**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# โครงการ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งและอันตรกิริยาที่มีต่อกรดอะมิโนใน โพรงการจับของตัวยับยั้งนอนนิวคลีโอไซด์ของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1 ด้วยระเบียบ วิธีโมเลกุลาร์ ด๊อกกิ้ง และ การคำนวณเคมีควอนตัม

**โดย ดร. พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากร และ คณะ**

**สิงหาคม 2552**

สัญญาเลขที่ MRG5080267

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

**โครงการ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งและอันตรกิริยาที่มีต่อกรดอะมิโนใน โพรงการจับของตัวยับยั้งนอนนิวคลีโอไซด์ของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1 ด้วยระเบียบ วิธีโมเลกุลาร์ ด๊อกกิ้ง และ การคำนวณเคมีควอนตัม**


| ผู้วิจัย | สังกัด | |
|---|---|---|
| 1. ดร. พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากร | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | (หัวหน้าโครงการ) |
| 2. รศ.ดร. สุภา หารหนองบัว | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | (นักวิจัยที่ปรึกษา) |



**สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย**

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

# Abstract (บทคัดย่อ)

| | |
|---|---|
| Project Code :<br>(รหัสโครงการ) | MRG5080267 |
| Project Title :<br>(ชื่อโครงการ) | (ภาษาอังกฤษ) Residue interaction energy- activity relationship of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-1 by using molecular docking and quantum chemical calculation methods<br>(ภาษาไทย) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งและอันตรกิริยาที่มีต่อกรดอะมิโนในโพรงการจับของตัวยับยั้งนอนนิวคลีโอไซด์ของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1 ด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ ด๊อกกิ้ง และ การคำนวณเคมีควอนตัม |
| Investigator :<br>(ชื่อนักวิจัย) | Patchreenart Saparpakorn<br>พัชรีนารถ ทรัพย์อาภากร |
| E-mail Address : | fscipnsk@ku.ac.th |
| Project Period :<br>(ระยะเวลาโครงการ) | 2 ปี |

Abstract:

The reverse transcriptase (RT) of the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) is the essential enzyme converting the single-stranded viral RNA genome into double-stranded proviral DNA. Non-nucleoside reversetranscriptase inhibitors (NNRTIs) are interesting for developing novel potent inhibitors because of their high sensitivity and high specificity. However, there occurs rapid development of drug resistance caused by mutation. Nowadays, novel NNRTIs influencing the mutation of HIV-1 RT are challenging. In this study, some new NNRTIs are investigated as follows; (1) A series of NNRTIs, pyrazinones, are found to active against wild-type HIV-1 RT and some of them are also active against mutant HIV-1 RT. Therefore, the specific binding mode of pyrazinones to HIV-1 RT is needed for suggesting the design of novel potent NNRTIs active against both wild and mutant HIV-1 RT. The combination of molecular docking, 3D-QSAR and quantum chemical calculations has been applied. The docked conformation of each pyrazinone is selected to construct COMFA and CoMSIA models. Both models suggest that the substituent at p-amionphenyl position prefers the steric bulky, electron-withdrawing, H-acceptor, and disfavored hydrophobic groups. In addition, the obtained interaction energies between compound no. 9 and the binding pocket by quantum chemical calculations show the important attractive interactions with Glu138(B). (2) The interaction of a HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, S-3-ethyl-7-fluoro-4-isopropoxy-carbonyl-3,4-dihydro-quinoxalin-2(1H)-one (GW420867X), with the wild type HIV-1 RT binding pocket has been analyzed by using quantum chemical calculations. Interaction energies between GW420867X and the surrounding amino acids are calculated by B3LYP and MP2 methods using 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-311G(d), and 6-311G(d,p) basis sets with BSSE. Particularly, the interaction energy with Lys101, recognized as the most important amino acid for the binding of the inhibitor, was calculated using various models, to evaluate which terminating residues have to be taken into account. The optimal results confirmed that GW420867X forms the most important attractive interaction with Lys101 via a hydrogen bond between the ammonium group and the backbone atoms of Lys101. The results are powerful to describe the binding mode of NNRTIs and suggest the design of new potent NNRTIs.

(บทคัดย่อ)

เอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญในการจำลองแบบจาก RNA ของไวรัส เป็น DNA ของไวรัส ตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์เป็นตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูง และมีความจำเพาะสูงในการจับกับเอนไซม์โดยข้อเสียของตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์คือมีการดื้อยาได้ง่ายซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ดังนั้นในการศึกษาจึงได้ทำการหาวิธีในการที่จะพัฒนาประสิทธิภาพของตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์ให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ทั้งที่ไม่มีการกลายพันธุ์และที่มีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ ดังนี้ (1) อนุพันธ์ของไพราซิโนนพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ทั้งชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์และชนิดที่มีการกลายพันธุ์ เพื่อที่จะทำการศึกษาการจับของอนุพันธ์ไพราซิโนนในบริเวณโพรงการจับและศึกษาผลของหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ไพราซิโนนที่มีต่อค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งในการศึกษานี้จะใช้การวางตัวของอนุพันธ์ไพราซิโนนด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ด๊อกกิ้งและสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทางโครงสร้างและประสิทธิภาพในการยับยั้ง ต่อจากนั้นใช้การคำนวณเคมีควอนตัมเพื่อศึกษาค่าพลังงานอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น โดยผลที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA สามารถเสนอแนวทางในการออกแบบตัวยับยั้งของอนุพันธ์ไพราซิโนนให้มีประสิทธิภาพให้ดียิ่งขึ้นโดยการเพิ่มหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง p-aminophenyl ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น, มีลักษณะเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน, ตัวรับอะตอมไฮโดรเจน, และหมู่ที่ไม่ชอบน้ำเพื่อที่จะได้มีอันตรกิริยาที่เพิ่มและผลการคำนวณพลังงานอันตรกิริยาได้บอกความสำคัญของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโครงสร้างของอนุพันธ์และ Glu138(B) (2) เพื่อศึกษาพลังงานอันตรกิริยาระหว่าง GW420867X และ กรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับ และศึกษาถึงรูปแบบของแบบจำลองที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคำนวณพลังงานอันตรกิริยาเช่น ผลของกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้เคียง, ผลของหมู่ฟังก์ชั่นที่ใช้ในการ terminate กรดอะมิโน โดยการคำนวณพลังงานอันตริกิริยาได้รวมการคำนวณ BSSE เพื่อให้ค่าพลังงานที่ได้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ค่าพลังงานที่ได้ๆจากการทำ single point calculation ด้วยระเบียบวิธี B3LYP และ MP2 ด้วย basis set 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-311G(d), and 6-311G(d,p) โดยจากโครงสร้าง X-ray crystallography พบว่าอันตรกิริยาที่สำคัญคือ Lys101 เพื่อทำการศึกษาลงไปในรายละเอียดถึงอันตรกิริยาแบบดึงดูดที่เกิดระหว่าง GW420867X และ Lys101 จึงได้ทำการศึกษาแบบจำลองที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการคำนวณพลังงานอันตรกิริยา ผลที่ได้ยืนยันว่า GW420867X มีอันตรกิริยาแบบดึงดูดกับหมู่แอมโมเนียมและโครงหลักของ Lys101 ผลการศึกษาที่ได้ทำให้แสดงถึงอันตรกิริยาที่สำคัญของตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์ที่ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 และเป็นประโยชน์เพื่อใช้ในการออกแบบยาให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น



| | |
|---|---|
| Keywords : | HIV-1 RT, NNRTI, Molecular Docking, QSAR, Quantum Chemical Calculations |
| (คำหลัก) | เอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1, ตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์, โมเลกุลาร์ด๊อกกิ้ง, การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทางโครงสร้างและประสิทธิภาพการยับยั้ง, การคำนวณทางเคมีควอนตัม |

# รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

## 1. บทคัดย่อ

Abstract:

The reverse transcriptase (RT) of the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) is the essential enzyme converting the single-stranded viral RNA genome into double-stranded proviral DNA. Non-nucleoside reversetranscriptase inhibitors (NNRTIs) are interesting for developing novel potent inhibitors because of their high sensitivity and high specificity. However, there occurs rapid development of drug resistance caused by mutation. Nowadays, novel NNRTIs influencing the mutation of HIV-1 RT are challenging. In this study, some new NNRTIs are investigated as follows; (1) A series of NNRTIs, pyrazinones, are found to active against wild-type HIV-1 RT and some of them are also active against mutant HIV-1 RT. Therefore, the specific binding mode of pyrazinones to HIV-1 RT is needed for suggesting the design of novel potent NNRTIs active against both wild and mutant HIV-1 RT. The combination of molecular docking, 3D-QSAR and quantum chemical calculations has been applied. The docked conformation of each pyrazinone is selected to construct COMFA and CoMSIA models. Both models suggest that the substituent at p-amionphenyl position prefers the steric bulky, electron-withdrawing, H-acceptor, and disfavored hydrophobic groups. In addition, the obtained interaction energies between compound no. 9 and the binding pocket by quantum chemical calculations show the important attractive interactions with Glu138(B). (2) The interaction of a HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, S-3-ethyl-7-fluoro-4-isopropoxy-carbonyl-3,4-dihydro-quinoxalin-2(1H)-one (GW420867X), with the wild type HIV-1 RT binding pocket has been analyzed by using quantum chemical calculations. Interaction energies between GW420867X and the surrounding amino acids are calculated by B3LYP and MP2 methods using 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-311G(d), and 6-311G(d,p) basis sets with BSSE. Particularly, the interaction energy with Lys101, recognized as the most important amino acid for the binding of the inhibitor, was calculated using various models, to evaluate which terminating residues have to be taken into account. The optimal results confirmed that GW420867X forms the most important attractive interaction with Lys101 via a hydrogen bond between the ammonium group and the backbone atoms of Lys101. The results are powerful to describe the binding mode of NNRTIs and suggest the design of new potent NNRTIs.

(บทคัดย่อ)

เอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญในการจำลองแบบจาก RNA ของไวรัส เป็น DNA ของไวรัส ตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์เป็นตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูง และมีความจำเพาะสูงในการจับกับเอนไซม์โดยข้อเสียของตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์คือมีการดื้อยาได้ง่ายซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ดังนั้นในการศึกษาจึงได้ทำการหาวิธีในการที่จะพัฒนาประสิทธิภาพของตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์ให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ทั้งที่ไม่มีการกลายพันธุ์และที่มีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ ดังนี้ (1) อนุพันธ์ของไพราซิโนนพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ทั้งชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์และชนิดที่มีการกลายพันธุ์ เพื่อที่จะทำการศึกษาการจับของอนุพันธ์ไพราซิโนนในบริเวณโพรงการจับและศึกษาผลของหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ไพราซิโนนที่มีต่อค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งในการศึกษานี้จะใช้การวางตัวของอนุพันธ์ไพราซิโนนด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ด๊อกกิ้งและสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทางโครงสร้างและประสิทธิภาพในการยับยั้ง ต่อจากนั้นใช้การคำนวณเคมีควอนตัมเพื่อศึกษาค่าพลังงานอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น โดยผลที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA สามารถเสนอแนวทางในการออกแบบตัวยับยั้งของอนุพันธ์ไพราซิโนนให้มีประสิทธิภาพให้ดียิ่งขึ้นโดยการเพิ่มหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง p-aminophenyl ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น, มีลักษณะเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน, ตัวรับอะตอมไฮโดรเจน, และหมู่ที่ไม่ชอบน้ำเพื่อที่จะได้มีอันตรกิริยาที่เพิ่มและผลการคำนวณพลังงานอันตรกิริยาได้บอกความสำคัญของอันตรกิริยาทีเกิดขึ้นระหว่างโครงสร้างของอนุพันธ์และ Glu138(B) (2) เพื่อศึกษาพลังงานอันตรกิริยาระหว่าง GW420867X และ กรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับ และศึกษาถึงรูปแบบของแบบจำลองที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคำนวณพลังงานอันตรกิริยาเช่น ผลของกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้เคียง, ผลของหมู่ฟังก์ชั่นที่ใช้ในการ terminate กรดอะมิโน โดยการคำนวณพลังงานอันตริกิริยาได้รวมการคำนวณ BSSE เพื่อให้ค่าพลังงานที่ได้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ค่าพลังงานที่ได้ๆจากการทำ single point calculation ด้วยระเบียบวิธี B3LYP และ MP2 ด้วย basis set 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-311G(d), and 6-311G(d,p) โดยจากโครงสร้าง X-ray crystallography พบว่าอันตรกิริยาที่สำคัญคือ Lys101 เพื่อทำการศึกษาลงไปในรายละเอียดถึงอันตรกิริยาแบบดึงดูดที่เกิดระหว่าง GW420867X และ Lys101 จึงได้ทำการศึกษาแบบจำลองที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการคำนวณพลังงานอันตรกิริยา ผลที่ได้ยืนยันว่า GW420867X มีอันตรกิริยาแบบดึงดูดกับหมู่แอมโมเนียมและโครงหลักของ Lys101 ผลการศึกษาที่ได้ทำให้แสดงถึงอันตรกิริยาที่สำคัญของตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์ที่ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 และเป็นประโยชน์เพื่อใช้ในการออกแบบยาให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

**2. Executive summary**

โรคเอดส์ หรือ โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Acquired Immune Deficiency Syndrome - AIDS) เป็นกลุ่มอาการเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นเพราะร่างกายได้รับเชื้อไวรัสเอชไอวี (HIV) โดยเชื้อเอช ไอ วี จะเข้าไปทำลายเม็ดเลือดขาว ที่เป็นแหล่งสร้างภูมิคุ้มกันโรค ทำให้ภูมิคุ้มกันโรคลดน้อยลงจึงทำให้ติดเชื้อโรคฉวยโอกาสแทรกซ้อนเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายขึ้น ในวงจรชีวิตของไวรัสเอช ไอ วี เพื่อเพิ่มจำนวนของไวรัส มีเอนไซม์หลายชนิดที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนของไวรัส โดยเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 (HIV-1 reverse transcriptase) จะเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญในการจำลองแบบจาก RNA ของไวรัส เป็น DNA ของไวรัส และ DNA ของไวรัสนี้จะเข้าไปรวมกับ DNA ของ host cell ในขั้นตอนต่อไป ยาต้านเอดส์ชนิดต้านการจำลองการถ่ายแบบเป็นยาที่ใช้มากในการรักษาผู้ป่วยโรคเอดส์ ยาต้านเอดส์ชนิดต้านการจำลองการถ่ายแบบสามารถจำแนกได้ออกเป็น 2 ชนิดคือ ชนิดนิวคลีโอไซด์ และ ชนิดนอนนิวคลีโอไซด์ ตัวยับยั้งชนิดนิวคลีโอไซด์ (เช่น AZT, ddI, ddC) เป็นตัวยับยั้งที่มีการจำลองให้เหมือน nucleoside ในการที่จะแย่งจับกับ เอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 เพื่อที่จะหยุดยั้งการเรียงต่อของลำดับเบสของ DNA (chain terminator) ตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์ (เช่น nevirapine, efavirenz, 2-quinolones, etravirine) มีกลไกในการยับยั้งต่างจากตัวยับยั้งชนิดนิวคลีโอไซด์ โดยตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์จะจับกันเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ที่โพรงการจับที่ห่างจากบริเวณ active site ประมาณ 10 อังสตรอม ทำให้เกิดการปรับตัวของโครงสร้างเอนไซม์ทำให้มีสามารถเกิดการสังเคราะห์ DNA ได้ จากข้อมูลของผู้ป่วยพบว่าตัวยับยั้งชนิดนิวคลีโอไซด์ไม่มีความจำเพาะสูงในการจับกับเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1, มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และ มีการดื้อยา ในขณะที่พบว่าตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์มีประสิทธิภาพสูง (ใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ) และมีความจำเพาะสูงในการจับกับเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์จึงมีความน่าสนใจในการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพให้ดียิ่งขึ้น โดยข้อเสียของตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์คือมีการดื้อยาได้ง่ายซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ดังนั้นในการศึกษาปัจจุบันจึงได้ทำการหาวิธีในการที่จะพัฒนาประสิทธิภาพของตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์ให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ทั้งที่ไม่มีการกลายพันธุ์และที่มีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ

โดยงานวิจัยในโครงการนี้จะทำการศึกษาการวางตัวของตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์ชนิดต่างๆ ในโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ด้วยวิธีโมเลกุลาร์ด๊อกกิ้ง และหาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทางโครงสร้างและประสิทธิภาพในการยับยั้ง ต่อจากนั้น ทำการคำนวณค่าพลังงานอันตรกิริยาโดยวิธีการเคมีควอนตัมระหว่างตัวยับยั้งและกรดอะมิโนบริเวณโพรงการจับ โดยเมื่อได้แบบจำลองที่แสดงถึงความสัมพันธ์นี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ที่สามารถนำไปออกแบบโครงสร้างและทำนายประสิทธิภาพของตัวยับยั้งตัวใหม่ต่อไปได้

**3. วัตถุประสงค์**

3.1 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งและพลังงานอันตรกิริยาที่มีต่อกรดอะมิโนในโพรงการจับของตัวยับยั้งประเภทนอนนิวคลีโอไซด์ของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี – 1 ด้วยวิธีโมเลกุลาร์ด๊อกกิ้ง, ความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทางโครงสร้างและประสิทธิภาพในการยับยั้งและการคำนวณอันตรกิริยาเคมีด้วยระเบียบวิธีเคมีควอนตัม

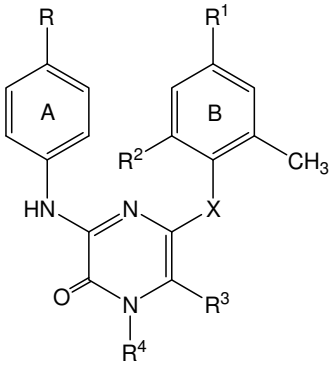
3.2 ผลจากการศึกษาที่ได้จะนำไปใช้ในการออกแบบตัวยับยั้งให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

**4. ผลการทดลอง**

โดยการศึกษาสามารถแบ่งออกเป็นหัวข้อดังนี้

### 4.1 Investigation the Binding Mode of Pyrazinones to HIV-1 RT Using CoMFA and CoMSIA Analyses and Quantum Chemical Calculations Based on Docked Conformation

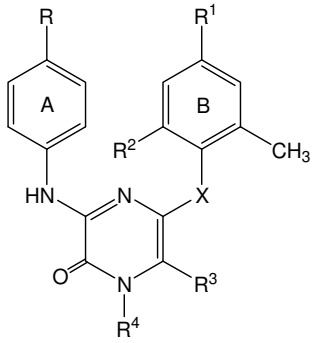
อนุพันธ์ของไพราซิโนน (Pyrazinone) เป็นตัวยับยั้งชนิดนอนนิวคลีโอไซด์เอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ชนิดหนึ่งที่พบว่าในบางโครงสร้างของอนุพันธ์นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ทั้งชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์และชนิดที่มีการกลายพันธุ์เช่นการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆดังนี้ 100 (Leu100Ile), 103 (Lys103Asn), 181 (Tyr181Cys), และ 188 (Tyr188Leu) เป็นต้น โครงสร้างหลักของอนุพันธ์ไพราซิโนนแสดงดังรูปที่ 1.




