



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ
สารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส

โดย ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และคณะ

เดือน ปีที่เสร็จโครงการ กรกฎาคม 2543



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ
สารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส

โดย อธิยุทธ วิไลวัลย์ และคณะ

เดือน ปีที่เสร็จโครงการ กรกฎาคม 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ สารยับยั้งเอ็นไซม์โคโรโฟลเลตรีดักเตส

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. นายธีรยุทธ วิไลวัลย์
2. นายยอดหทัย เทพธรานนท์
3. นายยงยุทธ ยุทธวงศ์
4. นางสาวบงกช ธารชมพู่
5. นางสาวชะวະณี ศิริชัยวัฒน์
6. นางสาวสุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล
7. นายวรชาติ สิริวรารักษ์
8. นางสาวเนตรนภา เจริญเศรษฐกุล
9. นางสาวหนึ่งฤทัย แสงแสงสีรุ่ง
10. Mr Gordon Lowe
11. Miss Rachel Quarrell

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Dyson Perrins Laboratory, Oxford, UK
Dyson Perrins Laboratory, Oxford, UK

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการ -

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	iv
Executive Summary	vii
Output	x
เนื้อหางานวิจัยโดยย่อ	xii
Research Abstract	xiii
บทที่ 1 เอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสและโรคมะเร็ง	1
บทที่ 2 การสังเคราะห์ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนในวัฏภาคสารละลาย	8
บทที่ 3 การสังเคราะห์ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนบนวัฏภาคของแข็ง	23
บทที่ 4 การสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ในวัฏภาคสารละลาย	30
บทที่ 5 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน	42
บทที่ 6 การสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 2,4-ไดอะมิโนพิริมิดีน	51
บทที่ 7 บทสรุป	56
บทที่ 8 Experimental Details	57
ภาคผนวก 1 HPLC chromatogram และ mass spectrum ของคอมบิเนทอเรียลไลบรารี ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนที่สังเคราะห์ได้	
ภาคผนวก 2 Reprints ของผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว	

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของสารยับยั้งเอ็นไทม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือของทุกฝ่าย กระผมในฐานะหัวหน้าโครงการขอขอบคุณ แหล่งเงินทุน สนับสนุน ได้แก่ โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอกของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย รุ่นที่ 1 ประจำปี 2540 (PDF57/2540) สหภาพยุโรป (INCO-DC IC18CT970223) และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ขอขอบคุณที่ปรึกษาโครงการได้แก่ ศ.ดร.ยอดหทัย เทพธรานนท์ ศ.ดร.ยงยุทธ ยุทธวงศ์ และ Professor Gordon Lowe ที่ช่วยควบคุมให้การวิจัยดำเนินไปตามกรอบที่กำหนดและให้คำแนะนำอันทรงคุณค่าพร้อมทั้งการสนับสนุนอย่างต่อเนื่อง ขอขอบคุณเพื่อนอาจารย์โดยเฉพาะ Dr. R.W. Bates ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และให้หยิบยืมสารเคมีในยามจำเป็น และ ดร.อรุณศิริ ชิตางกูร ที่ให้กรุณาความช่วยเหลือในด้าน HPLC และทีมงานวิจัยจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยโดยเฉพาะอย่างยิ่ง น.ส. หนึ่งฤทัย แสงแสงสีรุ่ง และ น.ส.เนตรนภา เจริญเศรษฐกุล ซึ่งเป็นการสำคัญในการสังเคราะห์สารเป็นจำนวนมากในโครงการวิจัยนี้ รวมทั้งนิสิตปริญญาตรีและปริญญาโทที่ทำงานภายใต้โครงการ "ไซโคลกัวนิล" ได้แก่ นายณพพงษ์ พงศ์ชัยสิริกุล น.ส. นริสา ณ ลำพูน นายปณิธิ สาทิสสระรัต น.ส.แพรว ลัตยาภูมิพงศ์ น.ส. วณิดา วิริยะวาริ และนายภาณุวัฒน์ ผดุงรส นอกจากนี้ก็ยังมีทีมงานจากมหาวิทยาลัยมหิดล (รศ.ดร.วรชาติ สิริวราภรณ์และคณะ) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ดร.สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาลและทีมงานสกรีนเอ็นไทม์, ดร.บงกช ชารชมพู, น.ส.ชะวะณี ศิริชัยวัฒน์) มหาวิทยาลัยออกซฟอร์ด (Dr. Rachel Quarrell) และผู้ให้ความช่วยเหลือทางด้านเทคนิคโดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณอัมพร อึ้งปกรณแก้ว (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และ น.ส.นันทิกา ปานจันทร์ (สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) รวมทั้งอีกหลายท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับโครงการไม่ว่าจะเป็นโดยตรงหรือทางอ้อม ซึ่งไม่อาจจะบุนามได้ทั้งหมดไว้ในเนื้อที่อันจำกัดนี้ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งระบบสาธารณูปโภคต่างๆ ที่จำเป็น

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: PDF57/2540

ชื่อโครงการ: การสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของสารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส

ผู้ร่วมวิจัย: นายธีรยุทธ วิไลวัลย์ นางสาวเนตรนภา เจริญเศรษฐกุล นางสาวหนึ่งฤทัย แสงแสงสีรุ่ง(ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) นายยอดหทัย เทพชรานนท์ (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) นายวรชาติ สิริวรภรณ์ (ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) นายยงยุทธ ยุทธวงศ์ นางสาวบงกช ธารชมพู นางสาวชะวະนี ศิริชัยวัฒน์ นางสาวสุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) Mr. Gordon Lowe Miss Rachel Quarrell (Dyson Perrins Laboratory, Oxford, UK)

หมายเลข e-mail: vtirayut@chula.ac.th

ระยะเวลาที่ทำวิจัย: 3 ปี (1 สิงหาคม 2540 - 31 กรกฎาคม 2543)

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ 2,4-ไดอะมีโนพิริมิดีน และ 4,6-ไดอะมีโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน โดยวิธีการสังเคราะห์แบบคอมบิเนทอเรียล

วิธีการที่ได้ข้อมูลและขอบเขตการวิจัย: เคมีอินทรีย์สังเคราะห์และการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีและสเปกโตรสโคปี และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สังเคราะห์ได้โดยใช้เอ็นไซม์ โดยขอบเขตของการวิจัยคือการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 2,4-ไดอะมีโนพิริมิดีน ซึ่งมีหมู่แทนที่ต่างๆ ที่ตำแหน่ง C⁵ และ C⁶ และ 4,6-ไดอะมีโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ซึ่งมีหมู่แทนที่ต่างๆ ที่ตำแหน่ง N¹ และ C² ในวัฏภาคสารละลาย และวัฏภาคของแข็ง

ผลที่ได้จากการวิจัย: ได้วิธีการสังเคราะห์สารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสในกลุ่ม 4,6-ไดอะมีโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ที่มีประสิทธิภาพสูง และได้นำวิธีนี้ไปสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารี ซึ่งเมื่อนำไปศึกษากับเอ็นไซม์พบสารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสที่ดีกว่าไซโคลกัวนิลหลายชนิด

สรุปสาระสำคัญของผลที่ได้จากการวิจัย: เทคนิคการสังเคราะห์และตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยเคมีคอมบิเนทอเรียลนำไปสู่โครงสร้างของสารยับยั้งเอ็นไซม์ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต: ออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่ๆ โดยอาศัยความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้เพื่อนำสารดังกล่าวไปศึกษาทางพิษวิทยาเพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป

คำสำคัญ: *Plasmodium falciparum*, malaria, dihydrofolate reductase, DHFR, inhibitor, combinatorial

Abstract

Project Code : PDF57/2540

Project Title : Synthesis of combinatorial libraries of dihydrofolate reductase inhibitors

Investigators : Mr. Tirayut Vilaivan, Miss Netnapha Chareonsethakul, Miss Nungruthai Saesaengseerung (Department of Chemistry, Chulalongkorn University) Mr. Yodhathai Thebtaranonth (Department of Chemistry, Mahidol University) Mr. Yongyuth Yuthavong, Miss Bongkoch Tamchompoo, Miss Chawanee Sirichaiwat, Miss Sumalee Kamchonwongpaisan (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) Mr. Worachart Sirawaraporn (Department of Biochemistry, Mahidol University) Mr Gordon Lowe, Miss Rachel Quarrell (Dyson Perrins Laboratory, Oxford, UK)

E-mail Address : vtirayut@chula.ac.th

Project Period : 3 years (August 1st, 1997 - July 31st, 2000)

Objectives : To develop a synthetic method for dihydrofolate reductase inhibitors belonging to the group 2,4-diaminopyrimidine and 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine using combinatorial techniques

Methodology : Chemical synthesis and chromatographic and spectroscopic analysis, together with biological assay with dihydrofolate reductase enzyme. The scope of this research is to synthesize combinatorial libraries of 2,4-diaminopyrimidine carrying substituents at C⁵ and C⁶ positions and 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine carrying substituents at N¹ and C² positions in solution and solid phase.

Results : An efficient method for synthesis of dihydrofolate reductase inhibitors belonging to the group 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine was developed and used in synthesis of combinatorial libraries of such compounds. Screening the libraries with enzyme revealed a number of inhibitors which are more effective than cycloguanil.

Discussion/Conclusion : Synthesis and biological assay of dihydrofolate reductase inhibitor libraries using combinatorial techniques lead to novel compounds possessing better DHFR-inhibiting properties.

Suggestion/Further Implication/ Implementation : Design and synthesis of new inhibitors based on the knowledge obtained from this study and test the toxicological properties of the compounds which will ultimately lead to new drugs discovery.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, malaria, dihydrofolate reductase, DHFR, inhibitor, combinatorial

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

Project Code : PDF57/2540

Project Title : การสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของสารยับยั้งเอ็นไซม์โคโรโฟลีดรีดักเทส

Investigators :

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1. นายธีรยุทธ วิไลวัลย์ | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. นายยอดหทัย เทพธรานนท์ | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. นายยงยุทธ ยุทธวงศ์ | ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ |
| 4. นางสาวบงกช ชารชมพู่ | ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ |
| 5. นางสาวชะวณี ศิริชัยวัฒน์ | ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ |
| 6. นางสาวสุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล | ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ |
| 7. นายวรชาติ สิริวรรณ | ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 8. นางสาวเนตรนภา เจริญเศรษฐกุล | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 9. นางสาวหนึ่งฤทัย แสงแสงสีรุ่ง | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 10. Mr Gordon Lowe | Dyson Perrins Laboratory, Oxford, UK |
| 11. Miss Rachel Quarrell | Dyson Perrins Laboratory, Oxford, UK |

E-mail Address : vtirayut@chula.ac.th

Project Period : 1 สิงหาคม 2540 - 31 กรกฎาคม 2543

Objectives :

1. เพื่อพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สารยับยั้งเอ็นไซม์โคโรโฟลีดรีดักเทสซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ 2,4-ไดอะมิโนฟิริมิดีน และ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน โดยวิธีการสังเคราะห์แบบคอมบิเนทอเรียล
2. เพื่อพัฒนาการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของสารยับยั้งเอ็นไซม์โคโรโฟลีดรีดักเทส ดังข้อ 1 ในวัฏภาคสารละลายและวัฏภาคของแข็ง
3. เพื่อสร้างกลุ่มวิจัยเกี่ยวกับเคมีคอมบิเนทอเรียลอันเป็นสาขาวิทยาการที่ใหม่ขึ้นในประเทศไทย

Methodology :

1. ศึกษาวิธีการและหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 2,4-ไดอะมิโนฟิริมิดีน และ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนบางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไพริเมตามีน, ไตรเมโทพริม และไซโคลกัวนิล ในวัฏภาคสารละลาย
2. ศึกษาและพัฒนาหาแนวทางสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของอนุพันธ์ของ 2,4-ไดอะมิโนฟิริมิดีน และ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ในวัฏภาคสารละลาย

3. ออกแบบและเลือกหาชนิดของ solid support และ linker ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 2,4-ไดอะมิโนฟิริมิดีน และ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีนในวัฏภาคของแข็ง

4. ออกแบบและเลือกวิธีการสังเคราะห์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 2,4-ไดอะมิโนฟิริมิดีน และ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีนในวัฏภาคของแข็ง

5. ศึกษาวิธีการและหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 2,4-ไดอะมิโนฟิริมิดีน และ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน บนวัฏภาคของแข็งดังที่เลือกในข้อ 4 และ 5

6. ศึกษาและพัฒนาหาแนวทางสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของอนุพันธ์ของ 2,4-ไดอะมิโนฟิริมิดีน และ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีนในวัฏภาคของแข็ง

7. (อยู่นอกเหนือจากโครงการที่เสนอขอทุนในครั้งนี้) สกรีนคอมบิเนทอเรียลไลบรารีแต่ละชนิดในวัฏภาคสารละลายและวัฏภาคของแข็งด้วยเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสและพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมเลกุลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์ที่ดีที่สุด ซึ่งส่วนนี้จะกระทำโดยร่วมมือกับกลุ่มวิจัยของ ศ.ดร. ยงยุทธ ยุทธวงศ์ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

โดยขอบเขตของการวิจัยคือการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 2,4-ไดอะมิโนฟิริมิดีน ซึ่งมีหมู่แทนที่ต่างๆ ที่ตำแหน่ง C⁵ และ C⁶ และ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ซึ่งมีหมู่แทนที่ต่างๆ ที่ตำแหน่ง N¹ และ C² ในวัฏภาคสารละลาย และวัฏภาคของแข็ง

Results :

1. สามารถพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่ม 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อนในเอกสารอ้างอิง

2. ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการสังเคราะห์สารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่ม 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนบนวัฏภาคของแข็ง พบว่าประสบปัญหา มาก และให้ผลไม่ดีเท่าการสังเคราะห์ในวัฏภาคสารละลาย

3. ได้นำวิธีการใหม่ que พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของสารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสในวัฏภาคสารละลาย ทั้งในรูปของไลบรารีที่เป็นสารบริสุทธิ์และในรูปที่เป็นสารผสม

4. ผลการทดสอบเอ็นไซม์กับไลบรารีที่สังเคราะห์ขึ้นทำให้สามารถบ่งชี้สารประกอบชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์แบบมีวแทนต์ได้ดีกว่าเดิมและทำให้มีความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอ็นไซม์และการคื้อยา

5. ได้พัฒนาเทคนิคสำหรับใช้เอ็นไซม์ในการเลือกเอาสารยับยั้งเอ็นไซม์ออกจากคอมบิเนทอเรียลไลบรารีในรูปของสารผสม และทดสอบความเป็นไปได้ของการใช้งานเทคนิคนี้

Discussion/Conclusion :

ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์สารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่ม 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ที่มีประสิทธิภาพสูง และได้นำวิธีการดังกล่าวไปใช้สังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีขนาดเล็กของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ในวัฏภาคสารละลาย ทั้งในรูปแบบที่เป็นสารบริสุทธิ์ และในรูปของไลบรารีของสารผสม ผลการทดสอบไลบรารีที่เป็นสารบริสุทธิ์กับเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสจาก *P. falciparum* (pfDHFR) ทั้งแบบธรรมชาติและแบบ A16VS108T มีวแทนต์ซึ่งดื้อต่อยาไซโคลกัวนิล ผลการศึกษาทำให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอนไซม์กับการดื้อยาของมิวแทนต์เอนไซม์ และทำให้ค้นพบสารใหม่ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีขึ้น การทดสอบไลบรารีสารผสมซึ่งประกอบด้วยสมาชิก 96 ชนิดโดยใช้เทคนิคคัดกรองโวลูชันพบสารยับยั้งมิวแทนต์เอนไซม์แบบ A16VS108T ที่มีประสิทธิภาพสูงมากถึง 2 ชนิด และยังสามารถศึกษาการใช้เคมีบนวัฏภาคของแข็งเพื่อการสังเคราะห์และทดสอบไลบรารี แต่พบว่าให้ผลไม่ดีเท่ากับการสังเคราะห์ในวัฏภาคสารละลาย นอกจากนี้ยังได้ทดสอบและยืนยันความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคการเลือกด้วยเอนไซม์ในการเลือกสารยับยั้งเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงจากไลบรารีที่เป็นสารผสมอีกด้วย

Suggestion/Further implication/ Implementation :

การศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสในกลุ่มต่างๆ ซึ่งนำไปสู่ความเข้าใจในการทำงานของยา และทำให้สามารถออกแบบสารชนิดใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีขึ้น เมื่อประกอบกับเทคนิคการสังเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นจะสามารถขยายขอบเขตการศึกษานี้ต่อไปได้อีกมากจนกระทั่งถึงการพัฒนาเป็นยาในที่สุด ขณะนี้มีสารอยู่จำนวนหนึ่งที่สังเคราะห์ได้จากโครงการนี้ซึ่งมีศักยภาพสูง และน่าจะได้มีการนำไปศึกษาความสามารถในการเป็นยาด้านมาลาเรีย *in vitro* และ *in vivo* ต่อไป

Keywords

Plasmodium falciparum, malaria, dihydrofolate reductase, DHFR, inhibitor, combinatorial

Executive Summary

Project Code : PDF57/2540

Project Title : Synthesis of combinatorial libraries of dihydrofolate reductase inhibitors

Investigators :

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. Mr. Tirayut Vilaivan | Department of Chemistry, Chulalongkorn University |
| 2. Mr. Yodhathai Thebtaranonth | Department of Chemistry, Mahidol University |
| 3. Mr. Yongyuth Yuthavong | National Center for Genetic Engineering and
Biotechnology |
| 4. Miss Bongkoch Tamchompoo | National Center for Genetic Engineering and
Biotechnology |
| 5. Miss Chawanee Sirichaiwat | National Center for Genetic Engineering and
Biotechnology |
| 6. Miss Sumalee Kamchonwongpaisan | National Center for Genetic Engineering and
Biotechnology |
| 7. Mr. Worachart Sirawaraporn | Department of Biochemistry, Mahidol University |
| 8. Miss Netnapha Chareonsethakul | Department of Chemistry, Chulalongkorn University |
| 9. Miss Nungruthai Saesaengseerung | Department of Chemistry, Chulalongkorn University |
| 10. Mr Gordon Lowe | Dyson Perrins Laboratory, Oxford, UK |
| 11. Miss Rachel Quarrell | Dyson Perrins Laboratory, Oxford, UK |

E-mail Address : vtirayut@chula.ac.th

Project Period : August 1, 1997 - July 31, 2000

Objectives :

1. To develop a synthetic method for dihydrofolate reductase inhibitors belonging to the group 2,4-diaminopyrimidine and 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine
2. To develop a synthetic method for synthesis of combinatorial libraries of dihydrofolate reductase inhibitors in solution and solid phase
3. To create a combinatorial group in Thailand

Methodology :

1. Optimize the conditions for synthesis of 2,4-diaminopyrimidine and 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine in solution phase

2. Develop methods for synthesis of combinatorial libraries of 2,4-diaminopyrimidine and 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine in solution phase

3. Design and select appropriate solid support and linkers for solid phase synthesis of 2,4-diaminopyrimidine and 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine

4. Design and select the most appropriate method for synthesis of 2,4-diaminopyrimidine and 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine in solid phase

5. Optimize the conditions for synthesis of 2,4-diaminopyrimidine and 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine in solid phase

6. Develop methods for synthesis of combinatorial libraries of 2,4-diaminopyrimidine and 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine in solid phase

7. (Outside the scope of this project) Screen the combinatorial libraries in solution and solid phase with dihydrofolate reductase to identify the most potent inhibitors. This work will be carried out in collaboration with the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)

The scope of this research is to synthesize combinatorial libraries of 2,4-diaminopyrimidine carrying substituents at C⁵ and C⁶ positions and 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine carrying substituents at N¹ and C² positions in solution and solid phase.

