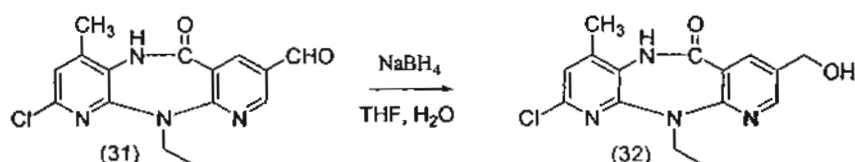


2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-hydroxymethyl-4-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (32)



นำสาร 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-formyl-4-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (31) (130 มิลลิกรัม, 0.41 มิลลิโมล) ละลายใน tetrahydrofuran (3 มิลลิลิตร) เติมน้ำ (2 หยด) คนสารละลายให้เข้ากัน เติมน sodium borohydride (15.5 มิลลิกรัม, 0.41 มิลลิโมล) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น แล้วระเหยเอา tetrahydrofuran ออก จะเหลือตะกอนขาวซึ่งไม่ค่อยละลายใน dichloromethane กรองตะกอนขาว ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น ทำให้แห้ง จะได้ผลผลิตหยาบของ 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-hydroxymethyl-4-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (16) ส่วนของ filtrate นำมาสกัดด้วย dichloromethane หลายๆครั้ง ล้างส่วยสกัดด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous sodium sulphate กรอง ระเหยตัวทำละลายออก ได้ผลผลิตหยาบของแข็งสีขาวทั้งหมดของ 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-hydroxymethyl-4-methyl-6*H*-dipyrido [3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (32) (130 มิลลิกรัม, 99%) จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 259-260 องศาเซลเซียส

FTIR (KBr), $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 3352 (O-H), 3191 (H-N-CO), 1651 (C=O), 1594 (C=N), 1477 (C=C), 1386 (C-N), 1228 (C=C-H), 1044 (C-O)

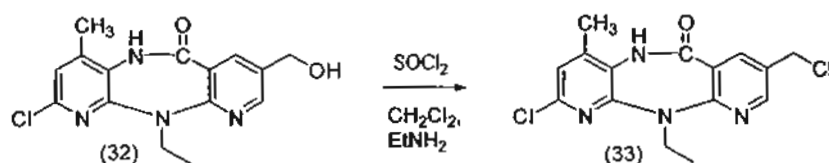
^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ : 10.01 (s, 1H, HN-C=O), 8.39 (d, $J=2.2$ Hz, 1H; H-9), 7.97 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-7), 7.19 (s, 1H, H-3), 5.33 (t, $J=5.86$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 4.48 (d, $J=5.86$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.99 (q, $J=7.3$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 2.33 (s, 1H, CH_3), 1.14 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, CH_2CH_3)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): 166.9, 157.4, 153.0, 149.4, 144.7, 143.0, 138.7, 133.3, 124.6, 121.2, 120.7, 59.7, 41.0, 17.5, 14.0 ppm

MS (EI), m/z (relative intensity): 318 (M^+ , 100), 303 (45), 290 (88), 275 (20), 261 (9)

HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 319.0956; found: 319.0955

2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-chloromethyl-4-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4] diazepin-6-one (33)



นำสาร 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-hydroxymethyl-4-methyl-6*H*-dipyrido [3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (32) (110 มิลลิกรัม, 0.35 มิลลิโมล) ละลายใน dichloromethane (30 มิลลิลิตร) เติม thionyl chloride (0.2 มิลลิลิตร, 2.74 มิลลิโมล) ตามด้วย triethylamine (0.5 มิลลิลิตร, 3.6 มิลลิโมล) คนสารละลายให้เข้ากันจนเป็นสารละลายใส เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ เติมน้ำกลั่นและสารละลายอิ่มตัวของ sodium hydrogencarbonate ในน้ำ สกักด้วย dichloromethane ล้างส่วนสกักด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous sodium sulphate กรอง ระเหยตัวทำละลายออก ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ขนาดด้วย 15% ethyl acetate/hexane จะได้ของแข็งสีขาวของ 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-chloromethyl-4-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (33) (85.7 มิลลิกรัม, 74%) จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 229-230 องศาเซลเซียส

FTIR (KBr), $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 3180 (H-N-CO), 2970 (C-H aliphatic), 1651 (C=O), 1603 (C=N), 1465 (C=C), 1382 (C-N), 1284 (C=C-H), 707 (C-Cl)

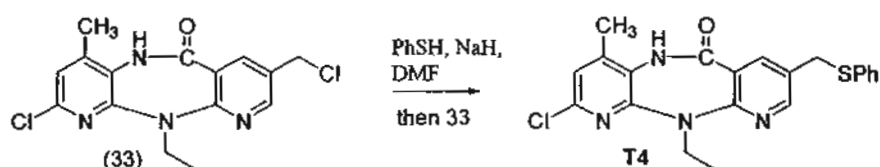
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 8.57 (br s, 1H, HN-C=O), 8.45 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-9), 8.14 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-7), 6.96 (s, 1H, H-3), 4.56 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Cl}$), 4.19 (q, $J=7.3$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 2.39 (s, 3H, CH_3), 1.24 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, CH_2CH_3)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): 168.2, 159.2, 152.4, 151.6, 145.2, 142.4, 141.0, 128.4, 123.9, 121.5, 120.1, 42.3, 42.1, 17.8, 13.7 ppm

MS (EI), m/z (relative intensity): 336 (M^+ , 79), 321 (56), 308 (75), 301 (38), 293 (19), 273 (100), 258 (15), 245 (18)

HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{OCl}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 337.0617; found: 337.0624

2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-4-methyl-8-(phenylthio)-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (T4)



นำ thiophenol (0.06 มิลลิลิตร, 0.58 มิลลิโมล) ละลายใน *N,N*-dimethylformamide (2 มิลลิลิตร) ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เติมนีออนไฮไดรด์ (37 มิลลิกรัม, 0.91 มิลลิโมล) ลงไป คนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำละลายของสาร 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-chloromethyl-4-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (33) (60 มิลลิกรัม, 0.18 มิลลิโมล) ใน *N,N*-dimethylformamide (3 มิลลิลิตร) คนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นสกัดด้วย dichloromethane ล้างส่วนสกัดด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติมน้ำ anhydrous sodium sulphate กรอง ระเหยตัวทำละลายออก ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 15% ethylacetate/hexane จะได้ของแข็งสีขาวของ 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-4-methyl-8-(phenylthio)-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (T4) (45 มิลลิกรัม, 62%) จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 166-167 องศาเซลเซียส

FTIR (KBr), $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 3174 (H-N-CO), 2965 (C-H aliphatic), 1651 (C=O), 1593 (C=N), 1461 (C=C), 1378 (C-N), 1231 (C=C-H), 737 (C-S), 689 (C-Cl)

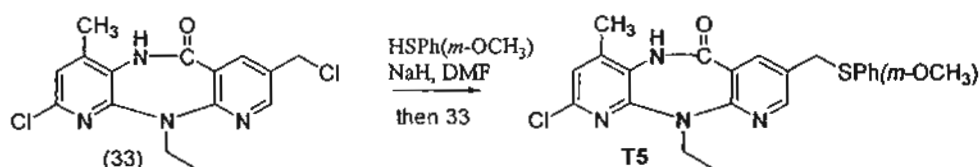
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 8.60 (br s, 1H, H-N-C=O), 8.27 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-9), 8.05 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-7), 7.31-7.19 (m, 5H, phenyl), 6.93 (s, 1H, H-3), 4.14 (q, $J=7.3$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.05 (s, 2H, CH_2S), 2.37 (s, 3H, CH_3), 1.21 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, CH_2CH_3)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): 168.5, 158.3, 152.6, 151.6, 145.0, 142.3, 140.9, 135.0, 130.5(2C), 129.1(2C), 128.6, 127.0, 124.0, 121.3, 120.1, 42.0, 35.6, 17.8, 13.6 ppm

MS (EI), m/z (relative intensity): 410 (M^+ , 10), 301 (100), 273 (30), 245 (6)

HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{OSCl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 411.1041; found: 411.1039

2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-4-methyl-8-(3-methoxyphenylthio)-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*] [1,4]diazepin-6-one (T5)



นำ 3-methoxythiophenol (0.18 มิลลิลิตร, 1.49 มิลลิโมล) ละลายใน *N,N*-dimethylformamide (3 มิลลิลิตร) ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เติมน sodium hydride (37 มิลลิกรัม, 2.36 มิลลิโมล) ลงไป คนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมนสารละลายของสาร 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-chloromethyl-4-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (33) (155 มิลลิกรัม, 0.46 มิลลิโมล) ใน *N,N*-dimethylformamide (6 มิลลิลิตร) คนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น สกัดด้วย dichloromethane ล้างส่วนสกัดด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติมน anhydrous sodium sulphate กรอง ระเหยตัวทำละลายออก ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ขนาด 20-30% ethyl acetate/hexane จะได้ของแข็งสีขาวของ 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-4-methyl-8-(3-methoxyphenylthio)-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (T5) (165 มิลลิกรัม, 81%) จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 176-177 องศาเซลเซียส

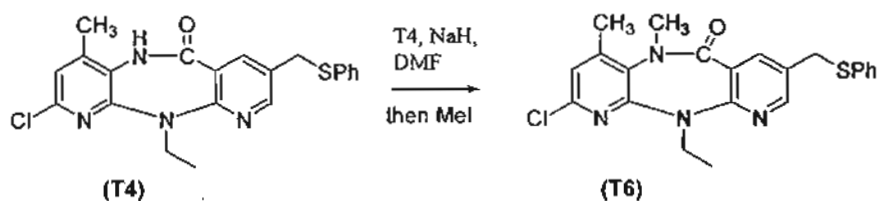
FTIR (KBr), $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 3187 (H-N-CO), 1661 (C=O), 1591 (C=C), 1571 (C=C), 1461, 1385 (C-N), 1235 (C=C-H), 765 (C-S), 684 (C-Cl)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 8.29 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-9), 8.25 (br s, 1H, HN-C=O), 8.05 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-7), 7.18 (dd, $J=8.1, 8.1$ Hz, 1H, H-5 of $\text{Ph}(m\text{-OCH}_3)$), 6.94 (s, 1H, H-3), 6.90-6.71 (m, 3H of $\text{Ph}(m\text{-OCH}_3)$), 4.14 (q, $J=7.3$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.05 (s, 2H, CH_2S), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 2.35 (s, 3H, CH_3), 1.21 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, CH_2CH_3)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): 168.5, 159.9, 158.2, 152.6, 151.3, 145.0, 142.6, 141.0, 136.2, 129.9, 128.6, 124.0, 122.4, 121.3, 120.2, 115.7, 112.9, 55.2, 42.1, 35.3, 17.8, 13.6 ppm

HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 441.1147; found: 441.1143

2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-4-methyl-8-(phenylthio)-methyl-5-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (T6)



นำสาร 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-4-methyl-8-(phenylthio)-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (T4) (118 มิลลิกรัม, 0.29 มิลลิโมล) ละลายใน *N,N*-dimethylformamide (2 มิลลิลิตร) ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เติมนีโคตริลไฮไดรด์ (17.3 มิลลิกรัม, 0.43 มิลลิโมล) ลงไป คนของผสมที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้ของผสมเย็นลงที่อุณหภูมิต่ำ เติมนีโคตริล (0.05 มิลลิลิตร, 0.80 มิลลิโมล) คนของผสมที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่น สกัดด้วย ethyl acetate ล้างส่วนสกัดด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติมนีโคตริล sodium sulphate กรอง ระเหยตัวทำละลายออก ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ขนาด 20% ethyl acetate/hexane จะได้ของแข็งขาวของ 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-4-methyl-8-(phenylthio)-methyl-5-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (T6) (106 มิลลิกรัม, 87%)

FTIR (KBr), $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 2970 (C-H aliphatic), 1645 (C=O), 1583 (C=N), 1452 (C=C), 1343 (C-N), 1247 (C=C-H), 733 (C-S), 690 (C-Cl)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 8.21 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-9), 7.99 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-7), 7.30-7.21 (m, 5H, phenyl), 6.96 (s, 1H, H-3), 4.14 (q, $J=7.3$ Hz, 1H, CH_2CH_3), 4.12 (q, $J=7.3$ Hz, 1H, CH_2CH_3), 4.05 (s, 2H, CH_2S), 3.32 (s, 3H, N-CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.24 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, CH_2CH_3)

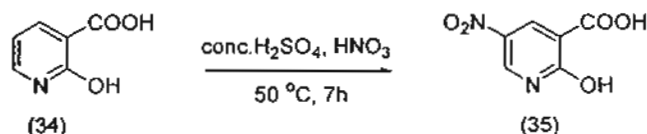
^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): 168.1, 158.7, 156.8, 150.0, 146.4, 145.8, 140.8, 135.1, 130.5(2C), 129.0(2C), 128.8, 128.5, 127.0, 122.0, 121.6, 41.2, 38.2, 35.7, 19.0, 13.5 ppm

MS (EI), m/z (relative intensity): 425 (M^+ , 3), 349 (21), 269 (100), 227 (30)

HRMS (APCI-TOF) calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{OSCl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 425.1197; found: 425.1192

การสังเคราะห์ T8-T9

2-Hydroxy-5-nitronicotinic acid (35)



นำสาร 2-hydroxynicotinic acid (34) (3 กรัม, 21.6 มิลลิโมล) ละลายด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (24 มิลลิลิตร) ให้เป็นสารละลายใส เติมกรดไนตริก 69% (3 มิลลิลิตร) คนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ทิ้งให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เทลงในน้ำแข็ง กรองตะกอนสีเหลืองอ่อนที่เกิดขึ้น ล้างตะกอนด้วยน้ำเย็น แล้วทำให้แห้ง จะได้ตะกอนสีเหลืองอ่อนของ 2-hydroxy-5-nitronicotinic acid (35) (3.13 กรัม, 79%) ซึ่งจะใช้ในขั้นตอนต่อไปได้; m.p. 241-242 °C.

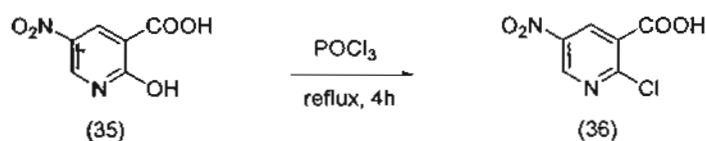
FTIR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3027 (O-H), 2872 (O-H), 1717 (C=O), 1624 (C=N), 1572 (C=C), 1466 and 1356 (NO_2), 1147 (C-O), 896 (C-OH), 653 (O-C=O), 599 (NO_2), 509 (C-C=O)

^1H NMR (acetone- d_6 , 200 MHz) δ : 9.16 (d, $J=2.9$ Hz, 1H, H-6), 9.00 (d, $J=2.9$, 1H, H-4)

^{13}C NMR (acetone- d_6 , 50 MHz): 165.7, 163.7, 142.1, 140.2, 133.4, 118.3 ppm $^{\bullet}$

MS (EI), m/z (relative intensity): 184 (M^+ , 50), 140 (100), 127 (31), 108 (24), 94 (75)

2-Chloro-5-nitronicotinic acid (36)



นำสาร 2-hydroxy-5-nitronicotinic acid (35) (2 กรัม, 10.87 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลม เติม phosphorus oxychloride (6 มิลลิลิตร, 64.36 มิลลิโมล) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทิ้งให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ค่อยๆหยดสารละลายลงในน้ำกลั่นพร้อมกับคนของผสมไปด้วยโดยให้อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส โดยเติมน้ำแข็งเล็กน้อย จากนั้นคนของผสมที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 1 คืน จากนั้นสกัดด้วย diethyl ether ล้างชั้น ether ด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม

anhydrous sodium sulphate กรอง และระเหยตัวทำละลายออก จะได้ของแข็งสีเหลืองนวลของ 2-chloro-5-nitronicotinic acid (36) (1.72 กรัม, 78%); m.p. 140-141 °C.