**รูปที่ 1.** โครงสร้างหลักของอนุพันธ์ไพราซิโนน (Pyrazinone)

เพื่อที่จะทำการศึกษาการจับของอนุพันธ์ไพราซิโนนในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 และศึกษาผลของหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ไพราซิโนนที่มีต่อค่าประสิทธิภาพในการยับยั้ง ($IC_{50}$) อนุพันธ์ไพราซิโนนจำนวน 24 โครงสร้าง พร้อมค่า logarithm ของประสิทธิภาพในการยับยั้ง ($IC_{50}$) ดังแสดงในตารางที่ 1. ในการศึกษาจะใช้การวางตัวของอนุพันธ์ไพราซิโนนด้วยระเบียบวิธี Molecular Docking และใช้การวางตัวเพื่อสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทางโครงสร้างและประสิทธิภาพในการยับยั้ง ต่อจากนั้นใช้การคำนวณเคมีควอนตัมเพื่อศึกษาค่าพลังงานอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น

**ตารางที่ 1.** โครงสร้างของอนุพันธ์ไพราซิโนนและค่า logarithm ของประสิทธิภาพในการยับยั้ง ($IC_{50}$) ของเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี -1 ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์




| โครงสร้าง | R | X | $R^1$ | $R^2$ | $R^3$ | $R^4$ | log(1/$IC_{50}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | H | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 6.60 |
| 2 | F | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 5.90 |
| 3 | $CH_3$ | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 4.00 |
| 4 | Cl | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 7.60 |
| 5 | Cl | S | $CH_3$ | $CH_3$ | H | $CH_3$ | 7.10 |
| 6 | $CF_3$ | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 6.30 |
| 7 | CN | O | H | H | H | $CH_3$ | 8.40 |
| 8 | CN | S | H | H | H | $CH_3$ | 7.70 |
| 9 | CN | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 9.00 |
| 10 | CN | S | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 8.30 |
| 11 | CN | S | $CH_3$ | $CH_3$ | H | $CH_3$ | 7.80 |
| 12 | CN | O | H | H | H | $CH_2Ph$ | 6.50 |
| 13 | CN | O | $CH_3$ | H | H | $CH_2Ph$ | 7.49 |
| 14 | Cl | O | H | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 7.00 |
| 15 | CN | O | H | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 8.30 |
| 16 | CN | S | H | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 7.40 |
| 17 | Cl | O | $CH_3$ | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 6.90 |
| 18 | Cl | S | $CH_3$ | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 6.30 |
| 19 | CN | O | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | 8.30 |
| 20 | CN | O | $CH_3$ | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 8.52 |
| 21 | CN | O | CN | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | 8.22 |
| 22 | CN | S | H | H | $CH_3$ | H | 7.40 |
| 23 | CN | $SO_2$ | $CH_3$ | $CH_3$ | H | $CH_3$ | 8.10 |
| 24 | CN | $SO_2$ | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | 8.30 |

**ระเบียบวิธีการทดลอง**

โครงสร้างเริ่มต้นของอนุพันธ์ไพราซิโนนจำนวน 24 โครงสร้าง สร้างและทำการ Optimization ด้วยระเบียบวิธี HF/3-21G โดยโปรแกรม Gaussian03 โครงสร้างที่ได้นำมาตรวจสอบชนิดของอะตอมและทำการคำนวณประจุชนิด Gasteiger-Huckel โดยโปรแกรม Sybyl7.0 สำหรับโครงสร้างของ HIV-1 RT ได้จากการเลือกโครงสร้างจาก Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb) pdb code 1suq ซึ่งเป็นโครงสร้าง X-ray Crystallography ของโครงสร้าง HIV-1 RT และมีตัวยับยั้ง R185545 ซึ่งพบว่า โครงสร้างของ R185545 มีโครงสร้างคล้ายกับโครงสร้างของอนุพันธ์ไพราซิโนน เพื่อการเตรียมโครงสร้างสำหรับทำ Moelcular Docking ด้วยโปรแกรม Sybyl7.0 ได้ทำการแยกโครงสร้างของเอนไซม์และตัวยับยั้งออกจากกัน โดยโครงสร้างของเอนไซม์ HIV-1 RT ทำการเติมไฮโดรเจนอะตอมแบบ All hydrogen และทำการเติมประจุชนิด Kollman charges สำหรับตัวยับยั้ง R185545 ทำการเติมไฮโดรเจนอะตอมและประจุชนิด Gasteiger-Huckel

ขั้นตอนการทำ Molecular Docking เริ่มด้วยการทดสอบประสิทธิภาพของ Lamarckian Genetic Algorithm แบบ Default พารามิเตอร์ ของโปรแกรม AutoDock3.05 โดยการ redock โครงสร้างของ R185545 กลับไปยังโพรงการจับของ HIV-1 RT pdb code 1suq ในส่วนของ grid box ใช้ขนาด 60x60x60 โดยมีขนาด grid spacing เท่ากับ 0.375 Å กำหนดให้จำนวนรอบการคำนวณเท่ากับ 50 ในการทำ docking หลังจากนั้นทำ Molecular Docking กับ อนุพันธ์ไพราซิโนนจำนวน 24 โครงสร้าง โดยทำการเลือกโครงสร้างที่ให้ค่า docked energy ต่ำที่สุดที่มีโครงสร้างการวางตัวเหมือน R185545

ต่อมานำโครงสร้างของอนุพันธ์ไพราซิโนนที่ได้จากการทำ Molecular Docking มาใช้ในการสร้างแบบจำลอง (model) สามมิติของระเบียบวิธี Comparative Molecular Analysis (CoMFA) และ Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (CoMSIA) ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทางโครงสร้างและประสิทธิภาพในการยับยั้ง (3D-Quantitative Structure Activity Relationship, 3D-QSAR) โดยแบ่งโครงสร้างของอนุพันธ์ไพราซิโนนออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ใช้สร้างแบบจำลอง (Training Set) และ กลุ่มที่ใช้ทดสอบแบบจำลอง (Test Set) สำหรับ Test Set ได้คัดเลือก 5 โครงสร้างที่ครอบคลุมช่วงของค่า $\log 1/IC_{50}$ และมีความหลากหลายของโครงสร้าง คือโครงสร้างที่ 8, 12, 16, 17, และ 19 และให้โครงสร้างที่เหลือเป็น Training Set โดยเลือกใช้โปรแกรม Sybyl7.0 สำหรับการสร้างแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA

ในการวิเคราะห์ CoMFA ทำได้โดยการคำนวณ Steric field และ Electrostatic field โดยอาศัย Lennard-Jones และ Coulombic potentials โดยใช้พารามิเตอร์แบบ Default, ใช้ probe ชนิด positively charged sp3 hybridized carbon, ใช้ขนาดของ grid เท่ากับ 2 Å และใช้ค่า energy cutoff values เท่ากับ 125.52 KJ/mol

ในการวิเคราะห์ CoMSIA ใช้ similarity fields จำนวน 5 แบบในการศึกษาคือ steric, electrostatic, hydrophobic, hydrogen bond donor และ hydrogen bond acceptor โดยคำนวณ similarity indices ของทั้ง 5 แบบบนจุด grid point แต่ละจุด ใช้ probe ชนิด carbon atom ซึ่งมีประจุ +1.0 charge

ใช้ Partial least squares (PLS) regression analyses ในการเลือก แบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA แบบจำลองที่ได้จะเสนอความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (CoMFA และ CoMSIA fields) และ ตัวแปรตาม (ค่า $\log(1/IC_{50})$ ของแต่ละโครงสร้าง โดยใช้ค่า maximum number of component เท่ากับ 6 และใช้วิธีการ leave-one-out (LOO) ในการทดสอบประสิทธิภาพในการทำนายของแบบจำลอง และใช้ค่า cross-

validated correlation coefficient ($q^2$ หรือ $r^2_{cv}$) ในการบอกประสิทธิภาพของแบบจำลอง และได้ใช้ วิธีคำนวณ Partial least Square (PLS) ที่ไม่ได้ทำ cross validation แบบจำลองของ CoMFA และ CoMSIA แสดงผลโดยใช้แผนภาพคอนทัวร์ (Contour map) และในการศึกษานี้ได้ทำการวางซ้อนทับ Contour map ลงในโพรงการจับของ HIV-1 RT เพื่อช่วยในการวิเคราะห์

เพื่อทำการศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างอนุพันธ์ไพราซิโนนและกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆในบริเวณโพรงการจับของ HIV-1 RT จึงได้ทำการคำนวนพลังงานอันตรกิริยาระหว่างโครงสร้างที่ 9 และกรดอะมิโนแต่ละตัวโดยการคำนวณเคมีควอนตัม ซึ่งโครงสร้างที่ 9 เป็นโครงสร้างที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง HIV-1 RT ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุดในอนุพันธ์ทั้ง 24โครงสร้าง โดยการคำนวณพลังงานอันตริกิริยาได้รวมการคำนวณ basis set superposition error (BSSE) correction เพื่อให้ค่าพลังงานที่ได้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ค่าพลังงานที่ได้ๆจากการทำ single point calculation ด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ MP2/6-31G(d) โดยโปรแกรม Gaussian03 โดยโครงสร้างที่ 9 เลือกจากโครงสร้างที่ทำ Molecular Docking สำหรับกรดอะมิโนได้ทำการคัดเลือกกรดอะมิโนจำนวน 14 ตำแหน่งที่มีการวางตัวในบริเวณโพรงการจับโดยใช้โครงสร้างของ HIV-1 RT ที่ใช้ในการทำ Molecular Docking โดยบริเวณ backbone ของกรดอะมิโนแต่ละตัวได้ทำการเติมอะตอม H ทั้งด้าน carbonyl และ amino เพื่อให้โครงสร้างสมบูรณ์ ค่าพลังงานอันตรกิริยา (Interaction Energy, INT) ระหว่างโครงสร้างที่ 9 และกรดอะมิโนแต่ละตัวได้จากการคำนวณดังนี้

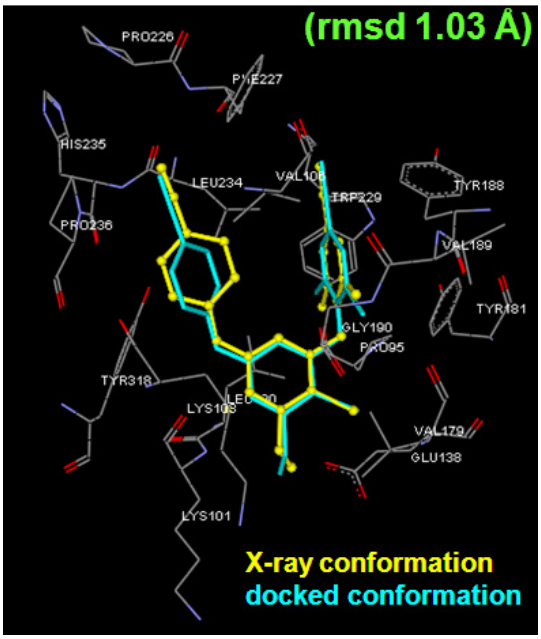
INT = E(compound no. 9 + each amino acid) – [ E(compound no. 9) + E(each amino acid) ]

เมื่อ E(compound no. 9 + each amino acid) คือค่าพลังงานรวมโครงสร้างที่ 9 และกรดอะมิโน, E(compound no. 9) คือค่าพลังงานของโครงสร้างที่ 9 และ E(each amino acid) คือค่าพลังงานของกรดอะมิโนแต่ละตัว

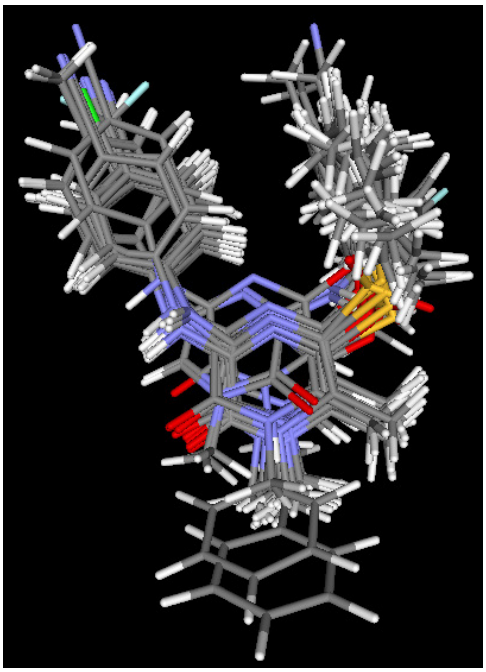
**ผลการทดลอง**

เพื่อทำการทดสอบพารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ Molecular Docking ด้วยโปรแกรม AutoDock3.05 ได้ทำการ redock ตัวยับยั้ง R185545 กลับเข้าไปในบริเวณโพรงการจับของ HIV-1 RT พบว่าโครงสร้างที่ได้จากการทำ Molecular Docking มีการวางตัวเหมือนโครงสร้างทีได้จาก X-ray Crstallography ในทั้ง 50 configurationsโดยมีค่าความแตกต่าง rmsd ระหว่าง 1.03-1.38 Å ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้และมีค่า final docked energies อยู่ระหว่าง -14.89 to -15.25 kcal/mol โดยโครงสร้างที่มี rmsd เท่ากับ 1.03 Å แสดงในรูปที่ 2. ดังนั้นพารามิเตอร์ที่ใช้นี้สามารถนำไปใช้ในการทำ Molecular Docking ของ อนุพันธ์ไพราซิโนนจำนวน 24 โครงสร้าง ผลที่ได้จากของแต่ละโครงสร้าง (50 configurations ) ถูกแยกออกเป็น Cluster ตามรูปแบบของการวางตัว โดยพบว่าโครงสร้างส่วนใหญ่มีการวางตัวเหมือนกับตัวยับยั้ง R185545 มีบางส่วนที่วางตัวนอกโพรงการจับ โดยเมื่อศึกษาค่า final docked energies พบว่าโครงสร้างที่มีการวางตัวเหมือนตัวยับยั้ง R185545 จะมีค่าพลังงานที่ต่ำกว่าหรือมีความเสถียรกว่าโครงสร้างที่มีการวางตัวนอกโพรงการจับ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกโครงสร้างที่มีค่า final docked energies ต่ำที่สุดที่มีการวางตัวหมือน ตัวยับยั้ง R185545 เพื่อใช้ในการสร้างแบบจำลอง 3D-QSAR ในขั้นตอนต่อไป โดยโครงสร้างที่ได้จากการทำ Molecular Docking ของอนุพันธ์ไพราซิโนนจำนวน 24 โครงสร้าง แสดงในรูปที่ 3. พบว่าทั้งมี 22 โครงสร้างที่มีการวางตัวแบบ

เดียวกัน โดยโครงสร้างที่ 1 และ 2 มีการวางตัวที่แตกต่างโดยมีการตัวของตำแหน่งหมู่ carbonyl ในวงไพราซิโนนในตำแหน่งตรงกันข้าม เนื่องจากอะตอม H และ F ของ โครงสร้างที่ 1 และ 2 ที่หมู่แทนที่ R มีขนาดเล็ก ดังนั้นหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง R1 จึงสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ His235 แทนหมู่แทนที่ R ทำให้เกิดการวางตัวที่กลับด้าน และมีการวางตัวที่ตำแหน่งสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับอีก 22 โครงสร้าง




**รูปที่ 2**. โครงสร้างเปรียบระหว่างโครงสร้างของ R185545 ที่ได้จาก X-ray Crstallography และโครงสร้างที่ได้จาก Molecular Docking



**รูปที่ 3**. โครงสร้างที่ได้จากการทำ Molecular Docking ของอนุพันธ์ไพราซิโนนจำนวน 24 โครงสร้าง

ผลของการวิเคราะห์ด้วย PLS แบบจำลองที่แสดงแบบจำลองของ CoMFA และ CoMSIA ที่ได้ทำการคัดเลือกแสดงในตารางที่ 2. โดยพบว่า แบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA แสดงประสิทธิภาพที่ดีในการทำนายด้วยค่า $r^2_{cv}$ เท่ากับ 0.703 สำหรับแบบจำลอง CoMFA และ 0.735 สำหรับแบบจำลอง CoMSIA โดยสำหรับแบบจำลอง CoMFA มีค่า $r^2$ เท่ากับ 0.994, s เท่ากับ 0.092, และ ค่า F value เท่ากับ 230.253 โดยมี Outliers คือโครงสร้างที่ 3, 6, และ 13 และแบบจำลอง CoMSIA มีค่า $r^2$ เท่ากับ 0.980, s เท่ากับ 0.158, และค่า F value เท่ากับ 87.871 โดยมี Outliers คือโครงสร้างที่ 3 โดยพบว่าโครงสร้างของ Outliers มีความแตกต่างจากโครงสร้างอื่นๆที่หมู่แทนที่ R และ R4 โดยหมู่แทนที่ R ของโครงสร้างที่ 3 และ 6 เป็น หมู่ methyl และ trifluoro methyl ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้างอื่นใน Training set สำหรับโครงสร้างที่ 13 พบว่าหมู่แทนที่ R4 เป็นหมู่ benzyl ในขณะที่โครงสร้างอื่นๆใน Training set เป็นอะตอม H หรือหมู่ methyl

ในแบบจำลอง CoMFA พบว่าองค์ประกอบเกิดจากอันตรกิริยา Steric 59.0 % และอันตรกิริยา Electrostatic 41.0% ซึ่งพบว่าสำหรับอนุพันธ์ไพราซิโนนนั้นอันตรกิริยาแบบ Steric มีความสำคัญมากกว่า Electrostatic ในการยับยั้ง สำหรับแบบจำลอง CoMSIA พบว่า องค์ประกอบเกิดจากอันตรกิริยา Steric 11.8 %, อันตรกิริยาElectroastatic 15.7%, อันตรกิริยา H-acceptor 36.6%, อันตรกิริยา H-donor 2.9%, และอันตรกิริยา hydrophobic 33.0% โดย อันตรกิริยา H-acceptor และอันตรกิริยา hydrophobic เป็นอันตรกิริยาหลัก โดยผลของแบบจำลองที่ได้จาก CoMFA และ CoMSIA แสดงโดยแผนภาพคอนทัวร์ (Contour Map)

Steric และ Electrostatic contours ของ CoMFA และ CoMSIA แสดงดังรูปที่ 4 และ 5 พบว่า Steric contour ของทั้งแบบจำลองของ CoMFA และ CoMSIA แสดงในบริเวณที่คล้ายกันในบริเวณโพรงการจับ แต่ในแบบจำลองของ CoMSIA พบในบริเวณที่กว้างกว่า โดยทั้งสองแบบจำลองพบ contour สีเขียวบริเวณใต้วง A ซึ่งเกิดจากการวางตัวของทั้ง 24 โครงสร้างที่มีความแตกต่างเล็กน้อย โดยวง A ชอบการวางตัวที่ต่ำกว่าเพราะสามารถเกิดอันตรกิริยาแบบ pi-pi กับ Tyr318 และสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ carbonyl ของ Lys101 ได้ นอกจากนี้ยังพบ Contour สีเขียวบริเวณหมู่แทนที่ R3 และ R4 ของวงไพราซิโนน ในแบบจำลองของ CoMSIA แต่บริเวณนี้ก็ปรากฏ Contour สีเหลืองขนาดเล็กซึ่งแสดงว่าบริเวณนี้ชอบความเป็น steric แต่ไม่มากนักดังนั้นหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่มากในบริเวณนี้จะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลง สำหรับหมู่แทนที่ R3 ถ้ามีหมู่แทนที่ที่ขนาดใหญ่จะทำให้เกิดอันตรกิริยา Steic กับสายโซ่ของ Val179 และ Cβ ของ Glu138(B) เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างที่ 9 และ 20 พบว่าอะตอมไฮโดรเจนที่หมู่แทนที่ R3 จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่าหมู่ methyl เนื่องจากโครงสร้างส่วนใหญ่ของ Training set พบว่าหมู่แทนที่ R4 เป็นหมู่ methyl ยกเว้นโครงสร้างที่ 22 ดังนั้นไม่สามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหมู่แทนที่ R4 ได้มากนักในการศึกษานี้และมีผลกระทบน้อยต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง สำหรับโครงสร้าง 22 ซึ่งมีหมู่แทนที่ R4 เป็นอะตอม H พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเหมือนกับโครงสร้าง 16 เนื่องจากหมู่ methyl ของโครงสร้าง 16 และ 22 ที่หมู่แทนที่ R3 ทำให้โครงสร้างมีการเลื่อนจากการวางตัวของโครงสร้าง 9 เล็กน้อยดังนั้นหมู่ methyl ของหมู่แทนที่ R4 ของโครงสร้าง 16 จึงไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ Glu138(B) ได้ สำหรับ Contour สีเขียวบริเวณหมู่แทนที่ R และ R1 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขนาดของหมู่แทนที่บริเวณนี้จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้ดียิ่งขึ้นแต่ต้องเป็นหมู่แทนที่ที่แสดงคุณสมบัติของ Electrostatic ด้วย

สำหรับ Electrostatic contour ในแบบจำลอง CoMFA พบว่าบริเวณที่ชอบ negative electrostatic จะอยู่ใกล้หมู่แทนที่ R ซึ่งบ่งบอกว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R ควรเป็นชนิด electron withdrawing ซึ่ง contour บริเวณนี้ไม่สามารถพบในแบบจำลอง CoMSIA ในกรณีโครงสร้าง 9 ซึ่งมีหมู่ cyano เป็นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R ของวง A จะสามารถสร้างแรงดึงดูดกับ Leu234 และ His235 ได้ และ หมู่ methyl บริเวณหมู่แทนที่ R1 ของวง B จะสามารถสร้างแรง H-pi กับ Tyr188 และ Trp229 นอกจากนี้พบ favored positive electrostatic contour ในบริเวณหมู่แทนที่ R3 และ R4 ทั้งในแบบจำลองของ CoMFA และ CoMSIA สำหรับ electrostatic contour ที่พบในแบบจำลองของ CoMFA แต่ไม่พบในแบบจำลองของ CoMSIA นั้น พบว่าแสดงอยู่ใน field ที่เหลือของแบบจำลอง CoMSIA คือ อันตรกิริยาแบบ hydrophobic, H-acceptor, และ H-donor

