

การค้นหาและออกแบบสารอนุพันธ์แซนโทนเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ InhA เพื่อใช้เป็นสารต้านวัณโรค
ด้วยการคัดสรรเสมือนจริงและการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

Discovery and Design of Xanthone Derivatives as InhA Inhibitors for Antituberculosis

Agents Using Virtual Screening and Molecular Dynamics Simulations

นฤตล ภูศรี¹ ภาพตะวัน ทองดี¹ บงกชวรรณ พาคำวงศ์¹ ทิมพิกา พรพรหม¹ กัมปนาท ฉายจรัส¹ จิดาภา แสงสวันต์²

อรดี พันธุ์กว้าง³ คมสันต์ สุทธิสินทอง⁴ ประสาท กิตตะคุปต์^{5,6,7} และ พรพรหม พึ่งโพธิ์^{1*}

Naruedon Phusi¹ Paptawan Thongdee¹ Bongkochawan Pakamwong¹ Thimpika Pornprom¹

Kampanart Chayajarus¹ Jidapa Sangswan² Auradee Punkvang³ Khomson Suttisintong⁴

Prasat Kittakoop^{5,6,7} and Pornpan Pungpo^{1*}

¹ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

อุบลราชธานี 34190 ประเทศไทย

²ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190 ประเทศไทย

³สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม นครพนม 48000 ประเทศไทย

⁴ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี 70171 ประเทศไทย

⁵สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพมหานคร 10210 ประเทศไทย

⁶สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์ ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพมหานคร 10210 ประเทศไทย

⁷ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อมและพิษวิทยา กรุงเทพมหานคร 10210 ประเทศไทย

¹Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science,

Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

²Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University,

Ubon Ratchathani 34190, Thailand

³Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand

⁴National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency,

Pathum Thani 70171, Thailand

⁵Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

⁶Chulabhorn Graduate Institute, Chulabhorn Royal Academy, Bangkok 10210, Thailand

⁷Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology, Bangkok 10210, Thailand

*E-mail: pornpan.p@ubu.ac.th

Received: Feb 18, 2025

Revised: Mar 27, 2025

Accepted: Apr 04, 2025

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาสารต้านวัณโรคชนิดใหม่จากสารอนุพันธ์แซนโทนที่สามารถยับยั้งการทำงานของ InhA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยได้รวบรวมโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มแซนโทนจำนวน 19,856 โครงสร้างจากฐานข้อมูล PubChem เพื่อนำมาทำการคัดสรรเสมือนจริง ซึ่งคัดเลือกสารประกอบกลุ่มแซนโทน 3 โครงสร้างที่มีศักยภาพ โดยสามารถเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญและมีพลังงานการจับกับเอนไซม์ InhA เมื่อนำมาศึกษาแบบการจับตัวและอันตรกิริยาสำคัญภายในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA โดยใช้วิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล ผลการศึกษาพบว่า หมู่ไฮดรอกซิลที่ติดกับโครงสร้างของแซนโทนมีบทบาทสำคัญในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Tyr158 และโคแฟกเตอร์ NADH ซึ่งช่วยเสริมฤทธิ์ในการยับยั้ง InhA ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

นอกจากนี้ สารหมายเลข 1 ยังแสดงอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโนที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกในโพรงการจับของ InhA ได้แก่ Phe149, Met155, Pro156, Ala157, Pro193, Met199 และ Leu218 จากผลการศึกษาดังกล่าว ได้มีการออกแบบสารยับยั้ง InhA ตัวใหม่อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้สารหมายเลข 1 เป็นแม่แบบ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้น ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้สามารถให้ข้อมูลเชิงโครงสร้างที่มีคุณค่าในระดับโมเลกุล และนำไปสู่การพัฒนาสารต้านวัณโรคชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในอนาคต

คำสำคัญ: สารยับยั้งเอนไซม์ InhA สารต้านวัณโรค การคัดสรรเสมือนจริง สารอนุพันธ์แซนโทน การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

Abstract

This research aimed to identify novel anti-tuberculosis compounds from xanthone derivatives effectively inhibiting InhA activity. A total of 19,856 xanthone structures were retrieved from the PubChem database and subjected to virtual screening. Three promising xanthone compounds demonstrating key interactions and strong binding affinity with the InhA enzyme were selected. These compounds were further analyzed to investigate their binding modes and key interactions within the InhA active site using molecular dynamics simulations. The results revealed that the hydroxyl groups attached to the xanthone core played a crucial role in forming hydrogen bond interactions with the amino acid Tyr158 and the NADH cofactor, thereby enhancing their inhibitory efficacy against InhA. Additionally, compound 1 exhibited hydrophobic interactions with non-polar amino acid residues in the InhA binding pocket, including Phe149, Met155, Pro156, Ala157, Pro193, Met199, and Leu218. Based on these findings, a promising InhA inhibitor was rationally designed using compound 1 as a template, demonstrating improved efficacy. The results of this study provide valuable molecular-level structural insights, contributing to the development of promising new anti-tuberculosis agents in the future.

