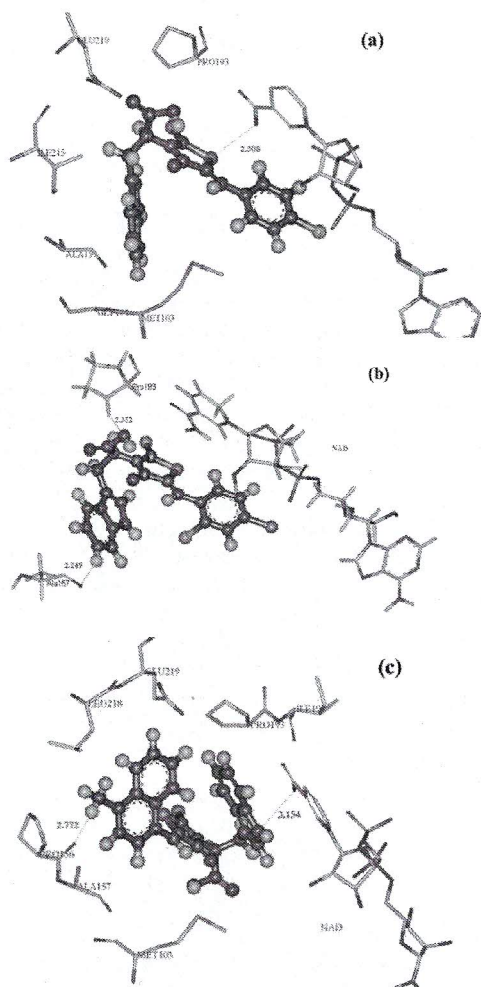


Fig. 3. The binding mode of (a) compound 2, (b) compound 3, and (c) compound 4 in the InhA binding pocket.

### 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 tuberculosis. Therefore, new design compounds should be contained the substituent that they can interacted with amino acid surrounding InhA binding pocket by 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 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.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Thailand Research Fund (RSA5980057) and the National Research Council of Thailand. The financial support from Young Scientist and Technologist program (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 and NECTEC are gratefully acknowledged for supporting this research.

## REFERENCES

- [1] World Health Organization, Global Tuberculosis Report, 2017. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](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 pyrrolyl-1,3,4-thiadiazole inhibitors of InhA" *Bioorganic Chemistry*, vol. 59, 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. Scignari, 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 Enoyl Reductase InhA", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 59, pp. 10917–10928, 2016.

\*\*\*

# การออกแบบสารยับยั้งโดยอาศัยข้อมูลทางโครงสร้างของสารต้านวัณโรคตัวใหม่กับเอนไซม์ Enoyl-ACP Reductase ของสารอนุพันธ์ 1-(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<sup>1</sup> นฤตล ภูศรี<sup>1</sup> ชญาณิลห์ หาญวสินโรจน์<sup>1</sup> กัมปนาท ฉายจรัส<sup>1</sup> พฤทธิ์ คำศรี<sup>2</sup> อรดี พันแก้ว<sup>2</sup> ณรงค์พล แก้วจังหวัด<sup>3</sup> ศตวรรษ เตือนสว่าง<sup>3</sup> คมสันต์ สุทธิสินทอง<sup>3</sup> พัชรินา ทพยอักษรณ<sup>4</sup> สุภา ทารหนองบัว<sup>4</sup> และ พรพรรณ พิงโพธิ์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>2</sup> ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

<sup>3</sup> ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

<sup>4</sup> ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

\* E-mail : pompan\_ubu@yahoo.com

### บทคัดย่อ

เอนไซม์ Enoyl-ACP Reductase (InhA) ของเชื้อไมโครแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการพัฒนาสารรักษาวัณโรค ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิงมาทำการศึกษานันทริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นระหว่างสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol กับโปรงเอนไซม์ InhA ที่เกิดขึ้น จากผลการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิงแสดงถึงความสามารถในการจำลองรูปแบบการจับตัวกันของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่ให้ค่า RMSD เท่ากับ 0.610 อังสตรอม ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิงที่ใช้มีความน่าเชื่อถือในการทำนายตำแหน่งการจัดวางตัวของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ในโปรงเอนไซม์ InhA เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ ได้แก่ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่หมู่แทนที่ตำแหน่ง R กับกรดอะมิโน Pro156, Tyr158 และ Val203 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน 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 ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิง

### 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

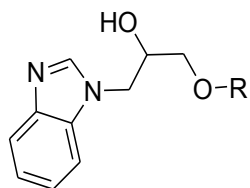
## บทนำ

โรควัณโรคเป็นโรคติดต่อที่มีสาเหตุหลักจากเชื้อแบคทีเรียไมโครแบคทีเรียริเยียม ทูเบอร์คูโลซิสและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนทั่วโลก จากสถิติในปี 2016 ขององค์การอนามัยโลก พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 2 ล้านคน ต่อปีและมีผู้ป่วยเสียชีวิตปีละประมาณ 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] โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของกรดไขมันในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรคอย่างใดก็ตามการใช้ไอโซไนอาซิดยังมีปัญหาสำคัญคือการเกิดกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA พบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการรบกวนพันธะไฮโดรเจนที่ช่วยการจับของ NADH มีเสถียรภาพ และจากการศึกษาในเวลาต่อมาจึงพบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ KatG ด้วย [Dias, M. V.,2007] จึงทำให้มีหลายกลุ่มงานวิจัยพยายามที่จะพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ โดยไม่ต้องการกระบวนการกระตุ้นจากเอนไซม์ KatG [Tamara, D., et al.,2010] เพื่อใช้ เป็นยาในการรักษาวัณโรคแทนที่ด้วยยาหลักไอโซไนอาซิด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการนำเอาระเบียบวิธีทางด้านการจำลองแบบโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการศึกษา ออกแบบและค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่โดยสนใจที่จะทำการพัฒนาสารอนุพันธ์ในกลุ่ม 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรควัณโรคได้สูงขึ้น โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิง (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 และเชื้อแบคทีเรียไมโครแบคทีเรียริเยียม 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 จากนั้นทำการปรับโครงสร้างให้เสถียรที่สุดด้วยระเบียบวิธีวิธีการคำนวณเคมีควอนตัม ab-initio (M062X/6-31G\*) โดยใช้ โปรแกรม Gaussius 09 ทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.02 ศึกษาารูปแบบการจับตัวกันของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ภายในโพรงการจับเอนไซม์ InhA (PDB Code: 2X23) ด้วยวิธีการคำนวณการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิงวิเคราะห์ผลการศึกษาและสรุปผลการศึกษา

ตารางที่ 1 โครงสร้างและค่าพลังงานอิสระ (docking score) ของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol

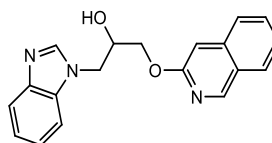


โครงสร้างทั่วไปของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol

| 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

ผลจากการเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้งของสารยับยั้งเชื้อไวรัสโคโรนา ในโปรแกรมการจับของเอนไซม์ InhA พบว่าให้ค่า RMSD เท่ากับ 0.61 อังสตรอม ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้งที่มีความน่าเชื่อถือในการทำนายตำแหน่งการจัดวางตัวของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ในโปรแกรม InhA

### 2) วิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ในโปรแกรม InhA

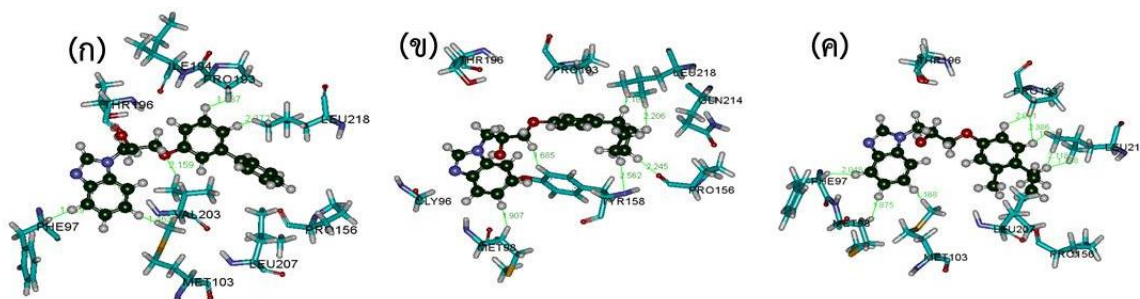
#### 2.1) สารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มี

ค่าพลังงานอิสระ (docking score) สูง

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด คือ สารหมายเลข 3, 8 และ 9 ซึ่งมีค่าพลังงานอิสระ (docking score) คือ -12.09, -11.85 และ -11.83 มีตำแหน่งในการวางตัว ดังแสดงในรูปที่ 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, Leu207 และ 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 ในโปรแกรมการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อไวรัสโคโรนาที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง

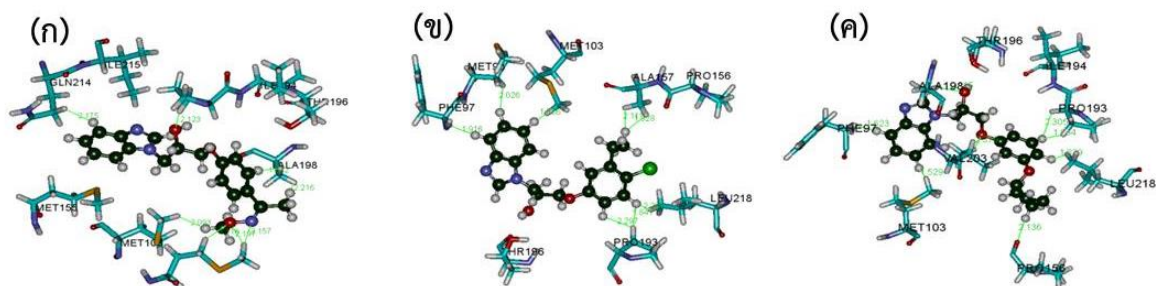
## 2.2) สารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีค่าพลังงานอิสระ (docking score) ปานกลาง

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 และ สารหมายเลข 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 ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลคิวลาร์ด็อกกิง

## 2.3) สารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีค่าพลังงานอิสระ (docking score) ต่ำ

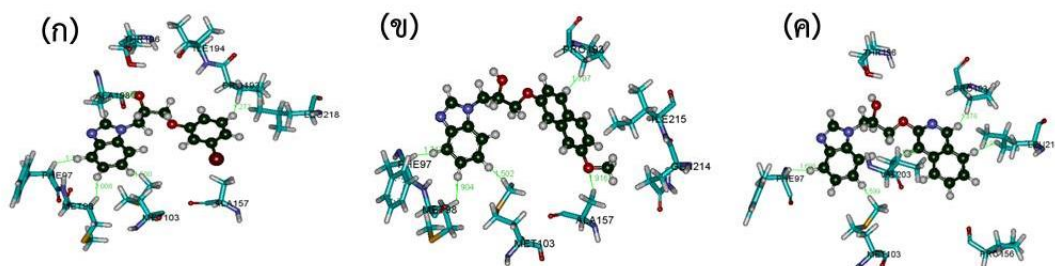
เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำคือ สารหมายเลข 60, 63 และ 71 ซึ่งมีค่าพลังงานอิสระ (docking score) เท่ากับ -11.14, -11.12 และ -11.02 ตามลำดับ มีตำแหน่งในการวางตัว ดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญดังนี้

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 ในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง

#### 2.4) ความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol

จากผลการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งและการศึกษาอันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ 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 และต้องเป็นหมู่ที่มีความเกะกะค่อนข้างใหญ่ ซึ่งหมู่แทนที่ดังกล่าวอาจเป็นหมู่แทนที่ที่ทำให้เกิดอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นมีความแข็งแรงมากขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้ดีขึ้น

#### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการออกแบบโมเลกุลโดยใช้การคำนวณของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณ โมเลกุลาร์ด็อกกิ้งจำนวน 9 โครงสร้าง ด้วยโปรแกรม Autodock 4.2 มีความสามารถในการทำนายรูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 1-(benzimidazol-1-yl)-3-(2,3-dihydro-1-h-inden-5-yloxy) propan-2-ol ในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA โดยให้ค่า RMSD เท่ากับ 0.61 อังสตรอมซึ่งทำให้สามารถยืนยันได้ว่าระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งที่ใช้มีความน่าเชื่อถือในการอันตรกิริยาที่เฉพาะเจาะจง 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 ผลิตนักเทคโนโลยี (YSTP) ของนายบุญรัตน์ ทาร์ตัน (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.



การค้นหายับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่เพื่อใช้เป็นสารต้านวัณโรคบนพื้นฐานโครงสร้าง  
ของสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีน: การคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้าง  
Identifications of New PknG Inhibitors as Anti-tuberculosis Agents Based on  
2-aminopyrimidine Derivatives: Structure Based Virtual Screening

พลฤทธิ์ คำศรี<sup>1</sup> อรดี พันธุ์กว้าง<sup>1</sup> พัชรินารถ ทรัพย์อาภากร<sup>2</sup> สุภา หารหนองบัว<sup>2</sup> Zhaoqiang Chen<sup>3</sup> Weiliang Zhu<sup>3</sup> สัณญา สุรัมย์<sup>4</sup>  
ประสาธ กิตตะคุปต์<sup>4</sup> คมสันต์ สุทธิสินทอง<sup>5</sup> นิธิมา สุทธิพันธุ์<sup>6</sup> กัมปนาท ฉายจรัส<sup>7</sup> อินทอร อัมปะมะโต<sup>7</sup> และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์<sup>7\*</sup>

<sup>1</sup> สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม 214 ถนนนิตโย อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม 48000

<sup>2</sup> ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวง ลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

<sup>3</sup> Drug Discovery and Design Center, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences,  
555 Zuchongzhi Rd, Shanghai 201203, China

<sup>4</sup> สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ถนนวาทิต-รังสิต เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210

<sup>5</sup> ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)  
111 ถนนพหลโยธิน, ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี, 12120

<sup>6</sup> คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 85 ถนนสกลมารค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

<sup>7</sup> ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 85 ถนนสกลมารค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

\* E-mail : pornpan\_ubu@yahoo.com

### บทคัดย่อ

การพัฒนาสารต้านวัณโรคยังมีความจำเป็นเร่งด่วนเนื่องจากปัญหาการดื้อยาของเชื้อวัณโรค ยาตัวใหม่ที่ทำให้ระยะเวลาในการรักษาสั้นลงเป็นสิ่งที่ต้องการในการรักษา ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้างโดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลมาใช้ในการคัดเลือกสารยับยั้งเอนไซม์ PknG ตัวใหม่โดยมีโครงสร้างเป็นสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีน จากการศึกษาได้สารทั้งหมด 23 โครงสร้างแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มมีค่าพลังงานอิสระจากการคำนวณโมเลกุลมาใช้ในการจับที่ต่ำกว่า -8.00 kcal/mol อันตรกิริยาที่สำคัญคือพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นกับกรดอะมิโน กลูตามิก 233 และกรดอะมิโนวาเลีน 235 ผลที่ได้จากการศึกษานี้นำไปสู่การพัฒนาเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ PknG เพื่อเป็นสารต้านวัณโรค

**คำสำคัญ :** สารต้านวัณโรค สารยับยั้งเอนไซม์ PknG การคัดสรรเสมือนจริง 2-อะมิโนไพริมิดีน

### Abstract

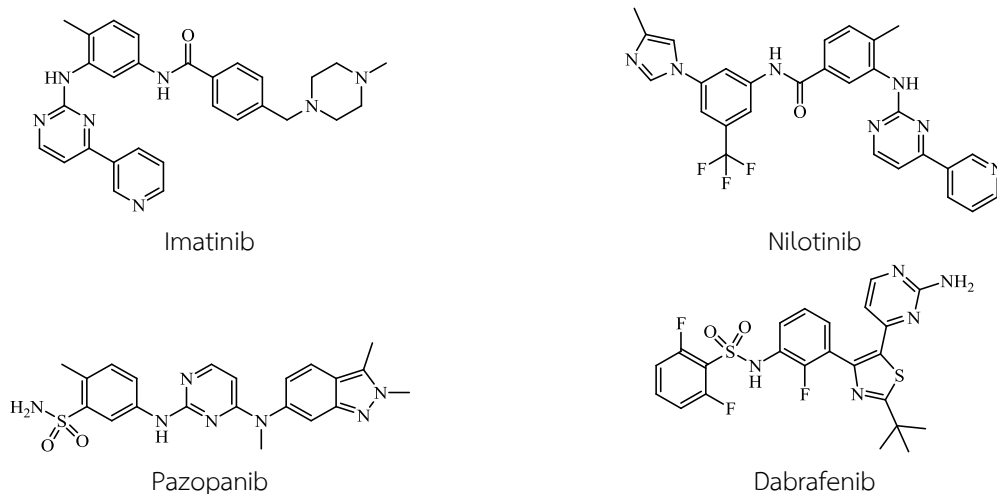
Development of new anti-tuberculosis agents is urgently required due to drug resistant tuberculosis problems. New drugs that effected to short duration of treatment timeline are required. This work, structure based drug design using molecular docking calculations was applied to screen new PknG inhibitors 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

