



การศึกษาอันตรกิริยาและการจับตัวกันระหว่างทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์
กับอนุพันธ์โพอโดฟิลโลทอกซิน และทำนายสมบัติทางฟิสิกเคมีคัล
โดยอาศัยระเบียบวิธีทางคอมพิวเตอร์

In Silico Study of the Interaction and Binding of Tubulin Heterodimer with the Modified
Podophyllotoxin Derivatives and Physicochemical Prediction

สุชญา ผ่องใส และ ดวงธิดา พันธุ์เมฆา

Suchaya Pongsai and Duangthida Panmekha

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Chemistry Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 15 April 2021

Revised : 31 May 2021

Accepted : 15 June 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษานันตรกิริยาและการจับตัวกันระหว่างโปรตีนเป้าหมายกับอนุพันธ์ของยาต้านมะเร็ง นั่นคือทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์กับอนุพันธ์โพอโดฟิลโลทอกซินชนิดใหม่ (80 ลิแกนด์) ที่ถูกปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R1 และ R2 โดยอาศัยระเบียบวิธีการจำลองโมเลกุลและโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง รวมทั้งการทำนายสมบัติทางฟิสิกเคมีคัลและ ADMET สำหรับอนุพันธ์โพอโดฟิลโลทอกซินชนิดใหม่ที่มีสมบัติความเป็นยาที่ดี มีความเสถียรในการจับตัวกับโปรตีนเป้าหมายสูงขึ้น และมีความเป็นพิษต่อตับต่ำมากอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับยาโพอโดฟิลโลทอกซิน ผลการศึกษานี้สามารถคัดเลือกอนุพันธ์โพอโดฟิลโลทอกซินชนิดใหม่ จำนวน 9 ลิแกนด์ (ค่า E-binding และ Tox_P) นั่นคือ N11R2 (-7.64 kcal/mol และ 1.1) N20R2 (-7.59 kcal/mol และ -0.7) N26R2 (-7.48 kcal/mol และ 4.4) N25R2 (-7.44 kcal/mol และ 4.1) N13R2 (-7.43 kcal/mol และ 2.8) N17R2 (-7.07 kcal/mol และ 4.4) N16R1 (-7.04 kcal/mol และ 3.2) N9R2 (-7.04 kcal/mol และ 3.9) และ N40R2 (-7.01 kcal/mol และ 3.6) ตามลำดับ อนุพันธ์โพอโดฟิลโลทอกซินชนิดใหม่ที่มีความเจาะจงต่อโปรตีนเป้าหมาย มีความเสถียรในการจับตัวกับโปรตีนเป้าหมายสูงขึ้น (E-binding \leq -7.00 kcal/mol) มีสมบัติความเป็นยาที่ดี และมีความเป็นพิษต่อตับต่ำมาก ($-0.7 \leq$ Tox_P \leq 4.4) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับยาโพอโดฟิลโลทอกซิน นอกจากนี้ยังพบว่าอนุพันธ์โพอโดฟิลโลทอกซิน 9 ลิแกนด์ที่ดีที่สุด มีแนวโน้มเกิดอันตรกิริยาและการจับตัวที่เสถียรในบริเวณ β -ทูบูลิน ภายในโพรงของตำแหน่งเข้าจับ จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าอนุพันธ์โพอโดฟิลโลทอกซินเหล่านี้ น่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของไมโครทูบูลได้

คำสำคัญ : อนุพันธ์โพอโดฟิลโลทอกซิน ; ทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์ ; โมเลกุลาร์ดอกกิ้ง ; ADMET



Abstract

This research had studied the interaction and binding between protein target and anticancer drug derivatives, which are tubulin heterodimer and new podophyllotoxin derivatives (80 ligands). These new derivatives were modified by replacing the functional groups at R1 or R2 positions, by using molecular modeling and molecular docking methods. Physicochemical and ADMET predictions were also considered in order to evaluate the good druglikeness properties for these new podophyllotoxin derivatives, having the most favorable binding with protein target, and having significantly the lowest hepatotoxicity compared to a drug podophyllotoxin. From the calculated results, the new podophyllotoxin derivatives were chosen of 9 ligands (E-binding and Tox_P values), i.e., **N11R2** (-7.64 kcal/mol and 1.1), **N20R2** (-7.59 kcal/mol and -0.7), **N26R2** (-7.48 kcal/mol and 4.4), **N25R2** (-7.44 kcal/mol and 4.1), **N13R2** (-7.43 kcal/mol and 2.8), **N17R2** (-7.07 kcal/mol and 4.4), **N16R1** (-7.04 kcal/mol and 3.2), **N9R2** (-7.04 kcal/mol and 3.9) and **N40R2** (-7.01 kcal/mol and 3.6), respectively. These new derivatives provided the most specificity to protein target, the more favorable binding with protein target (E-binding \leq -7.00 kcal/mol), the good druglikeness properties, and significantly very low hepatotoxicity ($-0.7 \leq$ Tox_P \leq 4.4) compared to the podophyllotoxin. Moreover, it was also found that the best podophyllotoxin derivatives (9 ligands) were likely to form strong interaction with stable conformations in β -tubulin regions within binding site cavity. From the overall results, it can be concluded that these new podophyllotoxin derivatives might be new drug candidates as the microtubule-depolymerizing agents.

Keywords : Podophyllotoxin derivatives ; tubulin heterodimer ; molecular docking ; ADMET

บทนำ

โพลีฟิลาทอกซิน (podophyllotoxin) หรือที่เรียกว่า โพลีฟิลาทอกซ์ (podofilox) (Podophyllotoxin, 2021; Cortest *et al.*, 1977; Imbert, 1998; Basmadjian, 2014) เป็นสารสกัดจากพืชสมุนไพรสายพันธุ์ *Podophyllum* จัดอยู่ในประเภทนอนอัลคาลอยด์ (non-alkaloids) ในตระกูลลิกแนน (lignans) มีการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ที่หลากหลาย ได้แก่ ยาฆ่าเชื้อ ยาด้านไวรัส และยาด้านมะเร็ง เป็นต้น นอกจากนี้โพลีฟิลาทอกซินยังถูกใช้เป็นสารตั้งต้นทางเภสัชวิทยาสำหรับยาด้านมะเร็งที่สำคัญ อาทิเช่น ยา Etoposide (Etoposide, 2021; Basmadjian, 2014) ซึ่งไม่มีผลต่อกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของทูบูลิน แต่มีฤทธิ์ยับยั้งทางมะเร็งวิทยา (oncology) ในส่วนของ DNA topoisomerase และใช้รักษาเคมีบำบัด เช่น มะเร็งลำไส้ มะเร็งตับ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งรังไข่ เป็นต้น และยา Teniposide (Teniposide, 2021; Basmadjian, 2014) ใช้รักษาเคมีบำบัด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดฮอดจ์กิน และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น

โพลีฟิลาทอกซินและอนุพันธ์ของยาโพลีฟิลาทอกซินหลายชนิด (Basmadjian, 2014) มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของไมโครทูบูล (microtubule-depolymerizing agent) เช่นเดียวกับ แท็กซอล (taxol) วินบลาสติน (vinblastine) และวินคาอัลคาลอยด์ (vinca alkaloid) เมื่อตัวยาเกิดการจับกับทูบูลินจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการรวมตัวของทูบูลินไปเป็นไมโครทูบูล นั่นคือ ลดความเสถียรของไมโครทูบูล (microtubule-destabilizing agent) ทำให้กระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสหยุดลง จัดอยู่ในกลุ่มยาที่รู้จักกันในชื่อ ‘antimitotic agent’ ทำหน้าที่ในขั้นตอนระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) โดยยาจะจับกับทูบูลิน ทำให้สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์โดยรบกวนการทำงานของไมโทติคสปินเดิล และการแบ่งเซลล์จะหยุดลงที่ระยะเมทาเฟส (metaphase) แม้ว่ายาด้านมะเร็งเหล่านี้จะมีฤทธิ์ในการรักษาโรคมะเร็งได้ แต่เซลล์มะเร็งก็สามารถต่อต้านยาเหล่านี้ได้ในเวลาต่อมา ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนายาชนิดใหม่ที่มีสมบัติในการยับยั้งกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของไมโครทูบูล และศึกษาอันตรกิริยาในตำแหน่งเข้าจับของยากับทูบูลินเพื่อยับยั้งเซลล์มะเร็งให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและมีความเป็นพิษน้อยจึงสำคัญมาก

รายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการออกแบบและพัฒนายาด้านมะเร็งในกลุ่มของโพลีฟิลาทอกซินที่สำคัญ อาทิเช่น Cortest *et al.* (1977) ได้ทำการทดลองยาด้านมะเร็ง 2 กลุ่มคือ โพลีฟิลาทอกซินและโคลชิซิน ตรวจสอบความสามารถในการจับตัวกับทูบูลินเป้าหมาย พบว่า อนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซินสามารถจับตัวกับทูบูลินได้ดีเช่นเดียวกับอนุพันธ์โคลชิซิน แต่ค่าคงที่อัตราของการรวมตัวของโพลีฟิลาทอกซินสูงกว่าโคลชิซินถึง 10 เท่า เนื่องจากมีค่าพลังงานกระตุ้นต่ำกว่า Gupta *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาสสมบัติเทอร์โมไดนามิกส์ของอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซินที่จับตัวกับทูบูลิน พบว่า เอนทัลปีของการจับตัวระหว่างอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซินกับทูบูลินมีค่าเป็นลบ และตรวจสอบการยึดเกาะของหมู่แทนที่ของอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซินกับทูบูลิน พบว่า ธรรมชาติและสเตอริโอเคมีของ 4'-hydroxy group บนวงแหวน D และ E เป็นส่วนสำคัญที่ยึดเกาะกับทูบูลินและเป็นตำแหน่งที่ถูกปรับเปลี่ยนมากที่สุด Hu *et al.* (2018) ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์ยาด้านมะเร็งของอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซิน-ฟีนอลิกแอซิด (M1 – M16) ที่มีประสิทธิภาพในการจับตัวกับทูบูลินเป้าหมาย (tubulin-target agents) พบว่า สารประกอบ M4 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งสูงสุด Nerella *et al.* (2020) ได้ทำการออกแบบและ

สังเคราะห์ยาต้านมะเร็งของอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซินที่ปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่บนวงแหวน D เป็นแอซิดไฮโดรซายด์ (3a – 3f) พบว่า สารประกอบ 3c และ 3f มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญคล้ายคลึงกับยา Etoposide

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ระเบียบวิธีทางเคมีคอมพิวเตอร์เพื่อช่วยในการออกแบบและพัฒนาาชนิดใหม่ๆ รวมถึงการทำนายสมบัติทางฟิสิกส์เคมีคัล (physicochemical property) จากโครงสร้างทางเคมีของยา และการศึกษาอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างโปรตีนเป้าหมาย หรือ รีเซพเตอร์ (receptor) กับตัวยาภายในตำแหน่งเข้าจับ (binding site) หรือ ตำแหน่งออกฤทธิ์ของยา (active site) ทำให้สามารถพัฒนาาได้อย่างรวดเร็วและมีความเสมือนจริงมากขึ้น ก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้มีรายงานผลการวิจัยการออกแบบและพัฒนาาชนิดใหม่ของอนุพันธ์ทาลิโดไมด์ (Pongsai & Duangoe, 2013) อนุพันธ์โคลชิซิน (Pongsai, 2018) และอนุพันธ์โนโคตาโซล (Pongsai, 2020) มาตามลำดับ และในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคการออกแบบโมเลกุล (Molecular modeling) มาใช้ในการออกแบบอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซิน (podophyllotoxin derivatives) โดยใช้โพลีฟิลาทอกซินเป็นโมเลกุลต้นแบบ และคำนวณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีคัล รวมถึงอันตรกิริยากับโปรตีนเป้าหมายคือ ทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์ (tubulin heterodimer) เพื่อที่จะพัฒนาให้เป็นยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของไมโครทิวบูลเช่นเดียวกับยาโพลีฟิลาทอกซิน

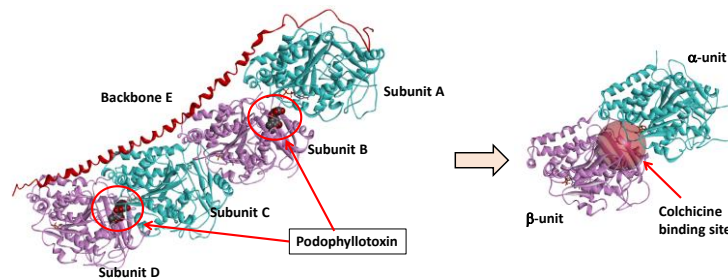
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสร้างแบบจำลองโมเลกุลของรีเซพเตอร์

ทำการสร้างแบบจำลองโครงสร้างของ α,β -ทูบูลิน (2 ไดเมอร์) โดยใช้ PDB code: 1SA1 จากฐานข้อมูล RCSB Protein Data Bank (Ravelli, 2004; <https://www.rcsb.org/structure/1SA1>) ซึ่งเป็นโครงสร้างทางเอกซเรย์ดิฟแฟรกชันของ α,β -ทูบูลิน (2 ไดเมอร์) ที่มีโมเลกุลยาโพลีฟิลาทอกซินอยู่ในตำแหน่งออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จากนั้นใช้โปรแกรม BIOVIA Discovery Studio Visualizer (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) ทำการลบหน่วยย่อย (คือ subunits: C, D, E) และโมเลกุลยาโพลีฟิลาทอกซินออกจากโครงสร้าง จะเหลือเพียงโครงสร้างของ α,β -ทูบูลิน (1 ไดเมอร์) ที่เรียกว่า ทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์ (tubulin heterodimer) แสดงในภาพที่ 1

2. การสร้างแบบจำลองโมเลกุลของโพลีฟิลาทอกซินและอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซิน

ทำการสร้างแบบจำลองโมเลกุลของโพลีฟิลาทอกซิน โดยใช้โปรแกรม BIOVIA Draw version 2018 ในการวาดโครงสร้างแบบ 2 มิติของโพลีฟิลาทอกซิน และใช้เป็นโครงสร้างต้นแบบสำหรับสร้างแบบจำลองโมเลกุลของอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซิน โดยทำการแทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชัน (รหัส N1 – N40) ที่ตำแหน่ง R1 (ในขณะที่ตำแหน่ง R2 จะถูกแทนด้วยอะตอม H) หรือ ที่ตำแหน่ง R2 (ในขณะที่ตำแหน่ง R1 จะถูกแทนด้วยอะตอม H) ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจะสร้างลิแกนด์ของอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซินได้จำนวน 80 ลิแกนด์ จากนั้นใช้โปรแกรม BIOVIA Discovery Studio Visualizer ทำการแปลงโมเลกุลของลิแกนด์เหล่านี้จากโครงสร้างแบบ 2 มิติไปเป็นโครงสร้างแบบ 3 มิติ และทำ 3-D structural geometry optimization (Hahn, 1995) เพื่อปรับให้เป็นโครงสร้างแบบ 3 มิติที่มีสภาวะสมดุลแล้ว ซึ่งเป็นขั้นตอนที่จำเป็นในการเตรียมโมเลกุลของลิแกนด์



ภาพที่ 1 ภาพซ้ายแสดงโครงสร้างการจับตัวกันระหว่าง α,β -ทูบูลิน (2 ไดเมอร์) กับยาโพโดฟิลโลทอกซิน

จาก PDB code: 1SA1 (Ravelli, 2004) และภาพขวาแสดงโครงสร้างของทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์

และตำแหน่งเข้าจับที่ Colchicine binding site

3. การทำโมเลกุลาร์ดีคอกกิ่งระหว่างรีเซพเตอร์กับลิแกนด์

ทำโมเลกุลาร์ดีคอกกิ่งระหว่างรีเซพเตอร์ (คือ ทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์) กับลิแกนด์ (คือ โพโดฟิลโลทอกซิน และอนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซิน (80 ลิแกนด์)) คำนวณโดยโปรแกรม AutoDock และ AutoDockTools version 4.2.6 (ADT4) (Morris *et al.*, 2009) ผลลัพธ์ที่ได้จะอยู่ในเทอมของพลังงานยึดเหนี่ยว (Binding energy) และสมบัติทางโครงสร้างของการจับตัวกันระหว่างทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์กับลิแกนด์ โดยทำการเซท {พารามิเตอร์} สำหรับการทำดีคอกกิ่ง ประกอบด้วย รีเซพเตอร์ {Rigid macromolecule}; ลิแกนด์ {Fully flexible; default rotatable bonds}; Grid box dimension {Center on macromolecule}; Grid center of x/y/z-coordinates {119.7/92.8/10.8}; Grid box boundary {60/60/60 number of points} และเซท {ตัวแปร} ที่ใช้สำหรับการคำนวณ ประกอบด้วย Optimization algorithm {Genetic algorithm}; Number of runs {10}; Maximum number of evals {3,000,000}; Number of cycles {50}; Accepted or Rejected steps/ cycle {25,000}; Output {Lamarckian Generic Algorithm}

