



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Phthalimide เพื่อประเมิน
ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 Reverse Transcriptase
ในหลอดทดลอง”

**Synthesis and *In Vitro* Evaluation of Phthalimide Derivatives
as Potential HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors**

โดย รศ. ดร. จิรภรณ์ อังวิทยาธร และคณะ

พฤษภาคม พ.ศ. 2549



สัญญาเลขที่ DBG4780001

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Phthalimide เพื่อประเมิน
ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 Reverse Transcriptase ใน
หลอดทดลอง”

**Synthesis and *In Vitro* Evaluation of Phthalimide Derivatives as
Potential HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors**

คณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร. จิรภรณ์ อังวิทยาธร ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. รศ.ดร. จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. ดร. วีระศักดิ์ สามิ กลุ่มวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
4. นางสาวนฤมล โพธิ์ศรีทอง ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Phthalimide เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 Reverse Transcriptase ในหลอดทดลอง" นี้ ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยในด้านค่าใช้จ่ายต่างๆในโครงการ นอกจากนี้ยังได้รับความเอื้อเฟื้อจากศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (National Electronics and Computer Technology Center หรือ NECTEC) ในด้านอุปกรณ์คอมพิวเตอร์และซอฟต์แวร์ทางด้าน Molecular Modeling คณะผู้ดำเนินการวิจัยใคร่ขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวเป็นอย่างมากและขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และสาธารณูปโภคต่างๆไว้ ณ ที่นี้

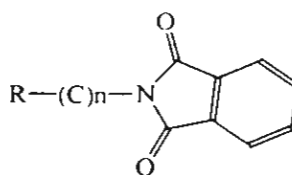
คณะผู้ดำเนินการวิจัย

พฤษภาคม 2549

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้สังเคราะห์สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ซึ่งอยู่ในกลุ่ม non-nucleoside กลุ่มใหม่ ได้แก่อนุพันธ์ของ phthalimide โดยสังเคราะห์จากสารประกอบ N-carboethoxyphthalimide ทำปฏิกิริยากับสารประกอบ amine และสังเคราะห์จากสารประกอบ phthalimide ทำปฏิกิริยากับ substituted benzyl halide สารที่สังเคราะห์ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวในหลอดทดลองโดยวิธี radiometric assay ใช้ความเข้มข้นของสารที่ 200 $\mu\text{g/mL}$ โดยมี poly(rA).oligo(dT) เป็น template-primer, methyl-[^3H]dTTP เป็น substrate และใช้ doxorubicin (1.25 mM) เป็น positive control พบว่า 4-phthalimidomethyl-1,2-dihydroxybenzene, 2-phthalimidoethylfuran และ 2-phthalimido-5-methylpyrazine เป็นอนุพันธ์ใน 3 ลำดับแรกที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 60.90, 98.10 และ 120.75 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ายา delavirdine (ค่า IC_{50} เท่ากับ 502.22 $\mu\text{g/mL}$ โดยมี poly(rA).oligo(dT) เป็น template-primer และ [^3H]dTTP เป็น substrate) โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ phthalimide จำนวน 21 อนุพันธ์และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ของอนุพันธ์ดังกล่าวนำมาใช้ในการศึกษา 3D QSAR ด้วยวิธี comparative molecular field analysis (CoMFA) และ comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสนามโมเลกุลกับการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ของสาร ในกรณี CoMFA model ที่ดีที่สุดมีค่า cross-validated r^2 (q^2) เท่ากับ 0.688 ค่า non-cross-validated r^2 เท่ากับ 0.996 โดยใช้ค่าพลังงาน highest occupied molecular orbital (HOMO) ในการศึกษานอกเหนือจากค่า CoMFA fields ในกรณีของ CoMSIA model ที่ดีที่สุดมีค่า q^2 เท่ากับ 0.629 ค่า non-cross-validated r^2 เท่ากับ 0.994 โดยใช้ค่า steric, electrostatic, hydrophobic และ H-bond acceptor fields ในการศึกษา อนุพันธ์ phthalimide จำนวน 12 อนุพันธ์ ใช้เป็น test set เพื่อศึกษาความสามารถในการใช้ทำนายฤทธิ์ของสาร พบว่าค่าที่ได้จากการคำนวณและจากการทดลองมีความสัมพันธ์กัน ผลของ 3D contour map ที่ได้จากการศึกษา CoMFA และ CoMSIA จะแสดงถึงโครงสร้างของสารที่ควรสังเคราะห์ที่นำออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ได้ดียิ่งขึ้น

โครงการวิจัยนี้ยังได้ใช้เทคนิคทาง docking simulation นำมาศึกษาปฏิกิริยาการจับกันระหว่างอนุพันธ์ phthalimide กับเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ผลที่ได้จากการศึกษาจะให้ข้อมูลทางด้านโครงสร้างของสารที่ทำให้จับกับเอนไซม์ได้ดีขึ้นซึ่งนำไปสู่การออกฤทธิ์ที่ดีขึ้น

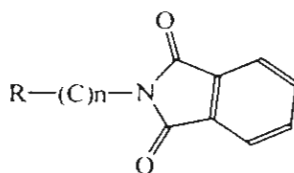


R = substituted aromatics or alicyclic rings
n = 0,1,2,3

Abstract

New type of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in phthalimide series has been synthesized from either the reaction of N-carboethoxyphthalimide with amines or phthalimide with appropriate alkyl halides. The *in vitro* inhibitory activity of the synthesized compounds was performed by radiometric assay at concentration 200 $\mu\text{g/ml}$ using poly(rA).oligo(dT) as template-primer, methyl- $[\text{}^3\text{H}]\text{dTTP}$ as substrate and doxorubicin (1.25 mM) as positive control. The three most potent compounds, 4-phthalimidomethyl-1,2-dihydroxybenzene, 2-phthalimidoethylfuran and 2-phthalimido-5-methylpyrazine exhibited IC_{50} of 60.90, 98.10 and 120.75 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which were lower than IC_{50} of delavirdine (502.22 $\mu\text{g/mL}$, using poly(rA).oligo(dT) as template-primer and $[\text{}^3\text{H}]\text{dTTP}$ as substrate). The structures and activity of 21 derivatives were subjected to 3D QSAR study, using comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) to correlate the molecular fields with their enzyme inhibitory activity. The best predictive CoMFA model gave cross-validated r^2 (q^2) = 0.688, non-cross-validated r^2 = 0.996, included the highest occupied molecular orbital (HOMO) energies in addition to CoMFA fields, and the best predictive CoMSIA model has q^2 = 0.629, non-cross-validated r^2 = 0.994, included steric, electrostatic, hydrophobic and hydrogen bond acceptor fields. A test set of 12 compounds was used to determine the predictive value of the models. The calculated (predicted) and experimental inhibitory activities were well correlated. The analysis of the 3D contour maps from both CoMFA and CoMSIA models offer important structural insight into designing novel and more active compounds prior to their synthesis.

The docking simulation technique was also performed with phthalimide series in order to investigate the inhibitor/enzyme binding interactions. The results suggested structural features required for tighter binding and better inhibitory activity.



R = substituted aromatics or alicyclic rings
n = 0,1,2,3

Executive Summary

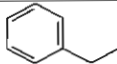
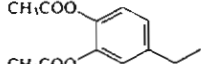
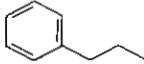
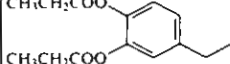
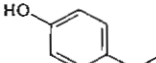
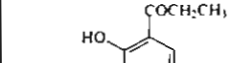
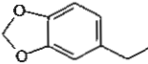
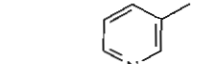
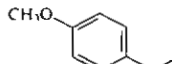
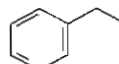
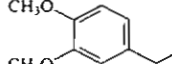
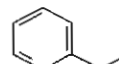
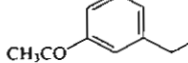
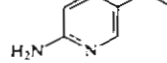
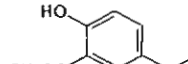
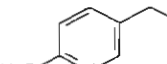
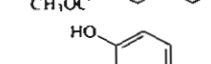
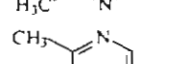
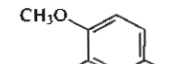
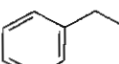
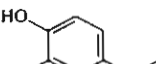
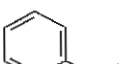
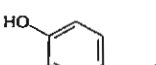
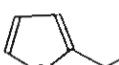
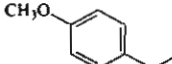
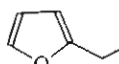
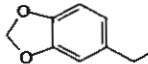
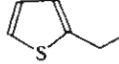
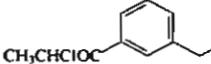
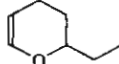
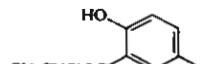
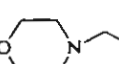
วัตถุประสงค์

1. สังเคราะห์สารในกลุ่ม non-nucleoside ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ phthalimide ซึ่งคาดว่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase
2. ทำการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองในการยับยั้งเอนไซม์ของสารที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธี radiometric assay
3. ศึกษาวิเคราะห์เปรียบเทียบสนามโมเลกุลโดยวิธี Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) และ Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (CoMSIA) ของสารที่สังเคราะห์ขึ้น เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสนามโมเลกุลกับการออกฤทธิ์ของสาร และนำผลที่ได้มาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น
4. ศึกษาปฏิกิริยาการจับกันระหว่างอนุพันธ์ phthalimide กับเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase โดยใช้เทคนิคของ docking simulation

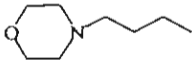
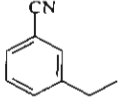
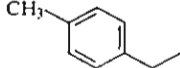
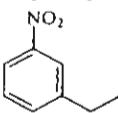
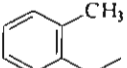
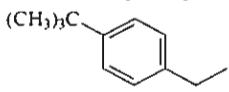
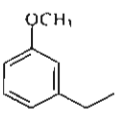
สิ่งที่ได้ดำเนินการและผลที่ได้

1. ทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ phthalimide ทั้งสิ้น 39 อนุพันธ์ โดยใช้ปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบ N-carboethoxy phthalimide กับสารประกอบ amine ต่างๆ หรือสังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาระหว่าง phthalimide กับสารประกอบ substituted benzyl halide ที่เหมาะสม จากนั้นทำสารที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกผลึก, วิธี column chromatography หรือวิธี preparative thin-layer chromatography และพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างทางเคมีโดยวิธี FTIR, NMR, MS และ CHN analysis จากผลที่ได้จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ทุกอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้เป็นสารที่ต้องการ
2. ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase โดยวิธี radiometric assay โดยแสดงผลการยับยั้งเป็น % inhibition ผลการยับยั้งเอนไซม์ของสารที่สังเคราะห์ขึ้นอยู่ในระหว่าง % inhibition โครงสร้างของอนุพันธ์ที่ได้สังเคราะห์, ผลของ % yield และ % inhibition ที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 1
3. นำโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์และทราบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 RT (โดยแสดงในรูปของ % inhibition) ทั้งหมดมาศึกษา 3D QSAR โดยวิธี Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) และ Comparative Molecular Similarity Indices (CoMSIA) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสนามโมเลกุลของสารกับการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ พบว่าผลของ CoMFA และ CoMSIA ที่ดีที่สุดให้ค่า q^2 เท่ากับ 0.688 และ 0.629 ตามลำดับ
4. ผลของ contour map ที่ได้จากการศึกษา CoMFA และ CoMSIA แสดงให้เห็นว่าควรเพิ่มหมู่แทนที่ที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ (bulky substituent) บริเวณ meta และ para ของ aromatic ring ที่เชื่อมกับ phthalimide nucleus จะทำให้ได้อนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ดีขึ้น
5. ผลของการทำ docking แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ phthalimide ที่สังเคราะห์ขึ้นจับกับเอนไซม์ได้ในทำนองเดียวกับ non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors ตัวอื่นๆที่ใช้ในคนไข้

ตารางที่ 1 โครงสร้างของสารที่ได้สังเคราะห์ทั้งหมด, % yield และ % inhibition

Cpd.	R	% yield	% inhibition	Cpd.	R	% yield	% inhibition
1		54	43	17		45.7	43
2		42	37	18		35.3	16
3		10.1	22	19		6.5	6
4		65	3	20		10	17
5		70.4	29	21		39	15
6		32.1	14	22		65	7
7		19.1	24	23		54	11
8		32.7	3	24		16	41
9		51.9	22	25		41	84 (IC ₅₀ = 120.75 μg/mL)
10		7.9	26	26		65	20
11		13.3	76 (IC ₅₀ = 60.90 μg/mL)	27		39	15
12		18	3	28		38	32
13		32	21	29		32	78 (IC ₅₀ = 98.10 μg/mL)
14		28	8	30		69	9
15		11.1	52	31		51	43
16		20.4	20	32		33	62

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Cpd.	R	% yield	% inhibition	Cpd.	R	% yield	% inhibition
33		42	61	37		44.7	6
34		43	12	38		34.2	15
35		44.7	13	39		31.7	23
36		13.8	19				

รายละเอียดเนื้อหางานวิจัย

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคเอดส์ยังคงเป็นโรคที่ก่อปัญหาสำคัญต่อระบบสาธารณสุขไม่เพียงแต่ในระดับประเทศเท่านั้น แต่เป็นปัญหาในระดับโลกอีกด้วย ข้อมูลจากกองโรคเอดส์ กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุขซึ่งได้รายงานไว้ในแต่ละปียังมีผู้ติดเชื้อใหม่ประมาณ 30,000 คน ในปัจจุบันมีผู้ติดเชื้อเอดส์ที่ยังมีชีวิตอยู่ประมาณ 700,000 ราย ที่ยังต้องรับบริการทางด้านการแพทย์และทางสังคม ทั้งนี้ยังไม่รวมถึงจำนวนผู้ติดเชื้อและผู้ป่วยที่ไม่มีรายงาน ซึ่งคาดว่าจะมีอีกเป็นจำนวนมาก เนื่องจากโรคนี้ยังไม่สามารถหาวิธีที่รักษาให้หายขาดได้ อีกทั้งการรักษาจะต้องเสียค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมากทำให้ปัญหาของโรคนี้มิใช่ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับสาธารณสุขแต่เพียงอย่างเดียวแต่ยังเป็นปัญหาที่เกี่ยวข้องกับเศรษฐกิจและสังคมในระดับประเทศอีกด้วย ด้วยเหตุดังกล่าวการค้นคว้ายาที่จะสามารถยับยั้งการเกิดโรคเอดส์ จึงน่าจะเป็นวิถีทางหนึ่งในอีกหลายวิธีที่จะช่วยแก้ปัญหาดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

โรคเอดส์ที่แพร่กระจายทั่วโลกในปัจจุบันเกิดจากเชื้อ HIV-1 ซึ่งจัดเป็น retrovirus ชนิดหนึ่ง วงจรชีวิตของการเจริญเติบโตของไวรัสชนิดนี้มีอยู่หลายขั้นตอน ซึ่งในปัจจุบันได้มีการค้นคว้าหาสารที่จะมายับยั้งการเจริญเติบโตในแต่ละขั้นตอนอย่างกว้างขวาง เอนไซม์ reverse transcriptase (RT) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเกิด reverse transcription ซึ่งเปลี่ยน RNA ให้เป็น DNA เอนไซม์ชนิดนี้จึงจำเป็นต้องขบวนการ replication ของไวรัส ดังนั้นสารที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ RT (reverse transcriptase inhibitor) จึงมีประโยชน์ในการใช้รักษาโรคเอดส์ สารดังกล่าวแบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นสองกลุ่ม คือ อนุพันธ์ nucleoside และ อนุพันธ์ non-nucleoside ยาที่ใช้ในคนไข้โรคเอดส์ในปัจจุบัน เช่น AZT (azidothymidine หรือ zidovudine), ddC (dideoxycytidine หรือ zalcitabine), ddi (dideoxyinosine หรือ didanosine), d4T (dideoxydidehydrothymidine หรือ stavudine), 3TC (lamivudine), ABC (abacavir) จัดอยู่ในกลุ่ม nucleoside และล่าสุดคือ tenofovir ซึ่งจัดเป็นอนุพันธ์ของ nucleoside phosphonate ยาในกลุ่ม nucleoside มีผลข้างเคียงที่ค่อนข้างรุนแรงซึ่งเกิดขึ้นจากยาออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อื่นๆ ของ cell ปกติของร่างกายด้วย เช่น เอนไซม์ DNA polymerase เป็นผลให้เกิดฤทธิ์ข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ อาทิ เช่น AZT ทำให้เกิด bone marrow suppression, ddC และ d4T ทำให้เกิด peripheral neuropathy, ddi ทำให้เกิด pancreatitis เป็นต้น นอกจากนี้คนไข้ที่ใช้ยาในกลุ่มนี้ไประยะเวลาหนึ่งจะมีปัญหาเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น สำหรับยาในกลุ่ม อนุพันธ์ non-nucleoside มีโครงสร้างทางเคมีซึ่งแตกต่างจากยาในกลุ่มแรกเป็นอย่างมาก พบว่ายาในกลุ่มนี้มีกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันซึ่งอาจจัดปัญหาของเชื้อดื้อยาในกลุ่ม nucleoside ได้ ตลอดจนยาในกลุ่ม non-nucleoside จะออกฤทธิ์อย่างเฉพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ RT ของ HIV-1 จึงไม่มีผลข้างเคียงต่างๆของยาในกลุ่ม nucleoside อยู่ ดังนั้นจึงอาจใช้ยาทั้งสองกลุ่มร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา

เนื่องจากยาในกลุ่ม non-nucleoside มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ HIV-1 RT มากกว่ากลุ่ม nucleoside ดังนั้นการสังเคราะห์ยาในกลุ่ม non-nucleoside จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรค AIDS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อเชื้อไวรัสที่ต้องการกำจัดสูงและสามารถลดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากยาในกลุ่ม nucleoside เนื่องจากการมีผู้ป่วยเป็นจำนวนมากในประเทศไทย ราคาของยาที่ใช้รักษาค่อนข้างสูงและต้องใช้เป็นเวลานาน ดังนั้นถ้าสามารถสังเคราะห์และพัฒนาายาดังกล่าวขึ้นใช้ได้เองภายในประเทศจะสามารถช่วยลดการนำเข้าจากต่างประเทศได้เป็นเงินจำนวนมาก

โครงการวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์ยาในกลุ่ม non-nucleoside ที่เป็นอนุพันธ์ของ phthalimide เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 RT โดยโครงสร้างของโมเลกุลที่จะทำการสังเคราะห์ได้จากการออกแบบโมเลกุลโดยการศึกษาวิเคราะห์เปรียบเทียบสนามโมเลกุล (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) ซึ่งเป็นการศึกษา

