

## ระเบียบและวิธีวิจัย

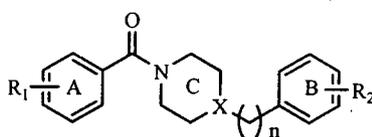
### 1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย

- 1.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ PCs (Intel Quad Core)
- 1.2 เครื่องพิมพ์ (Laser Printer)
- 1.3 เครื่องพิมพ์ (Color Printer)
- 1.4 โปรแกรมการคำนวณทางเคมีควอนตัม (Gaussian 03)
- 1.5 โปรแกรมการคำนวณทางโมเลคิวลาร์โมเดลลิ่ง (Discovery studio, Gausview และ ChemDraw )
- 1.6 โปรแกรมส่งข้อมูล (winscp, putty)
- 1.7 โปรแกรม Autodock 3.0.5
- 1.8 โปรแกรม Gromacs
- 1.9 โปรแกรม Sybyl

### 2. ข้อมูลโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA

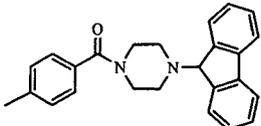
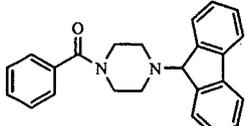
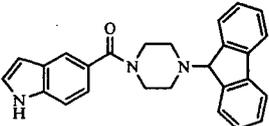
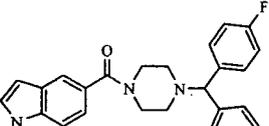
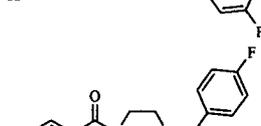
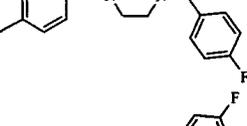
ข้อมูลทางโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA โดยตรงที่นำมาใช้ในการโครงการวิจัยนี้แสดงดังตารางที่ 1-4 ซึ่งประกอบไปด้วยสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ (ตารางที่ 1) สารอนุพันธ์ไตรโคซานและสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์กลุ่มที่ 1 และ 2 (ตารางที่ 2 และ 3) และโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ที่มีโครงสร้างหลากหลาย (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1. โครงสร้างและค่ากัมมันตภาพ ( $IC_{50}$ ) ของสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์



สาร	X	n	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	log (1/IC <sub>50</sub> )
a1*	N	0	H	H	4.41
a2	N	0	4-CH <sub>3</sub>	H	4.78
a3	N	0	4-CH <sub>3</sub>	3-CF <sub>3</sub>	5.20
a4	N	0	4-CH <sub>3</sub>	3-Cl	5.51
a5	N	0	3-CH <sub>3</sub>	3-Cl	5.03
a6	N	0	3-CH <sub>3</sub>	4-NO <sub>2</sub>	4.81
a7	N	0	3,4-Me <sub>2</sub>	3-Cl	6.00
a8	N	0	3,4-Me <sub>2</sub>	3-CF <sub>3</sub>	5.73
a9	N	0	4-i-Pr	3-Cl	<4.00

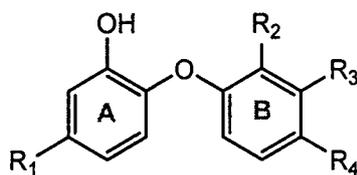
a10	N	0	4-t-Bu	3-Cl	<4.00
a11	N	0	4-t-Bu	3-CF <sub>3</sub>	<4.00
a12	N	0	4-t-Bu	4-CH <sub>3</sub> , 3-Cl	<4.00
a13	N	0	2-F	3-Cl	4.86
a14*	N	0	4-F	3-Cl	5.01
a15	N	0	3-Cl	3-Cl	5.17
a16	N	0	3,4-Cl <sub>2</sub>	3-Cl	5.22
a17	N	0	3,4-Cl <sub>2</sub>	H	4.75
a18	N	1	H	H	4.50
b1	C	1	3-Cl	H	5.11
b2	C	1	2-F	H	4.85
b3*	C	1	4-CH <sub>3</sub>	H	5.29
b4	C	1	3-CH <sub>3</sub>	H	5.13

p1		6.40
p2		7.05
p3*		6.70
p4		5.98
p5		5.72
p6		5.69

The test set compound for QSAR studies

118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129

ตารางที่ 2 โครงสร้างและค่ากัมมันตภาพ ( $IC_{50}$ ) ของสารอนุพันธ์ไตรโคซานและสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์กลุ่มที่ 1