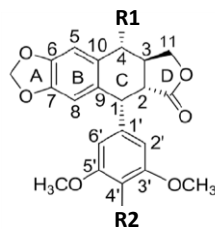
ทำโมเลกุลาร์ดีคอกกิ่งระหว่างทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์กับโพโดฟิลโลทอกซิน เปรียบเทียบกับโครงสร้างทางเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชันจาก PDB code: 1SA1 และคำนวณค่าการซ้อนทับ (overlay similarity; OS) ของโมเลกุลโพโดฟิลโลทอกซิน

4. การคำนวณสมบัติทางฟิสิกเคมีคัลและ ADMET

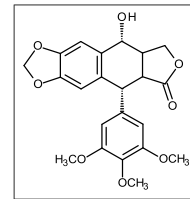
ทำการคำนวณสมบัติทางฟิสิกเคมีคัลของโพโดฟิลโลทอกซินและอนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซิน (80 ลิแกนด์) จะใช้ 'ADMET Descriptors protocol' ในโปรแกรม BIOVIA Discovery Studio Visualizer และคำนวณ ADMET ซึ่งหมายถึงการดูดซึม (Absorbtion) การกระจายตัว (Distribution) การเผาผลาญ (Metabolism) การขับของเสีย (Excretion) และความเป็นพิษ (Toxicity) ต่อร่างกาย ซึ่งผลที่ได้จากการคำนวณจะอยู่ในเทอมของ Hepatotoxicity (Tox_P) หมายถึงความเป็นพิษต่อตับ, CYP2D6 binding (CYP_P) หมายถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 2D6, Plasma protein binding (PPB_P) หมายถึงการจับของโปรตีนกับพลาสมา, Blood brain barrier penetration (BBB) หมายถึงการผ่านเข้าออกระหว่างระบบไหลเวียนโลหิตและระบบประสาทส่วนกลาง, Aqueous solubility (Sol) หมายถึงความสามารถในการละลายน้ำ และ

Human intestinal absorption (Abs) หมายถึงการดูดซึมของลำไส้ โดยทำการวิเคราะห์ค่าตามเกณฑ์ของความเป็นยาที่ยอมรับในงานวิจัยนี้ ดังตารางที่ 2




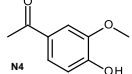
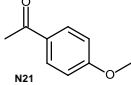












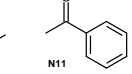






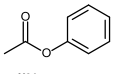
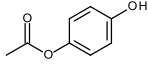
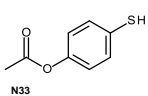



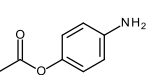
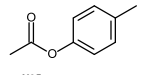
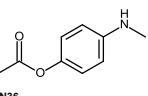







ตารางที่ 1 หมู่ฟังก์ชัน (รหัส N1 - N40) ที่ใช้เป็นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R1 หรือ R2 สำหรับสร้างลิแกนด์ของอนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซิน (80 ลิแกนด์) และยาโพโดฟิลโลทอกซิน



โครงสร้างต้นแบบ



Podophyllotoxin

หมู่ฟังก์ชัน รหัส N1 - N20				หมู่ฟังก์ชัน รหัส N21 - N40			
							
							
							
							
							
							

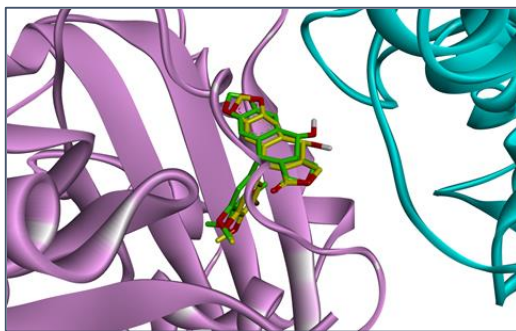
ตารางที่ 2 เกณฑ์ของความเป็นยาที่ยอมรับในงานวิจัยนี้ คำนวณด้วย ‘ADMET Descriptors protocol’

ค่าระดับ	ความหมาย
Tox_P ≤ -4.15	Unlikely to cause dose-dependent liver injuries
-4.15 < Tox_P < 5.0	Slightly cause dose-dependent liver injuries
CYP_P ≤ 0.16	Unlikely to inhibit Cyp2D6 enzyme
PPB_P ≤ -2.21	Bounded (< 90% bound) to plasma proteins
0 ≤ BBB ≤ 3	Inside 99% confidence ellipse
2 ≤ Sol ≤ 4	Acceptable aqueous solubility
0 ≤ Abs ≤ 2	Acceptable human intestinal absorption

ผลการวิจัย

จากผลการคำนวณที่ได้จากการทำโมเลกุลาร์ดีคอกกิ่งระหว่างทูปูลินเฮเทอโรไโดเมอร์กับโพลีฟิลาทอกซินเปรียบเทียบกับโครงสร้างทางเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชันจาก PDB code: 1SA1 พบว่ารูปแบบการเข้าจับของโพลีฟิลาทอกซินภายในตำแหน่งเข้าจับ ทั้งตำแหน่ง (location) และทิศทาง (orientation) มีความใกล้เคียงกับโครงสร้างทางเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชันและมีค่าการซ้อนทับ (overlay similarity; OS) ของโมเลกุล เท่ากับ 90% แสดงดังภาพที่ 2

จากการทำโมเลกุลาร์ดีคอกกิ่ง พบว่า ค่าพลังงานยึดเหนี่ยวระหว่างทูปูลินเฮเทอโรไโดเมอร์กับอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซิน (80 ลิแกนด์, เขียนแทนด้วย รหัส N1R1 - N40R1 และ N1R2 - N40R2) และยาโพลีฟิลาทอกซิน รวมถึงจำนวนพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างลิแกนด์กับเรซิดิว (residues) ซึ่งก็คือหมู่กรดอะมิโน (amino acids) ในตำแหน่งเข้าจับของทูปูลินเฮเทอโรไโดเมอร์ แสดงในตารางที่ 3 โดยที่สัญลักษณ์ N1R1 หมายถึงหมู่ฟังก์ชัน N1 แทนที่ที่ตำแหน่ง R1 และสัญลักษณ์ N1R2 หมายถึงหมู่ฟังก์ชัน N1 แทนที่ที่ตำแหน่ง R2 จากนั้นทำการพลอตกราฟแสดงพลังงานยึดเหนี่ยวระหว่างทูปูลินเฮเทอโรไโดเมอร์กับอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซินสำหรับลิแกนด์ทั้งสองกลุ่ม คือ ลิแกนด์รหัส N1R1 - N40R1 (40 ลิแกนด์) และ N1R2 - N40R2 (40 ลิแกนด์) เปรียบเทียบกับยาโพลีฟิลาทอกซิน ดังแสดงในภาพที่ 3 ในขณะที่ผลการคำนวณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีคัลและคำนวณ ADMET ของยาโพลีฟิลาทอกซินและอนุพันธ์โพลีฟิลาทอกซิน (ลิแกนด์รหัส N1R1 - N40R1 และ N1R2 - N40R2) โดยใช้ 'ADMET Descriptors protocol' แสดงค่าผลลัพธ์ในตารางที่ 4



ค่าการซ้อนทับ = 90%

ภาพที่ 2 (ภาพซ้าย) รูปแบบการเข้าจับของโพลีฟิลาทอกซินภายในตำแหน่งเข้าจับของทูปูลินเฮเทอโรไโดเมอร์ที่ได้จากโมเลกุลาร์ดีคอกกิ่ง (โมเลกุลสีเขียว) เปรียบเทียบกับโครงสร้างทางเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชันจาก PDB code: 1SA1 (โมเลกุลสีเหลือง) และ (ภาพขวา) การซ้อนทับของโมเลกุล (OS) มีค่าเท่ากับ 90%



ตารางที่ 3 พลังงานยึดเหนี่ยวและพันธะไฮโดรเจนระหว่างทูลินเฮเทอโรไโดเมอร์กับอนุพันธ์โอดีฟิลาทอกซิน (80 ลิแกนด์, รหัส N1R1 - N40R1; N1R2 - N40R2) และยาโอดีฟิลาทอกซิน ที่ได้จากการทำโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง

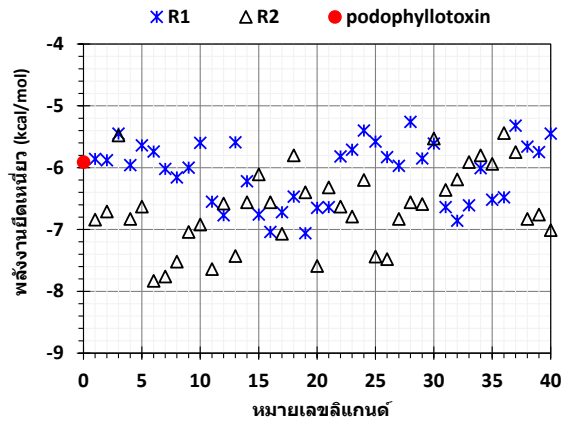
Ligand No.	Ligand Code	E-binding (kcal/mol)	H-bond
1a	N1R1	-5.86	-
2a	N2R1	-5.88	B:THR353:HN-N20; A:THR179:HG1-O25; B:LEU248:HN-O28
3a	N3R1	-5.45	-
4a	N4R1	-5.96	A:GLN11:HE22-O38
5a	N5R1	-5.64	-
6a	N6R1	-5.74	-
7a	N7R1	-6.02	-
8a	N8R1	-6.16	B:THR353:HN-N32
9a	N9R1	-6.00	-
10a	N10R1	-5.60	-
11a	N11R1	-6.55	-
12a	N12R1	-6.77	-
13a	N13R1	-5.59	A:GLN176:O-H26
14a	N14R1	-6.22	-
15a	N15R1	-6.76	-
16a	N16R1	-7.04	-
17a	N17R1	-6.72	A:SER178:O-H25
18a	N18R1	-6.47	A:THR179:OG1-H27
19a	N19R1	-7.06	B:THR353:HN-O38; B:THR353:O-H26
20a	N20R1	-6.65	A:ASN101:HD22-O35
21a	N21R1	-6.64	-
22a	N22R1	-5.82	-
23a	N23R1	-5.71	-
24a	N24R1	-5.40	-
25a	N25R1	-5.58	A:THR179:OG1-H24; A:TYR224:OH-H25
26a	N26R1	-5.83	A:THR179:OG1-H27
27a	N27R1	-5.97	A:SER178:O-H25; A:SER178:O-H26
28a	N28R1	-5.26	B:LYS254:H22-O29
29a	N29R1	-5.85	A:THR179:O-H20
30a	N30R1	-5.61	-
31a	N31R1	-6.64	B:LYS254:H22-O31
32a	N32R1	-6.86	B:THR353:O-H24
33a	N33R1	-6.61	B:THR353:O-H24
34a	N34R1	-6.01	-
35a	N35R1	-6.52	-
36a	N36R1	-6.48	B:THR353:O-H24
37a	N37R1	-5.32	-
38a	N38R1	-5.66	A:THR179:O-H20
39a	N39R1	-5.75	A:THR179:O-H22
40a	N40R1	-5.45	B:LYS254:H22-O30
Podophyllotoxin		-5.91	A:THR179:O-H6
1b	N1R2	-6.84	-
2b	N2R2	-6.71	-
3b	N3R2	-5.48	-
4b	N4R2	-6.83	B:ASN285:O-H23; B:THR353:HN-O16
5b	N5R2	-6.63	-
6b	N6R2	-7.83	-
7b	N7R2	-7.76	-
8b	N8R2	-7.52	B:GLY237:O-H21
9b	N9R2	-7.04	-
10b	N10R2	-6.92	-
11b	N11R2	-7.64	-
12b	N12R2	-6.58	B:THR353:HN-O14
13b	N13R2	-7.43	B:THR376:OG1-H26
14b	N14R2	-6.56	B:THR376:OG1-H27
15b	N15R2	-6.11	A:GLN11:HE22-O23; B:LYS254:H22-O25
16b	N16R2	-6.56	B:VAL315:O-H26; A:GLN11:HE22-O23;
17b	N17R2	-7.07	B:GLY237:O-H24
18b	N18R2	-5.80	B:VAL315:O-H27
19b	N19R2	-6.40	B:LYS352:HN-O39
20b	N20R2	-7.59	B:CYS241:HN-O35
21b	N21R2	-6.32	A:GLN11:HE22-O23; B:LYS254:H22-O25
22b	N22R2	-6.63	-
23b	N23R2	-6.79	-
24b	N24R2	-6.20	-
25b	N25R2	-7.44	-
26b	N26R2	-7.48	-
27b	N27R2	-6.83	A:THR179:OG1-H20; A:THR179:OG1-H25; A:TYR224:OH-H24; A:TYR224:OH-H26
28b	N28R2	-6.56	B:CYS241:HN-O33; B:GLT237:O-H20
29b	N29R2	-6.59	B:CYS241:HN-O32; B:THR240:OG1-H21
30b	N30R2	-5.53	B:THR353:HN-O25
31b	N31R2	-6.36	B:THR353:HN-O14
32b	N32R2	-6.19	B:ASN258:O-H24; B:THR353:HN-O14
33b	N33R2	-5.91	B:VAL355:HN-O25; B:ASN258:O-H24
34b	N34R2	-5.80	B:ASN258:O-H25
35b	N35R2	-5.94	-
36b	N36R2	-5.44	B:VAL315:O-H24
37b	N37R2	-5.75	B:LYS254:H22-O9; A:GLN11:HE22-O7
38b	N38R2	-6.83	B:VAL238:O-H20
39b	N39R2	-6.76	B:GLY237:O-H22
40b	N40R2	-7.01	B:CYS241:HN-O30

หมายเหตุ Ligand No. 1a - 40a คือ Ligand Code: N1R1 - N40R1 ตามลำดับ และ Ligand No. 1b - 40b คือ Ligand Code: N1R2 - N40R2 ตามลำดับ

ตัวอย่าง สัญลักษณ์ N1R1 หมายถึงหมู่ฟังก์ชัน N1 แทนที่ที่ตำแหน่ง R1, สัญลักษณ์ N1R2 หมายถึงหมู่ฟังก์ชัน N1 แทนที่ที่ตำแหน่ง R2

สัญลักษณ์ A:TYR224:OH-H26 หมายถึง H ตำแหน่งที่ 26 ของลิแกนด์เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ O ของหมู่กรดอะมิโน TYR224 ใน α -ทูลิน

สัญลักษณ์ B:THR353:HN-N20 หมายถึง N ตำแหน่งที่ 20 ของลิแกนด์เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ O ของหมู่กรดอะมิโน THR353 ใน β -ทูลิน



ภาพที่ 3 กราฟแสดงพลังงานยึดเหนี่ยวระหว่างหมู่ลิแกนด์ไฮโดรเจนกับอนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซิน (80 ลิแกนด์) เปรียบเทียบกับยาโพโดฟิลโลทอกซิน ที่ได้จากโมเลกุลาร์โดคกิ้ง

ตารางที่ 4 สมบัติทางฟิสิกเคมีคัลและ ADMET ของอนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซิน (80 ลิแกนด์) รหัส N1R1 - N40R1 (Ligand No. 1a - 40a); N1R2 - N40R2 (Ligand No. 1b - 40b) ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้ 'ADMET Descriptors protocol'