ทางด้าน 3-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship (3D-QSAR) ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารที่จะสังเคราะห์ประกอบด้วย phthalimide ring และ heterocyclic ring ชนิดต่างๆซึ่งมีหมู่แทนที่อยู่ สารที่สังเคราะห์ได้จะนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 RT โดยวิธี radioisotope assay หลังจากนั้นจะได้ทำการดัดแปลงแก้ไขโครงสร้างเพื่อให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. สังเคราะห์สารในกลุ่ม non-nucleoside ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ phthalimide ซึ่งคาดว่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ RT
2. ทำการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองในการยับยั้งเอนไซม์ของสารที่สังเคราะห์ขึ้น
3. ศึกษาวิเคราะห์เปรียบเทียบสนามโมเลกุล (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) ของสารที่สังเคราะห์ขึ้น เพื่อนำผลที่ได้มาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ที่ดีขึ้น
4. ศึกษาปฏิกิริยาการจับกันระหว่างอนุพันธ์ phthalimide กับเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase โดยใช้เทคนิคของ docking simulation ซึ่งทำให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ของสารที่สังเคราะห์ขึ้น และนำผลที่ได้มาดัดแปลงโครงสร้างของสารให้จับกับเอนไซม์ได้แน่นหนาขึ้น

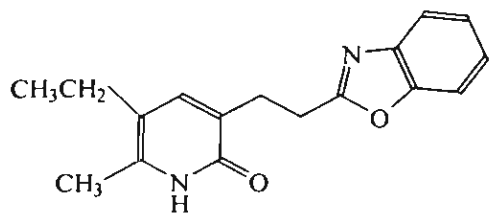
3. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่ม non-nucleoside ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 RT มีหลากหลายชนิด non-nucleoside HIV-1 RT inhibitors ที่มีประสิทธิภาพสูงที่กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาค้นคว้าคือ อนุพันธ์ของ pyridinones สาร pyridinone L-696,229 เป็นอนุพันธ์ตัวต้นๆที่ได้สังเคราะห์ขึ้น มีค่า IC_{50} เท่ากับ $0.022 \mu M$ ต่อมาพัฒนามาจนได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้นได้แก่สาร 1 มีค่า IC_{50} เท่ากับ $19 nM$ ซึ่งต่ำกว่าค่า IC_{50} ของ AZT ($0.5 \mu M$) ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน นอกจากอนุพันธ์ดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพสูงแล้วยังไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรงของ AZT¹⁻³

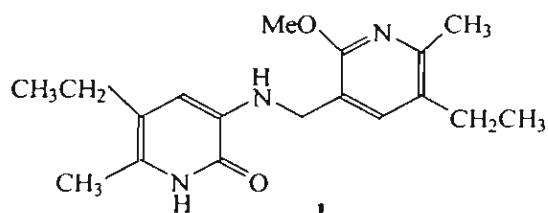
อนุพันธ์ในกลุ่มของ bis(heteroaryl)piperazine ได้แก่ delavirdine เป็น non-nucleoside อีกตัวหนึ่งซึ่งยอมรับโดย FDA ของสหรัฐอเมริกาให้ใช้ในคนไข้ติดเชื้อ HIV-1 และคนไข้โรคเอดส์โดยใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม nucleoside delavirdine มีผลข้างเคียงน้อยกว่าและใช้ได้ผลดีในคนไข้ที่ดื้อต่อยากลุ่ม non-nucleoside ตัวอื่นๆ⁴⁻⁵ นอกจากนี้ยังมีอนุพันธ์ในกลุ่มอื่นๆอีก เช่น nevirapine ซึ่งเป็น non-nucleoside ตัวแรกที่ FDA ของสหรัฐอเมริกายอมรับให้ใช้ในคนไข้ติดเชื้อ HIV และคนไข้โรคเอดส์ nevirapine อยู่ในกลุ่ม dipyridodiazepinone ซึ่งมี potency สูงและมีผลข้างเคียงน้อยกว่ากลุ่ม nucleoside แต่เกิดการดื้อยาได้เร็ว จึงต้องใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม nucleoside⁶ ยาในกลุ่ม HEPT (1-[2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymidine) derivatives เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษากันมาก ยาในกลุ่ม HEPT ปัจจุบันอยู่ใน clinical trial phase III⁷⁻⁹ ยาในกลุ่ม non-nucleoside ตัวล่าสุดที่ใช้ในคนไข้ติดเชื้อ HIV คือ efavirenz ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ benzoxazinone โดย efavirenz ต้องใช้ร่วมกับยาตัวอื่นเช่นเดียวกันกับยาในกลุ่ม non-nucleoside ทั่วไป¹⁰⁻¹¹

จากการศึกษาการจับกันระหว่างยาในกลุ่ม non-nucleoside HIV-1 RT inhibitor เช่น TIBO, nevirapine และ phenylisoindolinone กับเอนไซม์โดยวิธีการ docking พบว่า active conformation ของยาทั้ง 3 จะอยู่ในรูปคล้ายปีกผีเสื้อหรือ รูปหลังคา¹² เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่ม non-nucleoside ที่กล่าวมาจะเห็นว่าส่วนใหญ่ประกอบด้วย heterocyclic ring 2 หมู่เชื่อมกันด้วยหมู่ alkyl หรือ ring อีก ring หนึ่ง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ ในกลุ่ม phthalimide ซึ่งประกอบด้วย phthalimide ring เชื่อมกับ heterocyclic หรือ alicyclic ชนิดต่างๆ ผลของ preliminary study ของการทำ docking ระหว่างสารในกลุ่ม phthalimide derivative บางตัวพบว่า conformation ที่จับกับเอนไซม์มีลักษณะทำนองเดียวกับ TIBO, nevirapine และ phenyliso-

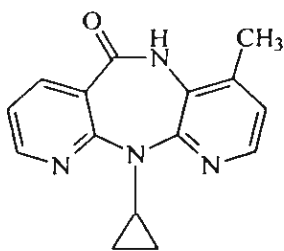
indolinone¹³ สารในกลุ่ม non-nucleoside ตัวอื่นๆที่อยู่ในระหว่างการศึกษาฤทธิ์ในการเป็น HIV-1 reverse transcriptase inhibitor ได้แก่กลุ่ม alkenyldiarylmethane (ADAM)¹⁴ และกลุ่มอนุพันธ์ของ lavendamycins¹⁵



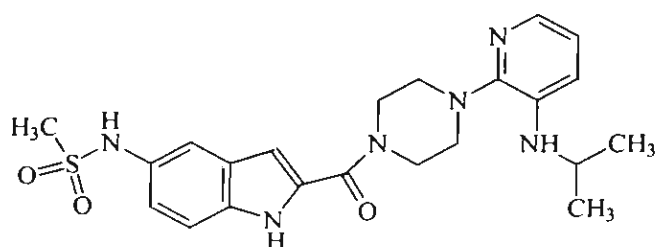
Pyridinone L-696,229



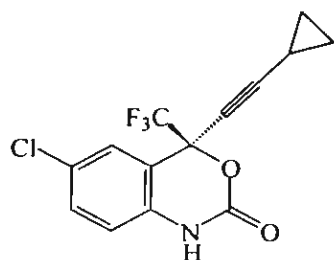
1



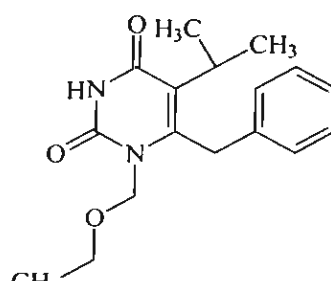
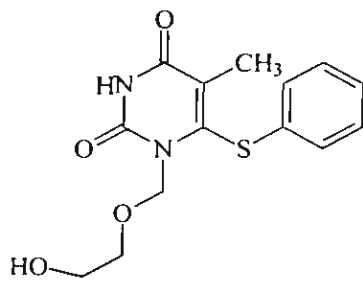
Nevirapine



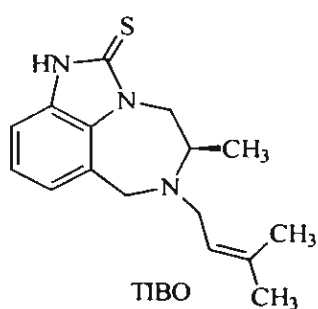
Delavirdine



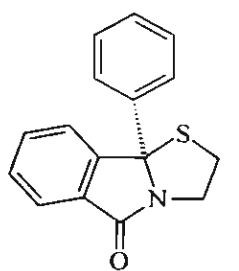
Efavirenz



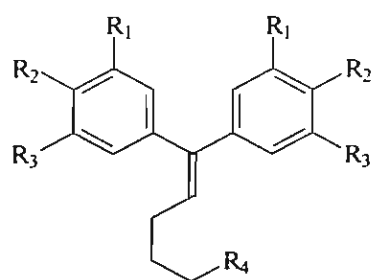
HEPT derivatives



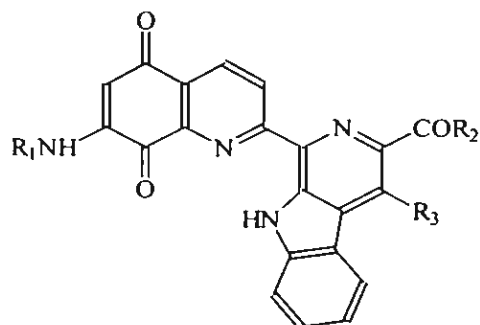
TIBO



Phenylisoindolinone



ADAM



Lavendamycin derivatives

เอกสารอ้างอิง

1. Hoffman JM, Smith AM, Rooney CS, Fisher TE, Wai JS, Thomas CM, et al. Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitors. 4. 3-[2-(benzoxazol-2-yl)ethyl]-5-ethyl-6-methylpyridin-2(1*H*)-one and analogues. *J Med Chem* 1993; 36: 953-66.
2. Wai JS, Williams TM, Bamberger DL, Fisher TE, Hoffman JM, Hudcosky RJ, et al. Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as specific HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. 3. Pyridyl and phenyl analogs of 3-aminopyridin-2(1*H*)-one. *J Med Chem* 1993; 36: 249-55.
3. Saari WS, Wai JS, Fisher TE, Thomas CM, Hoffman JM, Rooney CS, et al. Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitors. 2. Analogues of 3-aminopyridin-2(1*H*)-one. *J Med Chem* 1992; 35: 3792-802.
4. Esnouf RM, Ren J, Hopkins AL, Ross CK, Jones EY, Stammers DK, et al. Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3984-9.
5. Genin MJ, Poel TJ, Yagi Y, Biles C, Althaus I, Keiser BJ, et al. Synthesis and bioactivity of novel bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) reverse transcriptase inhibitors: Structure-activity relationships and increased metabolic stability of novel substituted pyridine analogs *J Med Chem* 1996; 39: 5267-75.
6. Cywin CL, Klunder JM, Hoermann M, Brickwood JR, David E, Grob PM, et al. Novel nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. 8.8-Aryloxy methyl- and 8-arylthiomethyldipyridodiazepinones. *J Med Chem* 1998; 41: 2972-84.
7. Tanaka H, Takashima H, Ubasawa M, Sekiya K, Nitta I, Baba M, et al. Structure- activity relationships of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymidine analogues: effects of substitutions at the C-6 phenyl ring and the C-5 position on the anti-HIV-1 activity. *J Med Chem* 1992; 35: 337-45.
8. Tanaka H, Takashima H, Ubasawa M, Sekiya K, Nitta I, Baba M, et al. Synthesis and antiviral activity of 6 benzyl analogues of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymidine (HEPT) as potent and selectivity anti-HIV-1 agent. *J Med Chem* 1995; 38: 2860-5.
9. Pedersen OS, pedersen EB. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: the NNRTI boom. *Antiviral Chem Chemother* 1999; 10: 285-314.
10. Udier-Blagovic M, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Structural and energetic analyses of the effects of the K103N mutation of HIV-1 reverse transcriptase on efavirenz analogues. *J Med Chem* 2004; 47(9): 2389-2392.
11. Corbett JW, Ko SS, Rodgers JD, Gearhart LA, Magnus NA, Bacheler LT, et al. Inhibition of clinically relevant mutant variants of HIV-1 by quinazolinone non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Med Chem* 2000; 43(10): 2019-30.
12. Schäfer W, Friedbe WG, Leinert H, Mertens A, Poll T, von der Saal W, et al. Non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase: Molecular modeling and X-ray structure investigations. *J. Med Chem* 36:1993; 726-32.
13. Ungwitayatorn J, Sothipatcharasai P. Docking study on phthalimide derivatives: HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Srinakharinwirot J Pharm Sci* 2000; 5 (1): 19-27.

14. Silverstri MA, Nagarajan M, De Clercq E, Pannecouque C, Cushman M. Design, synthesis, anti-HIV activities, and metabolic stabilities of alkenyldiarylmethane (ADAM) non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Med Chem* 2004; 47: 3149-3162.

15. Behforouz M, Cai W, Stocksdales MG, Lucas JS, Jung JY, Briere D, et al. Novel lavendamycin analogues as potent HIV-reverse transcriptase inhibitors: Synthesis and evaluation of anti-reverse transcriptase activity of amide and ester analogues of lavendamycin. *J Med Chem* 2003; 46: 5773-5780.

5. งานวิจัยที่ได้ดำเนินการและผลการวิจัย

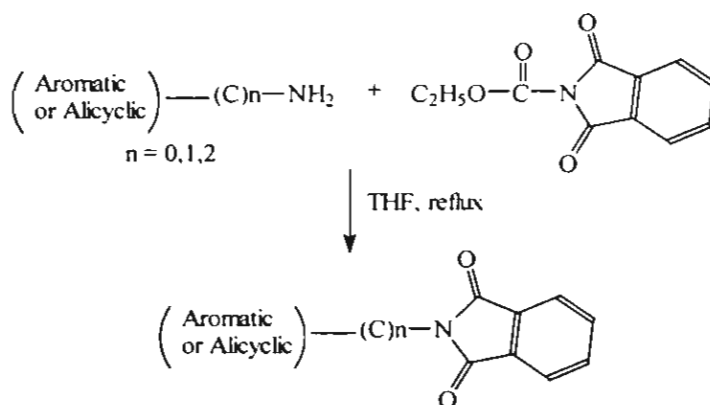
ส่วนที่ 1: การสังเคราะห์สาร

1. วิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ phthalimide มี 2 วิธีคือ

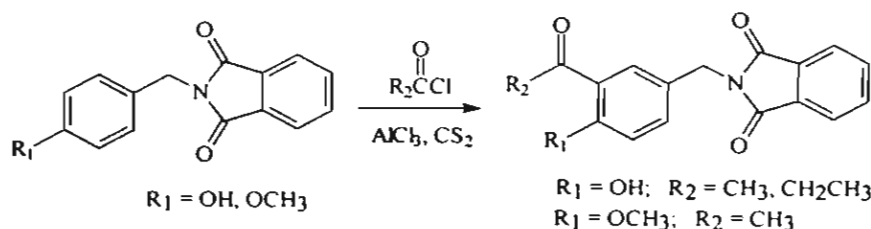
วิธีสังเคราะห์วิธีที่ 1

โดยใช้สารประกอบ N-carboethoxy phthalimide ทำปฏิกิริยากับสารประกอบ amine ต่างๆ โดยสารประกอบ amine แต่ละตัวจะแตกต่างกันที่ชนิดของ aromatic nucleus และชนิดและตำแหน่งของหมู่แทนที่ นอกจากนั้นสารตั้งต้นที่ใช้ อาจเป็นสารประกอบ amine ของ alicyclic กรณีที่สารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบ amine ที่มีหมู่แทนที่ที่ต้องการสังเคราะห์ไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด จะต้องสังเคราะห์สารดังกล่าวขึ้นเองจากสารตั้งต้นที่มีจำหน่าย

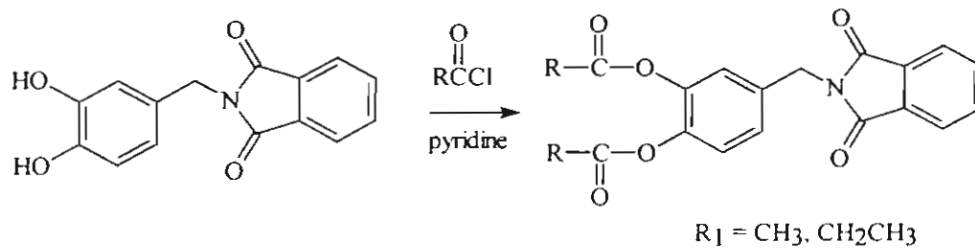
ปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์ phthalimide



เมื่อได้สารประกอบ phthalimide แล้ว ทำการเปลี่ยนแปลงหรือเพิ่มเติมหมู่แทนที่ที่ benzene ring ได้โดยทำปฏิกิริยา Friedel-Craft acylation โดยใช้สารประกอบ acyl halide โดยมี $AlCl_3$ เป็น catalyst

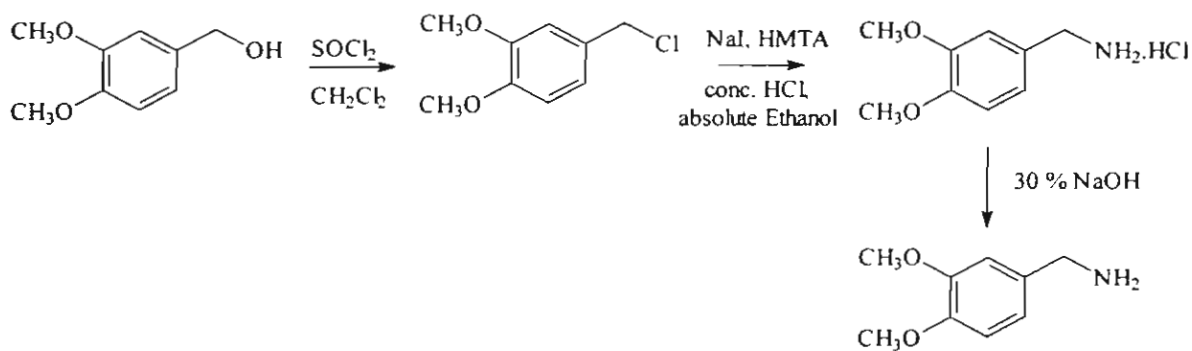


นอกจากนี้ยังทำการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่ที่ benzene ring โดยปฏิกิริยา esterification ที่หมู่ OH โดยใช้สารประกอบ acyl halide ใน pyridine

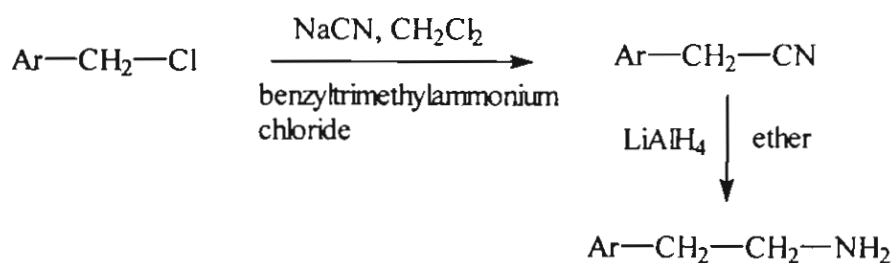


การเตรียมสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบ amine

ปฏิกิริยาการเตรียมสารตั้งต้น amine จากสารประกอบ alcohol โดยเปลี่ยนหมู่ hydroxyl เป็นหมู่ halide และ amine โดยใช้ thionyl chloride และ NaI, HMTA ตามลำดับ

