

(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-dihydro-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 desiccator 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

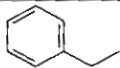
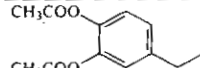
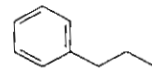
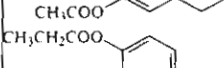
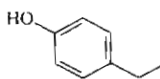
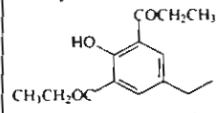
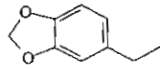
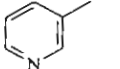
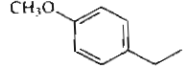
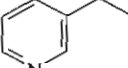
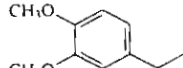
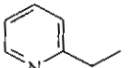
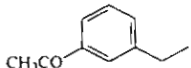
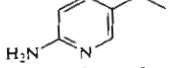
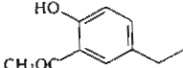
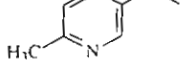
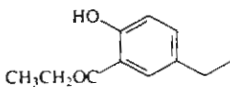
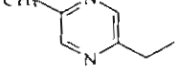
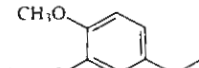
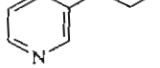
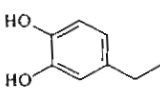
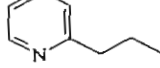
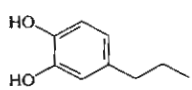
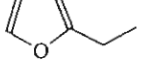
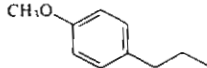
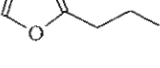
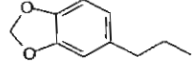
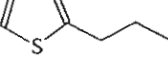
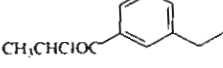
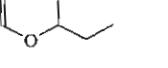
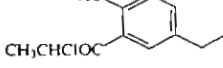
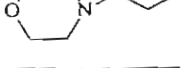
complete system - RT = reaction mixture which consisted of template-primer, substrate, and other reagents.

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

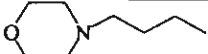
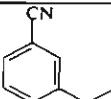
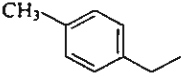
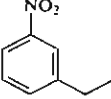
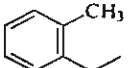
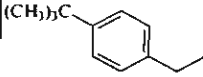
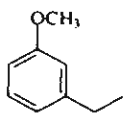
All experiments were performed in triplicate. The average of the 2 closely data values obtained from the experiment was used to calculate % IR (% inhibition).

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 ($IC_{50} = 120.75$ $\mu\text{g/mL}$)
10		26	26		20
11		76 ($IC_{50} = 60.90$ $\mu\text{g/mL}$)	27		15
12		3	28		32
13		21	29		78 ($IC_{50} = 98.10$ $\mu\text{g/mL}$)
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 ชนิดอื่นๆนอกเหนือจาก 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

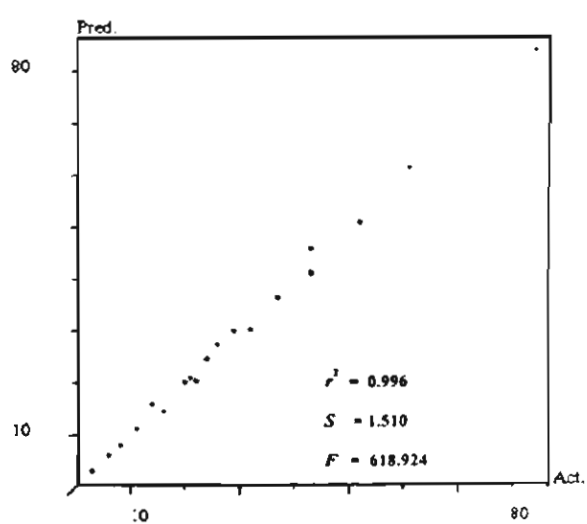
จากผลที่ได้นี้เราสามารถนำสมการที่ได้ในการคำนวณค่า % inhibition ของสารที่ยังไม่ได้สังเคราะห์แต่คาดว่าสารนั้นน่าจะออกฤทธิ์ได้ดี หรือใช้คำนวณค่า % inhibition ของสารที่สังเคราะห์แล้วแต่ยังไม่ได้ทดสอบการออกฤทธิ์จริงในห้องทดลอง