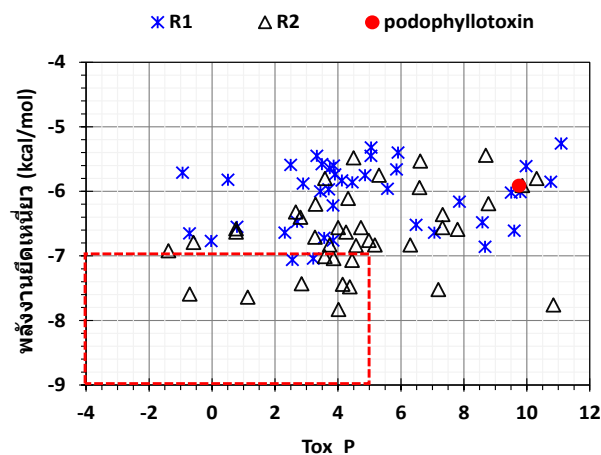
Ligand No.	Ligand Code	Mol. Formula	MW.	Tox_P	CYP_P	PPB_P	BBB	Sol	Abs	Ligand No.	Ligand Code	Mol. Formula	MW.	Tox_P	CYP_P	PPB_P	BBB	Sol	Abs
1a	N1R1	C23 H22 O7	410.4	4.5	-2.1	11.7	3	2	0	1b	N1R2	C23 H22 O7	410.4	4.6	-2.3	11.1	2	2	0
2a	N2R1	C24 H25 N O7	439.5	2.9	-6.3	6.9	3	2	0	2b	N2R2	C24 H25 N O7	439.5	3.3	-7.1	5.9	3	2	0
3a	N3R1	C22 H19 N O6	393.4	5.0	-3.8	12.0	3	2	0	3b	N3R2	C22 H19 N O6	393.4	4.5	-4.0	11.2	3	2	0
4a	N4R1	C29 H26 O9	518.5	5.6	0.4	12.8	4	2	1	4b	N4R2	C29 H26 O9	518.5	6.3	-1.7	13.1	4	2	1
5a	N5R1	C26 H22 O8	462.4	3.7	-3.0	7.1	2	2	0	5b	N5R2	C26 H22 O8	462.4	4.3	-4.1	6.9	2	2	0
6a	N6R1	C26 H23 N O7	461.5	3.9	-2.9	11.2	3	2	0	6b	N6R2	C26 H23 N O7	461.5	4.0	-4.0	11.6	4	1	0
7a	N7R1	C26 H22 O7 S	478.5	9.5	-2.7	15.4	2	2	0	7b	N7R2	C26 H22 O7 S	478.5	10.8	-3.9	17.4	2	1	0
8a	N8R1	C23 H21 N3 O6 S	467.5	7.9	-2.8	9.3	3	2	0	8b	N8R2	C23 H21 N3 O6 S	467.5	7.2	-3.6	10.9	3	2	0
9a	N9R1	C27 H23 N O7	473.5	3.4	-2.4	11.1	2	2	0	9b	N9R2	C27 H23 N O7	473.5	3.9	-3.5	11.5	2	2	0
10a	N10R1	C24 H24 O7	424.4	3.9	-0.7	12.0	2	2	0	10b	N10R2	C24 H24 O7	426.5	-1.4	-4.8	2.6	3	2	0
11a	N11R1	C28 H26 O7	474.5	0.8	-2.4	6.1	2	2	0	11b	N11R2	C28 H26 O7	474.5	1.1	-3.9	6.1	2	2	0
12a	N12R1	C29 H28 O7	488.5	0.0	-3.4	8.2	2	2	0	12b	N12R2	C29 H28 O7	488.5	0.8	-4.8	7.8	2	2	0
13a	N13R1	C28 H26 O8	490.5	2.5	-2.7	2.5	3	2	0	13b	N13R2	C28 H26 O8	490.5	2.8	-3.6	2.2	3	2	0
14a	N14R1	C28 H27 N O7	489.5	3.8	-5.5	3.6	3	2	0	14b	N14R2	C28 H27 N O7	489.5	4.7	-7.0	3.3	3	2	0
15a	N15R1	C30 H31 O7	517.6	3.8	-3.7	5.9	2	2	0	15b	N15R2	C30 H31 O7	517.6	4.3	-5.2	5.9	2	2	0
16a	N16R1	C28 H26 O7 S	506.6	3.2	-2.7	6.0	2	2	0	16b	N16R2	C28 H26 O7 S	506.6	4.0	-4.2	5.7	2	2	0
17a	N17R1	C26 H25 N O7 S	495.5	3.6	-5.6	4.5	3	2	0	17b	N17R2	C26 H25 N O7 S	495.5	4.4	-6.6	4.2	3	2	0
18a	N18R1	C28 H27 N O7	489.5	2.7	-4.3	4.3	3	2	0	18b	N18R2	C28 H27 N O7	489.5	3.6	-5.9	3.9	3	2	0
19a	N19R1	C28 H27 N O9	521.5	2.5	-5.0	3.4	4	2	0	19b	N19R2	C28 H27 N O9	521.5	2.8	-6.6	3.1	4	2	1
20a	N20R1	C27 H28 O7	464.5	-0.7	-3.7	5.1	3	2	0	20b	N20R2	C27 H28 O7	464.5	-0.7	-4.7	4.9	2	2	0
21a	N21R1	C29 H28 O8	504.5	2.3	-3.9	5.7	3	2	0	21b	N21R2	C29 H28 O8	504.5	2.7	-5.5	5.7	3	2	0
22a	N22R1	C22 H23 N O7	413.4	0.5	-8.3	0.1	3	3	0	22b	N22R2	C22 H23 N O7	413.4	0.8	-9.8	-0.2	3	3	0
23a	N23R1	C24 H27 N O7	441.5	-0.9	-7.9	1.3	3	3	0	23b	N23R2	C24 H27 N O7	441.5	-0.6	-9.5	1.0	3	3	0
24a	N24R1	C23 H22 O8	426.4	5.9	-1.4	10.3	3	2	0	24b	N24R2	C23 H22 O8	426.4	3.3	-3.0	11.1	3	2	0
25a	N25R1	C24 H25 N O7	439.5	3.5	-3.9	9.0	3	2	0	25b	N25R2	C24 H25 N O7	439.5	4.1	-4.2	8.7	3	2	0
26a	N26R1	C25 H27 N O7	453.5	4.1	-2.2	9.6	3	2	0	26b	N26R2	C25 H27 N O7	453.5	4.4	-2.5	8.5	3	2	0
27a	N27R1	C24 H26 N2 O8	470.5	3.7	-9.2	6.2	4	2	1	27b	N27R2	C24 H26 N2 O8	470.5	3.7	-9.4	6.7	4	2	1
28a	N28R1	C23 H23 N O8	441.4	11.1	-2.7	16.9	3	2	0	28b	N28R2	C23 H23 N O8	441.4	7.3	-4.0	9.7	3	2	0
29a	N29R1	C22 H21 N O8	427.4	10.8	-3.5	15.3	4	2	0	29b	N29R2	C22 H21 N O8	427.4	7.8	-4.5	9.4	4	2	0
30a	N30R1	C24 H25 N O8	455.5	10.0	-2.3	16.3	3	2	0	30b	N30R2	C24 H25 N O8	455.5	6.6	-3.9	7.2	3	2	0
31a	N31R1	C28 H24 O8	488.5	7.1	-0.8	11.6	2	2	0	31b	N31R2	C28 H24 O8	488.5	7.3	-2.2	11.6	4	1	0
32a	N32R1	C28 H24 O9	504.5	8.7	-0.9	8.2	4	2	1	32b	N32R2	C28 H24 O9	504.5	8.8	-2.4	8.1	4	2	1
33a	N33R1	C28 H24 O8 S	520.6	9.6	-0.9	11.9	4	1	0	33b	N33R2	C28 H24 O8 S	520.6	9.9	-2.3	11.8	4	1	1
34a	N34R1	C28 H25 N O8	503.5	9.8	-3.1	10.4	4	1	1	34b	N34R2	C28 H25 N O8	503.5	10.3	-4.3	10.3	4	1	1
35a	N35R1	C29 H26 O8	502.5	6.5	-2.1	13.5	4	1	0	35b	N35R2	C29 H26 O8	502.5	6.6	-3.4	13.4	4	1	1
36a	N36R1	C29 H27 N O8	517.5	8.6	-1.6	11.7	4	2	0	36b	N36R2	C29 H27 N O8	517.5	8.7	-3.1	11.6	4	1	1
37a	N37R1	C26 H28 O7	452.5	5.1	-1.4	12.6	2	2	0	37b	N37R2	C26 H28 O7	452.5	5.3	-2.4	12.0	2	1	0
38a	N38R1	C22 H20 O7 S	428.5	5.9	-1.9	12.1	2	2	0	38b	N38R2	C22 H20 O7 S	428.5	5.2	-2.9	11.7	2	2	0
39a	N39R1	C23 H22 O7 S	442.5	4.9	-1.6	9.6	3	2	0	39b	N39R2	C23 H22 O7 S	442.5	5.0	-2.4	9.3	2	2	0
40a	N40R1	C24 H24 O7 S	456.5	3.3	-1.1	9.5	2	2	0	40b	N40R2	C24 H24 O7 S	456.5	3.6	-2.0	9.2	2	2	0

หมายเหตุ Mol. Formula (Molecular formula), MW (Molecular weight), Tox_P (Hepatotoxicity), CYP_P (CYP2D6 binding), PPB_P (Plasma protein binding), BBB (Blood-brain barrier level), Sol (Aqueous solubility level), Abs (Human intestinal absorption level)

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการทำโมเลกุลาร์ดีคอกกิ่งระหว่างทูปูลินเฮเทอโรไดเมอร์กับอนุพันธ์โโดฟิลโลทอกซิน (80 ลิแกนด์) ภายในตำแหน่งเข้าจับของทูปูลินเฮเทอโรไดเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 3 พบว่า พลังงานยึดเหนี่ยว (E-binding) ของอนุพันธ์โโดฟิลโลทอกซิน 40 ลิแกนด์ รหัส N1R1 - N40R1 มีค่าอยู่ระหว่าง -7.06 ถึง -5.26 kcal/mol โดยมีจำนวน 21 ลิแกนด์ที่มีค่าพลังงานยึดเหนี่ยวต่ำกว่าโโดฟิลโลทอกซิน (-5.91 kcal/mol) และพลังงานยึดเหนี่ยวของอนุพันธ์โโดฟิลโลทอกซิน 40 ลิแกนด์ รหัส N1R2 - N40R2 มีค่าอยู่ระหว่าง -7.83 ถึง -5.44 kcal/mol โดยมีจำนวน 33 ลิแกนด์ที่มีค่าพลังงานยึดเหนี่ยวต่ำกว่าโโดฟิลโลทอกซิน (-5.91 kcal/mol) นอกจากนี้ยังพบว่า อนุพันธ์ของโโดฟิลโลทอกซินที่ถูกแทนที่ที่ตำแหน่ง R2 ส่วนใหญ่มีแนวโน้มให้ค่าพลังงานยึดเหนี่ยวต่ำกว่าที่ถูกแทนที่ที่ตำแหน่ง R1 อย่างมีนัยสำคัญ บ่งชี้ถึงความเสถียรของการจับตัวกันของโมเลกุลยาที่ถูกแทนที่ที่ตำแหน่ง R2 กับรีเซพเตอร์ ที่แข็งแรงมากกว่าที่ตำแหน่ง R1

ในตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาจำนวนพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างลิแกนด์กับเรซิดิว (residues) ซึ่งก็คือหมู่อกรดอะมิโน (amino acids) ในตำแหน่งเข้าจับของทูปูลินเฮเทอโรไดเมอร์ พบว่า ลิแกนด์รหัส N1R1 - N40R1 สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้จำนวน 0 ถึง 3 พันธะ โดยเรซิดิวที่ถูกพบว่าเกิดพันธะไฮโดรเจนกับลิแกนด์ ได้แก่ A:GLN11, A:ASN101, A:GLN176, A:SER178, A:THR179, A:TYR224 (ใน α -ทูปูลิน) และ B:LEU248, B:LYS254, B:THR353 (ใน β -ทูปูลิน) และลิแกนด์รหัส N1R2 - N40R2 เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง 0 ถึง 4 พันธะ โดยเรซิดิวที่ถูกพบว่าเกิดพันธะไฮโดรเจนกับลิแกนด์ ได้แก่ A:GLN11, A:THR179, A:TYR224 (ใน α -ทูปูลิน) และ B:GLY237, B:VAL238, B:THR240, B:CYS241, B:LYS254, B:ASN258, B:ASN285, B:VAL315, B:LYS352, B:THR353, B:VAL355, B:THR376 (ใน β -ทูปูลิน) สำหรับยาโโดฟิลโลทอกซินจะเกิดพันธะไฮโดรเจน 1 พันธะ โดยเรซิดิวที่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับลิแกนด์ คือ A:THR179:O-H6 (ใน α -ทูปูลิน)



ภาพที่ 4 พล็อตกราฟระหว่างพลังงานยึดเหนี่ยวกับค่า Tox_P ของอนุพันธ์โโดฟิลโลทอกซิน (80 ลิแกนด์) เปรียบเทียบกับยาโโดฟิลโลทอกซิน โดยเส้นประแสดงขอบเขตที่มีค่าพลังงานต่ำสุด (≤ -7.00 kcal/mol) และค่า Tox_P ในระดับที่มีความเป็นพิษต่ำมาก (≤ 5.0)

ในการคัดเลือกอนุพันธ์โพลีฟิลาโทกซินที่ดีที่สุดจากจำนวน 80 ลิแกนด์ จะต้องพิจารณาคุณสมบัติที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ความเป็นพิษต่อตับต่ำมากหรือไม่เป็นพิษต่อตับเลย (จากค่า Tox_P) และมีความเสถียรกับโปรตีนเป้าหมายที่ต่ำกว่ายา โพลีฟิลาโทกซินอย่างมีนัยสำคัญ (จากค่า E-binding) ซึ่งในภาพที่ 4 แสดงขอบเขตของอนุพันธ์โพลีฟิลาโทกซินที่มีสมบัติ ดังกล่าว(เส้นประ) จากกราฟที่พลอตระหว่างพลังงานยึดเหนี่ยวกับค่า Tox_P จะเห็นได้ว่า เราสามารถคัดเลือกอนุพันธ์โพลีฟิลาโทกซินที่ดีที่สุด จำนวน 9 ลิแกนด์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อตับต่ำมาก ($-0.7 \leq Tox_P \leq 4.4$) และมีความเสถียรของการเข้าจับของลิแกนด์กับรีเซพเตอร์ที่ต่ำกว่ายาโพลีฟิลาโทกซินอย่างมีนัยสำคัญ ($E\text{-binding} \leq -7.00$ kcal/mol) โดยเรียงตามลำดับค่าพลังงานยึดเหนี่ยวจากต่ำสุดไปสูงสุดดังนี้ **N11R2** (-7.64 kcal/mol และ 1.1) **N20R2** (-7.59 kcal/mol และ -0.7) **N26R2** (-7.48 kcal/mol และ 4.4) **N25R2** (-7.44 kcal/mol และ 4.1) **N13R2** (-7.43 kcal/mol และ 2.8) **N17R2** (-7.07 kcal/mol และ 4.4) **N16R1** (-7.04 kcal/mol และ 3.2) **N9R2** (-7.04 kcal/mol และ 3.9) และ **N40R2** (-7.01 kcal/mol และ 3.6) ตามลำดับ โดยค่าพลังงานในเทอมของ E-binding, $E_{(vdW+HB)}$, E_{elec} และ E_{tors} ค่าการซ้อนทับ พันธะไฮโดรเจน ADMET และสมบัติทางฟิสิกเคมีคัลของอนุพันธ์โพลีฟิลาโทกซิน (9 ลิแกนด์ที่ดีที่สุด) ที่ได้รับในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับยาโพลีฟิลาโทกซินต้นแบบ ดังแสดงในตารางที่ 5 รวมถึงจำนวนพันธะที่สามารถหมุนได้ (No. rotatable bonds) ของลิแกนด์ด้วย ซึ่งมีจำนวน 4 - 6 พันธะ ดังแสดงในภาพที่ 5

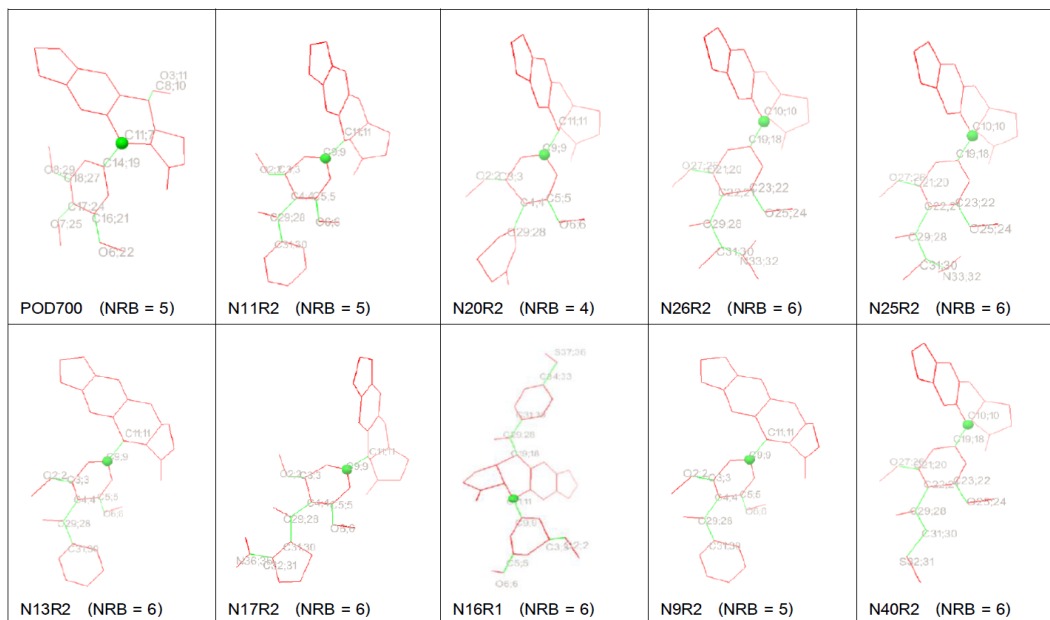
จากตารางที่ 5 จะเห็นว่าพลังงานยึดเหนี่ยว (E-binding) เป็นผลรวมของพลังงานเนื่องมาจาก dispersion/repulsion กับ hydrogen bonding ($E_{(vdW+HB)}$) พลังงานเนื่องมาจากแรงไฟฟ้าสถิต (E_{elec}) และพลังงานเนื่องมาจากแรงบิด (E_{tors}) โดยที่ $E_{(vdW+HB)}$ มีผลต่ออันตรกิริยาเป็นอย่างมาก (-8.27 ถึง -9.04 kcal/mol) ในขณะที่ E_{elec} (-0.11 ถึง -0.96 kcal/mol) และ E_{tors} (1.19 ถึง 1.79 kcal/mol) มีผลต่ออันตรกิริยาเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างลิแกนด์กับเรซิดิว ซึ่งมีจำนวนเพียง 0 ถึง 1 พันธะ ชี้ให้เห็นว่าพลังงานเนื่องจากพันธะไฮโดรเจนไม่มีผลต่ออันตรกิริยาอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 5 พลังงานในเทอมต่าง ๆ ค่าการซ้อนทับ พันธะไฮโดรเจน ADMET และสมบัติทางฟิสิกเคมีคัลของอนุพันธ์