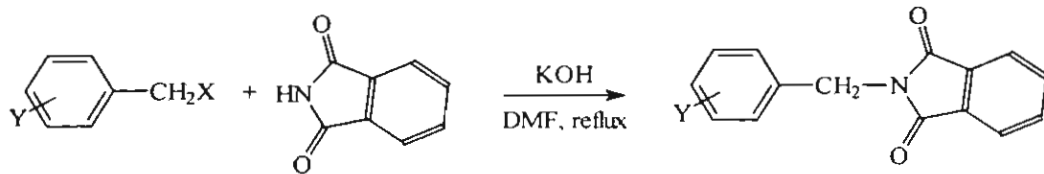


สารตั้งต้นบางตัวได้จากสารประกอบ chloride นำมาเปลี่ยนเป็นหมู่ cyanide โดยใช้ NaCN และ benzyltrimethylammonium chloride เป็น phase transfer catalyst หลังจากนั้นทำปฏิกิริยา reduction โดยใช้ lithium aluminium hydride (LAH) ตามสมการด้านล่าง



วิธีสังเคราะห์วิธีที่ 2

สังเคราะห์อนุพันธ์ phthalimide จากการทำปฏิกิริยาของ phthalimide กับ substituted benzyl halide ที่เหมาะสม โดยใช้ KOH และ reflux ใน DMF

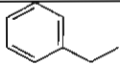
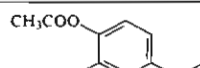
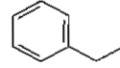
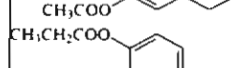
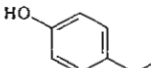
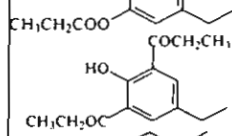
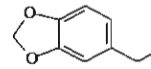
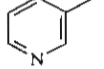
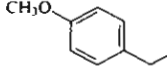
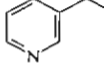
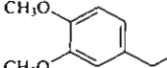
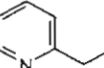
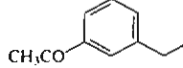
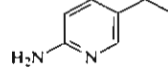
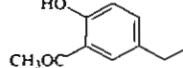
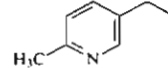
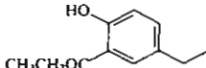
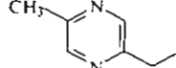
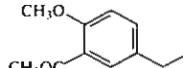
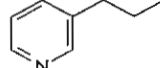
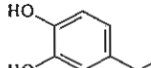
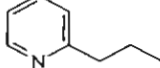
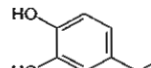
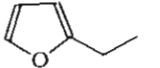
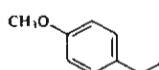
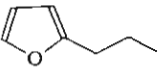
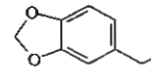
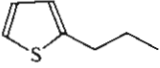
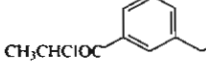
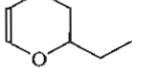
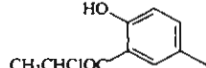
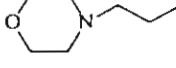


2. ทำสารที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกผลึกและ/หรือ วิธี column chromatography

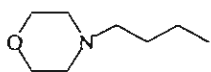
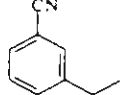
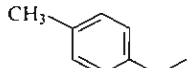
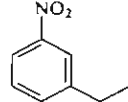
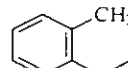
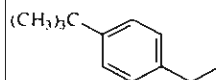
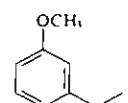
3. พิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างทางเคมีโดยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), mass spectrometry (MS), และ elemental analysis (CHN analysis)

ตารางที่ 2 แสดงโครงสร้างและ % yield ของสารที่ได้สังเคราะห์ สารหมายเลข 1-33 สังเคราะห์โดยวิธีที่ 1 สำหรับสารหมายเลข 34-39 สังเคราะห์โดยวิธีที่ 2

ตารางที่ 2 โครงสร้างของสารที่ได้สังเคราะห์ทั้งหมดและ % yield

Cpd.	R	% yield	Cpd.	R	% yield
1		54	17		45.7
2		42	18		35.3
3		10.1	19		6.5
4		65	20		10
5		70.4	21		39
6		32.1	22		65
7		19.1	23		54
8		32.7	24		16
9		51.9	25		41
10		7.9	26		65
11		13.3	27		39
12		18	28		38
13		32	29		32
14		28	30		69
15		11.1	31		51
16		20.4	32		33

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Cpd.	R	% yield	Cpd.	R	% yield
33		42	37		44.7
34		43	38		34.2
35		44.7	39		31.7
36		13.8			

รายละเอียดขั้นตอนในการสังเคราะห์และคุณสมบัติทางกายภาพของสารที่สังเคราะห์ได้ดังต่อไปนี้

วิธีการสังเคราะห์และผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้

Chemistry. Melting points are uncorrected and were determined by using Buchi 530 capillary melting point apparatus. IR spectra were recorded on a FT-IR Nicolet 550, using the potassium bromide pellet technique for solid compounds and neat for liquid compounds. ^1H NMR (200 Mz) spectra were recorded in a Varian Gemini 2000 spectrometer, using TMS as internal standard (chemical shifts in δ values, J in Hz). Mass spectra were determined on a GCQ Finigan using EI method. Elemental analysis were performed by a CHNS/O analyzer (Perkin Elmer PE2400 series II) and the results were within 0.4-0.6 % of theoretical values. TLC was carried out on silica gel GF₂₅₄ coated aluminium sheets 20X20 cm (E. Merck) with spots visualized by UV light (254 nm). The crude products were purified by column chromatography using silica gel (E. Merck, 70-230 mesh) and/or recrystallization.

General procedure 1. To a solution of primary amine in tetrahydrofuran (30 mL) was added N-carbethoxyphthalimide. The mixture was allowed to stir until obtaining clear solution, then refluxed for 6 hours. After removal of solvent *in vacuo*, the residue was dissolved in chloroform (30 mL) and washed with 5% sodium hydroxide (30 mL), water (2x30 mL) and brine (30 mL), respectively. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography.

General procedure 2. To a stirred solution of phthalimide in N,N-dimethylformamide (40 mL) was added the substituted benzyl halide and potassium hydroxide solution. The reaction mixture was refluxed for 6-8 hours at 190°C. The mixture was extracted with chloroform (30 mL) and water (3x15 mL). The organic

phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography and/or recrystallization.

Phthalimidomethylbenzene (1). Prepared according to the general procedure 1 using benzyl amine (500 mg, 4.67 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (1.1 g, 5.02 mmol). The crude product was purified by column chromatography (CHCl₃/hexane: 3/1) to afford 600 mg of **1** (54% yield) as white solid; mp 131-132°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3060 (aromatic C-H), 2950 (aliphatic C-H), 1720(C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 4.84 (s, 2H, -CH₂-N), 7.24-7.33 (m, 5H, benzene), 7.69-7.83 (m, 4H, phthalimide); EI MS(*m/z*) 237(M⁺, 100), 219(49), 208(33), 104(98), 91(24), 77(66), 65(21). Analysis calculated for C₁₅H₁₁NO₂ (237.26) C, 75.92; H, 4.68; N, 5.91; Found C, 76.13; H, 4.71; N, 6.39.

2-Phthalimidoethylbenzene (2). Prepared according to the general procedure 1 using 2-phenylethylamine (500 mg, 4.13 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (904 mg, 4.13 mmol). The crude product was purified by column chromatography (CHCl₃/hexane: 1/1) to afford 440 mg of **2** (42% yield); mp 131-132°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3029-3006 (aromatic C-H), 3006-2863 (aliphatic C-H), 1715 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 2.99 (t, *J* = 8 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-N), 3.93 (t, *J* = 8 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-N), 7.20-7.30 (m, 5H, benzene), 7.70-7.83 (m, 4H, phthalimide); EI MS(*m/z*) 251(M⁺, 45), 160(100), 104(69), 91(11), 77(20). Analysis calculated for C₁₆H₁₃NO₂ (251.28) C, 76.47; H, 5.22; N, 5.58; Found C, 75.96; H, 5.11; N, 6.27.

1-Phthalimidomethyl-4-hydroxybenzene (3). Compound **3** was unexpectedly obtained from the reaction of 1-phthalimidomethyl-4-methoxybenzene (1 g, 3.75 mmol), ethyl iodide (1.1 mL, 11.10 mmol), and aluminium trichloride (1.5 g, 11.25 mmol) in an attempted synthesis of 4-phthalimidomethyl-2-ethyl-1-methoxybenzene using the same procedure as described for compound **8** below. After evaporation, the crude product was purified by column chromatography using CHCl₃/CH₃OH: 9/1 as eluent. The undesired 1-phthalimidomethyl-4-hydroxybenzene **3** was obtained (0.09 g, 10.1% yield) as pale yellow solid; mp 109-110°C. IR(KBr)(cm⁻¹) 3315 (O-H), 3010 (aromatic C-H), 2953 (aliphatic C-H), 1689 (C=O); ¹H NMR(DMSO) δ 4.65 (s, 2H, CH₂-N), 6.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, benzene H3, H5), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, benzene H2, H6), 7.79-7.85 (m, 4H, phthalimide) 9.39 (s, OH exchangeable with D₂O); EI MS(*m/z*) 253(M⁺, 100), 235 (19), 224(14), 130(9), 77(7). Analysis calculated for C₁₅H₁₁NO₃ (253.26) C, 71.14; H, 4.38; N = 5.53; Found C, 71.14; H, 4.35; N, 5.61.

5-Phthalimidomethyl-1,3-benzodioxole (4). Prepared according to the general procedure 1 using piperonylamine (500 mg, 3.31 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (1.7 g, 7.76 mmol). The crude product was purified by column chromatography (CHCl₃/hexane: 3/1) to afford 600 mg of **4** (65% yield) as white solid; mp 144-146°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3101-3032 (aromatic C-H), 2902-2800 (aliphatic C-H), 1710 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 4.77(s, 2H, -CH₂-N), 5.91 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6.73 (d, *J* = 8.07 Hz, 1H, benzodioxole H7), 6.91-6.95 (m, 2H, benzodioxole H4, H6), 7.69-7.83 (m, 4H, phthalimide); EI MS(*m/z*) 281(M⁺, 100), 263(30), 252(14), 160(5), 148(31), 122(22), 104(34), 76(66), 63(23). Analysis calculated for C₁₆H₁₁NO₄ (281.27) C, 68.31; H, 3.94; N, 4.98; Found C, 68.02; H, 3.93; N, 5.44.

1-Phthalimidomethyl-4-methoxybenzene (5). To a solution of 4-methoxybenzylamine (1 g, 7.29 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (30 mL) was added in a small portion N-carbethoxyphthalimide (1.9 g, 8.67 mmol). The mixture was allowed to stir until clear solution was obtained. Then the reaction mixture

was refluxed for 6 hours. After evaporated *in vacuo*, the residue was dissolved in chloroform (30 mL) and then washed with water (2×30 mL), 5% sodium hydroxide (30 mL), water (2×30 mL) and saturated brine solution (30 mL). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduce pressure. The residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 2/1 as eluent. Recrystallization from hexane/EtOAc gave compound **5** (1.37 g, 70.4% yield) as white solid; mp 160-161°C. IR(KBr)(cm⁻¹) 3072-3006 (aromatic C-H), 2966-2835 (aliphatic C-H), 1722 (C=O); ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.77 (s, 3H, CH₃-O), 4.78 (s, 2H, CH₂-N), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, benzene H3, H5), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, benzene H2, H6), 7.67-7.85 (m, 4H, phthalimide); EI MS(*m/z*) 267(M⁺, 100), 224(26), 130(15). Analysis calculated for C₁₆H₁₃NO₃ (267.28) C, 71.89; H, 4.90; N, 5.24; Found C, 71.80; H, 5.01; N, 5.35.

4-Phthalimidomethyl-1,2-dimethoxybenzene (**6**)

3,4-Dimethoxybenzyl chloride. A mixture containing 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (5 g, 0.03 mmol) in 40 mL of methylene chloride and 2.4 mL of dry pyridine was stirred at 0°C. To this mixture, freshly distilled thionyl chloride (2.2 mL, 0.03 mmol) in 10 mL of methylene chloride was added dropwise under nitrogen. The mixture was allowed to stir for 6 hours at 0°C. The reaction mixture was slowly poured with stirring into 100 mL of ice water, and washed with 100 mL of saturated sodium bicarbonate, 100 mL of water, and 100 mL of brine solution respectively. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated *in vacuo*. The desired product was obtained as yellow brown liquid (3.5 g, 63%). 3,4-Dimethoxybenzyl chloride was used directly for the next step without further purification.

3,4-Dimethoxybenzylamine hydrochloride. A mixture of 3,4-dimethoxybenzyl chloride (4 g, 0.02 mmol), hexamethylenetetramine (2.4 g, 0.02 mmol), sodium iodide (2.5 g, 0.02 mmol), and absolute ethanol (30 mL) was stirred at room temperature for 24 hours. The white crystals were filtered, washed with cold ethanol, and then warmed for 2 hours in a mixture of ethanol (50 mL) and concentrated hydrochloric acid (0.5 mL). Upon cooling, 3,4-dimethoxybenzylamine hydrochloride (3.0 g, 73.89% yield) was obtained as white crystal. IR(KBr)(cm⁻¹) 3300-2600 (N-H), 1275 (C-O), 1031 (C-N).

3,4-Dimethoxybenzylamine. To a stirred solution of 3,4-dimethoxybenzylamine hydrochloride (3.0 g, 14.78 mmol) in dichloromethane (10 mL), 30% sodium hydroxide (1 mL) was added until clear solution was obtained. The residue was washed with water (2×5 mL) and saturated brine solution (5 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. 3,4-Dimethoxybenzylamine was obtained as yellow liquid (1.5 g, 41.7%) and was shown as tailing spot on TLC (CHCl₃/CH₃OH: 9/1) when detected by ninhydrin reagent. 3,4-Dimethoxybenzylamine was used directly for the next step without further purification. IR(KBr)(cm⁻¹) 3381, 3295 (N-H), 3032 (aromatic C-H), 2947-2841 (aliphatic C-H), 1268 (C-O), 1031 (C-N); 768 (aromatic oop C-H); ¹H NMR(CDCl₃) δ 3.82 (2H, CH₂-N), 3.87 (s, 3H, CH₃-O), 3.89 (s, 3H, CH₃-O), 6.84-6.87 (m, 3H, benzene);

4-Phthalimidomethyl-1,2-dimethoxybenzene (6**).** Compound **6** was synthesized from 3,4-dimethoxybenzylamine (1 g, 7.29 mmol), N-carbethoxyphthalimide (1.9 g, 8.67 mmol), and anhydrous tetrahydrofuran (30 mL) using the same procedure as described for compound **5**. After evaporation, the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 2/1 as eluent. Recrystallization from hexane/EtOAc gave compound **6** (0.30 g, 32.1% yield) as white solid; mp 141-142°C. IR(KBr)(cm⁻¹) 3038 (aromatic

C-H), 2975-2835 (aliphatic C-H), 1719 (C=O); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 3.84 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3.88 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 4.78 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 6.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, benzene H6), 7.01-7.05 (m, 2H, benzene H3, H5), 7.68-7.86 (m, 4H, phthalimide); EI MS(m/z) 297(M^+ , 100), 282(15), 266(34), 130(22). Analysis calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (297.31) C, 68.68; H, 5.09; N, 4.71; Found C, 68.77; H, 5.02; N, 4.86.

1-Phthalimidomethyl-3-acetylbenzene (7). Compound 7 was synthesized from phthalimidomethylbenzene 1 (1g, 4.22 mmol), acetyl chloride (0.9 mL, 12.67), and aluminium trichloride (1.7 g, 12.75 mmol) using the same procedure as described below for compound 8. After evaporation, the crude product was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 2/1 as eluent. Recrystallization from hexane/EtOAc gave compound 7 (0.23 g, 19.1% yield) as white solid; mp 65-66°C. IR(KBr)(cm^{-1}) 3104-3026 (aromatic C-H), 2927 (aliphatic C-H), 1722 (C=O); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 2.61 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 4.85 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 7.43 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, benzene, H5), 7.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, benzene, H6), 7.71-7.87 (m, 4H, phthalimide), 7.91 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H, benzene, H4), 8.02 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, benzene, H2); EI MS(m/z) 280($\text{M}^+ + \text{H}$, 69), 265(100), 237(27), 130(39). Analysis calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (279.29) C, 73.11; H, 4.69; N, 5.02; Found C, 73.05; H, 4.75; N, 5.12.

4-Phthalimidomethyl-2-acetyl-1-hydroxybenzene (8). To a stirred solution of 1-phthalimidomethyl-4-methoxybenzene 5 (1 g, 3.75 mmol) in dry carbon disulfide (30 mL) was slowly added acetyl chloride (0.8 mL, 11.26 mmol). Then anhydrous powdered aluminium chloride (1.5 g, 11.25 mmol) was added in small portion, and then stirred at room temperature for 24 hours. The reaction mixture was poured into 5 mL of concentrated hydrochloric acid in 40 g of crush ice then extracted with dichloromethane (2x50 mL). The combined organic layers were washed with water (4x50 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column using hexane/EtOAc: 2/1 as eluent. Recrystallization from hexane/EtOAc gave compound 8 (0.36 g, 32.7% yield) as white solid; mp 159-160°C. IR(KBr)(cm^{-1}) 3104-3052 (aromatic C-H), 2947 (aliphatic C-H), 1716 (C=O); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 2.66 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 4.79 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 6.93 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, benzene H6), 7.59 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, benzene H5), 7.70-7.88 (m, 5H, phthalimide, benzene H3), 12.24 (s, OH exchangeable with D_2O); EI MS(m/z) 296($\text{M}^+ + \text{H}$, 100), 281(45), 160(19), 148(36), 130(24), 105(25). Analysis calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (295.29) C, 69.15; H, 4.44; N, 4.74; Found C, 69.11; H, 4.42; N, 4.87.

4-Phthalimidomethyl-2-propionyl-1-hydroxybenzene (9). Compound 9 was synthesized from 1-phthalimidomethyl-4-methoxybenzene 5 (1 g, 3.75 mmol), propionyl chloride (1 mL, 11.45 mmol), and aluminium trichloride (1.5 g, 11.25 mmol) using the same procedure as described for compound 8. The crude product was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate: 2/1 as eluent. Recrystallization from hexane/EtOAc gave compound 9 (0.62 g, 51.9% yield) as white solid; mp 165-166 °C. IR(KBr)(cm^{-1}) 3066 (aromatic C-H), 2989-2912 (aliphatic C-H), 1712 (C=O); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 1.24 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO}$), 3.08 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO}$), 4.79 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 6.93 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, benzene H6), 7.58 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, benzene H5), 7.69-7.87 (m, 4H, phthalimide), 7.92 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, benzene H3), 12.33 (s, OH exchangeable with D_2O); EI MS(m/z) 309(M^+ , 44), 280(100), 160

(20), 130(13), 105(33), 77(15). Analysis calculated for $C_{18}H_{15}NO_4$ (309.32) C, 69.89; H, 4.88; N, 4.53; Found C, 69.73; H, 4.97; N, 4.87.