**ตารางที่ 2.** ผลการวิเคราะห์แบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA ที่ได้ทำการคัดเลือก

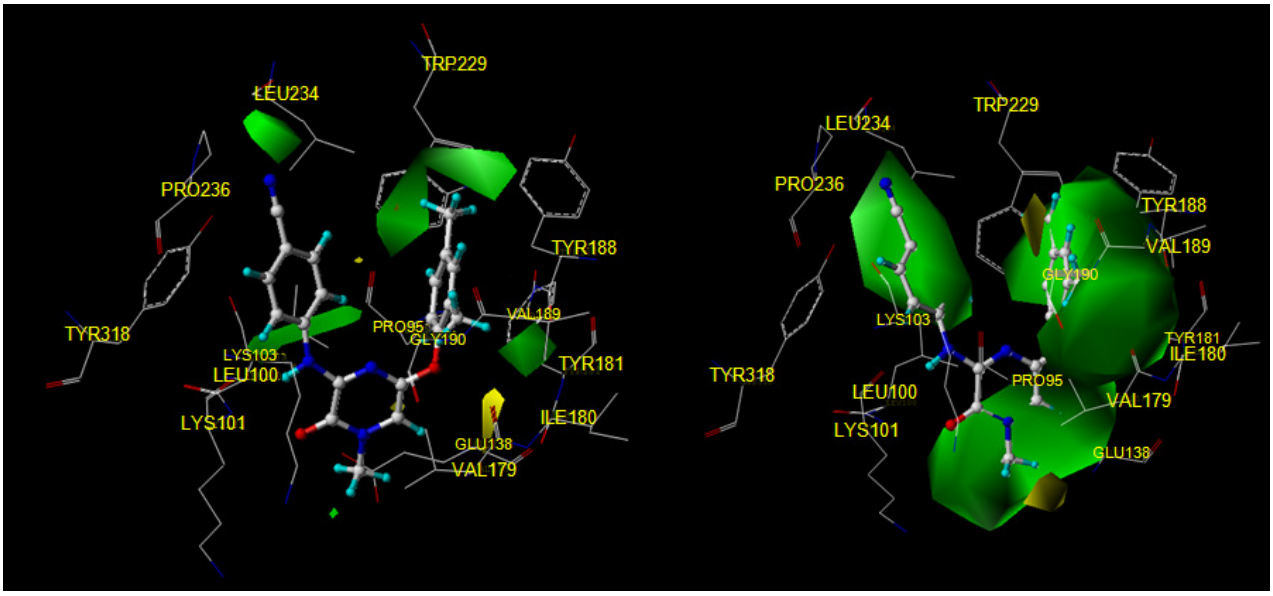
| | Model | |
|---|---|---|
| | CoMFA | CoMSIA |
| $r^2_{cv}$ | 0.703 | 0.735 |
| noc | 6 | 6 |
| s-press | 0.622 | 0.571 |
| $r^2$ | 0.994 | 0.980 |
| S | 0.092 | 0.158 |
| F | 230.253 | 87.871 |
| Field contribution (%) | | |
| Steric | 59.0 | 11.8 |
| Electrostatic | 41.0 | 15.7 |
| H-acceptor | - | 36.6 |
| H-donor | - | 2.9 |
| Hydrophobic | - | 33.0 |

เมื่อ $r^2_{cv}$ คือ cross-validation coefficient

noc คือ optimum number of components

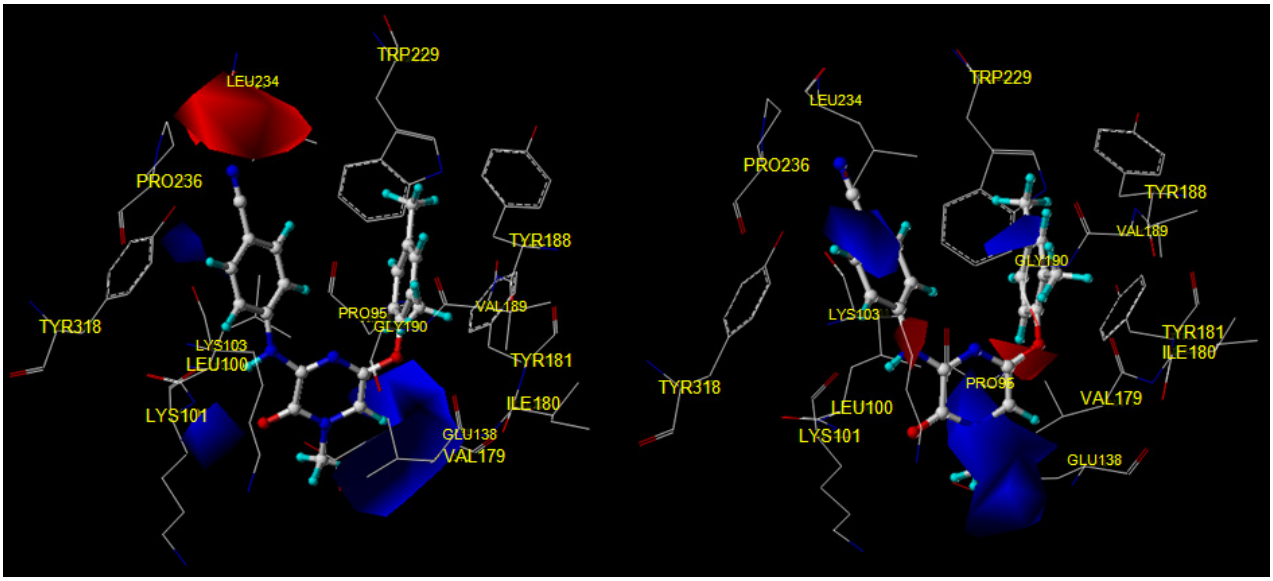
s-press คือ the uncertainty of the prediction error sum of squares derived from the LOO method

$r^2$ คือ regression coefficient




a. b.

**รูปที่ 4.** Steric contour ของแบบจำลอง CoMFA (a) and CoMSIA (b) โดยสีเขียวแสดงถึง favored steric area และสีเหลืองแสดงถึง disfavored steric area.

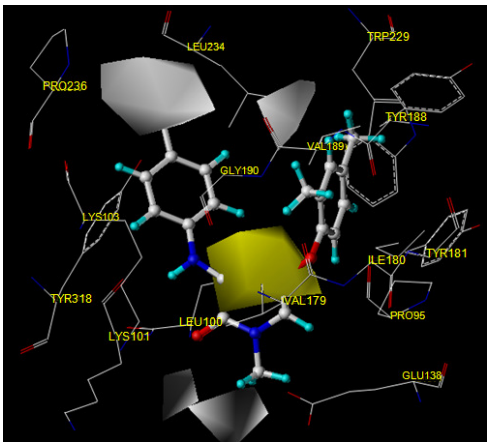



a. b.

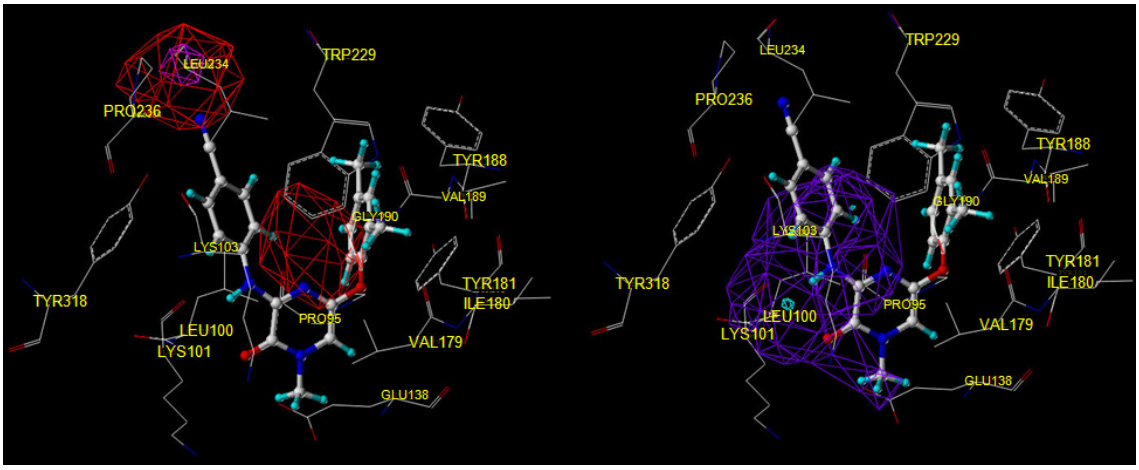
**รูปที่ 5.**Electrostatic contour ของแบบจำลอง CoMFA (a) and CoMSIA (b) โดยสีน้ำเงินแสดงถึง favored positive electrostatic area และสีแดงแสดงถึง favored negative electrostatic area.

แผนภาพ contour สำหรับอันตรกิริยาแบบ hydrophobic, H-acceptor, และ H-donor ของแบบจำลอง CoMSIA แสดงในรูปที่ 6. โดยพบแผนภาพ contour ของ disfavored hydrophobic area ใกล้หมู่แทนที่ R ซึ่งสอดคล้องกับแผนภาพ contour ของ disfavored hydrophobic area ของแบบจำลอง CoMFA นอกจากนี้ยังพบแผนภาพ contour ของ disfavored hydrophobic area ใต้บริเวณหมู่แทนที่ R4 และพื้นที่ระหว่างวง A และ B ซึ่งได้เสนอว่าควรเพิ่มหมู่แทนที่แบบ hydrophilic ที่บริเวณนี้จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ โดยจากการวางตัวของโครงสร้างที่ได้จากการทำ Molecular Docking พบว่าบริเวณใต้ตำแหน่งของหมู่แทนที่ R4 จะสามารถเกิดอันตรกิริยากับสายโซ่ของ Lys101 ได้และบริเวณพื้นที่ระหว่างวง A และ B จะสามารถเกิดอันตรกิริยากับสายโซ่ของ Leu234 ได้ สำหรับแผนภาพ contour ของ H-acceptor พบทั้ง favored และ disfavored H-acceptor area บริเวณใต้หมู่แทนที่ R โดยจากรูปพบว่า favored H-acceptor area ถูกล้อมรอบด้วย disfavored H-acceptor area ซึ่งบ่งบอกว่าหมู่แทนที่ R นั้นชอบหมู่ H-acceptor แต่ไม่ควรมีขนาดใหญ่มาก เมื่อพิจารณาในบริเวณโพรงการจับพบว่า disfavored H-acceptor area นี้อยู่ใกล้กับอะตอม N และ O ของ backbone His235 และ Pro236 สำหรับ disfavored H-donor area ปรากฏเป็นบริเวณกว้างจากบริเวณใต้วง A จนถึงหมู่ carbonyl ของวงไพราซิโนน นอกจากนี้ยังพบ favored H-donor area ขนาดเล็กภายใต้ disfavored H-donor area ซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งของหมู่ amino ระหว่างวง A และวงไพราซิโนน โดยจากการวางตัวของอนุพันธ์ไพราซิโนนพบว่าหมู่ amino นี้สำคัญเนื่องจากสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอม H และหมู่ amino และอะตอม O ของ backbone Lys101 ได้

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและแม่นยำของแบบจำลองที่ได้จาก CoMFA และ CoMSIA จึงทำการทำนายค่า log(1/$IC_{50}$) ของอนุพันธ์ไพราซิโนนทั้ง 24 โครงสร้าง (แบ่งเป็น Training set และ test set) โดยค่าการทำนายและความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและค่าจากการทำนาย (Residual) แสดงดังตารางที่ 3. โดยพบว่าค่าความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและค่าจากการทำนายของ Test set มีค่าอยู่ในช่วง ±0.9 log(1/$IC_{50}$) จากการทำนายด้วยแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA และค่า $r^2$ ของแบบจำลอง CoMFA มีค่าเท่ากับ 0.7414 ส่วน ค่า $r^2$ ของแบบจำลอง CoMSIA มีค่าเท่ากับ 0.8659 ดังแสดงในรูปที่ 7.

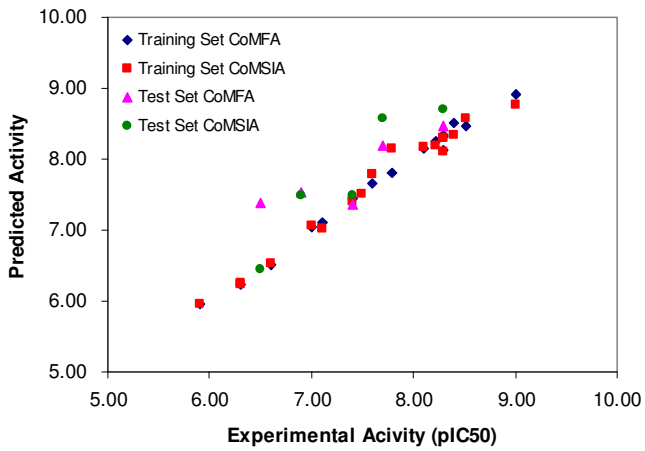



a.




b. c.

**รูปที่ 6.** Hydrophobic (a), H-acceptor (b), and H-donor (c) contours ของแบบจำลอง CoMSIA สีเหลือง แสดงถึง favored hydrophobic area, สีขาวแสดงถึง disfavored hydrophobic area, สีม่วงแดงเข้มแสดงถึง favored H-acceptor area, สีแดง แสดงถึง disfavored H-acceptor area, สีเขียวน้ำเงิน แสดงถึง favored H-donor area, และสีม่วง แสดงถึง disfavored H-donor area




**รูปที่ 7.** กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log(1/IC_{50})$ ของอนุพันธ์ไพราซิโนนทั้ง 24 โครงสร้างระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและค่าจากการทำนายจากแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA

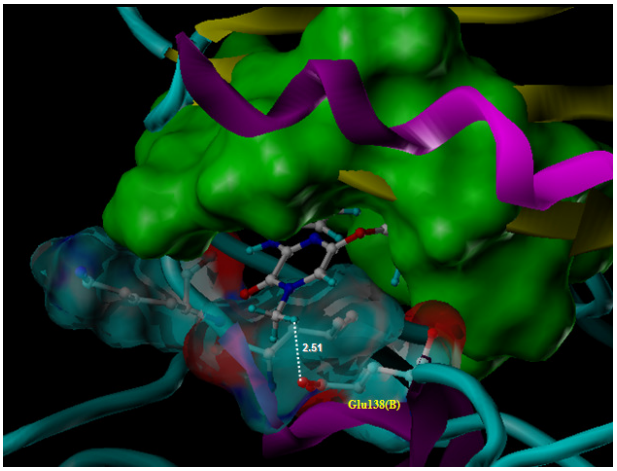
**ตารางที่ 3.** ค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจากการทดลองเทียบกับค่าที่ได้จากการคำนวณด้วยแบบจำลอง CoMFA และ CoMSIA และค่าความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและค่าจากการทำนาย (Residual)

| โครงสร้าง | log(1/$IC_{50}$) | CoMFA | | CoMSIA | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Calc. log(1/$IC_{50}$) | residual | Calc. log(1/$IC_{50}$) | residual |
| 1 | 6.60 | 6.52 | 0.08 | 6.54 | 0.06 |
| 2 | 5.90 | 5.96 | -0.06 | 5.95 | -0.05 |
| 3 | 4.00 | 6.44 | -2.44 | 7.14 | -3.14 |
| 4 | 7.60 | 7.65 | -0.05 | 7.78 | -0.18 |
| 5 | 7.10 | 7.10 | 0.00 | 7.02 | 0.08 |
| 6 | 6.30 | 8.85 | -2.55 | 6.23 | 0.07 |
| 7 | 8.40 | 8.51 | -0.11 | 8.35 | 0.05 |
| 8 | 7.70 | 8.19 | -0.49 | 8.58 | -0.88 |
| 9 | 9.00 | 8.92 | 0.08 | 8.76 | 0.24 |
| 10 | 8.30 | 8.34 | -0.04 | 8.10 | 0.20 |
| 11 | 7.80 | 7.81 | -0.01 | 8.14 | -0.34 |
| 12 | 6.50 | 7.38 | -0.88 | 6.45 | 0.05 |
| 13 | 7.49 | 8.80 | -1.31 | 7.52 | -0.03 |
| 14 | 7.00 | 7.05 | -0.05 | 7.06 | -0.06 |
| 15 | 8.30 | 8.13 | 0.17 | 8.29 | 0.01 |
| 16 | 7.40 | 7.36 | 0.04 | 7.48 | -0.08 |
| 17 | 6.90 | 7.54 | -0.64 | 7.48 | -0.58 |
| 18 | 6.30 | 6.23 | 0.07 | 6.26 | 0.04 |
| 19 | 8.30 | 8.47 | -0.17 | 8.70 | -0.40 |
| 20 | 8.52 | 8.47 | 0.05 | 8.58 | -0.06 |
| 21 | 8.22 | 8.26 | -0.04 | 8.19 | 0.03 |
| 22 | 7.40 | 7.44 | -0.04 | 7.40 | 0.00 |
| 23 | 8.10 | 8.14 | -0.04 | 8.16 | -0.06 |
| 24 | 8.30 | 8.31 | -0.01 | 8.29 | 0.01 |

เพื่อวิเคราะห์ถึงอันตรกิริยาที่เกิดระหว่างโครงสร้าง 9 และกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับจึงทำการคำนวณค่าพลังงานอันตรกิริยาโดยการคำนวณพลังงานอันตริกิริยาได้รวมการคำนวณ basis set superposition error (BSSE) correction เพื่อให้ค่าพลังงานที่ได้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ค่าพลังงานที่ได้ๆ จากการทำ single point calculation ด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ MP2/6-31G(d) ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4. โดยพบว่าอันตรกิริยาแบบดึงดูดที่สำคัญที่ทำให้โครงสร้างที่ 9 สามารถจับได้ดีในโรงการจับคือ Glu138(B) โดยมีค่าพลังงานอันตรกิริยาเท่ากับ 12.2 and -13.7 kcalฝmol ด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ MP2/6-31G(d) ตามลำดับ โดยจากการวางตัวของโครงสร้างที่ 9 ในโพรงการจับพบว่าหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง R4 ของโครงสร้างที่ 9 สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ carboxylate ของ Glu138(B) ด้วยระยะทาง 2.51 Å โดยอันตรกิริยาที่เกิดระหว่างโครงสร้างที่ 9 และ Glu138(B) แสดงในรูปที่ 8.

**ตารางที่ 4.** พลังงานอันตรกิริยา (kcal/mol) ระหว่างโครงสร้างที่ 9 และ กรดอะมิโนรอบๆโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์

| | Interaction Energy ($kcalmol^{-1}$) | |
|---|---|---|
| | B3LYP/6-31G(d) | MP2/6-31G(d) |
| Leu100 | 2.0 | -3.9 |
| Lys101 | -0.4 | -2.0 |
| Lys103 | 6.4 | 2.7 |
| Val179 | 1.6 | -1.2 |
| Tyr181 | 2.7 | -2.1 |
| Tyr188 | 8.1 | 4.2 |
| Val189 | 0.5 | -0.5 |
| Gly190 | 0.3 | -0.4 |
| Trp229 | 3.8 | 0.1 |
| Leu234 | 1.7 | -0.9 |
| His235 | 2.0 | 0.6 |
| Pro236 | -0.6 | -1.6 |
| Tyr318 | 1.1 | -1.1 |
| Glu138(B) | -12.2 | -13.7 |



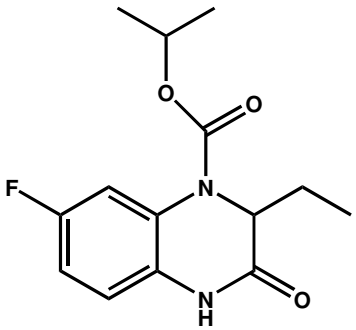

**รูปที่ 7.** อันตรกิริยาที่เกิดระหว่างโครงสร้างที่ 9 และ Glu138(B) ในโพรงการจับของ HIV-1 RT

**สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง**

ได้ทำการศึกษาการวางตัวของอนุพันธ์ไพราซิโนนจำนวน 24 โครงสร้างในโพรงการจับโดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทางโครงสร้างและประสิทธิภาพในการยับยั้ง (3D-QSAR) โดยอาศัยการวางตัวที่ได้จากระเบียบวิธี Molecular Docking และทำการศึกษาพลังงานอันตรกิริยาที่เกิดระหว่างโครงสร้างที่ 9 ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง HIV-1 RT ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของอนุพันธ์นี้ จากผลการศึกษา Molecular Docking เผยถึงการวางตัวของอนุพันธ์ไพราซิโนนจำนวน 24 โครงสร้างในโพรงการจับ และระเบียบวิธี 3D-QSAR โดยอาศัยแบบจำลองของ CoMFA และ CoMSIA สามารถบอกได้ถึงความสัมพันธ์ของหมู่แทนที่ตำแหน่งต่างๆที่มีต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง โดยแบบจำลองที่ได้มีประสิทธิภาพในการทำนายที่ดีด้วยค่า $r^2_{cv}$ เท่ากับ 0.703 สำหรับแบบจำลอง CoMFA และ 0.735 สำหรับแบบจำลอง CoMSIA โดยแผนภาพ contour ของอันตรกิริยา steric และ electrostatic จากทั้งแบบจำลองของ CoMFA และ CoMSIA ที่ได้มีความคล้ายคลึงกัน โดยแผนภาพ contour ของอันตรกิริยา electrostatic ของแบบจำลอง CoMFA ที่ไม่สามารถพบได้ในแผนภาพ contour ของอันตรกิริยา electrostatic ของแบบจำลอง CoMSIA สามารถพบได้ในแผนภาพ contour ของอันตรกิริยา hydrophobic, H-acceptor, และ H-donor ในแบบจำลอง CoMSIA โดยผลที่ได้สามารถเสนอแนวทางในการออกแบบตัวยับยั้งของอนุพันธ์ pyrazinone ให้มีประสิทธิภาพให้ดียิ่งขึ้นโดยการเพิ่มหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น, มีลักษณะเป็น electron-withdrawing, H-acceptor, และหมู่ disfavored hydrophobic เพื่อที่จะได้มีอันตรกิริยาที่เพิ่มขึ้นกับ leu234 และ His235 โดยผลของการคำนวณพลังงานอันตรกิริยาระหว่างโครงสร้างที่ 9 และกรดอะมิโนรอบๆโพรงการจับนั้นยังบอกความสำคัญของอันตรกิริยาทีเกิดขึ้นระหว่างโครงสร้างที่ 9 และ Glu138(B) ดังนั้นผลการศึกษาสามารถอธิบายถึงความสามารถในการจับในโพรงการจับของ HIV-1 RT และเสนอแนวทางในการออกแบบตัวยับยั้งของอนุพันธ์ไพราซิโนนให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