Keywords: InhA inhibitors, Anti-tuberculosis agent, Virtual screening, Xanthone derivatives, Molecular dynamics simulations

1. บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis, TB) เป็นโรคติดต่อที่มีการแพร่กระจายเชื้อทางอากาศ ทำให้วัณโรคยังคงเป็นหนึ่งในสาเหตุต้น ๆ ในการเสียชีวิตของประชากรโลก จากการรายงานขององค์การอนามัยโลกปี พ.ศ. 2566 มีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ทั่วโลกมากถึง 8.2 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจากวัณโรคถึง 1.25 ล้านคน สำหรับสถานการณ์วัณโรคในประเทศไทยนั้น องค์การอนามัยโลกจัดให้ประเทศไทยอยู่ใน 1 ใน 30 [1] ของประเทศทั่วโลกที่มีภาวะวัณโรคสูงสุด วัณโรคเกิดปัญหาการดื้อยาเป็นอุปสรรคสำคัญในการรักษาวัณโรคให้หายขาด ในปัจจุบันได้นำยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) เลโวฟล็อกซาซิน (Levofloxacin) โอฟล็อกซาซิน (Ofloxacin) ม็อกซิฟล็อกซาซิน (Moxifloxacin) มาใช้ในการรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant TB, MDR-TB) จากการรักษานี้ทำให้เชื้อวัณโรคดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone ส่งผลให้เกิดปัญหาวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (Extensive drug resistant TB, XDR-TB) [1] ปัจจุบันยังไม่มีตัวยาเฉพาะสำหรับรักษาวัณโรคดื้อยาแต่ทำได้เพียงใช้ยา

หลายขนานร่วมกันในการรักษาและใช้ระยะเวลาในการรักษา ยาวนานมากขึ้น [2], [3] ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องค้นหาและพัฒนาายากลุ่มใหม่ที่จำเพาะต่อการรักษาวัณโรคดื้อยาทั้งชนิด MDR และ XDR ไอโซไนอาซิด (Isoniazid, INH) เป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาวัณโรคเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ด้วยยาี้สามารถต้านวัณโรคได้โดยการเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ InhA โดยในขั้นตอนแรกไอโซไนอาซิดต้องถูกกระตุ้นให้อยู่ในรูปอนุโมลอิสระโดยเอนไซม์ *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) หลังจากนั้นอนุโมลอิสระของไอโซไนอาซิดที่เกิดขึ้นนี้จะสร้างพันธะกับ NADH เกิดเป็นสารประกอบของไอโซไนอาซิดกับ NADH (INH-NAD adduct) ซึ่งสารประกอบ INH-NAD ที่เกิดขึ้นนี้จะเข้าจับกับเอนไซม์ในตำแหน่ง cofactor binding เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ InhA [4]-[8] แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของยาไอโซไนอาซิดในการต้านวัณโรคจะลดลงเมื่อเกิดกลายพันธุ์ในเอนไซม์ katG และเอนไซม์ InhA [4]-[14] ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดวัณโรคดื้อยาชนิด MDR ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาวัณโรคดื้อยาไอโซไนอาซิดจึงได้มีกลุ่มวิจัย

ศึกษาและค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ที่มีกลไกยับยั้งแตกต่างจากยาไอโซไนอาซิด [15]-[30] โดยสารยับยั้งกลุ่มใหม่ เช่น ไพร์โรลิดีน คาร์บอกซาไมด์ (Pyrrolidine carboxamide) [15] อะริลเอไมด์ (Aryl amide) และ ไดฟีนีลอีเทอร์ (Diphenyl ether) [16], [19]-[20] จะเข้าจับกับเอนไซม์ในตำแหน่ง substrate binding เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ InhA ซึ่งตำแหน่งการจับนี้จะแตกต่างกับตัวยาไอโซไนอาซิดที่เข้าจับในตำแหน่ง cofactor binding ทำให้การกลายพันธุ์ในบริเวณ cofactor binding ของเอนไซม์ InhA (Ile21Val และ Ser94Ala) [21]-[23] ไม่ส่งต่อการจับของสารยับยั้งกลุ่มใหม่ที่เข้าจับในบริเวณ substrate binding

งานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารประกอบกลุ่มแซนโทน (Xanthone derivatives) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อวัณโรคคือยาหลายขนาน โดยกลุ่มวิจัยพบว่า alpha-mangostin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแซนโทน แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* [1] และเอนไซม์ InhA ได้อย่างมีประสิทธิภาพและจากการศึกษาของกลุ่มงานวิจัยพบสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA จากสารสกัดมังคุด โดยพบว่า alpha-mangostin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแซนโทน แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยค่า minimal inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 6.2 µg/mL และสามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 19.81 µM ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการค้นหาสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA ซึ่งเป็นหนึ่งในแนวทางที่มีศักยภาพในการแก้ไขปัญหาวัณโรคคือยาหลายขนาน โดยมุ่งเน้นไปที่การศึกษาและค้นหาสารในกลุ่มแซนโทน โดยการคัดสรรเสมือนจริงและการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล ที่จะพัฒนาต่อยอดเพื่อปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของสารให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่สูงขึ้น เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านวัณโรคคือยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. รวบรวมโครงสร้างของสารกลุ่มแซนโทน

ทำการรวบรวมโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มแซนโทน จากฐานข้อมูล PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยวิธีการค้นหาโครงสร้างย่อย (substructure search) [31]

2.2. การคัดสรรเสมือนจริง

รวบรวมโครงสร้างสารกลุ่มแซนโทน จากฐานข้อมูล

PubChem จากนั้นทำนายค่าสมบัติความเป็นยา (Drug-likeness) และเคมีของยา (Medicinal chemistry) ของสารกลุ่มแซนโทนที่รวบรวมได้ด้วย SwissADME free web-server tool (<http://www.swissadme.ch/>) [32] เพื่อใช้เป็นตัวคัดกรองคุณสมบัติทางยาของสารกลุ่มแซนโทน โครงสร้างที่ผ่านการคัดกรองคุณสมบัติทางยาจะถูกนำมาศึกษารูปแบบการวางตัว รูปแบบอันตรกิริยาและค่าพลังงานการจับในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA (PDB code 4R9S) [33] ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ดีค็อกกิง (Molecular docking calculation) Glide XP mode ดังแสดงในงานวิจัยที่ผ่านมา [34] โครงสร้างสารกลุ่มแซนโทนที่มีค่าพลังงานการจับ 100 อันดับแรกจะถูกนำมาพิจารณาอันตรกิริยาที่สำคัญ ได้แก่ พันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Tyr158 และโคแฟกเตอร์ NADH เพื่อคัดกรองสารกลุ่มแซนโทนที่จะเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่เป็นสารต้านวัณโรค เรียกว่า ฮิต (Hit) (Figure 1) และทำการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (Molecular dynamics (MD) simulations)

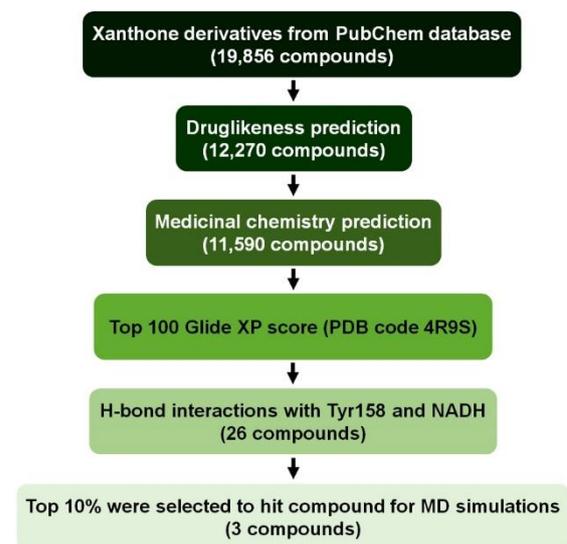


Figure 1 Virtual screening and validation workflow for discovery of InhA inhibitors.

2.3. การศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ดีค็อกกิง

ตรวจสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณโมเลกุลาร์ดีค็อกกิง (Molecular docking calculation) ของโครงสร้างลิแกนด์ (Co-crystal structure) ใน PDB code 4R9S พิจารณาค่า RMSD มีค่าน้อยกว่า 1 Å จากการศึกษาพบว่าค่า RMSD คือ 0.5 Å แสดงให้เห็นว่าโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณโมเลกุลาร์ดีค็อกกิงมีความน่าเชื่อถือ

2.4. การออกแบบอย่างมีเหตุผลของสารอนุพันธ์แซนโทน

จากการคัดสรรเสมือนจริงและพิจารณา docking score ของสารหมายเลข 1 พบว่ามีค่าต่ำสุดจึงถูกเลือกมาใช้เป็นแม่แบบในการออกแบบสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพและศึกษารูปแบบการจับและอันตรกิริยาที่สำคัญจากระเบียบวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล โดยมีรายละเอียดดังนี้ 1) เปลี่ยนหมู่แทนที่ R ของสารหมายเลข 1 เป็นหมู่ hydrophobic โดยใช้ SwissBioisostere (Figure 2) เป็นฐานข้อมูลเพื่อพิจารณาโมเลกุลที่สามารถเพิ่มอันตรกิริยาสำคัญภายในโพรงจับของเอนไซม์ โดยเลือกเฉพาะหมู่แทนที่ที่แสดงเป็นสีเขียว ที่จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้ 2) นำสารออกแบบยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ ไปทำนายสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ โดยใช้โปรแกรม SwissADME 3) นำสารออกแบบยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ ศึกษาการวางตัวรูปแบบการจับและเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญ ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิ้ง ด้วยโปรแกรม Glide docking

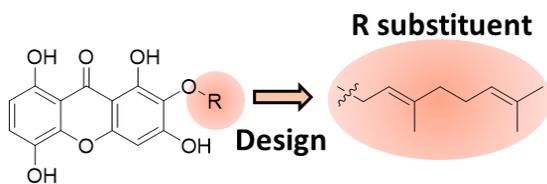


Figure 2 Chemical structure of our proposed compounds with R substitution.