4-Phthalimidomethyl-2-acetyl-1-methoxybenzene (10). The reaction of 1-phthalimidomethyl-4-methoxybenzene **5** and acetyl chloride in the presence of anhydrous aluminium trichloride as described for compound **8** also provided compound **10** as the minor product. After further purification by recrystallization with hexane/EtOAc, compound **10** was obtained (0.10 g, 7.9% yield) as pale-yellow solid; mp 154-155°C. IR(KBr)(cm^{-1}) 3073 (aromatic C-H), 2933-2856 (aliphatic C-H), 1726 (C=O); 1H NMR($CDCl_3$) δ 2.62 (s, 3H, CH_3 -CO), 3.87 (s, 3H, CH_3 -O), 4.79 (s, 2H, CH_2 -N), 6.90 (d, J = 8.4 Hz, 1H, benzene H6), 7.53 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H, benzene H5), 7.67-7.85 (m, 5H, phthalimide, benzene H3); EI MS(m/z) 309(M^+ , 27), 294(100), 160(8), 130(17). Analysis calculated for $C_{18}H_{15}NO_4$ (309.32) C, 69.89; H, 4.89; N, 4.53; Found C, 69.89; H, 4.87; N, 4.64.

4-Phthalimidomethyl-1,2-dihydroxybenzene (11). Prepared according to the general procedure 1 using 3,4-dihydroxybenzylamine HBr (200 mg, 1.05 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (276 mg, 1.26 mmol). The crude product was purified by preparative thin-layer chromatography ($CHCl_3$ /MeOH: 9/1) to afford 38 mg of **11** (13% yield); mp 202-203°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3310 (O-H), 3010 (aromatic C-H), 2910 (aliphatic C-H), 1740(C=O); 1H NMR(CD_3OD) δ 4.66 (s, 2H, $-CH_2$ -N), 6.65-6.72 (m, 2H, benzene H5, H6), 6.83 (bs, 1H, benzene H3), 7.74-7.86 (m, 4H, phthalimide); EI MS(m/z) 269(M^+ , 1), 160(1), 147(1), 136(1), 104(3), 76(4), 28(100). Analysis calculated for $C_{15}H_{11}NO_4$ (269.06) C, 66.91; H, 4.11; N, 5.20; Found C, 66.71; H, 3.79; N, 5.25.

4-(2-Phthalimidoethyl)-1,2-dihydroxybenzene (12). Prepared according to the general procedure 1 using 3-hydroxytyramine HCl (500 mg, 2.63 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (690 mg, 3.15 mmol). After purification by column chromatography ($CHCl_3$ /MeOH: 9/1) yielded 137 mg of compound **12** (18% yield); mp 167-168°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3270 (O-H), 3065 (aromatic C-H), 2953 (aliphatic C-H), 1696 (C=O); 1H NMR(CD_3OD) δ 2.80 (t, J = 7.8 Hz, 2H, $-CH_2-CH_2$ -N), 3.81 (t, J = 7.8 Hz, 2H, $-CH_2-CH_2$ -N), 6.49 (dd, J = 1.8, 7.8 Hz, 1H, benzene H5), 6.59-6.63 (m, 2H, benzene H3, H6), 7.74-7.85 (m, 4H, phthalimide); EI MS(m/z) 283(M^+ , 11), 160(35), 136(100), 123(70), 104(16), 77(57). Analysis calculated for $C_{16}H_{13}NO_4$ (283.03) C, 67.83; H, 4.62; N, 4.94; Found C, 67.25; H, 4.40; N, 4.84.

1-(2-Phthalimidoethyl)-4-methoxybenzene (13). Prepared according to the general procedure 1 using 2-(4-methoxyphenyl)ethylamine (1 g, 6.81 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (1.8 g, 8.10 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 3/1) to afford 618 mg of **13** (32% yield); mp 136-137°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3032 (aromatic C-H), 2933-2848 (aliphatic C-H), 1709 (C=O); 1H NMR($CDCl_3$) δ 2.82-2.89 (m, 2H, $-CH_2-CH_2$ -N), 3.60-3.70 (m, 2H, CH_2-CH_2 -N), 3.79 (s, 3H, CH_3 -O), 6.86 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, benzene H3, H5), 7.15 (d, J = 8.4 Hz, 2H, benzene H2, H6), 7.49-7.94 (m, 4H, phthalimide); EI MS(m/z) 281(M^+ , 8), 160(23), 134(100), 121(96), 104(11), 77(32). Analysis calculated for $C_{17}H_{15}NO_3$ (281.31) C, 72.58; H, 5.37; N, 4.97; Found C, 72.75; H, 4.97; N, 4.94.

5-(2-Phthalimidoethyl)-1,3-benzodioxole (14).

5-(2-Aminoethyl)-1,3-benzodioxole. A slurry of lithium aluminium hydride (560 mg, 14.75 mmol) in anhydrous ether (180 mL) was stirred in an ice-bath. To this slurry was added dropwise of 3,4-(methylenedioxy)phenylacetonitrile (2.0 g, 12.41 mmol) at 0°C under nitrogen gas. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was cooled to 0°C and slowly added 2 mL of water through the top of condenser, followed by the careful addition of 2 mL of 15% sodium hydroxide and 4 mL of water respectively, then stirred at room temperature for 1 hour and filtered. The white precipitate was washed with ether (100 mL). The combined ether filtrates were dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated to obtain crude amine product as yellow-brown oil which was shown as a tailing spot on TLC (CHCl₃/MeOH: 9/1), detected by ninhydrin spraying reagent. After purification by flash chromatography (CHCl₃/MeOH: 9/1 and 1% NH₄OH), the desired amine was obtained as yellow oil (1.87 g, 91%); IR (neat) (cm⁻¹) 3374, 3302 (N-H), 3080 (aromatic C-H), 2979-2907 (aliphatic C-H), 1045 (C-O), 1439 (bending C-H), 1360 (C-N).

5-(2-Phthalimidoethyl)-1,3-benzodioxole (14). Prepared according to the general procedure 1 using 5-(2-aminoethyl)-1,3-benzodioxole (1.5 g, 9.09 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (2.4 g, 10.94 mmol). The crude product was purified by column chromatography (CHCl₃/hexane: 3/1) to afford 834 mg of **14** (28%) as yellow solid; mp 139-140°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3040 (aromatic C-H), 2939-2895 (aliphatic C-H), 1771 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 2.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-N), 3.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-N), 5.92 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6.68-6.72 (m, 2H, benzodioxole H6, H7), 6.76 (bs, 1H, benzodioxole H4), 7.69-7.86 (m, 4H, phthalimide); EI MS(*m/z*) 295(M⁺, 11), 160(21), 148(100), 135(76), 105(14), 77(57). Analysis calculated for C₁₇H₁₃NO₄ (295.29) C, 69.14; H, 4.43; N, 4.74: Found C, 68.88; H, 4.57; N, 4.78.

1-Phthalimidomethyl-3-(2-chloropropionyl)benzene (15). Compound **15** was synthesized from phthalimidomethylbenzene **1** (1g, 4.22 mmol), 2-chloropropionyl chloride (1.2 mL, 12.19 mmol), and anhydrous aluminium trichloride (1.7 g, 12.75 mmol) using the same procedure as described for compound **8**. After evaporation, the crude product was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 2/1 as eluent to give compound **15** (0.16 g, 11.13% yield) as pale-yellow liquid. IR(KBr)(cm⁻¹) 3059 (aromatic C-H), 2982-2940 (aliphatic C-H), 1740 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.72 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃-CH(Cl)-CO), 4.92 (s, 2H, CH₂-N), 5.24 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH₃-CH(Cl)-CO), 7.45 (t, *J* = 8.2, 1H, benzene, H5), 7.53 (d, *J* = 8.2, 1H, benzene, H6), 7.44-7.91 (m, 4H, phthalimide) 7.97 (dd, *J* = 8.2, 1.8, Hz, 1H, benzene, H4), 8.08 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, benzene, H2); EI MS(*m/z*) 264(100), 236(10), 130(21). Analysis calculated for C₁₈H₁₄NO₃Cl (327.77) C, 65.96; H, 4.31; N, 4.27; Found C, 65.97; H, 4.32; N, 4.29.

4-Phthalimidomethyl-2-(2-chloropropionyl)-1-hydroxybenzene (16). Compound **16** was synthesized from 1-phthalimidomethyl-4-methoxybenzene **5** (1 g, 3.75 mmol), 2-chloropropionyl chloride (1.1 mL, 11.10 mmol), and aluminium trichloride (1.5 g, 11.25 mmol) using the same procedure as described for compound **8**. The crude product was purified by column chromatography using hexane/ EtOAc: 2/1 as eluent. Recrystallization from hexane/EtOAc gave compound **16** (0.26 g, 20.4% yield) as yellow solid; mp 148-150°C. IR(KBr)(cm⁻¹) 3052 (aromatic C-H), 2979-2920 (aliphatic C-H), 1726 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.77 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃-CH(Cl)-CO), 4.82 (s, 1H, CH₂-N), 5.37 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₃-CH(Cl)-CO), 6.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, benzene H6), 7.64 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H, benzene H5), 7.71-7.89 (m, 4H,

phthalimide), 7.97 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, benzene H3) 11.90 (s, OH exchangeable with D₂O); EI MS(m/z) 343 (M^+ , 7), 307(92), 280(100), 160(96), 130(12), 105(29). Analysis calculated for C₁₈H₁₄NO₄Cl (343.77) C, 62.89; H, 4.07; N, 4.07; Found C, 62.78; H, 4.17, N, 4.17.

4-Phthalimidomethyl-1,2-diacetoxybenzene (17). To a stirred solution of 4-phthalimidomethyl-1,2-dihydroxybenzene **11** (0.1 g, 0.56 mmol) in pyridine (0.5 mL), was slowly added acetyl chloride (0.15 mL, 2.11 mmol). The reaction mixture was adjusted to pH 7 with saturated sodium bicarbonate in an ice bath. The mixture was extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined EtOAc layers were dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 2/1 as eluent. Recrystallization from hexane/EtOAc gave compound **17** (0.06 g, 45.7 % yield) as white solid; mp 101-102°C. IR(KBr)(cm⁻¹) 3094-3071 (aromatic C-H), 2963 (aliphatic C-H), 1720 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 2.26 (s, 3H, CH₃-COO), 2.27 (s, 3H, CH₃-COO), 4.82 (2H, CH₂-N), 7.14 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, benzene H6), 7.30-7.39 (m, 2H, benzene H3, H5), 7.69-7.87 (m, 4H, phthalimide); EI MS(m/z) 311(26), 269(100), 160(15), 122(22). Analysis calculated for C₁₉H₁₅NO₆ (353.33) C, 64.59; H, 4.28; N, 3.96; Found C, 64.67; H, 4.14; N, 4.13.

4-Phthalimidomethyl-1,2-dipropionyloxybenzene (18). Compound **18** was synthesized from 4-phthalimidomethyl-1,2-dihydroxybenzene **11** (0.15 g, 0.56 mmol), propionyl chloride (0.2 mL, 2.29 mmol), and dry pyridine (0.5 mL) using the same procedure as described for compound **17**. After evaporation, the residue was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 2/1 as eluent. Recrystallization from hexane/EtOAc gave compound **18** (0.05 g, 35.3% yield) as white solid; mp 113-114°C. IR(KBr)(cm⁻¹) 3050 (aromatic C-H), 2982-2940 (aliphatic C-H), 1726 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.22 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H, CH₃-CH₂-COO), 1.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H, CH₃-CH₂-COO), 2.53 (q, $J = 7.8$ Hz, 2H, CH₃-CH₂-COO), 2.54 (q, $J = 7.8$ Hz, 2H, CH₃-CH₂-COO), 4.92 (2H, CH₂-N), 7.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, benzene H6), 7.28-7.37 (m, 2H, benzene H3, H5), 7.68-7.86 (m, 4H, phthalimide); EI MS(m/z) 325(25), 269(100), 160(12), 122(17). Analysis calculated for C₂₁H₁₉NO₆ (381.38) C, 66.14; H, 5.02; N, 3.67; Found C, 66.14; H, 5.11; N, 3.73.

4-Phthalimidomethyl-2,6-dipropionyl-1-hydroxybenzene (19). The reaction of 1-phthalimidomethyl-4-methoxybenzene and propionyl chloride in the presence of anhydrous aluminium trichloride as described for compound **8**, also provided compound **19** as the minor product. After further purification by recrystallization with hexane/EtOAc, compound **19** was obtained (0.10 g, 6.5% yield) as white solid; mp 165-166°C. IR(KBr)(cm⁻¹) 3045 (aromatic C-H), 2982-2940 (aliphatic C-H), 1719 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.21 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, 2×CH₃-CH₂-CO), 3.09 (q, $J = 7.4$ Hz, 4H, 2×CH₃-CH₂-CO), 4.81 (s, 2H, CH₂-N), 7.70-7.88 (m, 4H, phthalimide), 8.07 (s, 2H, benzene H3, H5); EI MS(m/z) 366(M^+ +H, 24), 337(100), 319(15), 207(22), 160(32), 130(18). Analysis calculated for C₂₁H₁₉NO₅ (365.38) C, 69.03; H, 5.24; N, 3.83; Found C, 69.00; H, 5.38; N, 3.99.

3-Phthalimidopyridine (20). Prepared according to the general procedure 1 using 3-aminopyridine (500 mg, 5.3 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (1.2 g, 5.5 mmol). The crude product was purified by recrystallization from CHCl₃/hexane to obtain 120 mg of **20** (10% yield) as white solid; mp 174-175°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3035 (aromatic C-H), 2922-2855 (aliphatic C-H), 1710 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 7.47

(dd, $J = 5.0, 8.0$ Hz, 1H, pyridine H5), 7.82-7.99 (m, 5H, [4H, phthalimide], [1H, pyridine H4]), 8.64 (dd, $J = 1.6, 5.0$ Hz, 1H, pyridine H6), 8.79 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, pyridine H2); EI MS(m/z) 224 (M^+ , 90), 180(54), 104 (41), 76(100). Analysis calculated for $C_{13}H_8N_2O_2 \cdot 0.1 H_2O$ (224.22) C, 69.62; H, 3.60; N, 12.50; Found C, 69.05; H, 3.57; N, 12.52.

3-Phthalimidomethylpyridine (21). Prepared according to the general procedure 1 using 3-aminomethylpyridine (500 mg, 4.72 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (1.1 g, 5.02 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 4/1) to afford 440 mg of **21** (39% yield) as white solid; mp 153-154°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3096-3026 (aromatic C-H), 2950 (aliphatic C-H), 1710 (C=O); 1H NMR($CDCl_3$) δ 4.87(s, 2H, $-CH_2-N$), 7.24-7.28 (m, 1H, pyridine H5), 7.73-7.86 (m, 5H, [4H, phthalimide], [1H, pyridine H4]), 8.53 (dd, $J = 1.76, 4.91$ Hz, 1H, pyridine H6), 8.72 (d, $J = 2.11$ Hz, 1H, pyridine H2); EI MS(m/z) 238 (M^+ , 100), 181(23), 105(64), 76(48). Analysis calculated for $C_{14}H_{10}N_2O_2$ (238.25) C, 70.57; H, 4.23; N, 11.76; Found C, 70.59; H, 4.25; N, 12.27.

2-Phthalimidomethylpyridine (22). Prepared according to the general procedure 1 using 2-aminomethylpyridine (500 mg, 4.72 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (1.1 g, 5.02 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 3/1) to afford 716 mg of **22** (65% yield) as white solid; mp 123-124°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3107-3045 (aromatic C-H), 2936 (aliphatic C-H), 1700 (C=O); 1H NMR($CDCl_3$) δ 5.02 (s, 2H, $-CH_2-N$), 7.17 (ddd, $J = 1.05, 5.27, 7.37$ Hz, 1H, pyridine H5), 7.29 (d, $J = 7.37$ Hz, 1H, pyridine H3), 7.64 (dt, $J = 1.76, 7.37$ Hz, 1H, pyridine H4), 7.74-7.89 (m, 4H, phthalimide), 8.51-8.54 (m, 1H, pyridine H6); EI MS(m/z) 238 (M^+ , 100), 193(92), 160(32), 104(49), 76(59). Analysis calculated for $C_{14}H_{10}N_2O_2$ (238.25) C, 70.57; H, 4.23; N, 11.76; Found C, 70.62; H, 4.24; N, 11.87.

3-Phthalimidomethyl-6-aminopyridine (23).

3-Aminomethyl-6-aminopyridine. 3-Aminomethyl-6-aminopyridine was synthesized using the same procedure as described for 5-(2-aminoethyl)-1,3-benzodioxole from 6-aminonicotinamide (1.0 g, 7.29 mmol) and lithium aluminium hydride (330 mg, 8.69 mmol). The crude amine was purified by flash chromatography ($CHCl_3/MeOH$: 5/1 and 1% NH_4OH) to provide pale yellow oil (850 mg, 94%); IR(neat) (cm^{-1}) 3359, 3222 (N-H), 2890-2960 (aliphatic C-H), 1395 (C-N), 1511 (bending C-H), 843 (oop N-H).

3-Phthalimidomethyl-6-aminopyridine (23). Prepared according to the general procedure 1 using 3-aminomethyl-6-aminopyridine (450 mg, 3.65 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (960 mg, 4.38 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 3/1) to afford 527 mg of **23** (54% yield); mp 189-190°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3468, 3365 (N-H), 3059-3025 (aromatic C-H), 2956 (aliphatic C-H), 1770 (C=O); 1H NMR($CDCl_3$) δ 4.52 (s, 2H, $-NH_2$), 4.70 (s, 2H, $-CH_2N$), 6.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, pyridine H5), 7.56 (dd, $J = 2.6, 8.4$ Hz, 1H, pyridine H4), 7.68-7.88 (m, 4H, phthalimide), 8.18 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, pyridine H2); EI MS(m/z) 253 (M^+ , 29), 196(10), 130(7), 120(21), 107(21), 94(22), 76(28). Analysis calculated for $C_{14}H_{11}N_3O_2$ (253.26) C, 66.39; H, 4.37; N, 16.59; Found C, 66.23; H, 4.73; N, 16.69.

3-Phthalimidomethyl-6-methylpyridine (24).

3-Aminomethyl-6-methylpyridine. 3-Aminomethyl-6-methylpyridine was synthesized using the same procedure as described for 5-(2-aminoethyl)-1,3-benzodioxole from 6-methylnicotinamide (1.0 g, 7.34 mmol) and lithium aluminium hydride (350 mg, 9.22 mmol). After purification by flash chromatography

(CHCl₃/MeOH: 9/1 and 1% NH₄OH), the desired amine was obtained as yellow oil (702 mg, 78%); IR(neat) (cm⁻¹) 3340, 3300 (N-H), 3180 (heterocyclic C-H), 2910-2850 (aliphatic C-H), 1439 (bending C-H), 1380 (C-N).