Results :

1. An efficient method for synthesis of dihydrofolate reductase inhibitors belonging to the group 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine has been successfully developed

2. Synthesis of dihydrofolate reductase inhibitors belonging to the group 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine has been investigated and it was found to be less satisfactory than the solution phase methodology

3. The newly developed method has been used to synthesize combinatorial libraries of dihydrofolate reductase inhibitors belonging to the group 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine in solution phase, both as pure compound and as mixture libraries

4. Enzymatic screening results of the synthetic libraries revealed new potent inhibitors against mutant enzyme and structure-activity relationship

5. A method of screening combinatorial libraries using enzyme selection technique has been developed and validated

Discussion/Conclusion :

An efficient method to synthesize dihydrofolate reductase inhibitors belonging to the class 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine (i) which are potentially useful as antimalarial drugs has been

developed. The method has been used, in conjunction with parallel or split and mix syntheses techniques, to generate solution-phase combinatorial libraries of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine both as pure compounds and as mixture libraries. Testing the pure compounds libraries with both wild-type and A16VS108T mutant *P. falciparum* dihydrofolate reductases (pfDHFR) provided a rationale for cycloguanil (ii) resistance of the latter and a number of potential lead compounds have been identified. Two highly potent inhibitors against A16VS108T pfDHFR have also been re-discovered from screening of the 96-membered mixture libraries using deconvolution techniques. A strategy to facilitate the synthesis and screening by solid phase chemistry has been evaluated and was found to be less satisfactory than the solution phase approach. The concept of screening of the mixture libraries by using enzyme selection technique has also been validated.

Suggestion/Further implication/ Implementation :

The study revealed structure-activity relationship information of different classes of dihydrofolate reductase inhibitors which lead to better understanding how these drugs work and enable us to design new compounds with better activities. Together with the efficient synthetic methods developed, this will expand the studies which will ultimately lead to new drugs discovery. At present a few compounds from this project were found to be potential drug candidates and they will be tested against malaria parasites *in vitro* and *in vivo*.

Keywords

Plasmodium falciparum, malaria, dihydrofolate reductase, DHFR, inhibitor, combinatorial

Output ที่ได้ของโครงการ

"การสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ สารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส"

1. ผลงานตีพิมพ์

ผลงานวิจัยที่ได้ส่วนหนึ่งของโครงการนี้ประกอบกับงานส่วนอื่นที่อยู่นอกเหนือจากโครงการที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการแล้วมีดังต่อไปนี้

1.1 G. Rastelli, W. Sirawaraporn, P. Sompompisut, T. Vilaivan, S. Kamchonwongpaisan, R. Quarrell, G. Lowe, Y. Thebtaranonth and Y. Yuthavong, Interaction of pyrimethamine, cycloguanil, WR99210 and their analogues with *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase : structural basis of antifolate resistance, *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, 8, 1117-1128.

1.2 Y. Yuthavong, T. Vilaivan, N. Chareonsethakul, S. Kamchonwongpaisan, W. Sirawaraporn, R. Quarrell and G. Lowe, Development of a lead inhibitor for the A16V+S108T mutant of dihydrofolate reductase from the cycloguanil resistant strain (T9/94) of *Plasmodium falciparum*, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 2738-2744.

ผลงานวิจัยต่อไปนี้จะกำลังอยู่ระหว่างการเตรียมต้นฉบับเพื่อส่งไปตีพิมพ์ต่อไป

- วิธีการสังเคราะห์ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ที่มีประสิทธิภาพสูง

- การสังเคราะห์และตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของของผสมคอมบิเนทอเรียลของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน

2. สิทธิบัตร

ผลงานวิจัยต่อไปนี้จะกำลังอยู่ระหว่างการขอจดสิทธิบัตรในประเทศ

2.1 ยงยุทธ ยุทธวงศ์, บงกช ชารมพู, สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล, จารุณี วาณิชนันกุล, สุกัญญา ยงเกียรติตระกูล, ชะวะณี ศิริชัยวัฒน์, เพ็ญจิตร จิตรนาททรัพย์, วรชาติ สิริวารณณ์, ยอดหทัย เทพธรานนท์ และธีรยุทธ วิไลวัลย์, "การพัฒนาและการใช้เอ็นไซม์ dihydrofolate reductase ของเชื้อมาลาเรียในการคัดเลือกว่ายับยั้งที่ดีจากกลุ่มของห้องสมุดตัวยับยั้งเชิงรวม (combinatorial libraries)"

3. อื่น ๆ

ผลงานวิจัยต่อไปนี้จะได้รับการนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับชาติและระดับนานาชาติ

3.1 T. Vilaivan, N. Saesaengseerung, S. Kamchonwongpaisan, Y. Yuthavong, W. Sirawaraporn and Y. Thebtaranonth, "Synthesis and biological evaluation of combinatorial libraries of dihydrofolate reductase inhibitors", The Fourth Princess Chulabhorn International Science Congress : Chemicals in the 21st Century, 20 November - 2 December 1999, Bangkok, Thailand.

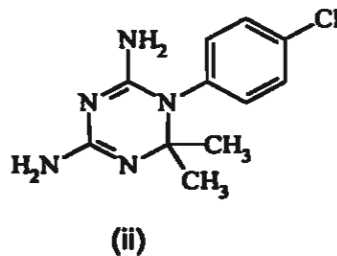
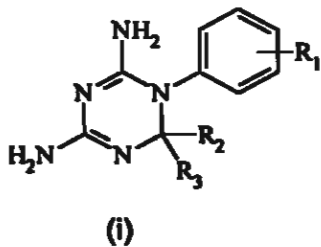
3.2 Y. Yuthavong, W. Sirawaraporn, P. Sompornpisut, T. Vilaivan, B. Tarnchompoo, C. Sirichaiwat, S. Kamchonwongpaisan and Y. Thebtaranonth, "Dihydrofolate reductase as a target for development of antimalarials", 25th Congress on Science and Technology of Thailand, 20-22 October 1999, Amarin Lagoon Hotel, Pitsanuloke.

3.3 Y. Yuthavong, P. Sompornpisut, S. Kamchonwongpaisan, T. Vilaivan, T. Tuntitippawan, W. Sirawaraporn, and Y. Thebtaranonth, "Stereospecific binding of cycloguanil derivatives to malarial dihydrofolate reductase : development of new effective inhibitors", 25th Congress on Science and Technology of Thailand, 20-22 October 1999, Amarin Lagoon Hotel, Pitsanuloke.

3.4 T. Vilaivan and N. Saesaengseerung, "Efficient synthesis of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine derivatives", 25th Congress on Science and Technology of Thailand, 20-22 October 1999, Amarin Lagoon Hotel, Pitsanuloke.

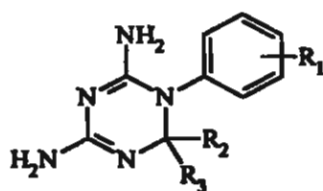
บทคัดย่อ

ได้พัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับสังเคราะห์สารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสในกลุ่ม 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน (i) ซึ่งมีศักยภาพสูงในการเป็นยาต้านมาลาเรีย กรรมวิธีนี้เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาปัดวงแหวนโดยมีองค์ประกอบสองส่วนได้แก่เอริลโบกัวไนด์ และสารประกอบคาร์บอนิลโดยมีการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีสารกำจัดน้ำอยู่ด้วย ภายใต้ภาวะที่ดีที่สุด สารตั้งต้นหลายชนิดทำปฏิกิริยาอย่างสะอาด มีปฏิกิริยาข้างเคียงน้อยมาก และสามารถทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ได้ง่ายโดยการล้างเท่านั้น ได้ใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ร่วมกับเทคนิคการสังเคราะห์แบบขนาน (parallel synthesis) และการสังเคราะห์แบบแยกส่วน (split and mix synthesis) ในการเตรียมคอมบิเนทอเรียลไลบรารีขนาดเล็กของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ในวัฏภาคสารละลายทั้งในรูปแบบที่เป็นสารบริสุทธิ์ และในรูปแบบของไลบรารีของสารผสม ผลการทดสอบไลบรารีที่เป็นสารบริสุทธิ์กับเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสจาก *P. falciparum* (pfDHFR) ทั้งแบบธรรมชาติและแบบ A16VS108T มิวแทนต์ซึ่งดื้อต่อยาไฮโคลกัวนิล (ii) ทำให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอ็นไซม์กับการดื้อยาของมิวแทนต์เอ็นไซม์ และทำให้ค้นพบสารใหม่ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์ได้ดีขึ้น การทดสอบไลบรารีสารผสมซึ่งประกอบด้วยสมาชิก 96 ชนิดโดยใช้เทคนิคคัดกรองไวสูง ค้นพบสารยับยั้งมิวแทนต์เอ็นไซม์แบบ A16VS108T ที่มีประสิทธิภาพสูงมากถึง 2 ชนิด และยังได้ศึกษาการใช้เคมีบนวัฏภาคของแข็งเพื่อการสังเคราะห์และทดสอบไลบรารี แต่พบว่าให้ผลไม่ดีเท่ากับการสังเคราะห์ในวัฏภาคสารละลาย นอกจากนี้ยังได้ทดสอบและยืนยันความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคการเลือกด้วยเอ็นไซม์ในการบ่งชี้สารยับยั้งเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงจากไลบรารีที่เป็นสารผสมอีกด้วย

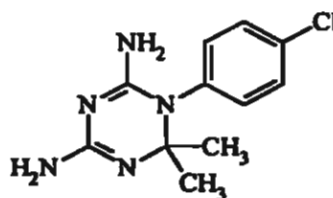


Abstract

An efficient method to synthesize dihydrofolate reductase inhibitors belonging to the class 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine (i) which are potentially useful as antimalarial drugs has been developed. The procedure involves 2-component cyclocondensation between an arylbiguanide and a carbonyl compound in the presence of an acid catalyst and a water scavenger. Under optimized conditions a variety of substrates afford very clean reaction with negligible side reactions and the products can be purified by simple washing. The developed method has been used, in conjunction with parallel or split and mix syntheses techniques, to generate solution-phase combinatorial libraries of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine both as pure compounds and as mixture libraries. Testing the pure compounds libraries with both wild-type and A16VS108T mutant *P. falciparum* dihydrofolate reductases (pfDHFR) provided a rationale for cycloguanil (ii) resistance of the latter and a number of potential lead compounds have been identified. Two highly potent inhibitors against A16VS108T pfDHFR have also been re-discovered from screening of the 96-membered mixture libraries using deconvolution techniques. A strategy to facilitate the synthesis and screening by solid phase chemistry has been evaluated and was found to be less satisfactory than the solution phase approach. The concept of screening of the mixture libraries by using enzyme selection technique has also been validated.



(i)



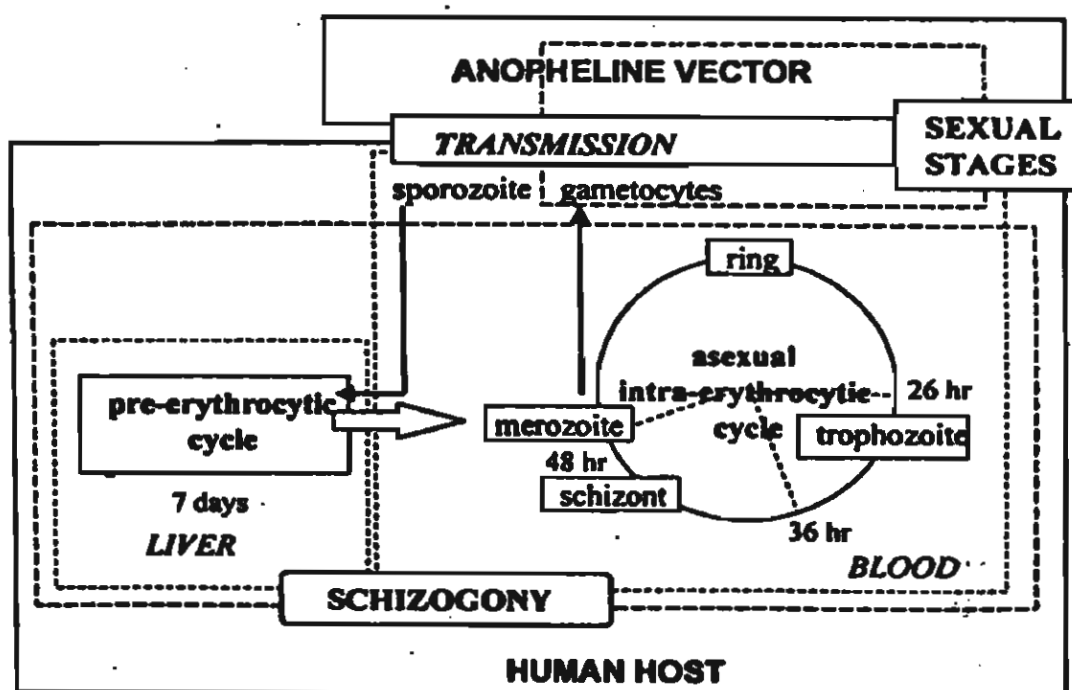
(ii)

บทที่ 1

เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสและโรคมาลาเรีย

โรคมาลาเรียเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศที่กำลังพัฒนาซึ่งอยู่ในเขตร้อน สาเหตุของโรคนี้คือโปรโตซัวในสกุล *Plasmodium* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Plasmodium falciparum* การศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียนับว่ามีความสำคัญยิ่งที่จะนำไปสู่การพัฒนาต่อต้านมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม ความรู้ความเข้าใจที่มีอยู่เกี่ยวกับเชื้อมาลาเรียซึ่งงานวิจัยพื้นฐานที่สำคัญหลายส่วนได้มีการศึกษาในประเทศไทยของเราเอง^{1,2} ยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัดเมื่อเทียบกับเชื้อโรคประเภทอื่น ดังเช่นแบคทีเรียหรือไวรัส

มาลาเรียมีช่วงกักป่องเป็นพาหะ เมื่อถูกยุงที่มีเชื้อกัด เชื้อจะเดินทางไปตามกระแสเลือดแล้วจะเข้าไปในเซลล์ตับและเจริญเติบโตอยู่ที่นั่น จากนั้นจึงทำลายเซลล์และออกมาสู่กระแสเลือดอีกครั้ง โดยจะเข้าไปอาศัยในเม็ดเลือดแดง โดยอาศัยฮีโมโกลบินเป็นแหล่งอาหารและเจริญเติบโตแบ่งตัวจนกระทั่งเซลล์เม็ดเลือดแดง จะกระจายออกมา โดยช่วงของการเติบโตและแบ่งตัวของเชื้อจะกินเวลา 2 วันทำให้เกิดอาการจับของไข้เป็นระยะ ดังนั้นชาวบ้านจึงเรียกโรคนี้ว่า "ไข้จับสั่น" วงจรชีวิตของมาลาเรียสามารถสรุปได้ดังแผนภาพ 1.1



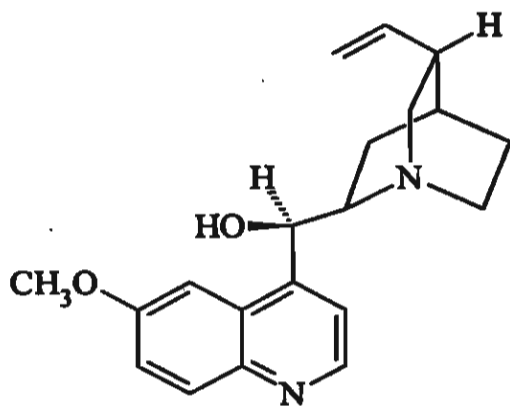
แผนภาพ 1.1 (จากเอกสารอ้างอิง 3)

ในปัจจุบันการพัฒนาวัคซีนสำหรับป้องกันมาลาเรียยังไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นการควบคุมโรคมาลาเรีย นอกจากการกำจัดยุงซึ่งเป็นพาหะนำเชื้อโรคแล้ว วิธีการบำบัดทางเคมีหรือการใช้ยาก็เป็นวิธีที่มีความสำคัญที่สุด ในปัจจุบันมีชาดมาลาเรียที่มีอยู่ในท้องตลาดมีจำนวนค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับชาดด้านแบคทีเรีย ความรู้ความเข้าใจที่มีอยู่เกี่ยวกับการดำรงชีวิต

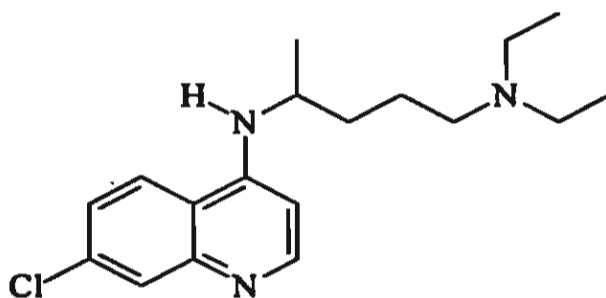
ของเชื้อมาลาเรียทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้เสนอแนะถึงเป้าหมายที่เป็นไปได้สำหรับการทำลายเชื้อมาลาเรียโดยการรบกวนหรือขัดขวางกระบวนการซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อมาลาเรียดังต่อไปนี้

1. กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ digestive vacuole

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าเชื้อมาลาเรียอาศัยโฮโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นใน digestive vacuole ในการย่อยโฮโมโกลบิน เชื้อมาลาเรียจะเอาเฉพาะส่วนของกรดอะมิโนไปใช้ ส่วนของฮีมจะถูกโพลีเมอไรซ์เป็นสิ่งที่เรียกว่า Haemozoin ("malaria pigment") เพื่อลดความเป็นพิษต่อเชื้อลง ยาที่ทำงานโดยการยับยั้งกระบวนการเหล่านี้ได้แก่ยาในกลุ่มควินิน และอะมิโนควิโนลีน ตัวอย่างเช่น

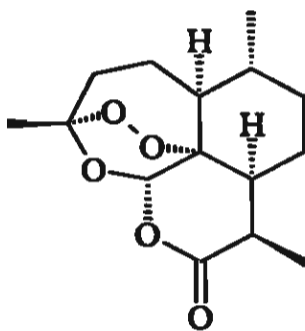


Quinine



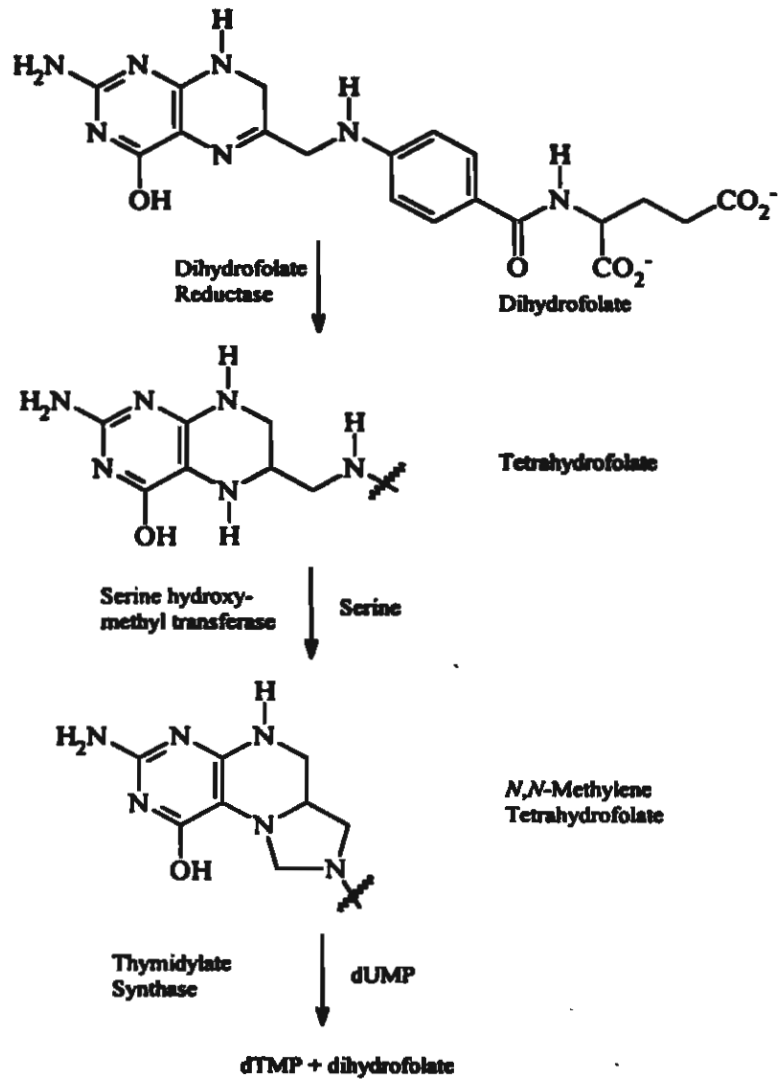
Chloroquin

นอกจากนี้ มาลาเรียยังมีระบบป้องกันตัวเองจากออกซิเจนที่ ซึ่งกระบวนการนี้ก็เกิดขึ้นใน digestive vacuole และไซโตพลาสซึมของเชื้อมาลาเรีย โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องหลายตัว เช่น superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase เป็นต้น เป็นที่เชื่อกันว่าสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจำพวกเอนโดเปอร์ออกไซด์เช่นอาร์ทีมิซินินทำงานโดยการทำให้เกิด oxidative stress และ/หรือทำลายระบบป้องกันตัวเองของเชื้อ