## 4.2 Systematic investigation on the methodology of quantum chemical calculations in the binding of GW420867X as NNRTI

ในปัจจุบันยาที่ได้รับการรับรองจาก Food and drug administration (FDA) เพื่อรักษาผู้ป่วยโรคเอดส์สำหรับเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี – 1 ชนิดนอนนิวคลีโอไซด์มี 4 ชนิดคือ เนวิราพีน (Nevirapine), เดอราเวอดีน (Deravirdine), เอฟาวิเรนซ์ (Efavirenz), และ เอทราวิรีน (Etravirine) แต่ในบางชนิดพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลงเมื่อมีเอนไซม์มีการกลายพันธุ์ S-3-ethyl-7-fluoro-4-isopropoxy-carbonyl-3,4-dihydro-quinoxalin-2(1H)-one (GW420867X) (โครงสร้างแสดงในรูปที่ 8.) เป็นตัวยับยั้งชนิดใหม่ที่พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 ทั้งชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์และชนิดที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 100, 101, และ 188 โดยพบว่าเมื่อเอนไซม์มีการกลายพันธุ์แบบ Leu100Ile, Lys101Glu, และ Tyr188Cys ยาจะมีประสิทธิภาพลดลง 1.4±0.6, 2.5±0.7, และ 2.4 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับประสิทธิภาพกับเอนไซม์ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ดังนั้น GW420867X เป็นโครงสร้างที่น่าสนใจในการศึกษาการเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับและเหตุใดเมื่อเอนไซม์มีการกลายพันธุ์ GW420867X ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง




**รูปที่ 7.** โครงสร้างของ GW420867X

ในการศึกษานี้เพื่อศึกษาพลังงานอันตรกิริยาระหว่าง GW420867X และ กรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาถึงรูปแบบของแบบจำลองที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคำนวณพลังงานอันตรกิริยาเช่น ผลของกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้เคียง, ผลของหมู่ฟังก์ชั่นที่ใช้ในการ terminate กรดอะมิโน โดยการคำนวณพลังงานอันตริกิริยาได้รวมการคำนวณ basis set superposition error (BSSE) correction เพื่อให้ค่าพลังงานที่ได้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ค่าพลังงานที่ได้ๆ จากการทำ single point calculation ด้วยระเบียบวิธี B3LYP และ MP2 ด้วย basis set 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-311G(d), and 6-311G(d,p) โดยโปรแกรม Gaussian03 นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาอันตรกิริยาของ Electrostatic โดยการศึกษาประจุบน backbone อะตอมด้วยการคำนวณประจุชนิดต่างๆ เช่น Mulliken population analysis, NPA, ChelpG, เป็นต้น

**ระเบียบวิธีการทดลอง**

นำโครงสร้างของ X-ray Crystallography GW420867X และกรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์และชนิดที่มีการกลายพันธุ์ Lys101Glu จากข้อมูลใน Protein Data Bank pdb code 2opp และ 2opr ทำการแยกโครงสร้าง เอนไซม์และ GW420867X หลังจากนั้นเติมอะตอมไฮโดรเจนด้วยโปรแกรม Sybyl7.2 ทำการคัดเลือกกรดอะมิโนที่มีอะตอมอยู่ในระยะ 4 Å จาก GW420867X ได้ทั้งหมด 15 กรดอะมิโน คือ Pro95, Leu100, Lys/Glu101, Lys103, Val106, Val179, Tyr181, Tyr188, Gly190, Phe227, Trp229, Leu234, His235, Tyr318, และ Glu138(B) เพื่อทำการศึกษาพลังงานอันตรกิริยาที่มีต่อกรดอะมิโนแต่ละตัว กรดอะมิโนแต่ละตัวทำการ terminate backbone C- และN- ด้วยอะตอมไฮโดรเจน ทำการคำนวณพลังงานอันตรกิริยาโดยวิธี B3LYP และ MP2 และใช้ Basis set 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-311G(d), และ 6-311G(d,p) ด้วยโปรแกรม Gaussian03 และทำการคำนวณ basis set superposition error (BSSE) correction เพื่อความถูกต้องมากขึ้น ค่าพลังงานอันตรกิริยา (Interaction Energy, INT) ระหว่าง GW420867X และกรดอะมิโนแต่ละตัวได้จากการคำนวณดังนี้

INT = E(GW420867X + each amino acid) – [ E(GW420867X) + E(each amino acid) ]

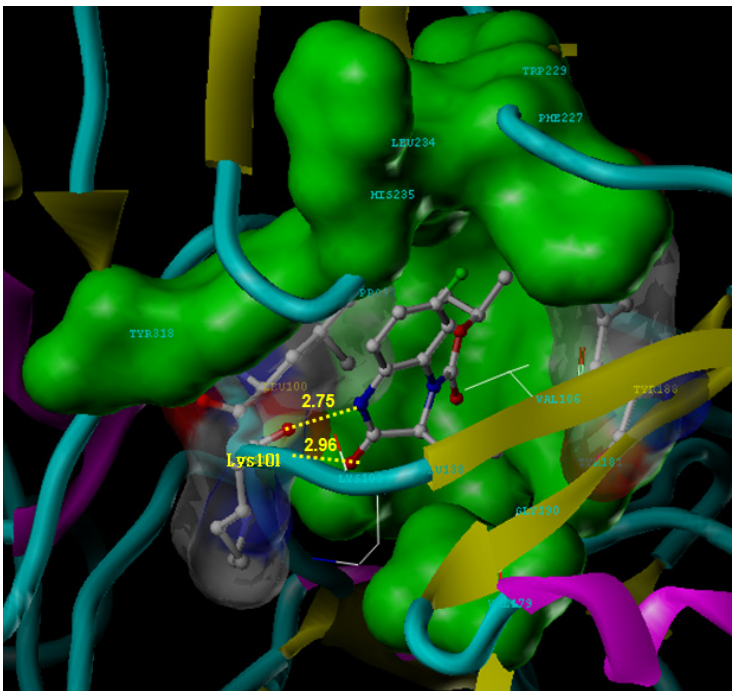
เมื่อ E(GW420867X + each amino acid) คือค่าพลังงานรวม GW420867X และกรดอะมิโน, E(GW420867X) คือค่าพลังงานของ GW420867X และ E(each amino acid) คือค่าพลังงานของกรดอะมิโนแต่ละตัว นอกจากนี้เพื่อเป็นการยืนยันถึงค่าพลังงานอันตรกิริยา ได้ทำการศึกษาผลของกรดอะมิโนข้างเคียงโดยการเพิ่มจำนวนกรดอะมิโนจำนวน 1-2 ตัวลงไปทางด้าน C- และN- ในแบบจำลองที่ทำการคำนวณ, ทำการทดสอบส่วนของ sidechain ที่มีผลต่อพลังงานอันตรกิริยา, และเพื่อทำการศึกษาผลของหมู่ที่ใช้ในการ termnate C- และ N- ของ backbone จากเดิมที่ใช้เพียงแค่อะตอม H ซึ่งอาจจะทำให้ลักษณะของ peptide bond เปลี่ยนแปลงไป จึงทำการศึกษาชนิดของหมู่ที่นำมา terminate โดยทำการเพิ่มขนาดให้มีลักษณะใกล้เคียงกับ Peptide bond, และทำการคำนวณประจุ Mulliken, NPA, และ ChelpG บนอะตอม H (ของหมู่ amino บน backbone) และอะตอม O (ของ Backbone) โดยการคำนวณเฉพาะ residue

**ผลการทดลอง**

- **ผลของ Basis set**

ค่าพลังงานอันตรกิริยาที่ทำการคำนวณ basis set superposition error (BSSE) correction ระหว่าง GW420867X และกรดอะมิโน โดยวิธี B3LYP และ MP2 และใช้ Basis set 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-311G(d), และ 6-311G(d,p) แสดงในตารางที่ 5. พบว่าทุกระเบียบวิธีให้ค่าพลังงานอันตรกิริยาระหว่าง GW420867X และ Lys101 เป็นอันตรกิริยาแบบดึงดูดที่สำคัญโดยวิธี B3LYP มีค่าพลังงานอยู่ระหว่าง -15.6 ถึง -15.9 kcal/mol และวิธี MP2 มีค่าพลังงานอยู่ระหว่าง -16.0 ถึง -16.3 kcal/mol ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลทางโครงสร้างที่ได้จาก X-ray Crystallography ว่า GW420867X สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้กับอะตอม

O และ H ของ backbone Lys101 ดังแสดงในรูปที่ 8 นอกจากนี้จากค่าพลังงานอันตรกิริยาพบว่า GW420867X ยังมีอันตรกิริยาแบบดึงดูดกับ Lys103 ด้วยค่าพลังงานอันตรกิริยา -4.8 ถึง -4.9 kcal/mol และ -6.4 ถึง -6.9 kcal/mol ด้วยวิธี B3LYP and MP2 ตามลำดับ นอกจากนี้จากค่าพลังงานอันตรกิริยาด้วยวิธี MP2 ยังพบว่า GW420867X สามารถมีอันตรกิริยาแบบดึงดูดกับ Tyr181, Tyr188, Trp229, Leu234, His235, และ Tyr318 เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของ basis set เดียวกันพบว่า เกือบทุกค่าของวิธี MP2 ให้ค่าพลังงานอันตรกิริยาที่ต่ำว่าของวิธี B3LYP โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Leu100 พบว่าวิธี B3LYP ให้ค่าพลังงานอันตรกิริยาแบบผลัก (~ 6 kcal/mol) ในขณะนี้วิธี MP2 ให้ค่าพลังงานอันตรกิริยาแบบดึงดูดเล็กน้อย (-0.9 ถึง -1.97 kcal/mol) ซึ่งแสดงว่าวิธี B3LYP ไม่สามารถรวมการคำนวณแบบ dispersion ได้ นอกจากนี้สำหรับอันตรกิริยาแบบ H-pi และ pi-pi (เช่น Tyr181. Tyr188, Trp229, และ Tyr318) วิธี MP2 ให้ค่าพลังงานอันตรกิริยาที่เป็นแบบดึงดูดมากกว่าวิธี B3LYP แสดงว่าวิธี MP2 ใช้ได้ผลดีกับอันตรกิริยา H-pi และ pi-pi มากกว่า B3LYP เมื่อเพิ่มขนาดของ basis set ในการคำนวณด้วยวิธี B3LYP พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันมาก (±0.24 kcal/mol) ในกรณีคำนวณด้วยวิธี MP2 พบว่ามีค่าความแตกต่างประมาณ ±1.20 kcal/mol เมื่อเทียบกับ basis set 6-31G(d) ยกเว้น Leu100 ที่มีค่าความแตกต่าง 2.12 kcal/mol เมื่อทำการคำนวณด้วย basis set 6-311G(d,p) จะเห็นได้ว่าผลของ basis set ทำให้มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้น basis set 6-31G(d) จึงถูกเลือกเพื่อใช้ในการคำนวณขั้นตอนต่อไปเพื่อเป็นการประหยัดเวลาในการคำนวณ




**รูปที่ 8.** การวางตัวของ GW420867X ในโพรงการจับของ HIV-1 RT ในชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์

**ตารางที่ 5**. พลังงานอันตรกิริยาของ GW420867X ด้วยระเบียบวิธี B3LYP และ MP2 ที่ basis set ต่างๆ

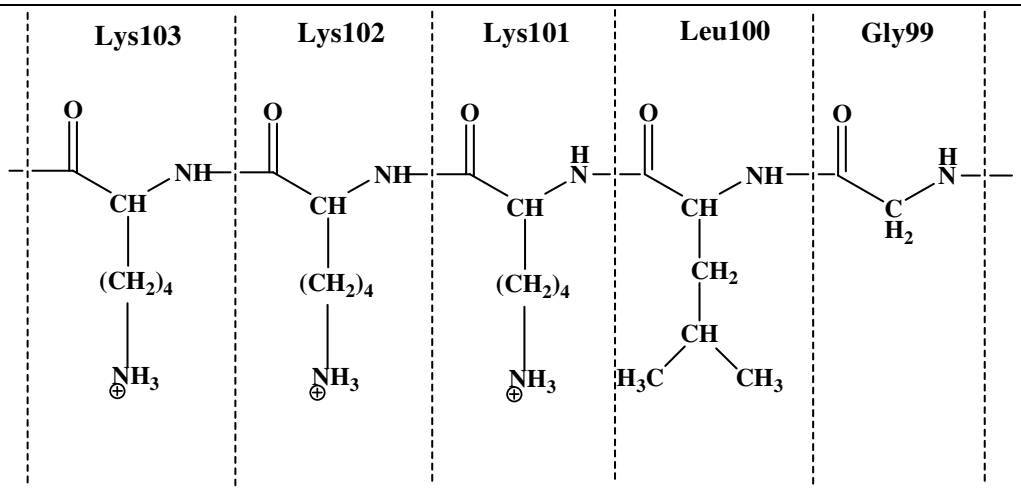
| Residues | B3LYP | | | | MP2 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | B3LYP/6-31G(d) | B3LYP/6-31G(d,p) | B3LYP/6-311G(d) | B3LYP/6-311G(d,p) | MP2/6-31G(d) | MP2/6-31G(d,p) | MP2/6-311G(d) | MP2/6-311G(d,p) |
| Pro95 | 2.59 | 2.56 | 2.61 | 2.55 | 1.97 | 1.64 | 1.69 | 1.25 |
| Leu100 | 5.86 | 5.78 | 6.04 | 5.87 | 0.15 | -0.68 | -0.86 | -1.97 |
| Lys101 | -15.65 | -15.59 | -15.89 | -15.72 | -16.28 | -16.24 | -15.98 | -15.89 |
| Lys103 | -4.81 | -4.79 | -4.85 | -4.90 | -6.42 | -6.51 | -6.69 | -6.86 |
| Val106 | 1.99 | 1.97 | 2.04 | 2.01 | -0.92 | -1.24 | -1.46 | -1.86 |
| Val179 | 1.19 | 1.17 | 1.29 | 1.20 | -0.90 | -1.27 | -1.28 | -1.80 |
| Tyr181 | 1.10 | 1.09 | 1.08 | 1.05 | -2.37 | -2.61 | -2.95 | -3.28 |
| Tyr188 | 1.82 | 1.78 | 1.86 | 1.77 | -1.89 | -2.23 | -2.59 | -3.04 |
| Gly190 | 0.30 | 0.27 | 0.37 | 0.40 | -0.30 | -0.45 | -0.42 | -0.58 |
| Phe227 | 0.18 | 0.18 | 0.11 | 0.10 | -0.60 | -0.64 | -0.68 | -0.74 |
| Trp229 | 1.42 | 1.38 | 1.27 | 1.27 | -1.69 | -1.98 | -2.56 | -2.90 |
| Leu234 | 1.12 | 1.13 | 1.26 | 1.25 | -1.27 | -1.48 | -1.51 | -1.78 |
| His235 | -0.98 | -0.99 | -1.10 | -1.06 | -1.55 | -1.54 | -1.58 | -1.53 |
| Tyr318 | -0.44 | -0.40 | -0.60 | -0.51 | -2.38 | -2.36 | -2.84 | -2.79 |
| Glu138(B) | 5.72 | 5.69 | 5.61 | 5.61 | 5.09 | 4.98 | 4.80 | 5.69 |

- **ผลของกรดอะมิโนข้างเคียง**

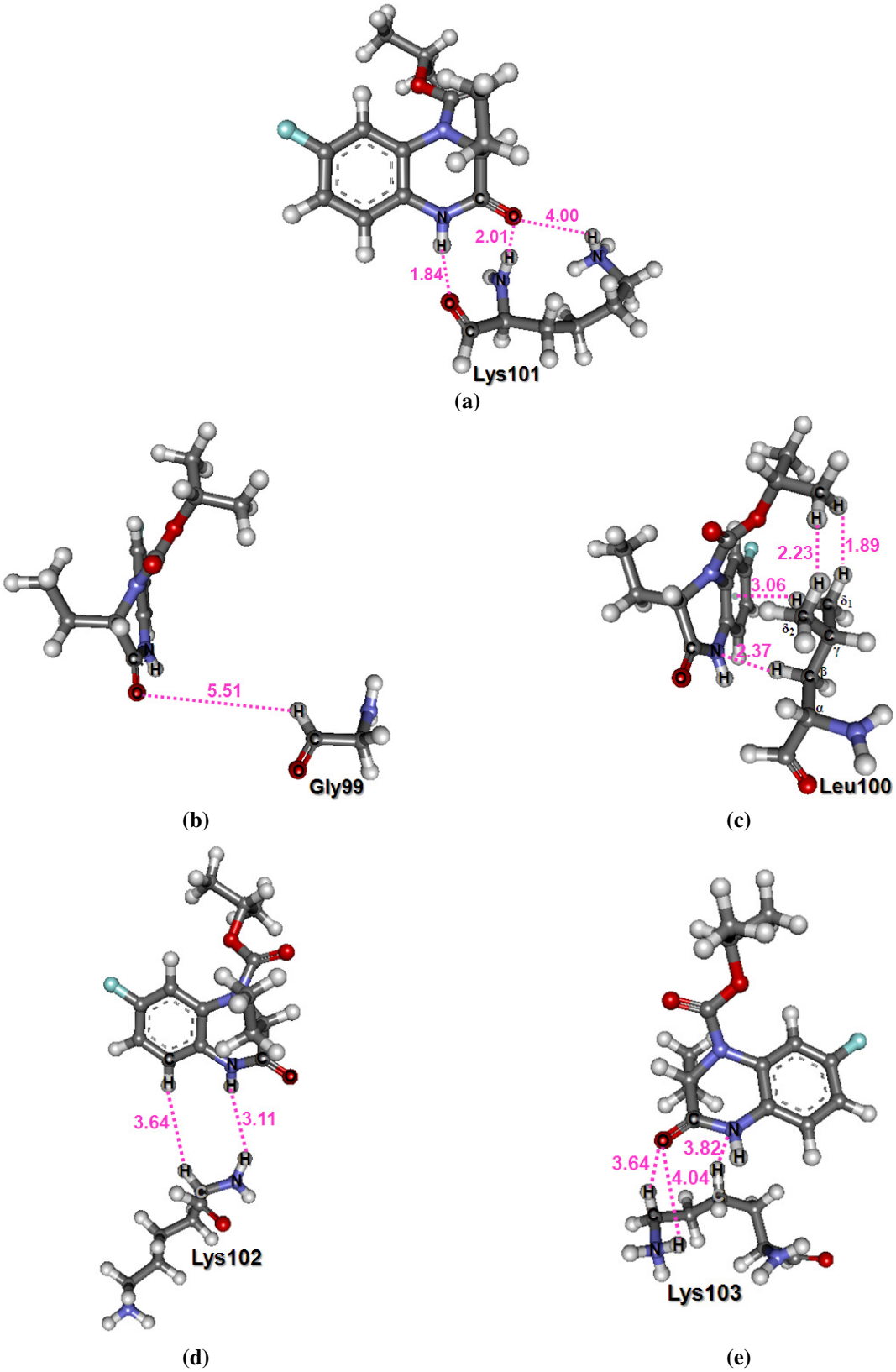
เพื่อทำการศึกษาลงไปในรายละเอียดถึงอันตรกิริยาแบบดึงดูดที่เกิดระหว่าง GW420867X และ Lys101 แบบจำลองการคำนวณพลังงานอันตรกิริยาที่เพิ่มกรดอะมิโนข้างเคียงของ Lys101 คือ Gly99, Leu100, Lys102, และ Lys103 โดยค่าพลังงานแสดงในตารางที่ 6. และโครงสร้างของแต่ละกรดอะมิโนแสดงในรูปที่ 9. ค่าระยะทางในหน่วยอังสตรอมได้แสดงในรูปเพื่ออธิบายถึงแรงดึงดูดและแรงผลัก Model1-Lys101 แสดงให้เห็นถึงพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงระหว่างอะตอม H และ O ของวง quinoxaline และ อะตอม O และ H ของ backbone Lys101 โดยระยะทางระหว่างอะตอม O ของวง quinoxaline และ อะตอม H ของหมู่ ammonium ของ Lys101 พบว่ามีระยะอยู่ภายใน 4 Å จากโครงสร้างแบบจำลอง model1-Gly99 และ model1-Lys102 พบว่าไม่มีแรงดึงดูดต่อกัน สำหรับแบบจำลอง model1-Leu100 จากโครงสร้างพบว่าอาจเกิดแรงผลักระหว่างหมู่ dimethyl ของ Leu100 และ GW420867X แต่ก็พบอันตรกิริยาแบบแรงดึงดูดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Cβ ของ Leu100 และอะตอม N ของวง quinoxaline และ อันตรกิริยา H-pi ระหว่าง Cδ ของ Leu100 และวง phenyl ring ของวง quinoxaline ในโครงสร้างแบบจำลอง model1-Lys103 พบแรงดึงดูดแบบอ่อนจากพันธะไฮโดรเจนระหว่าง GW420867X และ Lys103

โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานอันตรกิริยาของแต่ละกรดอะมิโนที่อยู่ข้างๆ Lys101 ด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) นั้นพบว่า ไม่มีอันตรกิริยากับ Gly99, มีแรงผลักกับ Leu100,มีแรงผลักเล็กน้อยกับ Lys102 และแรงดึงดูดกับ Lys103 ในกรณีค่าพลังงานอันตรกิริยาที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี MP2/6-31G(d) ไม่พบอันตรกิริยาแบบแรงดึงดูดกับ Gly99, Leu100, และ Lys102 แต่พบอันตรกิริยาแบบแรงดึงดูดกับ Lys103 สำหรับแบบจำลองที่เพิ่มกรดอะมิโนจำนวนหนึ่งตัว models 2-1 และ 2-2 พบว่าค่าพลังงานอันตรกิริยามีค่าไม่แตกต่างกับการรวมค่าของแต่ละกรดอะมิโน ซึ่งพบว่าผลที่ได้ยังสอดคล้องกับแบบจำลองเพิ่มหมู่ข้างเคียงตั้งแต่ 2-4 กรดอะมิโน จากแบบจำลองทั้งหมดที่ได้ยืนยันได้ว่าพลังงานอันตรกิริยาที่สำคัญในการจับของ GW420867X คืออันตรกิริยาแบบดึงดูดกับ Lys101

**ตารางที่ 6.** พลังงานอันตรกิริยาระหว่าง GW420867X และกรดอะมิโนข้างเคียง




| Model | Residues | | | | | Interaction Energy (kcal/mol) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | B3LYP/6-31G(d) | MP2/6-31G(d) |
| Model1-Lys101 | | | Lys101 | | | -15.65 | -16.28 |
| Model1-Leu100 | | | | Leu100 | | 5.86 | 0.15 |
| Model1-Lys102 | | Lys102 | | | | 1.53 | 1.07 |
| Model1-Gly99 | | | | | Gly99 | 0.60 | 0.45 |
| Model1-Lys103 | Lys103 | | | | | -4.81 | -6.42 |
| Model2-1 | | | Lys101 | Leu100 | | -10.37 | -16.89 |
| Model2-2 | | Lys102 | Lys101 | | | -15.55 | -16.74 |
| Model3-1 | | Lys102 | Lys101 | Leu100 | | -10.39 | -17.48 |
| Model3-2 | | | Lys101 | Leu100 | Gly99 | -9.88 | -16.51 |
| Model3-3 | Lys103 | Lys102 | Lys101 | | | -20.26 | -23.03 |
| Model4-1 | | Lys102 | Lys101 | Leu100 | Gly99 | -9.90 | -17.10 |
| Model4-2 | Lys103 | Lys102 | Lys101 | Leu100 | | -14.52 | -23.28 |
| Model5-1 | Lys103 | Lys102 | Lys101 | Leu100 | Gly99 | -13.80 | -22.67 |



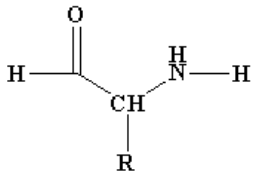

**รูปที่ 9.** แบบจำลองของแต่ละกรดอะมิโน a)Lys101, (b)Gly99), (c)Leu100, (d)Lys102, and (e)Lys103) ที่กระทำต่อ GW420867X โดยระยะทางแสดงในหน่วยอังสตรอม (Å)

- **ผลของสายโซ่ของ Lys101**

เพื่อที่จะศึกษาถึงส่วนของกรดอะมิโน Lys101 ที่ก่อให้เกิดแรงดึงดูดต่อ GW420867X จึงได้ทำการดัดแปลงหมู่สายโซ่ของ Lys101 ให้สั้นลงตามลำดับและคำนวณค่าพลังงานอันตรกิริยาผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 7. เมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลองของกรดอะมิโน Lys101 (model1-A0) โดยทำการแทนที่หมู่ ammonium ด้วยหมู่ methyl พบว่าค่าพลังงานอันตรกิริยามีค่าเพิ่มขึ้น 7.91 และ 7.68 kcal/mol ด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ MP2/6-31G(d) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าหมู่ ammonium มีผลสำคัญที่ทำให้เกิดแรงดึงดูดระหว่าง GW420867X และ Lys101 ต่อมาเมื่อลดขนาดของสายโซ่ลงพบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าพลังงานอันตรกิริยามากนักโดยมีค่าความแตกต่างของค่าพลังงานอันตรกิริยา <1 kcal/mol ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแรงดึงดูดระหว่าง GW420867X และ Lys101 นั้นเกิดจากส่วนของหมู่ ammonium และส่วนของ backbone Lys101

**ตารางที่ 7.** ค่าพลังงานอันตรกิริยาระหว่าง GW420867X และกรดอะมิโน Lys101 ที่ดัดแปลงสายโซ่

**Lys101**

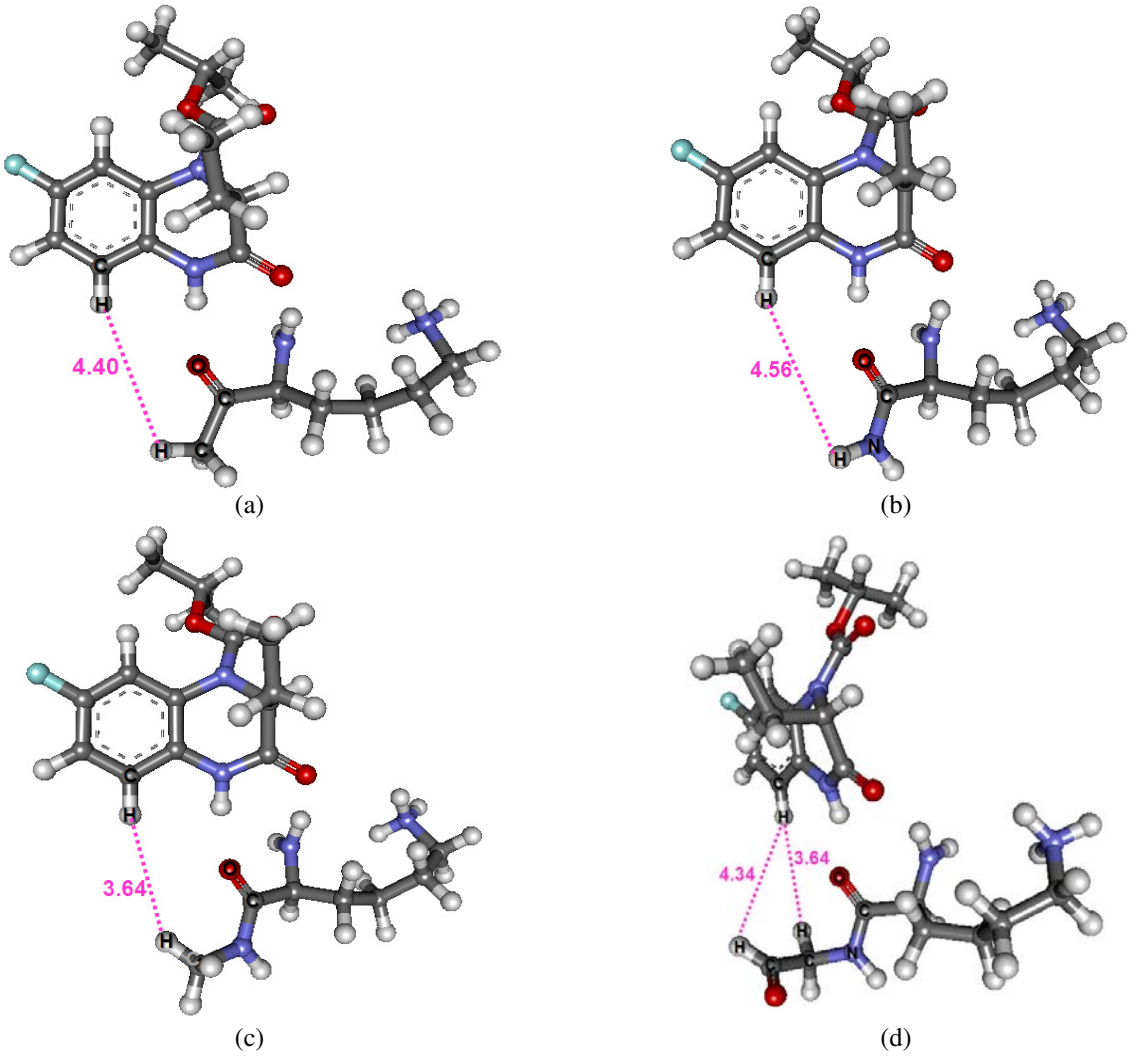



| Model | R | Interaction Energy (kcal/mol) | |
|---|---|---|---|
| | | B3LYP/6-31G(d) | MP2/6-31G(d) |
| Model1-Lys101 | $-(CH_2)_4-NH_3+$ | -15.65 | -16.28 |
| Model1-A0 | $-(CH_2)_4-CH_3$ | -7.74 | -8.60 |
| Model1-A1 | $-(CH_2)_3-CH_3$ | -7.70 | -8.47 |
| Model1-A2 | $-(CH_2)_2-CH_3$ | -7.66 | -8.39 |
| Model1-A3 | $-CH_2-CH_3$ | -7.57 | -8.18 |
| Model1-A4 | $-CH_3$ | -7.44 | -7.98 |
| Model1-A5 | -H | -7.36 | -7.62 |

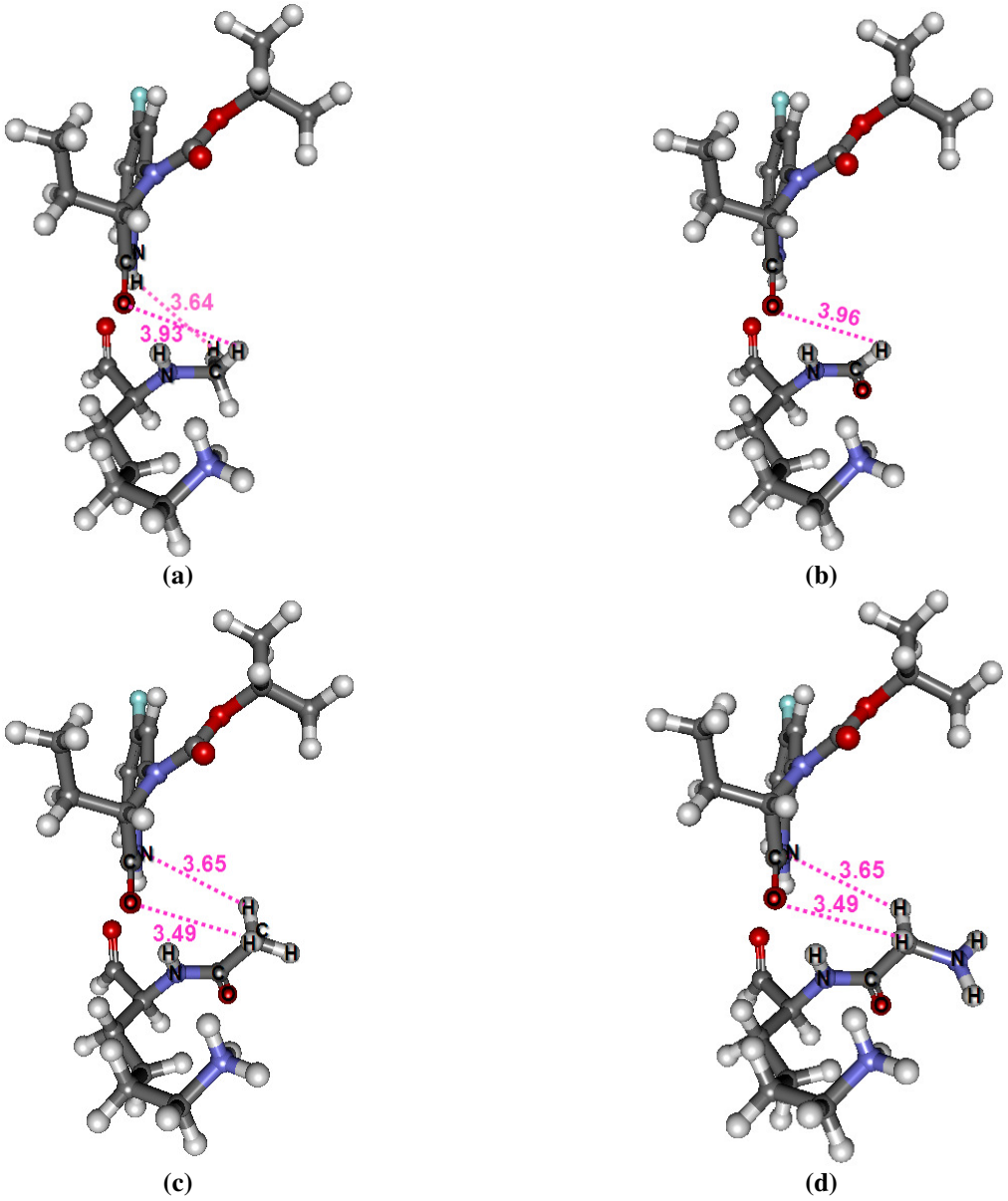
- **ผลของหมู่ Terminal (NH และCO) ของ Lys101**

เมื่อทำการตัดกรดอะมิโนมาทำการศึกษาพลังงานอันตรกิริยาของแต่ละกรดอะมิโนและทำการเติมอะตอม H ที่ปลายแต่ละข้างของ backbone พบว่าเป็นการทำลายลักษณะของพันธะเปปไทด์ของแต่ละข้างของกรดอะมิโนดังนั้นเพื่อทำการศึกษาผลกระทบที่มีต่อค่าพลังงานอันตรกิริยาเมื่อทำการเปลี่ยนหมู่ Terminal ทั้งสองข้างของกรดอะมิโน Lys101 ดังนั้นแบบจำลอง model-R1A-D and model-R2A-D ได้ถูกเสนอขึ้นมาเพื่อศึกษาผลของหมู่ terminal ที่เชื่อมต่อทั้งทางด้าน C- และ N- ของ backbone Lys101 ที่จะมีผลต่อค่าพลังงานอันตรกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11 โดยแบบจำลอง model1-R1A-2A ถึง model1-R1D-2D แสดงการแทนที่ของหมู่ terminal ที่ตำแหน่งทั้งสองด้านของ backbone Lys101 ดังแสดงในตารางที่ 8. ในกรณีผลของหมู่ terminal ทางด้าน carbonyl พบว่าหมู่แทนที่ที่เติมเข้าไปนั้นไม่มีผลต่อการเข้าไปสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ GW420867X เมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานอันตรกิริยาของ model1-Lys101 ค่าพลังงานอันตรกิริยาของแบบจำลอง model1-R1A ถึง model1-R1D จะมีค่าพลังงานอันตรกิริยาที่ต่ำกว่าแบบจำลอง model1-Lys101 ประมาณ 0.36 ถึง 1.78 kcal/mol and 0.46 ถึง 2.16 kcal/mol เมื่อทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ MP2/6-31G(d) ตามลำดับ โดยเมื่อเพิ่มขนาดของหมู่แทนที่ทางด้านหมู่ carbonyl ความแตกต่างของค่าพลังงานอันตรกิริยาจะมีค่าเพิ่มขึ้นแต่มีแนวโน้มที่จะลดลงจนค่าเข้าใกล้แบบจำลอง model1-Lys101 เช่น แบบจำลอง model1-R1D ค่าความแตกต่างของพลังงานอันตรกิริยาเมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลอง model1-Lys101 จะมีค่าเท่ากับ -0.83 และ -1.38 kcal/mol เมื่อทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ MP2/6-31G(d) ตามลำดับ

สำหรับผลของหมู่ terminal ที่เชื่อมต่อทางด้าน amino ของ Lys101 พบว่าหมู่แทนที่ที่เพิ่มเข้าไปนั้นสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ GW420867X ได้ ดังนั้นหมู่แทนที่ที่เพิ่มเข้าจะไปนั้นจะสามารถส่งผลกระทบต่อค่าพลังงานอันตรกิริยาได้ ในกรณีของแบบจำลองที่แสดงผลของหมู่ terminal ที่ตำแหน่งทั้งสองด้านของ backbone Lys101 พบว่าค่าความแตกต่างของพลังงานอันตรกิริยาเมื่อเทียบกับแบบจำลอง model1-Lys101 มีค่าระหว่าง 0.40 ถึง -2.46 kcal/mol และ 0.07 ถึง -2.72 kcal/mol เมื่อทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ MP2/6-31G(d) ตามลำดับ โดยค่าความแตกต่างของพลังงานที่มากกว่าจะมาจากผลของทางด้าน carbonyl มากกว่าทางด้านของ amino โดยสาเหตุอาจเกิดจากอันตรกิริยาที่เพิ่มเข้ามาของทางด้านหมู่ amino โดยผลของการเพิ่มหมู่ทั้งสองด้านของ backbone Lys101 พบว่าสอดคล้องกับการเพิ่มหมู่ทีละด้านของ Backbone

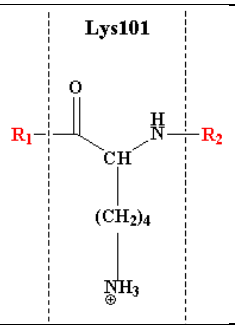



**รูปที่ 10.** แบบจำลองที่ศึกษาผลของหมู่ terminal ทางด้านหมู่ carbonyl ของ backbone (a) Model1-R1A, (b) Model1-R1B, (c) Model1-R1C, และ (d) Model1-R1D โดยระยะทางระหว่างหมู่ terminal และ GW420867X แสดงในรูป angstrom (Å)




**รูปที่ 11.** แบบจำลองที่ศึกษาผลของหมู่ terminal ทางด้านหมู่ amino ของ backbone (a) Model1-R2A, (b) Model1-R2B, (c) Model1-R2C, และ (d) Model1-R2D โดยระยะทางระหว่างหมู่ terminal และ GW420867X แสดงในรูป angstrom (Å)