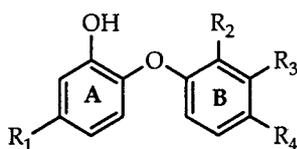
Cpd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	IC <sub>50</sub> (nM)	Log(1/IC <sub>50</sub> )
1	Cl	Cl	H	Cl	1100	5.96
2	CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	800	6.10
3	CH <sub>2</sub> Cy	Cl	H	Cl	110	6.96
4*	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	120	6.92
5	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	91	7.04
6	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	55	7.26
7	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Cl	H	Cl	63	7.20
8	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	130	6.89
9	CH <sub>2</sub> (2-pyridyl)	Cl	H	Cl	29	7.54
10*	CH <sub>2</sub> (3-pyridyl)	Cl	H	Cl	42	7.38
11	CH <sub>2</sub> (4-pyridyl)	Cl	H	CN	75	7.12
12	o-CH <sub>3</sub> -Ph	Cl	H	Cl	1300	5.89
13	m-CH <sub>3</sub> -Ph	Cl	H	Cl	870	6.06
14	CH <sub>2</sub> Ph	Cl	H	Cl	51	7.29
15	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph	Cl	H	Cl	21	7.68
16*	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Ph	Cl	H	Cl	50	7.30
17	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	11	7.96
18	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	2000	5.70
19	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	80	7.10
20	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	17	7.77
21	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	5	8.30
22	(CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	150	6.82
23*	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	H	H	180	6.74
24	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	H	48	7.32
25	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	NO <sub>2</sub>	90	7.05
26*	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H	H	62	7.21
27	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	H	1090	5.96
28	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	55	7.26
29	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	Br	H	H	10	8.00

30*	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	H	H	29.7	7.53
31	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	F	H	H	12.1	7.92
32	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	I	H	H	44.6	7.35
33	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	OH	H	H	48	7.32
34	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	CN	H	H	235.6	6.63
35	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	H	49.5	7.31
36*	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	50.7	7.29
37	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	NHCOCH <sub>3</sub>	H	H	1550	5.81
38	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	NHCONH <sub>3</sub>	1300	5.89
39	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	NHCOCO <sub>2</sub> H	H	H	2360	5.63
40	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	NHCOCO <sub>2</sub> H	H	580	6.24
41	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	NHCOC2O <sub>2</sub> H	1930	5.71
42*	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	NHCO- Isoxazole	H	1220	5.91
43	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -N-CH <sub>3</sub> - piperazine	H	H	1315	5.88
44	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> -N-CH <sub>3</sub> - piperazine	306	6.51
45	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph	H	H	H	144.3	6.84
46	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph	CH <sub>3</sub>	H	H	360.1	6.44
47	CH <sub>2</sub> Ph	Cl	H	H	20.08	7.70
48	CH <sub>2</sub> Ph	H	H	H	49.6	7.30
49	CH <sub>2</sub> Ph	CH <sub>3</sub>	H	H	56.4	7.25
50	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	H	H	4326	5.36
51	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	H	H	H	253.1	6.60
52*	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	94.2	7.03