วัณโรคเป็นโรคที่มีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อไมโครแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาหลักในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาและมีรายได้ต่ำ ในปี 2015 มีจำนวนของผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ทั้งหมด 10.4 ล้านคนและมีผู้ป่วยที่เสียชีวิตทั้งหมด 1.4 ล้านคน (WHO, 2016) โดยสำหรับการติดต่อของวัณโรคนั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณความหนาแน่นของประชากร สำหรับยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามประสิทธิภาพ ได้แก่ยาในกลุ่มของ First-line และยาในกลุ่ม second และ third-line ซึ่งเป็นยาที่มีการใช้ในการรักษามากกว่า 40 ปี (Chetty et al., 2017) แต่อย่างไรก็ตามการดื้อยาในการรักษาวัณโรคจึงเป็นปัญหาหลักในการรักษาในปัจจุบัน รวมทั้งการเกิดปัญหาร่วมกันกับโรคเอดส์ ซึ่งปัญหาเหล่านี้ทำให้ตัวยารักษาวัณโรคในปัจจุบันไม่สามารถใช้ในการรักษาวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการพัฒนาตัวยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงและสามารถแก้ไขปัญหาดื้อยาได้จึงเป็นที่ต้องการในการรักษาวัณโรค โดยตัวยาตัวใหม่ที่ใช้ในการรักษาจะต้องสามารถที่จะรักษาวัณโรคที่มีการดื้อยาได้ มีระยะเวลาที่ใช้ในการรักษาสั้นลง ลดปริมาณและความถี่ในการใช้ยาในการรักษา อันตรกิริยาระหว่างยา-ยาที่ลดลงและมีราคาถูกลง (Shehzad et al., 2013)

เอนไซม์ไคเนส (Kinase enzyme) เป็นอีกกลุ่มเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายในการพัฒนายารักษาโรคและประสบความสำเร็จในการใช้ในการรักษาโรค โดยเฉพาะมะเร็งและอีกหลายๆโรค (Kana et al., 2014; Klebl and Muller, 2005; Schreiber, Res and Matter, 2009) จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างเอนไซม์ไคเนสที่พบในเชื้อวัณโรคมีลักษณะที่เฉพาะ จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการพัฒนาสารยับยั้งและยาในการรักษาวัณโรคโดยที่มีความจำเพาะคือทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการรักษาสั้นลง 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) จากการศึกษาพบว่าการยับยั้งเอนไซม์ไคเนสในกลุ่มของอะมิโนไพริมิดีนถูกพัฒนาเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไคเนสเป็นจำนวนมากและเป็นตัวยาที่ใช้ในการรักษาโรคต่างๆดังรูปที่ 1 ดังนั้นการพัฒนาสารในกลุ่มของอะมิโนไพริมิดีนจึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ PknG และนอกจากนี้งานวิจัยของ Anand ได้พัฒนาโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีน ซึ่งมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง ดังนั้นแล้วในงานวิจัยนี้จึงสนใจในการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ PknG กลุ่มใหม่โดยมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น 2-อะมิโนไพริมิดีน ซึ่งผลจากการศึกษาได้สารโครงสร้างใหม่ที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงและพัฒนาเป็นยารักษาวัณโรคดื้อยาในอนาคต



รูปที่ 1 ตัวอย่างสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีน ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไคเนสที่เป็นยาในปัจจุบัน

## วิธีการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการคัดสรรเสมือนจริงเชิงโครงสร้างโดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้งโดยมีขั้นตอนของการคัดสรรดังนี้

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 สำหรับในงานวิจัยนี้การบ่งชี้บริเวณของโปรแกรมจับนั้นได้อาศัยข้อมูลการจับของสารยับยั้งเอนไซม์เป้าหมายจากโครงสร้างเอกซเรย์ 2PZI ซึ่งเป็นโครงสร้างของเอนไซม์ PknG ที่จับกับสารยับยั้ง AX20017 ในการบ่งชี้บริเวณการออกฤทธิ์ในการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ PknG สำหรับการศึกษาการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้งและการคัดสรรเสมือนจริง

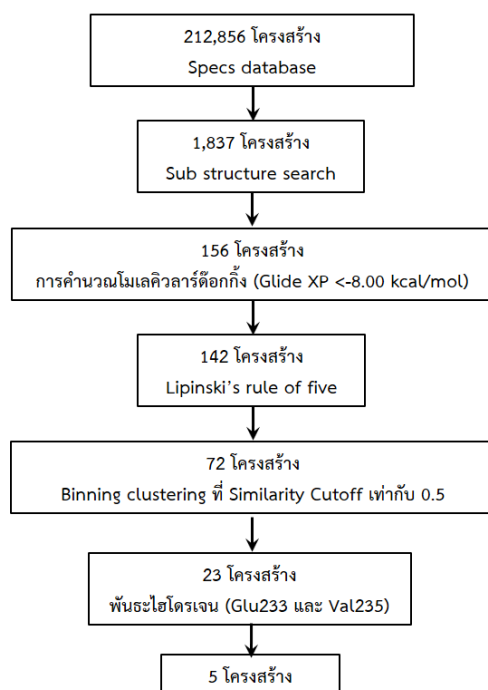
3. การคัดสรรเสมือนจริงโดยใช้การคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้งและการคำนวณค่าพลังงานในการจับโดยมีขั้นตอนแสดงดังรูปที่ 2 โดยเริ่มจากการนำเอาโครงสร้างทั้งหมดที่ได้จากระเบียบวิธี Sub structure search และเตรียมด้วยวิธี Ligand preparation ไปคำนวณการวางตัวและพลังงานในการจับโดยใช้โปรแกรม Glide โดยใช้การคำนวณพลังงานในการจับแบบ Glide XP

4. หลังจากการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้งเลือกโครงสร้างที่มีค่าพลังงานน้อยกว่า  $-8.00$  kcal/mol มาใช้ในการพิจารณาโครงสร้างโดยอาศัย Lipinski's rule of five การแบ่งกลุ่มโครงสร้างโดยใช้ Binning clustering ที่ Similarity Cutoff เท่ากับ 0.5 และการพิจารณาอันตรกิริยาที่สำคัญในโปรแกรมจับตามลำดับ

## ผลการวิจัย

### 1. การคัดสรรเสมือนจริง

เพื่อเป็นการยืนยันการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไคเนส (kinase) ของสารในกลุ่มของสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีนเพื่อพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PknG และสารต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพสูง โครงสร้างของ 2-อะมิโนไพริมิดีนถูกใช้เป็นต้นแบบในการค้นหาที่มีการใช้ในการรักษาโรคในปัจจุบันจากฐานข้อมูล Drugbank ซึ่งพบว่ามีตัวยาทั้งหมด 8 ตัวที่เป็นยารักษาโรคและมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไคเนส 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-อะมิโนไพริมิดีนทั้งหมดในโปรแกรมจับของเอนไซม์ PknG โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง (Glide XP) โดยพบว่ามีสารทั้งหมด 156 โครงสร้างที่มีพลังงานในการจับจากการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งที่ต่ำกว่า -8.00 kcal/mol และเพื่อให้ได้โครงสร้างสารที่เหมาะสมสำหรับการออกฤทธิ์เป็นยาและพัฒนาโครงสร้างสารยับยั้งให้เป็นยาได้ Lipinski's rule of five จึงถูกใช้ในการพิจารณาโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีนพบว่ามีสารทั้งหมด 142 โครงสร้างมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการออกฤทธิ์เป็นยา หลังจากนั้นใช้ Binning clustering ที่ Similarity Cutoff เท่ากับ 0.5 และเลือกสารยับยั้งที่มีค่าพลังงานในการจับที่ต่ำที่สุดในแต่ละกลุ่มได้โครงสร้างสารแบ่งตามกลุ่มทั้งหมด 78 โครงสร้างและเมื่อพิจารณาถึงอันตรกิริยาที่สำคัญภายในโปรแกรมจับของเอนไซม์ PknG กับสารยับยั้ง Tetrahydrobenzothiothiophene (AX20017) และวงอะดีนีนของ ATP ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์ PknG ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาเลอีน 235 (Val235) โดยพบโครงสร้างที่มีพันธะไฮโดรเจนทั้ง 2 ตำแหน่ง จำนวน 23 โครงสร้างดังตารางที่ 1 ซึ่งสารเหล่านี้มีความเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PknG และสารต้านโรควัณโรคต่อไป

ตารางที่ 1 สารอนุพันธ์ 2-อะมิโนไพริมิดีนชนิดใหม่ที่น่าสนใจจากระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริง

| 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 โครงสร้างที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ PknG ที่สูงแบ่งตามลักษณะโครงสร้างพื้นฐานโดยอาศัยโครงสร้างที่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาเลอีน 235 (Val235) ได้ทั้งหมด 5 กลุ่มดังนี้ 2-อะมิโนไพริมิดีน, 2,4-ไดอะมิโนไพริมิดีน, 3-อะมิโนไพราโซล, 4-อะมิโนไพริมิดีน และ 3-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 ของกรดอะมิโนวาเลอีน 235 (Val235) และหมู่อะมิโนของ 2-อะมิโนไพริมิดีนเกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิล (O=C backbone) กรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) สารหมายเลข AJ-292/14921003 เป็นสารที่มีค่าพลังงานในการจับต่ำที่สุดในกลุ่มนอกจากจะเกิดพันธะไฮโดรเจนใน 2 ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่กล่าวมาแล้ว ยังพบว่ามีอันตรกิริยาที่สำคัญคือ

พันธะฮาโลเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่คลอโร (Cl) กับหมู่  $\text{NH}_3^+$  ของกรดอะมิโนไลซีน 241 (Lys241) นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นระหว่างสารยับยั้ง AJ-292/14921003 กับกรดอะมิโนไอโซลิวซีน 157 (Ile157) กรดอะมิโนอะลานีน 158 (Ala158) กรดอะมิโนไอโซลิวซีน 165 (Ile165) กรดอะมิโนวาลีน 179 (Val179) กรดอะมิโนเมไทโอนีน 232 (Met232) กรดอะมิโนไทโรซีน 234 (Tyr234) กรดอะมิโนกลูตามิก 280 (Glu280) กรดอะมิโนเมไทโอนีน 283 (Met283) และกรดอะมิโนไอโซลิวซีน 292 (Ile292)

## 2.2 การวางตัวและอันตรกิริยาของ 2,4-ไดอะมิโนไพริมิดีน

2,4-ไดอะมิโนไพริมิดีนเป็นกลุ่มของสารอนุพันธ์ที่พบได้มากเป็นอันดับที่ 2 รองจากสารในกลุ่มของ 2-อะมิโนไพริมิดีน ซึ่งพบโครงสร้างทั้งหมด 4 โครงสร้างโดยอันตรกิริยาที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คือพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 หรือ 3 ในวงไพริมิดีนเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH backbone ของกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) และหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 2 และ 4 และเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกับอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิล ( $\text{O}=\text{C}$  backbone) กรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) โดยสารหมายเลข AK-105/40693577 เป็นสารที่มีค่าพลังงานในการจับต่ำที่สุดในกลุ่ม นอกจากนี้จะเกิดพันธะไฮโดรเจน 3 ตำแหน่งกับกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) ยังพบพันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่างหมู่คาร์บอนิลของสารยับยั้งกับอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิล ( $\text{O}=\text{C}$  backbone) กรดอะมิโนกลูตามิก 280 (Glu280) และพันธะแคทไอออน-ไพเราะหว่างวงพีนัลกับกรดอะมิโนไลซีน 241 (Lys241) นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นกับกรดอะมิโนที่อยู่ในโพรงการจับของสารยับยั้ง

## 2.3 การวางตัวและอันตรกิริยาของ 3-อะมิโนไพราโซล

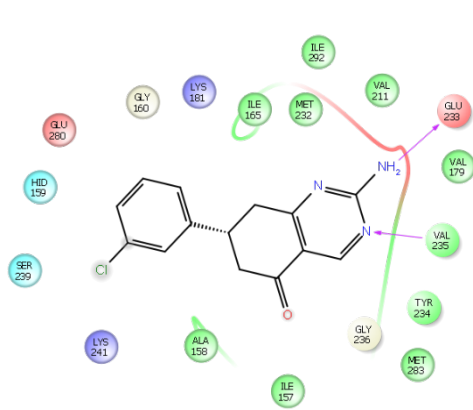
3-อะมิโนไพราโซลที่พบว่ามีความสามารถในการจับที่ต่ำมี 1 โครงสร้างคือสารหมายเลข AO-555/14497001 ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) ดังนี้ หมู่ NH และอะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 2 ของวงไพราโซลเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH และคาร์บอนิลของกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) ส่วนหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 3 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นระหว่างสารยับยั้งตรงบริเวณของ 4,6-ไดเมทอกซีไพริมิดีน กับกรดอะมิโนไอโซลิวซีน 157 (Ile157) กรดอะมิโนอะลานีน 158 (Ala158) กรดอะมิโนเมไทโอนีน 283 (Met283) และกรดอะมิโนไอโซลิวซีน 292 (Ile292)

## 2.4 การวางตัวและอันตรกิริยาของ 4-อะมิโนไพริมิดีน

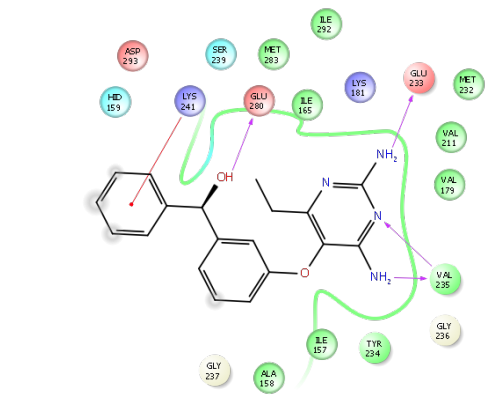
สารอนุพันธ์ในกลุ่มของ 4-อะมิโนไพริมิดีน ที่มีค่าพลังงานในการจับที่ได้จากการศึกษานี้มี 1 โครงสร้างคือ AO-476/43362695 ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) และกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) ดังนี้ อะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 3 ของวงไพริมิดีนเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH และคาร์บอนิลของกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) และหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 4 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นระหว่างวงไพโรลิดีนกับกรดอะมิโนอะลานีน 158 (Ala158)

## 2.5 การวางตัวและอันตรกิริยาของ 3-อะมิโน-[1,2,4]-ไตรเอโซล-[1,5-a]-ไพริมิดีน

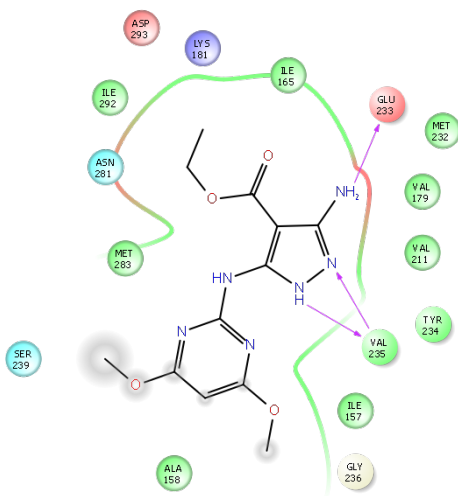
3-อะมิโน-[1,2,4]-ไตรเอโซล-[1,5-a]-ไพริมิดีนซึ่งพบได้ 1 โครงสร้างที่มีค่าพลังงานในการจับที่ต่ำคือ AK-968/11781368 โดยอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นคือ อะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 4 ของวงไตรเอโซลเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH และคาร์บอนิลของกรดอะมิโนวาลีน 235 (Val235) และหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 3 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนกลูตามิก 233 (Glu233) นอกจากนี้แล้วยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกระหว่างกรดอะมิโนไอโซลิวซีน 157 (Ile157) กรดอะมิโนอะลานีน 158 (Ala158) และกรดอะมิโนเมไทโอนีน 283 (Met283)



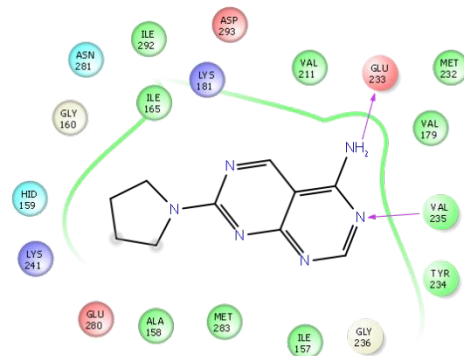
2-อะมิโนไพริมิดีน (AJ-292/14921003)  
-9.58 kcal/mol



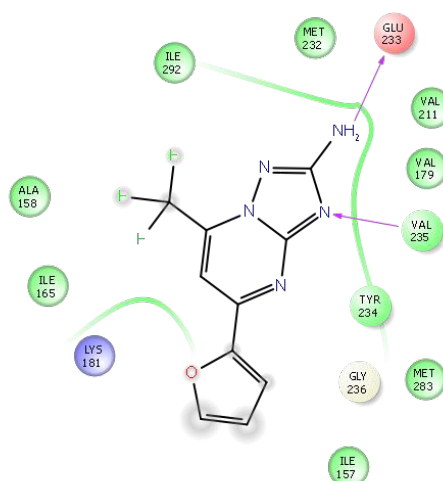
2,4-ไดอะมิโนไพริมิดีน (AK-105/40693577)  
-9.15 kcal/mol



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 ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะโครงสร้างทั่วไปแล้วสารที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 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 (Edinb)*, 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., Wączek, 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

นฤตล ภูศรี<sup>1</sup> จิมพิกา พรพรม<sup>1</sup> ชญาณิลห์ หาญวสินโรจน์<sup>1</sup> บัณฑิต คำศรี<sup>1</sup> บงกชวรรณ พาคำวงศ์<sup>1</sup>  
ภาพตะวัน ทองดี<sup>1</sup> กัมปนาท ฉายจรัส<sup>1</sup> นิธิมา สุทธิพันธ์<sup>2</sup> พุทธิ คำศรี<sup>3</sup> อรดี พันธุ์กว้าง<sup>3</sup> พชรินทร์ ทรัพย์อภรณ์<sup>4</sup>  
สุภา ทารหนองบัว<sup>4</sup> พงนัย ศรีมานิช<sup>5</sup> คมสันต์ สุทธิสินทอง<sup>6</sup> และ พรพรม พิงโพธิ์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>2</sup> คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>3</sup> สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