**ตารางที่ 8.** ค่าพลังงานอันตรกิริยาระหว่าง GW420867X และ Lys101 ที่ถูกดัดแปลงเพื่อศึกษาผลของหมู่ Terminal

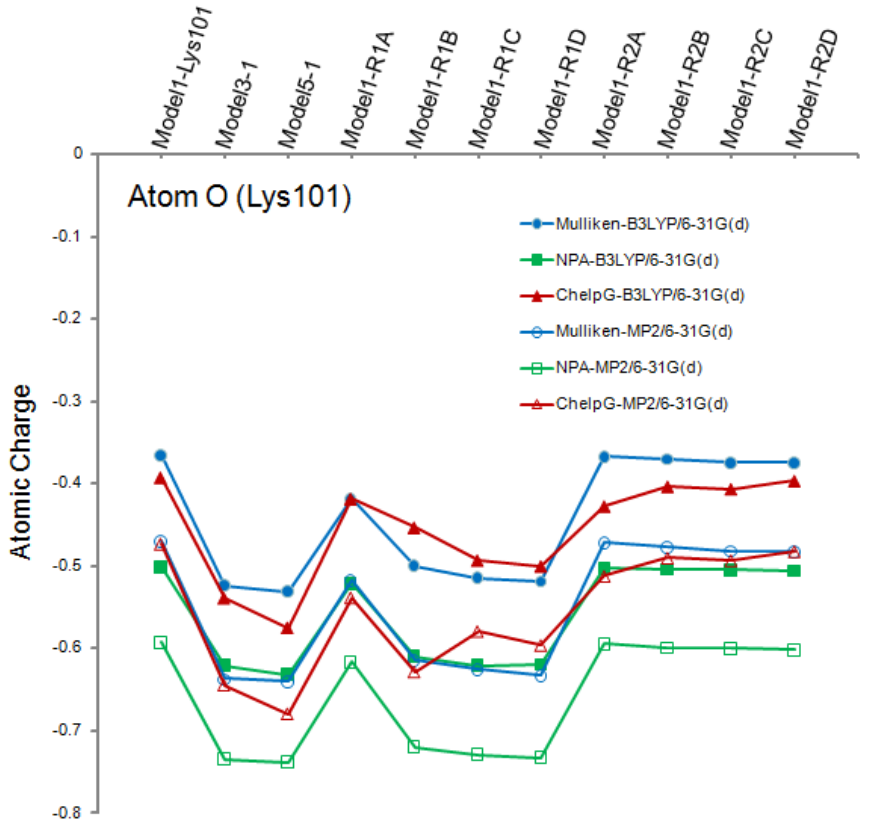



| Model | $R_1$ | $R_2$ | Interaction Energy (kcal/mol) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | B3LYP/6-31G(d) | MP2/6-31G(d) |
| Model1-Lys101 | H | H | -15.65 | -16.28 |
| - terminal at carbonyl group | | | | |
| Model1-R1A | $-CH_3$ | H | -16.01 (-0.36)* | -16.74 (-0.46) |
| Model1-R1B | $-NH_2$ | H | -17.43 (-1.78) | -18.29 (-2.01) |
| Model1-R1C | $-NH-CH_3$ | H | -17.41 (-1.76) | -18.44 (-2.16) |
| Model1-R1D | $-NH-CH_2-CHO$ | H | -16.48 (-0.83) | -17.66 (-1.38) |
| -terminal at amino group | | | | |
| Model1-R2A | H | $-CH_3$ | -15.25 (0.40) | -16.22 (0.07) |
| Model1-R2B | H | -CHO | -18.11 (-2.46) | -19.00 (-2.72) |
| Model1-R2C | H | $-CO-CH_3$ | -17.40 (-1.75) | -18.81 (-2.53) |
| Model1-R2D | H | $-CO-CH_2-NH_2$ | -16.97 (-1.32) | -18.52 (-2.24) |
| -terminal at carbonyl and amino groups | | | | |
| Model1-R1A-2A | $-CH_3$ | $-CH_3$ | -15.55 (0.09) | -16.59 (-0.31) |
| Model1-R1A-2B | $-CH_3$ | -CHO | -18.26 (-2.62) | -19.26 (-2.98) |
| Model1-R1A-2C | $-CH_3$ | $-CO-CH_3$ | -17.96 (-2.31) | -19.49 (-3.21) |
| Model1-R1A-2D | $-CH_3$ | $-CO-CH_2-NH_2$ | -17.34 (-1.69) | -18.97 (-2.69) |
| Model1-R1B-2A | $-NH_2$ | $-CH_3$ | -17.20 (-1.55) | -18.35 (-2.07) |
| Model1-R1B-2B | $-NH_2$ | -CHO | -19.85 (-4.20) | -20.98 (-4.70) |
| Model1-R1B-2C | $-NH_2$ | $-CO-CH_3$ | -19.30 (-3.65) | -20.96 (-4.68) |
| Model1-R1B-2D | $-NH_2$ | $-CO-CH_2-NH_2$ | -18.89 (-3.24) | -20.68 (-4.40) |
| Model1-R1C-2A | $-NH-CH_3$ | $-CH_3$ | -17.06 (-1.42) | -18.39 (-2.11) |
| Model1-R1C-2B | $-NH-CH_3$ | -CHO | -19.71 (-4.07) | -21.01 (-4.73) |
| Model1-R1C-2C | $-NH-CH_3$ | $-CO-CH_3$ | -19.16 (-3.51) | -21.00 (-4.71) |
| Model1-R1C-2D | $-NH-CH_3$ | $-CO-CH_2-NH_2$ | -18.76 (-3.11) | -20.71 (-4.43) |
| Model1-R1D-2A | $-NH-CH_2-CHO$ | $-CH_3$ | -16.13 (-0.48) | -17.62 (-1.33) |
| Model1-R1D-2B | $-NH-CH_2-CHO$ | -CHO | -18.78 (-3.13) | -20.24 (-3.96) |
| Model1-R1D-2C | $-NH-CH_2-CHO$ | $-CO-CH_3$ | -18.24 (-2.59) | -20.22 (-3.94) |
| Model1-R1D-2D | $-NH-CH_2-CHO$ | $-CO-CH_2-NH_2$ | -17.83 (-2.19) | -19.94 (-3.66) |

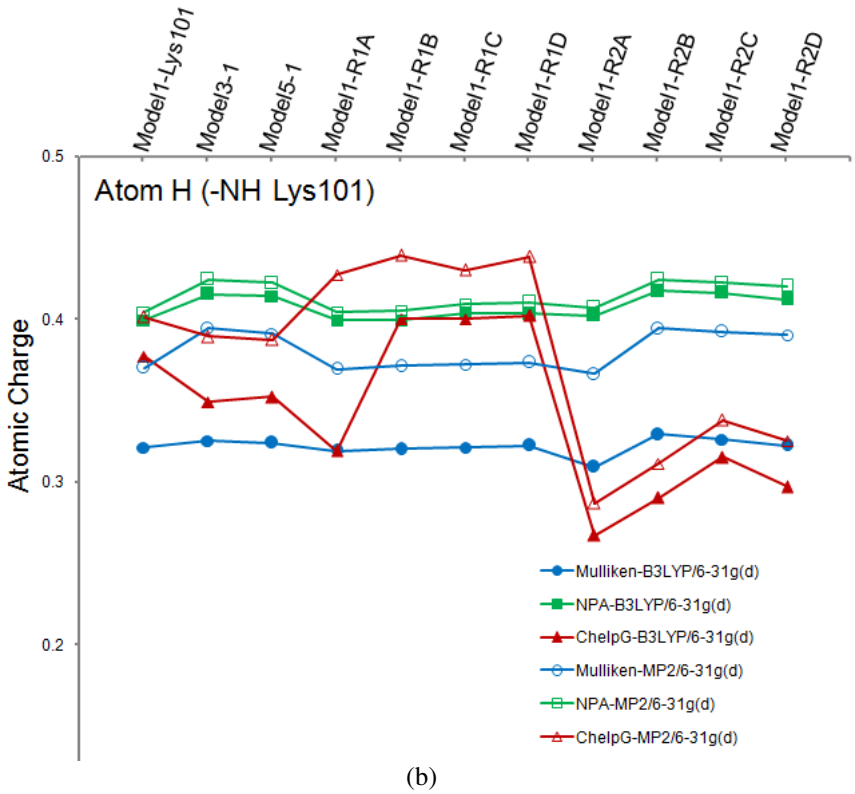
เพื่อทำการศึกษาผลของ electrostatic โดยการคำนวณประจุชนิด mulliken, NPA, และ ChelpG บนอะตอม O ของหมู่ carbonyl และอะตอม H ของหมู่ amino ของ backbone Lys101 โดยค่าพลังงานอันตรกิริยาที่ได้แสดงดังรูปที่ 12. โดยใช้แต่ residue ในการคำนวณ (ไม่รวม GW420867X ลงไปในแบบจำลอง) โดยคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ MP2/6-31G(d) สำหรับประจุบนอะตอม O ของหมู่ carbonyl ของ backbone Lys101 ค่าประจุที่ได้จากระเบียบวิธี MP2/6-31G(d) จะมีค่าความเป็นลบมากกว่าค่าที่ได้จากระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) ประมาณ 0.1 e และได้ทำการเปรียบเทียบประจุ บนอะตอม O ของหมู่ carbonyl ของแบบจำลอง model1-Lys101 กับแบบจำลองเมื่อรวมพันธะเปปไทด์เข้ามาในแบบจำลองด้วยคือแบบจำลอง models 3-1 และ 5-1 โดยประจุ mulliken, NPA, และ ChelpG บนอะตอม O ของหมู่ carbonyl ของแบบจำลอง models 3-1 และ 5-1 มีค่าความเป็นลบมากกว่าของแบบจำลอง model1-Lys101 ประมาณ 0.12-0.18e และ 0.14-0.21e เมื่อคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ MP2/6-31G(d) ตามลำดับ โดยค่าของประจุบนอะตอม O ของหมู่ carbonyl ของแบบจำลอง models 3-1 มีค่าใกล้เคียงกับ models 5-1 แสดงให้เป็นว่าพันธะเปปไทด์มีผลต่อผลของ electrostatic ของแบบจำลอง ในกรณีที่ศึกษาผลของหมู่แทนที่ด้าน carbonyl แบบจำลอง model1-R1A ซึ่งมีหมู่ terminal เป็นหมู่ methyl พบว่ามีค่าประจุไม่แตกต่างกับแบบจำลอง model1-Lys101 อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าประจุ Mulliken และ NPA บนอะตอม O ของแบบจำลอง models R1B-D มีค่าใกล้เคียงกับของแบบจำลอง models 3-1 และ 5-1 โดยมีค่าความแตกต่างของประจุ < 0.03e จากการคำนวณทั้งสองระเบียบวิธี ในกรณีที่คำนวณประจุ ChelpG แบบจำลอง models R1B-D พบว่ามีค่าความเป็นบวกมากกว่าแบบจำลอง models 3-1 และ 5-1 ประมาณ 0.04-0.09e จากการคำนวณทั้งสองระเบียบวิธี สำหรับแบบจำลองที่แสดงผลของหมู่ terminal ด้านหมู่ amino (models 1-R2A-D) ไม่พบความแตกต่างของค่าประจุบนอะตอม O ของ Lys101 โดยจากลักษณะทางโครงสร้างไม่พบแรงดึงดูดที่เกิดจากหมู่ terminal ที่เติมเข้าไปดังนั้นจากประจุลบที่มากขึ้นบนอะตอม O ทำให้ค่าพลังงานอันตรกิริยาลดลงด้วย

สำหรับค่าประจุบนอะตอม N ของหมู่ amino ประจุ Mulliken และ ChelpG ที่คำนวณด้วยระเบียบวิธี MP2/6-31G(d) มีค่าความเป็นบวกมากกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับค่าที่คำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) ประมาณ 0.05-0.07e สำหรับประจุ Mulliken และ 0.03-0.04e สำหรับประจุ ChelpG ในกรณีของประจุ NPA ประจุบนอะตอม N ของหมู่ amino แสดงผลที่เหมือนกันระหว่างการคำนวณด้วย B3LYP/6-31G(d) และ MP2/6-31G(d) โดยมีค่าความแตกต่างน้อยกว่า < 0.01e นอกจากนี้ประจุชนิด Mulliken, NPA, และ ChelpG ของแบบจำลอง models 3-1 และ 5-1 มีค่าใกล้เคียงกับแบบจำลอง model-1 Lys101 โดยมีค่าความแตกต่างของประจุ <0.03e จากค่าประจุ Mulliken และ NPA เมื่อคำนวณด้วยทั้งสองระเบียบวิธีหมู่ terminal ของทางด้าน carbonyl และ amino ไม่ส่งผลกระทบต่อค่าประจุบนอะตอม N บนหมู่ amino โดยมีค่าความแตกต่าง <0.04e เมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลอง model-1 Lys101 สำหรับประจุ ChelpG ที่ได้จากการคำนวณทั้งสองระเบียบวิธีพบว่ามีค่าที่เหมือนกับประจุของแบบจำลอง model-1 Lys101 ที่ได้เติมหมู่ terminal ทางด้าน carbonyl อย่างไรก็ตามพบว่าประจุ ChelpG ส่งผลกระทบกับแบบจำลองที่มีการ terminal ด้าน amino ประมาณ 0.06-0.11e เมื่อคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ 0.08-0.12e เมื่อคำนวณด้วยระเบียบวิธี MP2/6-31G(d) นอกจากนี้ผลของประจุ ChelpG บนอะตอม N ของหมู่ amino ของ

แบบจำลอง model1-R2A แสดงค่าความแตกต่างสูงสุดเมื่อเทียบกับแบบจำลอง model1-Lys101 ประมาณ 0.11e เมื่อคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) และ 0.12e เมื่อคำนวณด้วยระเบียบวิธี MP2/6-31G(d) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของค่าพลังงานอันตรกิริยาของแบบจำลองนี้ สำหรับแบบจำลอง models 1-R2A-D พบว่าค่าประจุที่คำนวณได้จากชนิด ChelpG มีค่าความเป็นบวกน้อยกว่าแบบจำลอง model1-Lys101 ซึ่งพบว่าค่าประจุ ChelpG ไม่สอดคล้องกับค่าพลังงานอันตรกิริยาที่ได้ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าผลของประจุบนอะตอม N ของหมู่ amino ไม่ส่งผลกระทบกับอันตรกิริยา Electrostatic มากนักแต่ค่าพลังงานอันตรกิริยาที่มีค่าความเป็นลบมากขึ้นนั้นมาจากแรงดึงดูดอื่นๆที่หมู่ terminal




(a)



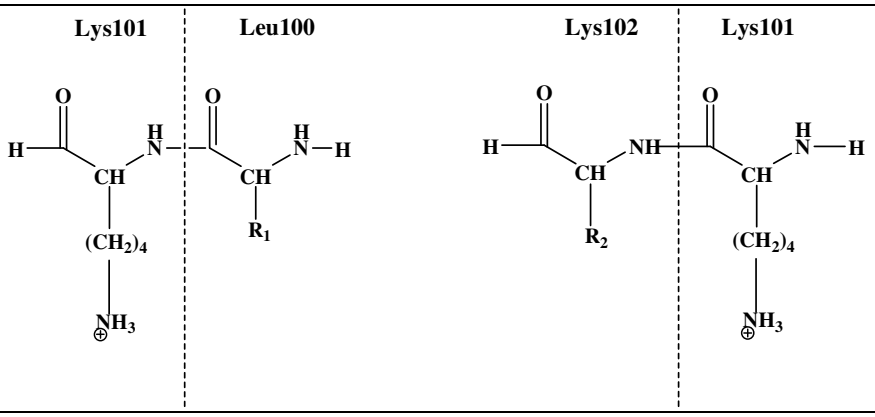

(b)

**รูปที่ 12.** ประจุบนอะตอม O (a) และ H ของ backbone Lys101 ของแบบจำลองเมื่อทำการคำนวณเฉพาะ residue

- **ผลของสายโซ่ของ Leu100 และ Leu102**

เพื่อที่จะยืนยันผลของกรดอะมิโนข้างเคียงที่มีต่อค่าพลังงานอันตรกิริยาแบบจำลองของกรดอะมิโนที่อยู่ด้านข้างโดยทำการเปลี่ยนแปลงขนาดของสายโซ่ของ Leu100 และ Lys102 ค่าพลังงานที่ได้แสดงดังตารางที่ 9. เมื่อพิจารณาแบบจำลองที่ทำการเปลี่ยนแปลงสายโซ่ของกรดอะมิโน Leu100 การคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d) แสดงอันตรกิริยาแบบผลักกับอะตอม δ-carbon ของ Leu100 โดยพบว่าเมื่อทำการลดขนาดของแบบจำลองโดยการตัดอะตอม δ-carbon ของ Leu100 (Model2-1-A1 และ Model2-1-A2) จะทำให้มีค่าพลังงานอันตรกิริยาที่มีค่าต่ำลง แต่เมื่อไม่พบแรงผลักนี้เมื่อทำการศึกษาด้วยระเบียบวิธี MP2/6-31G(d) เนื่องจากระเบียบวิธี B3LYP ขาดการพิจารณาผลของ dispersion contribution ค่าพลังงานอันตรกิริยาที่ได้จากระเบียบวิธี MP2/6-31G(d) ไม่ส่งผลต่อสายโซ่ของ Leu100 ในกรณีผลของสายโซ่ของ Lys102 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงขนาดของสายโซ่ จึงสรุปได้ว่าผลจากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี MP2/6-31G(d) นั้นสายโซ่ของกรดอะมิโน Leu100 และ Lys102 ไม่ส่งผลกระทบต่อการจับของ GW420867X ในบริเวณโพรงการจับ

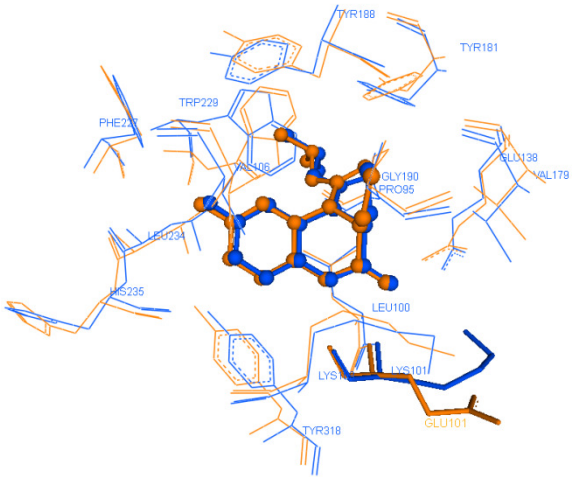
**ตารางที่ 9.** ค่าพลังงานอันตรกิริยาระหว่าง GW420867X และ กรดอะมิโน Lys101 และ ผลของสายโซ่ Leu100 และ Lys102




| Model | | Interaction Energy (kcal/mol) | |
|---|---|---|---|
| | | B3LYP/6-31G(d) | MP2/6-31G(d) |
| **Model1-Lys101** | | **-15.65** | **-16.28** |
| Model1-Leu100 | | 5.86 | 0.15 |
| Model1-Lys102 | | 1.52 | 1.09 |
| | **$R_1$** | | |
| **Model2-1-Lys101Leu100** | $-CH_2CH(CH_3)_2$ | -10.37 | -16.89 |
| Model2-1-A1 | $-(CH_2)_2-CH_3(\delta_1)$ | -13.18 | -18.37 |
| Model2-1-A2 | $-(CH_2)_2-CH_3(\delta_2)$ | -12.47 | -17.20 |
| Model2-1-A3 | $-CH_2-CH_3$ | -15.08 | -18.59 |
| Model2-1-A4 | $-CH_3$ | -15.30 | -17.79 |
| Model1-R2D | H | -16.97 | -18.52 |
| | **$R_2$** | | |
| **Model2-2-Lys101Lys102** | $-(CH_2)_4-NH_3+$ | -15.55 | -16.74 |
| Model2-2-A1 | $-(CH_2)_3-CH_3$ | -16.60 | -17.85 |
| Model2-2-A2 | $-(CH_2)_2-CH_3$ | -16.59 | -17.84 |
| Model2-2-A3 | $-CH_2-CH_3$ | -16.57 | -17.80 |
| Model2-2-A4 | $-CH_3$ | -16.55 | -17.76 |
| Model1-R1D | H | -16.48 | -17.66 |

- **ผลของโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์และชนิดที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 101**

ได้ทำการเปรียบเทียบโครงสร้างของ HIV-1 RT ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์และชนิดที่มีการกลายพันธุ์ Lys101Glu และ G420867X โดยการซ้อนทับ backbone ของกรดอะมิโน ดังแสดงในรูปที่ 13. โดยพบว่าการวางตัวของ G420867X ในโพรงการจับทั้งสองวางตัวในตำแหน่งที่คล้ายคลึงกัน แต่พบว่า G420867X ในโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิด Lys101Glu มีการบิดของหมู่ ethyl และ isopropoxy เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกรดอะมิโน Lys101 พบว่าสายโซ่ของ Glu101 มีการเบี่ยงเบนออกจากโพรงการจับเพื่อลดแรงผลักระหว่างหมู่ carboxylic ของ Glu101 และ Glu138(B) แต่ในส่วนของ Backbone ที่ตำแหน่ง 101 มีความคล้ายคลึงกันของการวางตัว กรดอะมิโน Trp229 ในโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิด Lys101Glu มีการเปลี่ยน conformation เมื่อเทียบกับโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์ นอกจากนี้มีการบิดของระนาบของวง Phenyl ของ Tyr181 ในโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิด Lys101Glu สำหรับกรดอะมิโนตัวอื่นพบว่ามีการวางตัวที่ต่างกันเล็กน้อย ตารางที่ 10. แสดงค่าพลังงานอันตรกิริยาระหว่าง G420867X ในโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิด Lys101Glu เปรียบเทียบกับค่าพลังงานอันตรกิริยาในโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์ โดยพบว่าค่าพลังงานอันตรกิริยาที่มีความแตกต่างมากคือค่าพลังงานอันตรกิริยากับกรดอะมิโน Lys101 และTyr181 โดย G420867X สูญเสียแรงดึงดูดโดยเสียค่าพลังงานอันตรกิริยาเท่ากับ 12.44 kcal/mol เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 101 จาก Lys เป็น Glu สำหรับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง Tyr181 เนื่องจากมีการบิดของระนาบของวง Phenyl ของ Tyr181 ที่เกิดจากการบิดของหมู่ isopropoxy ของ G420867X ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของค่าพลังงานอันตรกิริยาเท่ากับ 15.83 kcal/mol สำหรับกรดอะมิโนตัวอื่นพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่า $\Delta E$ มากนัก ดังนั้นค่าแรงดึงดูดที่ลดลงกับ Glu101 และแรงผลักที่เพิ่มขึ้นกับ Tyr181 ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งของ G420867X ลดลงเมื่อการกลายพันธุ์ของ Lys101Glu HIV-1 RT