\* Test set

2.1  
2.2  
2.3  
2.4  
2.5  
2.6  
2.7  
2.8  
2.9  
3.0  
3.1  
3.2  
3.3  
3.4  
3.5  
3.6  
3.7  
3.8  
3.9  
4.0  
4.1  
4.2  
4.3  
4.4  
4.5  
4.6  
4.7  
4.8  
4.9  
5.0  
5.1  
5.2  
5.3  
5.4  
5.5  
5.6  
5.7  
5.8  
5.9  
6.0  
6.1  
6.2  
6.3  
6.4  
6.5  
6.6  
6.7  
6.8  
6.9  
7.0  
7.1  
7.2  
7.3  
7.4  
7.5  
7.6  
7.7  
7.8  
7.9  
8.0  
8.1  
8.2  
8.3  
8.4  
8.5  
8.6  
8.7  
8.8  
8.9  
9.0  
9.1  
9.2  
9.3  
9.4  
9.5  
9.6  
9.7  
9.8  
9.9  
10.0

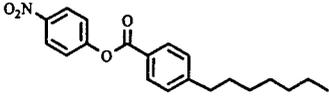
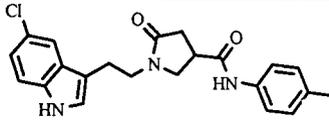
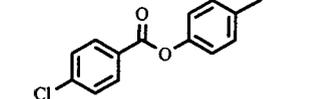
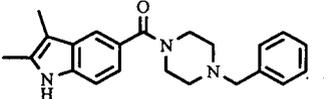
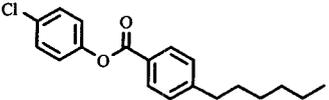
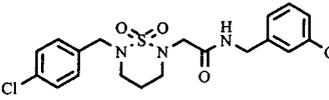
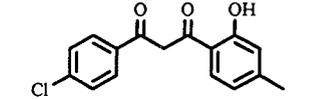
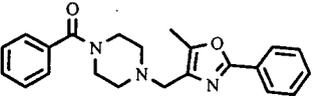
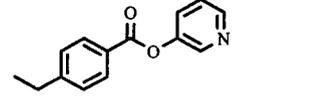
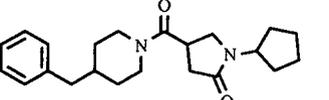
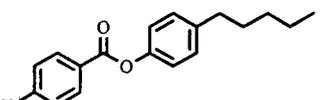
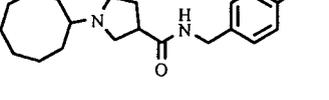
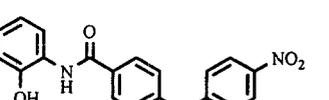
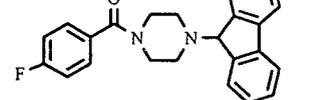
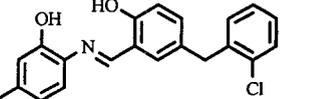
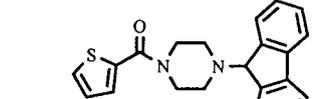
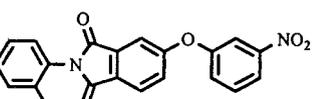
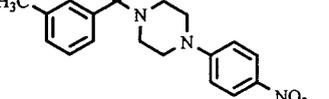
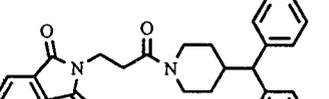
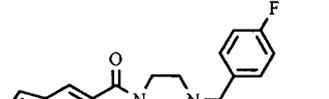
ตารางที่ 3 โครงสร้างและค่ากัมมันตภาพ ( $IC_{50}$ ) ของสารอนุพันธ์ไตรโคซานและสารอนุพันธ์ไดฟีนิลอีเทอร์กลุ่มที่ 2