ผลการศึกษา CoMSIA

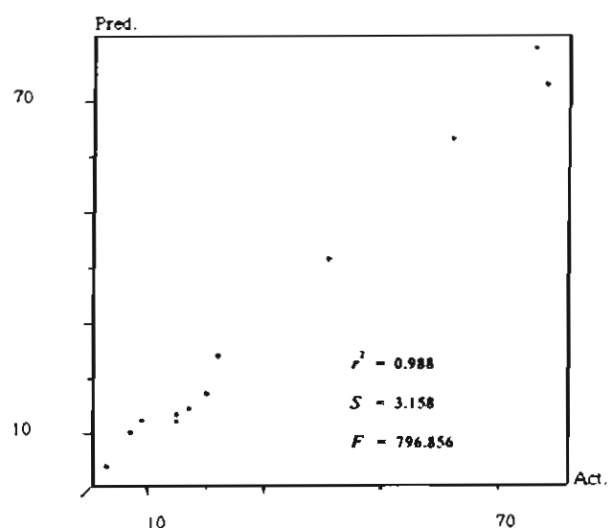
การศึกษา CoMSIA ทำในทำนองเดียวกับการศึกษา CoMFA ตารางที่ 5 สรุปผลทางสถิติที่ได้จากใช้ descriptor ที่แตกต่างกัน CoMSIA model ที่ดีที่สุดใช้ steric, electrostatic, hydrogen bonding และ hydrophobic field เป็น descriptor โดยให้ค่า $q^2 = 0.629$, $r^2 = 0.994$, $S = 1.90$, and $F = 389.280$ สมการที่ได้จาก 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)

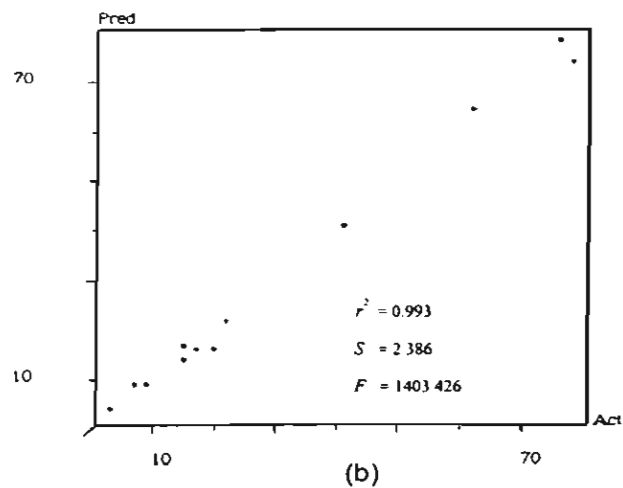
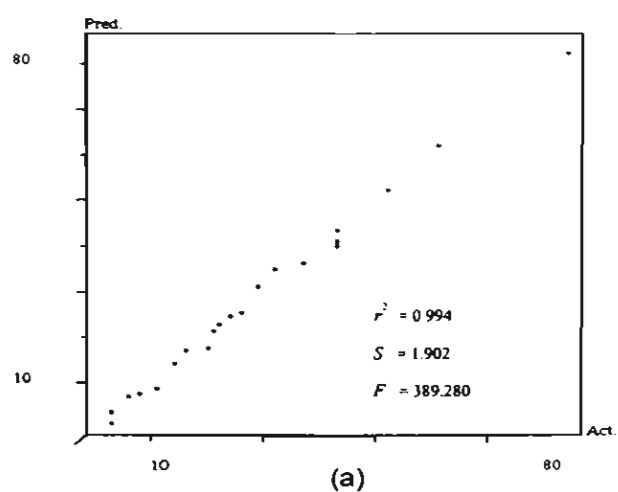


(b)

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

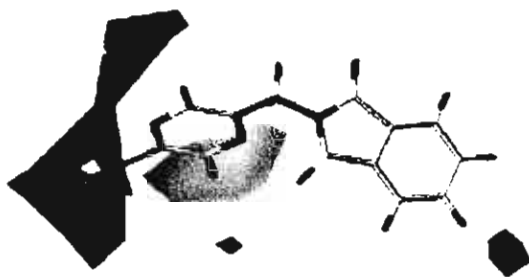
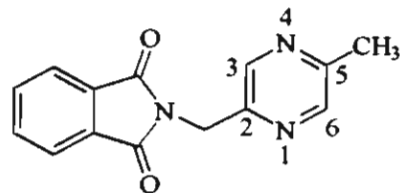
Descriptors	Cross-validation		Non-cross-validation		
	q^2	Optimal components	r^2	S	F
Steric (S)	0.017	2	0.510	15.21	9.368
Electrostatic (E)	0.032	2	0.621	13.38	14.731
Electrostatic+steric	0.027	1	0.437	15.87	14.721
HB acceptor (A)	0.453	4	0.848	8.98	22.304
HB donor (D)	0.007	3	0.343	18.12	2.957
Acceptor + 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