3-Phthalimidomethyl-6-methylpyridine (24). Prepared according to the general procedure 1 using 3-aminomethyl-6-methylpyridine (200 mg, 1.63 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (430 mg, 1.96 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 3/1) to afford 84 mg of **24** (16% yield) as white solid; mp 131-132°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3032 (aromatic C-H), 2947-2933 (aliphatic C-H), 1722 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 2.52 (s, 3H, CH₃-Ar), 4.82 (s, 2H, -CH₂-N), 7.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, pyridine H5), 7.68 (dd, *J* = 2.6, 7.6 Hz, 1H, pyridine H4), 7.68-7.88 (m, 4H, phthalimide), 8.59 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, pyridine H2); EI MS(*m/z*) 252(M⁺, 100), 223(20), 195(25), 160(20), 119(71), 104(44), 93(24), 76(85). Analysis calculated for C₁₅H₁₂N₂O₂ (252.27) C, 71.41; H, 4.79; N, 11.10; Found C, 71.21; H, 4.78; N, 10.84.

2-Phthalimidomethyl-5-methylpyrazine (25). Prepared according to the general procedure 1 using 2-(aminomethyl)-5-methylpyrazine (500 mg, 4.05 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (1 g, 4.86 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 3/1) to afford 419 mg of **25** (41% yield); mp 152-153°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3105-3045 (aromatic C-H), 2960-2927 (aliphatic C-H), 1709 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 2.53 (s, 3H, CH₃), 5.01 (s, 2H, -CH₂-N), 7.72-7.91 (m, 4H, phthalimide), 8.36 (s, 1H, pyrazine H6), 8.53 (s, 1H, pyrazine H3); EI MS(*m/z*) 253(M⁺, 100), 208(90), 194(12), 160(37), 132(27), 104(89), 76(69). Analysis calculated for C₁₄H₁₁N₃O₂ (253.26) C, 66.39; H, 4.37; N, 16.59; Found C, 66.31; H, 4.33; N, 16.64.

3-(2-Phthalimidoethyl)pyridine (26).

3-(2-aminoethyl)pyridine. 3-(2-aminoethyl)pyridine was synthesized using the same procedure as described for 5-(2-aminoethyl)-1,3-benzodioxole from 3-pyridylacetonitrile (1.0 g, 8.47 mmol) and lithium aluminium hydride (400 mg, 10.54 mmol). After purification by flash chromatography (CHCl₃/MeOH: 9/1 and 1% NH₄OH), the desired amine was obtained as brown oil (970 mg, 94%); IR(neat)(cm⁻¹) 3381, 3249 (N-H), 3045 (aromatic C-H), 2947-2874 (aliphatic C-H), 1433 (bending C-H), 1031 (C-N), 722 (heterocyclic oop C-H).

3-(2-Phthalimidoethyl)pyridine (26). Prepared according to the general procedure 1 using 3-(2-aminoethyl)pyridine (100 mg, 0.81 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (220 mg, 0.99 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 4/1) to afford 142 mg of **26** (65% yield) as white solid; mp 143-144°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3091 (aromatic C-H), 2999-2940 (aliphatic C-H), 1716 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 3.03 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-N), 3.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-CH₂-N), 7.21-7.25 (m, 2H, pyridine H5, H6), 7.63 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, pyridine H4), 7.69-7.87 (m, 4H, phthalimide), 8.47 (s, 1H, pyridine H2); EI MS(*m/z*) 252(M⁺, 20), 160(100), 133(8), 105(21), 92(11), 77(28). Analysis calculated for C₁₅H₁₂N₂O₂ (252.27) C, 71.41; H, 4.79; N, 11.11; Found C, 71.18; H, 4.42; N, 11.27.

2-(2-Phthalimidoethyl)pyridine (27). Prepared according to the general procedure 1 using 2-(2-aminoethyl)pyridine (500 mg, 4.09 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (1.1 g, 5.02 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 3/1) to afford 400 mg of **27** (39% yield) as white solid; mp 174-175°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3019 (aromatic C-H), 2938 (aliphatic C-H), 1706 (C=O); ¹H NMR

(CDCl₃) δ 3.18 (t, J = 6.8 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-N), 4.11 (t, J = 6.8 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-N), 7.13 (ddd, J = 0.8, 4.8, 8.5 Hz, 1H, pyridine H5), 7.18 (d, J = 8.5 Hz, 1H, pyridine H3), 7.59 (dt, J = 2.0, 8.5 Hz, 1H, pyridine H4), 7.70-7.73 (m, 4H, phthalimide), 8.50-8.53 (m, 1H, pyridine H6); EI MS(m/z) 252(M^+ , 100), 160(86), 106(63), 93(13), 77(31). Analysis calculated for C₁₅H₁₂N₂O₂(252.27) C, 71.41; H, 4.79; N, 11.11; Found C, 71.00; H, 4.83; N, 11.63.

2-Phthalimidomethylfuran (28). Prepared according to the general procedure 1 using furfurylamine (1 g, 10.8 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (2.36 g, 10.8 mmol). After purification by column chromatography (EtOAc/hexane: 3/1) yielded 944 mg of compound **28** (38% yield); mp 109-110°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3124 (aromatic C-H), 2940 (aliphatic C-H), 1722 (C=O); ¹H NMR(CD₃OD) δ 4.86 (s, 2H, -CH₂-N), 6.31 (dd, J = 1.9, 3.4 Hz, 1H, furan H4), 6.38 (d, J = 3.4 Hz, 1H, furan H3), 7.34 (d, J = 1.9 Hz, 1H, furan H5), 7.69-7.91 (m, 4H, phthalimide); EI MS(m/z) 227(M^+ , 79), 198(39), 170(25), 133(16), 104(41), 76(28), 28(100). Analysis calculated for C₉H₇NO₃ (227.05) C, 68.72; H, 3.99; N, 6.16; Found C, 68.71; H, 4.08; N, 6.33.

2-(2-Phthalimidoethyl)furan (29).

2-Furanmethylchloride. A mixture containing furfuryl alcohol (17 g, 173.5 mmol) in 100 mL of methylenechloride and 14 mL of dry pyridine was stirred at 0°C. To this mixture, freshly distilled thionylchloride (13.75 g, 173.9 mmol) in 40 mL of methylenechloride was added dropwise under nitrogen during 2 hours. The mixture was allowed to stir for six hours at 0°C. The reaction mixture was slowly poured with stirring into 100 mL of ice water. The organic layer was washed with 100 mL of water, 100 mL of saturated sodium bicarbonate, 100 mL of water, and 100 mL of brine solution respectively. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated *in vacuo* leaving the desired product as yellow-brown liquid (15.3 g, 76%). The product was used directly for the next step without further purification; IR(neat) (cm⁻¹) 3131 (heterocyclic C-H), 2979 (aliphatic C-H), 1426 (bending C-H), 1267 (bending CH₂-Cl), 742 (heterocyclic oop C-H).

2-Furanmethylcyanide. A solution of 2-furanmethylchloride (10.0 g, 85.8 mmol) and a catalytic amount of benzyltrimethylammoniumchloride in 50 mL of methylenechloride was stirred at 0°C. To this mixture was added dropwise of sodium cyanide (5.0 g, 102.9 mmol) in minimum amount of water. After the addition was completed, the mixture was allowed to stir for 6 hours at 0°C. The crude reaction mixture was added to 50 mL of water. The organic layer was separated and then washed with 3x50 mL of water and 50 mL of brine solution, dry over anhydrous sodium sulfate and then evaporated. After purification by column chromatography (EtOAc/hexane: 1/5) the desired product was obtained as dark-brown oil (5.75 g, 62.6%); IR(neat)(cm⁻¹) 3130 (heterocyclic C-H), 2930 (aliphatic C-H), 2227 (C $\equiv$ N), 1453 (bending C-H), 1025 (C-O), 796 (heterocyclic oop C-H).

2-(2-Aminoethyl)furan. 2-(2-Aminoethyl)furan was synthesized by using the same procedure as described for 5-(2-aminoethyl)-1,3-benzodioxole from 2-furanmethylcyanide (5.0 g, 46.7 mmol) and lithium aluminium hydride (2.1 g, 5.04 mmol). The crude amine was shown as a tailing spot on TLC (CHCl₃/MeOH: 9/1), detected by ninhydrin reagent. After purification by flash chromatography (CHCl₃/MeOH: 9/1 and 1%

NH_4OH), the desired amine was obtained as yellow-brown oil (2.3 g, 43.3%); IR(neat)(cm^{-1}) 3380, 3300 (N-H), 3110 (heterocyclic C-H), 2960-2920 (aliphatic C-H), 1450 (bending C-H), 1205 (C-N).

2-(2-Phthalimidoethyl)furan (29). Prepared according to the general procedure 1 using 2-(2-aminoethyl)furan (2 g, 18 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (4.73 g, 21.6 mmol). The crude product was purified by column chromatography (CHCl_3 /hexane: 3/1) to afford 1.4 g of **29** (32% yield) as yellow solid; mp 82-83°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3098 (aromatic C-H), 2947-2920 (aliphatic C-H), 1722 (C=O); ^1H NMR(CDCl_3) δ 2.23 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 4.80 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 5.86 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, furan H3), 6.24 (dd, $J = 2.1, 4.3$ Hz, 1H, furan H4), 7.21 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, furan H5), 7.65-7.90 (m, 4H, phthalimide); EI MS(m/z) 241(M^+ , 100), 198 (62), 170(31), 160(9), 130(16), 104(36), 95(58), 76(61). Analysis calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (241.24) C, 69.70; H, 4.59; N, 5.80; Found C, 69.95; H, 4.56; N, 5.92.

2-(2-Phthalimidoethyl)thiophene (30)

2-Thiophenemethylchloride. A mixture containing 2-thiophenemethanol (7 g, 61.4 mmol) in 100 mL of methylenechloride and 5 mL of dry pyridine was stirred at 0°C. To this mixture, freshly distilled thionylchloride (14.6 g, 122.8 mmol) in 40 mL of methylenechloride was added dropwise under nitrogen gas during 2 hours. The mixture was allowed to stir for 6 hours at 0°C. The reaction mixture was slowly poured with stirring into 100 mL of ice water. The organic layer was washed with 100 mL of water, 100 mL of saturated sodium bicarbonate, 100 mL of water and 100 mL of brine solution. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated *in vacuo* leaving the desired product as yellow-brown liquid (5.5 g, 68%). 2-Thiophenemethylchloride was used directly for the next step without further purification. IR(neat)(cm^{-1}) 3107 (heterocyclic C-H), 2964 (aliphatic C-H), 1431 (bending C-H), 1262 (bending $\text{CH}_2\text{-Cl}$).

2-Thiophenemethylcyanide. A solution of 2-thiophenemethylchloride (5.0 g, 37.7 mmol) and a catalytic amount of benzyltrimethylammoniumchloride in 50 mL of methylenechloride was stirred at 0°C. To this mixture, sodium cyanide (2.0 g, 40.8 mmol) in minimum amount of water was added dropwise. After the addition was completed, the mixture was allowed to stir for 6 hours at 0°C. The crude mixture was added 50 mL of water. The organic layer was washed with 3x50 mL of water and 50 mL of brine solution, dried over anhydrous sodium sulfate then evaporated. After purification by flash chromatography using (EtOAc/hexane: 3/1), the desired product was obtained as yellow-brown oil (2.26 g, 49%); IR(neat)(cm^{-1}) 3111 (heterocyclic C-H), 2955 (aliphatic C-H), 2255 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1438, 1413 (bending C-H); ^1H NMR(CDCl_3) δ 3.91 (s, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CN}$), 6.69 (dd, $J = 4, 5.6$ Hz, 1H, thiophene H3), 7.04-7.06 (m, 1H, thiophene H4), 7.27 (dd, $J = 2.4, 4.8$ Hz, 1H, thiophene H5).

2-(2-Aminoethyl)thiophene. 2-(2-Aminoethyl)thiophene was synthesized using the same procedure as described for 5-(2-aminoethyl)-1,3-benzodioxole from 2-thiophenemethylcyanide (2.0 g, 16.2 mmol) and lithium aluminium hydride (1.3 g, 34.3 mmol). After purification by flash chromatography (CHCl_3 /MeOH: 9/1 and 1% NH_4OH), the desired amine was obtained as yellow oil (1.7 g, 82%); IR(neat)(cm^{-1}) 3366 and 3298 (primary N-H), 3106 (heterocyclic C-H), 2929, 2867 (aliphatic C-H), 1443 (bending C-H), 1381 (C-N); ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.96 (s, 4H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 3.25 (bs, 2H, exchangeable with D_2O , $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 6.82 (dd, $J = 4$ Hz, 1H, thiophene H3), 6.90-6.93 (m, 1H, thiophene H4), 7.11-7.16 (m, 1H, thiophene H5).

2-(2-Phthalimidoethyl)thiophene (30). Compound **30** was synthesized according to the general procedure 1 from 2-(2-aminoethyl)thiophene (500 mg, 3.94 mmol) and N-carbethoxy-phthalimide (864 mg, 3.94 mmol). The crude product was purified by column chromatography (CHCl₃/hexane: 3/1) to provide white solid (695 mg, 69%); m.p. 128-130°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3120 (aromatic C-H), 2935-2861 (aliphatic C-H), 1715 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 3.23 (t, *J* = 8 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-N), 3.97 (t, *J* = 8 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-N), 6.87-6.91 (m, 2H, thiophene H3, H4), 7.14 (dd, *J* = 0.8, 5.6 Hz, 1H, thiophene H5), 7.71-7.84 (m, 4H, phthalimide); EI MS (*m/z*) 257(M⁺, 14), 160(41), 110(100.00), 104(9), 97(24), 77(22). Analysis calculated for C₁₄H₁₁NO₂S (257.31) C, 65.36; H, 4.31; N, 5.45; Found C, 65.58; H, 3.94; N, 5.88.

2-Phthalimidomethyl-3,4-dihydro-2H-pyran (31)

3,4-Dihydro-2H-pyran-2-carboxamide. A mixture containing sodium 3,4-hydro-2H-pyran-2-carboxylate (10 g, 66.62 mmol), anhydrous sodium carbonate (1.13 g, 10.66 mmol), ethyl iodide (8.2 mL, 16 g, 102.56 mmol), a trace amount of hydroquinone and N, N-dimethylformamide 80 mL was stirred vigorously for 3 hours at 80-100°C. After cooling to room temperature, the mixture was extracted with 100 mL of benzene and 100 mL of water. The organic layer was washed with 3x80 mL of water, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated *in vacuo*. The crude ester was stirred vigorously at 80°C with concentrated ammonium hydroxide 100 mL until the mixture became homogeneous. The solution was allowed to cool to room temperature and after crystallization had begun, the mixture was placed in an ice bath to crystallize. The mixture was filtered and the crystalline was washed with small amounts of ice water. The crystalline amide was dried in a vacuum desicator and yielded the desired ester product 3.6 g (43%); m.p. 114-115°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3401 and 3197 (N-H), 2954-2876 (aliphatic C-H), 1666 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.82-2.31 (m, 4H, -CH₂-CH₂-), 4.29 (dd, *J* = 3.12, 8.91 Hz, 1H -CH₂-CH-O-), 4.80-4.84 (m, 1H, -CH=CH-O-), 6.38 (td, *J* = 2.23, 6.24 Hz, 1H, -CH=CH-O-), 6.52 (bs, 2H, CO-NH₂).

3,4-Dihydro-2H-pyran-2-methanamine. 3,4-Dihydro-2H-pyran-2-methanamine was synthesized using the same procedure as described for 5-(2-aminoethyl)-1,3-benzodioxole from 3,4-dihydro-2H-pyran-2-carboxamide (3.0 g, 26.5 mmol) and lithium aluminium hydride (2.0 mg, 52.7 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (CHCl₃/MeOH: 9/1 and 1% NH₄OH) to provide pale yellow oil (1.65 g, 62%). IR(neat)(cm⁻¹) 3380 and 3306 (N-H), 2973-2873 (aliphatic C-H), 1458, 1442 (bending C-H), 1379 (C-N).

2-Phthalimidomethyl-3,4-dihydro-2H-pyran (31). Compound **31** was synthesized according to the general procedure 1 from 3,4-dihydro-2H-pyran-2-methanamine (500mg, 2.06 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (452 mg, 2.06 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 2/1) to provide white solid (550 mg, 51%); m.p. 95-96°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3061 (aromatic C-H), 2950-2848 (aliphatic C-H), 1725 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.63-2.14 (m, 4H, -CH₂-CH₂-), 3.71-4.20 (m, 2H, -CH₂-N), 4.18 (tt, *J* = 1.76, 8.78 Hz, 1H, -CH₂-CH-O-), 4.68-4.71 (m, 1H, CH=CH-O), 6.30 (td, *J* = 2.11, 6.32 Hz, 1H, -CH=CH-O-), 7.73-7.86 (m, 4H, phthalimide); EI MS(*m/z*) 243(M⁺, 5), 225(14), 160(36), 148(14), 104(23), 96(100), 83(64), 76(41), 67(19), 55(48). Analysis calculated for C₁₄H₁₃NO₃ (243.26) C, 69.11; H, 5.39; N, 5.76; Found C, 69.71; H, 4.76; N, 6.29.

4-(2-Phthalimidoethyl)morpholine (32). Prepared according to the general procedure 1 using 4-(2-aminoethyl)morpholine (1 g, 7.68 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (2 g, 9.21 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 3/1) to afford 669 mg of **32** (33% yield) as white solid; mp 127-128°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3026 (aromatic C-H), 2960-2800 (aliphatic C-H), 1716 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 2.51 (t, *J* = 4.4 Hz, 4H, 2xO-CH₂-CH₂-N), 2.63 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NCO), 3.63 (t, *J* = 4.4 Hz, 4H, 2 x O-CH₂-CH₂-N), 3.82 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NCO), 7.70-7.87 (m, 4H, phthalimide); EI MS(*m/z*) 260(M⁺, 1), 174(2), 160(11), 104(12), 100(100), 76(13). Analysis calculated for C₁₄H₁₆N₂O₃ (260.29) C, 64.60; H, 6.19; N, 10.76; Found C, 64.35; H, 6.24; N, 10.80.

4-(3-Phthalimidopropyl)morpholine (33). Prepared according to the general procedure 1 using 4-(3-aminopropyl)morpholine (500 mg, 3.47 mmol) and N-carbethoxyphthalimide (910 mg, 4.15 mmol). The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/hexane: 3/1) to afford 400 mg of **33** (42% yield) as white solid; mp 59-61°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3060 (aromatic C-H), 2953-2814 (aliphatic C-H), 1729 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 1.78-1.92 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-NCO), 2.30-2.44 (m, 6H, [2x-O-CH₂-CH₂-N](-CH₂-CH₂-CH₂-NCO)), 3.50 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H, 2 x O-CH₂-CH₂-N), 3.76 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-NCO), 7.68-7.86 (m, 4H, phthalimide); EI MS(*m/z*) 275(M⁺+H, 20), 160(3), 126(6), 100(100), 70(10), 56(14). Analysis calculated for C₁₅H₁₈N₂O₃ (274.32) C, 65.66; H, 6.62; N, 10.22; Found C, 65.71; H, 6.52; N, 10.19.

