

**DEVELOPMENT OF DRUGS FROM THERAPEUTIC TARGETS  
IN COBRA VENOM USING STRUCTURE BASED  
DRUG DESIGN AND VIRTUAL SCREENING**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND PHYTOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การพัฒนาจากบริเวณที่ออกฤทธิ์ในพิษงูโดยใช้เทคนิคการออกแบบยาจากโครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมายและเทคนิคการคัดกรองประสิทธิภาพสูง (DEVELOPMENT OF DRUGS FROM THERAPEUTIC TARGETS IN COBRA VENOM USING STRUCTURE BASED DRUG DESIGN AND VIRTUAL SCREENING)

มาลีรักษ์ อัดต์สินทอง 4636358 PYPP/D

ปร.ด. (เภสัชเคมีและพฤกษเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: โอภา วัชรคุปต์, Ph.D., วิเศษฐ์ ลีลามานิตย์, Ph.D., Arthur J. Olson, Ph.D.

### บทคัดย่อ

แอลฟาโคบราที่ออกซินจากงูเห่าไทยเป็นนิวโรทอกซินชนิดสายโซ่ยาว ออกฤทธิ์โดยการจับที่โพสซินแนบติกของอะซิติลโคลีนรีเซปเตอร์ทำให้อะซิติลโคลีนไม่สามารถจับกับรีเซปเตอร์ได้ เป็นสาเหตุของการเกิดอัมพาต การวิจัยนี้เป็นการออกแบบสารต้านพิษงูโดยใช้แอลฟาโคบราที่ออกซินเป็นโมเลกุลเป้าหมายและศึกษากลไกการต้านพิษงูของสารเรดิโอไอโซต์เอและบีจากสมุนไพรรอคตะนงโดยใช้เทคนิคโมเลกุลาร์ดีคอกกิง เริ่มจากการเตรียมแม่แบบของแอลฟาโคบราที่ออกซิน โดยใช้ข้อมูลจากการเอ็กซ์เรย์ผลึกแอลฟาโคบราที่ออกซินที่จับกับอะซิติลโคลีนบายดิงโปรตีน (PDB: 1Y15) และใช้เปปไทด์ตำแหน่งที่ 182-192 ของอะซิติลโคลีนบายดิงโปรตีนในการตรวจสอบความถูกต้องของแม่แบบซึ่งผลการตรวจสอบให้ค่า RMSD น้อยกว่า 1.2 อังสตรอม กลไกการออกฤทธิ์ของสารเรดิโอไอโซต์เอและบีคือ จับกับแอลฟาโคบราที่ออกซินที่ตำแหน่ง แอสพาราจิน27 ฟีนิลอะลานีน29 อาร์จินีน33 ไกลซีน34 ไลซีน35 และวาลีน37 ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกันกับที่แอลฟาโคบราที่ออกซินจับกับบายดิงโปรตีนพลังงานในการจับต่ำสุดมีค่า -14.17 และ -14.14 กิโลแคลอรีต่อโมลตามลำดับ ดังนั้นแอลฟาโคบราที่ออกซินจึงไม่สามารถจับกับอะซิติลโคลีนบายดิงโปรตีนเนื่องจากกรดอะมิโนบางตัวของแอลฟาโคบราที่ออกซินถูกรีดิโอไอโซต์เอจับอยู่ นอกจากนี้ยังใช้แม่แบบแอลฟาโคบราที่ออกซินมาคัดกรองสารจำนวน 1990 สารจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ได้โครงสร้างสารที่มีศักยภาพจำนวน 39 สาร และเมื่อนำสารทั้ง 39 สารมาทดสอบในหลอดทดลองได้สารต้นแบบ 3 สารที่มีความสามารถในการแข่งขันกับแอลฟาบังกาโลที่ออกซินและสารอีพิบาดีนินที่ติดฉลากกัมมันตรังสีโดยแย่งจับกับอะซิติลโคลีนบายดิงโปรตีนทั้ง 3 ชนิด สาร NCI121865 มีฤทธิ์สูงสุดสามารถจับกับบายดิงโปรตีนจาก *Aplysia Lymnaea* และ *Bolinus* ที่ 16.26 111 และ 415 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ ผลการศึกษาโดยใช้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า เรดิโอไอโซต์เอและบีสามารถลดความเข้มข้นของแอลฟาโคบราที่ออกซิน NCI121865 เพิ่มความเข้มข้นของแอลฟาโคบราที่ออกซิน NCI42258 และ NCI134754 เปลี่ยนคุณสมบัติแอลฟาโคบราที่ออกซิน ในกรณีที่มีทั้งบายดิงโปรตีนและพิษงูพบว่า สารต้นแบบทั้งสามสารและเรดิโอไอโซต์เอจับได้ทั้งแอลฟาโคบราที่ออกซินและบายดิงโปรตีนเมื่อศึกษาต่อในหนูถีบจักรพบว่า สารต้นแบบและเรดิโอไอโซต์เอสามารถยืดระยะเวลาการตายของหนูเมื่อนิดแอลฟาโคบราที่ออกซินหลังจากฉีดสาร 30 นาที แต่มีสารต้นแบบสองสารคือ NCI121865 และ NCI134754 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านพิษงู โดยสามารถยืดระยะเวลาการตายของหนูเมื่อนิดสารหลังจากแอลฟาโคบราที่ออกซินทันที ในทางคลินิก NCI121865 และ NCI134754 จะมีประโยชน์ในการพัฒนาเป็นสารต้านพิษงูในการรักษาผู้ถูกกัด