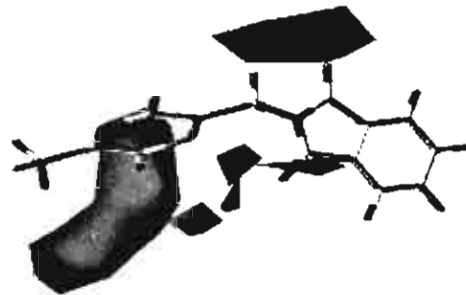
รูปที่ 2 กราฟ plot ระหว่างค่า % inhibition ที่ได้จากการทดลอง (actual) และค่าที่ได้จากการคำนวณ (predicted) โดย CoMSIA QSAR model ของ training set (a) และ test set (b)

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 ควรจะมีหมู่ที่มีขนาดใหญ่จะทำให้ activity ดีขึ้น รูปที่ 3 (b) เป็น electrostatic contour map บริเวณสีน้ำเงินที่ตำแหน่งที่ 6 ของ pyrazine ring ควรจะมีหมู่แทนที่ที่มีประจุบวกหรือหมู่แทนที่ที่มี 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 แสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่เป็น 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

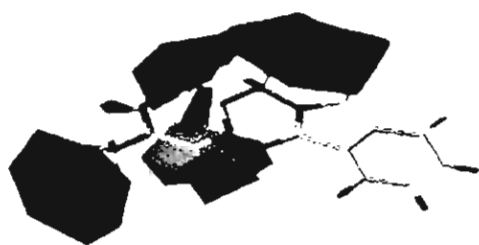


(a)

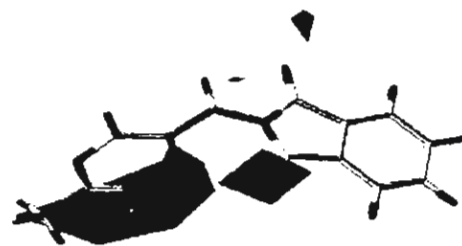


(b)

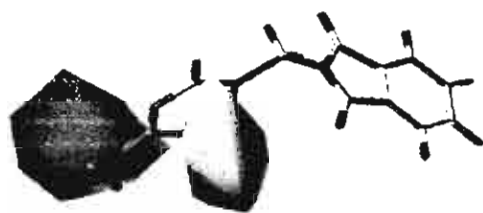
รูปที่ 3 CoMFA contour maps: (a) Steric contour map: บริเวณสีเขียวยแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่จะเพิ่ม activity บริเวณสีเหลืองแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่มีขนาดเล็กจะเพิ่ม activity (b) Electrostatic contour map: บริเวณสีน้ำเงินแสดงถึงบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ที่มีประจุบวก (electron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



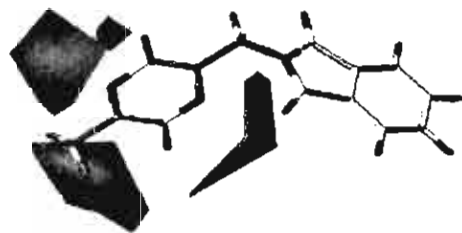
(a)



(b)



(c)



(d)

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

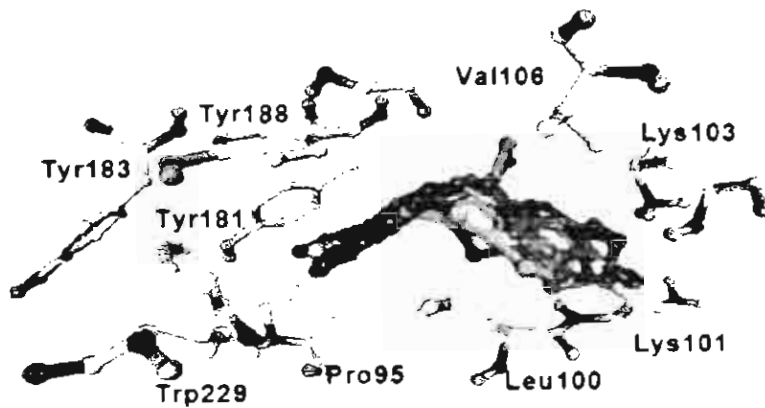
รูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของสารส่วนที่เป็น phthalimide nucleus จะยื่นเข้าไปในส่วนของ hydrophobic pocket ของเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย amino acid Pro95, Tyr181, Tyr183, Tyr188 และ Trp229 และเกิด hydrophobic interaction โดย active conformation (conformation ที่สารใช้จับกับ receptor ได้ดีที่สุด) ของอนุพันธ์ 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