1-Phthalimidomethyl-4-methylbenzene (34). Prepared according to the general procedure 2 using phthalimide (500 mg, 3.40 mmol), 4-methylbenzyl bromide (1.0 mL, 7.54 mmol) and potassium hydroxide solution (130 mg, 2.32 mmol) 10 mL. The crude product was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 2/1 as eluent. Recrystallization from CHCl₃/CH₃OH gave compound **34** (0.41 g, 43% yield) as white needle crystal, mp. 117-118°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3065 (aromatic C-H), 2940 (aliphatic C-H), 1726 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 2.36 (s, 3H, CH₃), 4.78 (s, 2H, CH₂-N), 7.10 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, benzene H3, H5), 7.31 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, benzene H2, H6), 7.64-7.70 (m, 2H, phthalimide H3¹, H4¹), 7.81 (dd, *J* = 3.0, 5.4 Hz, 2H, phthalimide H2¹, H5¹); EI MS(*m/z*) 251(M⁺, 100), 236(60), 208(13), 160(20), 130(27), 105(14), 104(27), 77(16). Analysis calculated for C₁₆H₁₃NO₂ (251.28) C, 76.48; H, 5.21; N, 5.57; Found C, 76.93; H, 5.45; N, 5.42.

1-Phthalimidomethyl-2-methylbenzene (35). Prepared according to the general procedure 2 using phthalimide (2 g, 13.6 mmol), 2-methylbenzyl bromide (4 mL, 29.4 mmol) and potassium hydroxide solution (310 mg, 5.5 mmol) 10 mL. The crude product was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 4/1 as eluent. Recrystallization from CHCl₃/CH₃OH gave compound **35** (1.50 g, 44.7% yield) as white needle crystal, mp. 158-159°C; IR(KBr)(cm⁻¹) 3087 (aromatic C-H), 2920 (aliphatic C-H), 1705 (C=O); ¹H NMR(CDCl₃) δ 2.46 (s, 3H, CH₃), 4.85 (s, 2H, CH₂-N), 7.09-7.15 (m, 3H, H3, benzene H5, H6), 7.21-7.25 (m, 1H, benzene H4), 7.67-7.73 (m, 2H, phthalimide H3¹, H4¹), 7.84 (dd, *J* = 3.0, 5.4 Hz, 2H, phthalimide H2¹, H5¹); EI MS(*m/z*) 251(M⁺, 100), 236(20), 160(23), 130(10), 104(53), 78(14). Analysis calculated for C₁₆H₁₃NO₂ (251.28) C, 76.48; H, 5.21; N, 5.57; Found C, 76.92; H, 5.54; N, 5.43.

1-Phthalimidomethyl-3-methoxybenzene (36). Prepared according to the general procedure 2 using phthalimide (2 g, 13.6 mmol), 3-methoxybenzyl chloride (4 mL, 29.5 mmol) and potassium hydroxide

solution (310 mg, 5.5 mmol) 10 mL. The crude product was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 4/1 as eluent. Recrystallization from $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ gave compound **36** (0.50 g, 13.8% yield) as white solid crystal, mp. 126-167°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3039 (aromatic C-H), 2953 (aliphatic C-H), 1709 (C=O); ^1H NMR(CDCl_3) δ 3.76 (s, 3H, OCH_3), 4.80 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 6.78 (dd, $J = 1.9, 8.2$ Hz, 1H, benzene H2), 6.95 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, benzene H6), 6.79 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, benzene H4), 7.21 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, benzene H5), 7.66-7.72 (m, 2H, phthalimide H3', H4'), 7.82 (dd, $J = 3.0, 5.4$ Hz, 2H, phthalimide H2', H5'); EI MS(m/z) 268($\text{M}^+ + \text{H}$, 29), 267(100), 234(28), 206(30), 180(9), 130(9), 77(10). Analysis calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (267.28) C, 71.80; H, 4.90; N, 5.24; Found C, 71.78; H, 5.11; N, 4.89.

1-Phthalimidomethyl-3-benzonitrile (37). Prepared according to the general procedure 2 using phthalimide (1 g, 6.79 mmol), 3-(bromomethyl) benzonitrile (2.7 g, 13.8 mmol) and potassium hydroxide solution (160 mg, 2.85 mmol) 10 mL. The crude product was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 1/2 as eluent. Recrystallization from $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ gave compound **37** (1.50 g, 44.7% yield) as white solid crystal, mp. 148-149°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3072 (aromatic C-H), 2947 (aliphatic C-H), 2242 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1705 (C=O); ^1H NMR(CDCl_3) δ 4.81 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 7.41 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, benzene H5), 7.54 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, benzene H6), 7.65 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, benzene H4), 7.68 (s, 1H, benzene H2), 7.71-7.75 (m, 2H, phthalimide H3', H4'), 7.84 (dd, $J = 3.0, 5.4$ Hz, 2H, phthalimide H2', H5'); EI MS(m/z) 263($\text{M}^+ + \text{H}$, 61), 262(100), 244(67), 233(24), 205(22), 130(10), 105(19), 77(9). Analysis calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ (262.27) C, 73.27; H, 3.84; N, 10.68; Found C, 73.69; H, 3.94; N, 10.59.

1-Phthalimidomethyl-3-nitrobenzene (38). Prepared according to the general procedure 2 using phthalimide (2 g, 13.6 mmol), 3-nitrobenzyl chloride (5 g, 29.1 mmol) and potassium hydroxide solution (310 mg, 5.5 mmol) 10 mL. The crude product was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 4/1 as eluent. Recrystallization from $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ gave compound **38** (1.31 g, 34.2% yield) as white needle crystal, mp. 163-164°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3087 (aromatic C-H), 2933 (aliphatic C-H), 1719 (C=O); ^1H NMR(CDCl_3) δ 4.92 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 7.49 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, benzene H5), 7.69-7.75 (m, 3H, benzene H6, phthalimide H3', H4'), 7.85 (dd, $J = 3.0, 5.4$ Hz, 2H, phthalimide H2', H5'), 8.11 (dd, $J = 0.9, 7.8$ Hz, 1H, benzene H4), 8.25 (s, 1H, benzene H2); EI MS(m/z) 281(M^+ , 11), 265(100), 266(23), 235(68), 207(9), 179(5), 130(6), 77(8). Analysis calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ (282.25) C, 63.83; H, 3.54; N, 9.93; Found C, H, N,

1-Phthalimidomethyl-4-tert-butylbenzene (39). Prepared according to the general procedure 2 using phthalimide (1 g, 6.79 mmol), 4-tert-butyl benzyl bromide (2.4 mL, 13.2 mmol) and potassium hydroxide solution (160 mg, 2.85 mmol) 10 mL. The crude product was purified by column chromatography using hexane/EtOAc: 4/1 as eluent. Recrystallization from $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ gave compound **39** (0.63 g, 31.7% yield) as white solid crystal, mp. 93-94°C; IR(KBr)(cm^{-1}) 3072 (C-H aromatic), 2966 (C-H aliphatic), 1716 (C=O); ^1H NMR(CDCl_3) δ 1.25 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.79 (s, 2H, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 7.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, benzene H2, H6), 7.36 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, benzene H3, H5), 7.66-7.69 (m, 2H, phthalimide H3', H4'), 7.81 (dd, $J = 3.1, 5.4$ Hz, 2H, phthalimide H2', H5'); EI MS(m/z) 293(M^+ , 16), 278(100), 236(28), 160(47), 131(35), 130(12). Analysis calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ (293.36) C, 77.79; H, 6.23; N, 4.77; Found C, 77.61; H, 6.75; N, 4.50.

ส่วนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase

วิธี Radiometric assay

ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase โดยวิธี radiometric assay เอนไซม์ที่ใช้เป็น recombinant reverse transcriptase, poly(rA) และ oligo(dT) เป็น template-primer, [methyl-³H]-thymidine triphosphate เป็น substrate โดยใช้สารที่สังเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้น 200 µg/mL สารดังกล่าวถูก incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที แล้ววัดปริมาณการยับยั้งการ incorporation ของ substrate เข้าไปใน template-primer โดยเครื่อง scintillation counter สารที่ใช้เป็น positive control คือ doxorubicin hydrochloride (adriamycin hydrochloride) อนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้มากกว่า 70 % inhibition จะนำมาหาค่า IC₅₀

วิธีการทดสอบฤทธิ์โดยละเอียดมีดังต่อไปนี้

1. Buffer and reagents preparation

1.1 Preparation of 10 mL of the buffer mixture solution.

DW	7.57	mL
1M Tris HCl pH 8.0	1.0	mL
2M KCl	0.5	mL
1M Mg(OAc) ₂	0.1	mL
2M dithiothreitol (DDT)	0.03	mL
2.5% Nonidet P-40	0.8	mL

1.2 Preparation of substrate solution per sample.

Buffer mixture solution	50.25	µL
DW	12.0	µL
[³ H] dTTP	0.25	µL

1.3 Preparation of enzyme solution per sample.

Buffer mixture solution	10.0	µL
BSA	2.0	µL
Recombinant RT	0.1	µL

2. Assay of RT (complete system)

The reaction mixture for the standard RT assay (final volume 100 µL) contained the following:

Substrate solution	62.5	µL
Poly(rA).oligo(dT)	10.0	µL
DW	10.4	µL
Sample solution	5.0	µL
Enzyme solution	12.1	µL

The synthesized compound was adjusted to 4 µg/µL with DMSO. The enzyme solution was added immediately before incubation. The reaction mixture was incubated at 37°C for 60 minutes and then terminated by boiling at 100°C for 10 minutes. Eighty µL of each assay mixture was applied to 2.3 cm circular Whatman DE 81 cellular paper and dried for 1 hour. The membrane was washed batchwise with

(4×7 mL) disodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4), followed by 2×7 mL of water and 2 mL of absolute ethanol. The membrane was dried and then transferred to a vial containing scintillation fluid (5 mL). The radioactivity was measured by a liquid scintillation counter.

3. Positive control of inhibitors

The positive control of inhibitors was performed by using doxorubicin hydrochloride. The reaction mixture (final volume 100 μL) contained the following:

Substrate solution	62.5	μL
Poly(rA).oligo(dT)	10.0	μL
DW	10.4	μL
Doxorubicin hydrochloride (14.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	5.0	μL
Enzyme solution	12.1	μL

The reaction mixture was incubated at 37°C for 60 minutes and followed the same procedure for the assay of RT.

4. Positive control of tested solution (complete system - sample)

The positive control assay consisted of DMSO instead of the synthetic compound. The reaction mixture (final volume 100 μL) contained the following:

Substrate solution	62.5	μL
DW	10.4	μL
DMSO	5.0	μL
Poly(rA).oligo(dT)	10.0	μL
Enzyme solution	12.1	μL

The reaction mixture was incubated at 37°C for 60 minutes and followed the same procedure for the assay of RT.

5. Negative control of tested solution (complete system - RT)

The negative control assay consisted of the same constituents as the assay of RT, but the RT was omitted. The reaction mixture (final volume 100 μL) contained the following:

Substrate solution	62.5	μL
Poly(rA).oligo(dT)	10.0	μL
Buffer mixture solution	10.0	μL
BSA	2.0	μL
DMSO	5.0	μL
DW	10.5	μL

The reaction mixture was incubated at 37°C for 60 minutes and followed the same procedure for the assay of RT.

6. Inhibition of RT activity

The inhibition of the incorporation of ^3H labeled substrates [^3H]dTTP into a polymer fraction by RT in the presence of the samples was calculated as follows:

$$\% \text{ IR} = \left[1 - \frac{[\text{cpm}(\text{complete system}) - \text{cpm}(\text{complete system} - \text{RT})]}{[\text{cpm}(\text{complete system} - \text{sample}) - \text{cpm}(\text{complete system} - \text{RT})]} \right] \times 100$$

% IR = percent of relative inhibitory ratio briefly called % inhibition

cpm = count per minute

complete system = reaction mixture which consisted of RT, template-primer, substrate, sample, and other reagents

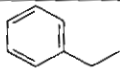
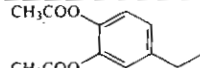
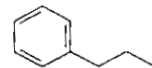
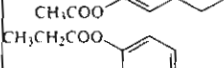
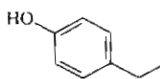
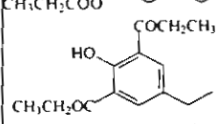
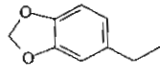
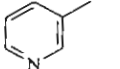
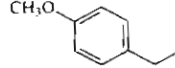
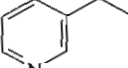
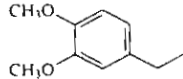
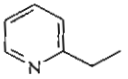
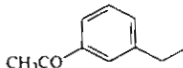
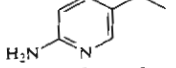
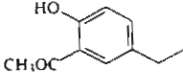
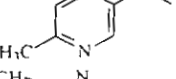
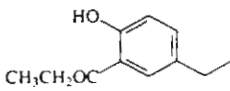
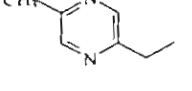
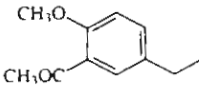
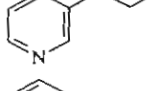
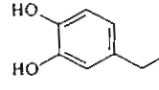
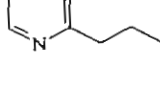
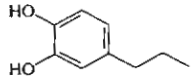
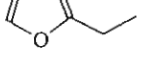
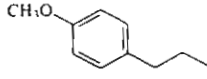
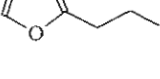
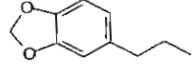
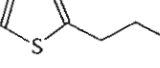
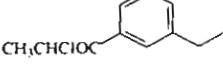
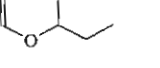
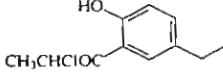
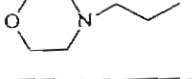
complete system - RT = reaction mixture which consisted of template-primer, substrate, and other reagents.

complete system - sample = reaction mixture which consisted of RT, template-primer, substrate, and other reagents.

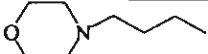
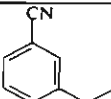
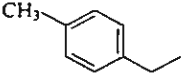
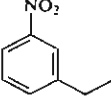
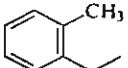
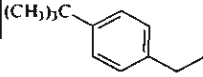
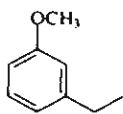
All experiments were performed in triplicate. The average of the 2 closely data values obtained from the experiment was used to calculate % IR (% inhibition).

ตารางที่ 3 แสดงโครงสร้างและ % inhibition ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี radiometric assay เฉพาะอนุพันธ์ที่มี % inhibition มากกว่า 70 % จะนำมาหาค่า IC_{50} พบว่า 4-phthalimidomethyl-1,2-dihydroxybenzene **11**, 2-phthalimidoethylfuran **29** และ 2-phthalimido-5-methylpyrazine **25** เป็นอนุพันธ์ใน 3 ลำดับแรกที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 60.90, 98.10 และ 120.75 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ อนุพันธ์ดังกล่าวมีค่า IC_{50} ต่ำกว่ายา delavirdine ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 502.22 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งใช้ poly(rA).oligo(dT) เป็น template-primer และ [^3H]dTTP เป็น substrate)

ตารางที่ 3 โครงสร้างของสารที่ได้สังเคราะห์ทั้งหมดและ % inhibition

Cpd.	R	% inhibition	Cpd.	R	% inhibition
1		43	17		43
2		37	18		16
3		22	19		6
4		3	20		17
5		29	21		15
6		14	22		7
7		24	23		11
8		3	24		41
9		22	25		84 ($IC_{50} = 120.75 \mu g/mL$)
10		26	26		20
11		76 ($IC_{50} = 60.90 \mu g/mL$)	27		15
12		3	28		32
13		21	29		78 ($IC_{50} = 98.10 \mu g/mL$)
14		8	30		9
15		52	31		43
16		20	32		62

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Cpd.	R	% inhibition	Cpd.	R	% inhibition
33		61	37		6
34		12	38		15
35		13	39		23
36		19			

ส่วนที่ 3 การศึกษา 3D QSAR โดยวิธี Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) และ Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (CoMSIA)

การศึกษา 3-D QSAR เป็นการศึกษาโดยคำนึงถึงคุณสมบัติแบบ 3 มิติ ของโมเลกุลและ receptor วิธีที่นิยมในปัจจุบันคือ CoMFA และ CoMSIA การศึกษา CoMFA และ CoMSIA สามารถทำได้โดยไม่จำเป็นต้องทราบโครงสร้างของ receptor binding site (ไม่จำเป็นต้องมี x-ray crystal structure ของ receptor ในที่นี้คือเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase) หลักการของ CoMFA คือโมเลกุลของยาส่วนใหญ่มักจับกับ receptor ด้วยแรงที่เป็นไม่ใช่ covalent อันได้แก่ electrostatic และ steric interaction ดังนั้น CoMFA จะหาความสัมพันธ์ระหว่าง electrostatic field และ steric field กับ biological activity ของโมเลกุล

ขั้นตอนของ CoMFA โดยสังเขปคือ เริ่มต้นจากการนำกลุ่มของโมเลกุลที่ใช้เป็น training set มาวางใน lattice โดยซ้อนทับกับโมเลกุลที่เป็น template คำนวณหา electrostatic และ steric field ระหว่างอะตอมที่ถูกกำหนดให้เป็น probe atom กับจุดต่างๆใน lattice นำค่าของ field ทั้ง 2 ชนิดที่คำนวณได้มาทำเป็นตาราง (QSAR table) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง field กับค่าของ activity (ค่า activity อาจเป็น IC_{50} , LD_{50} , $\log 1/IC_{50}$) โดยอาศัยวิธี PLS และ cross-validation ผลจาก QSAR นำมาสร้างสมการและแสดงผลออกมาเป็น contour map ซึ่งประกอบด้วยสีต่างๆ ในกรณีของ steric contour map บริเวณสีเขียวแสดงถึงบริเวณที่ถ้าเติมกลุ่มอะตอมที่เป็น bulky group จะเพิ่ม activity บริเวณสีเหลืองเป็นบริเวณซึ่งถ้าเติม bulky group จะลด activity และในกรณีของ electrostatic contour map บริเวณสีน้ำเงินและสีแดงเป็นบริเวณที่ถ้าเติมหมู่แทนที่ที่มีประจุบวกและประจุลบจะเพิ่ม activity ตามลำดับ สมการที่ได้จาก CoMFA จะใช้ในการทำนาย activity ของสารและเสนอโครงสร้างของสารที่น่าจะมี activity สูง

CoMSIA เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก CoMFA โดยเพิ่ม molecular potential field ชนิดอื่นนอกเหนือจาก electrostatic และ steric field เช่น hydrophobic field, hydrogen bonding field (ประกอบด้วย hydrogen bond donor และ hydrogen bond acceptor field) วิธีนี้จะคำนวณ similarity index ของ field ดังกล่าวโดยใช้ probe atom กับแต่ละโมเลกุล จากนั้นโดยวิธี PLS จะสรุปออกมาเป็นสมการและ contour map เช่นเดียวกับวิธี CoMFA โดยมี steric และ electrostatic contour map เช่นเดียวกับ CoMFA แต่จะเพิ่ม hydrophobic, hydrogen bond donor และ hydrogen bond acceptor contour map ซึ่งจะมีบริเวณสีต่างๆแล้วแต่จะกำหนดว่าบริเวณนั้นควรมีกุ่มอะตอมที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic, hydrophilic, hydrogen bond donor หรือ hydrogen bond acceptor จึงจะทำให้ activity เพิ่มขึ้น

วิธีการและขั้นตอนในการศึกษา CoMFA และ CoMSIA

1. Biological activity data of phthalimide derivatives

The synthesized phthalimide compounds were tested for their HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity by radiometric assay. The results of the inhibitory activity were reported as percentage of inhibition and used as dependent variables in 3D QSAR studies.