**รูปที่ 13.** การวางตัวซ้อนทับของ G420867X (Ball and stick model) ในบริเวณโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (สีน้ำเงิน) และ ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ Lys101Glu (สีส้ม) กรดอะมิโน Lys101 แสดงใน Stick model

**ตารางที่ 10.** ค่าพลังงานอันตรกิริยาระหว่าง GW420867X และ กรดอะมิโนในบริเวณโพรงการจับของ HIV-1 RT ชนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และชนิดที่มีการกลายพันธุ์

| Residues | Interaction Energy (kcal/mol) | | |
|---|---|---|---|
| | wild-type | Lys101Glu | $\Delta E^*$ |
| Pro95 | 1.97 | -0.65 | -2.62 |
| Leu100 | 0.15 | 0.08 | -0.07 |
| Lys101 | -16.28 | -3.84 | 12.44 |
| Lys103 | -6.42 | -7.21 | -0.79 |
| Val106 | -0.92 | -0.16 | 0.76 |
| Val179 | -0.90 | 1.55 | 2.45 |
| Tyr181 | -2.37 | 13.46 | 15.83 |
| Tyr188 | -1.89 | 0.33 | 2.22 |
| Gly190 | -0.30 | 1.94 | 2.24 |
| Phe227 | -0.60 | -1.07 | -0.47 |
| Trp229 | -1.69 | -2.25 | -0.56 |
| Leu234 | -1.27 | -0.98 | 0.29 |
| His235 | -1.55 | -2.05 | -0.50 |
| Tyr318 | -2.38 | -2.42 | -0.04 |
| Glu138(B) | 5.09 | 5.03 | -0.06 |

*$\Delta E$=I.E. $_{Lys101Glu}$-I.E.$_{wild\text{-}type}$

**สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง**

การศึกษาแบบเป็นระบบเพื่อหาแบบจำลองที่เหมาะสมในการคำนวณค่าพลังงานอันตรกิริยาของ GW420867X ในโพรงการจับของ HIV-1 RT โดยอาศัยการคำนวณเคมีควอนตัม จากค่าพลังงานอันตรกิริยา พบว่าอันตรกิริยาหลักที่เป็นแรงดึงดูดคือพันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่าง GW420867X และหมู่แอมโมเนียม และbackbone ของ Lys101 โดยใช้วิธี B3LYP และ MP2 และ basis set 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-311G(d), และ 6-311G(d,p) โดยพบว่าค่าพลังงานอันตรกิริยาจากวิธี MP2 มีประสิทธิภาพสูงว่าค่าพลังงานอันตรกิริยาที่ได้จากวิธี B3LYP โดยเฉพาะในกรณีที่มีการเกี่ยวข้องกับแรง dispersion และ อันตรกิริยา pi-pi และ H-pi ผลการคำนวณที่ได้แสดงให้เห็นว่าผลของหมู่ terminal ที่หมู่ carbonyl ของ Lys101 มีผลกระทบน้อยต่อค่าพลังงานอันตรกิริยา (~2 kcal/mol) และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยกับประจุบนอะตอม O ของ backbone Lys101 ดังนั้นแบบจำลองของกรดอะมิโนที่มีหมู่ terminal ด้วยอะตอม H สามารถใช้ในการสร้างแบบจำลองเพื่อคำนวณพลังงานอันตรกิริยาได้ นอกจากนี้ค่าพลังงานอันตรกิริยาสามารถอธิบายได้ว่า G420467X สูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้ง Lys101Glu HIV-1 RT เนื่องจากสูญเสียแรงดึงดูดกับกรดอะมิโน Lys101 12.44 kcal/mol และเกิดแรงผลักกับวง Tyr181

# ภาคผนวก

## ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Saparpakorn, P.; Thammaporn, R.; Hannongbua, S. Use of 3D QSAR to investigate the mode of binding of pyrazinones to HIV-1 RT. Monatsh Chem. 2009, 140, 587-594
2. Pungpo, P.; Punkvang, A.; Saparpakorn, P.; Wolschann, P.; Hannongbua, S. Recent Advances in NNRTI Design: Computer-Aided Molecular Design Approaches. Current Computer-Aided Drug Design, 2009, accepted
3. Khunnawutmanotham, N.; Chimnoi, N.; Thitithanyanont, A.; Saparpakorn, P.; Choowongkomon, K.; Pungpo, P.; Hannongbua, S.; Techasakul, S. Dipyridodiazepinone Derivatives; Synthesis and Anti HIV-1 Activity. Beilstein J. Org. Chem., 2009, accepted.
4. Saparpakorn, P.; Wolschann, P.; Karpfen, A.; Pungpo, P.; Hannongbua, S. Systematic investigation on the methodology of quantum chemical calculations in the binding of GW420867X as NNRTI. J. Chem. Inf. Model. submitted

## การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Oral presentation in the topic of “CoMFA study of 2-Aminopyrimidin-4(3H)-ones as potent NNRTIs” in 13th Annual Symposium on Computational Science and Engineer (ANSCSE13) at Faculty of Engineering, Kasetsart University, Bangkok on 25-27 March, 2009.
2. Poster presentation in the topic of “Systematic investigation on the methodology in the binding of GW420867X as NNRTI by using quantum chemical calculations” in CREST International Symposium on Theory and Simulations of Complex Molecular Systems and International Symposium on Theory of Molecular Structure, Function and Reactivity at Kyoto University, Kyoto on Japan, 20–23 July, 2009.

Monatsh Chem (2009) 140:587–594
DOI 10.1007/s00706-008-0093-3

ORIGINAL PAPER

# Use of 3D QSAR to investigate the mode of binding of pyrazinones to HIV-1 RT

**Patchreenart Saparpakorn · Ratsupa Thammaporn · Supa Hannongbua**

Received: 15 September 2008 / Accepted: 22 October 2008 / Published online: 27 November 2008
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** Comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) based on the docked conformation were performed for 24 pyrazinone derivatives. All compounds were docked into the wild-type HIV-1 RT binding pocket and the lowest-energy docked configurations were used to construct the 3D QSAR models. The CoMFA and CoMSIA models enable good prediction of inhibition by the pyrazinones, with $r^2_{cv} = 0.703$ and 0.735. Results obtained from CoMFA and CoMSIA based on the docking conformation of the pyrazinones are, therefore, powerful means of elucidating the mode of binding of pyrazinones and suggesting the design of new potent NNRTIs.

**Keywords** HIV-1 · CoMFA · CoMSIA · Molecular docking · NNRTI

## Introduction

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is caused by the human immunodeficiency virus (HIV). The reverse transcriptase (RT) of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) is the essential enzyme converting the single-stranded viral RNA genome into double-stranded proviral DNA prior to its integration into the host genomic DNA. HIV-1 RT is an asymmetric heterodimer consisting of a 560-residue chain (p66 subunit) and a 440-residue chain (p51 subunit). Nucleoside inhibitors (NRTIs) and non-nucleoside inhibitors (NNRTIs) are two types RT inhibitor widely used for treatment of AIDS. Nucleoside analog inhibitors, for example AZT, ddI, and ddC, are competitive inhibitors causing termination of the growing DNA chain. Although these nucleoside inhibitors are selective for HIV-1 RT, they are not highly specific and can affect cellular polymerases, with toxic effects [1, 2]. Non-nucleoside analog inhibitors, for example nevirapine, TIBO, and efavirenz, are non-competitive inhibitors binding in a hydrophobic pocket that is about 10 Å away from the enzyme's active site in the p66 subunit. Because of their use at low concentration and their high specificity, non-competitive inhibitors are of interest for developing novel potent inhibitors. Unfortunately, the major problem is the rapid development of NNRTI resistance, for example, Leu100Ile, Lys103Asn, and Tyr181Cys [3]. In order to improve the biological activity of NNRTIs, some classes of NNRTI, for example diaryltriazine (DATA) [4], diarylpyrimidine (DAPY) [5], TMC-125 [6], indolyl aryl sulfone (IAS) [7], and TMC-278 [8], have been proposed and designed to enhance activity against wild-type and mutant type HIV-1 RT. A series of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), pyrazinones, have been found to be active against wild-type HIV-1 RT and some are also active against mutant HIV-1 RT [9]. Information about the specific binding mode of pyrazinones to HIV-1 RT is therefore needed to suggest designs of novel potent NNRTIs active against both wild and mutant HIV-1 RT.

Comparative molecular field analysis (CoMFA) [10] and comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) [11] are three-dimensional quantitative structure–activity relationship (3D QSAR) methods widely used

P. Saparpakorn (✉) · R. Thammaporn · S. Hannongbua
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Kasetsart University (KU), Chatuchak,
Bangkok 10903, Thailand
e-mail: fscipnsk@ku.ac.th

P. Saparpakorn · R. Thammaporn · S. Hannongbua
Center of Nanotechnology, Kasetsart University (KU),
Bangkok, Thailand

to study and design new inhibitors. These methods have been used successfully for many classes of inhibitor by studying the relationship between their chemical structures and their biological activity. For NNRTIs, these methods are also able to reveal the dominant interaction of some types of NNRTI, for example TIBO [12], (aryl)bridged 2-aminobenzonitriles [13], and efavirenz [14]. In addition, the idea of a ligand's active conformation has been studied by using the docked conformation from the molecular docking method to construct 3D QSAR models. The docked conformation of some NNRTIs has been obtained by constructing and satisfying CoMFA and CoMSIA models [15, 16]. To avoid use of an incorrect conformation for construction of the 3D QSAR model, the docked conformation has been successfully used to select the bioactive conformation of the compounds [17]. Moreover, the 3D QSAR contour map obtained from the docked conformation can be superimposed on the active site for better explanation of the binding. In order to study the binding of pyrazinones to wild-type HIV-1 RT, the aim of this work was to derive their CoMFA and CoMSIA models based on their docked conformations.

## Results and discussion

### *Molecular docking of pyrazinones*

Because of the rotatable bonds connected to rings A and B of the pyrazinones, their optimized structures had different conformations from R185545, the conformation of which is known from X-ray studies. Therefore, the molecular docking method was used to propose bioactive conformations of the pyrazinones. The docked conformation was then used for constructing the 3D QSAR in the next step. To validate the AutoDock program for docking pyrazinones into the HIV-1 RT binding pocket, R185545 was docked back into its NNRTI binding pocket. From all 50 configurations, the results showed good ability to reproduce the same orientation as the X-ray position from RMSD values for the docked positions from the X-ray position of R185545 at about 1.03 to 1.38 Å. The final docked energies were about −61.92 to −63.81 kJ/mol. Therefore, these docking data were used to dock pyrazinones into the NNRTI binding pocket. From the docking results, each pyrazinone position was separated into several clusters but most of the positions (out of 50 configurations) were located in a binding orientation similar to that of R185545. Several positions have some parts of the compound located outside the binding pocket. For the final docked energies, most positions located in the binding orientation similar to that of R185545 had lower final docked energies than the other positions. Consequently,

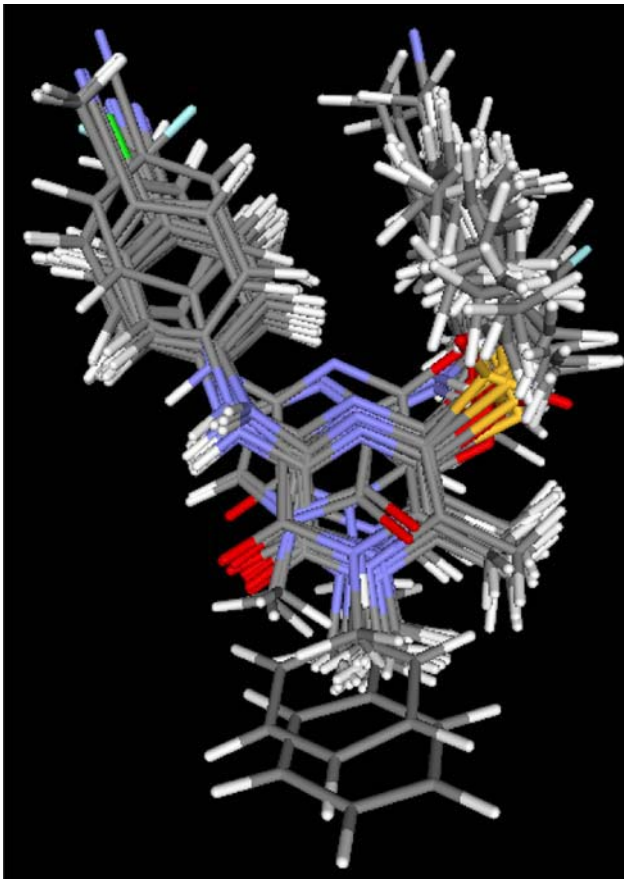


**Fig. 1** Selected docked conformation of all the pyrazinones

each pyrazinone position with the lowest final docked energy having similar binding orientation to R185545 was selected as the orientation used to construct 3D QSAR models in the next step. The positions selected for the pyrazinones are shown in Fig. 1. It is clearly apparent that they adopt the same binding orientation, except for compounds **1** and **2**, both of which had the opposite position of the carbonyl group in the central pyrazinone ring. Because of the small atoms (H and F) attached at the R position of compounds **1** and **2**, the methyl group at the $R^1$ position formed an H-bond with His235 instead of the hydrogen atom at the R position. This caused an upwards shift of the orientation and the opposite position of the carbonyl group on the central pyrazinone ring of the docking positions of compounds **1** and **2**.

### *CoMFA and CoMSIA models*

From PLS analysis, the results from the best CoMFA and CoMSIA models are shown in Table 1, where $r^2_{cv}$, noc, s-press, and $r^2$ represent the cross-validation coefficient, the optimum number of components, the uncertainty of the prediction error sum of squares derived from the LOO method, and the regression coefficient. From Table 1,

**Table 1** Statistical results for the CoMFA and CoMSIA models based on the docking conformation of the pyrazinones

| | Model | |
|---|---|---|
| | CoMFA | CoMSIA |
| $r^2_{cv}$ | 0.703 | 0.735 |
| noc | 6 | 6 |
| s-press | 0.622 | 0.571 |
| $r^2$ | 0.994 | 0.980 |
| $S$ | 0.092 | 0.158 |
| $F$ | 230.253 | 87.871 |
| Field contribution (%) | | |
| Steric | 59.0 | 11.8 |
| Electrostatic | 41.0 | 15.7 |
| H-acceptor | – | 36.6 |
| H-donor | – | 2.9 |
| Hydrophobic | – | 33.0 |

CoMFA and CoMSIA models reveal the good predictive power with $r^2_{cv}$ of 0.703 and 0.735. The $r^2$, $s$, and $F$ values were 0.994, 0.092, and 230.253 for the CoMFA model and 0.980, 0.158, and 87.871 for the CoMSIA model. Outliers of the best CoMFA model were compounds **3**, **6**, and **13**. For the best CoMSIA model, the outlier was compound **3**. These outliers are because of the different substituent group at positions R and $R^4$. The substituent groups at the R position of compounds **3** and **6** are the methyl and trifluoromethyl groups which are different from those of other compounds in the training set. In compound **13**, the $R^4$ substituent is the benzyl group, which is different from the hydrogen or methyl group used in the training set. For the CoMFA model, the contributions of the steric and electrostatic interactions were 59.0 and 41.0%. The main contribution in the CoMFA model was steric interaction. The field contributions of the CoMSIA model were 11.8, 15.7, 36.6, 2.9, and 33.0% for steric, electrostatic, H-acceptor, H-donor, and hydrophobic interactions, respectively. The H-acceptor and hydrophobic interactions were found to be the major contributions in the CoMSIA model. The 3D fields of the best CoMFA and CoMSIA models were represented as contour maps.

Steric and electrostatic contours of CoMFA and CoMSIA for compound **9** are shown in Figs. 2 and 3. Some steric contours of CoMFA and CoMSIA models (Fig. 2) are shown in the same region as the binding pocket. However, the steric contour map from the CoMSIA model was more localized than that from the CoMFA model. In both models, the green contours were localized near the bottom of ring A and substituent groups R and $R^1$. The green contour localized near the bottom of ring A was caused by the slightly different docked conformation of the ring A position. Ring A preferred the lower position, because in this position the ring formed a $\pi$–$\pi$ interaction with Tyr318 and an H-bond with the backbone carbonyl group of Lys101. In addition, the favored steric area was found at the $R^3$ and $R^4$ substituted groups of the pyrazinone ring in the CoMSIA model. This favored steric area of the CoMSIA model also had the small yellow contour. This suggested that a group which was too bulky was not favored in this area. For the $R^3$ substituted group, a group which was too bulky would cause steric interactions with the sidechain of Val179 and the $C_\beta$ of Glu138(B). Compared with compounds **9** and **20**, compounds with the hydrogen atom at the $R^3$ position have greater activity than that with the methyl substituent. Because most of the $R^4$ substituent groups in the training set were the methyl group, the exception being compound **22**, there was less effect at this substituent. Compound **22**, with the H substituent at the $R^4$ position, had the same activity as compound **16**. The methyl group at the $R^3$ position of compounds **16** and **22** caused slight movement of the structure compared with compound **9**. Therefore, the methyl group as the $R^4$ substituent group of compound **16**

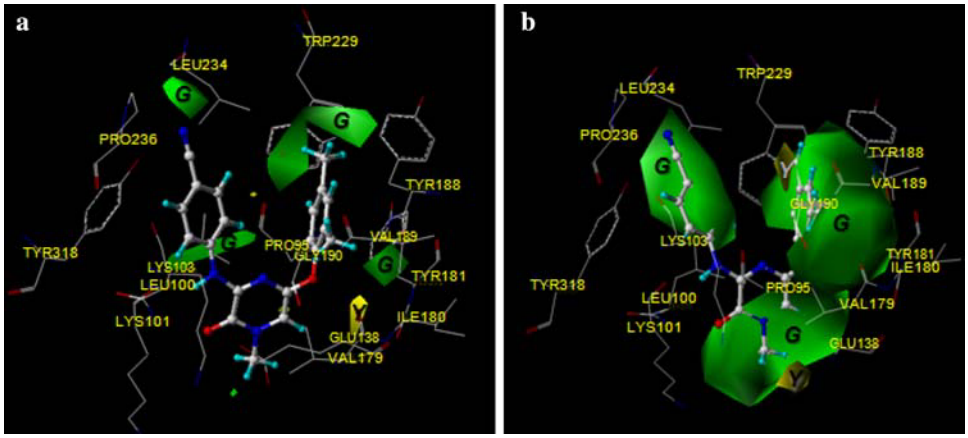



**Fig. 2** Steric contour of the CoMFA (**a**) and CoMSIA (**b**) models. The *green* (*G*) color represents the favored steric area and the *yellow* (*Y*) color represents the disfavored steric area

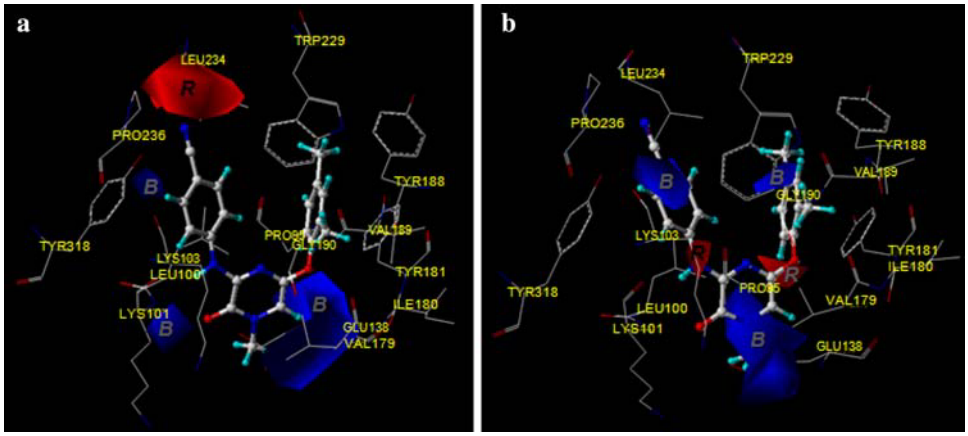



**Fig. 3** Electrostatic contour of the CoMFA (**a**) and CoMSIA (**b**) models. The *blue* (*B*) color represents the favored positive electrostatic area and the *red* (*R*) color represents the favored negative electrostatic area

could not form an H-bonding interaction with Glu138(B). The green contours localized near the R and $R^1$ substituent groups suggest that increasing the bulkiness of groups attached at R and $R^1$ increase the activity but the increase of this bulky group should be electrostatic in character, as suggested by the following electrostatic contours. For the electrostatic contour in the CoMFA model, the favored negative electrostatic area was found at the R substituent groups. This may suggest the advantage of having an electron-withdrawing substituent group at the R position. This located contour was not found in the CoMSIA model. For compound **9**, substitution of a cyano group at the R position of ring A resulted in an attractive interaction with Leu234 and His235, and a methyl group at the $R^1$ position of ring B resulted in an H–$\pi$ interaction with Tyr188 and Trp229. In both CoMFA and CoMSIA models, the favored positive electrostatic contours appeared in the same area. The contours were found near the $R^3$ and $R^4$ positions. The electrostatic CoMFA contour, excluding the common contour found in both CoMFA and CoMSIA models, can be explained by using the contours in the three additional field contributions of the CoMSIA model (i.e. hydrophobic, H-acceptor, and H-donor interactions).