2.5. การคำนวณการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของสารกลุ่มแซนโทนกับตัวจับ InhA

การศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของสารในกลุ่มแซนโทนที่จับกับเอนไซม์ InhA ใช้การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลด้วยโปรแกรม AMBER20 โดยโครงสร้างเริ่มต้นของ InhA ได้มาจากผลึกของเอนไซม์ InhA ที่จับกับสารยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์ pyridone (PDB code 4R9S) ซึ่งมี resolution เท่ากับ 3.2 Å การจำลองดำเนินการ 300 ns ภายใต้ระบบแบบ canonical โดยคงปริมาตรและอุณหภูมิของระบบให้คงที่ที่ 300 K ตลอดระยะเวลาการศึกษา ทั้งนี้ใช้อัลกอริทึม Berendsen coupling ในการควบคุมอุณหภูมิสำหรับการกำหนดสนามแรง (Force field) ใช้ AMBER20 force field สำหรับโปรตีน และใช้เครื่องมือ Antechamber Python Parser Interface (ACPYPE) ในการสร้างสนามแรง

ของลิแกนด์ นอกจากนี้ได้เติมโมเลกุลน้ำชนิด TIP3P เพื่อจำลองสภาพแวดล้อมในทุกระบบที่ศึกษา โดยกำหนดค่า non-bonded cutoff เท่ากับ 10 kcal/mol.Å² และใช้อัลกอริทึม LINCS ในการ constraint ระหว่างอะตอมทั้งหมด ทั้งนี้การจำลองใช้ค่า time step เท่ากับ 2 fs

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. การคัดสรรเสมือนจริง

จากการรวบรวมโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มแซนโทนจากฐานข้อมูล PubChem (สืบค้นเมื่อวันที่ 30 เมษายน 2566) พบทั้งหมด 19,856 โครงสร้าง จากนั้นทำนายค่าสมบัติความเป็นยาและเคมีของยา โดยเกณฑ์การพิจารณาดังนี้ 1) มวลโมเลกุล (MW) ≤ 500 g/mol 2) จำนวน rotatable bonds ≤ 10 3) จำนวน H-bond acceptors ≤ 10 4) จำนวน H-bond donors ≤ 5 ค่า 5) LogP ≤ 4.15 และ 6) ค่า Pan-assay interference compounds (PAINS) = 0 พบว่าโครงสร้าง 12,270 และ 11,590 ผ่านเกณฑ์ตามลำดับ โครงสร้างที่ผ่านการคัดกรองถูกนำมาประเมินค่าพลังงานการจับกับเอนไซม์ InhA (PDB code 4R9S) โดยใช้ระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ต็อกกิ้ง ด้วยโปรแกรม Glide XP mode พร้อมวิเคราะห์อันตรกิริยาที่สำคัญชนิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Tyr158 และโคแฟกเตอร์ NADH ซึ่งเป็นอันตรกิริยาสำคัญตามข้อมูลผลึกเอกซ์เรย์ ผลการวิเคราะห์พบว่า สารกลุ่มแซนโทน 26 โครงสร้าง (จาก 100 อันดับแรกที่มีค่าพลังงานการจับต่ำสุด) แสดงอันตรกิริยาดังกล่าว โดยเลือก 10 เปอร์เซนต์ของโครงสร้างเหล่านี้ (3 โครงสร้าง) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ได้แก่ PubChem IDs: 101549252 (1), 122362404 (2) และ 132556041 (3) การประเมินสมบัติทางเภสัชกรรมของทั้ง 3 โครงสร้าง (Figure 3) พบว่าเป็นไปตามคุณสมบัติความเป็นยาและเคมีของยา (Table 1)

Table 1 Code name, drug-likeness properties and medicinal chemistry of three hit compounds from virtual screening

Compounds	Drug-likeness properties					Medicinal chemistry
	1	2	3	4	5	
1	412.4	6	7	4	1.5	0
2	499.7	10	6	3	1.5	0
3	444.4	5	9	4	-0.3	0

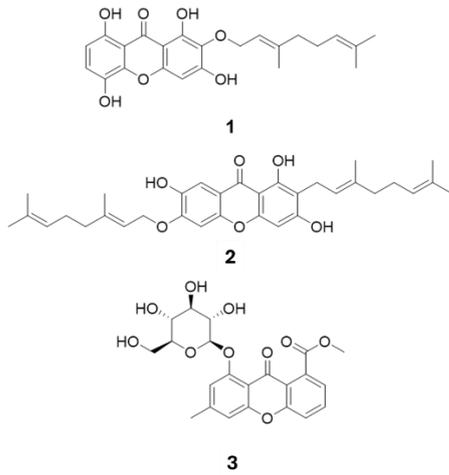


Figure 3 Structures of compounds 1, 2 and 3

3.2. การศึกษาารูปแบบการจับและอันตรกิริยาระหว่าง เอนไซม์เป้าหมายและสารกลุ่มแซนโทนด้วยระเบียบวิธีการ จำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

ความเสถียรของโครงสร้างสารหมายเลข 1 2 และ 3 ภายในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA ดำเนินการโดยการจำลอง พลวัตเชิงโมเลกุล โดยวิเคราะห์ค่า RMSD ของอะตอมทั้งหมดใน แต่ละโครงสร้าง ผลการจำลองแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลง ของโครงสร้างเมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้นที่ได้จากการ คำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ได้ออกกิ้ง (Figure 4) โดยพบว่า สารหมายเลข 1 2 และ 3 มีความเสถียรที่ 80 ns, 50 ns และ 20 ns ตามลำดับ