<sup>4</sup> ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<sup>5</sup> คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

<sup>6</sup> ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

\* E-mail : pornpan\_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

#### บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาระเบียบวิธีการทางด้านการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาและปรับเปลี่ยนสารยับยั้งของโมเลกุลเป้าหมายชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในการยับยั้ง เอนไซม์อีโนลเอซีพีรีดักเตส หรือ เอนไซม์ InhA ของเชื้อ *ไมโครแบคทีเรีย ทูเบอร์คูโลซิส* ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายในการออกฤทธิ์ยับยั้งของตัวยาหลักในการรักษาโรควัณโรคอย่างยาไอโซไนอาซิด ซึ่งการดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องเนื่องจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA ในการพัฒนายาต้านโรควัณโรคซึ่งสารยับยั้งโรควัณโรคที่ถูกนำมาทำการศึกษาในการพัฒนาสารยับยั้งเชื้อโรควัณโรคคือ สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ของเชื้อ *ไมโครแบคทีเรีย ทูเบอร์คูโลซิส* ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลที่ด็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติถูกประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาข้อมูลที่สำคัญของตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ทำให้ทราบถึงรูปแบบการวางตัวในโพรงการจับของตัวยับยั้งอันตรกิริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นในโพรงการจับและความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA ซึ่งเป็นแนวทางในการออกแบบตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA มีศักยภาพสูงขึ้น

**คำสำคัญ** : สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide การคำนวณโมเลกุลที่ด็อกกิ้ง 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 (3D-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

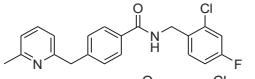
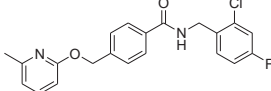
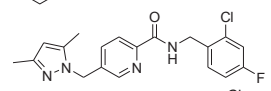
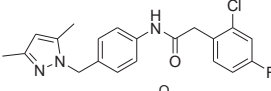
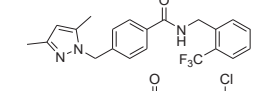
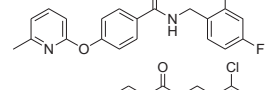
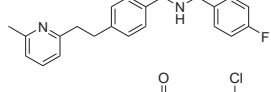
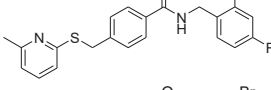
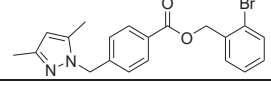
โรควัณโรคเป็นโรคติดต่อที่มีสาเหตุหลักมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* และ เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนทั่วโลก ปัจจุบันสถานการณ์ในประเทศไทยองค์การอนามัยโลกได้จัดอันดับ ให้ไทยอยู่ในกลุ่มประเทศที่ยังไม่สามารถควบคุมวัณโรคได้ (World Health Organization, [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)) การรักษาวัณโรคในปัจจุบันต้องใช้ยาในการรักษาด้วยกันอย่างน้อย 2 ชนิดขึ้นไป โดยมีไอโซไนอาซิด (Isoniazid หรือ INH) เป็นยาหลัก 1 ชนิดแล้วใช้ยาตัวอื่นๆ ร่วมด้วย (Graham, A. W. et al., 2005) เอนไซม์ Enoyl-ACP reductase (InhA) เป็นเอนไซม์เป้าหมายในการออกฤทธิ์ของ ยาไอโซไนอาซิด ซึ่งเป็นตัวยาสำคัญในการรักษาวัณโรค (Rozwarski, D. A. et al., 1998) โดยทำหน้าที่เร่ง ปฏิกิริยารีดักชันของสายโซ่กรดไขมันใน FAS II pathway ในกระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรค อย่างไรก็ตามการใช้ไอโซไนอาซิดยังมีปัญหาสำคัญคือการเกิดกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA พบว่าการดื้อยาของ ไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการรบกวนพันธะไฮโดรเจนที่ช่วยการจับของ Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) มีเสถียรภาพและจากการศึกษาในเวลาต่อมาจึงพบว่าการดื้อยาของไอโซไนอาซิดเกี่ยวข้อง กับการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ catalase-peroxidase (KatG) ด้วย (Rozwarski, D. A. et al., 1999) จึงทำให้ มีหลายกลุ่มงานวิจัยพยายามที่จะพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่โดยไม่ต้องการกระบวนการกระตุ้นจาก เอนไซม์ KatG (Frisch, M. J. et al., 2009) จากข้อมูลที่ได้เหล่านี้ทำให้เข้าถึงกลไกการดื้อยาซึ่งจะมีประโยชน์ต่อ การออกแบบตัวยาที่มีศักยภาพสูงในการรักษาโรควัณโรคเพื่อพัฒนาตัวยับยั้งให้มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะ ต่อเอนไซม์ InhA ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการนำเอาระเบียบวิธีทางด้านการจำลองแบบโมเลกุลมา ประยุกต์ใช้ในการศึกษาออกแบบและค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่โดยสนใจที่จะทำการพัฒนาสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรควัณโรคได้สูงขึ้น โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณ โมเลกุลาร์ดอกกิ้ง การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพการ ยับยั้งซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงรูปแบบการวางตัวและอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่เกิดขึ้นในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA โดยผู้วิจัยคาดหวังว่างานวิจัยนี้จะทำให้ได้สารยับยั้งตัวใหม่ที่มี ประสิทธิภาพที่ดีขึ้นเพื่อใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* นอกจากนี้ ยังทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญทางด้านโครงสร้าง อันตรกิริยาที่สำคัญซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการออกแบบและพัฒนาสาร ยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง

## วิธีการวิจัย

รวบรวมข้อมูลทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ดังแสดงดังตารางที่ 1 จากนั้น ทำการปรับโครงสร้างให้เสถียรด้วยระเบียบวิธีการคำนวณเคมีควอนตัม *ab initio* (M062X/6-31G\*) โดยใช้ โปรแกรมGaussian 09 (Frisch, M. J. et al., 2009) ทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.2 (Morris, G. M. et al., 2009) ศึกษารูปแบบการจับตัวกันของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ภายในโพรงการจับ เอนไซม์ InhA (PDB Code: 4QXM) (Guardia, A. et al., 2016) ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง ศึกษาสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์เพื่ออธิบายและทำนายกระบวนการสำคัญทางชีวเคมีในธรรมชาติ ทำการ คำนวณค่าพลังงานการจับอิสระของสารอนุพันธ์ 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                                                                           | $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 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 ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิ่ง

#### 1.1) ผลการตรวจสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.2

ผลจากการเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม พบว่าในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคให้ค่า RMSD เท่ากับ 0.50 อังสตรอม จากการซ้อนทับกันของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ระหว่างโครงสร้างผลึกทางเอ็กซ์เรย์กับโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรค พบว่าทั้งสองโครงสร้างมีตำแหน่งการวางตัวที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 1



**รูปที่ 1** การซ้อนทับกันของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ระหว่างลิแกนด์ผลึกทางเอ็กซ์เรย์ (สีเขียว) และโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณ (สีแดง) ของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ชนิดดั้งเดิม

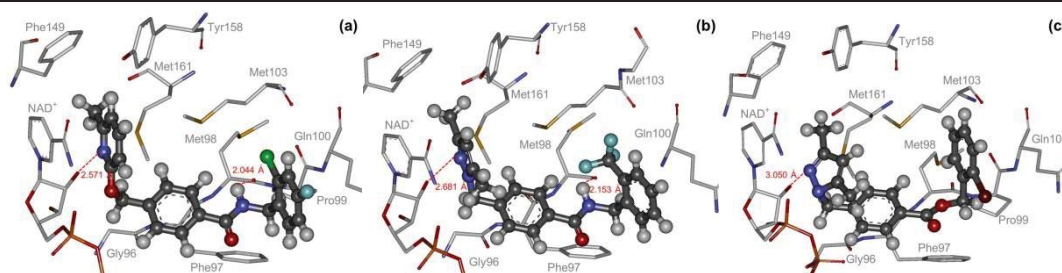
## 1.2) วิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในโพรงเอนไซม์

### InhA

สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA สูงที่สุด เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดคือ **สารหมายเลข 19** มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.02 \mu M$  มีรูปแบบการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 2 (a) พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 มีระยะห่าง  $2.044$  อังสตรอม และอะตอมไนโตรเจนของวงไพริดีนกับหมู่ไฮดรอกซิลของโคแฟกเตอร์  $NAD^+$  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  $1.00 \mu M$  มีรูปแบบการวางตัว ดังแสดงในรูปที่ 2 (b) พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมของออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 โดยมีระยะห่าง  $2.153$  อังสตรอม และอะตอมไนโตรเจนของวง 3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl กับหมู่ไฮดรอกซิลของโคแฟกเตอร์  $NAD^+$  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  $6.10 \mu M$  มีรูปแบบการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 2 (c) พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไนโตรเจนของวง 3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl กับหมู่ไฮดรอกซิลของโคแฟกเตอร์  $NAD^+$  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



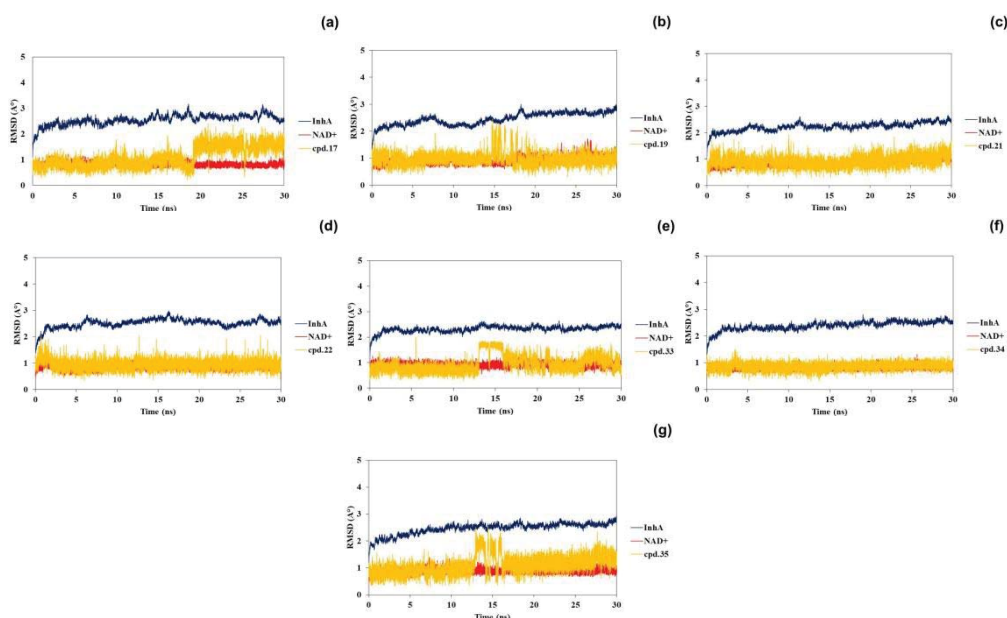


รูปที่ 2 รูปแบบการจับของสารยับยั้งสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide สารหมายเลข 19 ที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA สูง (a) สารหมายเลข 25 ที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA ปานกลาง (b) และสารหมายเลข 38 ที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ InhA ต่ำ (c) ในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA ของเชื้อวัณโรคที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง

## 2) ผลการศึกษาสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ด้วยระเบียบวิธีวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

### 2.1) ความเสถียรภาพและการคำนวณหาค่าพลังงานการจับอิสระของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA

จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลโดยการคำนวณ RMSD ของทุกอะตอมของเอนไซม์ InhA โคแฟกเตอร์  $\text{NAD}^+$  และสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide พบว่าในแต่ละระบบมีการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างจากโครงสร้างเริ่มต้น ดังแสดงในรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าโครงสร้างเอนไซม์ InhA โคแฟกเตอร์  $\text{NAD}^+$  และสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในทุกระบบมีค่า RMSD ค่อนข้างเสถียรตั้งแต่วเวลา 2 ns จนถึง 30 ns และมีค่า RMSD เฉลี่ยในช่วง 0.5-3.0 อังสตรอม ดังนั้นผู้วิจัยได้นำเอาค่าเฉลี่ยในช่วงเวลา 5 ns สุดท้ายมาทำการคำนวณหาค่าพลังงานการจับอิสระของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA ดังแสดงในตารางที่ 2 และเมื่อทำการพลอตกราฟหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานการจับอิสระที่ได้จากการทดลองและการคำนวณ พบว่า ได้ค่าความสัมพันธ์ ( $r^2$ ) 0.8642 ดังแสดงในรูปที่ 4

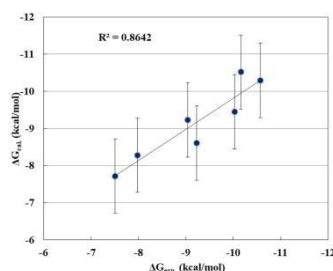


รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ RMSD ของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA ของสารหมายเลข 17 (a) สารหมายเลข 19 (b) สารหมายเลข 21 (c) สารหมายเลข 22 (d) สารหมายเลข 33 (e) สารหมายเลข 34 (f) และสารหมายเลข 35 (g)

ตารางที่ 2 การคำนวณค่าพลังงานการจับอิสระในหน่วย kcal/mol โดยวิธี MM-PBSA (n=100 snapshot)

| สารหมายเลข | IC <sub>50</sub> (μM) | ΔH          | TΔS         | ΔG <sub>cal</sub> | ΔG <sub>exp</sub> <sup>[a]</sup> |
|------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------------|----------------------------------|
| 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                            |

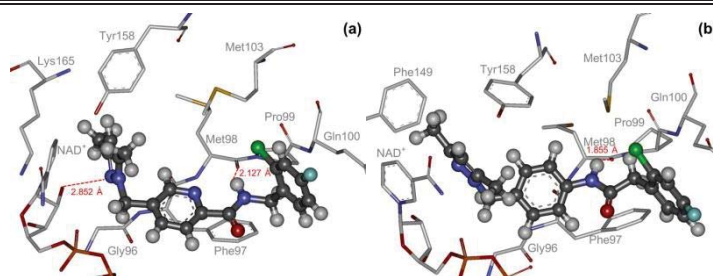
[a]  $\Delta G_{\text{exp}} = RT \ln[IC_{50}]$ , เมื่อ  $R = 1.988 \text{ cal/mol K}$  และ  $T = 300 \text{ K}$



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานการจับอิสระจากการทดลองและค่าพลังงานการจับจากการคำนวณ

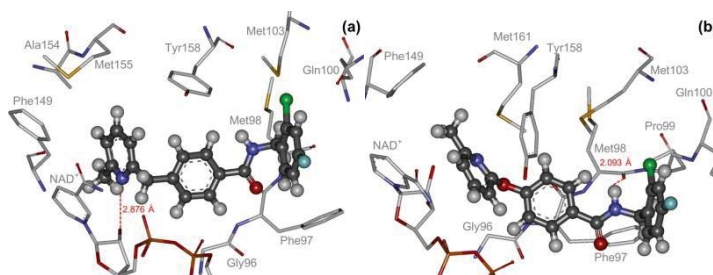
## 2.2) ตำแหน่งการวางตัวและอันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในโครงการจับของเอนไซม์ InhA

ตำแหน่งการวางตัวของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ตรงตำแหน่งของ picolinamide ของสารหมายเลข 21 และ *N*-phenylformamide ของสารหมายเลข 22 จะเห็นได้ว่ามีตำแหน่งการวางตัวของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่แตกต่างกัน สารหมายเลข 21 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.19 μM มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 5 (a) เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 ด้วยระยะห่าง 2.127 อังสตรอม และอะตอมไนโตรเจนของวง 3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl กับหมู่ไฮดรอกซิลของโคแฟกเตอร์ NAD<sup>+</sup> ระยะห่าง 2.852 อังสตรอม นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Met161 สารหมายเลข 22 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.04 μM มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 5 (b) จากผลการศึกษาพบ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 ระยะห่าง 1.855 อังสตรอม และพบอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Met161, Ala198 และ Ala201 จากสารหมายเลข 21 และสารหมายเลข 22 ที่มีความแตกต่างกันระหว่างหมู่ picolinamide และ *N*-phenylformamide ตามลำดับ ส่งผลให้มีตำแหน่งการวางตัวของสารทั้งสองหมายเลขและประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA แตกต่างกัน จากผลการศึกษา พบว่า สารหมายเลข 22 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงและอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่มากกว่าสารหมายเลข 21 จึงส่งผลให้สารหมายเลข 22 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ดีกว่าสารหมายเลข 21



รูปที่ 5 ตำแหน่งการวางตัวและอันตรกิริยาของสารหมายเลข 21 (a) และสารหมายเลข 22 (b) ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA

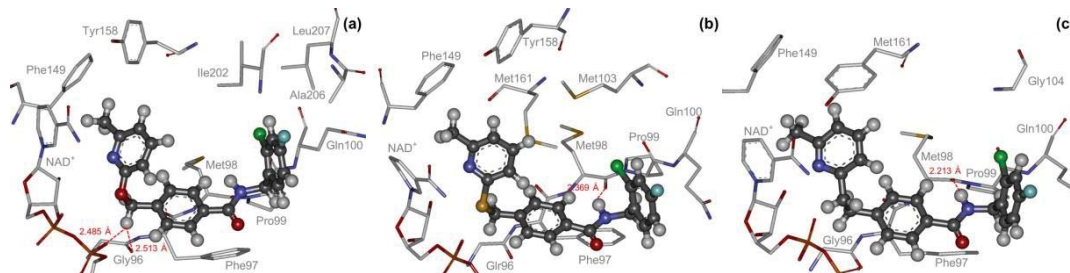
ตำแหน่งการวางตัวของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีโครงสร้างที่ต่างกันตรงตำแหน่งของหมู่อะตอมในสายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน สารหมายเลข 17 สายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน คือ มีเทน ( $-\text{CH}_2-$ ) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $0.05 \mu\text{M}$  และสารหมายเลข 33 สายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน คือ อะตอมออกซิเจน ( $-\text{O}-$ ) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ด้วยค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $3.40 \mu\text{M}$  และสารทั้งสองหมายเลขมีตำแหน่งการวางตัวดังแสดงในรูปที่ 6 จากผลการศึกษา พบว่า สารหมายเลข 17 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของวงไพริดีนกับโคแฟกเตอร์  $\text{NAD}^+$  ระยะห่าง  $2.876$  อังสตรอม และอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Met98, Met161, Leu197 และ Ala201 สำหรับสารหมายเลข 33 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 ด้วยระยะห่าง  $2.093$  อังสตรอม และยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Tyr158 และ Leu207 จากผลการศึกษา พบว่า สารหมายเลข 17 เกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกที่มากกว่าสารหมายเลข 33 ดังนั้นจึงส่งผลให้สารหมายเลข 17 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้ดีกว่าสารหมายเลข 33



รูปที่ 6 ตำแหน่งการวางตัวและอันตรกิริยาของสารหมายเลข 17 (a) และสารหมายเลข 33 (b) ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA

ตำแหน่งการวางตัวของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีโครงสร้างที่ต่างกันตรงตำแหน่งของสองอะตอมในสายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน สารหมายเลข 19 สายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน คือ เมธานอน ( $-\text{OCH}_2-$ ) มีค่า  $\text{IC}_{50}$   $0.02 \mu\text{M}$  พบว่าเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของเมธานอน ( $-\text{OCH}_2-$ ) กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Gly96 และโคแฟกเตอร์  $\text{NAD}^+$  ระยะห่าง  $2.513$  และ  $2.485$  อังสตรอม ตามลำดับ นอกจากนั้นยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Tyr158, Met161 และ Ala198 สารหมายเลข 35 สายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน คือ เมทิลไทโอ ( $-\text{SCH}_2-$ ) มีค่า  $\text{IC}_{50}$   $0.26 \mu\text{M}$  จากการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญ พบว่า เกิดอันตรกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 ระยะห่าง  $2.369$  อังสตรอม นอกจากนั้นยังเกิดอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Met161 และ Ile202 สารหมายเลข 34 สายโซ่ระหว่างวงเบนซีนกับวงไพริดีน คือ อีเทน ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) มีค่า  $\text{IC}_{50}$   $1.55 \mu\text{M}$  พบว่า เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์กับอะตอมออกซิเจนของกรดอะมิโน Met98 ระยะห่าง  $2.213$  อังสตรอม และอันตรกิริยาชนิดไฮโดรโฟบิกกับ

กรดอะมิโน Phe149 และ Met199 จากผลการศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นของสารทั้งสามหมายเลข พบว่า สารหมายเลข 19 ที่เป็นสารไซ้ประกอบด้วยอะตอมที่มีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูงจะเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่มากกว่าสารหมายเลข 35 และสารหมายเลข 34 ดังนั้นจึงส่งผลให้สารหมายเลข 19 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้ดีกว่าสารหมายเลข 35 และสารหมายเลข 34



รูปที่ 7 ตำแหน่งการวางตัวและอันตรกิริยาของสารหมายเลข 19 (a) สารหมายเลข 35 (b) และสารหมายเลข 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 และสนามไฮโดรเจนแอกเซปเตอร์ เป็น 10.0 %, 39.5 %, 31.6 % และ 18.9 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 ผลการศึกษานี้ ค่าความสามารถในการทำนาย (predictive ability) ของแบบจำลองที่ได้ต่ำกว่า 0.600 แสดงให้เห็นว่าแบบจำลอง CoMSIA ที่ได้นี้ไม่สามารถอธิบายความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและไม่สามารถนำไปใช้ในการออกแบบสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้นได้

ตารางที่ 3 ผลทางสถิติของแบบจำลอง CoMSIA ของอนุพันธ์ heteroaryl benzamide

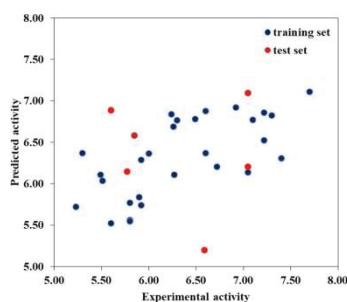
| model   | Statistical parameters |       |   |             |       |         |                     |
|---------|------------------------|-------|---|-------------|-------|---------|---------------------|
|         | $r_{cv}^2$             | $r^2$ | N | $S_{press}$ | SEE   | F       | Fraction            |
| 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

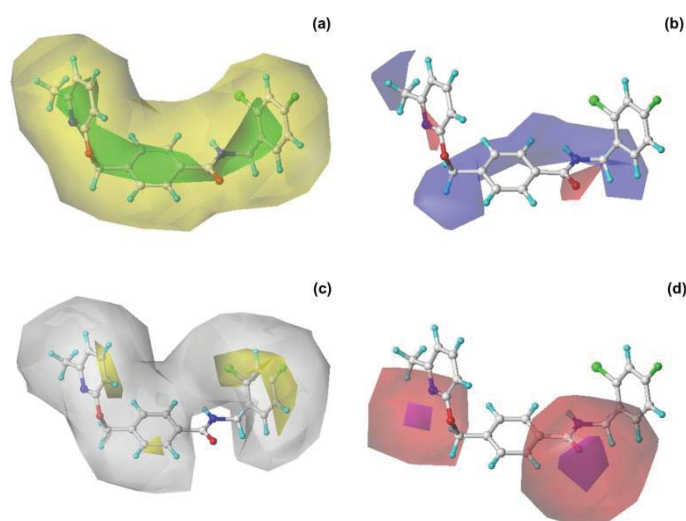
จากแบบจำลอง CoMSIA ของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่ดีที่สุด พบว่า ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่ได้จากการทำนายไม่ใกล้เคียงกับการทดลองแสดงโดยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจากการทดลองและการทำนาย ดังแสดงในรูปที่ 8 ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าแบบจำลอง QSAR ของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ไม่มีความน่าเชื่อถือเพียงพอในการทำนายค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจากการคำนวณและแผนภาพคอนทัวร์ในรูปที่ 9 ไม่สามารถชี้แนะถึงความต้องการทางโครงสร้างที่สำคัญของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ได้ เนื่องจากแผนภาพคอนทัวร์ที่ได้ของสนามสเตอริก สนามไฮโดรโฟบิก และสนามไฮโดรเจนแอกเซปเตอร์ นั้นมีลักษณะที่ใหญ่และไม่แยกเป็น



แต่ละความต้องการทางโครงสร้าง ดังนั้นจึงไม่สามารถที่จะชี้แนะถึงความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ได้



รูปที่ 8 กราฟที่พล็อตระหว่างค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่ได้จากการทดลองกับค่าจากการทำนายของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ด้วยวิธี CoMSIA



รูปที่ 9 แผนภาพคอนทัวร์ CoMSIA ในสนามสเตอริก (a) สนามอิเล็กโตรสแตติก (b) สนามไฮโดรโฟบิก (c) และ สนามไฮโดรเจนแอกเซปเตอร์ (d)

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการออกแบบโมเลกุลด้วยคอมพิวเตอร์โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิง ระเบียบวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลและการศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสามมิติของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ทำให้เข้าใจถึงรูปแบบการวางตัวและอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นของโครงสร้างที่มีผลต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA นอกจากนี้ พบว่ากรดอะมิโน Met98 คือกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญกับสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นแนวทางสำคัญสำหรับการออกแบบสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นเพื่อใช้เป็นสารต้านเชื้อไมโครแบคทีเรียมทูเบอร์คูโลซิส

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (RSA5980057) 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<sup>+</sup> 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/](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 หาญวสินโรจน์<sup>1\*</sup> นฤตล ภูศรี<sup>1</sup> พฤทธิ คำศรี<sup>2</sup> อรดี พันกว้าง<sup>2</sup> กัมปนาท ฉายจรัส<sup>1</sup> นิธิมา สุทธิพันธุ์<sup>3</sup>  
พัชรินารถ ทรัพย์อาภากรณ์<sup>4</sup> สุภา ทารหนองบัว<sup>4</sup> คมสันต์ สุทธิสินทอง<sup>5</sup> และ พรพรรณ พิงโพธิ์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>2</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

<sup>3</sup>คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>4</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<sup>5</sup>ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

\*E-mail: pornpan\_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

#### บทคัดย่อ

โรควัณโรคเกิดจากเชื้อไมโครแบคทีเรียทูปเบอร์คิวโลซิส (*Mycobacterium tuberculosis*) เอนไซม์ดีคาร์บ็อกซีไรนิลฟอสโฟริล-เบต้า-ดี-ไรโบส-2-อพิเมอเรส (DprE1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ arabinogalactan ที่ผนังเซลล์ของไมโครแบคทีเรีย ทูปเบอร์คิวโลซิส และยังคงค้นพบว่าเป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับการพัฒนาเป็นยับยั้งโรควัณโรค สารอนุพันธ์ 4 aminoquinolone piperidine amide เป็นสารยับยั้งโรควัณโรคชนิดนอนโควาเลนต์ สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ถูกพัฒนาเพื่อเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 อย่างไรก็ตาม สารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ชนิดพัฒนาขึ้นมายังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ระเบียบวิธี 3D-QSAR การคำนวณโมเลกุลาร์ไดค็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล และการคำนวณ fragment molecular orbital (FMO) ถูกประยุกต์ใช้เพื่อทำให้ทราบถึงความต้องการทางโครงสร้างและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้เข้าใจถึงความต้องการทางโครงสร้างรูปแบบการจับ และอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide เพื่อใช้เป็นแนวทางในการออกแบบสารยับยั้งโรควัณโรคให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

**คำสำคัญ :** เอนไซม์ดีคาร์บ็อกซีไรนิลฟอสโฟริล-เบต้า-ดี-ไรโบส-2-อพิเมอเรส ไมโครแบคทีเรียทูปเบอร์คิวโลซิส 3D-QSAR การคำนวณโมเลกุลาร์ไดค็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล การคำนวณ fragment molecular orbital

#### Abstract

Tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Decaprenyl phosphoryl- $\beta$ -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- $\beta$ -D-ribose oxidase (DprE1), *M. tuberculosis*, 3D-QSAR Molecular Docking Calculations, Molecular Dynamic Simulations, Fragment Molecular Orbitals Approach

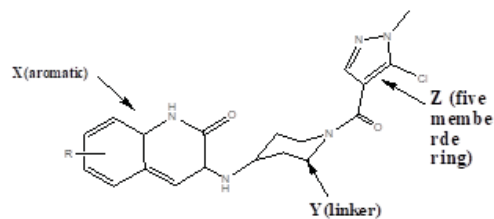
## บทนำ

ปัจจุบันวัณโรคเป็นโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุหลักการตายของประชากรทั่วโลก เนื่องจากปัญหาการดื้อยาทำให้ผู้ป่วยวัณโรคไม่ตอบสนองต่อยาหลักที่ใช้รักษาในปัจจุบัน [1] อีกทั้งยังมีการแพร่ระบาดของโรควัณโรคในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์อย่างรวดเร็ว ซึ่งการรักษาวัณโรคในผู้ป่วยกลุ่มนี้มีความซับซ้อนมากขึ้นไม่สามารถรักษาด้วยวิธีมาตรฐานได้อีกต่อไป ดังนั้น การแพร่ระบาดของวัณโรคจึงยังคงมีอยู่ในปัจจุบันและยังเป็นปัญหาหลักทางด้านสุขภาพของประชากรทั่วโลกโดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา จากปัญหาการดื้อยาของวัณโรคทำให้ตัวยาที่ใช้ในปัจจุบันไม่สามารถใช้รักษาวัณโรคได้อีกต่อไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาและพัฒนาตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งวัณโรค กลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาตัวใหม่คือการค้นหาตัวยาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่จำเป็นของเชื้อแบคทีเรีย *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุของวัณโรค โดยมีหลักการคือ ยาที่พัฒนาขึ้นมาได้ควรจะมีกลไกการออกฤทธิ์ใหม่หรือสามารถจับกับเป้าหมายใหม่ หรือยาที่พัฒนาขึ้นมาสามารถจับกับเป้าหมายเก่าได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เอนไซม์ DprE1 เป็นสารยับยั้งเชื้อวัณโรคชนิดใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้พบในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ decaprenylphosphoryl-d-arabinose (DPA) ในผนังเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาอิมเมโโรเซชัน [2] ทำให้เอนไซม์ DprE1 เป็นส่วนประกอบสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์ ดังนั้นจึงทำให้เอนไซม์ DprE1 เป้าหมายสำคัญที่จะทำการพัฒนาไปเป็นยารักษาวัณโรคตัวใหม่ที่มีศักยภาพสูงได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำเอาระเบียบวิธีทางด้านการจำลองแบบโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการศึกษา ออกแบบและค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 โดยสนใจที่จะทำการพัฒนาสารอนุพันธ์ในกลุ่มของ 4-aminoquinolone piperidine amide ให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งวัณโรคได้สูงขึ้น โดยในงานวิจัยนี้ได้นำเอาวิธีการจำลองแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณ โดยใช้ระเบียบวิธีการออกแบบโมเลกุลเชิงโครงสร้าง (Structure based drug design) และระเบียบวิธีการออกแบบโมเลกุลเชิงลิแกนด์ (Ligand based drug design) ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจถึงความต้องการทางโครงสร้าง รูปแบบการจับ และอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างเอนไซม์กับสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในโพรงการจับ โดยใช้ระเบียบวิธี 3D-QSAR การคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิ้ง 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 <sub>50</sub> (μM) | log(1/IC <sub>50</sub> ) |
|----|-------------------|------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 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 <sub>50</sub> (μM) | log(1/IC <sub>50</sub> ) |
|-----|-------------------|------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 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 ทั้งหมด 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. การคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิ้ง

รวบรวมข้อมูลทางโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งของเอนไซม์ DprE1 ของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ซึ่งแสดงดังตารางที่ 1 จากการสืบค้นเอกสารบนฐานข้อมูลต่างๆ ปรับโครงสร้างให้เสถียรที่สุดด้วยระเบียบวิธีการคำนวณเคมีควอนตัม *ab-initio* (M062X/6-31G\*) โดยใช้โปรแกรม Gaussius 09 ทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.02 ศึกษาแบบการจับตัวกันของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ภายในโพรงการจับเอนไซม์ DprE1 (PDB Code: 4P8L) ด้วยวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิ้ง วิเคราะห์ผลการศึกษาและสรุปผลการศึกษา

### 4. การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

การศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตเชิงโมเลกุลด้วยวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน (molecular dynamics simulation) ศึกษาการจับของสารยับยั้งกับเป้าหมายด้วยโปรแกรม AMBER12 ระบบที่ศึกษาเป็นแบบ Canonical การศึกษาทั้งหมดได้กำหนดให้ปริมาตรของระบบคงที่ และอุณหภูมิคงที่ที่ 300 K เป็นตัวควบคุม โดยใช้ ff03 สำหรับพารามิเตอร์ที่อธิบายโปรตีน ใช้ RESP จากการคำนวณโดยวิธี M062X/6-31G\* โมเลกุลของน้ำชนิด TIP3P ได้ถูกเติมเข้าไปในทุกๆระบบที่ใช้ในการศึกษาโมเลกุลาร์ 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-ribitol และ adenine deoxyribose ประจุของ DprE1, FAD และลิแกนด์คือ 0, -2 และ 0 ตามลำดับ พลังงานอันตรกิริยาของแต่ละส่วน (IFIE) เป็นพลังงานที่เกิดขึ้นระหว่างอันตรกิริยาของเอนไซม์ DprE1 โคแฟกเตอร์ ลิแกนด์ และโมเลกุลของน้ำ [4] ผลที่ได้จากการศึกษาดัชนีระเบียบวิธี FMO calculations จะได้พลังงานอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์ DprE1 กับสารยับยั้งในระดับอิเล็กทรอนิกส์ นอกจากนี้พลังงานรวม (TEs) ของโปรตีนโคแฟกเตอร์ และ ลิแกนด์ถูกนำมาคำนวณเพื่อหาพลังงานในการจับ (BE) โดยพลังงานในการจับสามารถหาได้จากสมการที่ 1 และ 2

$$BE = TE_{\text{complex}} - TE_{\text{receptor}} - TE_{\text{ligand}} - TE_{\text{water}} \quad (1)$$

$$BE = TE(\text{DprE1} + \text{FAD} + \text{AQ} + \text{water}) - TE(\text{DprE1} + \text{FAD} + \text{water}) - TE(\text{AQ} + \text{water}) + TE(\text{water}) \quad (2)$$

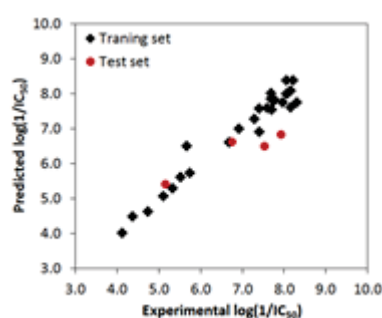
### ผลการวิจัย

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 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีทางชีวภาพที่ได้จากการคำนวณและค่าที่ได้จากการทดลอง