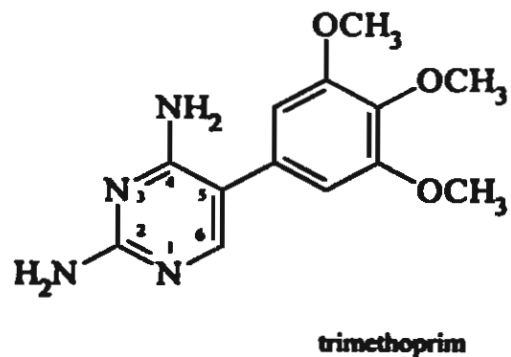
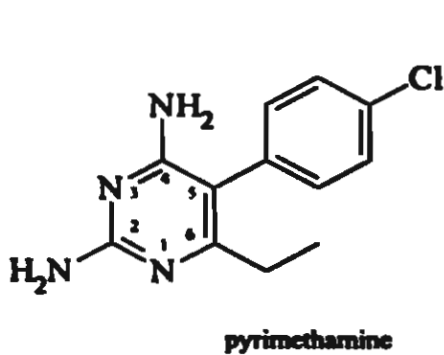
Artemisinin

2. กระบวนการสังเคราะห์เมตาโบไลต์และเมโครโมเลกุล ซึ่งรวมถึงเมตาโบลิซึมของกรดนิวคลีอิก ฟอสโฟลิพิด โกลโคไลซิส และ tubulin assembly กระบวนการที่มีการศึกษากันมากคือกระบวนการสังเคราะห์ไทมิดีเลต ซึ่งเชื้อมาลาเรียจะต้องสร้างพรีมีดินเบสขึ้นมาใหม่เองโดยไม่สามารถดึงมาจากเซลล์เจ้าบ้านได้ กระบวนการนี้เกี่ยวข้องกับโคแฟกเตอร์ที่สำคัญตัวหนึ่งคือเททระไฮโดรโฟเลต ซึ่งเป็นตัวพาหมู่คาร์บอนหนึ่งหน่วยในสภาพที่ว่องไวเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ไทมิดีน กระบวนการชีวสังเคราะห์ของเททระไฮโดรโฟเลตและไทมิดีนสามารถสรุปได้ดังแผนภาพ 1.2

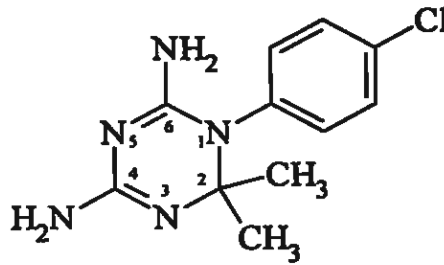


แผนภาพ 1.2

เอนไซม์สำคัญที่เป็นเป้าหมายในการกระทำของยาต้านมาลาเรียหลายชนิดคือไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส (EC 1.5.1.3) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เทตระไฮโดรโฟเลตจากไดไฮโดรโฟเลตโดยอาศัย NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ซึ่งมีชื่อเรียกรวมๆ ว่าแอนติโฟเลต (antifolates) ได้แก่อนุพันธ์ของ 2,4-ไดอะมิโนไพริมิดีนดังเช่นไพริเมตามีน [5-(4'-chlorophenyl)-6-ethyl-2,4-diaminopyrimidine] และไตรเมโทพริม [5-(3',4',5'-trimethoxybenzyl)-2,4-diaminopyrimidine]



และอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ดังเช่น ไซโคลกัวนิล [1-(4'-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine]

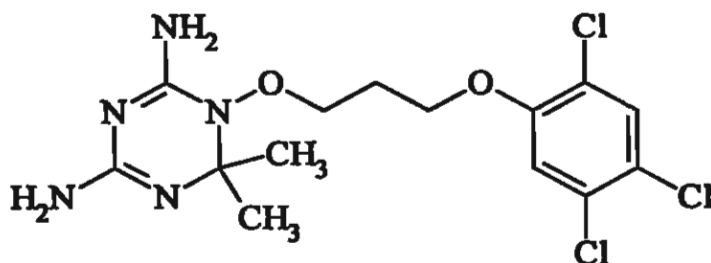


cycloguanil

3. กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเมมเบรน ได้แก่การส่งผ่านสาร/ขนและการสื่อสารสัญญาณ (signalling)

แม้ยาคังกล่าวมาข้างต้นจะสามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรียได้ผลเป็นที่น่าพอใจในระยะแรก แต่เมื่อใช้ไปนานๆ มันจะทำให้ยานั้นใช้ไม่ได้ผลอีกต่อไปเนื่องจากความสามารถของเชื้อมาลาเรียในการดื้อยาทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาชนิดใหม่ขึ้นมาอยู่เรื่อยๆ ได้มีการค้นพบว่ากลไกการดื้อยากลุ่มแอนติโฟเลต เกี่ยวข้องกับการเกิด point mutation ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส ทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการจับกับตัวยับยั้งไปในขณะที่ยังคงมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เทตระไฮโดรโฟเลตได้อยู่^{4,5,6} นอกจากนี้ยังได้มีการค้นพบว่ามียาต้านที่ตำแหน่งต่างๆ ทำให้เอนไซม์ความดื้อยาที่แตกต่างกันไป เช่น ในขณะที่ A16V+S108T มียาแทนที่จะดื้อต่อเฉพาะยาไซโคลกัวนิล มียาแทนแบบ C59R+S108N และ N51I+C59R+S108N+I164L จะดื้อกับยาทั้งสองชนิด⁷ และได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอนไซม์เหล่านี้กับความสามารถในการจับยึดกับตัวยับยั้งโดยใช้แบบจำลองโมเลกุลเพื่ออธิบายเหตุผลที่มียาเหล่านี้ทำให้เกิดการดื้อยาและทำนายโครงสร้างของยาชนิดใหม่ๆ มาบ้างแล้ว^{7,8,9}

เมื่อไม่นานมานี้ ยุทธพงศ์, ธีรवारณ และคณะได้ประสบความสำเร็จในการโคลนเฉพาะไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสโคเมนจากระบบเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส-ไทมิดีเลตซินเทสของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* จากยีนสังเคราะห์และทำให้เกิดการแสดงออกใน *E. coli* ได้เป็นผลสำเร็จ ซึ่งทำให้สามารถเตรียมเอนไซม์นี้ในระดับมิลลิกรัมได้¹⁰ และโดยกรรมวิธี cassette mutagenesis ทำให้สามารถเตรียมมียาแทนเอนไซม์ที่ตำแหน่งต่างๆ ได้ตามต้องการ¹¹ ซึ่งความสำเร็จนี้เปิดหนทางไปสู่การพัฒนาชนิดใหม่สำหรับด้านเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ดื้อยาโดยการสกรีนด้วยเอนไซม์ ในการศึกษาจะเน้นการพัฒนาชนิดมาลาเรียชนิดใหม่ซึ่งยังคงมีโครงสร้างหลักอยู่ในกลุ่ม 4,6-ไดไฮโดร-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน และ 2,4-ไดอะมิโนพิริมิดีน การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าหมู่อะมิโนทั้งสองหมู่ และไนโตรเจนที่ตำแหน่ง N' (ในไดอะมิโนพิริมิดีน) และ N' (ในไดไฮโดรไตรอะซีน) มีความสำคัญต่อการจับยึดกับเอนไซม์และจำเป็นต้องมีอยู่ ดังนั้นจึงมีสมมติฐานว่าการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่ที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจับยึดกับเอนไซม์โดยตรงนั่นคือหมู่แทนที่ที่บริเวณตำแหน่ง 5 และ 6 ในสารกลุ่มพิริมิดีน และตำแหน่ง 1 และ 2 ในสารกลุ่มไดไฮโดรไตรอะซีน น่าจะทำให้ได้สารใหม่ที่มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ทั้งแบบธรรมชาติและแบบมียาแทน และสารยับยั้งเหล่านี้อาจจะมียกยภาพสูงในการเป็นยาค้านมาลาเรียต่อไปได้ ตัวอย่างของสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสทั้งแบบธรรมชาติและมียาแทนที่ได้รับการพัฒนาขึ้นคือ WR99210^{12,13,14,15} ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็นไดไฮโดรไตรอะซีน แต่สารนี้มีความเป็นพิษสูง และกรรมวิธีการผลิตก่อให้เกิดสารพิษในกลุ่มไดออกซิน จึงมีโอกาสไม่มากนักที่สารนี้จะได้รับการพัฒนาไปเป็นยาได้



WR99210

ในงานวิจัยนี้มีแนวคิดที่จะนำเทคนิคใหม่ที่เรียกว่าเคมีคอมบินาทอเรียล (combinatorial chemistry) ซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาเมื่อไม่นานมานี้เพื่อที่จะสังเคราะห์และทดสอบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นสารยับยั้งเอ็นไซม์เป็นจำนวนมากพร้อมๆ กัน¹⁶ ในต่างประเทศได้มีการนำมาใช้ในการสังเคราะห์และทดสอบยาอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่มีหรือนำหลักการนี้มาใช้ในการวิจัยและพัฒนาอย่างกว้างขวางมากนัก ประกอบกับการสังเคราะห์คอมบินาทอเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน เพียงรายงานเดียวที่มีการตีพิมพ์เมื่อเร็ว ๆ นี้ (หลังจากที่งานวิจัยนี้ได้ดำเนินไปแล้วประมาณ 1 ปี) ยังครอบคลุมจำนวนสมาชิกของสารที่น้อยกว่าในการศึกษานี้ ใช้วิธีการที่ไม่มีประสิทธิภาพคือนัก อีกทั้งยังใช้เอ็นไซม์ที่แตกต่างจากงานวิจัยนี้¹⁷ ดังนั้นจึงเห็นควรที่จะมีการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์คอมบินาทอเรียลไลบรารีของยาต้านมาลาเรียในกลุ่ม 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน และ 2,4-ไดอะมิโนพิริมิดีน เพื่อที่จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งกับเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสของ *P. falciparum* ทั้งแบบปกติ (wild type enzyme) และที่เกิดจากมิวเตชัน (mutant enzyme) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมิวแทนต์เอ็นไซม์ที่คือคอชาโซโคลกัวนิล (A16VS108T) ต่อไป เพื่อที่จะให้สารใหม่ที่มีความสามารถในการยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสที่ดีขึ้นแม้แต่กับมิวแทนต์เอ็นไซม์ก็ตามซึ่งอาจนำไปพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิมต่อไป โดยที่ความสำเร็จของเทคนิคนี้จะอยู่ที่ความสามารถในการคัดเลือกสารเพียงไม่กี่ชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุดต่อสารชีวโมเลกุลที่เป็นเป้าหมาย (biological target) ที่เหมาะสมออกมาจากคอมบินาทอเรียลไลบรารีซึ่งเป็นของผสมที่ประกอบด้วยสารเหล่านี้กับสารอื่นอีกเป็นจำนวนมากที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันที่ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากเท่า แนวทางนี้จะนำไปได้ก็ต่อเมื่อมีเทคนิคการคัดเลือกหรือสกรีน (screening) ที่เหมาะสม โดยอาจทำได้ทั้งในวัฏภาคสารละลาย (solution phase screening) และในวัฏภาคของแข็ง (solid phase screening) ซึ่งจะเป็นหัวข้อศึกษาในงานวิจัยนี้ต่อไป

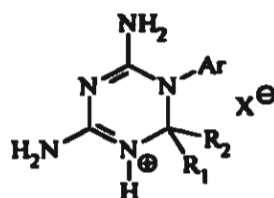
- ¹ ชงยุทธ ยุทธวงศ์ ใน นักวิทยาศาสตร์ดีเด่น 2525-2539, มูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์, 2539
- ² S. Thaithong and G. Beale in Malaria Parasites, Chulalongkorn University Printing House, Bangkok, 1992.
- ³ P. L. Olliaro and Y. Yuthavong, An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial drug discovery, *Pharmacol. Ther.*, 1999, **81**, 91-110.
- ⁴ Y. Yuthavong, The malarial folate pathway and molecular targets for antimalarial development, *J. Sci. Soc. Thailand*, 1996, **22**, 181.
- ⁵ W. Sirawaraporn and Y. Yuthavong, Kinetic and molecular properties of dihydrofolate reductase from pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine-resistant *Plasmodium chabaudi*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1984, **10**, 355-367.
- ⁶ S. Thaithong, S.W. Chan, S. Songsomboon, P. Wilairat, N. Seesod, T. Sueblinwong, M. Goman, R. Ridley and G. Beale, Pyrimethamine resistant mutations in *Plasmodium falciparum*, 1992, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, **52**, 149-157.
- ⁷ D.C. Warhurst, Antimalarial drug discovery : development of inhibitors of dihydrofolate reductase active in drug resistance, *Drugs Discover Today's*, 1998, **3**, 538-546.
- ⁸ J.H. McKie, K.T. Douglas, C. Chan, S.A. Roser, R. Yates, M. Read, J.E. Hyde, M.J. Dascombe, Y. Yuthavong and W. Sirawaraporn, Rational drug design approach for overcoming drug resistance : Application to pyrimethamine resistance in Malaria, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 1367-1370.
- ⁹ J.M. Blaney, C. Hansch, C. Silipo and A. Vittoria, Structure-Activity relationships of dihydrofolate reductase inhibitors, *Chem. Rev.*, 1984, **84**, 333-407.
- ¹⁰ W. Sirawaraporn, P. Prapunwattana, R. Sirawaraporn, Y. Yuthavong and D.V. Santi, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 21637-21644.
- ¹¹ W. Sirawaraporn, T. Sathitkul, R. Sirawaraporn, Y. Yuthavong and D. V. Santi, Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 1124-1129.
- ¹² P. Mamalis, L. Jrffries, S.A. Price, M.J. Rix and D.J. Outred, Aminooxy derivatives IV. Antimalarial activity of some o-ethers of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1-hydroxy-2-substituted-1,3,5-triazines, *J. Med. Chem*, 1965, **8**, 684-691.
- ¹³ P. Mamalis, J. Green, D.J. Outred and M.J. Rix, Amino-oxy derivatives Part V. some o-ethers of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1-hydroxy-2-substituted-1,3,5-triazines, *J. Chem. Soc.*, 1965, 1829-1843.
- ¹⁴ P. Mamalis and D.J. Outred, Dihydrotriazine Derivatives, US Patent 3,723,429, March 27, 1973.
- ¹⁵ P. Mamalis, Dihydro-s-triazines, US Patent 3,666,757, May 30, 1972.
- ¹⁶ for reviews see : a) N.K. Terrett, Combinatorial Chemistry, Oxford University Press, Oxford, 1998; b) S.R. Wilson and A.W. Czarnik Ed., Combinatorial Chemistry : Synthesis and Application, John Wiley & Sons, New York, 1997; c) G. Lowe, Combinatorial Chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, 1995, 309; d) *Acc. Chem. Res.* 1996, 29(3) (special volume on Combinatorial Chemistry) e) M.A. Gallop, R.W Barrett, W.J. Dower, S.P. Fodor and E.M. Gordon, Applications of combinatorial

technologies to drug discovery 1. Background and peptide combinatorial libraries, *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 1233-1521; f) E.M. Gordon, R.W Barrett, W.J. Dower, S.P.A. Fodor and M.A. Gallop, Applications of combinatorial technologies to drug discovery 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions, *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 1385-1401;

¹⁷ H.K. Lee and W.K. Chui, Combinatorial Mixture Synthesis and Biological Evaluation of Dihydrophenyl Triazine Antifolates, *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, 7, 1255-1262.

บทที่ 2

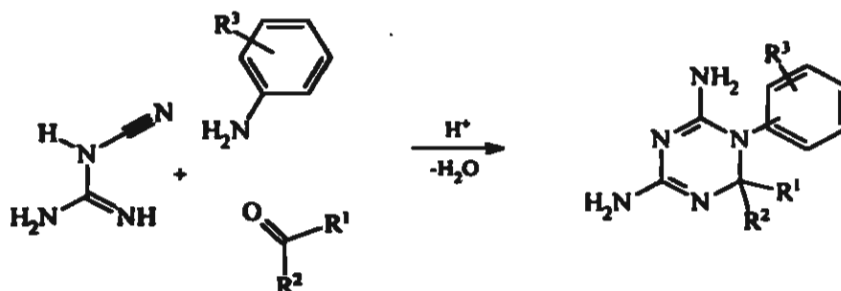
การสังเคราะห์ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ในวัฏภาคสารละลาย



(I)

การสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมายคือ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน (I) ได้มีรายงานอย่างกว้างขวางในเอกสารอ้างอิง^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11} แต่การสังเคราะห์ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่อนุพันธ์ของไดไฮโดรไตรอะซีนที่มีหมู่แทนที่ $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$ เท่านั้น และมีรายงานจำนวนไม่มากนักที่เกี่ยวข้องกับหมู่ R อื่น^{12,13,14,15} โดยที่ส่วนใหญ่ R อย่างน้อยหนึ่งหมู่เป็นหมู่เมทิลหรือไฮโดรเจน หรือมีฉะนั้น R^1 ก็เชื่อมกันกับ R^2 เป็นวงแหวน และไม่พบรายงานถึงวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (I) ที่มีหมู่แทนที่ R^1 และ R^2 ขนาดใหญ่ ดังนั้นเป้าหมายแรกที่ต้องทำให้บรรลุคือการหาวิธีการสังเคราะห์ไดไฮโดรไตรอะซีนที่มีสูตรทั่วไป (I) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง และนำไปประยุกต์ใช้สังเคราะห์ไดไฮโดรไตรอะซีนโดยครอบคลุมโครงสร้างที่หลากหลายให้ได้

ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบภาวะของการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน (I) โดยอาศัยวิธีในเอกสารอ้างอิง วิธีแรกที่ได้ทำการศึกษาคือวิธี Three-Component Synthesis¹ ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาปิดวงแหวนโดยการควบแน่น (cyclo-condensation reaction) ระหว่างองค์ประกอบสามชนิดได้แก่ อะโรมาติกเอมีน (ซึ่งให้ส่วน Ar และไนโตรเจนตัวหนึ่งบนวงแหวนไตรอะซีน), ไดไฮยาโนไดเอไมด์ (II) (ให้ส่วนของหมู่อะมิโนและไนโตรเจนที่เหลือบนวงแหวนไตรอะซีน) และอัลดีไฮด์หรือคีโตน (ให้ส่วนของ R^1 และ R^2) โดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (แผนภาพ 2.1)