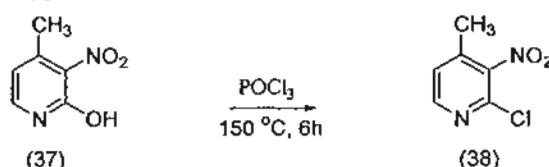
FTIR (KBr), $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 2909 (O-H), 1718 (C=O), 1609 (C=C), 1575 (C=N), 1415 and 1358 (NO_2), 1273, 1240, 1135 (C-O), 732 (C-Cl)

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 200 MHz) δ : 9.32 (d, $J=2.9$ Hz, 1H, H-6), 8.85 (d, $J=2.9$, 1H, H-4)

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 50 MHz): 163.9, 152.8, 146.5, 143.3, 134.9, 128.3 ppm

MS (EI), m/z (relative intensity): 202 (M^+ , 100), 174 (53), 156 (74), 100 (65), 76 (67)

2-Chloro-4-methyl-3-nitropyridine (38)



นำสาร 2-hydroxy-4-methyl-3-nitropyridine (37) (600 มิลลิกรัม, 3.90 มิลลิโมล) ใส่ในขวด vial เติม phosphorus oxychloride (2 มิลลิลิตร, 21.4 มิลลิโมล) ปิดด้วยฝาเกลียวที่แน่นสนิท ให้ความร้อนที่ 150 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิ oil bath) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทิ้งให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายลงในบีกเกอร์บรรจุน้ำแข็ง คนของผสมต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองตะกอนที่เกิดขึ้น ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น จากนั้นละลายตะกอนด้วย dichloromethane ล้างด้วยสารละลาย sodium hydrogen carbonate อิมัตวในน้ำ นำชั้น dichloromethane มาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous sodium sulphate กรอง และระเหยตัวทำละลายออก นำส่วนที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยให้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ะด้วย 15%ethyl acetate/hexane จะได้ของแข็งสีเหลืองนวลของ 2-chloro-4-methyl-3-nitropyridine (38) (570 มิลลิกรัม, 85%) จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 51-52 องศาเซลเซียส

FTIR (KBr), $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 1590 (C=C), 1526 (C=N), 1359 (NO_2), 854 (C-N), 838 (C-Cl)

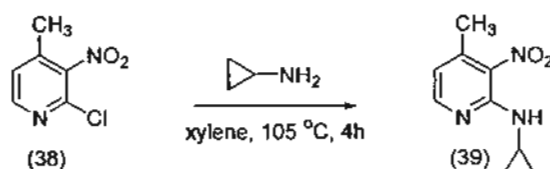
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 8.39 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-6), 7.25 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-5), 2.40 (s, 3H, CH_3)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): 149.8 (2C), 142.0, 141.8, 125.1 (2C), 17.1 ppm

MS (EI), m/z (relative intensity): 173 (M^+ , 100), 156 (30), 128 (6)

HRMS (APCI-TOF) calcd. for $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 173.0112; found: 173.0113

2-(Cyclopropylamino)-4-methyl-3-nitropyridine (39)



นำสาร 2-chloro-4-methyl-3-nitropyridine (38) (550 มิลลิกรัม, 3.2 มิลลิโมล) ละลายด้วย xylene (1 ml) ใส่ในขวด vial เติม cyclopropylamine (0.9 มิลลิลิตร, 12.8 มิลลิโมล) ปิดฝาขวดให้แน่นสนิท ให้ความร้อนที่ 105 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิ oil bath) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทิ้งให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เทลงในน้ำกลั่น สกัดด้วย dichloromethane ล้างชั้น dichloromethane ด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous sodium sulphate กรอง และระเหยตัวทำละลายออก นำส่วนที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ะด้วย 10% ethyl acetate/hexane จะได้ของเหลวสีเหลืองส้มของ 2-cyclopropylamino-4-methyl-3-nitropyridine (39) (610 มิลลิกรัม, 99%)

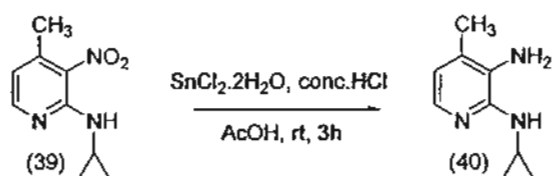
FTIR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3404 (N-H), 1596 (C=C), 1558 (C=N), 1359 (NO_2), 861 (C-N)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 8.23 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-6), 7.51 (br s, 1H, NH), 6.54 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-5), 3.00-2.88 (m, 1H, CH-cyclopropyl), 2.53 (s, 3H, CH_3), 0.95-0.85 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl), 0.62-0.54 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): 153.6, 152.2, 146.0, 131.0, 116.3, 24.4, 21.4, 7.3 (2C) ppm

MS (EI), m/z (relative intensity): 194 ($(\text{M}+\text{H})^+$, 100), 176 (76), 146 (60), 131 (20)

3-Amino-2-cyclopropylamino-4-methylpyridine (40)



นำสาร 2-cyclopropylamino-4-methyl-3-nitropyridine (39) (686 มิลลิกรัม, 3.55 มิลลิโมล) บรรจุลงในขวดกันกลม เติม acetic acid (7.4 มิลลิลิตร) คนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน แช่ของผสมลงใน

ในอ่างน้ำแข็ง เตรียมสารละลายของ $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.68 กรัม, 11.9 มิลลิโมล) ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (2.2 มิลลิลิตร) ค่อยๆเติมสารละลายของ $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ในกรด ลงในสารละลายของสารตั้งต้นที่ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นคนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแช่ของผสมลงในอ่างน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่น คนของผสมต่ออีกสักพัก จะเกิดตะกอนสีขาว ค่อยๆเติมสารละลาย 50% sodium hydroxide ในน้ำลงไปจนตะกอนละลายหมด (pH ประมาณ 11-12) สกัดของผสมด้วย dichloromethane นำส่วนที่สกัดได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำชั้น dichloromethane มาทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous sodium sulphate ลงไป กรอง และระเหยตัวทำละลายออก จะได้ผลผลิตหยาบของ 3-amino-2-cyclopropylamino-4-methyl pyridine (40) (481 มิลลิกรัม, 83%) ซึ่งสามารถนำไปใช้ในขั้นต่อไปได้ (m.p.148-150°C, K.G.Grozinger *et al.*, 2000)

FTIR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3334 (N-H), 1655 (NH_2), 1609 (C=C), 1558 (C=N), 1516, 1424, 1365, 1235 (C-N), 1019, 805 (CH)

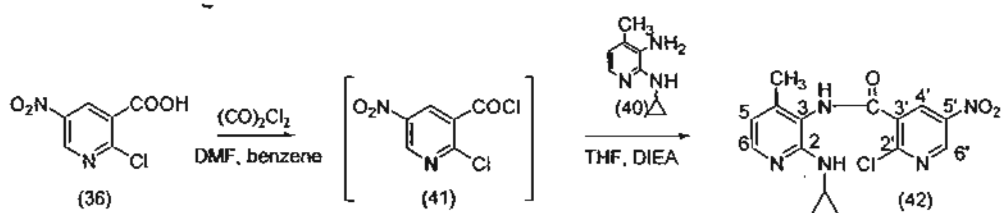
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 7.72 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-6), 6.49 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-5), 4.63 (br s, 1H, NH), 3.19 (br s, 2H, NH_2), 2.84-2.77 (m, 1H, CH-cyclopropyl), 2.15 (s, 3H, CH_3), 0.84-0.75 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl), 0.53-0.46 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): 150.1, 138.0, 129.6, 127.0, 116.6, 24.5, 16.6, 7.1 (2C) ppm

MS (EI), m/z (relative intensity): 164 ($(\text{M}+\text{H})^+$, 100), 148 (66), 134 (20), 80 (22)

HRMS (APCI-TOF) calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 164.1182; found: 164.1182.

N-(2-cyclopropylamino-4-methyl-3-pyridinyl)-2-chloro-5-nitro-3-pyridinecarbox amide (42)



เตรียม acid chloride (41) โดยนำ 2-chloro-5-nitronicotinic acid (36) (250 มิลลิกรัม, 1.23 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลม เติมน้ำ benzene (5 มิลลิลิตร) คนของผสมที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม oxalyl chloride (0.3 มิลลิลิตร, 3.90 มิลลิโมล) หยด *N,N*-dimethylformamide ลงไป (2 หยด) ปิดขวดก้นกลม

ด้วย calcium chloride guard tube คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระเหยเอาตัวทำละลายออก จะได้ 2-chloro-5-nitronicotiny chloride (41)

นำสาร 3-amino-2-cyclopropylamino-4-methylpyridine (40) (116 มิลลิกรัม, 0.71 มิลลิโมล) ละลายใน tetrahydrofuran (3 มิลลิลิตร) เติม N-ethyl-diisopropylamine (0.37 มิลลิลิตร, 2.13 มิลลิโมล) คนสารละลายให้เข้ากัน แสงในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นค่อยๆหยดสารละลายของ 2-chloro-5-nitronicotiny chloride (41) ใน tetrahydrofuran (2 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายข้างต้น ปิดขวดกันกลมด้วย calcium chloride guard tube คนสารละลายต่อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น และสารละลาย sodium hydrogen carbonate อิ่มตัวในน้ำ สกัดด้วย dichloromethane นำชั้น dichloromethane มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous sodium sulphate กรอง และระเหยตัวทำละลายออก นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ะด้วย 30% ethyl acetate/hexane จะได้ของแข็งสีเหลืองของ *N*-(2-cyclopropylamino-4-methyl-3-pyridinyl)-2-chloro-5-nitro-3-pyridinecarboxamide (42) (105 มิลลิกรัม, 53%) (m.p. 185-186°C, K.G.Grozinger *et al.*, 2000)

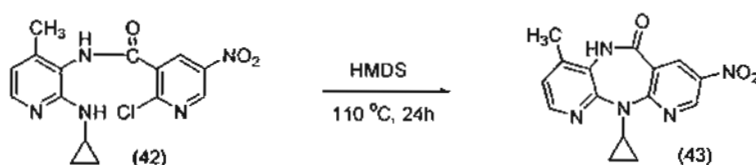
FTIR (KBr), $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 3230 (NH), 1650 (C=O), 1602 (C=C), 1568 (C=N), 1521 (N-H), 1352 (NO_2), 746 (C-Cl)

^1H NMR (acetone- d_6 , 200 MHz) δ : 9.30 (d, $J=2.9$ Hz, 1H, H-6'), 9.22 (br s, 1H, HN-CO), 8.95 (d, $J=2.9$, 1H, H-4'), 7.96 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-6), 6.58 (d, $J=4.4$ Hz, 1H, H-5), 8.06 (br s, 1H, NH), 2.79-2.71 (m, 1H, CH-cyclopropyl), 2.29 (s, 3H, CH_3), 0.73-0.63 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl), 0.42-0.35 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl)

^{13}C NMR (acetone- d_6 , 50 MHz): 163.2, 157.1, 153.4, 147.5, 146.5, 145.6, 144.7, 134.4, 134.2, 116.9, 115.9, 25.2, 18.2, 7.5 (2C) ppm

MS (EI), m/z (relative intensity): 348 ($(\text{M}+\text{H})^+$, 56), 332 (15), 314 (100), 233 (65), 162 (75)

HRMS (APCI-TOF) calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 348.0858; found: 348.0863.

4-Methyl-8-nitro-5,11-dihydro-11-cyclopropyl-6H-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4] diazepin-6-one (43)

นำสาร *N*-(2-cyclopropylamino-4-methyl-3-pyridinyl)-2-chloro-5-nitro-3-pyridine carboxamide (42) (378 มิลลิกรัม, 1.09 มิลลิโมล) ละลายใน hexamethyldisilazane (36 มิลลิลิตร) ได้เป็น suspension ให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เป็นสารละลายใสสีน้ำตาล ทั้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น สกัดด้วย dichloromethane นำชั้น dichloromethane มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous sodium sulphate กรอง และระเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง ตกผลึกใน acetone จะได้ของแข็งสีเหลืองของ 4-methyl-8-nitro-5,11-dihydro-11-cyclopropyl-6H-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (43) (305 มิลลิกรัม, 90%) จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 266.5-268 องศาเซลเซียส (dec.) (m.p.259-266°C, K.G.Grozinger *et al.*, 2000)

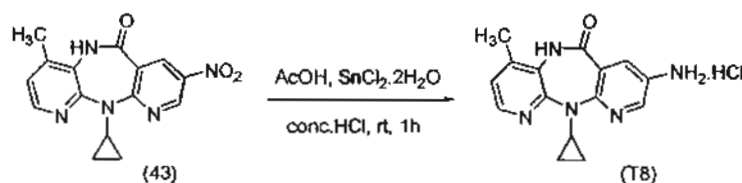
FTIR (KBr), $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 3197 (NH), 1659 (C=O), 1592 (C=C), 1519 (C=N), 1460 (N-H), 1336 (NO_2)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 9.23 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-9), 8.89 (d, $J=2.2$, 1H, H-7), 8.20 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-2), 8.10 (br s, 1H, NH), 7.04 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-3), 3.80-3.70 (m, 1H, CH-cyclopropyl), 2.42 (s, 3H, CH_3), 1.10-1.00 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl), 0.60-0.50 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): 166.4, 163.9, 151.8, 147.5, 144.9, 140.1, 139.6, 136.5, 124.4, 123.0, 118.8, 30.8, 17.6, 9.3 (2C) ppm

HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 312.1091; found: 312.1087.

8-Amino-4-methyl-5,11-dihydro-11-cyclopropyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one hydrochloride salt (T8)



นำสาร 4-methyl-8-nitro-5,11-dihydro-11-cyclopropyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (43) (80 มิลลิกรัม, 0.25 มิลลิโมล) บรรจุลงในขวดแก้วกลม เติม acetic acid (2.8 มิลลิลิตร) คนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน แสงของผสมลงในอ่างน้ำแข็ง เตรียมสารละลายของ $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (190 มิลลิกรัม, 0.84 มิลลิโมล) ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (0.7 มิลลิลิตร) ค่อยๆเติมสารละลายของ $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ในกรด ลงในสารละลายของสารตั้งต้นที่ 0 องศาเซลเซียส จะเกิดตะกอนสีเหลือง จากนั้นคนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองตะกอนสีเหลือง ล้างตะกอนด้วย tetrahydrofuran ทำให้แห้ง จะได้ผลผลิตหนายาบของ 8-amino-4-methyl-5,11-dihydro-11-cyclopropyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one hydrochloride salt (T8) (60 mg, 73%)

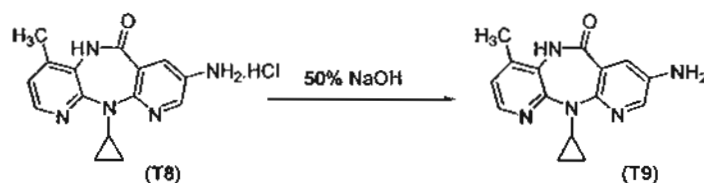
FTIR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3519 (NH), 2587 (N-H of NH_3^+), 1668 (C=O), 1620 ($\text{C}=\text{C}$), 1539 (NH of NH_3^+), 1468 (N-H), 1254 (C-N)

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 200 MHz) δ : 10.12 (s, 1H, HN-C=O), 8.47 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-9), 8.12 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-2), 7.99 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-7), 7.18 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-3), 5.63 (br s, NH_3), 3.63 (m, 1H, CH-cyclopropyl), 2.37 (s, 3H, CH_3), 0.92-0.89 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl), 0.50-0.30 (m, 4H, CH_2 -cyclopropyl)

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 50 MHz): 165.6, 156.6, 152.6, 143.6, 142.6, 142.4, 133.4, 128.0, 125.2, 122.7, 121.1, 29.5, 17.7, 8.8, 8.6 ppm

HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 282.1349; found: 282.1354.

8-Amino-4-methyl-5,11-dihydro-11-cyclopropyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4] diazepin-6-one (T9)



นำสาร 8-amino-4-methyl-5,11-dihydro-11-cyclopropyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4] diazepin-6-one hydrochloride salt (T8) ละลายในน้ำ เติมสารละลาย 50% aq. NaOH ปรับให้มีค่า pH ประมาณ 12 สกัดด้วย dichloromethane หลายๆ ครั้ง แล้วล้างชั้น dichloromethane ด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous sodium sulphate กรอง และระเหยตัวทำละลายออก จะได้ผลผลิตหายาบสีเหลืองของ 8-amino-4-methyl-5,11-dihydro-11-cyclopropyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4] diazepin-6-one (T9) (90%) (m.p. 294-296 °C, K.G. Grozinger *et al.*, 2000)

FTIR (KBr), $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 3362 (NH_2), 3317 (N-H), 1662 ($\text{C}=\text{O}$), 1640 (NH_2), 1602 ($\text{C}=\text{C}$), 1472 (N-H), 1237 (C-N)

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 200 MHz) δ : 9.69 (s, 1H, HN-C=O), 8.01 (d, $J=4.4$ Hz, 1H, H-2), 7.84 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-9), 7.20 (d, $J=2.9$ Hz, 1H, H-7), 6.98 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, H-3), 5.25 (s, 2H, NH_2), 3.60-3.40 (m, 1H, CH-cyclopropyl), 2.28 (s, 3H, CH_3), 0.80-0.60 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl), 0.30-0.10 (m, 1H, CH_2 -cyclopropyl)

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 50 MHz): 167.4, 155.3, 149.9, 143.2, 141.6, 140.1, 137.2, 124.8, 123.1, 121.5, 121.0, 28.8, 17.5, 8.5, 8.4 ppm

HRMS (APCI-TOF) calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 282.1360; found: 282.1352.

การศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง

1. ไวรัสที่ใช้เป็น DA5 (HIV-1 subtype E) ได้มาจากหญิงตั้งครรภ์ซึ่งติดเชื้อ HIV และได้มาฝากครรภ์ ณ โรงพยาบาลศิริราช ไวรัสที่ได้สายพันธุ์ X4 ซึ่งมีคุณสมบัติของทางชีววิทยาเป็น syncytia inducing (SI) formation โดยเซลล์ที่ติดเชื้อมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป (cytopathic effect)

2. เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยง

2.1 เซลล์เม็ดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (Peripheral blood mononuclear cell) จากเลือดผู้ป่วยโรคโลหิต สำหรับการแยกเชื้อไวรัส HIV จากเลือดผู้ติดเชื้อ

2.2 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด H9 cell line ซึ่งเป็น T-lymphoblastoid cell line ซึ่งได้รับบริจาคมาจากสถาบัน Medical research Centre, UK เพื่อเตรียมเป็นไวรัสจำนวนมาก (viral stock)

2.3 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด C8166 cell line ซึ่งเป็น T-lymphoblastoid cell line ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารตัวอย่าง ตลอดโครงการศึกษา

3. สารตัวอย่าง ซึ่งละลายอยู่ใน 70%-95% DMSO จำนวน 5 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

4. ยาริโทรไวรัส 3 ชนิดซึ่งเป็น reversed transcriptase (RT) inhibitor ขององค์การเภสัชกรรม เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเทคนิคการทดสอบตลอดโครงการ ประกอบด้วย

4.1 ANTIVIR (AZT 100 mg)

4.2 GPO-vir ซึ่งเป็น analog ของ RT inhibitors 3 ชนิด (Nevirapine 200mg, Lamivudine 150mg และ Stavudine 30 mg)

4.3 NERAVIR (Nevirapine 200 mg) ซึ่งเป็น analog ของ RT inhibitors

วิธีการทดสอบ

1. การศึกษาความเป็นพิษของสารตัวอย่าง, ยาริโทรไวรัส และ DMSO ที่มีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง

เจือจาง สารที่ต้องการทดสอบและยาริโทรไวรัส ในน้ำเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นที่ระดับ 10, 1, 0.1 ug/ml และเจือจาง DMSO ที่ระดับ 1%, 0.1% และ, 0.01% ใส่ใน tissue culture plate ตามลำดับ โดยทำซ้ำ 2 ชุด (duplicate) หลังจากนั้นเติม C8166 cells ลงทุกหลุม และติดตามทุกวันเป็นเวลา 7 วัน ในขณะทดสอบตรวจสอบความสมบูรณ์ของเซลล์ทุกครั้ง โดยนับจำนวนและย้อมดูเซลล์ที่มีชีวิตด้วย 1% trypan blue ใน D0 (วันที่ 0), D4 และ D7 โดยให้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่มี bioactive

2. การศึกษาผลต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ (virostatic) และต่อการฆ่าเชื้อไวรัส (virucidal)

ไวรัสที่ใช้มีค่า 100 TCID₅₀ (50% Tissue cell infectivity dose ซึ่งเป็นค่าความแรงของไวรัสที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในเซลล์ 50%) ซึ่งได้จากการเจือจางไวรัสและทำซ้ำ 4 หลุม คำนวณหาค่าความแรงไวรัสด้วยสูตร Karber equation แต่ครั้งที่ทดสอบมีตัวควบคุมทั้งหมด 5 ชนิด

2.1 ตัวควบคุมไวรัส (virus control) โดยเจือจางที่ 100, 10 และ 1 TCID₅₀ เพื่อติดตามไวรัสที่ใช้ในการทดสอบต้องได้ที่ 100 TCID₅₀ ทุกครั้ง

2.2 ตัวควบคุมเซลล์ C8166 (cell control) เพื่อตรวจสอบคุณภาพของเซลล์ตลอดการติดตามทดสอบ

2.3 ตัวควบคุม Bioactive (Bioactive control) เพื่อตรวจสอบผลของสารต่อเซลล์ทดสอบ

2.4 ตัวควบคุมสาร DMSO (DMSO control) เพื่อตรวจสอบผลกระทบต่อการเพิ่ม

จำนวนของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

2.5 ตัวควบคุมชุดยารักษาไวรัส (AZT, GPO-vir และ Nevirapine controls) เพื่อตรวจสอบผลกระทบต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

การศึกษาผลของสารสังเคราะห์ที่มีต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ (virostatic)

ในการทดสอบ อบสารละลายตัวอย่างกับเซลล์ C8166 เป็นเวลา 30 นาที โดยทำซ้ำ 2 ชุด (duplicate) จึงใส่ไวรัสที่ระดับ 100 TCID₅₀ จบไว้ 3 ชั่วโมง แล้วล้าง 4 ครั้ง หลังจากนั้นเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มีสาร ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10 เท่า ติดตามเป็นเวลานาน 7 วัน ซึ่งมีการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 3 โดยที่ D4 และ D7 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง (cytopathic effect) และใน D7 ติดตามการสร้าง p24 Ag ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ด้วยชุดตรวจ ELISA สำเร็จรูป คำนวณออกมาเป็น EC₅₀ (50% effective concentration) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของ สารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งไวรัสได้ 50%)

การศึกษาผลของสารสังเคราะห์ที่มีต่อการฆ่าเชื้อไวรัส (virucidal)

ในการทดสอบ อบสารละลาย ตัวอย่างกับไวรัสที่ระดับ 100 TCID₅₀ ไว้ 1 ชั่วโมงโดยทำซ้ำ 2 ชุด (duplicate) เช่นเดียวกัน จึงใส่เซลล์ C8166 จบไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้าง 4 ครั้ง หลังจากนั้นติดตามเป็นเวลานาน 7 วันซึ่งมีการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 3 โดยที่ D4 และ D7 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง และใน D7 ติดตามการสร้าง p24 Ag ในน้ำเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกัน

3. การศึกษาความสามารถของสารสังเคราะห์ในการยับยั้ง reverse transcriptase activity ของเชื้อ HIV-1

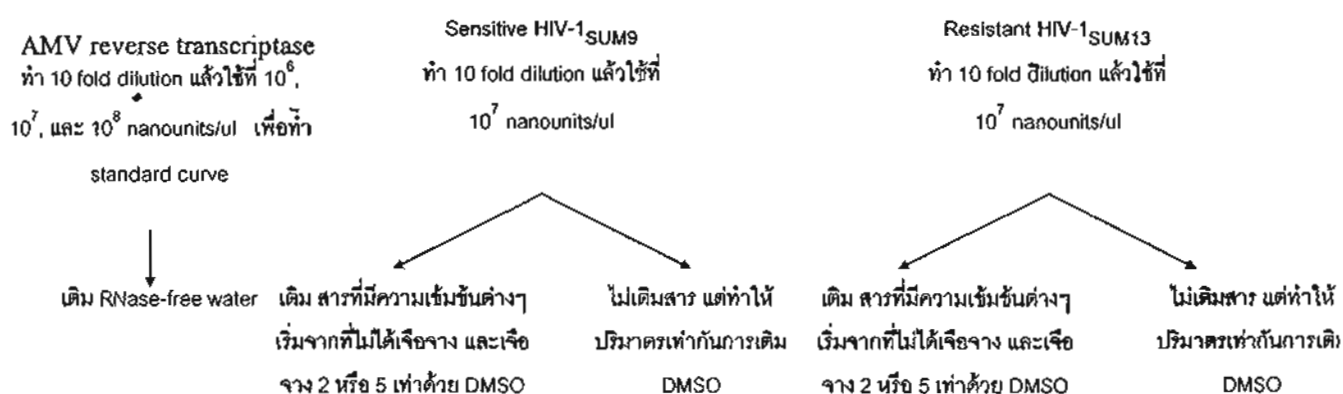
เชื้อ HIV-1 ที่ใช้ในการทดสอบ

1. HIV-1_{SUM9} เป็นเชื้อ HIV ที่ได้จากการทำ Transfection plasmid HIV-1_{SUM9} ซึ่งเป็น Molecular clone HIV wild type ไม่มี mutation ใน Reverse Transcriptase (RT) sequence ทำให้เป็น HIV ที่ไวต่อยา
2. HIV-1_{SUM13} เป็นเชื้อ HIV ที่ได้จากการทำ Transfection plasmid HIV-1_{SUM13} ซึ่งเป็น Molecular clone HIV มี mutations ใน RT sequence คือ A62V/V75I/F77L/F116Y/Q151M ทำให้เป็น HIV ที่ดื้อต่อยาชนิด Nucleoside RT Inhibitor (NRTI) ได้แก่ 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), 2',3'-dideoxycytidine (ddC), 2', 3'-dideoxy inosine (ddI)⁵.

วิธีการแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ การทำ Reverse transcription⁶, real-time polymerase chain reaction (PCR), และการหาค่า %inhibition of RT และ IC₅₀⁷

1. Reverse transcription

เริ่มจากการเตรียม Master mix ของ 5X Buffer, DTT, dNTP, EMCV primer, RNase-inhibitor, EMCV RNA template, RNase-free water และ NP40 แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละเท่าๆกัน จากนั้นนำแต่ละหลอดไปเติม standard enzyme (AMV reverse transcriptase (10U/ul), QIAGEN) หรือ HIV-1 และ สารดังนี้



เมื่อผสม Master mix, AMV-RT หรือ HIV-1 และ สารที่ต้องการทดสอบในหลอดทดลอง แล้ว นำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้ RT

activity ของ AMV-RT หรือ HIV-1 จะเปลี่ยน EMCV RNA template ให้เป็น EMCV cDNA ในสถานะที่มีหรือไม่มีสารที่มีความเข้มข้นต่างๆ ถ้าหากสารที่ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ RT จะทำให้ปริมาณของ EMCV cDNA ในหลอดทดลองน้อยลงหรือไม่มีเลย เมื่อครบ 1 ชั่วโมง RT activity จะถูกทำลายโดยการ incubate ใน heat block ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที

2. Real-time polymerase chain reaction (PCR)

เตรียม Master mix โดยผสม 10X Buffer, MgCl₂, dNTP, Probe, EMCV forward and reward primers, Hot Tag DNA polymerase และ Distill water แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละเท่าๆกัน จากนั้นนำแต่ละหลอดไปเติม product ที่ได้จากการทำ Reverse transcription นำไปเข้าเครื่อง real-time PCR (Rotor Gene) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อที่ DNA polymerase จะเพิ่มจำนวน EMCV cDNA ในแต่ละหลอดให้มากขึ้นแบบ exponential และ จำนวน EMCV DNA product จะถูก detect ด้วย Probe ซึ่งจะแสดงผลใน program ใน computer

3. การหาค่า % Inhibition of RT และ IC₅₀

โดยการใช้ Program จะสามารถหาค่า RT activity (nanounits/ul) ของ HIV-1_{SUM9} และ HIV-1_{SUM13} ในหลอดที่มีสารและหลอดที่ไม่มีสารได้ เมื่อเทียบกับ RT activity ของ AMV RT จากนั้นนำค่า RT activity ที่ได้มาคำนวณความสามารถของสารในหน่วยเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง RT activity ได้จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition of RT} = \frac{(\text{RT activity ของ HIV-1}_{\text{A}} \text{ ที่ไม่ได้เติมสาร} - \text{RT activity ของ HIV-1}_{\text{A}} \text{ ที่เติมสาร})}{\text{RT activity ของ HIV-1}_{\text{A}} \text{ ที่ไม่ได้เติมสาร}} \times 100$$

$$\text{HIV-1}_{\text{A}} = \text{HIV-1}_{\text{SUM9}} \text{ หรือ } \text{HIV-1}_{\text{SUM13}}$$

นำค่า % Inhibition และ ความเข้มข้นของสาร (M) ไป plot graph แบบ Nonlinear regression โดยใช้ program GraphPad Prism เพื่อหาความสัมพันธ์ดังสมการข้างล่าง

$$Y = 1 / (1 + 10^{((\log IC_{50} - X) \cdot Slope)})$$

เมื่อ $Y = (\% \text{ inhibition}) \times 0.01$

$X = \text{compound concentration (M)}$

หลังจากการใส่ข้อมูลของ Y และ X ของสารลงใน Prism program แล้วสั่งวิเคราะห์ผล program จะคำนวณและแสดงค่า IC50

เอกสารอ้างอิง

1. Luzuriaga, K.; Bryson, Y.; Krostad, P.; Robinson, J.; Stechenberg, B.; Lamson, M.; Cort, S.; Sullivan, J. L. Combination Treatment With Zidovudine, Didanosine, and Nevirapine In Infants With Human Immunodeficiency Virus Type I Infection. *N. Engl. J. Med.* 1997, 336, 1343-1349.
2. (a) Merluzzi, V. J.; Hargrave, K. D.; Labadia, M.; Grozinger, K.; Skoog, M.; Wu, J. C.; Shih, C.-K.; Eckner, K.; Hattox, S.; Adams, J.; Rosenthal, A. S.; Faanes, R.; Eckner, R. J.; Koup, R. A.; Sullivan, J. L. Inhibition of HIV-1 Replication by a Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor. *Science* 1990, 250, 1411-1413. (b) Hargrave, K. D.; Proudfoot, J. R.; Grozinger, K. G.; Kapadia, S. R.; Patel, U. R.; Fuchs, V. U.; Mauldin, S. C.; Vitous, J.; Behnke, M. L.; Klunder, J. M.; Pai, K.; Skiles, J. W.; McNeil, D. W.; Rose, J. M.; Chow, G. C.; Skoog, M. T.; Wu, J. C.; Schmidt, G.; Engel, W.; Eberlein, W. G.; Saboe, T. D.; Campbell, S. J.; Rosenthal, A. S.; Adams, J. Novel Non-Nucleoside Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. 1. Tricyclic Pyridobenzo- and Dipyrindiazepinones. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 2231-2241.
3. Richman, D.; Havlir, D.; Corbell, J.; Looney, D.; Ignacio, C.; Spector, S. A.; Sullivan, J.; Cheeseman, S.; Barringer, K.; Pauletti, D.; Shih, C.-K.; Myers, M.; Griffin, J. Nevirapine Resistance Mutations Of Human Immunodeficiency Virus Type I Selected During Therapy. *J. Virol.* 1994, 68, 1660-1666.
4. (a) Klunder, J. M.; Hoermann, M.; Cywin, C. L.; David, E.; Brickwood, J. R.; Schwartz, R.; Barringer, K. J.; Pauletti, D.; Shih, C.-K.; Erickson, D. A.; Sorge, C. L.; Joseph, D. P.; Hattox, S. E.; Adams, J.; Grob, P. M.; Novel Nonnucleoside Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. 7. 8-Arylethyldipyrro diazepinones as Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Wild-Type and Mutant Enzymes. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 2960-2971. (b) Cywin, C. L.; Klunder, J. M.; Hoermann, M.; Brickwood, J. R.; David, E.; Grob, P. M.; Schwartz, R.; Pauletti, D.; Barringer, K. J.; Shih, C.-K.; Sorge, C. L.; Erickson, D. A.; Joseph, D. P.; Hattox, S. E.; Novel Nonnucleoside Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. 8. 8-Aryloxymethyl- and 8-Arylthiomethyldipyrro diazepinones. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 2972-2984.

5. Shirasaka T, Kavlick MF, Ueno T, Gao WY, Kojima E, Alcaide ML, et al. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(6):2398-402.
6. Lerma JGG, Heneine W. Ultrasensitive detection of reverse transcriptase activity by the Amp-RT assay. In: Kinchington D, Schinazi RF, editors. *Antiviral methods and protocols*. Totowa, New Jersey; 2000.
7. Ferreira S, Crumb WJ, Jr., Carlton CG, Clarkson CW: Effects of cocaine and its major metabolites on the HERG-encoded potassium channel. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299(1):220-6.