The CoMSIA contours of three additional field contributions, i.e. hydrophobic, H-acceptor, and H-donor interactions, are shown in Fig. 4. One disfavored hydrophobic area is revealed at the R position. The results agree well with the favored negative electrostatic area in the CoMFA model. The other disfavored hydrophobic area appears at the bottom of the $R^4$ position and a space between ring A and B. These basic structural interactions suggest the design of new inhibitors by adding a hydrophilic substituent group around these regions. From the docked conformation, the bottom of the $R^4$ position had the space to interact with the sidechain of Lys101 and there was the space between ring A and B to interact with the sidechain of Leu234. For the H-acceptor contour, favored and disfavored H-acceptor areas were located at the R position. The favored H-acceptor area was surrounded by the disfavored H-acceptor area, as shown in the line contour map in Fig. 4b. This suggests that the substituent group preferred at the R position is a H-acceptor group but that this substituted H-acceptor group should not be bulky. Considering the binding pocket, this indicated that this disfavored H-acceptor area was located near the nitrogen and the oxygen atoms of backbone His235 and Pro236. The disfavored H-donor area was found in the wide region from the bottom part of ring A to the carbonyl group of pyrazinone ring. Moreover, there was a small favored H-donor area inside the disfavored H-donor area, which agrees well with the position of amino group between ring A and the pyrazinone ring. From the docked conformation in the binding pocket, the amino group was important for these derivatives because H-bonding occurred between the hydrogen atom of an amino group and an oxygen atom of backbone Lys101.

To validate the best CoMFA and CoMSIA models, the biological activities of compounds in the test set were predicted by using the best CoMFA and CoMSIA models obtained from the training set. The predicted $\log(1/IC_{50})$ and residuals for all the compounds are shown in Table 2. The residuals of the test set were within $\pm 0.9$ $\log(1/IC_{50})$ unit in both models. The $r^2$ of the test set are 0.7414 and 0.8659 for the CoMFA and CoMSIA models. The ability of both models to predict the biological activity of the pyrazinones is summarized in Fig. 5 as a plot of experimental activity [$\log(1/IC_{50})$] against activity predicted by the best CoMFA and CoMSIA models.

## Conclusions

To investigate the important mode of binding of pyrazinones to HIV-1 RT, 3D QSAR methods were used with the docked conformations of the pyrazinones. Twenty-four pyrazinones were docked into the HIV-1 RT binding pocket and the orientations of the pyrazinones in the binding pocket were demonstrated. The docked conformation of each pyrazinone

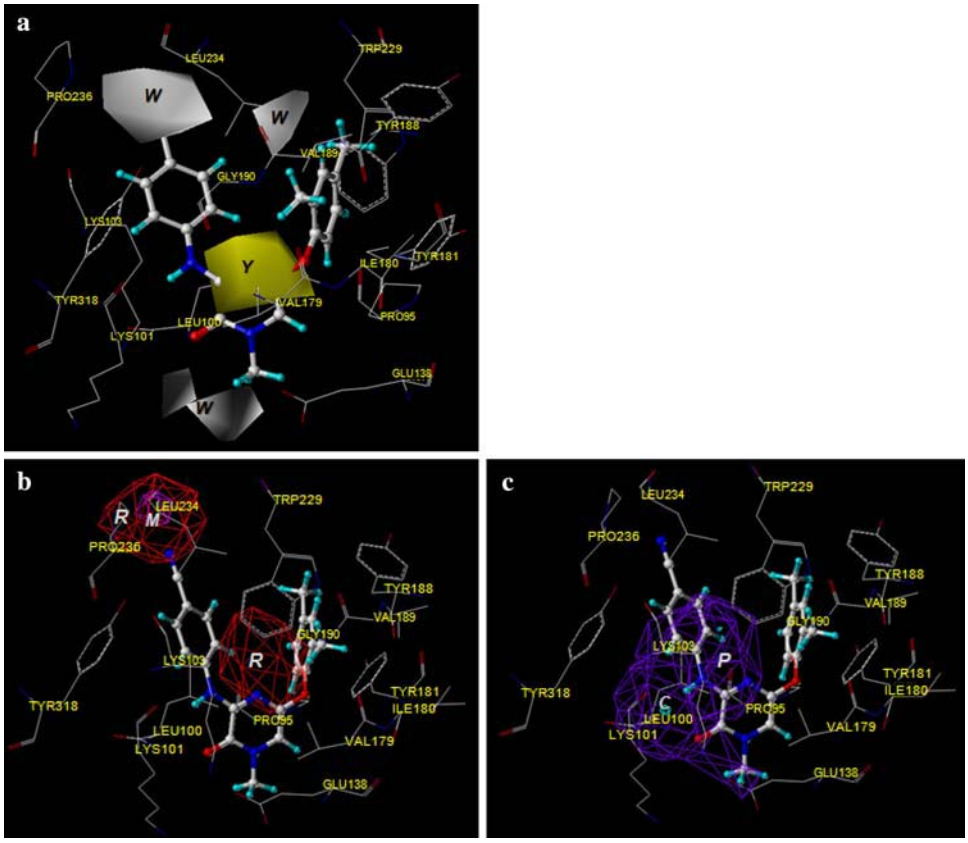



**Fig. 4** Hydrophobic (**a**), H-acceptor (**b**), and H-donor (**c**) contours of the CoMSIA models. The *yellow* (*Y*) color represents the favored hydrophobic area, the *white* (*W*) color represents the disfavored hydrophobic area, the *magenta* (*M*) color represents the favored H-acceptor area, the *red* (*R*) color represents the disfavored H-acceptor area, the *cyan* (*C*) color represents the favored H-donor area, and the *purple* (*P*) color represents the disfavored H-donor area

was used to construct CoMFA and CoMSIA models. These models had good predictive power, with $r^2_{cv}$ of 0.703 and 0.735. Steric and electrostatic contours of the CoMFA model are more or less similar to those of the CoMSIA model. The electrostatic contour found only in the CoMFA model agrees well with the contours from the three additional field contributions of the CoMSIA model (i.e. hydrophobic, H-acceptor, and H-donor interactions). Both models led to similar results and suggested that the preferred substituent at the R position should be a bulky, electron-withdrawing, H-acceptor, and that hydrophobic groups are not favored for forming an attractive interaction with Leu234 and His235. Therefore, the results obtained from the CoMFA model, and CoMSIA analyses based on the docked conformation of the pyrazinones, were powerful methods for describing the binding mode of pyrazinones and suggesting the design of new potent NNRTIs (Fig. 6).

## Computational details

### *Data set and molecule preparation*

Twenty-four pyrazinone structures and their experimental activities [$\log(1/IC_{50})$] used in this work are shown in Table 3. Starting geometries were optimized by quantum chemical calculations at the HF/3-21G level of theory using the Gaussian03 program [18]. Gasteiger–Hückel charges were added by using SYBYL software version 7.0 [19]. Because of the similar structures of the pyrazinones, the X-ray structure of HIV-1 RT complex with R185545 was selected from the Protein Databank (pdb code 1suq [20]) and used in this study. After removing R185545 from the complex structure, all-hydrogen atoms were added to the protein using standard SYBYL geometries, and Kollman charges were also added. For the R185545 structure, hydrogen atoms and Gasteiger–Hückel charges were added using SYBYL software.

### *Molecular docking of the pyrazinones*

The pyrazinones were docked into the binding pocket of HIV-1 RT by using the software AutoDock3.05 [21] with the Lamarckian genetic algorithm. First, the validity of the docking method was verified by redocking R185545 back into the binding pocket of the protein structure (pdb code 1suq). The grid size and grid spacing were set to 60 × 60 × 60 and 0.375 Å, respectively. The numbers of runs was set to 50. All other parameters were the default value. To select the configuration for setting up the 3D QSAR models, the lowest docked energy configuration having similar orientation of R185545 was used.

**Table 2** Predicted log(1/$IC_{50}$) and residuals for the CoMFA and CoMSIA models

| Compounds | log(1/$IC_{50}$) | CoMFA | | CoMSIA | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Calc. log(1/$IC_{50}$) | Residual | Calc. log(1/$IC_{50}$) | Residual |
| 1 | 6.60 | 6.52 | 0.08 | 6.54 | 0.06 |
| 2 | 5.90 | 5.96 | −0.06 | 5.95 | −0.05 |
| 3 | 4.00 | 6.44 | −2.44 | 7.14 | −3.14 |
| 4 | 7.60 | 7.65 | −0.05 | 7.78 | −0.18 |
| 5 | 7.10 | 7.10 | 0.00 | 7.02 | 0.08 |
| 6 | 6.30 | 8.85 | −2.55 | 6.23 | 0.07 |
| 7 | 8.40 | 8.51 | −0.11 | 8.35 | 0.05 |
| 8 | 7.70 | 8.19 | −0.49 | 8.58 | −0.88 |
| 9 | 9.00 | 8.92 | 0.08 | 8.76 | 0.24 |
| 10 | 8.30 | 8.34 | −0.04 | 8.10 | 0.20 |
| 11 | 7.80 | 7.81 | −0.01 | 8.14 | −0.34 |
| 12 | 6.50 | 7.38 | −0.88 | 6.45 | 0.05 |
| 13 | 7.49 | 8.80 | −1.31 | 7.52 | −0.03 |
| 14 | 7.00 | 7.05 | −0.05 | 7.06 | −0.06 |
| 15 | 8.30 | 8.13 | 0.17 | 8.29 | 0.01 |
| 16 | 7.40 | 7.36 | 0.04 | 7.48 | −0.08 |
| 17 | 6.90 | 7.54 | −0.64 | 7.48 | −0.58 |
| 18 | 6.30 | 6.23 | 0.07 | 6.26 | 0.04 |
| 19 | 8.30 | 8.47 | −0.17 | 8.70 | −0.40 |
| 20 | 8.52 | 8.47 | 0.05 | 8.58 | −0.06 |
| 21 | 8.22 | 8.26 | −0.04 | 8.19 | 0.03 |
| 22 | 7.40 | 7.44 | −0.04 | 7.40 | 0.00 |
| 23 | 8.10 | 8.14 | −0.04 | 8.16 | −0.06 |
| 24 | 8.30 | 8.31 | −0.01 | 8.29 | 0.01 |

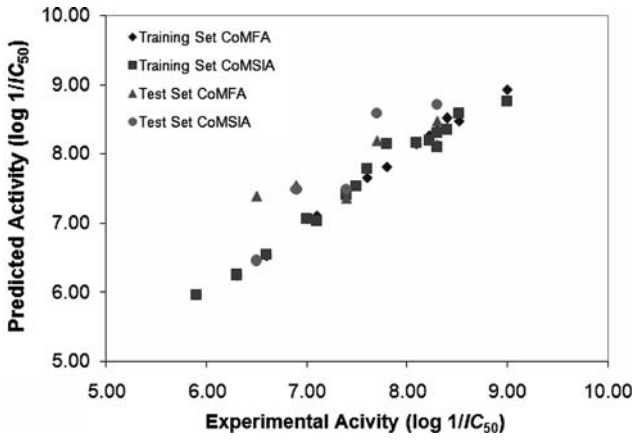



**Fig. 5** Plot of experimental activity [log(1/$IC_{50}$)] against activity predicted by the best CoMFA and CoMSIA models

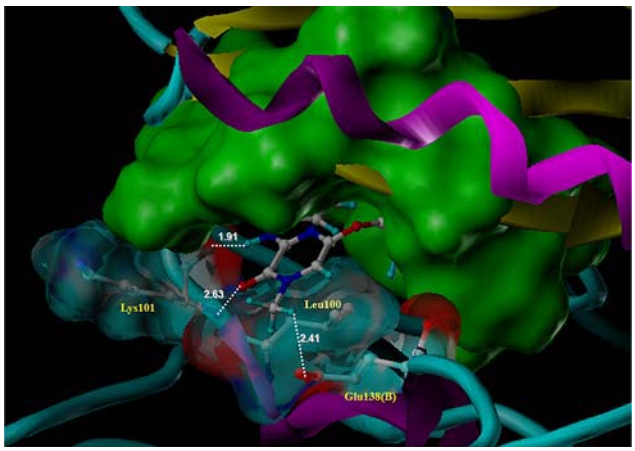
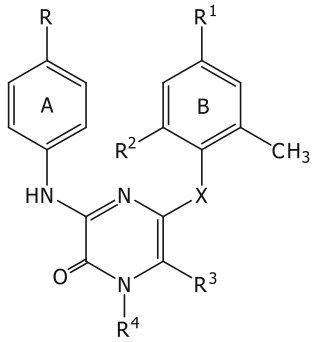



**Fig. 6** Orientation of compound **9** (ball and stick model) in the binding pocket surface of HIV-1 RT

*CoMFA and CoMSIA models*

The selected configurations of each compound from molecular docking were used to construct the 3D QSAR models. These docked structures were divided into the training set and the test set. Five compounds representing the diversity of the pyrazinone derivatives and the range of activities [log(1/$IC_{50}$)] served as the test set. These were compounds **8**, **12**, **16**, **17**, and **19**. The remaining compounds served as the training set for constructing 3D QSAR models. SYBYL software, version 7.0, was used to study the CoMFA and CoMSIA models. In CoMFA analysis, the steric and electrostatic fields were calculated using Lennard–Jones and Coulombic potentials. Default values for probes were

**Table 3** Structures of the pyrazinones and antiviral activity against wild-type HIV-1 RT




| Compound | R | X | $R^1$ | $R^2$ | $R^3$ | $R^4$ | $\log(1/IC_{50})$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | H | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 6.60 |
| 2 | F | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 5.90 |
| 3 | $CH_3$ | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 4.00 |
| 4 | Cl | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 7.60 |
| 5 | Cl | S | $CH_3$ | $CH_3$ | H | $CH_3$ | 7.10 |
| 6 | $CF_3$ | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 6.30 |
| 7 | CN | O | H | H | H | $CH_3$ | 8.40 |
| 8 | CN | S | H | H | H | $CH_3$ | 7.70 |
| 9 | CN | O | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 9.00 |
| 10 | CN | S | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | 8.30 |
| 11 | CN | S | $CH_3$ | $CH_3$ | H | $CH_3$ | 7.80 |
| 12 | CN | O | H | H | H | $CH_2Ph$ | 6.50 |
| 13 | CN | O | $CH_3$ | H | H | $CH_2Ph$ | 7.49 |
| 14 | Cl | O | H | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 7.00 |
| 15 | CN | O | H | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 8.30 |
| 16 | CN | S | H | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 7.40 |
| 17 | Cl | O | $CH_3$ | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 6.90 |
| 18 | Cl | S | $CH_3$ | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 6.30 |
| 19 | CN | O | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | 8.30 |
| 20 | CN | O | $CH_3$ | H | $CH_3$ | $CH_3$ | 8.52 |
| 21 | CN | O | CN | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | 8.22 |
| 22 | CN | S | H | H | $CH_3$ | H | 7.40 |
| 23 | CN | $SO_2$ | $CH_3$ | $CH_3$ | H | $CH_3$ | 8.10 |
| 24 | CN | $SO_2$ | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | 8.30 |

positively charged $sp^3$ hybridized carbon, 2 Å of grid spacing, and energy cutoff values of 125.52 kJ/mol for steric and electrostatic fields. For CoMSIA analysis, five different similarity fields were studied: steric, electrostatic, hydrophobic, hydrogen-bond donor, and hydrogen-bond acceptor. The similarity indices of five fields at regularly spaced grid points were calculated. Probes with carbon atom with +1.0 charge and 1 Å radius were used. Partial least-squares (PLS) regression analysis was used to derive the CoMFA and CoMSIA models. The models represented the relationships between the independent variables (CoMFA and CoMSIA fields) and the dependent variable (the experimental activities [$\log(1/IC_{50})$] for each compound). The maximum number of components was set to six and leave-one-out (LOO) was used to evaluate the predictive capability of the model and to obtain the optimum number of components. The cross-validated correlation coefficient ($q^2$ or $r^2_{cv}$) represented the quality of the model. The PLS procedure without cross-validation was performed to generate the CoMFA and CoMSIA models by using the chosen optimum number of components. The CoMFA and CoMSIA models were represented by use of contour maps. For better understanding of the pyrazinones, the contour maps were superimposed on to the NNRTI binding site.

**Acknowledgments** This investigation was supported by the Thailand Research Fund (RTA5080005). P.S. is grateful to the Thailand Research Fund (MRG5080267) and the Faculty of Science (ScRF), Kasetsart University for a research grant. The National Synchrotron Research Center, Thailand, is also acknowledged for R.T.'s scholarship. The Center of Nanotechnology at Kasetsart University, Laboratory for Computational and Applied Chemistry (LCAC), the Postgraduate Program in Education and Research on Petroleum, Petrochemical Technology and Advanced Materials, Ministry of Education, and the Large Scale Simulation Research Laboratory (LSR)/NECTEC are also gratefully acknowledged for research facilities and computing resources. Thanks are also due to Andrew Olson for reading the manuscript.

## References

1. Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, Hughes SH, Pauwels R, Andries K, Janssen PA, Arnold E (1994) J Mol Biol 243:369
2. De Clercq E (1995) Clin Microbiol Rev 8:200
3. Menéndez-Arias L (2002) Trends Pharmacol Sci 23:381
4. Ludovici DW, Kavash RW, Kukla MJ, Ho CY, Ye H, De Corte BL, Andries K, De Béthune MP, Azijn H, Pauwels R, Moereels HEL, Heeres J, Koymans LMH, De Jonge MR, Van Aken KJA, Daeyaert FFD, Lewi PJ, Das K, Arnold E, Janssen PAJ (2001) Bioorg Med Chem Lett 11:2229
5. Ludovici DW, De Corte BL, Kukla MJ, Ye H, Ho CY, Lichtenstein MA, Kavash RW, Andries K, De Béthune MP, Azijn H, Pauwels R, Lewi PJ, Heeres J, Koymans LMH, De Jonge MR, Van Aken KJA, Daeyaert FFD, Das K, Arnold E, Janssen PAJ (2001) Bioorg Med Chem Lett 11:2235
6. Andries K, Azijn H, Thielemans T, Ludovici D, Kukla M, Heeres J, Janssen P, De Corte B, Vingerhoets J, Pauwels R, De Béthune MP (2004) Antimicrob Agents Chemother 48:4680
7. Ragno R, Coluccia A, La Regina G, De Martino G, Piscitelli F, Lavecchia A, Novellino E, Bergamini A, Ciaprini C, Sinistro A, Maga G, Crespan E, Artico M, Silvestri RJ (2006) J Med Chem 49:3172
8. Mordant C, Schmitt B, Pasquier E, Demestre C, Queguiner L, Masungi C, Peeters A, Smeulders L, Bettens E, Hertogs K, Heeres J, Lewi P, Guillemont J (2007) Eur J Med Chem 42:567
9. Heeres J, De Jonge MR, Koymans LMH, Daeyaert FFD, Vinkers M, Van Aken KJA, Arnold E, Das K, Kilonda A, Hoornaert GJ, Compernolle F, Cegla M, Azzam RA, Andries K, De Béthune M, Azijn H, Pauwels R, Lewi PJ, Janssen PAJ (2005) J Med Chem 48:1910

10. Cramer RD III, Patterson DE, Bunce JD (1988) J Am Chem Soc 110:5959
11. Klebe G, Abraham U, Mietzner T (1994) J Med Chem 37:4130
12. Barreca ML, Carotti A, Carrieri A, Chimirri A, Monforte AM, Calace MP, Rao A (1999) Bioorg Med Chem 7:2283
13. Sciabola S, Carosati E, Baroni M, Mannhold R (2005) J Med Chem 48:3756
14. Pungpo P, Saparpakorn P, Wolschann P, Hannongbua S (2006) SAR QSAR Environ Res 17:353
15. Zhou Z, Madura JD (2004) J Chem Inf Comput Sci 44:2167
16. Medina-Franco JL, Rodríguez-Morales S, Juárez-Gordiano C, Hernández-Campos A, Castillo RJ (2004) J Comput Aided Mol Des 18:345
17. AbdulHameed MDM, Hamza A, Liu J, Zhan C (2008) J Chem Inf Model 48:1760
18. Frisch MJ et al (2003) Gaussian03. Gaussian, Inc., Pittsburgh
19. SYBYL 7.0 TRIPOS, Assoc., Inc., St. Louis, MO
20. Das K, Clark AD Jr, Lewi PJ, Heeres J, De Jonge MR, Koymans LM, Vinkers HM, Daeyaert F, Ludovici DW, Kukla MJ, De Corte B, Kavash RW, Ho CY, Ye H, Lichtenstein MA, Andries K, Pauwles R, Debethune MP, Boyer PL, Clark P, Hughes SH, Janssen PA, Arnold E (2004) J Med Chem 47:2550
21. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ (1998) J Comput Chem 19:1639