รูปแบบการวางตัวของสารกลุ่มแซนโทนที่เป็นได้จากการ คัดสรรเสมือนจริงในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA ของ สารหมายเลข 1 ซึ่งเป็นสารยับยั้งที่ค่าพลังงานการจับที่ดีที่สุด ของสารกลุ่มแซนโทน คือ -14.0 kcal/mol พบว่าเกิดอันตร กิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนจำนวน 2 อันตรกิริยาระหว่างกลุ่ม ไฮดรอกซิล ของสารหมายเลข 1 ที่ต่อกับส่วนของแซนโทนกับ กรดอะมิโน Tyr158 และโคแฟกเตอร์ NADH ด้วยระยะ 1.8 Å และ 2.0 Å ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอันตรกิริยาชนิด ไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Phe97 Met98 Pro99 Gln100 Met103 phe149 Met155 Pro156 Ala157 Met161 Pro193 Ala198 Met199 และ Ile202 (Figure 5(a)) สาร หมายเลข 2 มีรูปแบบการวางตัวในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA ที่คล้ายกันกับสารหมายเลข 1 แต่จะมีโครงสร้างที่มี ขนาดใหญ่และเกาะมากกว่าสารหมายเลข 1 และการเกิด อันตรกิริยาของสารหมายเลข 2 เกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะ ไฮโดรเจนและไฮโดรโฟบิกเช่นเดียวกับสารหมายเลข 1 โดย มีระยะอันตรกิริยาระหว่างกลุ่มไฮดรอกซิลของสารหมายเลข 2

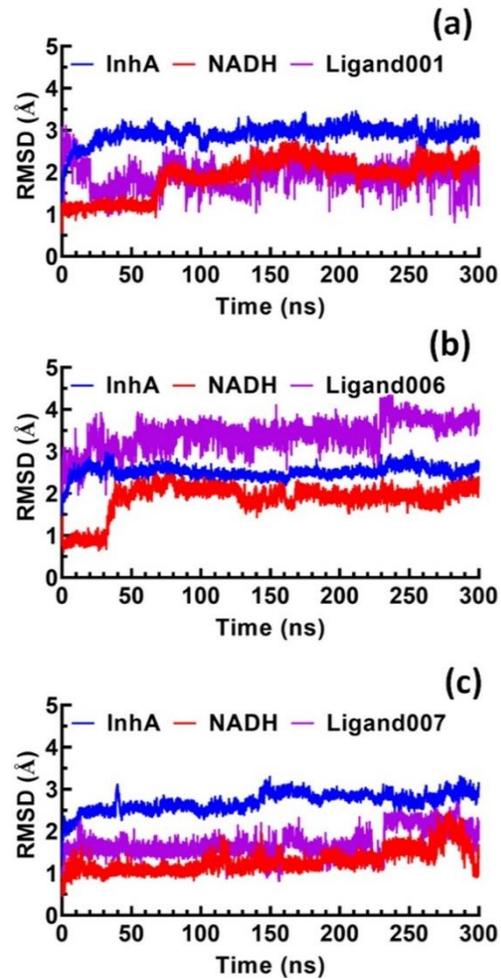


Figure 4 RMSDs from MD simulations of *M. tuberculosis* InhA complexes of hit compounds; (a) compound 1, (b) compound 2 and (c) compound 3; Blue lines indicate RMSDs of *M. tuberculosis* InhA; Red and purple lines indicate RMSDs of NADH and ligand from MD simulations, respectively.

ที่ต่อกับส่วนของแซนโทนกับกรดอะมิโน Tyr158 และ โคแฟกเตอร์ NADH ด้วยระยะ 1.8 Å และ 1.7 Å ตามลำดับ (Figure 5(b)) และมีค่าพลังงานการจับคือ -12.2 kcal/mol และสารหมายเลข 3 มีค่าพลังงานการจับเป็นลำดับสุดท้ายคือ -11.8 kcal/mol และมีรูปแบบการวางตัวในโปรแกรมจับของ เอนไซม์ InhA ที่แตกต่างกับสารหมายเลข 1 และ 2 เกิด อันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจนจำนวน 2 อันตรกิริยาระหว่าง กลุ่มไฮดรอกซิลของสารหมายเลข 3 ในวงน้ำตาลไรโบสของ แซนโทนกับกรดอะมิโน Tyr158 และโคแฟกเตอร์ NADH ด้วย ระยะ 2.0 Å และ 2.0 Å ตามลำดับ (Figure 5(c)) ดังนั้นผลที่ ได้จากการศึกษาการคัดสรรเสมือนจริงของสารกลุ่มแซนโทน

ในครั้งนี้นี้ สามารถสรุปได้ถึงรูปแบบการวางตัวและอันตรกิริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นของสารยับยั้ง เอนไซม์ InhA และสามารถออกแบบหรือปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ใน สารอนุพันธ์แซนโทนิน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง InhA ที่ดีขึ้นและเสนอเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ต่อไปในอนาคต