#### การแปลผลสมการ

ผลการศึกษาคอมพิวเตอร์จะแสดงอันตรกิริยาของตัวยับยั้งที่มีผลต่อเอนไซม์ DprE1 พบว่าคอนทัวร์ steric (รูป 3 ก.) บริเวณคอนทัวร์สีเหลืองคือไม่ชอบความเกะกะ ผลจากการศึกษาพบคอนทัวร์สีเหลืองที่บริเวณรอบหมู่เอริล แสดงว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ควรเป็นหมู่นขนาดเล็ก คอนทัวร์ electrostatic (รูปที่ 3 ข.) พบว่าคอนทัวร์สีแดงที่บริเวณวงเอริล แสดงว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ควรมีคุณสมบัติเป็นหมู่ดองอิเล็กตรอน คอนทัวร์ hydrophobic (รูปที่ 3 ค.) แสดงให้เห็นว่ามีคอนทัวร์สีเทาที่บริเวณวงอะโรมาติกและวงเอริล ดังนั้นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ควรมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก คอนทัวร์ H-bond donor (รูปที่ 3 ง.) พบว่ามีคอนทัวร์มีฟ้าขึ้นที่ตำแหน่งไนโตรเจนของวงอะโรมาติก จากผลการศึกษาความต้องการโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide สามารถสรุปได้ว่าหมู่แทนที่ของสารยับยั้งตัวใหม่ควรมีคุณสมบัติเป็นหมู่แทนที่ขนาดเล็ก มีคุณสมบัติเป็นหมู่ดองอิเล็กตรอนและมีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่สูงเพื่อให้สารยับยั้งตัวใหม่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ได้ดีขึ้น



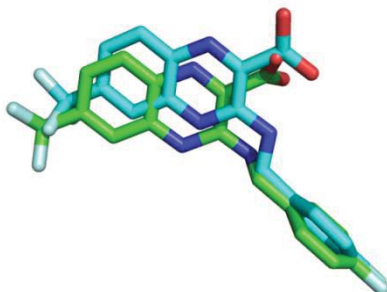
รูปที่ 2 แผนภาพคอนทัวร์ (ก) สนาม steric (ข) สนาม electrostatic (ค) สนาม hydrophobic (ง) สนาม H-bond donor



## 2. การคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง

### 2.1. ผลการตรวจสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม Autodock 4.02

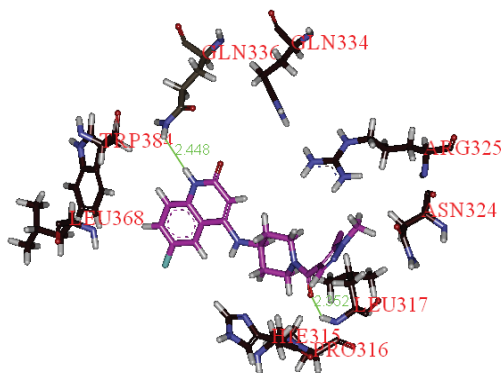
ผลจากการเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโปรแกรมจับของเอนไซม์ DprE1 พบว่าในโปรแกรมจับของเอนไซม์ DprE1 ของเชื้อวัณโรคให้ค่า RMSD เท่ากับ 1.15 องศา จากการซ้อนทับกันระหว่างโครงสร้างผลึกทางเอ็กซ์เรย์กับโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโปรแกรมจับของเอนไซม์ DprE1 พบว่าทั้งสองโครงสร้างมีตำแหน่งการวางตัวใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ลิแกนด์ผลึกทางเอ็กซ์เรย์ (สีเขียว) และโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณ (สีฟ้า) ของสารยับยั้งเชื้อวัณโรคในโปรแกรมจับของเอนไซม์ DprE1

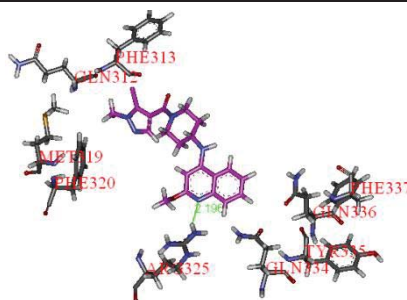
### 2.2 การวิเคราะห์อันตรกิริยาของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโปรแกรมจับของเอนไซม์ DprE1

เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด คือ สารหมายเลข 2 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.005 \mu M$  มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 4 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณอะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติกกับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน Gln336 และหมู่คาร์บอกซิลิกของหมู่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโน Leu317 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาแบบไพของวงอะโรมาติกกับวงอะโรมาติกของโคแฟกเตอร์ (FAD)



รูปที่ 4 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide สารหมายเลข 2 ในโปรแกรมจับของเอนไซม์ DprE1 ที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง

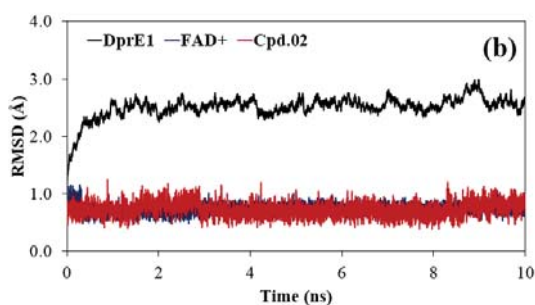
เมื่อพิจารณาถึงสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำสุด คือ สารหมายเลข 9 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $78 \mu M$  มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 5 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณอะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติกกับกรดอะมิโน Arg325 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาแบบไพของวงอะโรมาติกกับวงอะโรมาติกของโคแฟกเตอร์



รูปที่ 5 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide สารหมายเลข 9 ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 ที่ได้จากการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง

### 3. การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล (Molecular dynamic stimulation model)

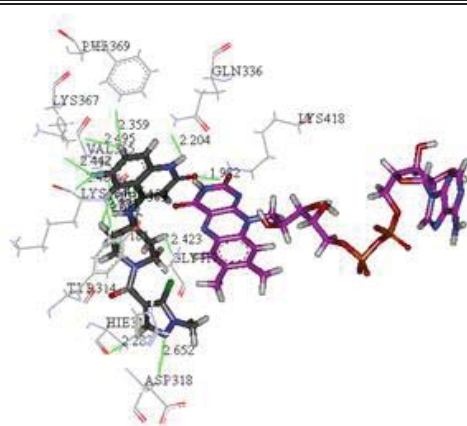
เพื่อตรวจสอบความน่าเชื่อถือของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 ด้วยระเบียบวิธีการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล ผลจากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการพล็อตกราฟ RMSD ระหว่างเอนไซม์ DprE1 โคแฟกเตอร์ และสารหมายเลข 2 พบว่าระบบเข้าสู่สมดุลหลังจากผ่านไป 2 ns ดังแสดงในรูปที่ 6 จากรูปพบว่าระบบมีความเสถียรและมีความน่าเชื่อถือสำหรับนำไปศึกษาารูปแบบการจับและรูปแบบการวางตัวและการคำนวณพลังงานการจับ



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  $0.005 \mu M$  มีตำแหน่งในการวางตัว แสดงดังในรูปที่ 7 พบว่าเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญคือ อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณอะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติกกับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน Gln336 และหมู่คาร์บอกซิลิกของหมู่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโน Leu317 และ Lys418 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาแบบไพของวงอะโรมาติกกับวงอะโรมาติกของโคแฟกเตอร์ซึ่งสอดคล้องกับรูปที่ 4

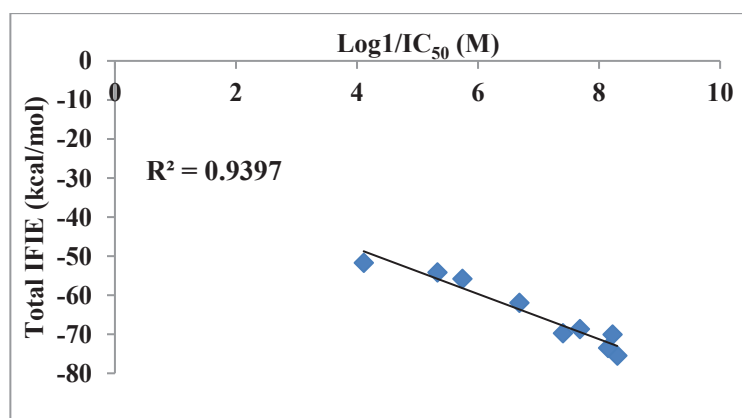


รูปที่ 7 รูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide สารหมายเลข 2 ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 ที่ได้รับการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

#### 4. พลังงานอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์ DprE1 กับสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amides (Total IFIE) /kcal/mol

ตารางที่ 3 พลังงานอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์ DprE1 กับสารยับยั้งที่ได้จากการคำนวณโดยระเบียบวิธี Fragment molecular orbitals

| Compound | Log1/IC <sub>50</sub> | 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<sub>50</sub>)

พลังงานในการจับระหว่างเอนไซม์ DprE1 กับสารยับยั้งที่ได้จากการศึกษาด้วยระเบียบวิธี FMO แสดงดังตารางที่ 3 จากตารางที่ 23 พบว่าสารหมายเลข 2 ให้ค่าพลังงานในการจับต่ำที่สุด จากนั้นทำการพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานในการจับกับค่ากัมมันตภาพทางชีวภาพที่ได้จากการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.94 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าผลการศึกษาที่ได้มีความน่าเชื่อถือ และสามารถใช้อธิบายแนวโน้มของค่ากัมมันตภาพทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาการออกแบบโมเลกุลโดยใช้การคำนวณของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide โดยใช้ระเบียบวิธี 3D-QSAR การคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิ้ง และการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล เพื่อใช้ในการพัฒนาประสิทธิภาพของสารอนุพันธ์เหล่านี้ในการยับยั้งเอนไซม์ DprE1 พบว่าหมู่แทนที่ของสารยับยั้งตัวใหม่ควรมีคุณสมบัติเป็นหมู่แทนที่ขนาดเล็ก มีคุณสมบัติเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนและมีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่สูงเพื่อทำให้สารยับยั้งตัวใหม่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ได้สูงขึ้น ผลจากการศึกษาอันตรกิริยาที่สำคัญและรูปแบบการจับของสารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 โดยใช้ระเบียบวิธีคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิ้งด้วยโปรแกรม Autodock 4.02 มีความสามารถในการทำนายรูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 โดยให้ค่า RMSD ระหว่างโครงสร้างผลึกทางเอ็กเรย์กับโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 1.15 อังสตรอม จากค่าที่ได้ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าระเบียบวิธีคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิ้งที่ใช้มีความน่าเชื่อถือในระดับหนึ่ง ในการทำนายตำแหน่งการจัดวางตัวของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโพรงการจับเอนไซม์ DprE1 และสามารถบ่งบอกอันตรกิริยาที่เฉพาะเจาะจงของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide และพบอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณอะตอมไนโตรเจนของวงอะโรมาติกกับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน Gln336 และหมู่คาร์บอกซิลิกของหมู่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโน Leu317 นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาแบบไพของวงอะโรมาติกกับวงอะโรมาติกของโคแฟกเตอร์ ผลการศึกษาคำนวณแบบพลวัตเชิงโมเลกุลของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ในโพรงการจับของเอนไซม์ DprE1 พบว่าเมื่อทำการพล็อตกราฟ RMSD ระหว่างเอนไซม์ DprE1 โคแฟกเตอร์ และสารหมายเลข 2 พบว่าระบบเข้าสู่สมดุลหลังจากผ่านไป 2 ns พบว่าระบบมีความเสถียรและมีความน่าเชื่อถือสำหรับนำไปศึกษาในรูปแบบการจับและรูปแบบการวางตัวทำการคำนวณพลังงานการจับเมื่อนำโครงสร้างที่ได้จากการศึกษาคำนวณแบบพลวัตเชิงโมเลกุลไปเป็นโครงสร้างเริ่มต้นสำหรับการศึกษา 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 โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้งและการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล

### Elucidating of Binding Modes and Crucial Interactions of Pyrrolyl Benzohydrazide using Molecular Docking Calculations and Molecular Dynamic Simulations Approaches

ภาพตะวัน ทองดี<sup>1</sup> จิมพิกา พรพรม<sup>1</sup> บัณฑิต คำศรี<sup>1</sup> บงกชวรรณ พาคำวงศ์<sup>1</sup> นฤตล ภูศรี<sup>1</sup>  
ชญาณิลท์ หาญวสินโรจน์<sup>1</sup> กัมปนาท ฉายจรัส<sup>1</sup> พงษ์ศักดิ์ คำศรี<sup>2</sup> อรดี พันธุ์กว้าง<sup>2</sup> พัชรินทร์ ทรัพย์ภากรณ์<sup>3</sup>  
สุภา ทารหนองบัว<sup>3</sup> พงษ์เกียรติ ศรีมาโนชญ์<sup>4</sup> คมสันต์ สุทธิสินทอง<sup>5</sup> และ พรพรม พิงโพธิ์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>2</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

<sup>3</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<sup>4</sup>คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

<sup>5</sup>ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

\*E-mail: pompan\_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

#### บทคัดย่อ

*M. tuberculosis* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการเกิดวัณโรคซึ่งมี Enoyl ACP reductase (ENR) หรือ InhA เป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบหลักของแบคทีเรีย ดังนั้นเอนไซม์ InhA จึงเป็นเป้าหมายในการพัฒนาเพื่อยับยั้งวัณโรค ปัจจุบันมียาไอโซไนอะไซด์ เป็นยาที่ยับยั้ง *M. tuberculosis* แต่พบว่าเมื่อใช้ยาไอโซ-ไนอะไซด์ต่อเนื่องจะเกิดการดื้อยาซึ่งสาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของ KatG งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยมีอนุพันธ์ของ Pyrrolyl benzohydrazide เป็นพื้นฐานและใช้วิธีโมเลกุลาร์ดอกกิ้งเพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารกลุ่มยับยั้งกับ InhA เป้าหมาย ซึ่งพบว่าสารยับยั้งเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนใน InhA ได้แก่ พันธะไฮโดรเจนที่ Pro156 Tyr158 Ala198 Val203 และโคแฟกเตอร์ NAD<sup>+</sup> และพันธะไพซึ่งเป็นอันตรกิริยาที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพระหว่างสารกลุ่มยับยั้งและโมเลกุล InhA ได้และใช้วิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่ทำให้โครงสร้างเสถียรที่สุด ซึ่งจากการวิเคราะห์ร่วมกันสามารถนำมาออกแบบโครงสร้างใหม่เพื่อยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้อย่างสมเหตุสมผล

**คำสำคัญ :** วัณโรค โมเลกุลาร์ดอกกิ้ง 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<sup>+</sup> 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>) ซึ่งการเสียชีวิตที่มาจากหลายปัจจัยทั้งด้านการเข้าถึงการบริการรักษาและการรักษาที่มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอเนื่องจากเกิดการดื้อยา

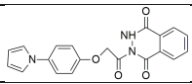
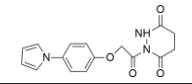
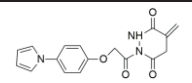
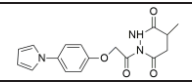
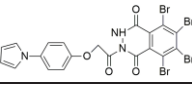
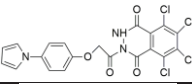
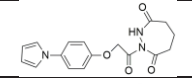
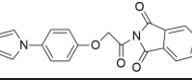
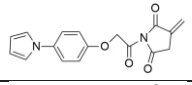
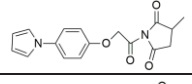
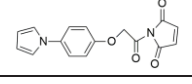
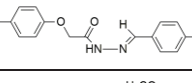
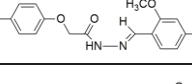
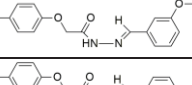
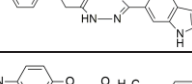
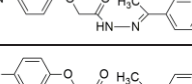
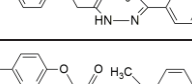
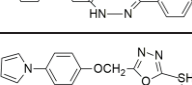
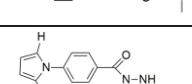
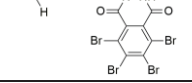
วัณโรคมีสาเหตุหลักจาก *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในระบบทางเดินหายใจจึงมักพบวัณโรคในปอด [He X et al. (2007)] รายงานว่า *M. tuberculosis* เป็นแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์หนาที่ประกอบไปด้วยกรดไมโคลิก (mycolic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ไขมัน Enoyl ACP reductase (ENR) หรือ InhA ในการสังเคราะห์กรดไขมันเหล่านี้ ปัจจุบันในการรักษาวัณโรคใช้ยาไอโซไนอะซิด (isoniazid, INH) ที่ทำงานร่วมกับ KatG เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน [Gaurava S. et al. (2017)] รายงานว่าเมื่อใช้ยาไอโซไนอะซิดต่อเนื่องจะทำให้เกิดการดื้อยาในผู้ป่วยโดยมีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ใช้สังเคราะห์เอนไซม์ InhA และการกลายพันธุ์ของ KatG ส่งผลให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและอะมิโนของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นเมื่อทราบถึงสาเหตุของการดื้อยาจึงทำให้สามารถนำมาออกแบบและพัฒนาสารยับยั้ง InhA ได้

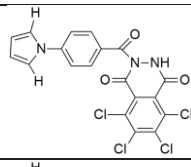
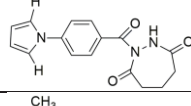
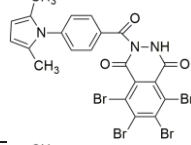
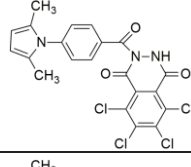
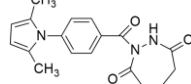
[Shrinivas D. J. et al. (2017)] รายงานว่ายยาไอโซไนอะซิดเป็นกลุ่มยาที่มีอนุพันธ์ของ Pyrrolyl benzohydrazide เป็นพื้นฐาน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงนำโครงสร้างกลุ่มอนุพันธ์ของ Pyrrolyl benzohydrazide มาศึกษาคุณสมบัติเพื่อออกแบบและพัฒนาสำหรับเป็นโมเลกุลสารยับยั้ง InhA โดยคุณสมบัติที่ศึกษา ได้แก่ การศึกษาอันตรกิริยาดัวยวิธีโมเลกุลาร์ด็อกกิง (molecular docking calculations) และศึกษาการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics simulation) เพื่อศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่ทำให้โครงสร้างเสถียรที่สุด ซึ่งจากผลการศึกษาคาดว่าจะนำไปสู่การออกแบบสารตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพและยับยั้งการดื้อยาได้