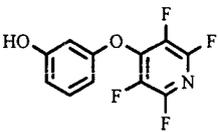
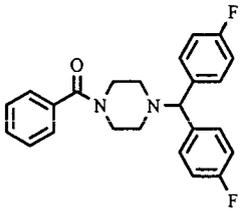
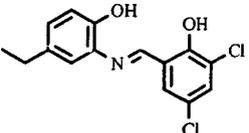
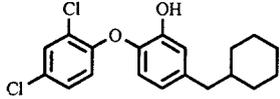
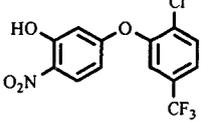
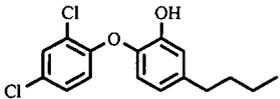
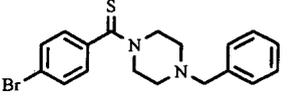
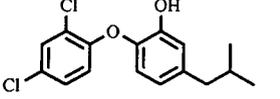
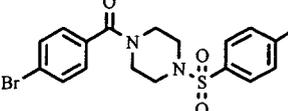
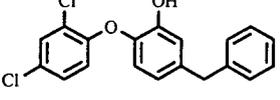
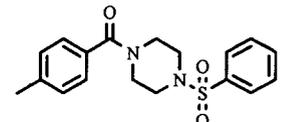
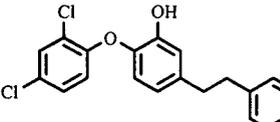
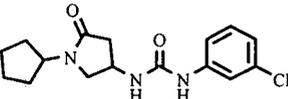
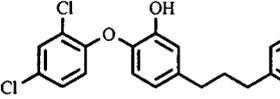


สาร	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	IC <sub>50</sub> [nM]	Log(1/ IC <sub>50</sub> )
1	Cl	Cl	H	Cl	1100	2.96
2*	CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	800	3.10
3	CH <sub>2</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> )	Cl	H	Cl	110	3.96
4	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	120	3.92
5	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	91	4.04
6*	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	55	4.26
7	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Cl	H	Cl	96	4.02
8	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Cl	H	Cl	63	4.20
9	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	Cl	130	3.89
10	CH <sub>2</sub> (2-pyridyl)	Cl	H	Cl	29	4.54
11	CH <sub>2</sub> (3-pyridyl)	Cl	H	Cl	42	4.38
12	CH <sub>2</sub> (4-pyridyl)	Cl	H	CN	75	4.12
13	<i>o</i> -CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Cl	H	Cl	1300	2.89
14	<i>m</i> -CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Cl	H	Cl	870	3.06
15	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Cl	H	Cl	51	4.29
16	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Cl	H	Cl	21	4.68
17	CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Cl	H	Cl	50	4.30
18	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	11	4.96
19	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	2000	2.70
20*	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	80	4.10
21	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	17	4.77
22	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	5	5.30
23	(CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H	150	3.82
24*	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	H	H	180	3.74
25	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	H	48	4.32
26	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	NO <sub>2</sub>	90	4.05
27	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H	H	62	4.21
28	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	H	1090	2.96
29	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	55	4.26

\*The test set compounds

ตารางที่ 4 โครงสร้างและค่ากัมมันตภาพ ( $IC_{50}$ ) ของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ที่มีโครงสร้างหลากหลาย

No.	Structure	MIC( $\mu$ M)	Log 1/MIC	No.	Structure	MIC ( $\mu$ M)	Log (1/M
1		187.40	3.73	18		80.83	4.0
2		259.42	3.59	19		368.38	3.4
3		202.00	3.69	20		146.13	3.8
4		13.85	4.86	21		187.48	3.7
5		563.20	3.25	22 <sup>a</sup>		361.07	3.4
6		105.68	3.98	23		369.46	3.4
7		5.70	5.24	24 <sup>a</sup>		85.91	4.0
8 <sup>a</sup>		181.90	3.74	25		355.08	3.4
9		85.03	4.07	26		125.00	3.9
10		141.10	3.85	27		62.50	4.2

11		246.95	3.61	28		125.00	3.9
12		206.33	3.69	29		27.00	4.1
13 <sup>a</sup>		383.63	3.42	30		30.00	4.1
14		85.25	4.07	31		60.00	4.2
15		302.36	3.52	32		27.00	4.1
16		371.61	3.43	33 <sup>a</sup>		52.00	4.2
17		180.09	3.74	34		13.00	4.1