2. Generating the three-dimensional (3D) structure

The 3D structures of phthalimide derivatives were modeled with SYBYL 6.8 molecular modeling program (Tripos Associates, Saint Louis, MO) on Indigo Elan workstation (Silicon Graphics Inc., Mountain View, CA) using sketch approach. The fragment libraries in SYBYL database containing of small molecules were also used as building blocks for construction of larger ones. Each structure was first energy minimized using the standard Tripos force field (Powell method and 0.05 kcal/mol* Å energy gradient convergence criteria) and electrostatic charge was assigned by Gasteiger-Hückel method. These conformations were used as starting conformations to perform docking by Flexidock option in SYBYL. The conformations obtained from docking were further optimized by MOPAC 6.0 (PM3) and these conformations were used in the following 3D QSAR studies.

3. Structural alignment

Due to no x-ray crystallographic data of molecules in the training set available, two different alignment methods, superimposition and field fit, were performed.

3.1 Superimposition

The superimposition of molecules in the alignment was based on trying to minimize root-mean-squares (rms) differences in the fitting of selected atoms with template atoms. Compound **25** with the highest percent inhibition (84%) was used as template molecule. All atoms of the benzene moiety of the phthalimide structural element and the pyrazine ring were selected for superimposition. Conformations which exhibited minimum of rms after superimposition procedure, were selected and stored in the database for the next step.

3.2 Field fit

The field fit procedure was used as the second alignment criteria to increase field similarity within a series of molecules. In the field fit operation, the rms difference in the sum of steric and electrostatic interaction energies averaged across all (possibly weighted) lattice points, between molecules in the training set molecule and template molecule was minimized to find the best fit. The same template molecule and atoms of template molecule were also used in field fit alignment. All molecular conformations obtained from superimposition were used to calculate the steric and electrostatic field around the molecules to find the best field fit.

4. CoMFA Set up

CoMFA was performed using the QSAR option of SYBYL version 6.8. The steric and electrostatic energies were generated using sp^3 -carbon as probe atom with a +1 charge (default probe atom in SYBYL program). A 2.0 Å grid spacing and a distance-dependent dielectric constant were chosen. The cutoff value for both steric and electrostatic interaction was set to 30 kcal/mol at the beginning.

5. CoMSIA Set up

CoMSIA was performed using the QSAR option of SYBYL version 6.8. Five physicochemical properties (steric, electrostatic, hydrophobic, and hydrogen bond donor and acceptor) were evaluated, using a common probe atom with 1 Å radius, charge +1, hydrophobicity +1, hydrogen bond donor and acceptor properties +1. Similarity indices were calculated using Gaussian-type distance dependence between the probe and the atoms of the molecules of the data set. This functional form requires no arbitrary definition of cutoff limits, and the similarity indices can be calculated at all grid points inside and outside the molecule. The value of the attenuation factor α was set to 0.3.

6. PLS Calculations and Validations

PLS methodology was used for all 3D-QSAR analyses. The grid had a resolution of 2.0 Å and extended beyond the molecular dimensions by 4.0 Å in all directions. Column filtering was set to 2.0 kcal/mol. CoMFA and CoMSIA models were developed using the conventional stepwise procedure. The optimum number of components used to derive the non-validated model was defined as the number of components leading to the highest cross-validated r^2 (q^2) and the lowest standard error of prediction (SEP). The q^2 values were derived after "leave-one-out" cross-validation. The non-cross-validated models were assessed by the explained variance r^2 , standard error of estimate (S) and F ratio. The non-cross-validated analyses were used to make predictions of the percent inhibitions of the phthalimide compounds from the test set and to display the coefficient contour maps. The actual versus predicted percent inhibitions of the test phthalimide compounds were fitted by linear regression, and the "predictive" r^2 , S , and F ratio were determined.

7. QSAR Coefficient Contour Maps

The visualization of the results of the best CoMFA and CoMSIA models have been performed using the "StDev*Coeff" mapping option contoured by contribution. Favored and disfavored levels fixed at 80% and 20%, respectively. The contours of the CoMFA and CoMSIA steric maps are shown in green (more bulk is favored) and yellow (less bulk is favored). The electrostatic fields of both CoMFA and CoMSIA contours are colored blue (positive charge is favored) and red (negative charge is favored). The contours of the CoMSIA hydrophobic fields are colored yellow (hydrophobic groups enhance activity) and white (hydrophilic groups enhance activity). The hydrogen bond field contours show regions where hydrogen bond acceptors (magenta) on the receptor enhance the activity and hydrogen bond donor (cyan) increase the activity.

ผลการศึกษา CoMFA

การศึกษา CoMFA ครั้งนี้ใช้อนุพันธ์ phthalimide จำนวน 21 อนุพันธ์เป็น training set ได้แก่สารหมายเลข 1-21 (ในตารางที่ 3) และอนุพันธ์จำนวน 12 อนุพันธ์ ใช้เป็น test set ได้แก่สารหมายเลข 22-33 การเลือก test set ทำโดยให้อนุพันธ์ใน test set มีโครงสร้างของ ring ที่ไม่ใช่ phthalimide ring ที่หลากหลายและเป็นอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์สูง ปานกลางและต่ำอยู่

CoMFA model ที่ดีที่สุดใช้ default steric, electrostatic field และเพิ่ม physicochemical parameter คือ HOMO energy เป็น descriptor ตารางที่ 4 แสดงค่าทางสถิติที่ได้จาก CoMFA model ที่ดีที่สุดซึ่งมีค่า $q^2 = 0.688$, $r^2 = 0.996$, $S = 1.510$ และ $F = 618.924$ สมการที่ได้จาก CoMFA model นี้ใช้ในการคำนวณค่า % inhibition ของอนุพันธ์ทุกตัวใน training set และ test set รูปที่ 1 เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า % inhibition ที่ได้จากการทดลอง (actual) และที่ได้จากการคำนวณ (predicted) จะเห็นได้ว่าค่า % inhibition ที่ได้จากทั้ง 2 วิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างยิ่ง โดยมีค่า $r^2 = 0.996$, $S = 1.510$ และ $F = 618.924$ สำหรับอนุพันธ์ใน training set และมีค่า $r^2 = 0.988$, $S = 3.158$ และ $F = 796.856$ สำหรับอนุพันธ์ใน test set

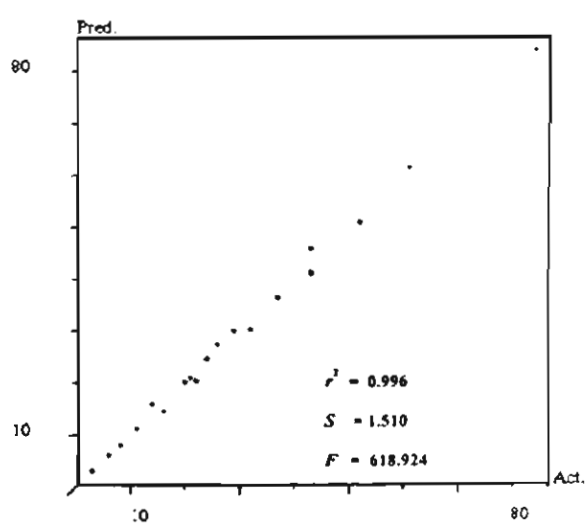
จากผลที่ได้นี้เราสามารถนำสมการที่ได้ในการคำนวณค่า % inhibition ของสารที่ยังไม่ได้สังเคราะห์แต่คาดว่าสารนั้นน่าจะออกฤทธิ์ได้ดี หรือใช้คำนวณค่า % inhibition ของสารที่สังเคราะห์แล้วแต่ยังไม่ได้ทดสอบการออกฤทธิ์จริงในห้องทดลอง

ผลการศึกษา CoMSIA

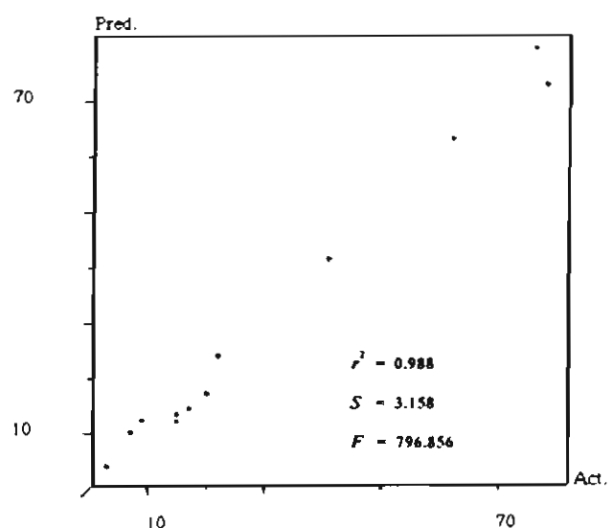
การศึกษา CoMSIA ทำในทำนองเดียวกับการศึกษา CoMFA ตารางที่ 5 สรุปผลทางสถิติที่ได้จากใช้ descriptor ที่แตกต่างกัน CoMSIA model ที่ดีที่สุดใช้ steric, electrostatic, hydrogen bonding และ hydrophobic field เป็น descriptor โดยให้ค่า $q^2 = 0.629$, $r^2 = 0.994$, $S = 1.90$, and $F = 389.280$ สมการที่ได้จาก CoMSIA model นี้ใช้ในการคำนวณค่า % inhibition ของอนุพันธ์ใน training set และ test set รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า % inhibition ที่ได้จากการทดลองและที่ได้จากการคำนวณ พบว่า % inhibition ที่ได้จากทั้ง 2 วิธีมีความสัมพันธ์กัน โดยมีค่า $r^2 = 0.994$, $S = 1.902$ และ $F = 389.280$ สำหรับอนุพันธ์ใน training set และมีค่า $r^2 = 0.993$, $S = 2.386$ และ $F = 1403.426$ สำหรับอนุพันธ์ใน test set

ตารางที่ 4 ผลทางสถิติของ CoMFA (grid space 2.0 Å, column filtering 2 kcal/mol and energy cutoff 40 kcal/mol)

Descriptors	Cross-validation			Non-crossvalidation		
	q^2	SEP	Optimal components	r^2	S	F
steric+electrostatic +HOMO	0.688	13.327	6	0.996	1.510	618.924
Contributions						
	Steric	Electrostatic	HOMO			
	0.343	0.476	0.181			



(a)

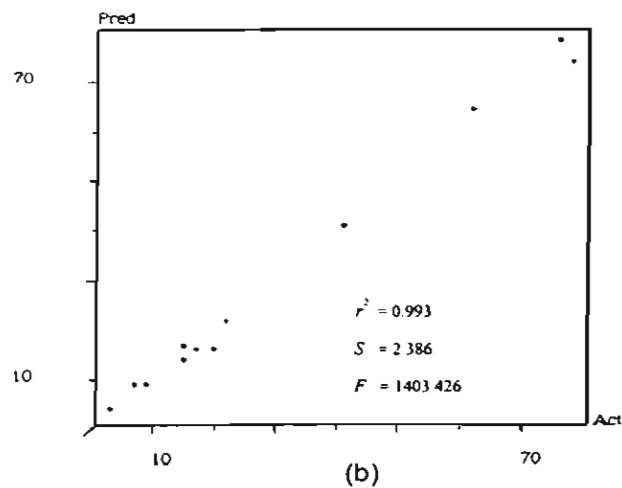
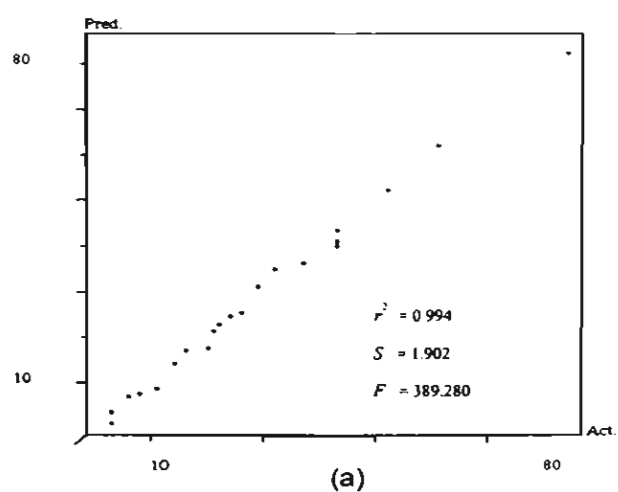


(b)

รูปที่ 1 กราฟ plot ระหว่างค่า % inhibition ที่ได้จากการทดลอง (actual) และค่าที่ได้จากการคำนวณ (predicted) โดย CoMFA QSAR model ของ training set (a) และ test set (b)

ตารางที่ 5 ผลของ CoMSIA

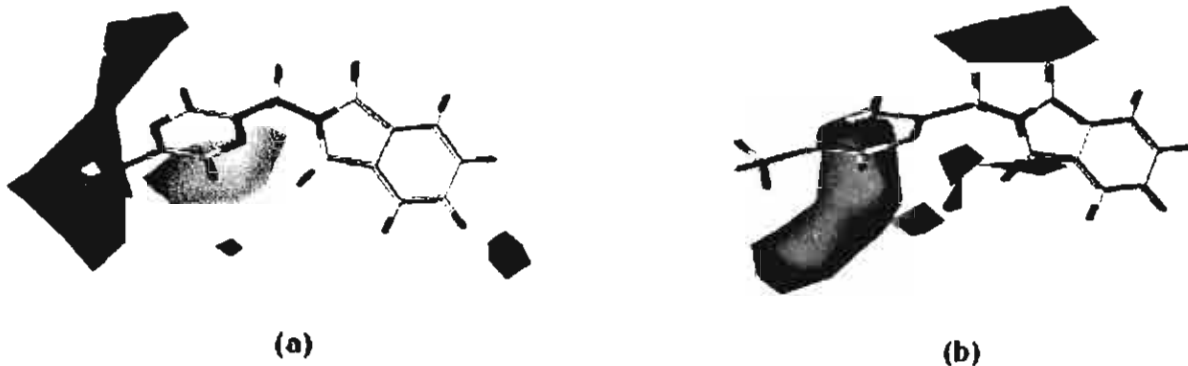
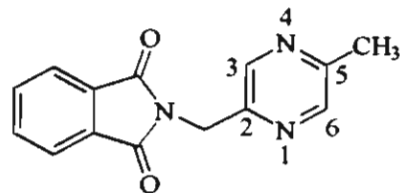
Descriptors	Cross-validation		Non-cross-validation		
	q^2	Optimal components	r^2	S	F
Steric (S)	0.017	2	0.510	15.21	9.368
Electrostatic (E)	0.032	2	0.621	13.38	14.731
Electrostatic+steric	0.027	1	0.437	15.87	14.721
HB acceptor (A)	0.453	4	0.848	8.98	22.304
HB donor (D)	0.007	3	0.343	18.12	2.957
Acceptor + donor	0.433	6	0.860	9.23	14.289
Hydrophobic (H)	0.063	2	0.785	10.07	32.892
S+E+A+D+H	0.616	6	0.985	3.02	152.101
S+E+A+H	0.629	6	0.994	1.90	389.280
Contributions					
Steric	Electrostatic		Hydrophobic	HB Acceptor	
0.094	0.235		0.213	0.458	



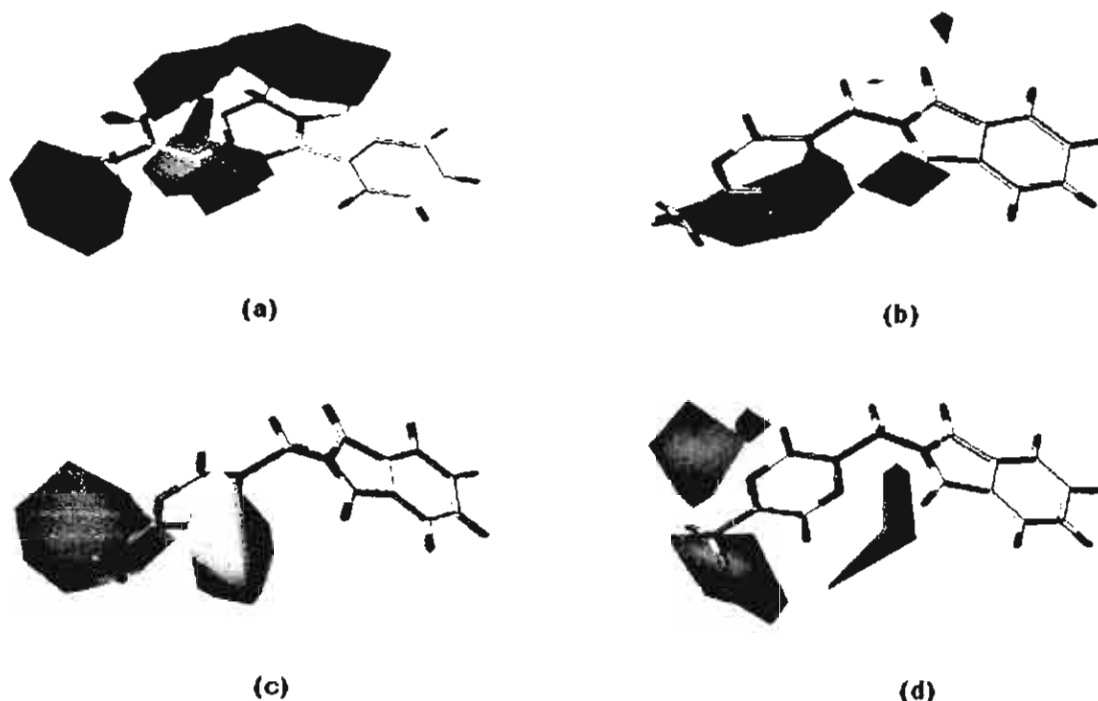
รูปที่ 2 กราฟ plot ระหว่างค่า % inhibition ที่ได้จากการทดลอง (actual) และค่าที่ได้จากการคำนวณ (predicted) โดย CoMSIA QSAR model ของ training set (a) และ test set (b)