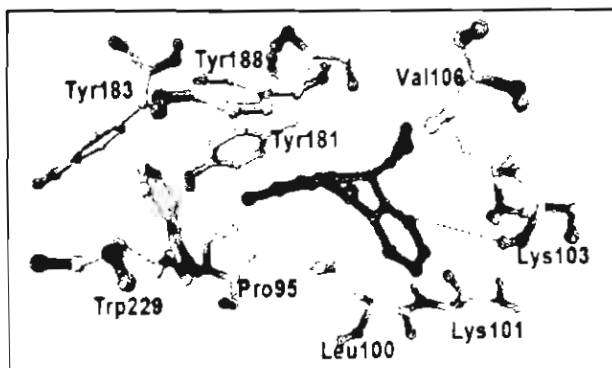
ตารางที่ 6 แสดงผลของ docking 100 independent run สำหรับแต่ละ ligand (สาร) โดย amino acid residue ที่แสดงเป็นตัวเข้มเป็น amino acid ที่สามารถเกิด H-bond กับ ligand

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

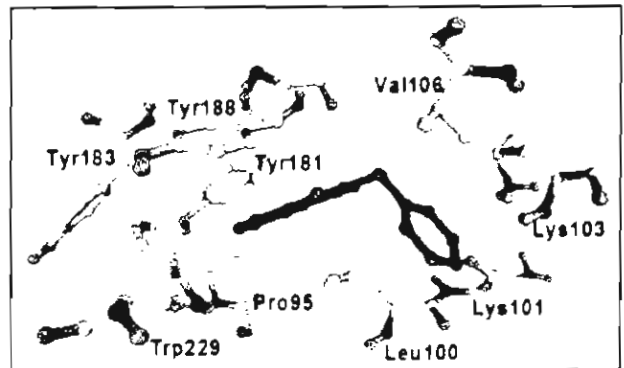
^a N_{tot} is the total number of clusters; ^b f_{occ} is the number of results in the top cluster is given by the frequency of occurrence; ^c ΔG_{bind} is the estimated free energy of binding for the top cluster results and is given in kcal/mol.



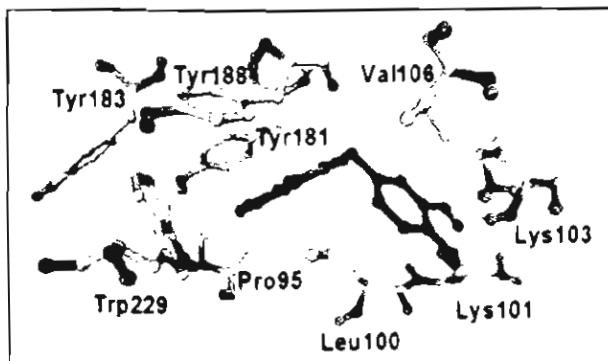
รูปที่ 5 การจัดวางตัวของ nevirapine (สีแดง) เปรียบเทียบกับอนุพันธ์ phthalimide 1, 11, 25 (สีเขียว) โดยจับกับ amino acid residue ที่แสดงในตารางที่ 6



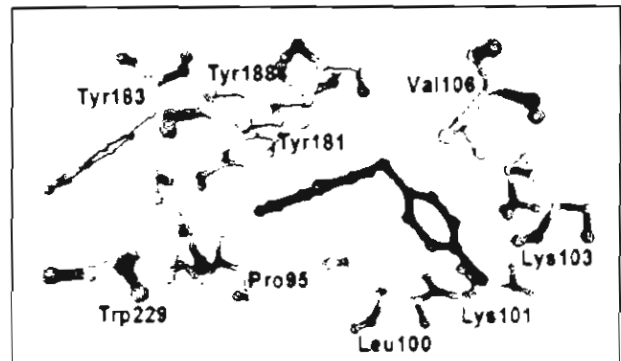
(a)



(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