<sup>a</sup>The test set compounds

### 3. การสร้างและคำนวณโครงสร้างของโมเลกุลด้วยบียัง

โครงสร้างเริ่มต้นของสารยับยั้งเอนไซม์ InhA ทั้งหมดได้จากการสร้างโดยใช้โปรแกรมโมเลกุลาร์โมเดลลิ่ง Gausview จากนั้นทำการคำนวณปรับโครงสร้างที่เสถียรที่สุด (full geometrical optimization) ด้วยระเบียบวิธีแอบอินซิโอ (HF/3-21G) เมื่อทำการคำนวณในขั้นตอนนี้เสร็จแล้ว จะได้โครงสร้างที่เสถียรแต่ละโมเลกุล จากนั้นนำโครงสร้างเหล่านี้ไปใช้ในการคำนวณด้วยวิธีการโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง การคำนวณทางเคมีควอนตัม และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบ 3D-QSAR

### 4. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพ

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งโดยวิธี Quantitative structure activity relationship (QSAR) ดังนี้

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

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

#### 1. การวางโมเลกุล (Alignment rule)

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

#### 2. การวิเคราะห์โดยวิธีคอมฟาและคอมเซีย (CoMFA and CoMSIA Analysis)

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

#### 3. การแปลผล (Interpretation)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากวิธีวิเคราะห์ทั้งสองแบบนี้ จะไม่สามารถแสดงได้เป็นสมการทั่วไป แต่การประเมินผลว่าแบบจำลองใดที่ให้ผลการทำนายค่ากัมมันตภาพดีที่สุดนั้นจะอาศัยค่าความสามารถในการทำนาย (Predictive ability,  $q^2$ ) เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาโดยค่า  $q^2$  ควรมีค่าสูงกว่า 0.6 และการแปลผลจะแสดงในรูปของภาพคอนทัวร์ของสัมประสิทธิ์ (coefficient contour map) ทั้งนี้ คอนทัวร์แบบสเตอริกจะแสดงโดยสีเขียว

(positive) และสีเหลือง (negative) ซึ่งหมายความว่าควรเพิ่มหมู่เกาะในโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบสเตอริกบริเวณที่แสดงโดยสีเขียว คอนทัวร์แบบอิเล็กทรอนิกส์จะแสดงโดยสีแดง (positive) และสีน้ำเงิน (negative) โดยความหมายคือควรเพิ่มหมู่แทนที่ในโครงสร้างโมเลกุลที่มีประจุอิเล็กตรอนสูงขึ้นเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบอิเล็กทรอนิกส์บริเวณที่แสดงโดยสีแดง สำหรับคอนทัวร์แบบไฮโดรโฟบิกจะแสดงโดยสีชมพู (positive) และสีขาว (negative) หมายความว่าควรเพิ่มหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการละลายในชั้นไขมันเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิกในบริเวณที่แสดงสีชมพู ในการพิจารณาอิทธิพลของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของตัวรับยั้งและเอนไซม์โดยพิจารณาจากคอนทัวร์ของการให้โปรตอน (H donor) โดยจะแสดงสีฟ้า (positive) และสีม่วง (negative) หมายถึงควรเพิ่มหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการให้โปรตอนในบริเวณที่แสดงสีฟ้า และคอนทัวร์ของการรับโปรตอน (H acceptor) โดยจะแสดงเป็นสีส้ม (positive) และสีขาว (negative) หมายถึงควรเพิ่มหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการรับโปรตอนเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาระหว่างบริเวณที่แสดงสีขาวนั้น