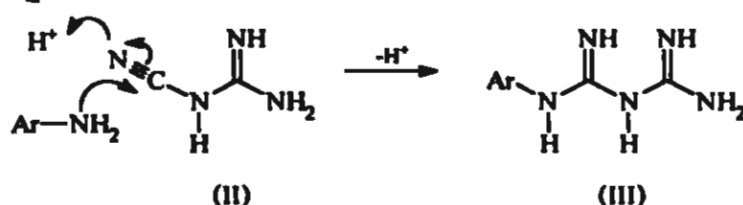


แผนภาพ 2.1

ปฏิกิริยาระหว่างอะมิโนที่มีหมู่แทนที่ ($R^3 = 4\text{-CH}_3; 2,4\text{-Cl}_2; 3,4\text{-Cl}_2$) กับอะโรมาติกเอมีนและไดไฮยาโนไดเอไมด์ภายใต้ภาวะเดียวกันกับที่รายงานไว้ในเอกสารอ้างอิง¹ โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (1.1 อีควิวลนต์) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้อะโรมาติกเอมีนที่มากเกินไปเป็นตัวแทนของตัวทำละลาย ภายใต้การรีฟลักซ์เป็นเวลา 6-18 ชั่วโมง พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดไฮโดรไตรอะซีน (I) ตามต้องการซึ่งตกผลึกแยกออกมาจากสารละลายในรูปของเกลือโมโนไฮโดรคลอไรด์เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา โดยมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตอยู่ในช่วง 50-70 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดย ¹H NMR สเปกโตรสโกปีแสดงให้เห็นว่าความบริสุทธิ์ของ

ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นที่น่าพอใจทั้งก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกจากตัวทำละลายที่เหมาะสมเช่น น้ำ หรือเมทานอล และ MALDI-TOF แมสสเปกตรัม ของผลิตภัณฑ์แสดงค่า m/z ที่สอดคล้องกับสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบปฏิกิริยาของอะนิลีนดังกล่าวกับคีโตนและอัลดีไฮด์อื่นโดยใช้ *p*-toluidine ($4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$) และ 2,4-dichloroaniline ($2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{NH}_2$) เป็นสารต้นแบบ และให้ทำปฏิกิริยากับไคไซยาโนโคเอไมด์ (II) และสารประกอบคาร์บอนิลต่างๆ ได้แก่ ไซโคลเฮกซาโนน, 3-ออกทานอน, เมทิลเอทิลคีโตน, เบนซาลดีไฮด์ และ เมทิลไอโซบิวทิลคีโตน โดยมีกรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาภายใต้ภาวะเดียวกับข้างต้น โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายถ้าสารประกอบคาร์บอนิลนั้นมีจุดเดือดสูงกว่า 80°C หรือใช้สารประกอบคาร์บอนิลนั้นเป็นตัวทำละลายถ้าจุดเดือดต่ำกว่า 80°C พบว่าปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีเฉพาะกับเบนซาลดีไฮด์ และคีโตนที่มีความเกะกะต่ำ ได้แก่ อะซิโตนและ ไซโคลเฮกซาโนนเท่านั้น ในขณะที่คีโตนที่มีความเกะกะปานกลาง เช่น เมทิลเอทิลคีโตนจะทำปฏิกิริยาได้ไม่สมบูรณ์ และคีโตนที่มีความเกะกะสูง ได้แก่ 3-ออกทานอน และเมทิลไอโซบิวทิลคีโตนพบว่าไม่ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเลย ถ้าตีความว่องไวในการปฏิกิริยาเช่นนี้สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานเช่นกันในเอกสารอ้างอิง¹⁴ ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์เหล่านี้คือเอริลไบกัวไนด์ (III) ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่าปฏิกิริยาไฮโดรคอนเดนเซชันเพื่อให้ได้ (I) นั้นจะต้องผ่านอินเทอร์มีเดียตที่เป็นเอริลไบกัวไนด์ก่อน (แผนภาพ 2.2)¹⁴ นอกจากนี้ Modest ยังได้รายงานว่าเมื่อทำปฏิกิริยาคอนเดนเซชันที่อุณหภูมิห้องจะได้ปริมาณผลผลิตที่ดีกว่า¹⁵ อย่างไรก็ดีเมื่อทดลองให้ *p*-toluidine ทำปฏิกิริยากับไคไซยาโนโคเอไมด์และเมทิลเอทิลคีโตนในเอทานอลที่อุณหภูมิห้องโดยมีกรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น



แผนภาพ 2.2

เนื่องจากในปฏิกิริยาไฮโดรคอนเดนเซชันมีการกำจัดน้ำออกมา 1 โมล ต่อโมลของไคไซโครโคโรซีนที่เป็นผลิตภัณฑ์ และมีรายงานในเอกสารอ้างอิงว่าไฮโดรแกวนิลสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกลับไปเป็นสารตั้งต้นได้เมื่อให้ความร้อนในสารละลายที่เป็นกรด¹ ดังนั้นจึงได้พยายามหาวิธีการที่จะลดน้ำในปฏิกิริยาลงเพื่อที่จะเลื่อนสมดุลไปทางด้านของผลิตภัณฑ์และลดการไฮโดรไลซิสของสารผลิตภัณฑ์ที่อาจเกิดขึ้นลง โดยการใช้กรดพาราโทลูอินซัลโฟนิก ($4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}\cdot\text{H}_2\text{O}$) เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทนกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ดังนั้นเมื่อให้ *p*-toluidine ($4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$) ทำปฏิกิริยากับไคไซยาโนโคเอไมด์และเมทิลเอทิลคีโตนโดยมีกรดพาราโทลูอินซัลโฟนิกอยู่ด้วย 1.1 อีคิวาเลนต์จะเกิดปฏิกิริยาให้อนุพันธ์ของไฮโดรแกวนิล (I, Ar = 4-MePh; R¹ = Me; R² = Et; X = OTs) (44 %) ตามต้องการ โดยไม่เกิดเอริลไบกัวไนด์เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง เมื่อเปลี่ยนคีโตนเป็น 2-เพนทาโนน (EtCO⁺Pr), 3-เพนทาโนน (EtCOEt) และ 2-ออกทานอน (MeCO⁺C₆H₁₃) พบว่าเกิดปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของไฮโดรแกวนิล (I, Ar = 4-MePh; R¹ = Me; R² = ⁺Pr; X = OTs; I, Ar = 4-MePh; R¹ = Et; R² = Et; X = OTs และ I, Ar = 4-MePh; R¹ = Me; R² = ⁺C₆H₁₃; X = OTs) ในปริมาณผลผลิต 23, 47 และ 8 % ตามลำดับ โดยสาเหตุที่ได้ปริมาณผลผลิตต่ำในบางกรณีเป็นเพราะความลำบากในการทำสารให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึก เนื่องจากเกลือพาราโทลูอินซัลโฟนิกของ (I) ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ส่วนใหญ่ และมีแนวโน้มที่จะเกิดเป็นยางเหนียว

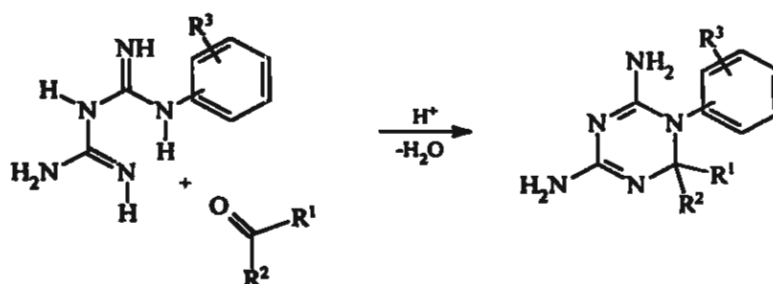
แม้ว่าจะลดปริมาณน้ำลงโดยใช้กรดพาราโทลูอินซัลโฟนิกแทนกรดไฮโดรคลอริกแล้วก็ตาม ความพยายามที่จะใช้วิธีดังกล่าวข้างต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไฮโดรแกวนิลจากคีโตนที่มีความเกะกะสูงเช่นเมทิลไอโซบิวทิลคีโตน (MeCO⁺Bu)

ก็ยังไม่ประสบผลสำเร็จ แต่เมื่อเติมไตรเมทิลออร์โทฟอร์เมต $[\text{HC}(\text{OMe})_3]$ ลงไประหว่างทำปฏิกิริยาเพื่อเป็นสารกำจัดน้ำพบว่า ได้ผลดีขึ้น กล่าวคือปฏิกิริยาระหว่าง *p*-toluidine, ไคโซยานิโคเอไมด์ และเมทิลไอโซบิวทิลไดโคโนโดยมีกรดพาราโทลูอินซัลโฟนิคอยู่ด้วย 1.1 อีคิวาเลนต์ และมีเอทานอล-ไตรเมทิลออร์โทฟอร์เมตเป็นตัวทำละลาย ให้อนุพันธ์ของไดไฮโดรโครอะซีน (I, $\text{Ar} = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{Me}$; $\text{R}^2 = \text{tBu}$; $\text{X} = \text{OTs}$) เป็นผลิตภัณฑ์ในปริมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ได้ปริมาณผลผลิตต่ำ คาดว่ามาจากการสูญเสียระหว่างการตกผลึกและปฏิกิริยาข้างเคียงอื่น สังเกตได้จากสีเหลืองเข้มของผลิตภัณฑ์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึก

ตาราง 2.1 ไดไฮโดรโครอะซีนที่เตรียมได้โดยวิธี Three-Component Synthesis

Ar	R ₁	R ₂	X	method ^a	formula	calcd			found		
						C	H	N	C	H	N
4-ClPh	H	Me	Cl	A	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{Cl}_2$	43.8	4.8	25.6	43.8	4.9	25.4
4-ClPh	H	Et	Cl	A	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{Cl}_2$	45.8	5.2	24.3	45.9	5.2	24.2
4-MePh	Me	Me	Cl	A	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	50.4	7.0	24.5	50.5	6.8	24.6
4-MePh	$-(\text{CH}_2)_5-$		Cl	A	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{Cl}$	58.5	7.3	22.8	58.4	7.3	22.9
4-MePh	H	Ph	Cl	A	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{Cl}$	60.8	5.7	22.2	60.8	5.7	22.2
4-MePh	Me	Et	OTs	B	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$	57.5	6.5	16.8	57.5	6.5	16.8
4-MePh	Me	nPr	OTs	B	$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$	58.4	6.8	16.2	58.4	6.8	16.2
4-MePh	Et	Et	OTs	B	$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$	58.4	6.8	16.2	58.4	6.8	16.3
4-MePh	Me	$^i\text{C}_6\text{H}_{13}$	OTs	B	$\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$	60.9	7.4	14.8	61.0	7.4	15.0
4-MePh	Me	^tBu	OTs	B [*]	$\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$	59.3	7.0	15.7	59.3	7.0	15.8

^aA: conc. HCl, EtOH, reflux; B: *p*TsOH, EtOH, reflux

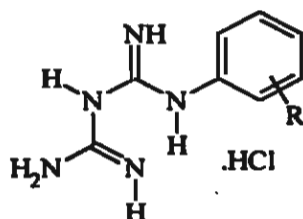


แผนภาพ 2.3

ด้วยข้อจำกัดของวิธีการสังเคราะห์ไฮโคลกวนิดโดยวิธี Three-Component Synthesis ดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงได้มีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ในขั้นนี้ให้ดีขึ้นโดยการพิจารณาวิธีการ Two-Component Synthesis ซึ่งแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

โดยในขั้นแรกจะเป็นการสังเคราะห์อนุพันธ์เอริลไบกวไนด์ (arylbiquanide, III) จากปฏิกิริยาระหว่างอะโรมาติกเอมีนและไดไฮยาโนไดเอไมด์โดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาก่อน^{5,16} แล้วจึงให้เอริลไบกวไนด์ซึ่งอยู่ในรูปของเกลือโมโนไฮโดรคลอไรด์นั้นทำปฏิกิริยาต่อไปกับสารประกอบคาร์บอนิลภายใต้ภาวะที่เป็นกรดเกิดเป็นสารประกอบไดไฮโดรไตรอะซีน (แผนภาพ 2.3) การสังเคราะห์โดยวิธี Two-Component Synthesis มีข้อได้เปรียบที่เห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับวิธี Three-Component Synthesis คือน่าจะได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์กว่าเนื่องจากมันไม่จำเป็นต้องใช้กรดในปริมาณมากเกินไปซึ่งอาจทำให้เกิดไฮโดรไลซิสของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากมีรายงานว่าผลิตภัณฑ์ที่ต้องการไม่เสถียรภายใต้ภาวะที่เป็นกรด' นอกจากนี้วิธีนี้ยังใช้สารตั้งต้นน้อยชนิดลงทำให้น่าจะสามารถแยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ได้ง่ายขึ้น อีกทั้งเอริลไบกวไนด์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นก็เป็นของแข็งที่เป็นผลึก เสถียร และไม่เกิดออกซิเดชันในอากาศได้ง่ายดังเช่นอะโรมาติกเอมีน จึงมีความสะดวกในการใช้งานมากกว่า

ตาราง 2 แสดงเอริลไบกวไนด์ที่เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ไดไฮโดรไตรอะซีน (I)



(III)

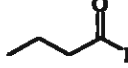
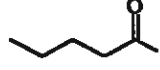
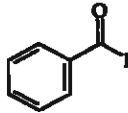
Biguanide	substituent R	% yield	<i>m/z</i> (found, calcd.)
IIIa	4-Me	61	192.3 (192.1)
IIIb	4-Et	68	206.1 (206.1)
IIIc	H	61	177.5 (178.1)
IIId	4-Cl	77	211.6 (212.1)*
IIIe	3-Cl	70	212.3 (212.1)*
IIIf	2,4-Cl ₂	60	246.0 (246.0)*
IIIg	3,4-Cl ₂	67	245.9 (246.0)*
IIIh	4-Br	78	255.6 (256.0)*

* with correct isotopic distribution pattern

4-methylphenylbiguanide hydrochloride (IIIa) เตรียมได้จากการรีฟลักซ์ *p*-toluidine กับไดไฮยาโนไดเอไมด์ในเอทานอล โดยมีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นอยู่ด้วยในปริมาณ 1.5 อีควิวาเลนต์ ซึ่งจะได้อผลิตภัณฑ์ตกผลึกออกมาเมื่อทำให้เย็นลง โดยมีปริมาณผลผลิต 61 % ไบกวไนด์ชนิดอื่นๆ สามารถสังเคราะห์ได้ในทำนองเดียวกัน โดยมีปริมาณผลผลิตอยู่ในช่วง 60-78 % (ตารางที่ 2.2)

สารประกอบไบกวไนด์ดังกล่าวทำปฏิกิริยากับอะซิโตน ไสโคลเฮกซาโนน อะลิฟาติกอัลดีไฮด์ และอะโรมาติกอัลดีไฮด์ ชนิดต่างๆ โดยมีเอทานอลเป็นตัวทำละลาย และกรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้ภาวะมาตรฐานที่รายงานโดย Modest⁹ พบว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจ โดยได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดไฮโดรไตรอะซีน (I) ที่หลากหลายดังแสดงในตาราง 2.3 โดยผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่จะตกผลึกออกมาเองจากปฏิกิริยาหลังจากรีฟลักซ์ไประยะหนึ่ง และสามารถทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยการตกผลึกจากตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น เมทานอล หรือ เอทานอล โดยอาจใช้ร่วมกับตัวทำละลายอื่นเช่นน้ำ หรือ ไดเอทิลอีเทอร์

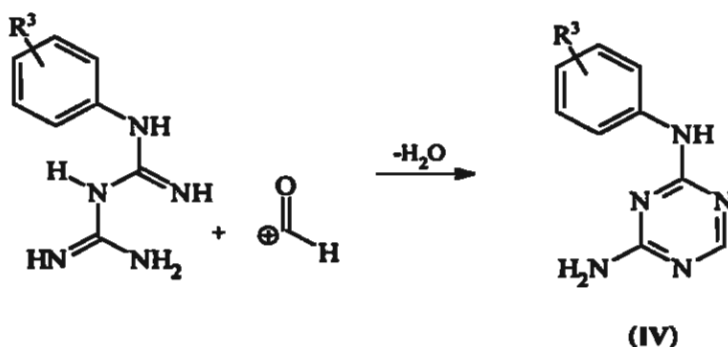
ตาราง 3 ตัวอย่างสารประกอบไดไฮโดรไดอะซีนที่ได้จากการสังเคราะห์โดยวิธี Two-Component Synthesis

entry	carbonyl compound	biguanide	Ar	R ₁	R ₂	% yield (crude)	m/z (observed)	m/z (calcd. M.H ⁺)
1		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	Me	Me	62	252	252
2		4-BrC ₆ H ₄ -	4-BrC ₆ H ₄ -	Me	Me	78	296	296
3		4-MeC ₆ H ₄ -	4-MeC ₆ H ₄ -	Me	Me	59	232	232
4		4-EtC ₆ H ₄ -	4-EtC ₆ H ₄ -	Me	Me	48	246	246
5		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ -	Me	Me	67	218	218
6		3-ClC ₆ H ₄ -	3-ClC ₆ H ₄ -	Me	Me	60	252	252
7		3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	Me	Me	71	286	286
8		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	H	Me	49	238	238
9		4-BrC ₆ H ₄ -	4-BrC ₆ H ₄ -	H	Me	53	282	282
10		4-MeC ₆ H ₄ -	4-MeC ₆ H ₄ -	H	Me	27	218	218
11		4-EtC ₆ H ₄ -	4-EtC ₆ H ₄ -	H	Me	18	238	238
12		3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	H	Me	76	272	272
13		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	H	Et	92	252	252
14		4-BrC ₆ H ₄ -	4-BrC ₆ H ₄ -	H	Et	93	296	296
15		4-MeC ₆ H ₄ -	4-MeC ₆ H ₄ -	H	Et	77	232	232
16		3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	H	Et	91	286	286
17		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	H	ⁿ Pr	86	266	266
18		4-BrC ₆ H ₄ -	4-BrC ₆ H ₄ -	H	ⁿ Pr	74	310	310
19		4-MeC ₆ H ₄ -	4-MeC ₆ H ₄ -	H	ⁿ Pr	83	246	246
20		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	H	ⁱ Pr	59	266	266
21		4-BrC ₆ H ₄ -	4-BrC ₆ H ₄ -	H	ⁱ Pr	71	310	310
22		4-MeC ₆ H ₄ -	4-MeC ₆ H ₄ -	H	ⁱ Pr	85	246	246
23		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	H	ⁿ Bu	89	280	280
24		4-BrC ₆ H ₄ -	4-BrC ₆ H ₄ -	H	ⁿ Bu	93	344	344
25		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	H	Ph	55	300	300
26		4-BrC ₆ H ₄ -	4-BrC ₆ H ₄ -	H	Ph	93	344	344
27		4-MeC ₆ H ₄ -	4-MeC ₆ H ₄ -	H	Ph	58	280	280
28		3-ClC ₆ H ₄ -	3-ClC ₆ H ₄ -	H	Ph	90	300	300
29		3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	H	Ph	63	334	334
30		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	H	^t Bu	31	280	280

ในบางกรณีเมื่ออะลฟาไดคัลดีไฮด์นั้นมีขนาดเล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง acetaldehyde และ propionaldehyde พบว่าปฏิกิริยาจะเกิดได้ไม่ดีเมื่อใช้เอทานอลหรือเมทานอลเป็นตัวทำละลายอาจเนื่องจากมันเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเฮมิอะซีทัลหรืออะซีทัลกับเอทานอลได้ง่ายภายใต้ภาวะที่เป็นกรด ในกรณีเช่นนี้การใช้ไอโซโพรพานอลซึ่งเกิดเป็นเฮมิอะซีทัลได้ยากกว่าเนื่องจาก steric effect เป็นตัวทำละลายจะให้ผลดีกว่าเอทานอลหรือเมทานอล

เมื่อพยายามขยายขอบเขตของการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา Two-Component Synthesis ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไคไฮโดรไตรอะซีน (I) จากสารประกอบคาร์บอนิลอื่นที่มีความเคอะมากขึ้น โดยให้ 4-methylphenylbiguanide hydrochloride (IIIa) ทำปฏิกิริยากับเมทิลเอทิลคีโตน ($\text{CH}_3\text{COC}_2\text{H}_5$) ในเอทานอลโดยเติมกรดไฮโดรคลอริกลงไปเล็กน้อยเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ประมาณ 2 หยด หรือ 50 μL สำหรับปฏิกิริยาในสเกล 1 มิลลิโมล) แล้วคนที่อุณหภูมิห้องพบว่าไม่ประสบความสำเร็จ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิโดยการรีฟลักซ์ พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น และผลการวิเคราะห์โดยทินเนลล์โครมาโตกราฟี (TLC) แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์หลังจากการรีฟลักซ์เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เมื่อเปลี่ยนคีโตนจาก เมทิลเอทิลคีโตนไปเป็นเมทิลไอโซบิวทิลคีโตน ซึ่งมีความเคอะสูงกว่าพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาเลยในภาวะเดียวกัน แต่ถ้าเติมไตรเมทิลออร์โทฟอร์มเมต $[\text{HC}(\text{OMe})_3]$ ลงไปด้วยเพื่อเป็นสารกำจัดน้ำพบว่าสารตั้งต้นจะเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์อย่างสมบูรณ์ภายในเวลาเพียง 1-2 ชั่วโมงเท่านั้น