**DEVELOPMENT OF DRUGS FROM THERAPEUTIC TARGETS IN COBRA VENOM USING STRUCTURE BASED DRUG DESIGN AND VIRTUAL SCREENING.**

MALEERUK UTSINTONG 4636358 PYPP/D

Ph.D. (PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND PHYTOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: OPA VAJRAGUPTA, Ph.D., WICHET LEELAMANIT, Ph.D., ARTHUR J. OLSON, Ph.D.

**ABSTRACT**

Alpha-cobratoxin ( $\alpha$ -cbtx), the long chain neurotoxin from *Naja kaouthia* acts on the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) and causes paralysis by preventing acetylcholine binding to nAChR.  $\alpha$ -Cbtx has been proposed as a potential target for anticobratoxin drug design. Investigation of redioides (A & G) binding mode to reveal the molecular mechanism of its antivenom action was achieved by means of molecular docking. The  $\alpha$ -cbtx/ acetylcholine binding protein (AChBP) complex (1Y15) was selected to construct  $\alpha$ -cbtx active binding site for docking. The constructed  $\alpha$ -cbtx template was validated with the control peptide (Ser182 – Tyr192 of AChBP) and the RMSD was less than 1.2 Å. Redioides bind to the  $\alpha$ -cbtx in the same location that the  $\alpha$ -cbtx binds to AChBP at the Asp27, Phe29, Arg33, Gly34, Lys35 and Val37 residues. The binding energies were -14.17 and -14.14 kcal/mol, respectively. Thus,  $\alpha$ -cbtx cannot bind to AChBP because some of its binding sites are occupied with redioides. The template was also employed in the virtual screening of over 1990 compounds in NCI diversity set and 39 hits were identified. The potential hits are NCI42258, NCI121865 and NCI134754 which competitively displace the antagonist ( $^{125}$ I  $\alpha$ -bungarotoxin) and the agonist ( $^3$ H epibatidine) from their mutually exclusive binding sites on *Lymnaea stagnalis* (*Ls*), *Aplysia californica* (*Ac*) and *Bulinus truncatus* (*Bt*) AChBPs. In particular, NCI121865 had  $K_d$  of 16.26 nM against *Ac* and 111 nM and 415 nM against *Ls* and *Bt*, respectively. The results from SDS-PAGE found that redioides neutralized and diminished the  $\alpha$ -cbtx band intensity. NCI121865 bound the  $\alpha$ -cbtx in crude venom resulting in the increase of the  $\alpha$ -cbtx band intensity. NCI42258 and NCI134754 changed some characteristics of the  $\alpha$ -cbtx and broadened  $\alpha$ -cbtx band. In the presence of AChBP, it was apparent that three hits and redioides bound to both  $\alpha$ -cbtx and AChBP. *In vivo*, three hits (5 mg/kg, i.v.) and redioides (0.5 mg/kg, i.v.) can prolong the survival times of the mice when injected 30 minutes before injection of the  $\alpha$ -cbtx (3LD<sub>50</sub> dose). Only NCI121865 and NCI134754 demonstrated the antivenom action; they can prolong the survival time when injected immediately after injection of the  $\alpha$ -cbtx. In clinical applications, NCI121865 and NCI134754 would be a very useful potential lead for the treatment of snakebite victims.

**KEY WORDS : ALPHA-COBRATOXIN / ANTICOBRATOXIN / DOCKING / ACETYLCHOLINE / VIRTUAL SCREENING.**

170 pp.