Out put จากโครงการที่ได้รับทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1.1 Chaosuanchaoen N, Chimnoi N, Leeprasert T, Thitithanyanont A, Hannongbua S, Techasakul, S. Synthesis and Anti-HIV-1 Reverse Transcriptase Activity of Dipyrindodiazepinone derivatives. Manuscript in preparation.
- 1.2 Chaosuanchaoen N, Chimnoi N, Pungpo P, Louisirirotchanakul S, Hannongbua S, Techasakul, S. Novel 2-chloro-8- arylthiomethyldipyrindodiazepinone derivatives with activity against HIV-1 reverse transcriptase. *Molecule* 2007; 12, 218-230.
- 1.3 Vailikhit V, Bunsawansong P, Techasakul S, Hannongbua S. Conformational analysis of nevirapine in solutions based on nmr spectroscopy and quantum chemical calculations. *JTCC* 2006; 4: 913-24.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงสาธารณะ ได้มีเครือข่ายความร่วมมือในการทำงานวิจัยกับ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- 3.1 การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบปะวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 13-15 ตุลาคม 2548 ณ โรงแรมรีเจนท์ ซะอ่า จ.เพชรบุรี ในหัวข้อ "Novel 2-chloro-8-arylthiomethyl dipyrindodiazepinone derivatives with activity against HIV-1 reverse transcriptase".
- 3.2 Chaosuanchaoen N, Chimnoi N, Saparpakorn P, Thitithanyanont A, Pungpo P, Louisirirotchanakul S, Hannongbua S, Techasakul S. Novel 2-chloro-8-arylthiomethyl dipyrindodiazepinone derivatives with activity against HIV-1 reverse transcriptase. *1st International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia*, Naha, Okinawa, Japan, October 16-20, 2006.

- 3.3 Chaosuancharoen N, Techasakul S, Hannongbua S. An Efficient and Facile Synthetic Approach to Dipyrindodiazepinone Derivatives. *The International Conference on Biodiversity and Natural Products: Chemistry and Medical Applications*, Delhi, India, January, 26-31, 2004.

ภาคผนวก

Full Paper

Novel 2-Chloro-8-arylthiomethyldipyridodiazepinone Derivatives with Activity against HIV-1 Reverse Transcriptase[†]

Nisachon Khunnawutmanotham¹, Nitirat Chimnoi¹, Patchareenart Saparpakorn², Pornpan Pungpo³, Suda Louisirirotchanakul⁴, Supa Hannongbua² and Supanna Techasakul^{1,2,*}

¹ Chulabhorn Research Institute, Vibhavadee-Rangsit Highway, Bangkok 10210, Thailand;
E-mails: cnisachon@yahoo.com; E-mail: nitirat@yahoo.com

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10903, Thailand;
E-mails: p_saparpakorn@yahoo.com, fscisph@ku.ac.th, supanna@cri.or.th

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand; E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com

⁴ Department of Microbiology, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand;
E-mail: sudaloui@yahoo.com

[†] Paper presented at ECSOC-10, 1–30 November 2006

* Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: supanna@cri.or.th

Received: 22 December 2006; in revised form: 18 February 2007 / Accepted: 19 February 2007 /
Published: 20 February 2007

Abstract: Based on the molecular modeling analysis against Y181C HIV-1 RT, dipyridodiazepinone derivatives containing an unsubstituted lactam nitrogen and 2-chloro-8-arylthiomethyl were synthesized *via* an efficient route. Some of them were evaluated for their antiviral activity against HIV-1 RT subtype E and were found to exhibit virustatic activity comparable to some clinically used therapeutic agents.

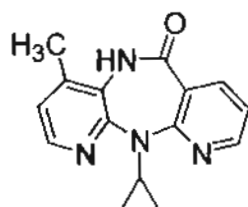
Keywords: Dipyridodiazepinone, HIV-1 RT, antiviral activity

Introduction

The introduction of antiretroviral therapy results in delayed progression of HIV-1. The majority of existing therapy methods have targeted the viral replication at reverse transcriptase (RT) and protease enzyme [1,2]. However, the emergence of drug resistance has been observed [3,4], therefore, new therapeutic agents are still needed. Recently, a new class of therapeutic agents has focused on inhibiting HIV entry into cells, CD4 binding, coreceptor binding and membrane fusion such as T-20 [5]. A number of bioactive nucleoside-based compounds against HIV virus have been clinically used [6].

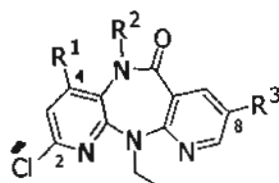
In the clinic, nevirapine (1, Figure 1) [7] monotherapy results in relatively rapid drug resistance due to mutation of the RT enzyme. In an effort to develop a second generation inhibitor with improved activity against mutant RT enzyme, a number of dipyrroldiazepinone derivatives have been synthesized and evaluated their activities against HIV-1 RT enzymes [8]. On the basis of a molecular modeling analysis of activity against Y181C HIV-1 RT aimed at modifying the nevirapine structure for higher antiviral activity (Table 1), it was shown that the dipyrroldiazepinone derivatives containing unsubstituted lactam nitrogens and a 2-chloro-8-arylthiomethyl (T1 and T2) moiety are effective inhibitors for this mutant enzyme when compared with 68nv, used as reference [9]. The result prompted us to develop an efficient synthetic route to prepare 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-(phenylthio)methyl-6H-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (T1) and 2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-(3-methoxy-phenylthio)methyl-6H-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (T2) and to evaluate their anti-HIV-1 activity as well as verifying our hypothesis.

Figure 1. Structure of nevirapine.



Nevirapine (1)

Table 1. Structure of the proposed compounds and calculated Y181C HIV-1-RT inhibitory affinities.



Cpds	R ¹	R ²	R ³	Y181C log (1/C)			
				Expt. ^a	Calc. ^b	Calc. ^c	Calc. ^d
68nv	H	CH ₃	CH ₂ SPh	8.0	7.83	7.77	7.79
T1	H	H	CH ₂ SPh		8.19	7.96	8.01
T2	H	H	CH ₂ SPh(<i>m</i> -OCH ₃)		8.25	8.05	8.17

Table 1. Cont.

Cpds	R ¹	R ²	R ³	Y181C log (I/C)			
				Expt. ^a	Calc. ^b	Calc. ^c	Calc. ^d
T3	H	CH ₂ OH	CH ₂ SPh		7.70	7.55	7.79
T4	CH ₃ CH ₂	H	CH ₂ SPh		7.91	7.62	7.80
T5	OCH ₃	H	CH ₂ SPh(<i>m</i> -OCH ₃)		7.70	7.47	7.58

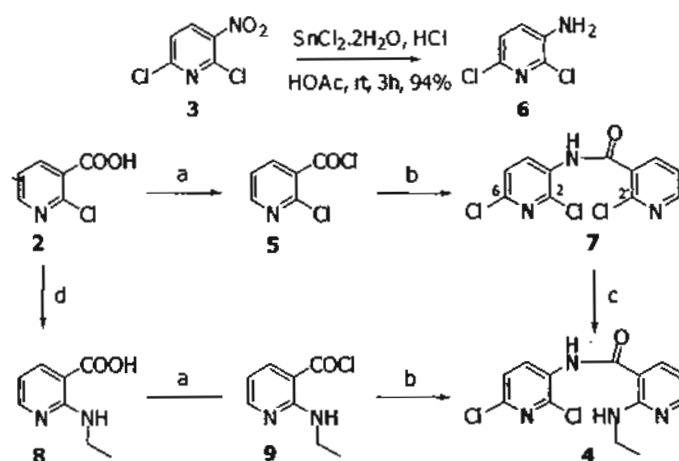
^a[ref. 9], ^bCalculated by CoMFA, ^cCalculated by CoMSIA, ^dCalculated by HQSAR [ref. 10].

Results and Discussion

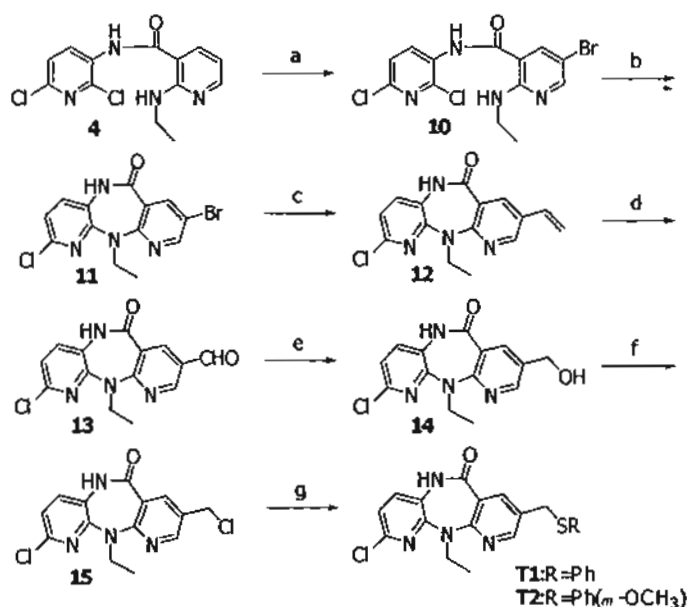
Chemistry

Synthesis of T1 and T2 was accomplished from commercially available 2-chloronicotinic acid (2) and 2,6-dichloro-3-nitropyridine (3). The intermediate aminopyridine 4 was prepared as shown in Scheme 1. Reaction of 2-chloronicotinyl chloride (5) and 3-amino-2,6-dichloropyridine (6), obtained from reduction of 3, provided pyridinecarboxamide 7. Treatment of 7 with ethylamine in xylene produced not only the desired 2'-displacement but also competing substitutions of the 2-chloro and 6-chloro substituents as significant side reactions. To improve the yield of aminopyridine 4, it appears that ethylamine should be introduced before carboxamide formation. Thus, 2 was treated with ethylamine in a sealed tube to give 2-(ethylamino)-3-pyridinecarboxylic acid (8) in quantitative yield. Then, acid chloride 9 produced from 8 was condensed with 6 to yield 4 in good yield. By this method, an increased and satisfactory yield of 4 was obtained.

Scheme 1. Synthesis of the intermediate aminopyridine 4.



Reagents and conditions: (a) (COCl)₂, benzene, DMF, rt, 1h; (b) 6, dioxane, cyclohexane, pyridine, rt, 16h, 60%(from 5 to 7) and 80%(from 9 to 4); (c) EtNH₂, xylene, 120°C, 0.5h, 40%; (d) EtNH₂, 120°C, 4h, 99%

Scheme 2. Synthesis of compounds **T1** and **T2**.

Reagents and conditions: (a) Br₂, HOAc, KOAc, rt, 1h, 99%; (b) NaHMDS, py, 90 °C, 1h, 90%; (c) CH₂=CH-SnBu₃, Pd(PPh₃)₄, DMF, 90 °C, 1h, 75%; (d) O₃, CH₂Cl₂/MeOH, -78 °C then PPh₃, rt, 1h, 85%; (e) NaBH₄, THF, H₂O, rt, 0.5h, 93%; (f) SOCl₂, CH₂Cl₂, Et₃N, rt, 87%; (g) NaH, RSH, DMF, rt, 1h, 70% (**T1**) and 87% (**T2**)

The aminopyridine **4** was regioselectively brominated to afford *N*-(2,6-dichloro-3-pyridinyl)-5-bromo-2-ethylamino-3-pyridinecarboxamide (**10**) (Scheme 2). The azepinone ring was formed by treatment with sodium hexamethyldisilazane in pyridine to yield 8-bromo-2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (**11**). Such a ring closure using sodium hydride led to the undesired debrominated product. Coupling of **11** with vinyltributyltin in the presence of tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) provided the 8-vinyl compound **12**, which underwent ozonolysis to give aldehyde **13** in good yield. Reduction of **13** with NaBH₄ afforded alcohol **14**, which was converted to the corresponding chloride **15** by treatment with thionyl chloride in dichloromethane. Reaction of **15** with thiophenolate and 3-methoxythiophenolate in DMF yielded **T1** and **T2**, respectively. Thus **T1** and **T2** were synthesized from 2-chloronicotinic acid (**2**) and 2,6-dichloro-3-nitropyridine (**3**) in 10 steps with 26% and 32% overall yields, respectively.

Biological Testing

Compounds **T1** and **T2**, together with some intermediates, were evaluated for their virustatic and virucidal activities against HIV-1 subtype E (CRF01 AE). In addition, the toxicity of the compounds, DMSO and cell controls were also examined. The biological activity of **T1** and **T2** as well as of intermediates **14** and **15** is summarized in Table 2. Compound **T1** exhibited virustatic activity at EC₅₀ ≤ 1 µg/mL for seven days. On the other hand, compound **T2** exhibited virustatic activity at EC₅₀ ≤ 1 µg/mL during the first four days, but the activity decreased to EC₅₀ ≤ 10 µg/mL by the seventh day.

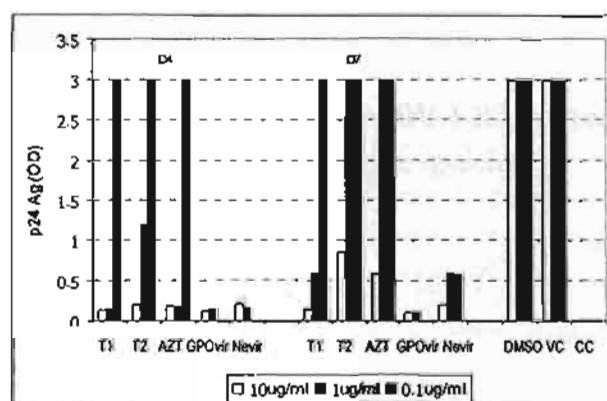
Other intermediates did not show virustatic activity. This result suggested that thioaryl group could be involved in regulating virustatic activity. However, all compounds did not show virucidal activity.

Table 2. Virustatic and virucidal activities at 50% effective concentration (EC_{50}) against HIV-1 subtype E.

Cpds	Virustatic		Virucidal	
	EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$		EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$	
	Day4	Day7	Day4	Day7
14	>10	>10	>10	>10
15	>10	>10	>10	>10
T1	<1	1	>10	>10
T2	≤ 1	≤ 10	>10	>10

Virustatic activity of T1 and T2 against HIV-1 subtype E observed in seven days is shown in Figure 2. T1 exhibited comparable virustatic activity to that of AZT, GPOvir and nevirapine at concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$ on the fourth day. On the seventh day, T1 exhibited comparable activity to that of nevirapine at a concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$ and to that of GPOvir at 10 $\mu\text{g/mL}$, but showed higher activity than AZT at 1 $\mu\text{g/mL}$. T2 was less potent than T1 (~6-fold) at concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$.

Figure 2. Virustatic activity of T1 and T2 observed in seven days.



AZT = azidothymidine, GPOvir = analog of three RT inhibitors (nevirapine, lamivudine and stavudine), Nevir = nevirapine, DMSO = DMSO control, VC = virus control and CC = cell control.

Molecular Docking

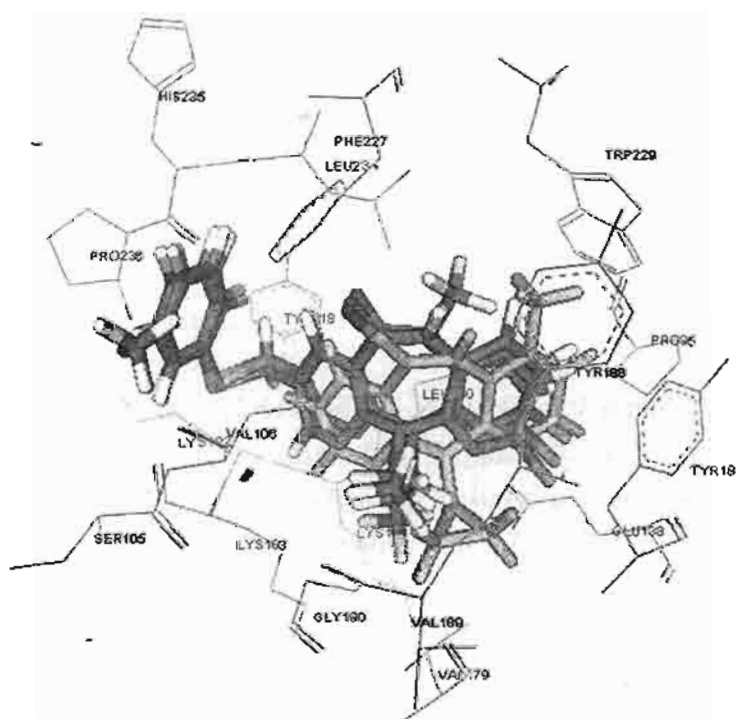
In order to investigate the orientation and estimated binding energies of the inhibitors in the enzyme binding site, molecular docking by using Lamarckian genetic algorithm AutoDock 3.05 program [11] was used to dock 68nv, T1 and T2 into the binding pocket of HIV-1 RT (pdb code 1KLM) and the results were compared with that of nevirapine, as shown in Table 3. The grid size was set to 80x80x80. A grid spacing of 0.375 Å was used and the numbers of docking runs were set to 50.