จากการค้นคว้าเอกสารอ้างอิงพบว่าได้มีการศึกษาการใช้ไตรเอทิลออร์โทฟอร์มเมตเพื่อเป็นตัวกำจัดน้ำในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไฮโดรไตรอะซีนได้มีการศึกษามาก่อนแล้วโดย Baker¹⁷ โดยเขาเชื่อว่าบทบาทของไตรเอทิลออร์โทฟอร์มเมตคือการกำจัดน้ำที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาปิดวงแหวน โดยตัวมันเองจะถูกไฮโดรไลสไปเป็นเอทิลฟอร์มเมตและเอทานอลทำให้สมดุลของปฏิกิริยาเลื่อนไปข้างหน้า ข้อดีประการหนึ่งของการใช้สารประกอบออร์โทเอสเทอร์เป็นตัวกำจัดน้ำคือผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของออร์โทเอสเทอร์ได้แก่แอลกอฮอล์และเอสเทอร์เป็นสารระเหยง่ายทั้งคู่ ดังนั้นเมื่อระเหยสารผสมที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่างไบกัวไนด์ (IIIa) กับเมทิลไอโซบิวทิลคีโตนภายใต้ภาวะดังกล่าวให้แห้งพบว่าได้ผลึกสีขาวแยกตัวออกมา ผลการวิเคราะห์ผลึกที่ได้นี้โดย ^1H NMR พบว่ามีผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอยู่ด้วยจริง แต่ยังไม่บริสุทธิ์ ผลการวิเคราะห์ ^1H NMR สเปกตรัม, แมสสเปกตรัม (m/z 202.2) และข้อมูลในเอกสารอ้างอิงสามารถสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์อีกตัวหนึ่งที่เกิดขึ้นนั้นคือ s-triazine (IV) (calcd m/z 202.1) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเอริลไบกัวไนด์ (IIIa) กับออร์โทฟอร์มเมตซึ่งเป็นอิกัวเลนซ์ของฟอร์มิลแคทไอออนนั่นเอง Baker ได้เคยรายงานถึงปฏิกิริยานี้โดยระบุว่าเป็นปฏิกิริยาข้างเคียงที่สำคัญในกรณีที่คีโตนทำปฏิกิริยาได้ช้า¹⁷



แผนภาพ 2.4

จากการศึกษาในเอกสารอ้างอิงพบว่านอกจากไตรเอทิลออร์โทฟอร์มเมตแล้วมีการใช้ anhydrous calcium sulfate¹⁸ เพื่อเป็นสารกำจัดน้ำในปฏิกิริยาสังเคราะห์ไคไฮโดรไตรอะซีนเช่นกัน แต่มันมีประสิทธิภาพต่ำกว่า และไม่สามารถเติมลงไปเพื่อให้ทำปฏิกิริยาในภาชนะเดียวกันได้ (ต้องใช้เทคนิค Soxhlet เข้าช่วย) ด้วยเหตุนี้จึงได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สารกำจัดน้ำตัว

ภาคสารละลาย พบปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นสองประการได้แก่ 1) สารตั้งต้น (เอริลไบกัวไนด์) ทำปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์และไม่สามารถกำจัดออกได้โดยการล้างด้วยอะซิโตน 2) เกิดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการจัดเรียงตัวใหม่ (V) เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ดังนั้นจึงได้มีการคัดแปลงภาวะของการสังเคราะห์ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรโครโธซีนในสารละลายใหม่เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ปัญหาประการแรกสามารถแก้ไขได้โดยการใช้สารตั้งต้นตัวใดตัวหนึ่งให้มากเกินไป เพื่อจะทำปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์กับสารตั้งต้นอีกตัวหนึ่ง แล้วจึงกำจัดสารตั้งต้นตัวที่มากเกินไปออกจากผลิตภัณฑ์ในภายหลัง เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างเอริลไบกัวไนด์กับสารประกอบคาร์บอนิลแล้วจะเห็นได้ว่าสารตั้งต้นที่น่าจะกำจัดออกได้ง่ายกว่าคือสารประกอบคาร์บอนิล ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงใช้สารประกอบคาร์บอนิลในปริมาณมากเกินไป คือ 10 eq แทนที่จะเป็น 1 eq ดังที่ใช้แต่เดิม ส่วนตัวทำละลาย, ตัวกำจัดน้ำและกรดที่ใช้ยังคงเหมือนเดิม พร้อมทั้งคัดแปลงวิธีการ work-up เล็กน้อยคือแทนที่จะล้างของแข็งด้วยอะซิโตนก็เปลี่ยนเป็นการสกัดสารละลายของผลิตภัณฑ์ในน้ำด้วยอีเทอร์เพื่อกำจัดอะซิโตนออก ส่วนขั้นน้ำหลังจากระเหยน้ำออกจะได้อนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรโครโธซีนกลับคืนมา ดังนั้นเมื่อให้ 4-methylphenylbiguanide.HCl (IIIa) ทำปฏิกิริยากับ 3-เพนทาโนน ภายใต้วิธีการที่ปรับปรุงใหม่นี้พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (I, Ar=4-MePh, R¹=R²=Et) ในรูปที่เกือบจะบริสุทธิ์โดยมีปริมาณผลผลิตใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี ผลการวิเคราะห์โดย ¹H NMR พบว่ามีสารตั้งต้น (ไบกัวไนด์) เจือปนอยู่ประมาณ 4 % และพบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ (V, Ar=4-MePh, R¹=R²=Et) อีกประมาณ 10 %

ตาราง 2.5 : ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 4-methylphenylbiguanide กับคีโตนภายใต้ภาวะต่างๆ

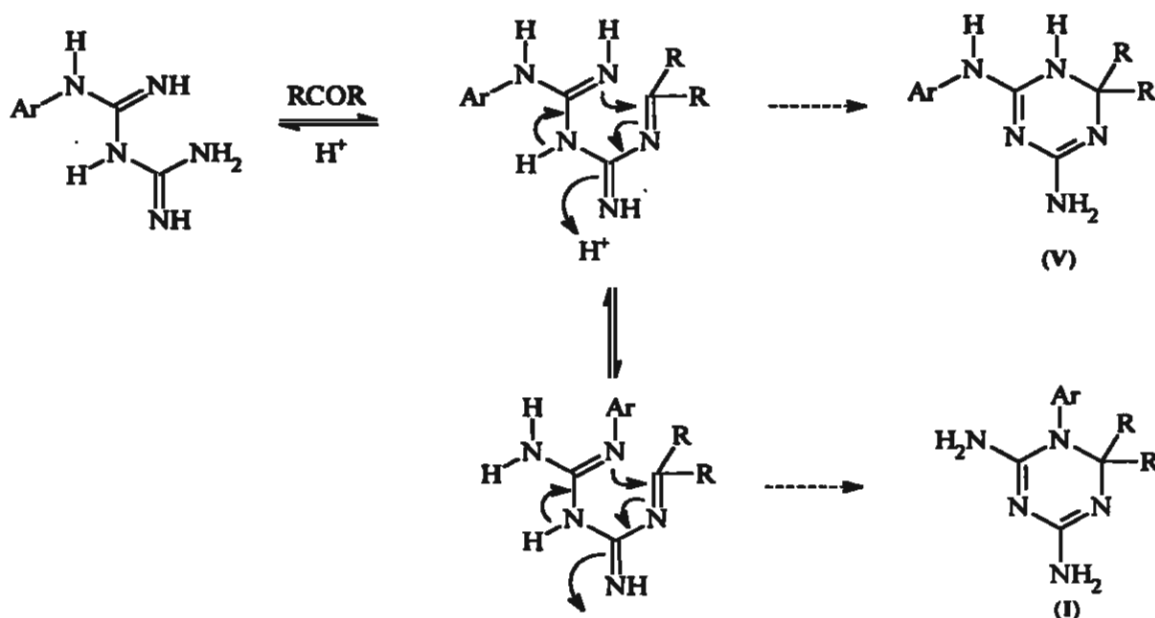
conditions	ketones	time	% yield	purity ^a	side products ^b
10 eq ketone, 1.1 eq aq. HCl, EtOH, reflux	Et ₂ CO	6 h	quant.	85%	biguanide (4%); isomer (11%)
10 eq ketone, 1.1 eq aq. HCl, MeOH, reflux	Et ₂ CO	6 h	quant.	83%	biguanide (12.5%); isomer (4.5%)
	MeCO ^t Bu	6 h	quant.	73%	biguanide (<1%); isomer (27%)
	MeCO ^t Pr	12 h	quant.	58%	biguanide (<1%); isomer (42 %)
	Pr ₂ CO	24 h	nd	nd	biguanide test positive
10 eq ketone, 1.1 eq aq. HCl, MeOH, rt	Et ₂ CO	5 days	nd	nd	biguanide test positive
	MeCO ^t Bu	2 days	nd	84%	biguanide (16%)
	MeCO ^t Pr	5 days + 6 h at 45 °C	nd	nd	biguanide test positive
10 eq ketone, 1.1 eq aq. HCl, MeOH, 45 °C	Et ₂ CO	24 h	quant.	>95%	biguanide (<5%)
	MeCO ^t Bu	48 h	quant.	>82%	biguanide (<18%)
	MeCO ^t Pr	48 h	quant.	84%	biguanide (16%)

^a เป็นค่าโดยประมาณ ได้จากการวัด integration ของ 200 MHz ¹H NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์หลังการสกัดคีโตนที่มากเกินไปออกด้วยอีเทอร์

ปัญหาประการที่ 2 คือปฏิกิริยาจัดเรียงตัวใหม่นั้นเป็นทราบกันดีในเอกสารอ้างอิง¹⁴ แต่โดยทั่วไปเชื่อกันว่าปฏิกิริยานี้เกิดภายใต้ภาวะที่เป็นเบสหรือเมื่อให้ความร้อนแก่เกลือของไดไฮโดรโครโธซีนจนถึงจุดหลอมเหลวเท่านั้น แต่ในการศึกษานี้พบว่านอกจากภายใต้ภาวะที่เป็นเบสหรือเมื่อหลอมเหลว การจัดเรียงตัวใหม่ยังสามารถเกิดได้ภายใต้ภาวะที่เป็นกรด และที่อุณหภูมิไม่สูงไปกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายได้แก่เมทานอล (65 °C) หรือเอทานอล (78 °C) นอกจากนี้ยังพบว่าการจัดเรียงตัวใหม่จะเกิดเร็วขึ้นในตัวทำละลายไดโพลาร์อะโปรติก ดังเช่น ไคเมทิลซัลโฟนิก ซึ่งผลการศึกษาด้วยเทคนิค NMR แสดงให้

เห็นชัดเจนว่าการให้ความร้อนแก่สารละลายของ (I) ในไดเมทิลซัลโฟไซด์- d_6 ที่ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ จะทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ไปเป็น (V) อย่างสมบูรณ์ภายในเวลาไม่กี่นาที ภายใต้ภาวะของการสังเคราะห์พบว่าสัดส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่จะเพิ่มขึ้นเมื่อคีโตนมีความเคอะสูงขึ้นดังแสดงในตาราง 2.5

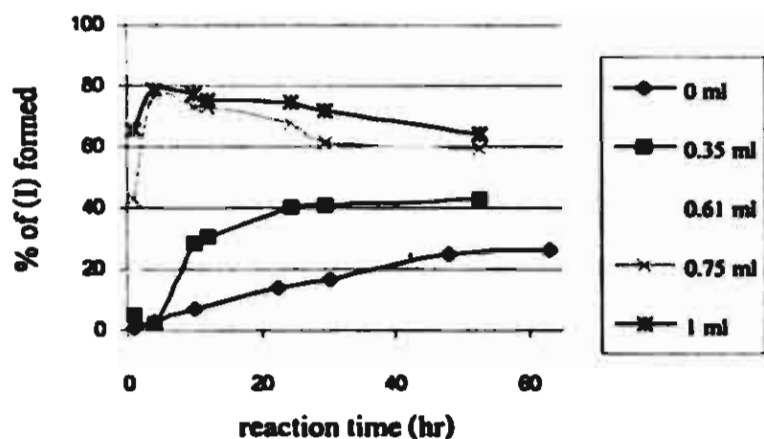
จากตาราง 2.5 จะเห็นว่า คีโตนที่มีความเคอะสูงมีแนวโน้มที่จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่า ผลิตภัณฑ์ที่มีโครงสร้าง (V) นั้นเป็นผลิตภัณฑ์แบบเทอร์โมไดนามิก (thermodynamic product) ซึ่งเสถียรกว่า ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่มีโครงสร้าง (I) นั้นเป็นผลิตภัณฑ์แบบไคเนติก (kinetic product) ซึ่งเกิดได้เร็วกว่า โดยทั้งสองผลิตภัณฑ์อาจเกิดจากอินเทอร์มีเดียตตัวเดียวกัน (แผนภาพ 2.5) ดังนั้น ถ้าต้องการให้เกิดผลิตภัณฑ์แบบไคเนติกมากกว่าควรจะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ ผลการทดลองแสดงว่าเมื่อให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำลง สัดส่วนของการเกิด (II) เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจะลดลง อย่างไรก็ตาม ที่อุณหภูมิต่ำเกินไปดังเช่นที่อุณหภูมิห้องปฏิกิริยาจะเกิดช้าและไม่สมบูรณ์



แผนภาพ 2.5

แม้จะได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไดไฮโดรไตรอะซีนที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างดีแล้วก็ตาม ภายใต้ภาวะดังกล่าวยังให้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่บริสุทธิ์เพียงพอสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารี เนื่องจากในการสังเคราะห์ไลบรารีจะไม่มีโอกาสทำสารให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกหรือโครมาโตกราฟีเช่นเดียวกับสารที่สังเคราะห์เป็นตัวย่อยๆ จึงได้ทำการปรับปรุงภาวะในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีนอย่างเป็นระบบ โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเครื่องมือติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาโดยใช้ปฏิกิริยาระหว่าง 4-chlorophenylbiguanide.HCl กับ 4-methyl-2-pentanone (methyl isobutyl ketone, MIBK) ซึ่งไม่เกิดเองภายใต้ภาวะมาตรฐานของ Modest⁴ เป็นปฏิกิริยาทดสอบ ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ซึ่งยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากปฏิกิริยา Two-Component Condensation ระหว่าง 4-Chlorophenylbiguanide กับ เมทิลไอโซบิวทิลคีโตนที่กระทำภายใต้ภาวะที่ดีที่สุดแต่เดิม กล่าวคือ การใช้เอริลไบกัวไนด์ไฮโดรคลอไรด์ (1 eq) กับคีโตน (10 eq), กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (50 μL ต่อเอริลไบกัวไนด์ 1 มิลลิโมล) และโครเอทิลออร์โทอะซิเตด (0.5 mL ต่อเอริลไบกัวไนด์ 1 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิ $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ โดยมีเมทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยเทคนิค HPLC พบว่ามีพิกของสารถึง 3 ชนิดในระบบ ได้แก่ ไบกัวไนด์ซึ่งเป็นสารตั้งต้น, ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (I,

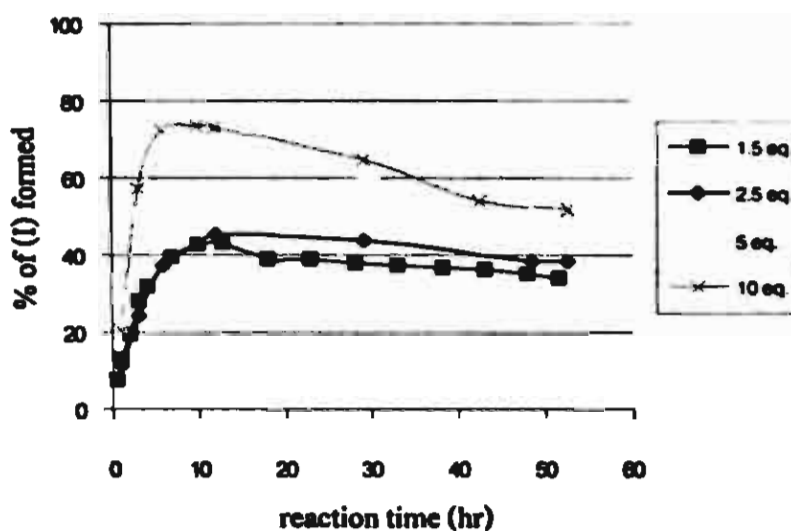
Ar=4-ClPh, R¹=Me, R²=ⁱBu) และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ (V, Ar=4-ClPh, R¹=Me, R²=ⁱBu) ตามลำดับของ retention time จากน้อยไปหามาก จากนั้นจึงได้ปรับเปลี่ยนตัวแปรต่างๆ ได้แก่ อัตราส่วนของคีโตนต่อไบทัวโนล, ปริมาณของกรดและสารกำจัดน้ำที่ใช้ และอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยา (แผนภาพ 2.6-2.11)



แผนภาพ 2.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไตรเอทิลออร์โทอะซิเตดที่ใช้กับ % yield ของผลิตภัณฑ์

Conditions : 4-Chlorophenylbiguanide 1 mmol; MIBK 5 eq; conc HCl 100 μ L; 45 $^{\circ}$ C

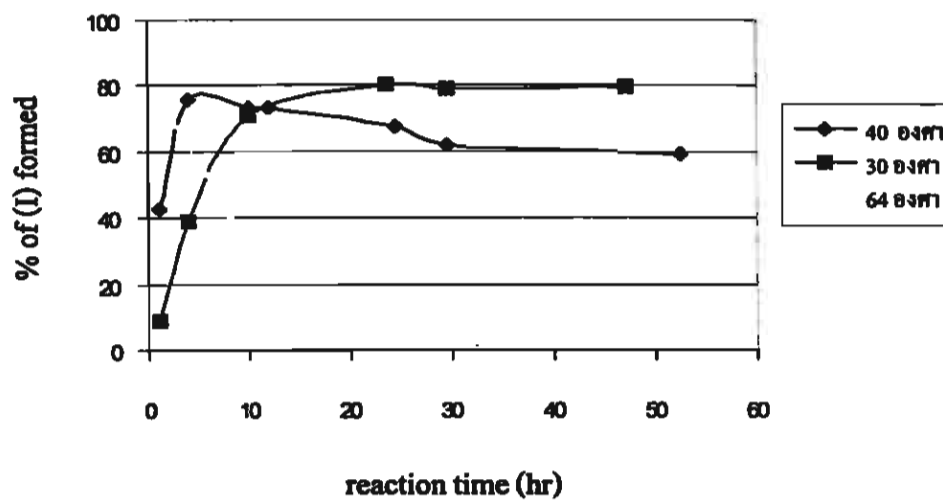
Parameter varied : amounts of TEOA (0, 0.35, 0.61, 0.75, 1.0 mL)



แผนภาพ 2.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของคีโตนที่ใช้กับ % yield ของผลิตภัณฑ์

Conditions : 4-Chlorophenylbiguanide 1 mmol; TEOA 0.61 mL; conc HCl 100 μ L; 45 $^{\circ}$ C