โพลีฟิลาโทกซิน (9 ลิแกนด์ที่ดีที่สุด) ที่ได้รับในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับยาโพลีฟิลาโทกซินต้นแบบ

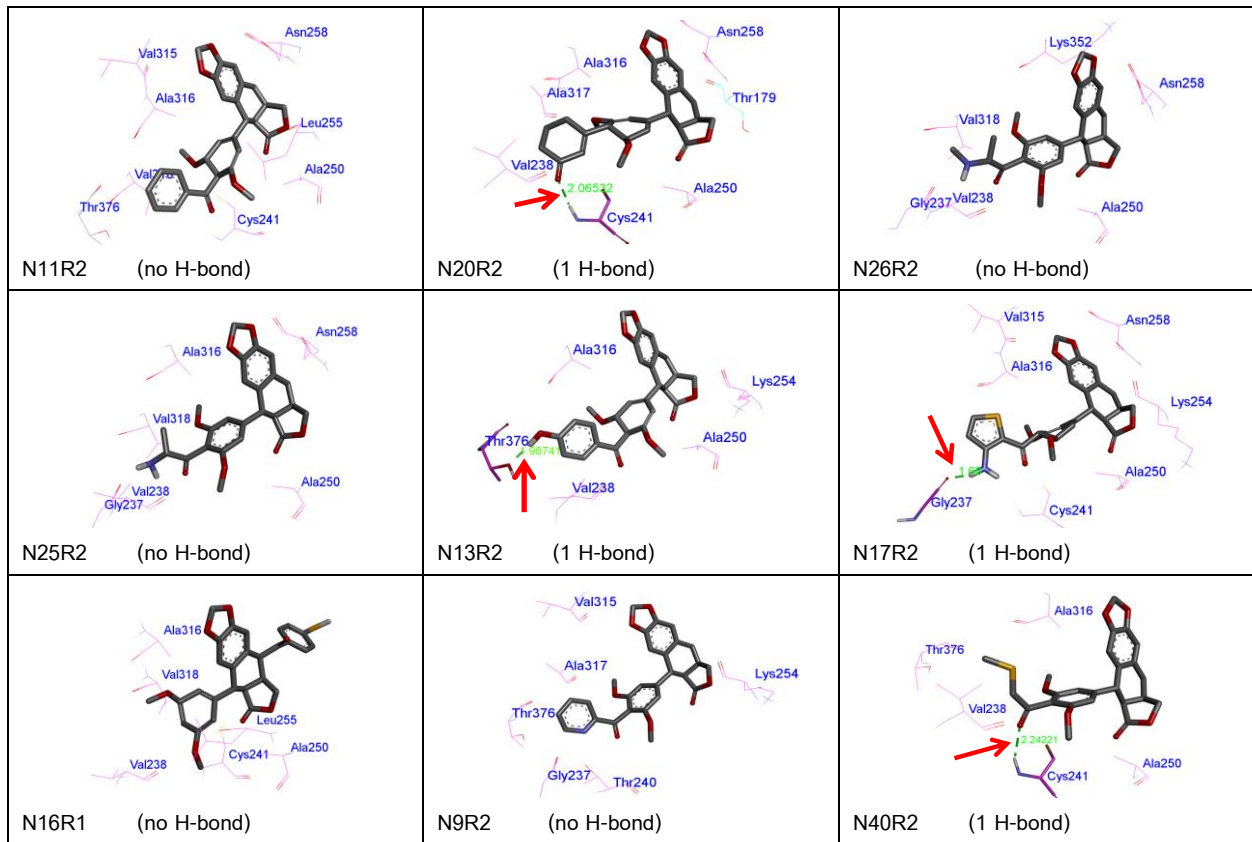
Ligand No.	Ligand Code	E-binding	$E_{(vdW+HB)}$	E_{elec}	E_{tors}	No. rotatable bonds	O.S.	H-bond	Tox_P	CYP_P	PPB_P	BBB	Sol	Abs
11b	N11R2	-7.64	-9.02	-0.11	1.49	5	0.80	-	1.1	-3.9	6.1	2	2	0
20b	N20R2	-7.59	-8.61	-0.17	1.19	4	0.72	B:CYS241:HN--O35	-0.7	-4.7	4.9	2	2	0
26b	N26R2	-7.48	-8.33	-0.94	1.79	6	0.79	-	4.4	-2.5	8.5	3	2	0
25b	N25R2	-7.44	-8.27	-0.96	1.79	6	0.79	-	4.1	-4.2	8.7	3	2	0
13b	N13R2	-7.43	-9.04	-0.19	1.79	6	0.78	B:THR376:OG1--H26	2.8	-3.6	2.2	3	2	0
17b	N17R2	-7.07	-8.62	-0.24	1.79	6	0.79	B:GLY237:O--H24	4.4	-6.6	4.2	3	2	0
16a	N16R1	-7.04	-8.71	-0.12	1.79	6	0.53	-	3.2	-2.7	6.0	2	2	0
9b	N9R2	-7.04	-8.39	-0.14	1.49	5	0.67	-	3.9	-3.5	11.5	2	2	0
40b	N40R2	-7.01	-8.62	-0.18	1.79	6	0.80	B:CYS241:HN--O30	3.6	-2.0	9.2	2	2	0
	Podophyllotoxin	-5.91	-7.26	-0.14	1.49	5		A:THR179:O--H6	9.8	-2.9	18.2	3	2	0

หมายเหตุ E-binding คือพลังงานยึดเหนี่ยว; $E_{(vdW+HB)}$ คือพลังงานเนื่องมาจาก dispersion/repulsion กับ hydrogen bonding; E_{elec} คือพลังงานเนื่องมาจากแรงไฟฟ้าสถิต (electrostatics); E_{tors} คือพลังงานเนื่องมาจากแรงบิด (torsion); No. rotatable bonds คือจำนวนพันธะที่สามารถหมุนได้ของลิแกนด์; O.S. คือค่าการซ้อนทับ (overlay similarity); H-bond คือพันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่างลิแกนด์กับเรซิดิว; 6 คอลัมน์ท้ายคือค่าของ ADMET และสมบัติทางฟิสิกเคมีคัล

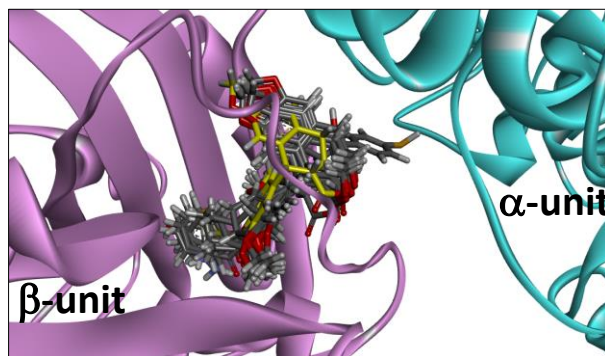


ภาพที่ 5 จำนวนพันธะที่สามารถหมุนได้ (Number of rotatable bonds; NRB) ของโอดีฟิลโลทอกซิน (POD700) และอนุพันธ์โอดีฟิลโลทอกซิน (จากตารางที่ 5)

การเปรียบเทียบคอนฟอร์เมชัน (conformation) ของอนุพันธ์โอดีฟิลโลทอกซิน จำนวน 9 ลิแกนด์นี้กับคอนฟอร์เมชันของยาโอดีฟิลโลทอกซินที่อยู่ในตำแหน่งเข้าจับ จะเห็นว่า 6 ลิแกนด์ มีค่า O.S. สูงสุดอยู่ระหว่าง 0.78 – 0.80 (หรือ 78 – 80%) ซึ่งจะมีการจัดวางตัวของโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับยาโอดีฟิลโลทอกซินค่อนข้างมาก นั่นคือ ลิแกนด์รหัส N11R2 (0.80), N40R2 (0.80), N17R2 (0.79), N25R2 (0.79), N26R2 (0.79) และ N13R2 (0.78) ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลมาจากหมู่ฟังก์ชันที่ถูกแทนที่ที่ตำแหน่ง R2 มีการปรับตัวของโมเลกุลเพียงบางส่วนขณะเกิดอันตรกิริยากับเรซิดิวภายในตำแหน่งเข้าจับและอาจเกิดพันธะไฮโดรเจนขึ้นระหว่างลิแกนด์กับเรซิดิว ดังแสดงในภาพที่ 6 สำหรับรูปแบบการจับตัวกันระหว่างทูลินเฮเทอโรไดเมอร์กับอนุพันธ์โอดีฟิลโลทอกซิน (9 ลิแกนด์ที่ดีที่สุด) ภายในตำแหน่งเข้าจับเปรียบเทียบกับยาโอดีฟิลโลทอกซินที่แสดงในภาพที่ 7 จะเห็นว่า มีแนวโน้มเกิดอันตรกิริยาและการจับตัวที่เสถียรในบริเวณ β -ทูลิน มากกว่าที่จะเกิดในบริเวณของ α -ทูลิน ภายในโพรงของตำแหน่งเข้าจับ