รูปที่ 3 และรูปที่ 4 แสดงผลของ contour map ที่ได้จากการศึกษา CoMFA และ CoMSIA ตามลำดับ โดยใช้ อนุพันธ์ 25 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่มีค่า % inhibition สูงสุด (ตารางที่ 3) เป็นตัวอย่างอ้างอิง ในรูปที่ 3 (a) เป็น steric contour map บริเวณสี่เหลี่ยมครอบคลุมตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 5 (บริเวณหมู่ CH_3) ของ pyrazine ring แสดงว่า ในบริเวณดังกล่าวของอนุพันธ์ phthalimide ควรให้มีหมู่ที่มีขนาดใหญ่จะทำให้ activity ดีขึ้น รูปที่ 3 (b) เป็น electrostatic contour map บริเวณสีน้ำเงินที่ตำแหน่งที่ 6 ของ pyrazine ring ควรให้มีหมู่แทนที่ที่มีประจุบวกหรือหมู่แทนที่ที่มี electron density หนาแน่นน้อยจะช่วยเพิ่ม activity ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลของ CoMSIA contour map ในรูปที่ 4 (a) เป็น CoMSIA steric contour map ซึ่งมีบริเวณสี่เหลี่ยมอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกับ CoMFA steric contour map แต่ CoMSIA steric contour map จะมีบริเวณสี่เหลี่ยมเพิ่มเติมที่บริเวณหมู่ CH_2 ซึ่งเชื่อมระหว่าง pyrazine ring และ phthalimide ring รูปที่ 4 (b) เป็น CoMSIA electrostatic contour map ซึ่งมีบริเวณสีน้ำเงินอยู่ในบริเวณเดียวกับ CoMFA electrostatic contour map รูปที่ 4 (c) เป็น CoMSIA hydrophobic contour map มีบริเวณสีเหลืองซึ่งหมายถึงการมีหมู่แทนที่ที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic จะทำให้ activity ดีขึ้น บริเวณสีเหลืองนี้ ครอบคลุมตำแหน่งที่ 3 ของ pyrazine ring ทำนองเดียวกับบริเวณสี่เหลี่ยมของ steric contour map ของทั้ง CoMFA และ CoMSIA รูปที่ 4 (d) เป็น hydrogen bond acceptor contour map บริเวณสีม่วงครอบคลุมตำแหน่งที่ 1 และ ตำแหน่งที่ 4 (เป็นบริเวณของ N) ของ pyrazine แสดงถึงบริเวณที่ควรให้มีหมู่แทนที่ที่เป็น hydrogen bond acceptor จะเพิ่ม activity บริเวณสีแดงที่ตำแหน่งที่ 5 ของ pyrazine เป็นบริเวณที่ไม่ควรมีหมู่แทนที่ที่เป็น hydrogen bond acceptor

ผลการศึกษา CoMFA และ CoMSIA จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและคุณสมบัติแบบ 3 มิติของสารในกลุ่มอนุพันธ์ phthalimide กับฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ผลของการศึกษาดังกล่าวนอกจากจะใช้ในการทำนายฤทธิ์ของสารที่ยังไม่ได้สังเคราะห์หรือสังเคราะห์แล้วแต่ยังไม่ได้ทดสอบฤทธิ์ในห้องทดลอง ยังสามารถใช้ในการออกแบบโครงสร้างของอนุพันธ์ใหม่ๆในกลุ่มเดียวกันซึ่งคาดว่าจะออกฤทธิ์ได้ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 3 CoMFA contour maps: (a) Steric contour map: บริเวณสีเขียวนแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่จะเพิ่ม activity บริเวณสีเหลืองแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่มีขนาดเล็กจะเพิ่ม activity (b) Electrostatic contour map: บริเวณสีน้ำเงินแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่มีประจุบวก (electron density หนาแน่นน้อย) จะเพิ่ม activity บริเวณสีแดงแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่มีประจุลบ (electron density หนาแน่นมาก) จะเพิ่ม activity



รูปที่ 4 CoMSIA contour maps. (a) Steric contour maps. (b) Electrostatic contour maps. (c) Hydrophobic contour map: บริเวณสีเหลืองแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่เป็น hydrophobic จะเพิ่ม activity บริเวณสีขาวแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่เป็น hydrophilic จะเพิ่ม activity (d) Hydrogen bond acceptor contour map: บริเวณสีม่วงแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่เป็น hydrogen bond acceptor จะเพิ่ม activity บริเวณสีแดงแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่เป็น hydrogen bond acceptor จะลด activity

การศึกษาปฏิกิริยาการจับกันระหว่างอนุพันธ์ phthalimide กับเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase โดยวิธี docking

การศึกษาปฏิกิริยาการจับกันระหว่างอนุพันธ์ phthalimide กับเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase โดยวิธี docking ใช้โปรแกรม AutoDock 3.0 ทำใน personal computer โดยศึกษากับอนุพันธ์ phthalimide หมายเลข 1, 11, 25 และ 33 (ในตารางที่ 3) โดยเลือกตาม % inhibition ที่มีค่าปานกลางค่อนข้างต่ำถึงมีค่าสูง โครงสร้าง x-ray crystal ของ HIV-1 reverse transcriptase เป็นโครงสร้างที่เอนไซม์จับกับ nevirapine ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม non-nucleoside การศึกษาครั้งนี้จะใช้ nevirapine เป็นตัวเปรียบเทียบ วิธีการและขั้นตอนในการทำ docking ดังต่อไปนี้

The X-ray crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) binding sites complexed with inhibitor, nevirapine (3HVT) was obtained from the Brookhaven Protein Data Bank (PDB). The docking procedure was performed with version 3.0 of AutoDock program. It combines a rapid energy evaluation through pre-calculated grids of affinity potentials with a variety of search algorithms to find suitable binding positions for a ligand on a given protein. In AutoDock, the protein is required to be rigid, the program allows torsional flexibility in the ligand. Docking study of phthalimide compounds with HIV-RT was carried out using the Lamarckian genetic algorithm, applying a standard protocol, with an initial population of 100 randomly placed individuals, a maximum number of $1.5/10^6$ energy evaluations, a mutation rate of 0.02, a crossover rate of 0.80, and an elitism value of 1. One hundred independent docking runs were carried out for each ligand. Results differing by less than 1.5 Å in positional root mean-square deviation (rmsd) were clustered together and represented by the result with the most favorable free energy of binding.

1. Ligand setup

The structures of the ligands were generated with SYBYL 6.8 and optimized by the MOPAC 6.0 (PM3) interface. Atomic charges were assigned using the Gasteiger-Marsili formalism, which is the type of atomic charges used in calibrating the AutoDock empirical free energy function. Finally the compounds were setup for docking with the help of AutoTors utility, the main purpose of which is to define the torsional degrees of freedom to be considered during the docking process.

2. Protein setup

The structure of the HIV-1 RT catalytic core domain was obtained by X-ray analysis of the complex with nevirapine (PDB 3HVT). The enzyme, subunit A which is the only one monomer in the asymmetric unit where the position of the ligand could be determined was selected. The structure of enzyme was setup as follows: polar hydrogens were added using the PROTONATE utility, solvation parameters were added to the final protein file using ADDSOL utility of AutoDock 3.0.

3. Grid setup

The grid maps representing the protein in the actual docking process were calculated with AutoGrid. The grids (one for each atom type in the ligand, plus one for electrostatic interactions) were

chosen to be sufficiently large to include not only the active site but also significant portions of the surrounding surface. The dimensions of the grids were thus 40 Å x 40 Å x 40 Å, with a spacing of 0.375 Å between the grid points and the center placed at mid point between Tyr181 and Lys103.

ผลการศึกษา Docking

ตารางที่ 6 สรุปผลที่ได้จากการทำ docking 100 run โดยแสดงกลุ่มของ conformation ของสารที่มีค่า binding energy (ΔG_{bind}) ที่ดีที่สุด (มีค่าติดลบมากที่สุด) amino acid ที่แสดงเป็นตัวเข้ม (Lysine) จะเป็น amino acid ที่สามารถเกิด H-bond กับสารได้ในระยะ 1.7-3.8 Å amino acid ในบริเวณ binding site ของเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการจับกับ non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors ได้แก่ Pro95, Leu100, Lys101, Lys103, Val106, Tyr181, Tyr188 และ Trp229 ค่า ΔG_{bind} ของอนุพันธ์ phthalimide มีค่าระหว่าง -7.22 ถึง -8.09 kcal/ ตารางที่ 6 ยังแสดงผลของการทำมุมกันระหว่าง ring ทั้งสองของอนุพันธ์ phthalimide ซึ่งทำมุมกันโดยมีลักษณะเป็น butterfly-like shape ผลดังกล่าวตรงกับ pharmacophore ที่ Schäfer และคณะได้รายงานไว้ โดยมุมระหว่าง phthalimide nucleus และ aromatic ring ของอนุพันธ์หมายเลข 1, 11 และ 25 อยู่ในช่วง 107-110° ซึ่งเหมือนกับของ nevirapine ซึ่งมีมุมระหว่าง pyridine nucleus ทั้งสองเท่ากับ 113° และจากการศึกษาของ Schäfer และคณะพบว่ามุมระหว่าง ring ทั้งสองของสาร TIBO, 2,3-dihydrothiazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-one R-(+) เท่ากับ 108-115° ในกรณีของอนุพันธ์หมายเลข 33 มีมุมระหว่าง phthalimide และ morpholine เท่ากับ 100° ซึ่งไม่อยู่ในช่วงดังกล่าว ทำให้ conformation ของอนุพันธ์หมายเลข 33 มีการจัดวางตัวที่ไม่เหมาะสม จึงอาจเป็นสาเหตุให้อนุพันธ์นี้มีค่า % inhibition ต่ำกว่าอนุพันธ์หมายเลข 11 และ 28 เล็กน้อย

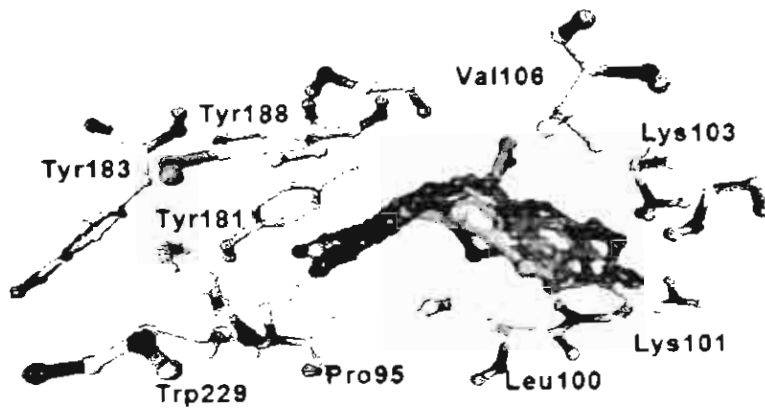
รูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของสารส่วนที่เป็น phthalimide nucleus จะยื่นเข้าไปในส่วนของ hydrophobic pocket ของเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย amino acid Pro95, Tyr181, Tyr183, Tyr188 และ Trp229 และเกิด hydrophobic interaction โดย active conformation (conformation ที่สารใช้จับกับ receptor ได้ดีที่สุด) ของอนุพันธ์ phthalimide จะจัดวางตัวเหมือนกันกับ active conformation ของ nevirapine นอกจากนี้จากการทำ docking เปรียบเทียบ conformation ที่ใช้จับกับเอนไซม์ของอนุพันธ์ซึ่งมีค่า % inhibition ต่างๆ (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้ ณ ที่นี้) พบว่า conformation ของอนุพันธ์ดังกล่าวมีการจัดวางตัวต่างจาก active conformation ของ nevirapine

รูปที่ 6 แสดงถึงการเกิด H-bond ระหว่างสารกับเอนไซม์ ในกรณีของ nevirapine (รูปที่ 6a) จะเห็นได้ว่า pyridine nitrogen จะเกิด H-bond กับ amide nitrogen ของ Lys103 ซึ่งการที่ nevirapine เกิด H-bond กับ Lys103 สามารถอธิบายถึงการที่เชื้อที่เกิด mutation ที่ Lys103 จะดื้อต่อยา nevirapine รูปที่ 6(b) อนุพันธ์หมายเลข 1 จากโครงสร้างไม่มี heteroatom จึงไม่สามารถเกิด H-bonding ได้ ด้วยเหตุนี้จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้อนุพันธ์นี้มีค่า % inhibition ต่ำกว่าอนุพันธ์ 11, 28 และ 33 รูปที่ 6(c) อนุพันธ์หมายเลข 11 มี OH 2 หมู่ ที่สามารถเกิด hydrogen bond กับ amide nitrogen ของ lys103 และหมู่ carbonyl ของ Lys101 รูปที่ 6(d) อนุพันธ์หมายเลข 25 pyrazine nitrogen จะเกิด H-bond กับ amide nitrogen ของ Lys103 เช่นกัน

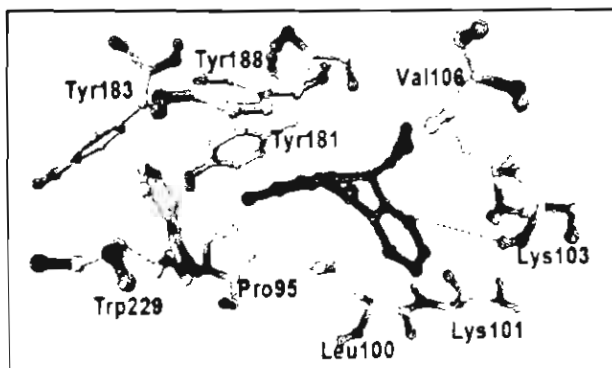
ตารางที่ 6 แสดงผลของ docking 100 independent run สำหรับแต่ละ ligand (สาร) โดย amino acid residue ที่แสดงเป็นตัวเข้มเป็น amino acid ที่สามารถเกิด H-bond กับ ligand

Ligand	^a N_{tot}	^b f_{occ}	^c ΔG_{bind} (kcal/mol)	H-bond distance (Å) with Lys103	Angle of plane (degree)	Contacting residues
Nevirapine	1	100	-8.93	3.804	113.699	Pro95, Leu100, Lys101, Lys103 , Val106, Tyr188, Tyr181, Trp229
1	5	12	-7.22	-	107.233	Pro95, Leu100, Lys101, Lys103, Val106, Tyr188, Tyr181, Trp229
11	6	33	-8.09	2.117, 2.487	109.356	Pro95, Leu100, Lys101 , Lys103 , Val106, Tyr188, Tyr181, Trp229
25	2	22	-7.96	2.590	110.059	Pro95, Leu100, Lys101, Lys103 , Val106, Tyr188, Tyr181, Trp229
33	17	4	-8.04	1.746	100.801	Pro95, Leu100, Lys101, Lys103 , Val106, Tyr188, Tyr181, Trp229

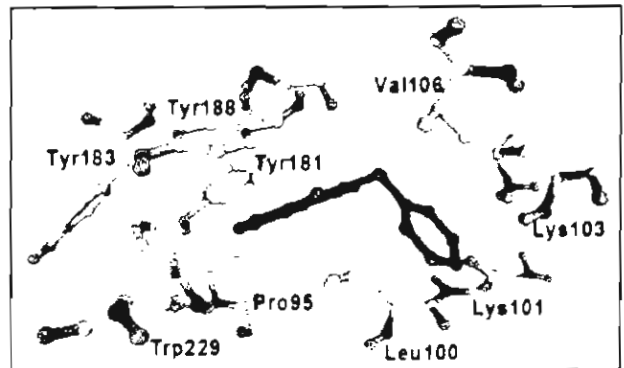
^a N_{tot} is the total number of clusters; ^b f_{occ} is the number of results in the top cluster is given by the frequency of occurrence; ^c ΔG_{bind} is the estimated free energy of binding for the top cluster results and is given in kcal/mol.



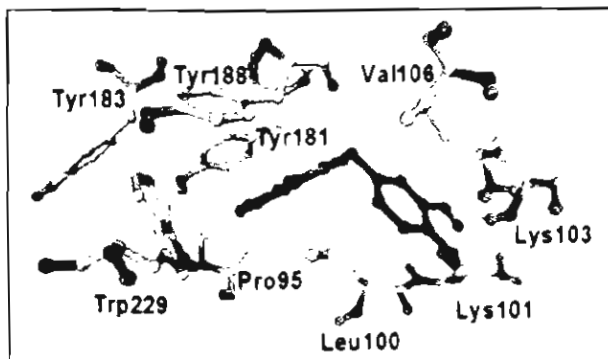
รูปที่ 5 การจัดวางตัวของ nevirapine (สีแดง) เปรียบเทียบกับอนุพันธ์ phthalimide 1, 11, 25 (สีเขียว) โดยจับกับ amino acid residue ที่แสดงในตารางที่ 6



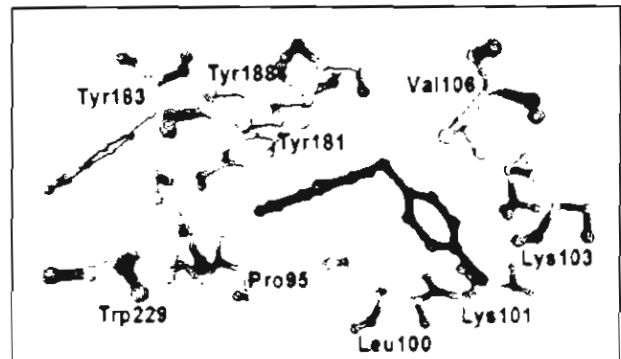
(a)



(b)



(c)



(d)

รูปที่ 6 การเกิด H-bond ระหว่างอนุพันธ์ phthalimide กับ binding site ของเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase (a) nevirapine (b) อนุพันธ์หมายเลข 1 (c) อนุพันธ์หมายเลข 11 และ (d) อนุพันธ์หมายเลข 25

สรุปผลงานวิจัย

โครงการวิจัยได้สังเคราะห์สารประกอบในกลุ่ม non-nucleoside ซึ่งมีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ phthalimide โครงสร้างของสารประกอบด้วยหมู่ phthalimide เชื่อมกับหมู่ aromatic ด้วย methylene linkage และทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ในหลอดทดลอง พบว่าอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์สูงสุด 3 ลำดับแรกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 60.90, 98.10 และ 120.75 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ายา delavirdine ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 502.22 $\mu\text{g/mL}$ จากนั้นนำโครงสร้างและ % inhibition ที่ได้จากการทดลองไปศึกษา 3D QSAR โดยวิธี CoMFA และ CoMSIA ผลที่ได้จากการศึกษาดังกล่าวใช้คำนวณหาค่า % inhibition ของสารในกลุ่มอนุพันธ์เดียวกันนี้ที่ยังไม่ได้สังเคราะห์หรือสารที่สังเคราะห์แล้วแต่ยังไม่ได้ทดสอบฤทธิ์ นอกจากนี้ผลที่ได้จากการศึกษา CoMFA และ CoMSIA ยังใช้ในการออกแบบอนุพันธ์ใหม่ๆที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ดีขึ้น ผลจากการทำ docking แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ phthalimide ที่สังเคราะห์ขึ้นมี active conformation เหมือนกับ nevirapine และปฏิกิริยาการจับกับเอนไซม์เป็นไปในทำนองเดียวกับ nevirapine จากผลดังกล่าวการดำเนินงานวิจัยที่จะทำต่อไปคือทำการสังเคราะห์สารตามผลที่ได้และทดสอบฤทธิ์จริงในห้องทดลอง เพื่อเป็นการประเมินว่าผลที่ได้จากการศึกษา 3D QSAR จะถูกต้องตรงกันหรือไม่

6. Output ที่ได้จากโครงการ

งานวิจัยชิ้นนี้จะส่งตีพิมพ์ในวารสารโดยมี

ชื่อเรื่อง	Design, Synthesis, Biological Evaluation and Structure-Activity Relationship of Phthalimide Derivatives as HIV-1 Transcriptase Inhibitors
ชื่อผู้แต่ง	Ungwitayatorn J, Wiwat C, Phosrithong N and Piyaviriyakul S.
ชื่อวารสาร	Journal of Pharmacy and Pharmacology ค่า impact factor 1.288
หรือ	Journal of Molecular Structure ค่า impact factor 1.122