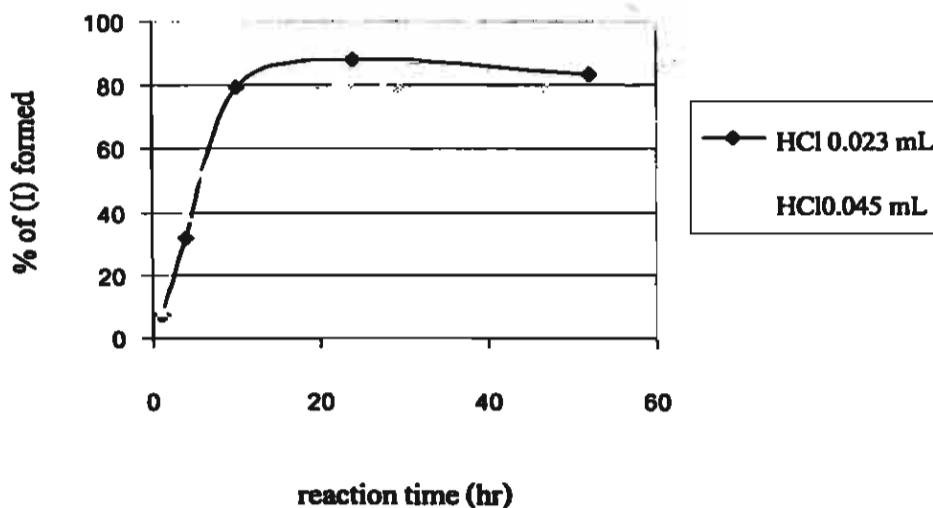
Parameter varied : amounts of MIBK (1.5, 2.5, 5, 10 eq)



แผนภาพ 2.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับ % yield ของผลิตภัณฑ์

Conditions : 4-Chlorophenylbiguanide 1 mmol; MIBK 5 eq; TEOA 0.75 mL; conc HCl 50 μ L

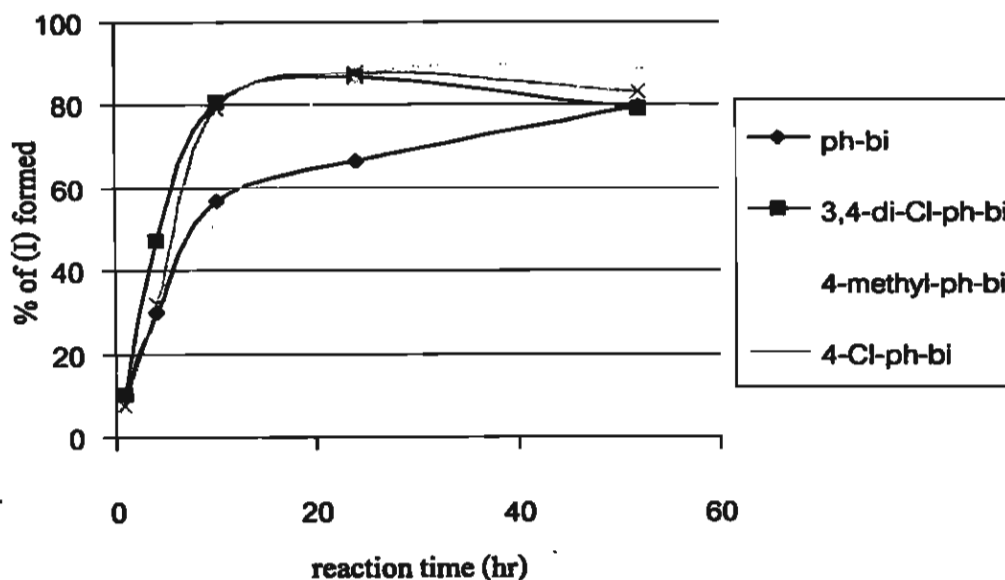
Parameter : Temperature (30, 40, 60 °C)



แผนภาพ 2.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้กับ % yield ของผลิตภัณฑ์

Conditions : 4-Chlorophenylbiguanide 1 mmol; MIBK 5 eq; TEOA 0.75 mL; Temperature 30 °C

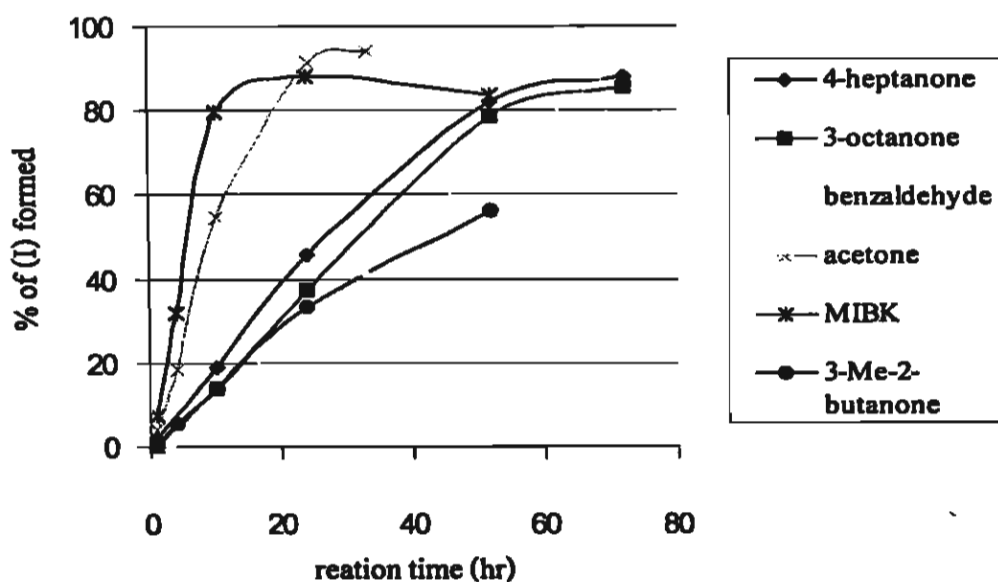
Parameter varied : conc HCl (50, 100 mL)



แผนภาพ 2.10 แสดงอัตราเร็วของการเกิดผลิตภัณฑ์เมื่อเปลี่ยนชนิดของเอริลไบกัวไนด์ที่ทำปฏิกิริยา

Conditions : biguanide 1 mmol; MIBK 5 eq, TEOA 0.75 mL; conc HCl 50 μ L; 30 $^{\circ}$ C

Parameter varied : arylbiguanides (R = H-, 4-Me, 4-Cl, 3,4-Cl₂)

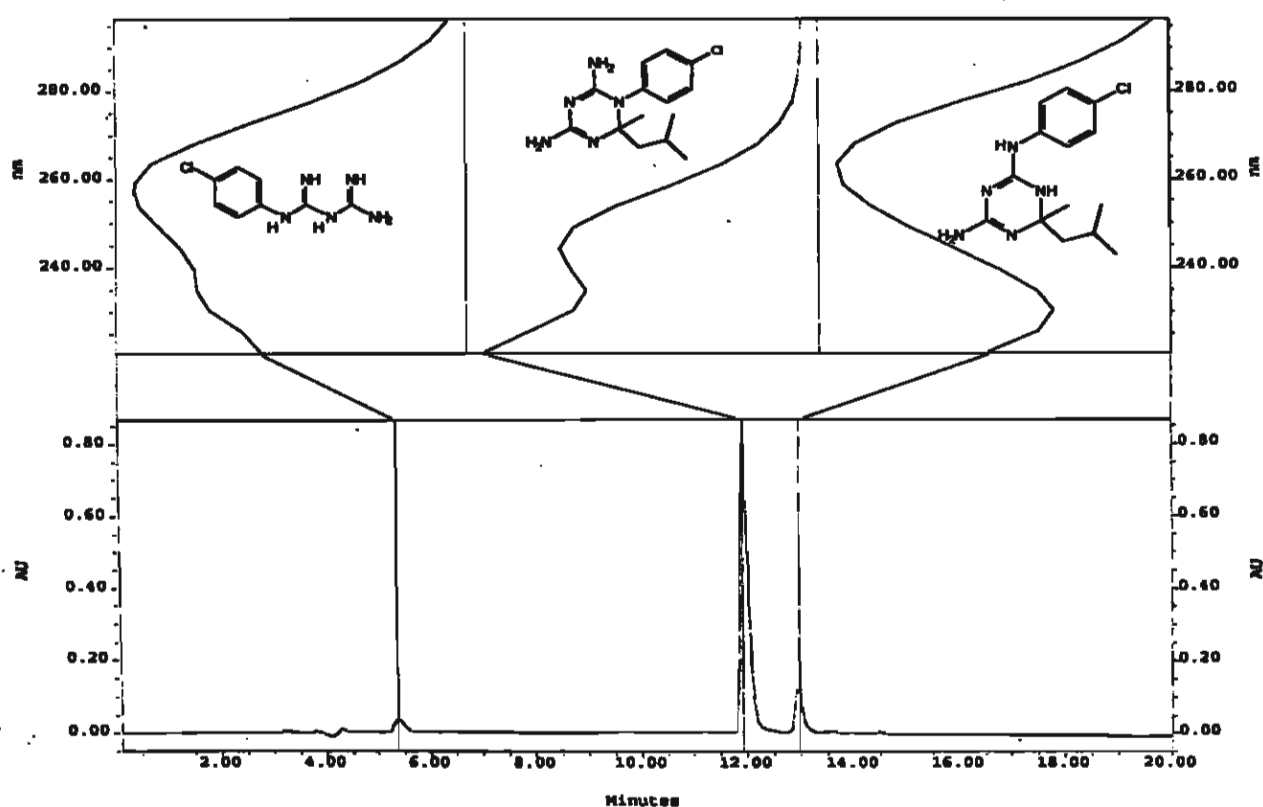


แผนภาพ 2.11 แสดงอัตราเร็วของการเกิดผลิตภัณฑ์เมื่อเปลี่ยนชนิดของสารประกอบคาร์บอนิลที่ทำปฏิกิริยา

Conditions : 4-chlorophenylbiguanide 1 mmol; TEOA 0.75 mL; conc HCl 50 μ L; 30 $^{\circ}$ C

Parameter varied : ketones (4-heptanone, 3-octanone, benzaldehyde, acetone, methyl isobutylketone, 3-methyl-2-butanone)

ผลการศึกษาพบว่าปัญหาการเกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์สามารถแก้ไขได้โดยการใช้คีโตนและสารกำจัดน้ำมากเกินไป ซึ่งพบว่าปริมาณของคีโตน 5 eq และไตรเอทิลออร์โทอะซิเตต (0.5 mL ต่อเอริลไบกัวไนด์ 1 มิลลิโมล) ให้ผลดีที่สุด ในขณะที่ปัญหาการเกิดการจัดเรียงตัวใหม่แก้ไขได้โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ แต่มันจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดช้าลงด้วย ดังนั้นจากการศึกษาจึงเลือกอุณหภูมิห้องเป็นอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยาซึ่งใช้เวลาไม่นานเกินไปและเกิด rearranged product (V) ในปริมาณที่ยอมรับได้ (< 5%) ภายใต้ภาวะนี้ คีโตนที่มีความกะทัดรัดสูงหลายชนิด ได้แก่ 4-methyl-2-pentanone, 4-heptanone, 3-methyl-2-butanone และ 3-octanone ทำปฏิกิริยากับ 4-chlorophenylbiguanide.HCl อย่างสมบูรณ์ภายใน 48-72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องและมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเกิดขึ้นน้อยมาก เอริลไบกัวไนด์ชนิดอื่นแม้จะทำปฏิกิริยาด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน แต่เมื่อให้เวลาทำปฏิกิริยานานพอ เอริลไบกัวไนด์ทุกชนิดสามารถทำปฏิกิริยาได้สมบูรณ์เหมือนกัน ผลการวิเคราะห์สารผสมเมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วโดยเทคนิค HPLC และ ^1H NMR พบว่าทุกกรณีได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยมีความบริสุทธิ์สูงมากกว่า 85 % (แผนภาพ 2.12)

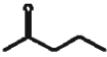
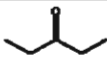
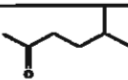
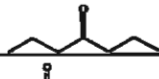
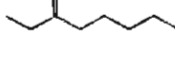
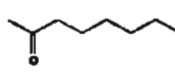


แผนภาพ 2.12 HPLC โครมาโตแกรมและวิธีวิธีเปิดสเปกตรัมของสารผสมจากปฏิกิริยาระหว่าง 4-คลอโรฟีนิลไบกัวไนด์และเมทิลไอบิวทิลคีโตนภายใต้ภาวะที่ดีที่สุดจากการทดลอง

วิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้จึงเหนือกว่าวิธีที่ได้เคยมีรายงานมาในเอกสารอ้างอิงทั้งหลายด้วยในแง่ที่ว่ามันสามารถใช้สังเคราะห์อนุพันธ์ของไดไฮโดรโครอะซินที่มีหมู่แทนที่ที่มีความกะทัดรัดที่ตำแหน่ง C^2 ซึ่งไม่สามารถเตรียมได้โดยวิธีอื่น เมื่อทดสอบวิธีสังเคราะห์กับสารตั้งต้นที่หลากหลายขึ้นเพื่อศึกษาขอบเขตการใช้งานของภาวะใหม่นี้พบว่าสามารถนำไปใช้งานได้อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างของไดไฮโดรโครอะซินชนิดใหม่ที่เตรียมได้จากภาวะข้างต้นเป็นดังแสดงในตาราง 2.6

ตาราง 2.6 อนุพันธ์ของไดไฮโดรไดโรอะซีนที่สังเคราะห์ได้ตามวิธีการใหม่ที่พัฒนาขึ้น

(based on 1 mmol scale synthesis)

entry	ketone	biguanide HCl	Ar	R ¹	R ²	% yield (crude)	M.H ⁺ (observed)	M.H ⁺ (calculated)
1		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ -	Me	ⁿ Pr	93	246.2	246.2
2		4-MeC ₆ H ₄ -	4-MeC ₆ H ₄ -	Me	ⁿ Pr	82	260.5	260.2
3		C ₆ H ₅ -	4-MeC ₆ H ₄ -	Et	Et	73	246.2	246.2
4		3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	4-EtC ₆ H ₄ -	Et	Et	88	314.0	315.2
5		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ -	-(CH ₂) ₂ -		61	244.1	244.2
6		4-MeC ₆ H ₄ -	4-MeC ₆ H ₄ -	-(CH ₂) ₂ -		78	258.1	258.2
7		4-EtC ₆ H ₄ -	4-EtC ₆ H ₄ -	Me	ⁱ Pr	59	275.5	274.2
8		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	Me	ⁱ Pr	38	281.4	280.8
9		3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	Me	ⁱ Pr	84	315.6	314.1
10		4-MeC ₆ H ₄ -	4-MeC ₆ H ₄ -	Me	^t Bu	75	275.8	274.2
11		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	Me	^t Bu	62	295.6	294.1
12		3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	Me	ⁿ C ₅ H ₁₁	75	341.9	342.1
13		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	ⁿ Pr	ⁿ Pr	68	308.2	308.2
14		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ -	Et	ⁿ C ₅ H ₁₁	79	288.5	288.2
15		4-ClC ₆ H ₄ -	4-ClC ₆ H ₄ -	Et	ⁿ C ₅ H ₁₁	64	324.1	322.2
16		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ -	Me	ⁿ C ₆ H ₁₃	89	288.5	288.2
17		4-MeC ₆ H ₄ -	4-MeC ₆ H ₄ -	Me	ⁿ C ₆ H ₁₃	90	303.7	302.2
18		4-EtC ₆ H ₄ -	4-EtC ₆ H ₄ -	Me	ⁿ C ₆ H ₁₃	84	316.5	316.3

เทคนิคการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไดโรอะซีน ในวิทยาศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้ได้กับสารตั้งต้นที่มีโครงสร้างหลากหลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเป็นอะลิฟาติกไดโรอะซีนที่มีความเคอะสูงและปราศจากหมู่ฟังก์ชันอื่นซึ่งจะเสริมกับวิธีการ Two-Component Synthesis แบบเดิมที่เหมาะสมกับอะซิโตน และอะลิฟาติกหรืออะโรมาติกอัลดีไฮด์เท่านั้น เมื่อทดสอบวิธีการใหม่นี้กับไดโรอะซีนที่มีหมู่ฟังก์ชันอยู่ด้วย เช่น levulinic acid, ethyl acetoacetate, 1,3-dichloroacetone รวมทั้งอะโรมาติกไดโรอะซีนได้แก่ benzophenone และ acetophenone และอะลิฟาติกไดโรอะซีนที่มีความเคอะสูงเป็นพิเศษ (เช่น diisopropyl ketone) พบว่าไม่เกิดผลึกตามต้องการ ซึ่งน่าจะได้มีการพัฒนาวิธีการต่อไปอีกให้ครอบคลุมสารกลุ่มนี้ด้วย โดยทั่วไปไดไฮโดรไดโรอะซีนที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยานี้มีความบริสุทธิ์สูงเพียงพอที่จะนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยไม่จำเป็นต้องนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกหรือโครมาโตกราฟีอีก ดังนั้นมันจึงน่าจะเหมาะสมกับการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีในวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ของแข็งเป็นอย่างยิ่ง

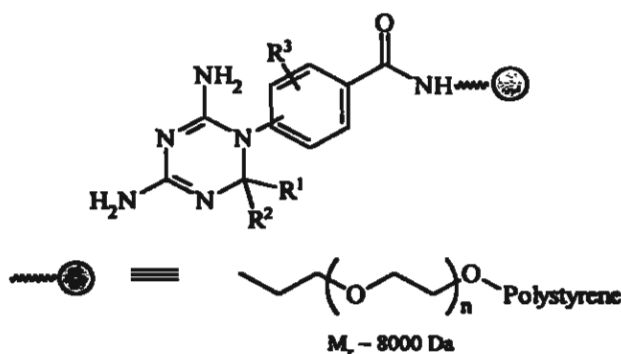
เอกสารอ้างอิงบทที่ 2

- ¹ H. C. Carrington, A. F. Crowther and G. J. Stacey, Synthetic Antimalarials. Part XLIX. The structure and synthesis of the dihydrotriazine metabolite of proguanil, *J. Chem. Soc.*, 1954, 1017-1031.
- ² H. A. Stevenson and E.L. Leafe, Method of controlling graminaceous weeds, US Patent 3,155,486, November 3, 1964.
- ³ B.R. Baker and B.T. Ho, Analogs of tetrahydrofolic acid. XXII. 1-(ω -phenylalkyl)-4,6-diamino-1,2-dihydro-s-triazines as inhibitors of dihydrofolic reductase, *J. Heterocyclic Chem.*, 1965, 2, 72-79.
- ⁴ E. J. Modest, Chemical and biological studies on 1,2-dihydro-s-triazines II. Three-component synthesis, *J. Org. Chem.*, 1956, 21, 1-13.
- ⁵ E.J. Modest and P. Levine, Chemical and biological studies on 1,2-dihydro-s-triazines. III. Two-component synthesis, *J. Org. Chem.*, 1956, 21, 14-21.
- ⁶ M. Furukawa, Y. Seto and S. Toyoshima, Syntheses of compounds related to guanidine and their inhibitory action on growth of HeLa cells, *Chem. Pharm. Bull.*, 1951, 9, 914-921.
- ⁷ B. Roth and J. J. Burchall, Inhibitors of dihydrofolate reductase, *Methods in Enzymology*, 1971, 18, 779-786
- ⁸ S.Schalit and R.A. Cutler, New dihydrotriazines of chemotherapeutic interest, *J. Org. Chem.*, 1959, 24, 573-576.
- ⁹ B.R. Baker and W.T. Ashton, Irreversible enzyme inhibitors. 197. Water-soluble reversible inhibitors of dihydrofolate reductase with potent antitumour activity derived from 4,6-diamino-1,2-dihydro-2,2-dimethyl-1-phenyl-s-triazine, *J. Med. Chem.*, 1973, 16, 209-214.
- ¹⁰ B.R. Baker and N.M.J. Vermeulen, Irreversible Enzyme Inhibitors. CLXXV. Irreversible Inhibition of purified dihydrofolic reductase, *J. Med. Chem.*, 1970, 13, 1143-1148.
- ¹¹ H. C. Carrington, A. F. Crowther and G. J. Stacey, Synthetic Antimalarials Part XLIX. *J. Chem. Soc.*, 1951, 1780.
- ¹² A.B. Sen and P.R. Singh, Search for new antimalarials : synthesis of some substituted 1,2-dihydro-s-triazines. Part I, *J. Indian Chem. Soc.*, 1958, 35, 847-852.
- ¹³ B.R. Baker and M.A. Johnson, Irreversible Enzyme Inhibitors. CXI. Candidate active-site-directed irreversible inhibitors of dihydrofolic reductase derived from 4,6-diamino-1,2-dihydro-1-phenyl-s-triazines V, *J. Heterocyclic Chem.*, 1967, 4, 507-510.
- ¹⁴ A.B. Sen and P.R. Singh, Search for antimalarials. Part II. Synthesis of some new 1,2-dihydro-1,3,5-triazines, *J. Indian Chem. Soc.*, 1959, 36, 260-262.
- ¹⁵ A.B. Sen and P.R. Singh, Search for antimalarials. Part II. Synthesis of some new 1,2-dihydro-1,3,5-triazines, *J. Indian Chem. Soc.*, 1961, 38, 187-188.
- ¹⁶ S.L. Shapiro, V.A. Parrino, E. Rogow and L. Freedman, Hypoglycemic Agents. II. Arylbiguanides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81, 3725-3728.
- ¹⁷ B.R. Baker and M. A. Johnson, *J. Heterocyclic Chem.*, 1967, 4, 447.
- ¹⁸ J.G. Lombardino, 4,6-Diamino-1-alkyl-1,2-dihydro-s-triazines, *J. Med. Chem.*, 1963, 6, 213-214.