Superimposition of the binding pocket of HIV-1 RT with docked **68nv**, **T1** and **T2**, compared with nevirapine (green), is shown in Figure 3. The obtained results demonstrate clearly that **68nv** and both **T1** and **T2** oriented their structures in the HIV-1 RT binding site similar to nevirapine. However, the final docked energies and free energies of binding of both **T1** and **T2** which are the same as those of **68nv** with the value of about ± 0.5 kcal/mol are much lower than that of nevirapine by about 4 kcal/mol. The explanation for this might be the fact that rotatable thiophenyl side chain in the three compounds can interact with the residues in the binding site such as Lys103, Leu234, His235 and Tyr318. However, the docked orientations of **T1** and **T2** revealed that the lack of methyl group at R² caused a slight move upwards of the **T1** and **T2** structures and make the adjustment of ethyl group attached at diazepinone ring to form the attractive interaction with Val189. Furthermore, methoxy group attached in thiophenyl side chain of **T2** also interacts with Val106. This can significantly contribute to the conformational change of the whole enzyme structure, and consequently reduce catalytic efficiency of the enzyme.

Table 3. The docked energy and free energy of binding (kcal/mol) of **T1** and **T2** as compared with nevirapine and **68nv**.

Cpds	Final Docked Energy (kcal/mol)	Free Energy of Binding (kcal/mol)
Nevirapine	-11.88	-11.24
68nv	-15.92	-15.03
T1	-15.58	-14.47
T2	-16.37	-14.82 ♦

Figure 3. The binding pocket of enzyme HIV-1 RT with **68nv**, **T1** and **T2** (atom type color) compared with nevirapine (green).



Conclusions

In summary, two dipyrroldiazepinone derivatives, **T1** and **T2**, were synthesized based on a molecular modeling study and were found to exhibit virustatic activity against HIV-1 RT subtype E at 2.5 μM (1 $\mu\text{g}/\text{mM}$) and 23.5 μM (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively.

Experimental Section

General

The ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 2000 spectrometer operating at 200 and 50 MHz, respectively. Chemical shifts were recorded as δ values in ppm referenced to the solvent. Coupling constants (J) are given in Hertz. Infrared (IR) spectra were recorded in cm^{-1} on a Perkin Elmer 1760x FT-IR spectrometer. Mass spectra were obtained on a Finnigan Polaris GCQ mass spectrometer and accurate masses (HRMS) were obtained on a Bruker Micro TOF in ESI positive mode. Melting points (m.p.) were determined on a SMP3 melting point apparatus and are reported in $^{\circ}\text{C}$ uncorrected. Column chromatography was performed on Scharlau silica gel 60 (70-230 mesh).

3-Amino-2,6-dichloropyridine (**6**)

A solution of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (970 mg, 4.3 mmol) in concentrated HCl (0.8 mL) was added dropwise to a stirred solution of 2,6-dichloro-3-nitropyridine (250 mg, 1.3 mmol) in acetic acid (2.6 mL) and the mixture was stirred for 3 hours at room temperature. Then the mixture was cooled in ice bath, and water was added. After stirring for an additional half an hour, the mixture was made basic (pH 12) with aqueous 50% sodium hydroxide. The reaction mixture was extracted with CH_2Cl_2 and the combined organic layers were washed with water, dried (Na_2SO_4) and concentrated under reduced pressure to give **6** (200 mg, 94.8%) as white solid which could be used directly in the next step. Recrystallization from hexane/ CH_2Cl_2 afforded needles, m.p. 121–122 $^{\circ}\text{C}$; FTIR (KBr) ν_{max} : 3460, 3338, 1619, 1559, 1454, 1311, 1145, 720 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 7.06 (d, $J=1.47$, 2H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 138.8, 137.3, 134.6, 125.1, 123.6; MS (EI), m/z (relative intensity): 162 (M^+ , 100), 126 (20), 99 (10), 64 (30); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_5\text{H}_5\text{Cl}_2\text{N}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 162.9824; found: 162.9824.

2-(Ethylamino)-3-pyridine carboxylic acid (**8**)

A stirred mixture of 2-chloronicotinic acid (**2**) (300 mg, 1.9 mmol), ethylamine (1.3 mL, 19.1 mmol) was heated at 120 $^{\circ}\text{C}$ in a sealed vessel for 4 hours. After cooling down the ethylamine was removed and the residue was purified by silica gel column chromatography (30% methanol/ethyl acetate) to give **8** (315 mg, 99.7%) as a white solid, m.p. 178–180 $^{\circ}\text{C}$; FTIR (KBr) ν_{max} : 3474, 3228, 1636, 1557, 1341, 1239; ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.20 (dd, $J=4.8$, 1.8, 1H), 8.04 (dd, $J=7.7$, 1.8 Hz, 1H), 6.50 (dd, $J=7.6$, 5.1, 1H), 4.81 (br s, 1H), 3.43 (q, $J=6.9$, 2H), 1.15 (t, $J=6.9$, 3H); ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 169.3, 158.4, 153.0, 140.1, 110.8, 106.9, 35.1, 15.0; MS (EI), m/z (relative intensity):

167 ($M^+ + 1$, 20), 151 (60), 133 (100), 122 (30), 93 (50), 78 (96); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $C_8H_{11}N_2O_2$ [$M + H$] $^+$ 167.0815; found: 167.0812.

N-(2,6-Dichloro-3-pyridinyl)-2-ethylamino-3-pyridinecarboxamide (**4**)

A stirred solution of **8** (315 mg, 1.9 mmol), in benzene (10 mL) was treated with oxalyl chloride (0.35 mL, 4.1 mmol) followed by a catalytic amount of DMF (2 drops) and the mixture was stirred at room temperature for 1 hour. Then the solvent was removed under reduced pressure to afford acid chloride **9** as yellow solid. This acid chloride was redissolved in 1,4-dioxane (10 mL) and added dropwise to a solution of **6** (200 mg, 1.2 mmol) in 1,4-dioxane (3 mL), cyclohexane (2 mL) and pyridine (0.2 mL, 2.4 mmol). After stirring at room temperature for 16 hours, the resultant precipitate was filtered. The solid was redissolved in CH_2Cl_2 and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$. The organic layer was washed with water, dried (Na_2SO_4) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (15% EtOAc/hexane) to yield **4** (308 mg, 80.7%) as a pale yellow solid, m.p. 119–120 °C; FTIR (KBr) ν_{max} : 3431, 3351, 1660, 1572, 1504, 1301, 1235, 1122, 770; 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 8.77 (d, $J=7.3$, 1H), 8.33 (d, $J=4.4$, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.97 (br t, 1H), 7.74 (d, $J=7.3$, 1H), 7.34 (d, $J=8.1$, 1H), 6.60 (dd, $J=7.3$, 4.4, 1H), 3.61–3.48 (m, 2H), 1.29 (t, $J=7.0$, 3H); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 166.4, 158.1, 153.4, 143.5, 138.7, 135.3, 131.2, 130.9, 123.6, 110.5, 108.0, 35.8, 14.7; MS (EI), m/z (relative intensity): 310 (M^+ , 20), 275 (25), 149 (35), 131 (100), 119 (20); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $C_{13}H_{13}Cl_2N_4O$ [$M + H$] $^+$ 311.0461; found: 311.0464.

N-(2,6-Dichloro-3-pyridinyl)-5-bromo-2-ethylamino-3-pyridinecarboxamide (**10**)

A solution of Br_2 (0.06 mL, 1.17 mmol) in acetic acid (1 mL) was added dropwise to a stirred solution of **4** (355 mg, 1.14 mmol), and potassium acetate (134 mg, 1.36 mmol) in acetic acid (15 mL). After 15 minutes, to the reaction mixture was added water and the precipitate was collected by suction filtration and washed with water for several times to provide **10** (435 mg, 98.0%) as a yellow solid, m.p. 193–194 °C; FTIR (KBr), ν_{max} : 3439, 3336, 1673, 1575, 1506, 1302, 1248, 787, 528; 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 8.69 (d, $J=8.8$, 1H), 8.33 (d, $J=2.2$, 1H), 8.10 (br s, 1H), 7.89 (br t, 1H), 7.79 (d, $J=2.2$, 1H), 7.30 (d, $J=8.1$, 1H), 3.58–3.44 (m, 2H), 1.27 (t, $J=7.3$, 3H); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 165.4, 156.5, 154.2, 139.1, 137.4, 131.7, 130.7, 123.8, 109.6, 103.9, 36.1, 14.6; MS (EI), m/z (relative intensity): 388 (M^+ , 60), 373 (15), 353 (20), 227 (70), 209 (60); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $C_{13}H_{12}BrCl_2N_4O$ [$M + H$] $^+$ 388.9566; found: 388.9579.

8-Bromo-2-chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one (**11**)

A solution of **10** (440 mg, 1.13 mmol) in pyridine (10 mL) was heated at 90 °C under a nitrogen atmosphere. Then the solution was added 0.6 M sodium bis(trimethylsilyl)amide in toluene (6.3 mL, 3.7 mmol) and the mixture was stirred at 90 °C for 15 minutes. After cooling down, the mixture was poured into ice water and stirred for additional 2 hours. The precipitate was filtered and washed with water to afford **11** (370 mg, 92.8%) as a yellow solid, m.p. 263–264 °C; FTIR (KBr) ν_{max} : 3195, 3074, 2972, 1665, 1575, 1456, 1381, 1226, 687, 630; 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 8.53 (br s, 1H), 8.49 (d, $J=2.2$,

1H), 8.24 (d, $J=2.2$, 1H), 7.27 (d, $J=8.1$, 1H), 7.06 (d, $J=8.1$, 1H), 4.81 (q, $J=7.3$, 2H), 1.25 (t, $J=7.3$, 3H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 165.4, 156.8, 151.8, 150.5, 143.0, 142.6, 133.3, 126.3, 122.2, 120.4, 113.6, 41.5, 13.4; MS (EI), m/z (relative intensity): 352 (M^+ , 80), 337 (42), 324 (75), 309 (20); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrClN}_4\text{O}$ [$M+H$] $^+$ 352.9799; found: 352.9803.

2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-vinyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one (12)

A solution of **11** (500 mg, 1.4 mmol) in DMF (7 mL) was treated with tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (70 mg, 0.06 mmol) followed by vinyl tributyltin (1 mL, 3.42 mmol) and heated at 100 °C under nitrogen atmosphere for half an hour. After cooling down, the reaction mixture was poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with 15% aqueous ammonia, brine and water, then dried (Na_2SO_4) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (30% EtOAc/hexane) to provide **12** (318 mg, 74.6%) as a yellow solid, m.p. 201–202 °C; FTIR (KBr) ν_{max} : 3195, 2965, 1665, 1585, 1455, 1383, 1239, 688; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 9.37 (s, 1H), 8.46 (d, $J=2.2$, 1H), 8.20 (d, $J=2.2$, 1H), 7.35 (d, $J=8.1$, 1H), 7.04 (d, $J=8.1$, 1H), 6.66 (dd, $J=17.6$, 11.0, 1H), 5.78 (d, $J=17.6$, 1H), 5.35 (d, $J=11.0$, 1H), 4.22 (q, $J=7.3$, 2H), 1.27 (t, $J=7.3$, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 168.8, 157.9, 151.9, 150.1, 145.1, 137.7, 131.9, 131.8, 128.8, 125.0, 119.7, 119.6, 115.8, 42.1, 13.7; MS (EI), m/z (relative intensity): 300 (M^+ , 100), 285 (35), 272 (92), 257 (35); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClN}_4\text{O}$ [$M+H$] $^+$ 301.0851; found: 301.0855.

2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-formyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one (13)

A cooled (−78 °C) solution of **12** (343 mg, 1.14 mmol) in 1:1 CH_2Cl_2 -MeOH (20 mL) was treated with O_3 for 30 minutes. After the completion of reaction, the solution was purged with O_2 for 5 minutes. Then the reaction mixture was stirred with triphenylphosphine (598 mg, 2.28 mmol) for additional 1 hour at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (30% EtOAc/hexane) to yield **13** (295 mg, 85.4%) as a yellow solid, m.p. 216–217 °C; FTIR (KBr) ν_{max} : 3203, 2939, 1702, 1674, 1596, 1456, 1354, 1231, 975, 692; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 10.02 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 8.60 (d, $J=2.2$, 1H), 8.64 (d, $J=2.2$, 1H), 7.41 (d, $J=8.1$, 1H), 7.13 (d, $J=8.1$, 1H), 4.34 (q, $J=7.0$, 2H), 1.32 (t, $J=7.0$, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 188.6, 168.1, 162.1, 153.8, 149.9, 145.3, 142.3, 132.3, 126.9, 125.0, 120.8, 118.8, 43.0, 13.7; MS (EI), m/z (relative intensity): 302 (M^+ , 80), 287 (30), 274 (100), 260 (30), 245 (35); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClN}_4\text{O}_2$ [$M+H$] $^+$ 303.0643; found: 303.0645.

2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-hydroxymethyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one (14)

To a solution of **13** (228 mg, 0.75 mmol) in THF (12 mL) were added water (0.1 mL) and sodium borohydride (28.5 mg, 0.75 mmol). The mixture was stirred for half an hour, then diluted with water. THF was removed under reduced pressure and the precipitate was filtered and washed with water to yield **14** (214 mg, 93%) as a white solid, m.p. 197–198 °C; FTIR (KBr) ν_{max} : 3319, 3191, 2959, 1666, 1590, 1456, 1390, 1232, 1041; ^1H -NMR (acetone- d_6) δ : 9.50 (br s, 1H), 8.46 (d, $J=2.2$, 1H), 8.11 (d,

$J=2.2$, 1H), 7.60 (d, $J=8.1$, 1H), 7.18 (d, $J=8.1$, 1H), 4.65 (d, $J=5.13$, 2H), 4.56 (t, $J=5.86$, 1H), 4.15 (q, $J=7.3$, 2H), 1.21 (t, $J=7.3$, 3H); ^{13}C -NMR (acetone- d_6) δ : 167.8, 158.7, 152.7, 151.0, 144.5, 140.3, 134.1, 133.4, 127.3, 121.2, 120.5, 61.5, 42.4, 14.0; MS (EI), m/z (relative intensity): 304 (M^+ , 69), 289 (39), 276 (100), 261 (29), 247 (20), 164 (31); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 305.0800; found: 305.0805.

2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-chloromethyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one (15)

A suspension of **14** (177 mg, 0.58 mmol) in CH_2Cl_2 (100 mL) was treated with thionyl chloride (0.3 mL) followed by triethylamine (1 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour and a clear solution was obtained. Then, saturated aqueous NaHCO_3 was added and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with water, then dried (Na_2SO_4) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (20%EtOAc/hexane) to give **15** (163 mg, 87%) as a pale yellow solid, m.p. 226–227 °C; FTIR (KBr) ν_{max} : 3195, 2969, 1671, 1588, 1455, 1382, 1247, 699; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 9.15 (br s, 1H), 8.47 (d, $J=2.9$, 1H), 8.19 (d, $J=2.9$, 1H), 7.34 (d, $J=8.1$, 1H), 7.06 (d, $J=8.1$, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.23 (q, $J=7.3$, 2H), 1.27 (t, $J=7.3$, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 168.3, 158.7, 151.7, 151.5, 145.2, 141.4, 131.9, 128.3, 125.0, 119.9, 119.6, 42.3, 42.2, 13.7; MS (EI), m/z (relative intensity): 322 (M^+ , 54), 307 (31), 294 (62), 287 (37), 259 (100), 244 (28), 231 (21); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 323.0461; found: 323.0470.

2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-(phenylthio)-methyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one (T1)

A solution of thiophenol (0.1 mL, 0.97 mmol) in DMF (2 mL) was treated with 60% sodium hydride (65 mg, 1.6 mmol) under a N_2 atmosphere. After 10 minutes, a solution of **15** (100 mg, 0.31 mmol) in DMF (3 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 1 hour. The reaction was quenched by addition of water and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, then dried (Na_2SO_4) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (20%EtOAc/hexane) to give **T1** (85.5 mg, 70%) as a yellow solid, m.p. 188.5–189.5 °C; FTIR (KBr) ν_{max} : 3182, 2965, 1665, 1585, 1455, 1383, 1239, 739, 688; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 9.33 (s, 1H), 8.29 (d, $J=2.2$, 1H), 8.09 (d, $J=2.2$, 1H), 7.34–7.20 (m, 6H), 7.04 (d, $J=8.1$, 1H), 4.18 (q, $J=7.3$, 2H), 4.05 (s, 2H), 1.23 (t, $J=7.3$, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 168.6, 157.8, 151.8, 145.1, 141.2, 134.9, 131.8, 130.6(2C), 129.1(2C), 128.6, 127.0(2C), 125.1, 119.7, 119.6, 42.0, 35.6, 13.6; MS (EI), m/z (relative intensity): 396 (M^+ , 7), 287 (100), 259 (52), 231 (14); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClN}_4\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 397.0884; found: 397.0894.