ภาพที่ 6 คอนฟอร์เมชัน (conformations) ของอนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซิน (9 ลิแกนด์ที่ดีที่สุด) ภายในตำแหน่งเข้าจับของทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์ โดยลูกศรชี้ตำแหน่งพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นกับเรซิดิวของทูบูลินเฮเทอโรไดเมอร์

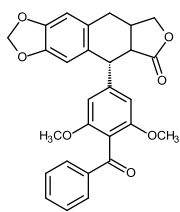
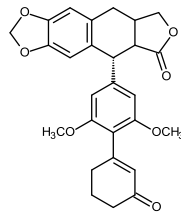
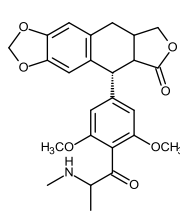
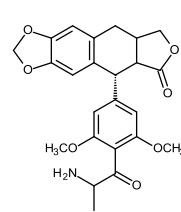
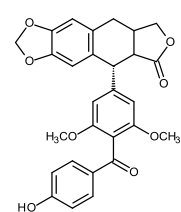
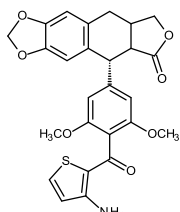
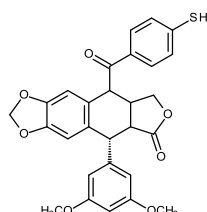
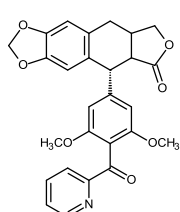
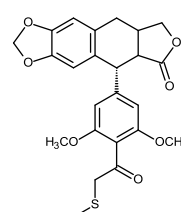


ภาพที่ 7 อนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซิน 9 ลิแกนด์ที่ดีที่สุด (โมเลกุลสีเทา) มีแนวโน้มเกิดอันตรกิริยาและการจับตัวที่เสถียรในบริเวณ β -ทูบูลิน ภายในโพรงของตำแหน่งเข้าจับ เปรียบเทียบกับยาโพโดฟิลโลทอกซิน (โมเลกุลสีเหลือง)

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาด้วยวิธีทางเคมีคอมพิวเตอร์โดยอาศัยการทำโมเดลาร์ดีอกกึ่งมีประโยชน์อย่างสำคัญในการสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับอันตรกิริยาและการจับตัวกันระหว่างทูปูลินเฮเทอโรไโดเมอร์กับอนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซิน และยังสามารถทำนายสมบัติทางฟิสิกเคมีคัลและ ADMET ของโมเดลกุลยาที่ออกแบบขึ้นใหม่ ในงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า อนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซินชนิดใหม่จำนวน 9 ลิแกนด์ (คือ N11R2 N20R2 N26R2 N25R2 N13R2 N17R2 N16R1 N9R2 และ N40R2 ตามลำดับ) ที่มีความเจาะจงต่อโปรตีนเป้าหมาย (คือ ทูปูลินเฮเทอโรไโดเมอร์) มีความเสถียรในการจับตัวกับโปรตีนเป้าหมายสูง (E-binding ≤ -7.00 kcal/mol) มีสมบัติความเป็นยาที่ดี (CYP_P, PPB_P, BBB, Sol และ Abs อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ) และมีความเป็นพิษต่อตับต่ำมาก ($-0.7 \leq \text{Tox}_P \leq 4.4$) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับยาโพโดฟิลโลทอกซิน ซึ่งอนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซินเหล่านี้ น่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของไมโครทูปูล

อนุพันธ์โพโดฟิลโลทอกซิน 9 ลิแกนด์ที่ดีที่สุด มีแนวโน้มเกิดอันตรกิริยาและการจับตัวที่เสถียรในบริเวณ β -ทูปูลินภายในโพรงของตำแหน่งเข้าจับ โดยมีโครงสร้างของโมเดลกุล (และค่า Tox_P) ดังนี้

N11R2 ($\text{Tox}_P = 1.1$)N20R2 ($\text{Tox}_P = -0.7$)N26R2 ($\text{Tox}_P = 4.4$)N25R2 ($\text{Tox}_P = 4.1$)N13R2 ($\text{Tox}_P = 2.8$)N17R2 ($\text{Tox}_P = 4.4$)N16R1 ($\text{Tox}_P = 3.2$)N9R2 ($\text{Tox}_P = 3.9$)N40R2 ($\text{Tox}_P = 3.6$)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความเชื่อเพื่อสถานที่ทำวิจัยจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และได้รับการสนับสนุนโปรแกรมการคำนวณจาก Dassault Systèmes BIOVIA และจาก The Scripps Research Institute จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้



เอกสารอ้างอิง

Basmadjian, C., Zhao, Q., Bentouhami, E., Djehal, A., Nebigil, C.G., Johnson, R.A., Serova, M., de Gramont, Faivre, S., Raymond, E., & Dèsaubry, L.G. (2014). Cancer Wars: Natural Products Strike Back. *Frontiers in Chemistry*, 2(20), 1-18.

Etoposide. (2021). *Wikipedia The Free Encyclopedia*. Retrieved April 15, 2021, from <https://en.wikipedia.org/wiki/Etoposide>

Gupta, S., Das, L., Datta, A.B., Poddar, A., Janik, M.E., & Bhattacharyya, B. (2006). Oxalone and Lactone Moieties of Podophyllotoxin Exhibit Properties of Both the B and C Rings of Colchicine in Its Binding with Tubulin. *Biochemistry*, 45, 6467-6475.

Hahn, M. (1995). Receptor surface models: 1. Definition and construction, *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 2080-2090.

Hu, C., Zhu, X., Wang, G.-H., Wu, X., Han, H.-W., Lu, G.-H., Qi, J.-L., Pang, Y.-J., Yang, R.-W., Wang, X.-M., and Yang, Y.-H. (2018). Design, Synthesis and Anti-cancer Evaluation of Novel Podophyllotoxin Derivatives as Potent Tubulin-Targeting Agents. *Medicinal Chemistry Research*, 27, 351–365.

Imbert, TF. (1998). Discovery of Podophyllotoxin. *Biochimie*, 80, 207-222.

Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., & Olson, A.J. (2009). Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30, 2785-2791.

Nerella, S., Kankaka, S. Paidakula, S., & Gavaji, B. (2020). Synthesis of D-ring Modified Acid Hydrazide Derivatives of Podophyllotoxin and Their Anticancer Studies as Tubulin Inhibiting Agents. *Bioorganic Chemistry*, 94(103384), 1-3.

RCSB Protein Data Bank. (2021). Retrieved April 15, 2021, from <https://www.rcsb.org/structure/1SA1>



Podophyllotoxin. (2021). *Wikipedia The Free Encyclopedia*. Retrieved April 15, 2021, from <https://en.wikipedia.org/wiki/Podophyllotoxin>

Pongsai, S. (2020). *In Silico Drug Design and Molecular Docking Study of Some Related Structural Isomers of Nocodazole Analogues as Tubulin-Polymerization Inhibitors*. *NU. International Journal of Science*, 17(2), 1-16.

Pongsai, S. (2018). *In Silico Study of the Interaction between the Modified B-ring Analogues of Colchicine with Tubulin Heterodimer*. *Burapha Science Journal*, 23(1), 44-60.

Pongsai, S., & Duangoe, C. (2013). *In Silico Drug Design and Molecular Docking Study of Thalidomide Derivatives as Tubulin-Polymerization Inhibitors*. In *Proceeding Pure and Applied Chemistry International Conference 2013*. (pp. 911-914). Bangsaen Beach: Thailand.

Ravelli, R.B.G., Gigant, B., Curmi, P.A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., & Marcel Knossow, M. (2004). Insight into Tubulin Regulation from a Complex with Colchicine and a Stathmin-like Domain. *Nature*, 428, 198-202.

Tenposide. (2021). *Wikipedia The Free Encyclopedia*. Retrieved April 15, 2021, from <https://en.wikipedia.org/wiki/Tenposide>