#### 4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งโดยวิธี 2D-QSAR

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

### 5. การศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกูลาร์ดอกกิ้ง

โครงสร้างผลึก (X-ray crystallography) ของยาไอโซในอาซิดที่จับอยู่กับเอนไซม์ InhA รหัส 2IDZ และโครงสร้างผลึกของสารยับยั้งเอริลเอไมด์ที่จับอยู่กับเอนไซม์ InhA รหัส 2NSD ได้นำมาใช้ในการคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลกูลาร์ดอกกิ้ง ขั้นแรกทำการทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณโมเลกูลาร์ดอกกิ้ง โดยเบื้องต้นจากโครงสร้าง X-ray ทำการแยกโครงสร้างของตัวยาวออกจากเอนไซม์ จากนั้นคำนวณรูปแบบการวางตัวของตัวยาวไอโซในอาซิดในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA โดยใช้วิธีการคำนวณโมเลกูลาร์ดอกกิ้ง ด้วยโปรแกรม AutoDock3.05 และโปรแกรม Glide ทำการเปรียบเทียบระหว่างรูปแบบการจับที่ได้

จาก X-ray และ รูปแบบการจับที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธีการคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิ่ง ถ้าค่า RMSD มีค่าน้อยกว่า 1 อังสตรอม แสดงให้เห็นว่าโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณโมเลกุลาร์ต็อกกิ่งมีความน่าเชื่อถือ และสามารถนำมาใช้ในการคำนวณรูปแบบการวางตัวของสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดและสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ได้

## 6. การคำนวณพลังงานการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนโพรงการจับของเอนไซม์ InhA และสารอนุพันธ์ไอโซในอาซิดด้วยการคำนวณเคมีควอนตัม

นำโครงสร้างของสารอนุพันธ์ในกลุ่มไอโซในอาซิดที่วางตัวในโพรงการจับของเอนไซม์ InhA ที่ได้จากการศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ต็อกกิ่ง มาคำนวณหาค่าพลังงานอันตรกิริยาระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนแต่ละตัวที่อยู่ในโพรงการจับด้วยระเบียบวิธีการคำนวณเคมีควอนตัม MP2/6-31G(d) โดยค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาคำนวณได้ดังสมการ

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

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

## 7. การคำนวณโดยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน (Molecular dynamics simulation)

การศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตเชิงโมเลกุลโดยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน (Molecular dynamics simulation) ของสารยับยั้งที่จับกับเอนไซม์ InhA ด้วยโปรแกรม Gromacs 4.0.4 โดยที่โครงสร้างของเอนไซม์ InhA เริ่มต้นได้มาจากผลึกของเอนไซม์ InhA ที่จับกับสารยับยั้งในกลุ่มสารอนุพันธ์เอริลเอไมด์ (2NSD.pdb) ซึ่งมีค่า resolution เท่ากับ 1.9 Å ระเบียบวิธีทางโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชันนี้ได้ทำการศึกษาทั้งหมด 6 ns ระบบที่ศึกษาเป็นแบบ canonical โดยที่ตลอดเวลาการศึกษาทั้งหมดได้กำหนดให้ปริมาตรของระบบคงที่ และอุณหภูมิคงที่ที่ 300 K โดยอาศัย Berdensen coupling algorithm เป็นตัวควบคุมชนิดของสนามแรง (force field) ที่ใช้สำหรับโปรตีน คือ Gromos96 43a2 force field และใช้ Antechamber python parser interface (ACPYPE) tool สำหรับการสร้างสนามแรงของลิแกนด์โมเลกุลของน้ำชนิด SPC216 ได้ถูกเติมเข้าไปในทุกๆระบบที่ใช้ในการศึกษาโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ ซิมูเลชัน ในการกำหนดสนามแรงของลิแกนด์ และได้มีการกำหนด non-bonded cutoff ให้มีค่าเท่ากับ 10 Å และใช้ LINCS algorithm ช่วยในการ constrain อะตอมทั้งหมดสำหรับ time step ที่ใช้มีค่าเท่ากับ 2 fs