2-Chloro-5,11-dihydro-11-ethyl-8-(3-methoxyphenylthio)-methyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one (T2)

A solution of 3-methoxythiophenol (0.14 mL, 1.14 mmol) in DMF (2 mL) was treated with 60% sodium hydride (76 mg, 1.88 mmol) under a N_2 atmosphere. After 10 minutes, a solution of **15** (122

mg, 0.38 mmol) in DMF (3 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 1 hour. The reaction was quenched by addition of water and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, then dried (Na_2SO_4) and concentrated under reduced pressure. The residue was recrystallized from hexane/EtOAc to afford **T2** (140 mg, 87%) as yellow crystals, m.p. 188–189°C; FTIR (KBr) ν_{max} : 3181, 2965, 1662, 1589, 1458, 1385, 1229, 1044, 767, 693; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 9.56 (br s, 1H), 8.30 (d, $J=2.2$, 1H), 8.08 (d, $J=2.2$, 1H), 7.33 (d, $J=8.1$, 1H), 7.18 (t, $J=8.1$, 1H), 7.04 (d, $J=8.1$, 1H), 6.90–6.72 (m, 3H), 4.06 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 1.23 (t, $J=7.3$, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 168.8, 159.9, 157.9, 151.8(2C), 145.1, 141.2, 136.2, 131.8, 129.9, 128.6, 125.2, 122.6, 119.7, 119.6, 115.8, 112.9, 55.3, 42.1, 35.4, 13.6; MS (EI), m/z (relative intensity): 426 (M^+ , 6), 287 (100), 259 (57), 231 (15); HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 427.0990; found: 427.0988.

Biological methods: Materials

DA5 (HIV-1 subtype E) cells were obtained from HIV-1 infected pregnant women. These viruses were X4 strain with the syncytium-inducing (SI) formation property, causing morphological changes (cytopathic effect) in infected cells. White blood cells: peripheral blood mononuclear cells were obtained from blood donors and used for HIV virus isolation. H9 T-lymphoblastoid cell line obtained from Medical Research Centre, UK, was used to prepare the viral stock. C8166 T-lymphoblastoid cell line was used to test the activities of bioactive compounds in all experiments. Bioactive compounds were dissolved in 70–95% DMSO. Three anti-retroviral drugs (reverse transcriptase inhibitors) manufactured by the Government Pharmaceutical Organization (GPO), including ANTIVIR (100 mg AZT), GPO-vir (containing 200 mg nevirapine, 150 mg lamivudine, and 30 mg stavudine), and NERAVIR (200 mg nevirapine), were used as controls in all experiments. All experiments were performed in duplicate.

Toxicity of bioactive compounds, anti-retroviral drugs, and DMSO against white blood cell culture.

The solutions of the bioactive compounds and anti-retroviral drugs (diluted to 10, 1, and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the culture medium), as well as DMSO (diluted to 1%, 0.1%, and 0.01%), were dispensed into tissue culture plates in duplicates. C8166 cells were then added into each well and examined everyday for 7 days. Moreover, the cells were counted, stained with 1% trypan blue in order to examine for cell viability under the microscope on day 0, day 4, and day 7, and compared with drug-free control cells.

Virustatic and virucidal tests

The viruses were used at 100 TCID₅₀ (50% tissue cell infectivity dose) level, which was determined by diluting the viruses in quadruplicates, and the potency of the viruses was calculated using Karber equation. Additionally, the following controls were used in all experiments: control viruses diluted to 100, 10, and 1 TCID₅₀ in order to verify that the viruses used in all experiments were at 100 TCID₅₀ level. C8166 control cells were used for cell examination throughout the experiments. Bioactive control was used to investigate the effect of the compounds on the cells. DMSO control was

used to evaluate the effect of DMSO on virus proliferation in the cells. Anti-retroviral drug controls (AZT, GPO-vir, and Nevirapine) were used to investigate the effect of the drugs on the cells.

Virustatic test

C8166 cells were incubated with the solutions of bioactive compounds for 30 minutes. The viruses were then added into each well at 100 TCID₅₀ level, and the samples were further incubated for 3 hours. After that, the cells were washed 4 times, and maintained for 7 days. The culture medium was changed on day 3, and the cells were examined for cytopathic effect on days 4 and 7. Additionally, the level of the p24 antigen in the culture medium was determined on day 7 using commercially-available ELISA kits in order to determine the EC₅₀, which was the concentration of each bioactive compound that inhibited the viruses by 50%.

Virucidal test

The viruses at 100 TCID₅₀ level were incubated with the solutions of bioactive compounds for 1 hour. C8166 cells were then added to each well, and the samples were further incubated for 1 hour. After that, the cells were washed 4 times, and maintained for 7 days. The culture medium was changed on day 3, and the cells were examined for cytopathic effect on days 4 and 7. Additionally, the level of the p24 antigen in the culture medium was also determined on day 7 using commercially-available ELISA kits.

Acknowledgements

We are grateful to the Thailand Research Fund (DBG4780009 for S.T., BRG4780007 for S.H., TRG4580072 for P.P. and RGJ-Ph.D. Program (3.C.KU/45/B.1) for P.S.) and to the Ministry of Education for financial support. Grateful acknowledgement is also due to Dr. Poonsakdi Ploypradith, Chulabhorn Research Institute, for his valuable suggestions.

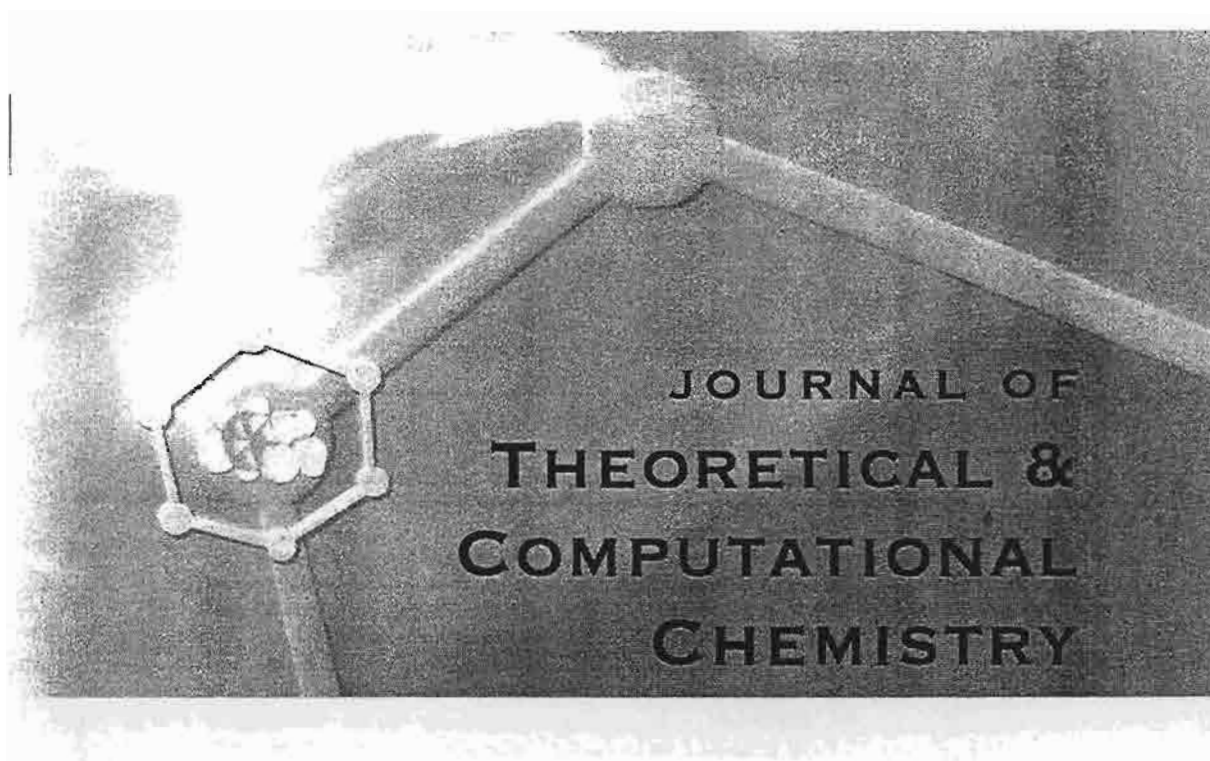
References

1. Loveday, C. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **2001**, *26 (Suppl)*, S10-S24.
2. Deeks, S. G. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **2001**, *26 (Suppl)*, S25-S33.
3. Wainberg, M. A.; Friedland, G. Public health implications of antiretroviral therapy and HIV drug resistance. *J. Am. Med. Assoc.* **1998**, *279*, 1977-1983.
4. Volberding, P.; Lange, J. International perspectives on antiretroviral resistance. Introduction. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **2001**, *26 (Suppl)*, S1-S2.
5. Cooley, L. A.; Lewin, S. R. HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *J. Clin. Virol.* **2003**, *26*, 121-132.
6. De Clercq, E. Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* **2004**, *30*, 115-133.

7. Hargrave, K. D.; Proudfoot, J. R.; Grozinger, K. G.; Cullen, E.; Kapadia, S. R.; Patel, U. R.; Fuchs, V. U.; Mauldin, S. C.; Vitous, J.; Behnke, M. L.; Klunder, J. M.; Pal, K.; Skiles, J. W.; McNeil, D. W.; Rose, J. M.; Chow, G. C.; Skoog, M. T.; Wu, J. C.; Schmidt, G.; Engel, W. W.; Eberlein, W. G.; Saboe, T. D.; Campbell, S. J.; Rosenthal, A. S.; Adams, J. Novel non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. 1. Tricyclic pyridobenzo- and dipyrindiazepinones. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2231-2241.
8. O'Meara, J. A.; Yoakim, C.; Bonneau, P. R.; Bos, M.; Cordingley, M. G.; Deziel, R.; Doyon, L.; Duan, J.; Garneau, M.; Guse, I.; Landry, S.; Malenfant, E.; Naud, J.; Ogilvie, W. W.; Thavonekham, B.; Simoneau, B. Novel 8-substituted dipyrindiazepinone inhibitors with a broad-spectrum of activity against HIV-1 strains resistant to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5580-5588.
9. Cywin, C. L.; Klunder, J. M.; Hoermann, M.; Brickwood, J. R.; David, E.; Grob, P. M.; Schwartz, R.; Pauletti, D.; Barringer, K. J.; Shih, C. -K.; Sorge, C. L.; Erickson, D. A.; Joseph, D. P.; Hattox, S. E. Novel nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. 8. 8-Aryloxymethyl- and 8-arylthiomethyldipyrindiazepinones. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2972-2984.
10. Pungpo, P.; Hannongbua, S.; Wolschann, P. Hologram quantitative structure-activity relationships investigations of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1661-1677.
11. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.

Sample availability: Contact the authors.

Vol. 5, No. 4 December 2006



**Conformational Analysis of Nevirapine
in Solutions Based on NMR
Spectroscopy and Quantum Chemical
Calculations**

V. Vailikhit, P. Bunsawansong, S. Techasakul
and S. Hannongbua

 **World Scientific**

NEW JERSEY • LONDON • SINGAPORE • BEIJING • SHANGHAI • HONG KONG • TAIPEI • CHENNAI

CONFORMATIONAL ANALYSIS OF NEVIRAPINE IN SOLUTIONS BASED ON NMR SPECTROSCOPY AND QUANTUM CHEMICAL CALCULATIONS

V. VAILIKHIT, P. BUNSAWANSONG, S. TECHASAKUL and S. HANNONGBUA*

Department of Chemistry, Faculty of Science
Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
*fscisph@ku.ac.th

Received 1 August 2005
Accepted 3 November 2005

The conformational analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor, nevirapine, 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one, was investigated using *ab initio* and density functional theory calculations. The fully optimized structures and rotational potential energies of the nitrogen and carbon bonds in the cyclopropyl ring (C15-N11-C17-C19, α) were examined in detail. Geometries obtained from all applied calculations show similarities to the complex structure with HIV-1 reverse transcriptase. To obtain more information on the structure, conformational minima of nevirapine, optimized at the B3LYP/6-31G** level, were calculated for the ^1H , ^{13}C , and ^{15}N -NMR chemical shifts at the B3LYP/6-311++G** level using the GIAO approach in DMSO and chloroform IEFPCM solvation models. The calculated ^1H , ^{13}C -NMR chemical shifts agree well with the experimental data, which indicates that the geometry of nevirapine in solution is similar to that of the molecule in the inhibition complex. Solvation free energies (ΔG_{sol}) of nevirapine in DMSO and chloroform were also obtained.

Keywords: Nevirapine; NMR; IR; quantum chemical calculations; GIAO; IEFPCM.

1. Introduction

HIV-1 reverse transcriptase (RT) continues to be a major target for anti-AIDS chemotherapies and has been since the early design of pharmaceutical compounds against HIV. Two groups of RT inhibitors have been extensively investigated: nucleoside-analog inhibitors (NRTIs) and non-nucleoside RT inhibitors (NNRTIs). NNRTIs are chemically diverse, generally hydrophobic, and relatively non-cytotoxic compounds. Generally, they have a butterfly-like shape and bind strongly into a pocket of HIV-1 RT. The crystal structures of HIV-1 RT itself and complexes with some different NNRTIs have been published.¹⁻¹⁰ NNRTIs such as nevirapine,¹¹ HEPT,¹² and TIBO,¹³ which are pharmacologically active, have been studied. The information of a single preferred conformation of a drug molecule in solution to the

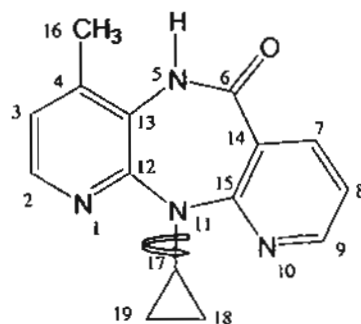


Fig. 1. Chemical structure of nevirapine and its atomic numbering.

conformational requirements of the binding site in the inhibition complex is important. It appears that the majority of HIV-1 RT inhibitors that act on the binding site show a pronounced dependence for their action on seemingly major changes in their molecular conformation.¹⁴ The role of the molecular structures of NNRTIs on HIV-1 inhibition and conformational analyses of the potent NNRTIs have been previously studied.^{15,16} Nevirapine (Fig. 1), an NNRTI which has already passed pre-clinical and clinical tests and is available on the market,¹⁷ shows a rotation of the cyclopropyl ring around the carbon nitrogen single bond (N11–C17) that determines the conformational space of nevirapine. It is found that alpha angle of cyclopropyl ring (C15–N11–C17–C19, α) plays an important role in determining the structure of nevirapine, where only a limited flexibility of the ring system exists.¹⁸ As NMR spectroscopy is a useful technique to investigate conformations of compounds because it can be used to characterize the conformation assumed by the molecule in solution that could be different in respect to the conformation assumed in the solid form, several approaches to overcome the so-called gauge-origin problem have been developed, such as GIAO (gauge including atomic orbitals),¹⁹ IGLO (individual gauge for localized orbitals),²⁰ and LORG (localized orbitals-localized origin).²¹ Sometimes the interpretation of experimental NMR spectra may be difficult, especially in assigning the correct conformation assumed by the molecule in analysis. The use of computational techniques can help interpret ambiguous experimental NMR spectra. As experimental NMR spectra are most commonly measured from condensed-phase samples (solutions or powders) at ambient temperature, the self-consistent reaction field (SCRF)²² method, using integral equation formalism polarized continuum model (IEFPCM),^{23,24} which solves the electrostatic solvation problem at the QM level with the aid of apparent surface charges (ASC), was expected to improve the calculated NMR chemical shifts in solution.

In the present study, conformational analysis has been performed to investigate the role of the nevirapine, 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one, structure. The nevirapine structure and the atomic numbering used in this study are shown in Figs. 1 and 2. Furthermore, the ¹H, ¹³C, and ¹⁵N-NMR chemical shifts in DMSO and chloroform solvation models of

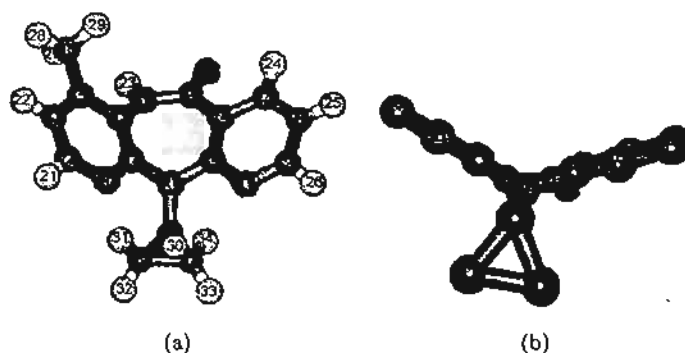


Fig. 2. (a) Three-dimensional structure of nevirapine and (b) butterfly-like-shape of nevirapine.

structural energy minima were calculated at the B3LYP/6-311++G**//B3LYP/6-31G** level and compared to the experimental data in order to conceptualize the structure of the molecule in solutions. The solvation free energies (ΔG_{sol}) of nevirapine in DMSO and chloroform were also studied. The information of the three-dimensional structures of nevirapine based on this theoretical study will be useful in structure activity relationship studies and the design of new potent NNR-TIs compounds.