## วิธีการวิจัย

1. นำโครงสร้างของอนุพันธ์ pyrrolyl benzohydrazide จำนวน 53 โครงสร้างจากการทบทวนวรรณกรรม และเลือกโครงสร้างที่ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ดีและเหมาะสมที่แสดงดังตารางที่ 1
2. ศึกษาแบบจำลองเชิงโมเลกุลโครงสร้าง 3 มิติ โดยใช้ GaussView 5.0.8 program
3. ทำการปรับเสถียรโครงสร้าง 3 มิติ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของโครงสร้างสารโดยใช้ Gaussian program และเข้าสู่การทำโมเลกุลาร์ด็อกกิงโดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2 (PDB code: 2X23)
4. วิเคราะห์อันตรกิริยาของโครงสร้างจากตารางที่ 1 และเลือกโครงสร้างที่ได้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงกลางและนำมาพิจารณาความแตกต่างของอันตรกิริยาเพื่อนำไปออกแบบโมเลกุลตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพต่อไป
5. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เสถียรที่สุดที่เวลาต่างๆ ด้วยโปรแกรม AMBER12 โดยที่โครงสร้างของเอนไซม์เป้าหมายที่จับกับสารยับยั้งจากระเบียบวิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลนี้ได้ทำการศึกษาระบบที่ศึกษาเป็นแบบ canonical โดยที่ตลอดเวลาการศึกษาทั้งหมดได้กำหนดให้ปริมาตรของระบบคงที่และอุณหภูมิคงที่ที่ 300 เคลวิน เป็นตัวควบคุม โดยใช้ ff03 สำหรับพารามิเตอร์ที่อธิบายโปรตีน ใช้ RESP จากการคำนวณโดยวิธี M062X/6-31G\* โมเลกุลของน้ำชนิด TIP3P ได้ถูกเติมเข้าไปในทุกะบบที่ใช้ในการศึกษาวิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลในการกำหนด 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 $\mu$ M |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| 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 $\mu$ M |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| 21    |   | 64                         |
| 22    |   | 27                         |
| 23    |   | 75                         |
| 24    |   | 76                         |
| 25    |  | 13                         |

## ผลการวิจัย

### 1. การศึกษาโดยใช้วิธีโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง

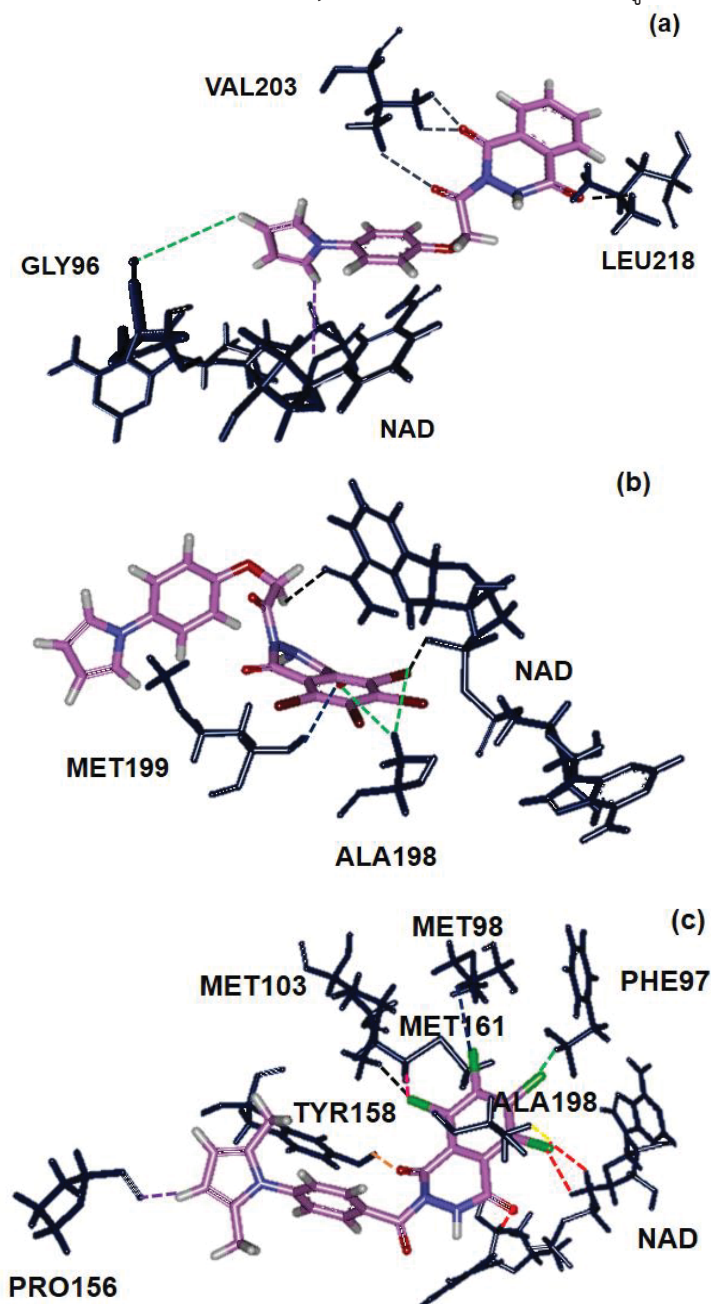
การศึกษาแบบจำลองเชิงโมเลกุลโดยใช้วิธีโมเลกุลาร์ดอกกิ้งเพื่อทำนายลักษณะการวางตัวและการเกิดอันตรกิริยาของสารยับยั้งกับโมเลกุล InhA

การเกิดอันตรกิริยาที่กรดอะมิโนต่างๆ โดยอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นได้แก่ พันธะไฮโดรเจนและพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งพันธะไฮโดรเจนเกิดจากสารยับยั้งกับโมเลกุลเป้าหมาย Gly96 Phe97 Met98 Met103 Pro156 Tyr158 Met161 Ala198 Met199 Val203 Leu218 และโคแฟกเตอร์  $\text{NAD}^+$  แสดงดังรูปที่ 1 และการเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างสารยับยั้งกับโมเลกุลเป้าหมายต่าง ๆ ได้แก่ กรดอะมิโน Tyr158 Lys165 Leu218 และ โคแฟกเตอร์  $\text{NAD}^+$  แสดงดังรูปที่ 2

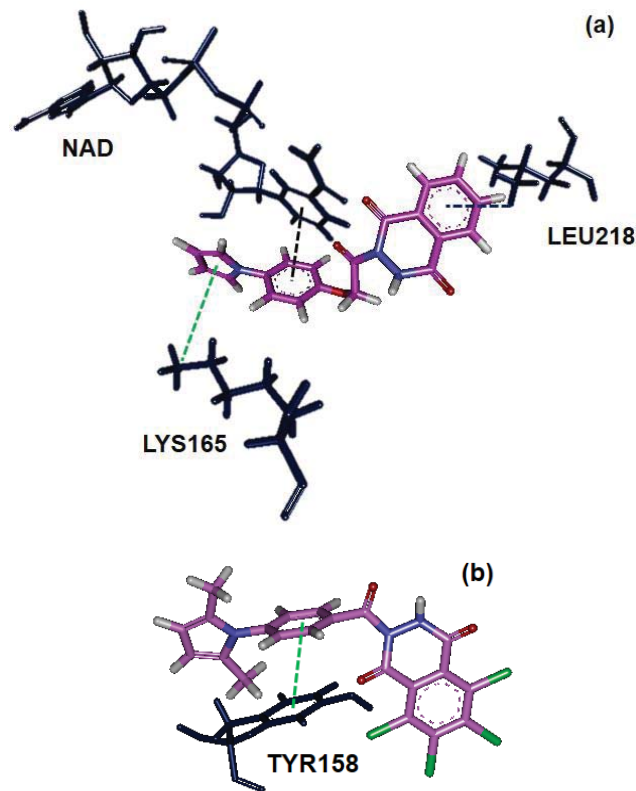
การเกิดพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) พันธะไฮโดรเจนเป็นอันตรกิริยาที่ดึงดูดกันระหว่างอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมอื่น ๆ ที่มีอิเล็กโตรเนกาติวิตี (electronegativity) สูงกว่า ซึ่งการพิจารณาการเกิดพันธะไฮโดรเจนของสารยับยั้งกับกรดอะมิโนของโมเลกุล InhA จากระยะห่างและมุมของพันธะทั้งสอง โดยโครงสร้างที่ 24 1 และ 5 คือโครงสร้างที่มีค่าการยับยั้งสูง 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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  เกิด 3 พันธะไฮโดรเจนจากอะตอมไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนและอะตอมคลอรีน 2 อะตอมที่ตำแหน่งต่างกัน ระยะห่าง 1.595 2.332 และ 2.276 Å ตามลำดับ (เส้นสีแดง)

การวางตัวของสารยับยั้งและโมเลกุลInhA ที่ทำให้เกิดพันธะโคเวเลนต์ ได้แก่ อันตรกิริยาระหว่างแคปไทออน-พันธะไพ อันตรกิริยาระหว่างพันธะซิกมา-พันธะไพและอันตรกิริยาระหว่างพันธะไพ-พันธะไพ ซึ่งมีเพียงโครงสร้างที่ 1 และ 24 ที่เกิดพันธะโคเวเลนต์กับกรดอะมิโนและโคแฟกเตอร์  $\text{NAD}^+$  ของโมเลกุล InhA แสดงดังรูปที่ 2 โดยโครงสร้างที่ 1 พบอันตรกิริยาจากไอออนบวกของอะตอมไนโตรเจนที่กรดอะมิโน Lys165 กับพันธะไพของวงไพโรล (pyrrole) ในโครงสร้างที่ 1 (เส้นสีเขียว) เกิดพันธะซิกมาของอะตอมไฮโดรเจนในกรดอะมิโน

Leu218 และพันธะไฮโดรเจนของวงเบนซีน (benzene ring) ของโครงสร้างที่ 1 (เส้นสีน้ำเงิน) และเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างวงเบนซีนของโคแฟกเตอร์  $\text{NAD}^+$  และโครงสร้างที่ 1 (เส้นสีดำ) แสดงดังรูป 2a และโครงสร้างที่ 24 เกิดพันธะไฮโดรเจนจากวงเบนซีนของกรดอะมิโน Tyr158 และโครงสร้างที่ 24 ดังรูปที่ 2b



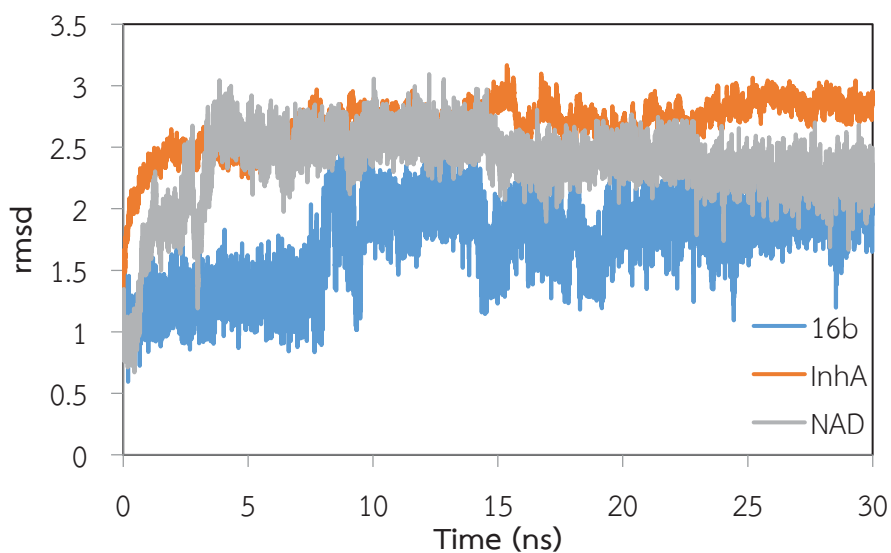
รูปที่ 1 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนของโมเลกุล InhA และโคแฟกเตอร์  $\text{NAD}^+$  กับ  
(a) โครงสร้าง 1 (b) โครงสร้าง 5 และ (c) โครงสร้าง 24



รูปที่ 2 การเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างกรดอะมิโนของโมเลกุล InhA และโคแฟกเตอร์  $\text{NAD}^+$  กับ  
(a) โครงสร้าง 1 และ (b) โครงสร้าง 24

## 2. การศึกษาวิธีการจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล

ศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนไปตามเวลาที่สนใจที่ทำให้โครงสร้างเสถียรจากรูปที่ 3 คือโครงสร้าง 24 ที่มีค่าการยับยั้งอยู่ในกลุ่มสูงและพบว่าเมื่อรันไป 25 นาโนวินาที โครงสร้างได้ค่า RMSD ใกล้เคียงกันนั้นแสดงถึงว่าโครงสร้างมีความเสถียรและนำโครงสร้างที่ 25 นาโนวินาที มาวิเคราะห์อันตรกิริยาซึ่งคาดว่าจะเป็นการทำงานที่จะทำต่อไป



รูปที่ 3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างตามระยะเวลาที่สนใจ

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการวางตัวโดยวิธีโมเลกุลาร์ดอกกิงของสารยับยั้งและโมเลกุลเป้าหมายโดยพิจารณาจากโครงสร้างทั้งหมดและนำมาแสดงการวางตัวและอันตรกิริยาของสารยับยั้งตามค่าการยับยั้งเป็นกลุ่มได้แก่ 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 ( $\text{CH}_3$ ) เกาะที่วงไพโรลทำให้เกิดอันตรกิริยาสูงและนอกจากนี้มีอะตอมโบรมีนเกาะที่วงเบนซีนอีกด้วยแต่ในโครงสร้างที่ 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](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 และการคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิงของสารอนุพันธ์ Pyrrolyl Benzohydrazide และ Pyrrolyl Benzamide เพื่อการยับยั้งเชื้อวัณโรค

อิสราภรณ์ เสี่ยงล้ำ<sup>1</sup> นฤตล ภูศรี<sup>1</sup> ชญาณิลห์ หาญวรินทร์<sup>1</sup> ทิมพิกา พรพรม<sup>1</sup> กัมปนาท ฉายจรัส<sup>1</sup> กัลย์ชญาภัท อริยะเชาวกุล<sup>2</sup> พฤทธิ คำศรี<sup>3</sup> อดิ พันกว้าง<sup>3</sup> สุภา หารหนองบัว<sup>4</sup> พัชรินาถ ททรัพย์อารม<sup>4</sup> คมสันต์ สุทธิสินทอง<sup>5</sup> และ พรพรม พึ่งโพธิ์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>2</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สาขาสาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>3</sup>ภาควิชาเคมี สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

<sup>4</sup>ภาควิชาเคมี สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<sup>5</sup>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 และศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลาร์ต็อกกิง เพื่อศึกษาความต้องการทางโครงสร้าง รูปแบบการจับและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ benzohydrazide pyrrolyl และ pyrrolyl benzamide ในโพรงการจับ InhA จากผลศึกษาแสดงอันตรกิริยาแบบพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Gly96 และ Met161 กับสารหมายเลข 18 ยังมีการเกิดอันตรกิริยาแบบพันธะไพ-ไพ ระหว่างวงอะโรมาติก Tyr158 และไพ-แคทไอออน เกิดอันตรกิริยาแบบระหว่างวงอะโรมาติกกับอะตอมไฮโดรเจนของ Phe149 นอกจากนี้ยังพบว่ามีอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิกระหว่างสารหมายเลข 18 23 และ 32 กับ Gly96, Phe97, Ala157, Tyr158, Met161, Ala198, Val203 และ Ile215 ข้อมูลสำคัญของอันตรกิริยาระหว่างสารยับยั้งกับเอนไซม์ และความต้องการทางโครงสร้างที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความสำคัญในการออกแบบและพัฒนายาตัวใหม่เพื่อใช้ในการต้านเชื้อวัณโรค

คำสำคัญ : เชื้อวัณโรค 3D QSAR การคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิง 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<sup>1</sup> Naruedon Phusi<sup>1</sup> Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup> Thimpika Pornprom<sup>1</sup> Kampanart Chayajarus<sup>1</sup> Kanchiyaphat Ariyachaokun<sup>2</sup> Pharit Kamsri<sup>3</sup> Auradee Punkvang<sup>3</sup> Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup> Supa Hannongbua<sup>4</sup> Khomson Suttisintong<sup>5</sup> and Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

<sup>2</sup>Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

<sup>3</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

<sup>5</sup>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 และมีจำนวนของผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มขึ้นทุกปี เป็นปัญหาหลักที่สำคัญในประเทศที่กำลังพัฒนา ด้อยพัฒนาและประเทศที่มีความหนาแน่นของประชากรสูง (Salla A Munro 2007) เอนไซม์ Enoyl-ACP reductase (InhA) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *M. tuberculosis* เนื่องจากเอนไซม์นี้เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดไขมัน mycolic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียวัณโรคก่อโรค (Drugs., 2004) นอกจากนี้ยังเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรควัณโรคของตัวยาหลักที่ใช้ในการรักษาคือยาไอโซไนอาซิด แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการรักษาโรควัณโรคของตัวยาไอโซไนอาซิดจะลดลง เนื่องจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ KatG ที่ทำหน้าที่กระตุ้นตัวยาไอโซไนอาซิดให้อยู่ในรูปอนุโมลิอิสระเพื่อจับกับ  $NAD^+$  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 จากนั้นนำโครงสร้างเหล่านี้ไปใช้ในการคำนวณด้วยวิธีการโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสามมิติ (3D-QSAR) โดยโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA แสดงดังตารางที่ 1

## การศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างสมบัติทางโครงสร้างโมเลกุลกับค่ากัมมันตภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพแบบสามมิติ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งแบบ 3D-QSAR ใช้วิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (Comparative Similarity Index Analysis, CoMSIA) (Ahmad, Islam, Ahmad, Dwivedi, & Hassan, 2019) ซึ่งเป็นวิธีด้าน Computer-Aided Molecular Design ขั้นตอนสำคัญในการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีนั้นอาจแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนคือ

### 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 อันตรกิริยาสเตอร์ริก อันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก การให้โปรตอน (H donor) และการรับโปรตอน (H acceptor) จากนั้นค่าอันตรกิริยาดังกล่าวจะถูกบันทึกไว้ในตาราง เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยระเบียบวิธี cross-validation และการถดถอยพหุคูณแบบพาร์เชียล (Partial Least Squares)

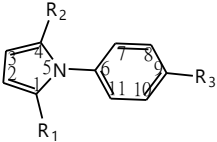
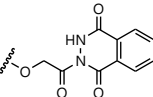
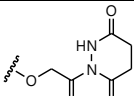
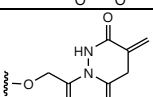
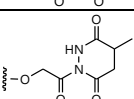
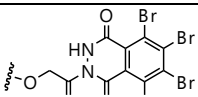
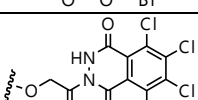
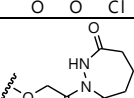
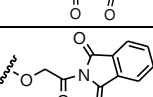
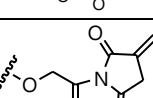
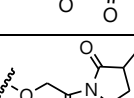
### 3. การแปลผล (Interpretation)

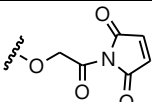
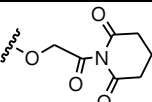
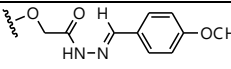
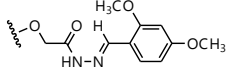
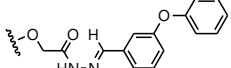
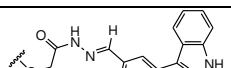
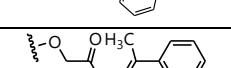
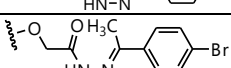
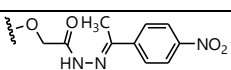
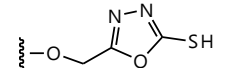
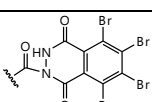
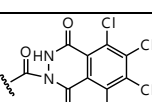
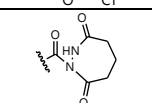
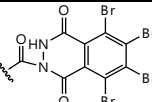
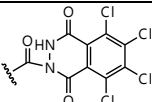
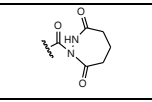
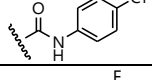
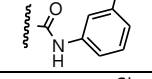
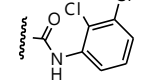
การประเมินผลว่าแบบจำลองใดที่ให้ผลการทำนายค่ากัมมันตภาพดีที่สุดนั้นจะอาศัยค่าความสามารถในการทำนาย (Predictive ability,  $q^2$ ) เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาโดยค่า  $q^2$  ควรมีค่าสูงกว่า 0.6 และการแปลผลจะแสดงในรูปของภาพคอนทัวร์ของสัมประสิทธิ์ (coefficient contour map)

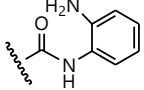
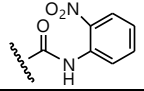
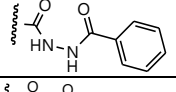
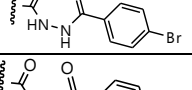
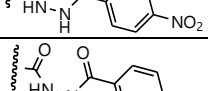
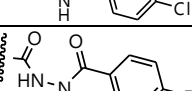
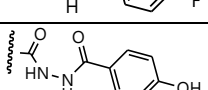
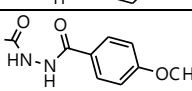
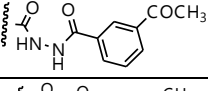
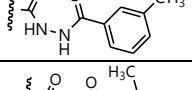
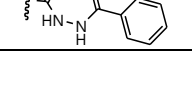
#### การศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ต็อกกิ้ง

โครงสร้างผลึก (X-ray crystallography) ของ InhA รหัส 2X23 ถูกนำมาใช้ศึกษาอันตรกิริยาที่สำคัญในโพรงการจับ 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 ( $\mu$ /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 <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |  | 3.12 | 5.34 |
| 25  | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |  | 3.12 | 5.20 |
| 26* | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |  | 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

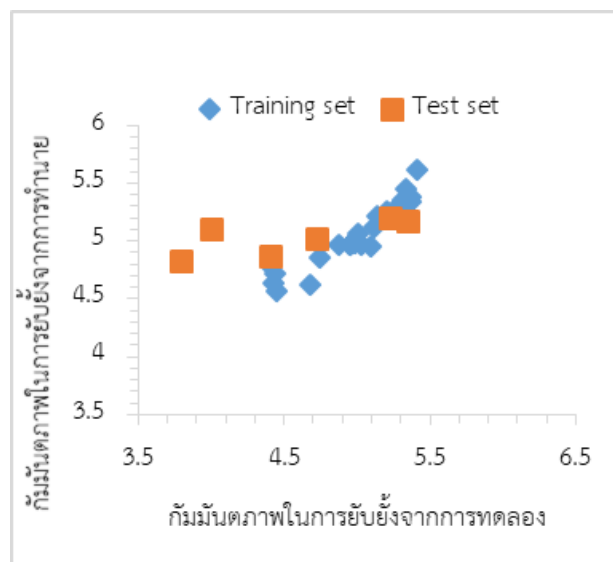
การศึกษาความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างสมบัติทางโครงสร้างโมเลกุลกับค่าสัมประสิทธิ์ทางชีวภาพแบบสามมิติ

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 และเมื่อทำการทดสอบการทำนายค่าสัมประสิทธิ์ในการยับยั้งที่ได้จาก CoMSIA model พบว่ามีความน่าเชื่อถือดังแสดงในรูปที่ 1(Ahamad et al., 2019)

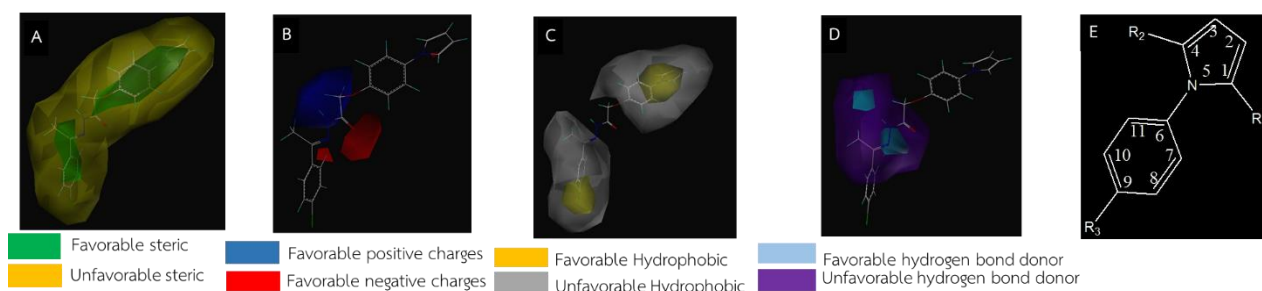
ตารางที่ 2 ค่าทางสถิติของการศึกษาแบบจำลอง CoMSIA model

| Field type | $q^2$ | $r^2$ | N | S     | SSE   | F      | อัตราส่วนการมีส่วนร่วม        |
|------------|-------|-------|---|-------|-------|--------|-------------------------------|
| 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 คือ standard error of prediction; SEE คือ standard error of estimate; F คือ F-test value; S คือ steric field; E คือ electrostatic field; H คือ hydrophobic field; HD คือ hydrogen 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 เนื่องจากมีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งสูงสุด รูปที่ 2 แผนภาพคอนทัวร์สามารถแปลผลได้เพียงแผนภาพคอนทัวร์สนามอิเล็กโตรสแตติก ส่วนแผนภาพคอนทัวร์สนามสเตอริก แผนภาพคอนทัวร์สนามไฮโดรโฟบิก และ แผนภาพคอนทัวร์สนามการให้โปรตอน ไม่สามารถนำมาแปลผลได้เนื่องจากมีการซ้อนทับกันของสีคอนทัวร์

พิจารณา R1 ซึ่งอยู่ใกล้ C1 โดยบริเวณ C1 อยู่ใกล้คอนทัวร์สีแดงขนาดเล็กแสดงว่าหมู่แทนที่ R1 จะต้องเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนจึงจะทำให้ C1 มีความเป็น negative charge หมู่ให้อิเล็กตรอนได้แก่ H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> เป็นต้น

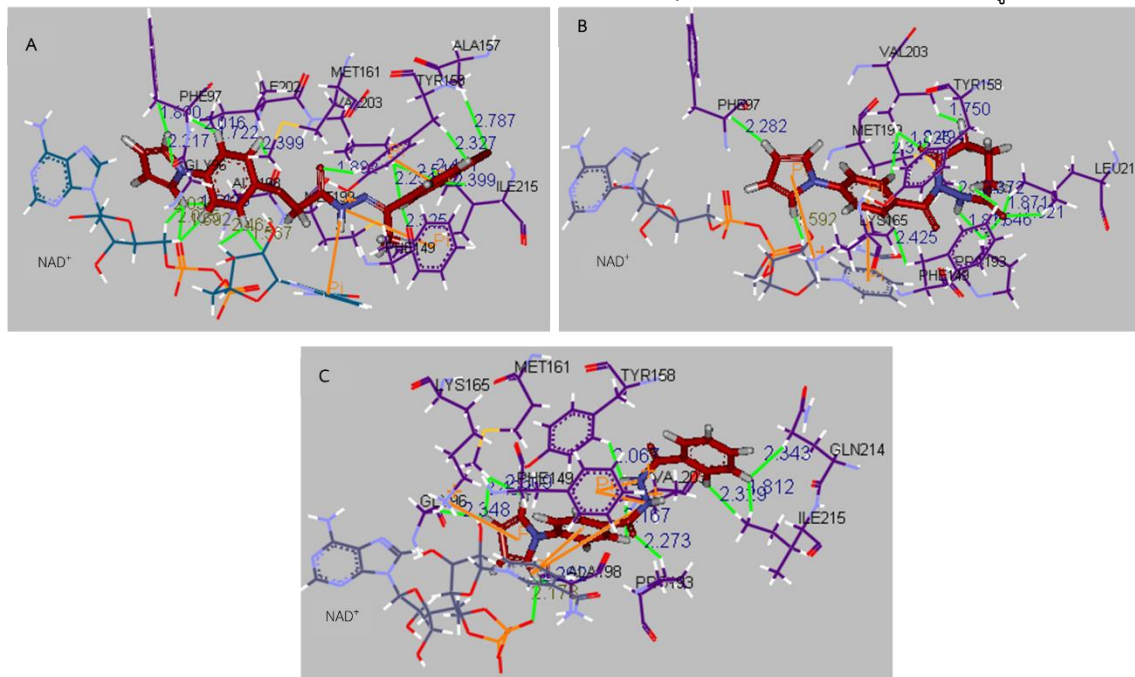
พิจารณา R3 คอนทัวร์สีน้ำเงินขนาดใหญ่แสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนจึงมีความเป็น positive charge หมู่ให้อิเล็กตรอนได้แก่ H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> เป็นต้น คอนทัวร์สีแดงขนาดใหญ่แสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนแสดงว่าบริเวณนั้นชอบความเป็น negative charge หมู่ดึงอิเล็กตรอนได้แก่ O และ S เป็นต้น และคอนทัวร์สีแดงขนาดเล็กแสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนแสดงว่าบริเวณนั้นชอบความเป็น negative charge หมู่ดึงอิเล็กตรอนได้แก่ F, Cl และ Br เป็นต้น

#### การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลที่สำคัญ

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 และ Ile215 มีการเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Gly96 และ Met161 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 จะต้องเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอน จึงจะทำให้ C1 มีความเป็น negative charge ที่บริเวณ R3 คอนทัวร์สีน้ำเงินขนาดใหญ่ที่หมู่คาร์บอนิลแสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนจึงมีความเป็น positive charge คอนทัวร์สีแดงขนาดใหญ่ที่ตำแหน่งออกซิเจนที่หมู่คาร์บอนิลแสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนแสดงว่าบริเวณนั้นชอบความเป็น negative charge นอกจากนี้ยังเกิดคอนทัวร์สีแดงขนาดเล็กที่ตำแหน่งไฮโดรเจนในบริเวณวงเบนซีน แสดงว่าบริเวณตรงนั้นต้องเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนแสดงว่าบริเวณนั้นชอบความเป็น negative charge เมื่อนำพิจารณาผลจากการศึกษาสรุปแบบการจับของสารสารอนุพันธ์ 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 ขอขอบคุณโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) (SCA-CO-2561-6957TH) สำหรับเงินทุนสนับสนุน ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 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., Sasic, 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<sup>1</sup>, Naruedon Phusi<sup>1</sup>, Thimpika Pornprom<sup>1</sup>, Kanchiyaphat Ariyachaokun<sup>2</sup>, Pharit Kamsri<sup>3</sup>, Auradee Punkvang<sup>3</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>, Khomson Suttisintong<sup>5</sup>, Prasat Kittakoop<sup>6</sup>, James Spencer<sup>7</sup>, Adrian Mulholland<sup>8</sup> and Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

<sup>2</sup>Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>3</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom, 48000, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900 Thailand

<sup>5</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

<sup>6</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>7</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom

<sup>8</sup>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<sup>1</sup>, Paptawan Tongdee<sup>1</sup>, Naruedon Phusi<sup>1</sup>, Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>, Thimpika Pornprom<sup>1</sup>, Kampanart Chayajarus<sup>1</sup>, Kanchiyaphat Ariyachaokun<sup>2</sup>, Pharit Kamsri<sup>3</sup>, Auradee Punkvang<sup>3</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>, Khomson Suttisintong<sup>5</sup>, Prasat Kittakoo<sup>6</sup>, James Spencer<sup>7</sup>, Adrian Mulholland<sup>8</sup> and Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>2</sup>Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>3</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>5</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

<sup>6</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>7</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom

<sup>8</sup>Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, United Kingdom

\*E-mail: [pornpan\\_ubu@yahoo.com](mailto: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<sup>+</sup> 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

## Interaction and Structural Requirement of 4-Thiazolidinone (Rhodanine) Inhibitors as Potential Anti-Tuberculosis Agents: MD Simulations, Molecular Docking Calculations and 3D-QSAR

Thimpika Pornprom<sup>1</sup>, Bandit Kham Sri<sup>1</sup>, Bongkochawan Pakamwong<sup>1</sup>, Paptawan Thongdee<sup>1</sup>, Issaraporn Saenglam<sup>1</sup>, Naruedon Phusi<sup>1</sup>, Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>, Kampanart Chayajarus<sup>1</sup>, Kanchiyaphat Ariyachaokun<sup>2</sup>, Pharit Kamsri<sup>3</sup>, Auradee Punkvang<sup>3</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>, Khomson Suttisintong<sup>5</sup>, Prasat Kittakoo<sup>6</sup>, James Spencer<sup>7</sup>, Adrian Mulholland<sup>8</sup>, Pornpan Pungpo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>2</sup>Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

<sup>3</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>5</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

<sup>6</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

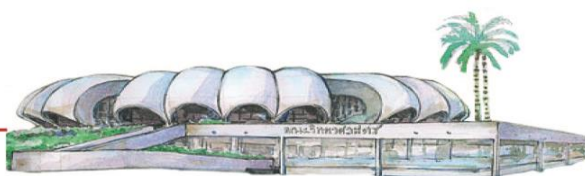
<sup>7</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom

<sup>8</sup>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<sup>+</sup> 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



## **Rational design of PknB inhibitors in class of 4-oxo-crotonic acid derivatives as highly potent anti-tuberculosis agents**

Chayanin Hanwarinroj,<sup>1</sup> Naruedon Phusi,<sup>1</sup> Pharit Kamsri,<sup>2</sup> Auradee Punkvang,<sup>2</sup>  
Patchareenart Saparpakorn,<sup>3</sup> Supa Hannongbua,<sup>3</sup> Khomson Suttisintong,<sup>4</sup>  
and Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

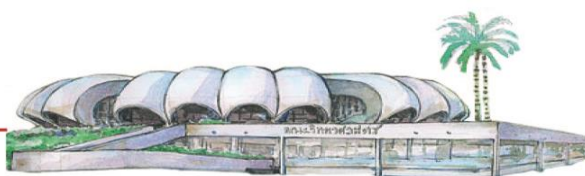
<sup>4</sup>National Nanotechnology Center, 114 Thailand Science Park, Pathumthani, Thailand

\*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





## Molecular docking and 3D-QSAR study of pyrrolyl benzohydrazide derivatives to explore the structure requirements of InhA inhibitors

Paptawan Thongdee<sup>1</sup>, Bongkochawan Pakamwong<sup>1</sup>, Kotchakorn Yotyiamkrae<sup>1</sup>,  
Bunrat Tharat<sup>1</sup>, Bundit Khamisri<sup>1</sup>, Thitima Chuansupak<sup>1</sup>, Naruedon Phusi<sup>1</sup>,  
Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>, Kampanart Chayajarus<sup>1</sup>, Pharit Kamsri<sup>2</sup>, Auradee Punkvang<sup>2</sup>,  
Nitima Suttipanta<sup>3</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>, Prasart Kittakoop<sup>5</sup>,  
Ubonsree Leartsakulpanich<sup>6</sup>, Khomson Suttisintong<sup>7</sup>, James Spencer<sup>8</sup>, Adrian Mulholland<sup>9</sup>  
and Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