บทที่ 3

การศึกษาแนวทางการสังเคราะห์ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน บนวิญภาคของแข็ง

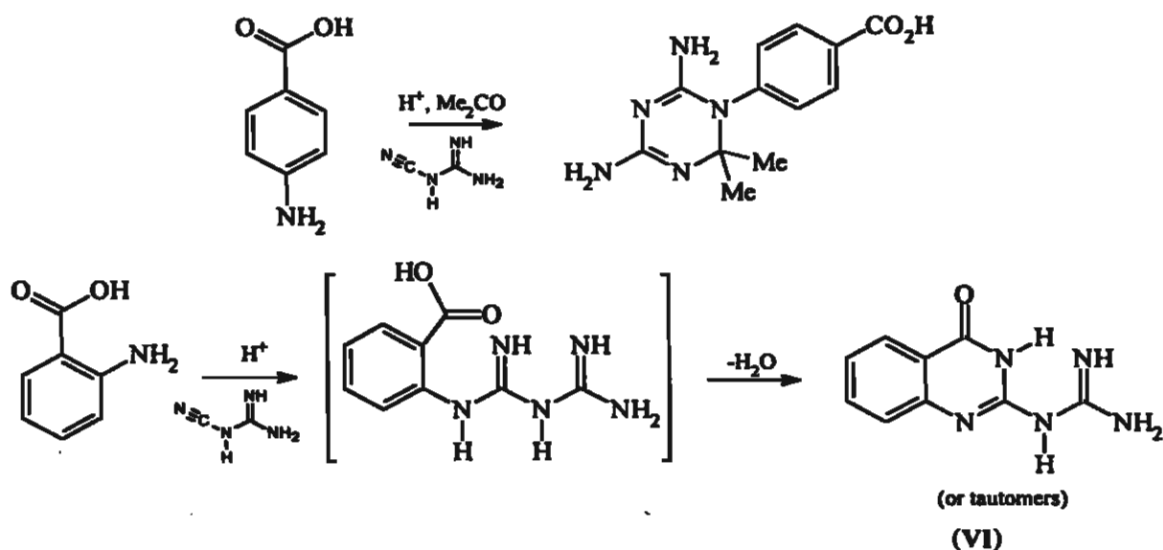
ในการเตรียมคอมบิเนทอเรียลไลบรารีบนวิญภาคของแข็งนั้น ชนิดของวิญภาคของแข็งที่จะเลือกใช้เป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการทำการสกรีนเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับไลบรารีที่เชื่อมต่อกับวิญภาคของแข็งโดยตรง ซึ่งส่วนใหญ่จะต้องทำในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ ดังนั้นวิญภาคของแข็งที่ไม่ชอบน้ำดังเช่น โพลิสไตรีนจึงไม่เหมาะสมสำหรับวัตถุประสงค์นี้ โดยทั่วไปวิญภาคของแข็งที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีคือ Tentagel resin ซึ่งเป็นโพลิสไตรีนที่ผ่านการเติมหมู่โพลีเอทิลีนไกลคอลลงไป สายของโพลีเอทิลีนไกลคอลที่เติมลงไปนอกจากจะทำให้เรซินนี้สามารถใช้งานได้ในตัวกลางที่เป็นน้ำแล้ว มันยังสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างอิสระ ปฏิกริยาจึงเกิดได้คล้ายคลึงกับภายใต้ภาวะที่เป็นสารละลาย นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิค Gel-phase NMR spectroscopy ในการติดตามการเกิดปฏิกริยาได้อีกด้วย การสกรีนคอมบิเนทอเรียลไลบรารีบน Tentagel resin ยังมีปัญหายู้งายในเรื่องของการแทรกซึมของ biological target ที่มีขนาดใหญ่ดังเช่นเอ็นไซม์เข้าไปทำปฏิกริยากับโมเลกุลที่อยู่ภายในของเรซิน แต่มันก็มีตัวอย่างที่ได้รับการพิสูจน์ว่าการสกรีนคอมบิเนทอเรียลไลบรารีที่เชื่อมต่ออยู่บน Tentagel resin ด้วยสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดปานกลางนั้นเป็นไปได้ในบางกรณี² ประกอบกับการที่ Tentagel resin มีจำหน่ายแพร่หลายในรูปที่มีหมู่ฟังก์ชันต่างๆ เช่น ไฮดรอกซี อะมิโน หรือตัวเชื่อมอื่นๆ นอกจากนี้มันยังมีความแข็งแรงเชิงกลสูง และมีราคาถูกกว่าวิญภาคของแข็งอื่นที่นิยมใช้เพื่อวัตถุประสงค์เดียวกันนี้เช่น cross-linked polyacrylamide resin หรือ PEGA resin ในการศึกษาเบื้องต้นจึงเลือก Tentagel resin เป็นวิญภาคของแข็ง และให้โมเลกุลของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน เนื่องจากตำแหน่งอื่นของโมเลกุลโดยเฉพาะอย่างยิ่ง N' และหมู่ -NH₂ ทั้ง 2 หมู่นั้นมีความสำคัญต่อการจับยึดของเอ็นไซม์ ดังนั้นตำแหน่งที่เหมาะสมกว่าในการเชื่อมต่อกับวิญภาคของแข็งควรจะเป็นบริเวณ N' หรือ C² ของสารประกอบ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน เป้าหมายของการสังเคราะห์แรกที่ตั้งไว้คือการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนบน Tentagel resin โดยการเชื่อมต่อผ่านหมู่คาร์บอกซิลซึ่งต่ออยู่กับวงแหวนอะโรมาติกดังนี้ (แผนภาพ 3.1)



แผนภาพ 3.1

ผลการศึกษาเบื้องต้นเพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนโดยเริ่มต้นจากกรดอะมิโนเบนโซอิกโดยวิธี Three-component synthesis (รีฟลักซ์กับอะซีโตน/ไดไฮยาโนไดเอไมด์/กรดไฮโดรคลอริก)³ แสดงให้เห็นว่าแม้กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (*p*-H₂NC₆H₄CO₂H, "PABA") จะทำปฏิกริยาได้ตามปกติให้ผลิตภัณฑ์เป็น 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ตามที่คาดไว้ แต่กรดแอนทรานิลิกหรือเมทิลและเบนซิลเอสเทอร์ของมัน (*o*-H₂NC₆H₄CO₂R, R=H, Me, Bzl)

กลับเกิดปฏิกิริยาปิดวงแหวนแทน ดังนั้นเมื่อรีฟลักซ์กรดแอนทรานิลิกกับไคไซยาโนโคเอไมด์ในเอทานอล/กรดไฮโดรคลอริก พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ quinazoline (VI) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ได้เคยมีรายงานมาแล้วในเอกสารอ้างอิงในตอนที่จะเป็นอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรควิโนลีนดังที่คาดไว้ (แผนภาพ 3.2)



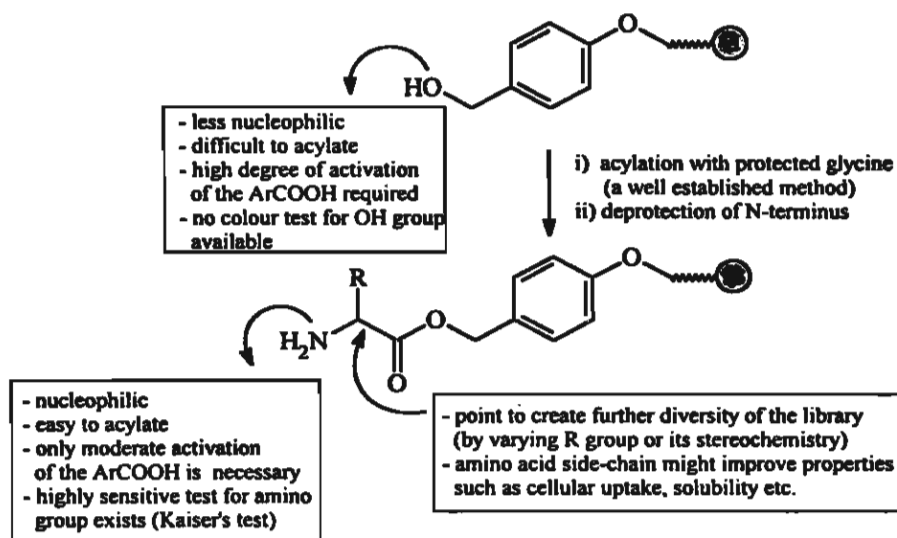
แผนภาพ 3.2 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรควิโนลีน จากกรดอะมิโนเบนโซอิก

ดังนั้นข้อจำกัดของไลบรารีที่อาศัยหมู่คาร์บอกซิลเป็นตัวยึดเหนี่ยวคือการที่ไม่สามารถให้หมู่อะมิโนและคาร์บอกซิลอยู่ในตำแหน่ง 1,2 ซึ่งกันและกันได้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากยังมีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนเบนโซอิกเป็นจำนวนมากที่สามารถหาซื้อได้ ดังนั้นจึงคาดว่าน่าจะยังคงสามารถเตรียมไลบรารีที่มีขนาดใหญ่พอสมควรโดยละเว้นอนุพันธ์ของกรดแอนทรานิลิกไว้

เนื่องจาก 4-คาร์บอกซีฟีนิลโบกัวไนด์ ไฮโดรคลอไรด์ เป็นของแข็งที่เสถียร เป็นผลึกและสามารถสังเคราะห์ได้ง่ายจากปฏิกิริยาระหว่างกรดพารอะมิโนเบนโซอิกและไคไซยาโนโคเอไมด์ภายใต้ภาวะมาตรฐานและผลการทดสอบเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าหมู่โบกัวไนด์ของสารนี้ไม่สามารถถูกเอซิลเลตด้วย ไดเทอร์เซียร์บิวทิลคาร์บอเนต (Boc_2O) ภายใต้ภาวะที่เอซิลเลตหรืออะโรมาติกเอมีนทั่วไปเกิดปฏิกิริยาแม้ว่าจะมีไดเมทิลอะมิโนพิริดีน (DMAP) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอยู่ด้วยก็ตาม จึงได้พยายามควบคู่ (coupling) หมู่คาร์บอกซิลของสารนี้เข้ากับหมู่อะมิโนบน Tentagel- NH_2 resin โดยตรงโดยไม่ต้องมีการปกป้องหมู่โบกัวไนด์ก่อน ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนการสังเคราะห์ลงไปได้มาก ได้มีการศึกษาถึงภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาและพบว่าการใช้ *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N,N*-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate (HBTU)⁶⁷ ร่วมกับ ของเอ็น,เอ็น-ไดไอโซโพรพิลเอทิลามีน (DIEA) 3 อีควิวาเลนต์เป็นตัวควบคู่ (coupling reagent) ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ กล่าวคือปฏิกิริยาเอซิลเลชันของหมู่อะมิโนบนเรซินเกิดสมบูรณ์เมื่อให้ Tentagel- NH_2 resin (50 mg, 13 μmol) ทำปฏิกิริยากับ 4-คาร์บอกซีฟีนิลโบกัวไนด์ ไฮโดรคลอไรด์ (5.2 eq), HBTU (5.2 eq) และ DIEA (16 eq) ใน DMF (0.5 mL) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ทำซ้ำสองครั้ง) ซึ่งทราบได้จากผลการทดสอบเรซินด้วยสารละลายนินไฮดริน (Kaiser's Test)⁶⁸ จะได้สารละลายสีเหลืองอ่อนและเมื่อบดเรซินที่ใส่ปราศจากสีม่วงหรือน้ำเงินซึ่งแสดงว่ามีหมู่อะมิโนอิสระเหลืออยู่น้อยกว่า 0.05 %

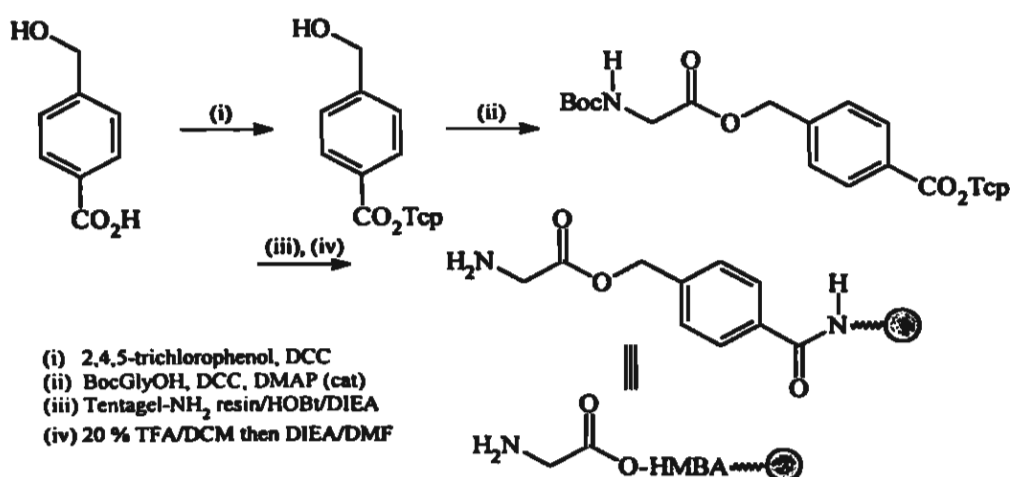
แม้ว่าการใช้ Kaiser test จะสามารถบอกให้ทราบเบื้องต้นได้ว่าการเกิดปฏิกิริยาขึ้นที่หมู่อะมิโนบนเรซินอย่างสมบูรณ์แล้ว แต่ไม่ได้หมายความว่าจะไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงอย่างอื่น ดังนั้นจึงได้ทดสอบปฏิกิริยาควบคู่ของ 4-คาร์บอกซีฟีนิลโบกัวไนด์ กับ Tentagel resin แบบที่มีตัวยึดที่สามารถเอาออกได้เมื่อต้องการ (cleavable linker) อยู่ด้วยเพื่อที่จะได้สามารถแยกเอาสาร

ผลิตภัณฑ์ออกมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปีหรือโครมาโตกราฟีได้ ตัวเชื่อมที่เลือกใช้คือ HMBA (hydroxymethylbenzoyl linker) ซึ่งเสถียรในกรดและสามารถ เอาออกได้ด้วยนิวคลีโอไฟล์เช่น ไฮดรอกไซด์, แอลคอกไซด์, แอมโมเนีย หรือเอมีน^{๓๐} ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของกรดคาร์บอกซิลิก นอกจากนี้ได้สกัดแทรกโมเลกุลของกรดอะมิโนตัวหนึ่ง ได้แก่ โกลซีนเข้าไปด้วยเพื่อทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่างตัวเชื่อมและหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนเบนโซอิก ดังแสดงในแผนภาพ 3.3



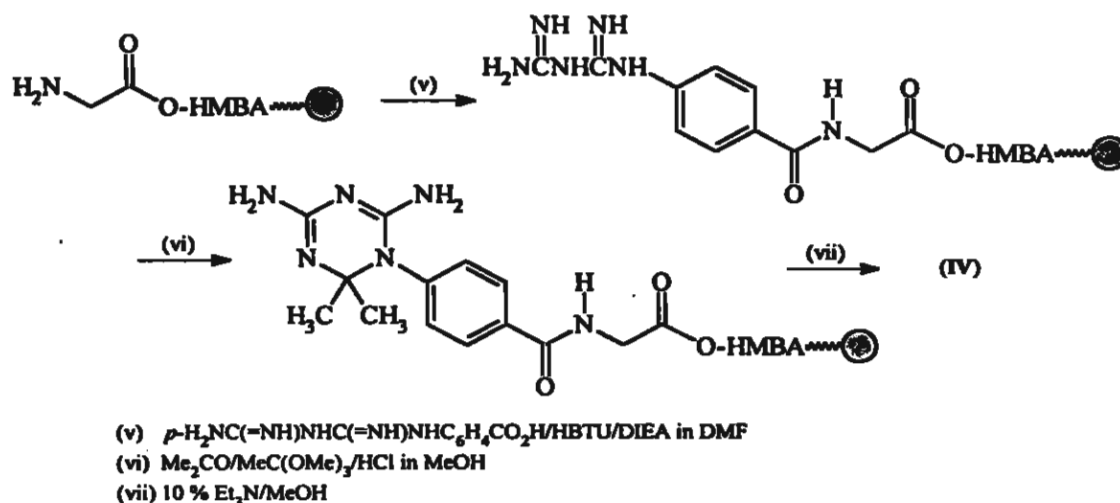
แผนภาพ 3.3 แสดงข้อดีของการใส่กรดอะมิโนเข้าไประหว่างตัวเชื่อมและหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนเบนโซอิก

โกลซีนที่ใส่เข้าไปนั้นนอกจากทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมโดยเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชัน -OH บนเรซินให้กลายเป็นหมู่ -NH₂ ซึ่งเกิดปฏิกิริยาเอซิลเลชันได้ง่ายกว่าแล้ว มันยังเป็นหมู่ฟังก์ชันอ้างอิงในการใช้ปฏิกิริยาทดสอบที่ใช้สารละลายนินไฮดรินได้ว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์หรือยัง ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนจากโกลซีนเป็นตัวอื่นเช่น อะลานีน, โลซีน ก็จะสามารถเพิ่มความหลากหลาย (diversity) ให้กับคอมบินทอรีลไลบรารีอีกชั้นหนึ่ง โดยที่หมู่ฟังก์ชันในกรดอะมิโนเหล่านี้จะช่วยปรับปรุงสมบัติบางประการของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรโครโรซีนที่ได้ เช่น ความจำเพาะในการจับยึดกับเอนไซม์, การละลายน้ำ, การแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น



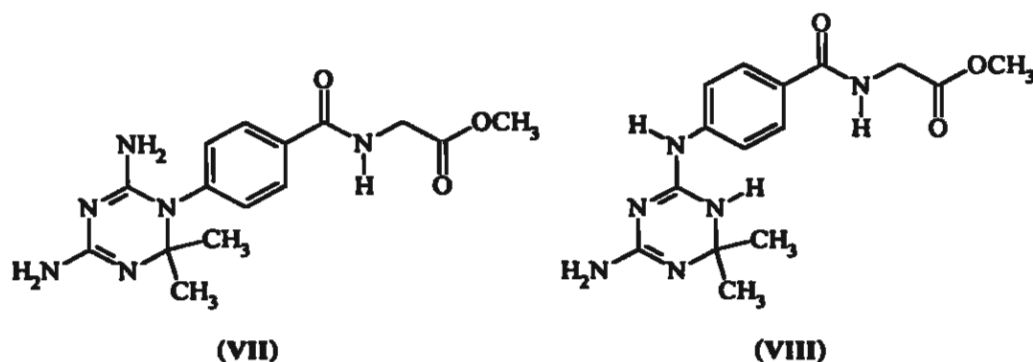
แผนภาพ 3.4 การสังเคราะห์และต่อตัวเชื่อม HMBA เข้ากับเรซิน