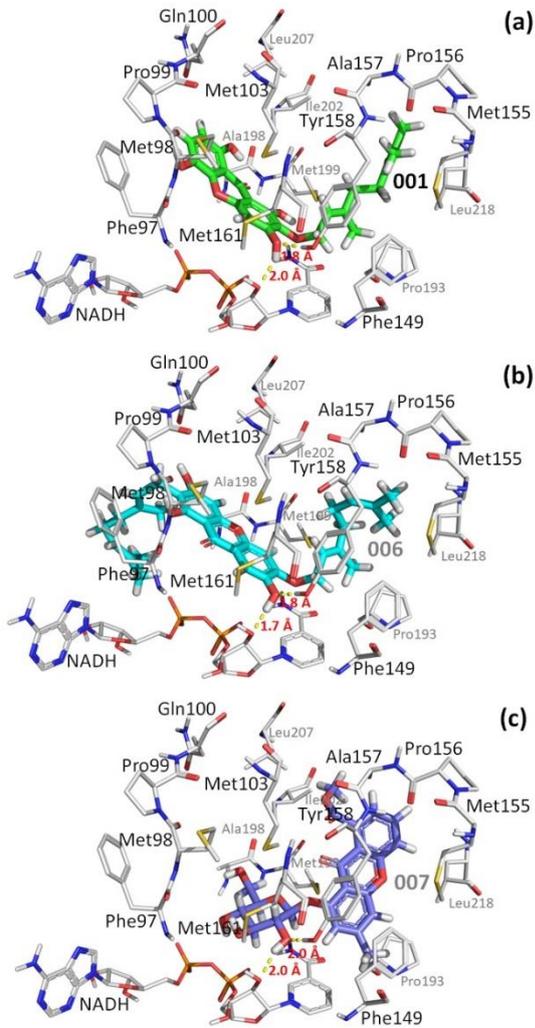


Figure 5 Representative structures of compounds; (a) 1 (b) 2 and (c) 3 in the binding site of *M. tuberculosis* InhA; Structures were obtained from MD simulations; Yellow dotted lines indicate hydrogen bond interactions.

3.3. ความต้องการทางโครงสร้างของสารกลุ่มแซนโทน
จากการศึกษาแบบการวางตัวและรูปแบบการเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญของสารกลุ่มแซนโทนินที่ได้จากการคัดสรรเสมือนจริงที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ในโปรแกรมจับของเอนไซม์ โดยพบว่าโครงสร้างหลักของแซนโทนินมีความสำคัญ

ต่อการเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญของการจับในโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA และยังเป็นส่วนที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อวัณโรค จากข้อมูลทางโครงสร้างของสารหมายเลข 1 ที่มีค่าพลังงานการจับที่ได้จากการศึกษาโมเลกุลาร์ดอกกิ้งที่ดีที่สุด และนำมาศึกษาด้วยวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลพบว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ติดกับโครงสร้างของแซนโทนินมีความสำคัญต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Tyr158 และโคแฟกเตอร์ NADH ซึ่งส่งผลให้การออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์ *M. tuberculosis* InhA มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของสารหมายเลข 1 พบอันตรกิริยาระหว่างไฮโดรโฟบิกเนื่องจากบริเวณโปรแกรมจับของเอนไซม์ InhA ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก ได้แก่กรดอะมิโน Phe149 Met155 Pro156 Ala157 Pro193 Met199 และ Leu218 เป็นต้น จากผลการศึกษาดังกล่าว สามารถสรุปความต้องการทางโครงสร้างตามสารหมายเลข 1 ได้ (Figure 6) และจะปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ในโครงสร้างดังกล่าว ที่ตำแหน่งของอะตอมไฮโดรเจนทั้งสองตำแหน่งที่อยู่ติดกับโครงสร้างแซนโทนิน โดยเลือกหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่ มีลักษณะเกาะและมีส่วนเป็นไฮโดรโฟบิก เพื่อเสริมสร้างการเกิดอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิกกับกรดอะมิโน Met98, Pro99, Gln100, Met103 และ Leu207 (Figure 6)

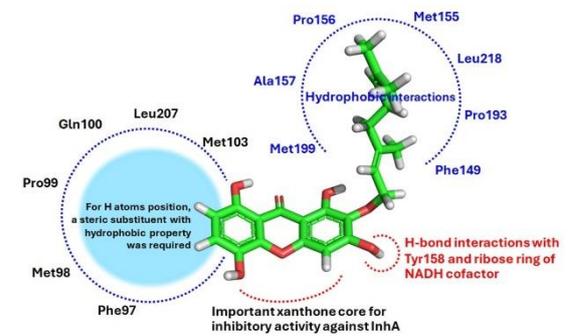


Figure 6 The binding mode and interactions between the most potent inhibitor, compound 1, and InhA residues, along with NADH, obtained from MD simulations

3.4. การออกแบบอย่างมีเหตุผลของสารอนุพันธ์แซนโทน

สารอนุพันธ์แซนโทนินถูกออกแบบใหม่โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากอันตรกิริยาที่สำคัญของสารหมายเลข 1 กับเอนไซม์ InhA ด้วยการศึกษากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลโดยเปลี่ยน