<sup>2</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom, 48000, Thailand

<sup>3</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900 Thailand

<sup>5</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>6</sup>National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

<sup>7</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

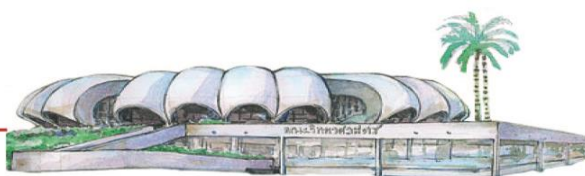
<sup>8</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom

<sup>9</sup>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<sup>+</sup> cofactor. Moreover, pi-pi interaction and hydrophobic interactions were improved the binding affinity of inhibitors in InhA binding site. Reliable 3D-QSAR model was obtained based on q<sup>2</sup> 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



## Molecular modeling, design and synthesis of InhA inhibitors in the class of Benzimidazole derivatives as a novel Anti-tuberculosis agents

Bunrat Tharat<sup>1</sup>, Bongkochawan Pakanwong<sup>1</sup>, Paptawan Thongdee<sup>1</sup>,  
Kotchakorn Yotyiamkrae<sup>1</sup>, Bundit Khamsri<sup>1</sup>, Thitima Chuansupak<sup>1</sup>, Naruedon Phusi<sup>1</sup>,  
Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>, Kampanart Chayajaras<sup>1</sup>, Nitima Suttipanta<sup>2</sup>, Pharit Kamsri<sup>3</sup>,  
Auradee Punkvang<sup>3</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>, Prasart Kittakoop<sup>5</sup>,  
Khomson Suttisintong<sup>6</sup>, Adrian Mulholland<sup>7</sup>, James Spencer<sup>8</sup> and Pornpan Pungpo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190

<sup>3</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom, 48000, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900 Thailand

<sup>5</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>6</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, 111 Thailand Science Park, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand

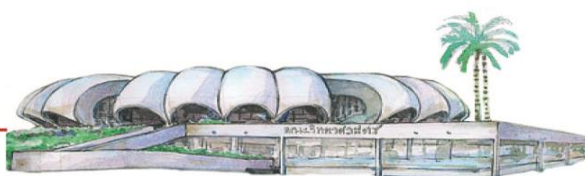
<sup>7</sup>Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, BS8 1TS, United Kingdom

<sup>8</sup>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 bioisoster 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



## ***In-silico* Aided Inhibitor Design of Benzoimidazole-containing Derivatives as Novel Direct InhA Inhibitors**

Pharit Kamsri<sup>1,\*</sup>, Auradee Punkvang<sup>1</sup>, Patchreenart Saparpakorn<sup>2</sup>, Supa Hannongbua<sup>2</sup>, Sanya Sureram<sup>3</sup>, Prasat Kittakoop<sup>3</sup>, Nitima Suttipanta<sup>4</sup>, Khomson Suttisintong<sup>5</sup>, Adrian Mulholland<sup>6</sup>, James Speccer<sup>7</sup>, Pornpan Pungpo<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>3</sup>Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

<sup>4</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

<sup>5</sup>National Nanotechnology Center, NSTDA, Pathum Thani 12120, Thailand

<sup>6</sup>Centre for Computational Chemistry, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK

<sup>7</sup>School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK

<sup>8</sup>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<sub>50</sub>) 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





**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<sup>1</sup>  
bunrat30353@gmail.com

Naruedon Phusi<sup>1</sup>, Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>, Kampanart Chayajaras<sup>1</sup>, Nitima Suttipanta<sup>2</sup>,  
Pharit Kamsri<sup>3</sup>, Auradee Punkvang<sup>3</sup>, Patchareenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>,  
Khomson Suttisintong<sup>5</sup>

Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>  
pornpan\_ubu@yahoo.com

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University,  
Ubon Ratchathani, Thailand

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University, Thailand

<sup>3</sup>Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom, Thailand

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand

<sup>5</sup>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 Sarpapakorn, 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

นฤตล ภูศรี<sup>1</sup> ทิมพิกา พรพรม<sup>1</sup> ชญาณิลห์ หาญวรินทร์<sup>1</sup> บัณฑิต คำศรี<sup>1</sup> บงกชวรรณ พาคำวงศ์<sup>1</sup> ภาพตะวัน ทองดี<sup>1</sup>

กัมปนาท ฉายจรัส<sup>1</sup> นิธิมา สุทธิพันธ์<sup>2</sup> พฤทธิ คำศรี<sup>3</sup> อรดี พันธุ์กว้าง<sup>3</sup> พิชรินทร์ ทรัพย์อากาศกรณ<sup>4</sup>

สุภา หารทองบัว<sup>4</sup> พจนีย์ ศรีมาโนชญ์<sup>5</sup> คมสันต์ สุทธิสินทอง<sup>6</sup> และ พรพรรณ พิงโพธิ์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>2</sup> คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>3</sup> สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

<sup>4</sup> ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<sup>5</sup> คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

<sup>6</sup> ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

\* E-mail : pornpan\_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

### บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาระเบียบวิธีการทางด้านการออกแบบโมเลกุลด้วยการคำนวณมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาและปรับเปลี่ยนสารยับยั้งของโมเลกุลเป้าหมายชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในการยับยั้ง เอนไซม์อีโนอินเอสซิพีรีดักเตส หรือ เอนไซม์ InhA ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายในการออกฤทธิ์ยับยั้งของตัวยาหลักในการรักษาโรควัณโรคอย่างยาไอโซไนอาซิด ซึ่งการดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดเกี่ยวเนื่องจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ InhA ในการพัฒนายาต้านโรควัณโรคซึ่งสารยับยั้งโรควัณโรคที่ถูกนำมาทำการศึกษาในการพัฒนาสารยับยั้งเชื้อโรควัณโรคคือ สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลวาล์วตอกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติถูกประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาข้อมูลที่สำคัญของตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ทำให้ทราบถึงรูปแบบการวางตัวในโพรงการจับของตัวยับยั้งอันตรกิริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นในโพรงการจับและความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA ซึ่งเป็นแนวทางในการออกแบบตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA มีศักยภาพสูงขึ้น

**คำสำคัญ** : สารอนุพันธ์ heteroaryl benzamide การคำนวณโมเลกุลวาล์วตอกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับค่ากัมมันตภาพในเชิงสามมิติ



## Elucidating the Structural Basis of InhA Inhibitors for Anti-Tuberculosis Agents: Ligand and Structure Based Drug Design Approaches

Naruedon Phusi<sup>1</sup>, Thimpika Pornprom<sup>1</sup>, Chayanin Hanwarinroj<sup>1</sup>, Bundit Khamsri<sup>1</sup>,  
Bongkochawan Pakamwong<sup>1</sup>, Paptawan Thongdee<sup>1</sup>, Thitima Chuansupak<sup>1</sup>, Kampanart Chayarus<sup>1</sup>,  
Nitima Suttipanta<sup>2</sup>, Pharit Kamsri<sup>3</sup>, Auradee Punkvang<sup>3</sup>, Patchareenart Saparpakorn<sup>4</sup>, Supa Hannongbua<sup>4</sup>,  
Potjane Srimanote<sup>5</sup>, Khomson Suttisintong<sup>6</sup> and Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

<sup>2</sup> Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University

<sup>3</sup> Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University

<sup>4</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

<sup>5</sup> Faculty of Allied Health Science, Thammasat University

<sup>6</sup> 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 (3D-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 หาญวสินโรจน์<sup>1\*</sup> นฤตล ภูศรี<sup>1</sup> พงษ์สิทธิ์ คำศรี<sup>2</sup> อรดี พันแก้ว<sup>2</sup> กัมปนาท ฉายจรัส<sup>1</sup> นิธิมา สุทธิพันธุ์<sup>3</sup>

พัชรินทร์ ทรัพย์อาภากรณ<sup>4</sup> สุภา หารหนองบัว<sup>4</sup> คมสันต์ สุทธิสินทอง<sup>5</sup> และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>2</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

<sup>3</sup>คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>4</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<sup>5</sup>ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

\*E-mail: pornpan\_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

### บทคัดย่อ

โรควัณโรคเกิดจากเชื้อไมโครแบคทีเรียทูปเอร์คิวโลซิส (*Mycobacterium tuberculosis*) เอนไซม์ ดีคาร์บอซิลเพปติดาส-เบต้า-ดี-โรโบส-2-อีพิเมอร์เอส (DprE1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ arabinogalactan ที่ผนังเซลล์ของไมโครแบคทีเรียทูปเอร์คิวโลซิส และยังคงค้นพบว่าเป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับการพัฒนาเป็นยับยั้งโรควัณโรค สารอนุพันธ์ 4 aminoquinolone piperidine amide เป็นสารยับยั้งโรควัณโรคชนิดนอนโควาลেন্ট สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ถูกพัฒนาเพื่อเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 อย่างไรก็ตาม สารยับยั้งเอนไซม์ DprE1 ชนิดพัฒนาขึ้นมายังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ระเบียบวิธี 3D-QSAR การคำนวณโมเลกุลาร์ดีค็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล และการคำนวณ fragment molecular orbital (FMO) ถูกประยุกต์ใช้เพื่อทำให้ทราบถึงความต้องการทางโครงสร้างและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้เข้าใจถึงความต้องการทางโครงสร้างรูปแบบการจับ และอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ 4-aminoquinolone piperidine amide เพื่อใช้เป็นแนวทางในการออกแบบสารยับยั้งโรควัณโรคให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

**คำสำคัญ :** เอนไซม์ดีคาร์บอซิลเพปติดาส-เบต้า-ดี-โรโบส-2-อีพิเมอร์เอส ไมโครแบคทีเรียทูปเอร์คิวโลซิส 3D-QSAR การคำนวณโมเลกุลาร์ดีค็อกกิ้ง การจำลองแบบพลวัตเชิงโมเลกุล การคำนวณ fragment molecular orbital

## Computer Aided Molecular Design of 4-aminoquinolone piperidine amides Derivatives as Highly Potent Anti-Tuberculosis Agents

Chayanin Hanwarinroj<sup>1\*</sup> Naruedon Phusi<sup>1</sup> Pharit Kamsri<sup>2</sup> Auradee Punkvang<sup>2</sup> Patchareenart Saparpakorn<sup>3</sup>

Supa Hannongbua<sup>3</sup> Khomson Suttisintong<sup>4</sup> and Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

<sup>4</sup> 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- $\beta$ -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- $\beta$ -D-ribose oxidase (DprE1), *M. tuberculosis*, 3D-QSAR Molecular Docking Calculations, Molecular Dynamic Simulations, Fragment Molecular Orbitals Approach

## การศึกษารูปแบบการจับและอันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ Pyrrolyl benzohydrazide โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ดอกกิ้งและการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล

ภาพตะวัน ทองดี<sup>1</sup> จิมพิกา พรพรม<sup>1</sup> บัณฑิต คำศรี<sup>1</sup> บงกชวรรณ พาคำวงศ์<sup>1</sup> นฤตล ภูศรี<sup>1</sup>  
ชญาณิลห์ หาญวรินทร์<sup>1</sup> กัมปนาท ฉายจรัส<sup>1</sup> พฤทธิ คำศรี<sup>2</sup> อรดี พันธุ์กว้าง<sup>2</sup> พชรินทร์ ทรัพย์อาภากรณ<sup>3</sup>  
สุภา หารหนองบัว<sup>3</sup> พงษ์ ศรีมาโนชญ์<sup>4</sup> คมสันต์ สุทธิสินทอง<sup>5</sup> และ พรพรม พิงโพธิ์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>2</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

<sup>3</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<sup>4</sup>คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

<sup>5</sup>ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

\*E-mail: pornpan\_ubu@yahoo.com (Corresponding author)

### บทคัดย่อ

*M. tuberculosis* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการเกิดวัณโรคซึ่งมี Enoyl ACP reductase (ENR) หรือ InhA เป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบหลักของแบคทีเรีย ดังนั้นเอนไซม์ InhA จึงเป็นเป้าหมายในการพัฒนาเพื่อยับยั้งวัณโรค ปัจจุบันมียาไอโซไนอะไซด์ เป็นยาที่ยับยั้ง *M. tuberculosis* แต่พบว่าเมื่อใช้ยาไอโซ-ไนอะไซด์ต่อเนื่องจะเกิดการดื้อยาซึ่งสาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของ KatG งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของตัวยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยมีอนุพันธ์ของ Pyrrolyl benzohydrazide เป็นพื้นฐานและใช้วิธีโมเลกุลาร์ดอกกิ้งเพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารกลุ่มยับยั้งกับ InhA เป้าหมาย ซึ่งพบว่าสารยับยั้งเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนใน InhA ได้แก่ พันธะไฮโดรเจนที่ Pro156 Tyr158 Ala198 Val203 และโคแฟกเตอร์ NAD<sup>+</sup> และพันธะไพซึ่งเป็นอันตรกิริยาที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพระหว่างสารกลุ่มยับยั้งและโมเลกุล InhA ได้และใช้วิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่ทำให้โครงสร้างเสถียรที่สุด ซึ่งจากการวิเคราะห์ร่วมกันสามารถนำมาออกแบบโครงสร้างใหม่เพื่อยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้อย่างสมเหตุสมผล

**คำสำคัญ :** วัณโรค โมเลกุลาร์ดอกกิ้ง วิธีการจำลองแบบทางพลวัตเชิงโมเลกุล

## Elucidating of Binding Modes and Crucial Interactions of Pyrrolyl Benzohydrazide using Molecular Docking Calculations and Molecular Dynamic Simulations Approaches

Paptawan Thongdee,<sup>1</sup> Thimpika Pornprom,<sup>1</sup> Bandit Khamsri,<sup>1</sup> Bongkochawan Pakamwong,<sup>1</sup> Naruedon Phusi,<sup>1</sup> Chayanin Hanwarinroj,<sup>1</sup> Kampanart Chayajarus,<sup>1</sup> Pharit Kamsri,<sup>2</sup> Auradee Punkvang,<sup>2</sup> Patchareenart Saparpakorn,<sup>3</sup> Supa Hannongbua,<sup>3</sup> Potjanee Srimanote,<sup>4</sup> Khomson Suttisintong<sup>5</sup> and Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

<sup>4</sup>Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus

<sup>5</sup>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<sup>+</sup> 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 ซึ่งเป็นการยับยั้งโรควัณโรค ที่มีศักยภาพสูง: การคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง

ทิมพิกา พรพรม<sup>1</sup> บัณฑิต คำศรี<sup>1</sup> บงกชวรรณ พาคำวงศ์<sup>1</sup> ภาพตะวัน ทองดี<sup>1</sup> นฤตล ภูศรี<sup>1</sup> ชญาณิลห์ หาญวรินทร์<sup>1</sup>  
กัมปนาท ฉายจรัส<sup>1</sup> นิธิมา สุทธิพันธุ์<sup>2</sup> พงษ์สิทธิ์ คำศรี<sup>3</sup> อรดี พันธุ์กว้าง<sup>3</sup> พชรินทร์ ทรัพย์อาภากรณ<sup>4</sup> สุภา ทารหนองบัว<sup>4</sup>  
พจนีย์ ศรีมานิชญ์<sup>5</sup> คมสันต์ สุทธิสินทอง<sup>6</sup> และ พรพรรณ พิงโพธิ์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>2</sup>คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>3</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

<sup>4</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<sup>5</sup>คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

<sup>6</sup>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 การคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งถูกประยุกต์ใช้ เพื่อให้เข้าใจถึงอันตรกิริยาที่สำคัญ และรูปแบบการจับของสารอนุพันธ์ควินาโซลิน ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ผลจากการศึกษาพบว่าระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งให้ค่าความน่าเชื่อถือจากการคำนวณโดยพิจารณาจากค่า RMSD ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.27 อังสตรอม เมื่อทำการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญของสารอนุพันธ์ควินาโซลินพบว่า เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Leu17 Val95 Gly97 และ Asp102 ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB นอกจากนี้ ยังพบอันตรกิริยาแบบแวนเดอร์วาลส์กับกรดอะมิโน Val25 Val98 และ Ala142 ในโพรงการจับของเอนไซม์ PknB ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากผลการศึกษาวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งทำให้เข้าใจถึงความต้องการทางโครงสร้างของสารอนุพันธ์ควินาโซลินสำหรับการออกแบบสารยับยั้งเอนไซม์ PknB ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งวัณโรคที่สูงขึ้น

**คำสำคัญ :** สารอนุพันธ์ควินาโซลิน ไมโครแบคทีเรียทูปอร์คูโลซิส การคำนวณโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง



## Structure Based Drug Design of Quinazoline Derivatives as Highly Potent Anti-Tuberculosis Agents : Molecular Docking Calculations

Thimpika Pornprom,<sup>1</sup> Bandit Khamsri,<sup>1</sup> Bongkochawan Pakamwong,<sup>1</sup> Paptawan Thongdee<sup>1</sup>  
Naruedon Phusi<sup>1</sup> Chayanin Hanwarinroj,<sup>1</sup> Kampanart Chayajarus,<sup>1</sup> Nitima Suttipanta,<sup>2</sup>  
Pharit Kamsri,<sup>3</sup> Auradee Punkvang,<sup>3</sup> Patchareenart Saparpakorn,<sup>4</sup> Supa Hannongbua,<sup>4</sup>  
Potjanee Srimanote,<sup>5</sup> Khomson Suttisintong<sup>6</sup> and Pornpan Pungpo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchathani University

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

<sup>5</sup>Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus

<sup>6</sup>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