2. Methods

2.1. Experimental

Nevirapine was extracted from Viramune® and recrystallized from CH_2Cl_2 . ^1H -NMR spectra were recorded in deuterated dimethyl-*d*6 sulfoxide (DMSO-*d*6) and CDCl_3 with a Varian INOVA 400 spectrometer operating at 300 K. The typical spectral conditions used were a spectral width of 6387.7 Hz and 16–64 scans per spectrum. Digital resolution was 0.195 Hz per point. Deuterium from the solvent was used as the lock signal and TMS as the internal standard. Nevirapine concentration was 10–20 mg ml^{-1} .

^{13}C proton decoupled spectra were recorded with the same spectrometer, also in DMSO-*d*6 and CDCl_3 . The spectral conditions used were a spectral width of 25157.2 Hz and 2560–25,600 scans per spectrum. The concentration was 20–30 mg ml^{-1} , and the digital resolution was 0.7677 Hz per point.

2.2. Methods of calculations

The starting geometry of nevirapine was obtained from X-ray crystallographic data at 2.2 Å resolution of the enzyme-inhibitor complex structure (1vrt).²⁵ First, the conformational analysis of nevirapine was determined in the gas phase with a step-size of 10° of rotational bond between the nitrogen atom of the tricyclic system and the carbon atom of the cyclopropyl group (C15–N11–C17–C19, α) by keeping the α angle constant based on *ab initio* at HF/3-21G and HF/6-31G level, and DFT

at the B3LYP/6-31G** level. Second, full geometrical optimization was performed by all the methods of calculations and all possible alpha conformations were fully optimized at the B3LYP/6-31G** level. Theoretical calculations were compared to the experimental geometry, in particular to X-ray diffraction data of the reverse transcriptase and nevirapine complex, as available from the PDB (1vrt).

The ^1H , ^{13}C , and ^{15}N chemical shielding constants, and $\sigma(^1\text{H}_i)$, $\sigma(^{13}\text{C}_i)$, and $\sigma(^{15}\text{N}_i)$ in DMSO and chloroform were calculated by the GIAO method at the B3LYP/6-311++G** level of theory utilizing the SCRF method with IEFPCM on the structure optimized at the B3LYP/6-31G** level. The ^1H and ^{13}C chemical shifts $\delta(^1\text{H}_i)$ and $\delta(^{13}\text{C}_i)$ are referred to the usual standard tetramethylsilane (TMS) and the ^{15}N chemical shifts $\delta(^{15}\text{N}_i)$ are referred to nitromethane through the relation

$$\delta(^1\text{H}_i) = \sigma(^1\text{H})_{\text{TMS}} - \sigma(^1\text{H}_i)_{\text{Nevirapine}}, \quad (1)$$

$$\delta(^{13}\text{C}_i) = \sigma(^{13}\text{C})_{\text{TMS}} - \sigma(^{13}\text{C}_i)_{\text{Nevirapine}}, \quad (2)$$

$$\delta(^{15}\text{N}_i) = \sigma(^{15}\text{N})_{\text{nitromethane}} - \sigma(^{15}\text{N}_i)_{\text{Nevirapine}}. \quad (3)$$

To give accurate chemical shifts, the isotropic shielding constant of hydrogen and carbon in TMS, $\sigma(^1\text{H})_{\text{TMS}}$ and $\sigma(^{13}\text{C})_{\text{TMS}}$, and the isotropic shielding constant of nitrogen in nitromethane $\sigma(^{15}\text{N})_{\text{nitromethane}}$ were calculated at the same computation level of the nevirapine compound. In addition, solvation energies of nevirapine were calculated on the optimized geometries. For the IEFPCM model, the solvent is assumed to be a continuous medium with a dielectric constant ϵ that surrounds a cavity, adjusted to fit the shape of the solute molecule to afford more accurate solvation energies. The dielectric constants for DMSO ($\epsilon = 46.7$) and chloroform ($\epsilon = 4.9$) were used in the calculations. The calculated ^1H and ^{13}C -NMR chemical shifts were compared to experimental data. These calculations were done using Gaussian03²⁶ on a 2.53 GHz Pentium IV PC running on Redhat Linux 9.

3. Results and Discussion

The determination of conformational minima of nevirapine where the dihedral angles determine the position of the cyclopropyl ring (C15-N11-C17-C19, α) was analyzed by using HF/3-21G, HF/6-31G, and B3LYP/6-31G** methods as shown in Fig. 3. From the results, it can be seen that all the methods of calculations lead to the same conformational minimum where the dihedral angle α is equal to 220°. Moreover, at α angles around 100° and 340°, two other energy minima can be observed, with not too high energy barriers between them (2–3 kcal/mol).

The conformation of nevirapine was fully optimized from the X-ray crystallographic starting geometry, based on different methods, and also the three conformational minima at $\alpha = 100^\circ$, 220° , and 340° from the conformation analysis were fully optimized at the B3LYP/6-31G** level. The obtained structural parameters with the lowest energy conformation calculated were compared with X-ray diffraction data of nevirapine complex with RT and are presented in Table 1.

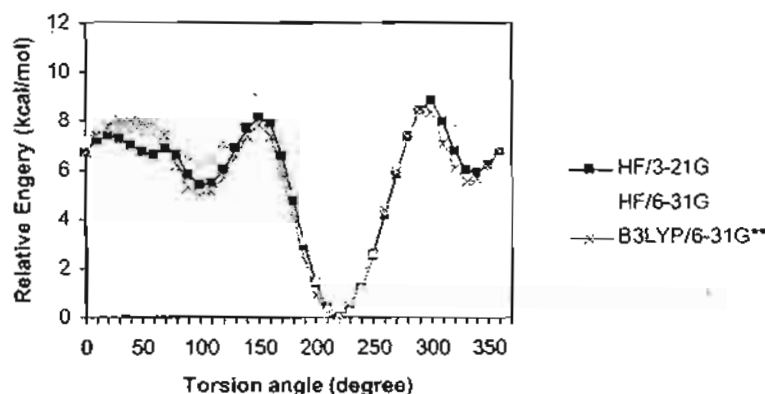


Fig. 3. Rotational potential (kcal/mol) of dihedral angle α obtained from the HF/3-21G level, the HF/6-31G level, and the B3LYP/6-31G** level of calculations.

This indicates that all considered methods provide good results for the torsional angles of the full optimization of the starting geometry obtained from X-ray crystallographic data.^{27,28} For the full optimization of the starting geometries of each conformational minima of nevirapine at $\alpha = 100^\circ$, 220° , and 340° at the B3LYP/6-31G** level, it shows that the energy minimum at $\alpha = 217.4^\circ$ ($\alpha_{\text{Expt.}} = 208.5^\circ$) from the $\alpha = 220^\circ$ starting geometry gives the smallest standard deviation (7.7), and it gives the same optimum structure of the full optimization at the B3LYP/6-31G** level. Superimposition of the geometry optimization at the B3LYP/6-31G** level on the crystal structure of nevirapine in the complex shows good agreement (root mean square deviation of 0.08). From these results, it can be seen that the dihedral angle α is restricted to the one minimum at $\alpha = 217.4^\circ$. Considering the position of the energy minimum at $\alpha = 217.4^\circ$ in more detail and by comparing to the experimental values obtained by X-ray investigation, it shows that the calculated values are nearly the same as the experimental ones. This can be seen to suggest that the conformation of nevirapine in the inhibition complex is rather close to its energy minimum conformation.

To test the correlation between the conformational analysis results and structures in solution, the NMR shifts of nevirapine in solution were calculated. The ^1H and ^{13}C -NMR chemical shifts of the three conformational minima were calculated using DMSO and chloroform solvation models and compared to experimental results. Comparison between our experimental data to the previously reported experimental ^1H -NMR chemical shifts for nevirapine in DMSO²⁹ and ^{13}C -NMR chemical shifts in CDCl_3 ³⁰ showed standard deviations of about 0.01 and 0.02 for the ^1H and ^{13}C -NMR chemical shifts, respectively.

The NMR calculations typically benefit from an accurate geometry and a large basis set such as at the 6-311++G** level of the theory. Moreover, for the large basis sets, errors for ^1H chemical shifts could be consistently less than 1 ppm and

Table 1. Comparison of selected torsion angles in degrees of the fully optimized geometries of nevirapine, obtained by different methods and three different starting values of alpha angle compared to experimental X-ray crystallographic data.

Torsion Angle	Expt.	Starting Geometry Obtained from X-ray Crystallographic Data ^a			Starting Geometry Obtained from $\alpha = 100$ $\alpha = 220$ $\alpha = 340$		
		3-21G	HF/6-31G	B3LYP/6-31G**	B3LYP/6-31G**	B3LYP/6-31G**	B3LYP/6-31G**
O20-C6-C14-C7	30.0	21.1	24.6	24.1	21.2	19.2	23.4
C12-N11-C17-C19	68.7	69.6	69.1	73.3	71.2	305.4	179.5
C12-N11-C17-C18	136.8	137.7	138.1	142.0	139.9	22.8	257.1
C14-C15-N11-C17	168.3	154.8	153.1	137.0	159.9	152.0	151.5
C13-C12-N11-C17	200.1	208.3	209.3	206.9	205.4	215.2	215.2
C15-N11-C17-C19	208.5	220.6	220.1	216.4	217.4	101.8	334.3
C15-N11-C17-C18	276.6	288.7	289.7	285.1	286.1	175.7	51.9
C6-N5-C13-C14	144.4	135.8	137.6	131.1	134.8	129.5	135.9
N5-C6-C14-C7	212.9	202.2	205.4	204.1	201.1	197.9	204.2
C15-N11-C12-N1	238.8	237.6	238.1	243.3	238.0	239.2	236.5
C12-N11-C15-N10	126.7	127.4	126.0	122.2	127.9	132.4	126.8
SD ^b		9.0	8.7	8.3	7.7	95.8	96.8

^aData obtained from Refs. 27 and 28 with a resolution of 2.2 Å.^bStandard deviation (SD) = $[\sum (X_{\text{Calc}} - X_{\text{Expt}})^2 / n - 1]^{1/2}$.

Table 2. Comparison of experimental and calculated ^1H -NMR chemical shifts (ppm) at different α angles (degree) of the cyclopropyl ring (C15-N11-C17-C19) calculated at the B3LYP/6-311++G**//B3LYP/6-31G** level with DMSO and chloroform IEFPCM solvation models.

^1H -NMR	Chemical Shifts δ (ppm) in DMSO				Chemical Shifts δ (ppm) in Chloroform			
	Expt.	$\alpha = 101.8$	$\alpha = 217.4$	$\alpha = 334.3$	Expt.	$\alpha = 101.8$	$\alpha = 217.4$	$\alpha = 334.3$
21H	8.06	8.40	8.59	8.59	8.16	8.33	8.53	8.54
22H	7.04	7.52	7.56	7.42	6.94	7.36	7.40	7.25
24H	8.00	8.67	8.63	8.55	8.11	8.62	8.58	8.50
25H	7.17	7.43	7.51	7.46	7.07	7.29	7.36	7.31
26H	8.50	8.98	8.98	8.79	8.54	8.91	8.90	8.70
27H	2.32	2.43	2.36	2.43	2.41	2.38	2.30	2.37
28H	2.32	2.26	2.27	2.29	2.41	2.21	2.22	2.24
29H	2.32	2.41	2.33	2.43	2.41	2.42	2.33	2.43
30H	3.61	3.41	3.80	3.26	3.77	3.35	3.84	3.18
31H	0.33	1.96	0.46	1.74	0.50	2.01	0.42	1.75
32H	0.86	0.83	0.98	0.48	1.00	0.82	0.95	0.43
33H	0.86	0.50	1.02	0.77	1.00	0.46	1.00	0.75
34H	0.33	1.42	0.48	2.11	0.50	1.41	0.46	2.16
SD ^a		0.65	0.34	0.73		0.60	0.27	0.68

^aStandard deviation (SD) = $[\sum(X_{\text{Cal.}} - X_{\text{Expt.}})^2/n - 1]^{1/2}$.

Table 3. Comparison of experimental and calculated ^{13}C -NMR chemical shifts (ppm) at different α angles (degree) of the cyclopropyl ring (C15-N11-C17-C19) calculated at the B3LYP/6-311++G**//B3LYP/6-31G** level with DMSO and chloroform IEFPCM solvation models.

^{13}C -NMR	Chemical Shifts δ (ppm) in DMSO				Chemical Shifts δ (ppm) in Chloroform			
	Expt.	$\alpha = 101.8$	$\alpha = 217.4$	$\alpha = 334.3$	Expt.	$\alpha = 101.8$	$\alpha = 217.4$	$\alpha = 334.3$
2C	140.73	151.77	152.22	153.62	140.36	151.26	151.87	153.23
3C	120.91	129.29	128.80	129.06	120.22	128.55	128.04	128.30
4C	140.01	148.05	146.99	146.87	139.47	146.93	145.71	145.58
6C	167.02	178.08	176.74	177.11	168.85	177.25	175.96	176.28
7C	143.59	149.99	149.39	149.37	144.31	149.63	148.09	149.07
8C	119.35	124.03	124.88	124.92	118.97	123.41	124.21	124.28
9C	151.33	161.73	161.83	160.88	152.10	161.11	161.22	160.16
12C	154.20	159.12	162.27	162.41	153.95	159.15	162.24	162.34
13C	124.92	135.69	135.13	134.67	124.90	135.47	134.76	134.31
14C	122.27	125.81	126.81	128.18	122.08	125.54	126.53	128.02
15C	159.99	170.54	169.83	167.91	160.55	170.23	169.58	167.71
16C	17.57	19.80	19.73	20.02	17.80	19.78	19.70	19.99
17C	29.29	42.65	35.64	43.27	29.61	42.72	35.59	43.40
18C	8.52	1.47	13.24	8.97	8.82	1.50	13.26	9.07
19C	8.75	9.75	12.57	0.80	9.11	9.83	12.60	0.90
SD ^a		8.65	7.93	8.71		8.10	6.43	8.22

^aStandard deviation (SD) = $[\sum(X_{\text{Cal.}} - X_{\text{Expt.}})^2/n - 1]^{1/2}$.

sometimes less than 0.10 ppm.³¹ Therefore, in this study, the chemical shifts were calculated at the B3LYP/6-311++G** level using the SCRF-IEFPCM solvation model and used the corresponding at the B3LYP/6-31G** level for optimizing the structure. The comparison of chemical shifts between experimental and calculated ^1H and ^{13}C -NMR chemical shifts are presented in Tables 2 and 3.