หมู่แทนที่ R ขึ้นตอนในการออกแบบเพื่อให้ได้สารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพ (Figure 7) จากการออกแบบโดยใช้ฐานข้อมูล SwissBioisostere พบจำนวน 80 โครงสร้างจากนั้น พิจารณาผลการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของโครงสร้างย่อยโดยใช้ฐานข้อมูล SwissBioisostere ซึ่งแสดงเป็นแถบสี 3 สี ได้แก่ สีเขียว เพิ่มค่าการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญหรือเปลี่ยนจาก สารที่ไม่ออกฤทธิ์เป็นสารที่ออกฤทธิ์ สีส้ม ไม่ส่งผลกระทบต่อค่าการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างชัดเจนและสีแดง ลดค่าการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญหรือเปลี่ยนจากสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ โดยพิจารณาคัดเลือกโครงสร้างย่อยเฉพาะที่มีแถบสีเขียวที่สามารถเพิ่มค่าการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ 22 โครงสร้างและนำไปทำนายคุณสมบัติความเป็นยา พบโครงสร้างจำนวน 17 โครงสร้างที่ผ่านคุณสมบัติความเป็นยา และนำมาศึกษาการจับและพลังงานการจับระหว่างสารยับยั้งเอนไซม์ InhA กับสารยับยั้งตัวใหม่ทั้ง 17 โครงสร้างพบว่า 14 โครงสร้างมีค่าพลังงานการจับต่ำกว่าสารหมายเลข 1 ที่เป็นสารแม่แบบค่าพลังงานการจับของทั้ง 14 โครงสร้างนอกจากนำไปทำนายการสังเคราะห์ มีค่าต่ำอยู่ระหว่าง 3.21-4.52 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้ง่าย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำไปสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไปในอนาคตได้

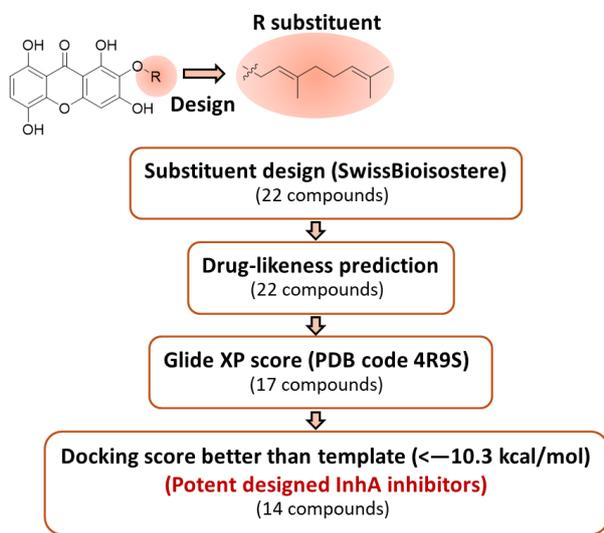


Figure 7 Workflow for rational design of novel InhA inhibitors

4. บทสรุป

การค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ตัวใหม่ในกลุ่มแซนโทนเพื่อใช้เป็นสารต้านวัณโรค อาศัยระเบียบวิธีการคัดสรรเสมือนจริง โดยรวบรวมข้อมูลจากฐานข้อมูล

PubChem พบโครงสร้างสารกลุ่มแซนโทนจำนวน 19,856 โครงสร้าง จากนั้นทำการคัดกรองด้วยการทำนายสมบัติความเป็นยาและเคมีของยา รวมถึงการคำนวณค่าพลังงานการจับภายในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA โดยใช้ระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง ผลการศึกษาพบสารกลุ่มแซนโทน 3 โครงสร้างที่คาดว่าจะมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA และเชื้อวัณโรค นอกจากนี้ศึกษารูปแบบการวางตัวและอันตรกิริยาสำคัญในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ผ่านการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล จากผลการศึกษาพบว่าหมู่ไฮดรอกซิลบนโครงสร้างแซนโทนมีบทบาทสำคัญในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Tyr158 และโคแฟกเตอร์ NADH และสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของสารยับยั้งยังเกิดอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของโพรงการจับที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งนำไปสู่การออกแบบโครงสร้างใหม่ที่ได้จากความต้องการทางโครงสร้าง ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถให้ข้อมูลเชิงโครงสร้างในระดับโมเลกุลที่เป็นประโยชน์ต่อการออกแบบและพัฒนาสารต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการค้นหาและพัฒนาายาต้านวัณโรคใหม่ที่มีศักยภาพสูงในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนทุนวิจัยสำหรับทำงานวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และ Computational facilities of the Advanced Computing Research Centre, University of Bristol, United Kingdom <http://www.bris.ac.uk/acrc/> สำหรับการสนับสนุนโปรแกรมและเครื่องมือในการคำนวณในงานวิจัยนี้

6. References

- [1] World Health Organization. 2024. **Global Tuberculosis Report 2024**. <https://www.who.int/publications/item/9789240101531>. Accessed 10 January 2025.
- [2] Barry, C.E., Slayden, R.A. and Mdluli, K. 1998. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Drug Resistance Updates**. 1(2): 128-134.

- [3] Tiberi, S. and et al. 2018. New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens. **Pulmonology**. 24(2): 86-98.
- [4] Saint-Joanis, B. and et al. 1999. Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/oxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemical Journal**. 338: 753-760.
- [5] Parikh, S. and et al. 1999. Roles of tyrosine 158 and lysine 165 in the catalytic mechanism of InhA, the Enoyl-ACP reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**. 38(41): 13623-13634.
- [6] Lei, B., Wei, C.J. and Tu, S.C. 2000. Action mechanism of antitubercular isoniazid: Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of InhA inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**. 275(4): 2520-2526.
- [7] Marrakchi, H., Laneelle, G. and Quemard, A.K. 2000. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. **Microbiology**. 146(2): 289-296.
- [8] World Health Organization. 2009. **Global Tuberculosis Control 2009 - Epidemiology, Strategy, Financing**. <https://reliefweb.int/report/world/global-tuberculosis-control-2009-epidemiology-strategy-financing>. Accessed 10 January 2025.
- [9] Banerjee, A. and et al. 1994. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**. 263(5144): 227-230.
- [10] Dessen, A. and et al. 1995. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**. 267(5204): 1638-1641.
- [11] Rouse, D.A. and et al. 1995. Characterization of the katG and inhA genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 39(11): 2472-2477.
- [12] Bertrand, T. and et al. 2004. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-oxidase **Journal of Biological Chemistry**. 279(37): 38991-38999.
- [13] Zhao, X. and et al. 2006. Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-oxidase (KatG) and its S315T mutant. **Biochemistry**. 45(13): 4131-4140.
- [14] He, X. and et al. 2006. Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Medicinal Chemistry**. 49(21): 6308-6323.
- [15] He, X., Alian, A. and Ortiz de Montellano, P.R. 2007. Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 15(21): 6649-6658.
- [16] Kumar, A. and Siddiqi, M.I. 2008. CoMFA based de novo design of pyrrolidine carboxamides as inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Molecular Modeling**. 14(10): 923-935.
- [17] Lu, X.Y. and et al. 2009. Discovery of potential new InhA direct inhibitors based on pharmacophore and 3D-QSAR analysis followed by in silico screening. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 44(9): 3718-3730.
- [18] Duca, G. and et al. 2019. Tryptanthrin analogues as inhibitors of enoyl-acyl carrier protein reductase: Activity against *Mycobacterium tuberculosis*, toxicity, modeling of enzyme binding. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 19(8): 609-619.

- [19] Boyne, M.E. and et al. 2007. Targeting fatty acid biosynthesis for the development of novel chemotherapeutics against *Mycobacterium tuberculosis*: Evaluation of A-ring-modified diphenyl ethers as high-affinity InhA inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 51(10): 3562-3567.
- [20] Rozwarski, D.A. and et al. 1999. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate. **Journal of Biological Chemistry**. 274(22): 15582-15589.
- [21] Oliveira, J.S. and et al. 2006. Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wild-type and isoniazid-resistant enoyl-ACP (CoA) reductase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Molecular Biology**. 359(3): 646-666.
- [22] Dias, M.V.B. and et al. 2007. Crystallographic studies on the binding of isonicotinylnad adduct to wild-type and isoniazid resistant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Structural Biology**. 159(3): 369-380.
- [23] Suksamram, S. and et al. 2003. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 51(7): 857-859.
- [24] Sudta, P. and et al. 2013. Potent activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of alpha-mangostin analogs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 61(2): 194-203.
- [25] Lyne, P.D., Lamb, M.L. and Saeh, J.C. 2006. Accurate prediction of the relative potencies of members of a series of kinase inhibitors using molecular docking and MM-GBSA scoring. **Journal of Medicinal Chemistry**. 49(16): 4805-4808.
- [26] Rasheed, A., Ashok Kumar, C.K. and Sravanthi, V.V.N.S.S. 2008. Cyclodextrins as drug carrier molecule: A review. **Scientia Pharmaceutica**. 76(4): 567-598.
- [27] Kumar, A. and et al. 2009. Knowledge based identification of potent antitubercular compounds using structure based virtual screening and structure interaction fingerprints. **Journal of Chemical Information and Modeling**. 49(1): 35-42.
- [28] Punkvang, A. and et al. 2010. 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**. 15(4): 2791-2813.
- [29] Hou, T. and 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.
- [30] Wang, S. and et al. 2012. Design, synthesis and structure-activity relationships of new triazole derivatives containing N-substituted phenoxypropylamino side chains. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 53: 292-299.
- [31] Kim, S. and et al. 2021. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic Acids Research**. 49: D1388-D1395.
- [32] Daina, A., Michielin, O. and Zoete, V. 2017. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**. 7: 42717.
- [33] Manjunatha, U.H. and et al. 2015. Direct inhibitors of InhA are active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Science Translational Medicine**. 7(269): 269ra3.

- [34] Thongdee, P. and et al. 2022. Virtual screening identifies novel and potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* PknB with antibacterial activity. **Journal of Chemical Information and Modeling**. 62(24): 6508-6518.