As expected, it was found that the optimum geometry at $\alpha = 217.4^\circ$ shows an excellent agreement between calculated ^1H chemical shifts and experimental data, except the ^1H chemical shift of the 23H atom attached to the nitrogen atom of the seven membered ring, which was not observed in the measured NMR spectra. Because this proton is an acidic proton, hydrogen bonding strongly influences the electronic environment of this proton in solution, and hence, it is difficult to observe the chemical shift of this proton. The 30H, 31H, 32H, 33H, and 34H calculated chemical shifts that are influenced by the rotation around the alpha angle, are completely different at $\alpha = 101.8^\circ$ and $\alpha = 334.3^\circ$, but similar at $\alpha = 217.4^\circ$, to the experimental data. The same with the 17C, 18C, and 19C calculated chemical shifts, in that they are similar to the experimental data only at $\alpha = 217.4^\circ$. It can be seen that the chemical shifts of cyclopropyl rings are very sensitive to the rotation around the alpha angle. Plots of the ^1H - and ^{13}C -NMR chemical shifts in DMSO and chloroform as calculated against experimental data are shown in Fig. 4. With $\alpha = 217.4^\circ$, correlation coefficients are $R^2 = 0.991$ for ^1H -NMR in chloroform, and $R^2 = 0.999$ for ^1H -NMR in DMSO and ^{13}C -NMR in both solvents. This shows

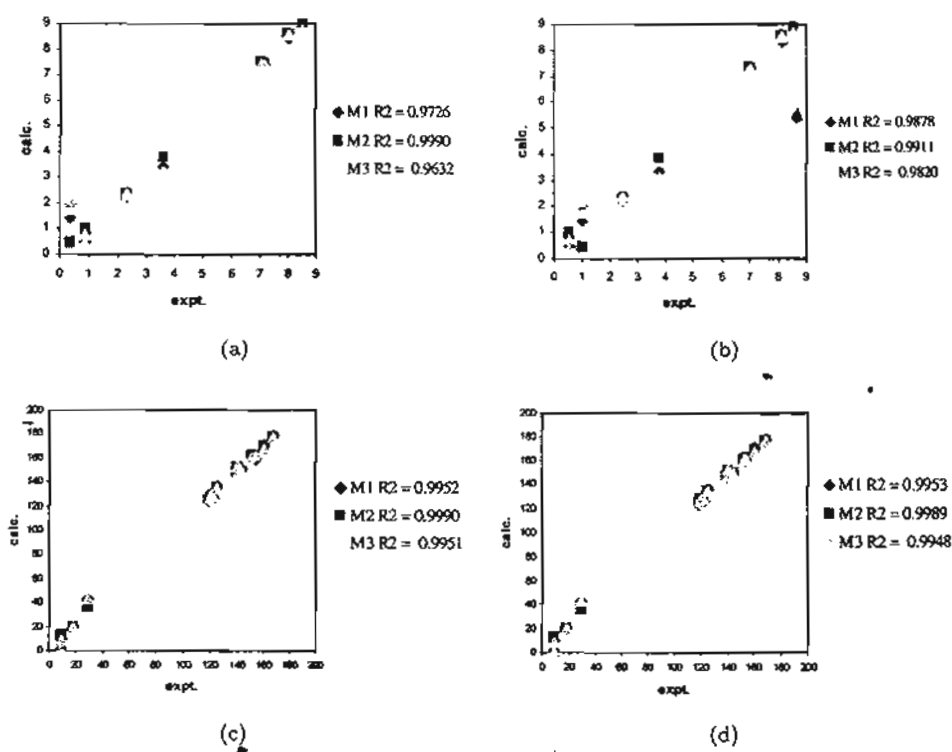


Fig. 4. Correlation plots between calculated and experimental chemical shifts (ppm) for $\alpha = 101.8$ (M1), $\alpha = 217.4$ (M2), and $\alpha = 334.3$ (M3): (a) ^1H -NMR chemical shifts in DMSO, (b) ^1H -NMR chemical shifts in chloroform, (c) ^{13}C -NMR chemical shifts in DMSO, and (d) ^{13}C -NMR chemical shifts in chloroform.

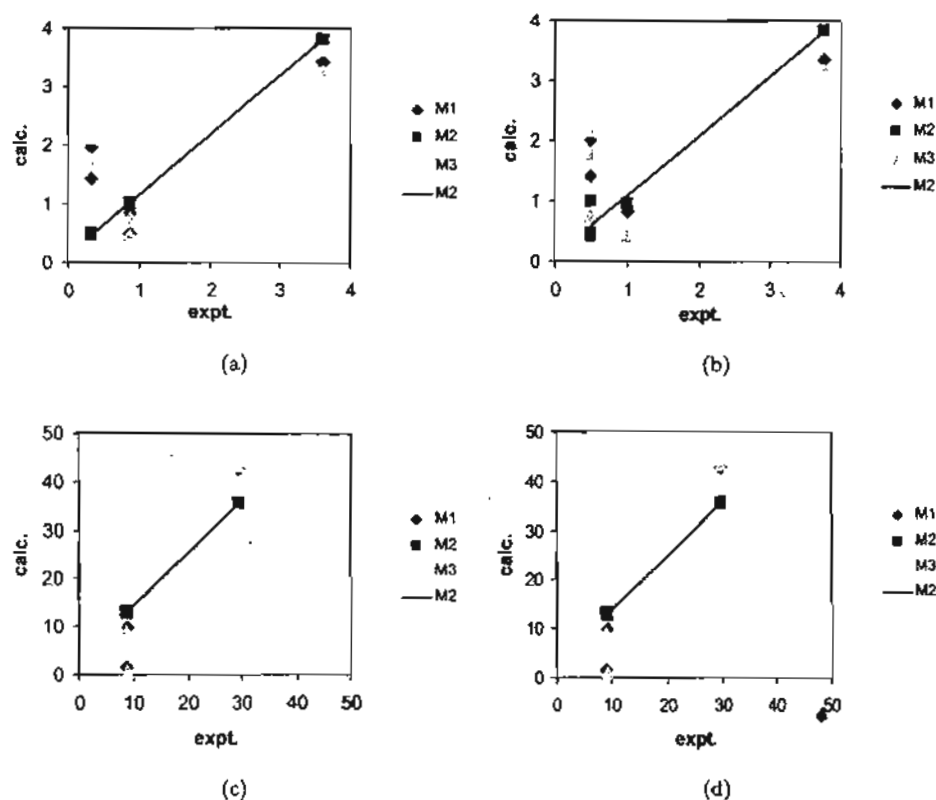


Fig. 5. Correlation plots between calculated and experimental chemical shifts of 30H, 31H, 32H, 33H, 34H, 17C, 18C, and 19C for $\alpha = 101.8$ (M1), $\alpha = 217.4$ (M2), and $\alpha = 334.3$ (M3): (a) ^1H -NMR chemical shifts in DMSO, (b) ^1H -NMR chemical shifts in chloroform, (c) ^{13}C -NMR chemical shifts in DMSO, and (d) ^{13}C -NMR chemical shifts in chloroform.

good agreement and the presence of a conformation of nevirapine in DMSO and chloroform solutions consistent with the optimized geometry at a dihedral angle α of about 217.4° .

To investigate in more detail, the plots between calculated and experimental chemical shifts of protons and carbons located in the cyclopropyl ring 30H, 31H, 32H, 33H, 34H, 17C, 18C, and 19C at different α angles in DMSO and chloroform were considered. From the plots in Fig. 5, it is obviously seen that the rotation around α angle effects the shifts of atoms in the cyclopropyl ring, and it shows the best agreement between calculated and experimental chemical shifts at $\alpha = 217.4^\circ$.

The calculated free energy changes of solvation of nevirapine at all three α conformations are shown in Table 4. The solvation free energy (ΔG_{sol}) is defined as the free energy change to transfer a molecule from gas to solvent. The ΔG_{sol} can be considered to have three components: ΔG_{elec} , ΔG_{cav} , and ΔG_{dis} and ΔG_{rep} .

Table 4. Calculated energies of nevirapine at the B3LYP/6-311++G** B3LYP/6-31G** level in the gas phase and solution.^a

Nevirapine	$\Delta E_{\text{gasphase}}$	ΔE_{iefpcm}	ΔG_{sol}^b	ΔG_{elec}	ΔG_{cav}	ΔG_{dis}	ΔG_{rep}
DMSO, $\epsilon = 46.7$							
$\alpha = 101.8^\circ$	5.53	6.13	-1.18	-11.44	32.92	-24.12	1.46
$\alpha = 217.4^\circ$	0	0	-1.77	-12.25	33.07	-24.07	1.49
$\alpha = 334.3^\circ$	6.03	6.21	-1.59	-11.85	32.94	-24.14	1.46
CDCl ₃ , $\epsilon = 4.9$							
$\alpha = 101.8^\circ$	5.53	5.85	-0.13	-8.07	24.77	-17.79	0.95
$\alpha = 217.4^\circ$	0	0	-0.44	-8.55	24.88	-17.74	0.97
$\alpha = 334.3^\circ$	6.03	6.11	-0.37	-8.31	24.79	-17.80	0.95

^aEnergies (E) and all free energy changes (ΔG) are in kcal/mol.^b $\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{cav}} + \Delta G_{\text{dis}} + \Delta G_{\text{rep}}$.Table 5. ¹⁵N-NMR chemical shifts (ppm) at different α angles (degree) of the cyclopropyl ring (C15–N11–C17–C19) calculated at the B3LYP/6-311++G**/B3LYP/6-31G** level with DMSO and chloroform IEFPCM solvation models.

¹⁵ N-NMR	Chemical Shifts δ (ppm) in DMSO			Chemical Shifts δ (ppm) in Chloroform		
	$\alpha = 101.8$	$\alpha = 217.4$	$\alpha = 334.3$	$\alpha = 101.8$	$\alpha = 217.4$	$\alpha = 334.3$
1N	-99.75	-108.52	-105.25	-100.92	-101.67	-98.82
5N	-270.50	-272.70	-272.32	-274.68	-271.04	-270.66
10N	-105.18	-107.65	-104.27	-105.78	-101.82	-100.13
11N	-291.61	-280.78	-297.45	-294.38	-277.47	-294.09

where ΔG_{elec} stands for the electrostatic component, ΔG_{cav} is the free energy required to form the solute cavity within the solvent, ΔG_{dis} and ΔG_{rep} are the dispersion and repulsion contribution (van der Waals interaction between the solute and the solvent).²¹ It is shown that the different α conformational angles present different energies in gas phase and in solution models. The range of ΔE of nevirapine in gas phase is between 5.53 and 6.03 kcal/mol and the range of ΔE of nevirapine in DMSO and chloroform IEFPCM models are 6.13–6.21 and 5.85–6.11-kcal/mol, respectively. As expected, different α angles show different ΔG_{sol} values. It can be concluded that the rotational α angle influences the solvation energies of nevirapine in DMSO and chloroform.

As ¹⁵N-NMR chemical shifts are very sensitive to environmental changes, considering the ¹⁵N-NMR chemical shifts of nevirapine at all three conformational angles was of great interest. The prediction of the ¹⁵N-NMR chemical shifts is shown in Table 5. The results indicate that 1N, 10N, and 11N were affected by the rotational angle. This is especially so for 11N, which forms the single bond to carbon (N11–C17), which rotates, and shows completely different chemical shifts at the three different α angles. The ranges of 11N chemical shifts are -280.78 to -297.45 ppm in DMSO and -277.47 to -294.38 ppm in chloroform solutions. In contrast, 5N, being distant from the cyclopropyl ring, has chemical shifts that do not seem

to be much affected. As there are no ^{15}N -NMR experimental data available, due to its sensitivity and instrumentation limitations, calculating ^{15}N -NMR chemical shifts of nevirapine is a convenient choice for predicting and studying ^{15}N -NMR chemical shifts.

4. Conclusions

The conformational analysis of nevirapine was performed based on quantum chemical calculations, *ab initio*, and density functional theory methods. The optimized local minima structure at the B3LYP/6-31G** level, regarding the energetic structure, indicates that the dihedral angle $\alpha = 217.4^\circ$. The ^1H - and ^{13}C -NMR chemical shift calculations of nevirapine in DMSO and chloroform solutions agree well with the experimental results and show an almost identical structure to the geometry of the molecule in the complex with HIV-1 RT. The predicted ^{15}N -NMR chemical shifts of nevirapine in DMSO and chloroform are presented. The chemical shifts of atoms in the cyclopropyl ring and 1N, 10N, and 11N are affected by the rotation of the alpha conformational angle. Solvation free energies (ΔG_{sol}) of nevirapine in DMSO and chloroform show the different values due to the different of alpha angles.

Acknowledgments

This work was supported by the Thailand Research Fund (BRG 4780007 and DBG 4780009). The Commission of Higher Education and the Postgraduate on Education and Research in Petroleum and Petrochemical Technology (ADB-MUA) are gratefully acknowledged for financial support and research facilities. Thesis-in-aid of the Graduate School is acknowledged for partial financial support. The authors thank LCAC, Department of Chemistry, Faculty of Science, and the computing center, KU, for providing computing facilities throughout this work.

References

1. Ren J, Esnouf RM, Hopkins AL, Warren J, Balzarini J, Stuart DI, Stammers DK, *Biochemistry* 37:14394, 1998.
2. Kohlstaedt A, Wang J, Friedman MJ, Rice AP, Steitz TA, *Science* 256:1783, 1992.
3. Ren J, Esnouf RM, Hopkins AL, Stuart DI, Stammers DK, *J Med Chem* 42:3845, 1999.
4. Das K, Ding J, Hsiou Y, Clark Jr AD, Moereels H, Koymans L, Andries K, Pauwels R, Janssen PAJ, Boyer PL, Clark P, Smith Jr RH, Kroeger Smith MB, Michejda CJ, Hughes SH, Arnold E, *J Mol Biol* 264:1085, 1996.
5. Stammers DK, Somers DO, Ross CK, Kirby I, Ray PH, Wilson JE, Norman M, Ren JS, Esnouf RM, German EF, Jones EY, Stuart DI, *J Mol Biol* 242:586, 1994.
6. Hopkins AL, Ren J, Esnouf RM, Willcox BE, Jones EY, Ross C, Miyasaka T, Walker RT, Tanaka H, Stammers DK, Stuart DI, *J Med Chem* 39:1589, 1996.
7. Hsiou Y, Ding J, Das K, Clark AD, Hughes SH, Arnold E, *Structure* 4:853, 1996.
8. Jaeger J, Smerdon SJ, Wang J, Boisvert CD, Steitz AT, *Structure* 2:869, 1994.
9. Najmudin S, Cote ML, Sun D, Yohannan S, Montano SP, Gu J, Georgiadis MM, *J Mol Biol* 296:613, 2000.

10. Ding J, Das K, Moereels H, Koymans L, Andries K, Janssen PAJ, Hughes SH, Arnold E, *Nat Struct Biol* 2:407, 1995.
11. Merluzzi VJ, Hargrave KD, Labadia KJ, Grozinger K, Skoog M, Wu JC, Shih C, Shih CK, Eckner K, Hattox S, Adams J, Rosenthal AS, Faanes R, Eckner RJ, Koup RA, Sullivan LL, *Science* 250:1411, 1990.
12. Tanaka H, Takashima H, Ubasawa M, Sekiya K, Nitta I, Baba M, Shigeta S, Walker RT, De Clercq E, Miyasaka T, *J Med Chem* 35:4713, 1992.
13. Pauwels R, Andries K, Desmyter J, Schols D, Kukla MJ, Breslin HJ, Raeymaeckers A, Vangelder J, Wostenborghs R, Heykants J, Schellekens K, Janessen MAC, De Clercq E, Janssen PAJ, *Nature* 343:470, 1990.
14. De Clercq E, *AIDS Res Hum Retroviruses* 8:119, 1992.
15. Lawtrakul L, Hannongbua S, Beyer A, Wolschann P, *Monatshefte Chem* 130:1347, 1999.
16. Saen-oon S, Hannongbua S, Wolschann P, *J Chem Inf Comput Sci* 43:1412, 2003.
17. <http://www.rxlist.com/cgi/generic2/nevira.htm>.
18. Hannongbua S, Prasithichokekul S, Pungpo P, *J Comput Aided Mol Des* 15:997, 2001.
19. Wolinski K, Hinton JF, Pulay P, *J Am Chem Soc* 112:8215, 1990.
20. Schindler M, Kutzelnigg W, *J Chem Phys* 76:1919, 1982.
21. Hansen AE, Bouman TD, *J Chem Phys*, 82:5035, 1985.
22. Cramer CJ, Truhlar DG, in Lipkowitz KB, Boyd DB (eds.), *Review in Computational Chemistry*, Vol. 6, VCH, New York, pp. 1-72, 1995.
23. Tomasi J, Mennucci B, Cancs E, *J Mol Struct (Theorchem)* 464:211, 1999.
24. Mennucci B, Martinez JM, Tomasi J, *J Phys Chem A* 105:7287, 2001.
25. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE, *Nucleic Acids Res* 28:235, 2000.
26. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery Jr JA, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA, Gaussian03, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2004.
27. Ren J, Esnouf R, Garman E, Somers D, Ross C, Kirby I, Keeling J, Darby G, Jones Y, Stuart D, Stammers D, *Struct Biol* 2:293, 1995.
28. <http://alpha.vmc.uu.se/~gerard/hetero/NEV.html>.
29. Hargrave KD, Proudfoot JR, Grozinger KG, Cullen E, Kapadia SR, Petal UR, Fuchs VU, Mauldin SC, Vitous J, Behnke ML, Klunder JM, Pal K, Skiles JW, McNeil DW, Rose JM, Chow GC, Skoog MT, Wu JC, Schmidt G, Engel WW, Eberlein WG, Saboe TD, Campbell SJ, Rosenthal AS, Adams J, *J Med Chem* 34:2231, 1991.
30. Norman MH, Minick DJ, Martin GE, *J Heterocycl Chem* 30:771, 1993.
31. Vaara J, Ruud K, Vahtras O, Ågren H, Jokisaari J, *J Chem Phys* 109:1212, 1998.