ตัวเชื่อม HMBA ที่มีไกลซีนต่ออยู่สามารถสังเคราะห์ได้จากกรดพารามิตเบนโซอิกตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง⁹ (แผนภาพ 3.4) เมื่อต่อตัวเชื่อมนี้เข้ากับ Tentagel-NH₂ resin (iii) ตามด้วยการกำจัดหมู่ Boc ซึ่งปกป้องไกลซีนอยู่ออกโดยใช้กรดไตร-ฟลูออโรอะซิติก 50 % ในไดคลอโรมีเทนและทำให้เป็นกลางด้วยสารละลาย DIEA ใน DMF (iv) จะได้ H₂N-Gly-HMBA-Tentagel resin ซึ่งจะถูกนำไปทำปฏิกิริยากับ 4-คาร์บอกซีฟีนิลโบกัวไนด์/HBTU/DIEA (v) ต่อไป เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาขั้นนี้ได้มีการทดสอบการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากตัวเชื่อม HMBA โดยให้เรซิน 10 mg ทำปฏิกิริยากับ 10 % ไตรเอทิลามีนในเมทานอลตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง⁹ ผลการวิเคราะห์ ¹H nmr สเปกตรัมและ MALDI แมสสเปกตรัมของสารที่ได้พบว่าสอดคล้องกับโมเลกุลที่เป็นเป้าหมาย (*m/z* found. 292.9; calcd. for M.H⁺ = 293.3) (แผนภาพ 3.5)



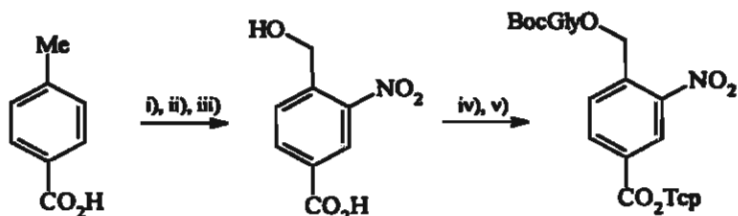
แผนภาพ 3.5 แสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน โดยใช้ตัวเชื่อม HMBA

ในขั้นตอนต่อไปเมื่อให้ 4-คาร์บอกซีฟีนิลโบกัวไนด์ที่อยู่บนเรซินนี้ทำปฏิกิริยากับอะซิโคนในเมทานอลโดยมีกรดไฮโดรคลอริกและไตรเอทิลออร์โทอะซิเตดอยู่ด้วยดังวิธีการที่ใช้ในการสังเคราะห์ในวัฏภาคสารละลายพบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นจริงได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน (VII) (*m/z* found. 333.1; calcd. for M.H⁺ = 333.4) อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาข้างเคียง 2 ปฏิกิริยาที่สำคัญคือ 1) การหลุดออกของผลิตภัณฑ์จากเรซินก่อนถึงขั้นตอนสุดท้ายเนื่องจากเกิดการไฮโดรไลต์ของตัวเชื่อม HMBA และ 2) การเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ได้เป็นไอโซเมอร์ (VIII)

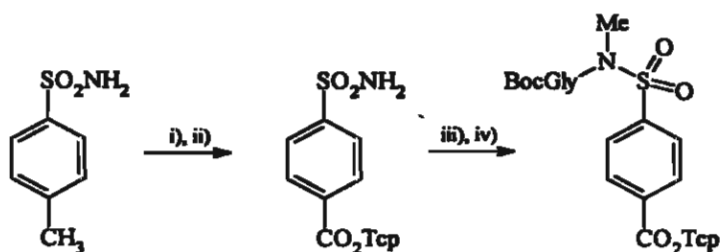


เนื่องจากปัญหาจาก reproducibility ของปฏิกิริยา และการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะต้องผ่านการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากวัฏภาคของแข็งก่อนการวิเคราะห์ประกอบกับวัฏภาคของแข็งที่ใช้ (Tentagel resin) มีราคาค่อนข้างสูง จึงพยายามหาแนวทางที่จะศึกษาปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคการสังเคราะห์โดยใช้โพลีเอทิลีนไกลคอล โมโนเมทิลอีเทอร์ (PEG-OMe) เพื่อเป็นกรณีศึกษาแทน เนื่องจากสามารถวิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาโดยเทคนิค NMR ได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านการแยกผลิตภัณฑ์ออก และคาดว่าเมื่อได้

ภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงสามารถกลับไปใช้เทคนิคการสังเคราะห์บนวิญญากาศของแข็งได้ทันที เนื่องจากโครงสร้างของ side chain ของ Tentagel resin มีลักษณะใกล้เคียงกับ PEG อยู่แล้ว นอกจากนี้ยังได้พิจารณาตัวเชื่อมอื่นนอกเหนือจาก HMBA ได้แก่ ตัวเชื่อม Nitro-HMBA (photo labile linker) และ ตัวเชื่อม sulfonamide (nucleophile labile linker) ซึ่งขณะนี้ได้สังเคราะห์ตัวเชื่อมทั้งสองได้เป็นผลสำเร็จแล้ว¹⁰ ดังแสดงในแผนภาพ 3.6 และจะได้นำไปศึกษาต่อไป



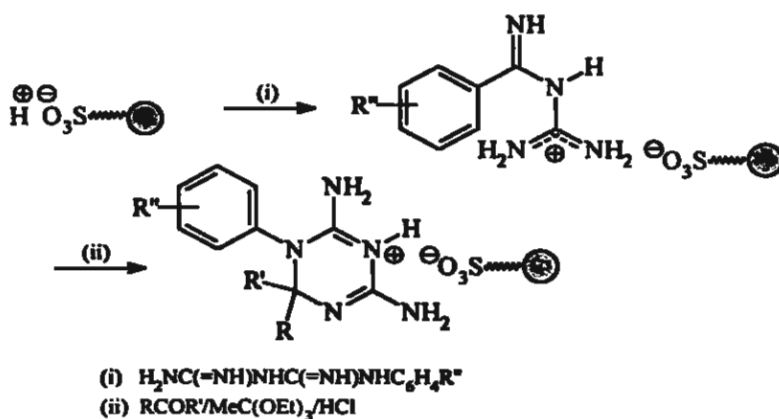
- i) NBS/Bz₂O₂ ii) aq Na₂CO₃, Δ iii) HNO₃/H₂SO₄ iv) TcpOH/DCC
v) BocGlyOH/DCC/DMAP



- i) aq KMnO₄ ii) TcpOH/DCC iii) BocGlyOH/DCC/DMAP iv) CH₃N₂

แผนภาพ 3.6 การสังเคราะห์ตัวเชื่อม Nitro-HMBA และ ตัวเชื่อม sulfonamide

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาอีกแนวทางหนึ่งในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไดไฮโดรไตรอะซีนบนวิญญากาศของแข็งโดยใช้แคโทออนเอ็กซ์เชนจ์เรซินเป็นตัววิญญากาศของแข็งแทนที่จะเป็น Tentagel resin เนื่องจากสารในกลุ่มไบกัวไนด์และไดไฮโดรไตรอะซีนมีสมบัติเป็นเบสจึงน่าจะถูกดูดซับบนแคโทออนเรซินได้ดี หลักการของการสังเคราะห์แสดงได้ดังแผนภาพ 3.7



แผนภาพ 3.7 การใช้แคโทออนเอ็กซ์เชนจ์เรซินเพื่อเป็นวิญญากาศของแข็งในการสังเคราะห์ไดไฮโดรไตรอะซีน

ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไบกัวโนด์และไซโคลกัวนิลสามารถถูกดูดซับโดยแคทไอออนเอ็กซ์เชนจ์เรซินประเภทกรดแก่สองชนิดคือ Dowex-50 และ Amberlyst-15 ได้ดี แต่พบปัญหาในการแยกไซโคลกัวนิลกลับคืนมาจากเรซิน การปรับพีเอชให้เป็นกรดหรือการเพิ่มไอออนิกสเตรนจ์ไม่สามารถชะ (elute) สารประกอบไซโคลกัวนิลออกมาจากเรซินได้ แต่ถ้าใช้สารละลายที่เป็นเบสเช่น 2 M NH_4MeOH ในการชะพบว่าสามารถแยกสารประกอบที่ต้องการออกมาได้บ้าง อย่างไรก็ตามภายใต้ภาวะเช่นนี้อาจก่อให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของไซโคลกัวนิลได้ วิธีนี้จึงยังต้องมีการศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมต่อไปก่อนที่จะนำมาใช้งานจริง

ในเบื้องต้นคาดว่าเมื่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์สามารถปรับปรุงจนได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจแล้วจึงอาจทำการสกรีนเบื้องต้นเพื่อพิสูจน์ว่า 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ที่ต่ออยู่บนวิฎาของแฉ่งนี้ยังคงสามารถจับยึดกับเอ็นไซม์ได้หรือไม่ ตัวอย่างเช่นโดยการให้ทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ที่ผ่านการติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent labelled DHFR) ก่อนที่จะเริ่มสังเคราะห์ไลบรารีบนวิฎาของแฉ่งที่มีความหลากหลายมากขึ้นต่อไป อย่างไรก็ตาม เมื่อปรึกษากับนักวิจัยที่ปรึกษาและคณะผู้วิจัยแล้ว มีความเห็นตรงกันว่า การสังเคราะห์โดยวิฎาของแฉ่งนี้อาจไม่ให้ผลดีเท่ากับในสารละลายเนื่องจากแม้ว่าจะสามารถสังเคราะห์ไลบรารีบนของแฉ่งได้สำเร็จก็ยังคงแก้ปัญหาเรื่องการสกรีนโดยใช้เอ็นไซม์บนวิฎาของแฉ่งโดยตรง ซึ่งจะต้องแน่ใจว่าเอ็นไซม์จะสามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปจับกับโมเลกุลเป้าหมายภายในเมทริกซ์ของวิฎาของแฉ่งนั้นได้ และปัญหาในด้านการตรวจวิเคราะห์สารที่อยู่บนวิฎาของแฉ่งที่ได้หลังจากการสกรีนด้วยเอ็นไซม์แล้วซึ่งมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่สำหรับระดับของเทคโนโลยีที่มีอยู่ในประเทศไทยในขณะนี้ ประกอบกับผลการทดลองที่ได้จากการสังเคราะห์ไลบรารีในสารละลายให้ผลดีกว่าที่คาดหมายไว้มาก ดังนั้นจึงเห็นพ้องต้องกันว่าควรจะหยุดการศึกษากการสังเคราะห์บนวิฎาของแฉ่งไว้เพียงเท่านั้นและมุ่งเน้นการสังเคราะห์และสกรีนไลบรารีในสารละลายแทนต่อไป

เอกสารอ้างอิงบทที่ 3

- ¹ W. E. Rapp, Macro beads as microractors : new solid-phase synthesis methodology, in *Combinatorial Chemistry : Synthesis and Application*, S.R. Wilson and A. W. Czarnik Ed., John Wiley & Sons, New York, 1997.
- ² R. Quarrell, T.D.W. Claridge, G.W. Weaver and G. Lowe, Structure and properties of TentaGel resin beads: Implications for combinatorial library chemistry, *Molecular Diversity*, 1996, 1, 223-232.
- ³ E. J. Modest, Chemical and biological studies on 1,2-dihydro-s-triazines II. Three-component synthesis, *J. Org. Chem.*, 1956, 21, 1-13.
- ⁴ W.L.F. Armarego in *Fused Pyrimidines, Part I Quinazolines*, D. J. Brown Ed., Interscience Publisher, 1967, New York, pp 324-5.
- ⁵ N. Chareonsethakul and N. Saesaengseerung, *Development of synthesis of combinatorial library of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine on solid support*, Senior Project, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 1998
- ⁶ V. Dourtoglou and B. Gross, *O*-benzotriazolyl-*N,N,N,N*-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest, *Synthesis*, 1984, 572.
- ⁷ R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth and D. Gillessen, New Coupling Reagents for Peptide Chemistry, *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30, 1927.
- ⁸ E. Atherton and R.C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis*, A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1989.
- ⁹ E. Atherton, C.J. Logan and R.C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1981, 538.
- ¹⁰ P. Satissarat and P. Sattayavutipong, *Synthesis of Combinatorial Library of Dihydrofolate Reductase Inhibitors*, Senior Project, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 1999.
- ¹¹ M.J. Suto, L.M. Gayo-Fung, M.S.S. Palanki and R. Sullivan, Solution-phase parallel synthesis using ion-exchange resins, *Tetrahedron*, 1998, 54, 4141-4150.

บทที่ 4

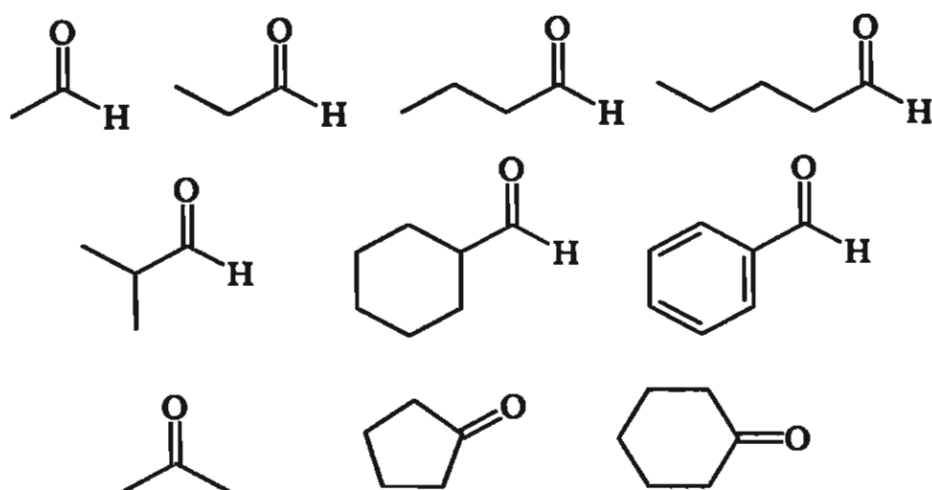
การสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ในวัฏภาคสารละลาย

ในงานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาวิธีการเตรียมคอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ในสองรูปแบบ (format) ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไลบรารีที่เป็นสารบริสุทธิ์แต่ละตัวแยกจากกัน (discrete compound library) และไลบรารีที่เป็นสารผสม (mixture library)

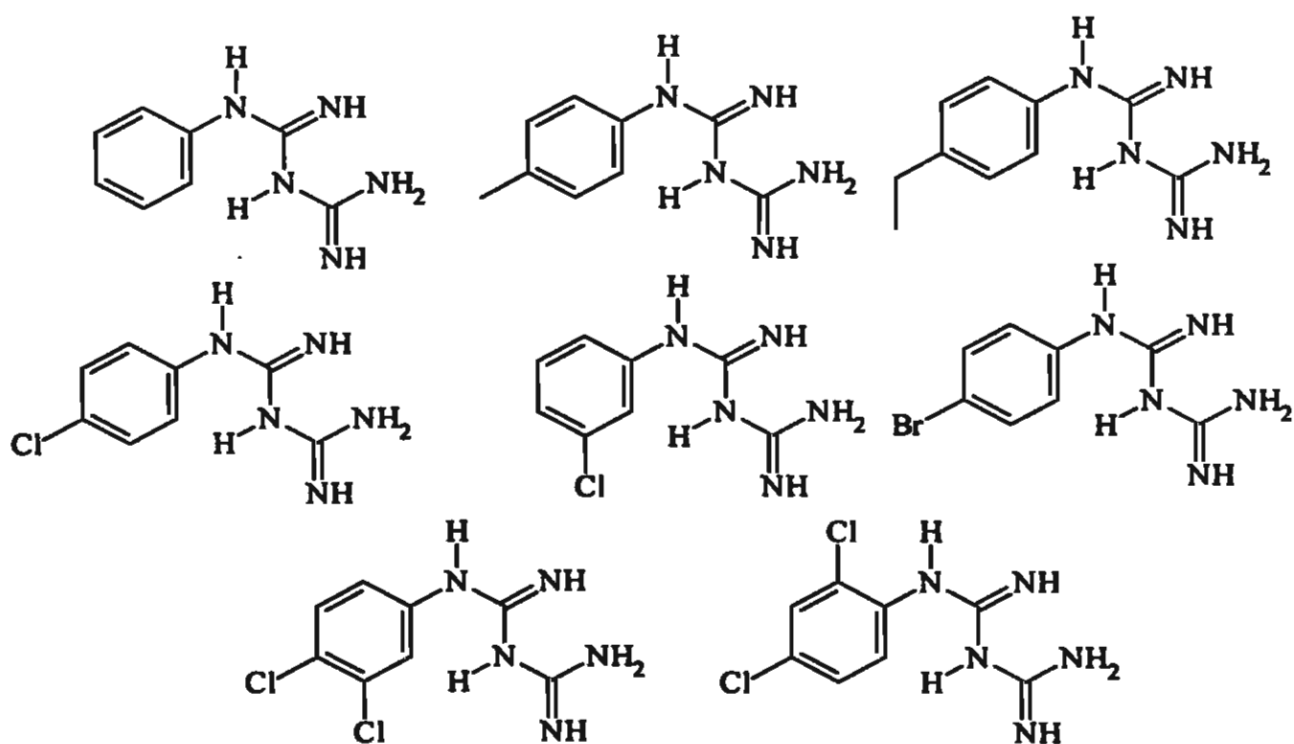
ไลบรารีที่เป็นสารบริสุทธิ์มีประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ (structure-activity relationship) และผลการทดสอบที่ได้จะน่าเชื่อถือมากที่สุดเนื่องจากการสกรีนจะทำกับสารบริสุทธิ์แต่ละตัวจึงลดผลกระทบที่เกิดจากอันตรกิริยาของสารมากกว่า 1 ชนิด (synergistic / antagonistic effect) อย่างไรก็ตาม ข้อเสียที่สำคัญของการเตรียมไลบรารีประเภทนี้คือใช้เวลาในการสังเคราะห์และสกรีนสารแต่ละชนิดนานเนื่องจากสามารถทำได้ครั้งละ 1 สารเท่านั้น นอกจากนี้จะมีเครื่องมือที่สามารถสังเคราะห์สารได้หลายๆสารพร้อมกัน (parallel synthesis apparatus) ขณะนี้กลุ่มวิจัยของ Prof. G. Lowe ณ มหาวิทยาลัยออกซฟอร์ดกำลังดำเนินการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน โดยใช้วิธีการ parallel synthesis อยู่โดยจะเน้นที่หมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C^2 ที่มาจากอัลดีไฮด์ที่มีหมู่แทนที่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกอะโรมาติกอัลดีไฮด์ สำหรับในงานวิจัยนี้จะสังเคราะห์ไลบรารีของสารในกลุ่มเดียวกัน แต่จะเน้นที่หมู่แอลคิลอย่างง่ายที่ตำแหน่ง C^2 ซึ่งมาจากอะลิฟาติกอัลดีไฮด์และอะลิฟาติกคีโตนเป็นหลัก ดังนั้นไลบรารีที่สังเคราะห์จากออกซ์ฟอร์ดและที่สังเคราะห์ในการศึกษานี้จะเสริมกันได้เป็นอย่างดี

ในการศึกษานี้ได้ทำการสังเคราะห์ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ในรูปแบบที่เป็นสารบริสุทธิ์แต่ละตัวแยกจากกันโดยใช้เทคนิค two-component synthesis ดังที่ได้บรรยายในเอกสารอ้างอิง¹ โดยการสังเคราะห์ไลบรารีวิธีนี้จะจำกัดขอบเขตอยู่เฉพาะแคคีโตน และอัลดีไฮด์ ซึ่งทำปฏิกิริยาได้ง่ายภายใต้ภาวะดังกล่าวเท่านั้น ด้วยเหตุนี้จึงเลือกสารประกอบคาร์บอนิลมา 10 ชนิด และสารประกอบโบกัวไนด์อีก 8 ชนิด (แผนภาพ 4.1) มาทำปฏิกิริยากันเพื่อให้ได้ไลบรารีของไดไฮโดรไตรอะซีนที่เป็นสารบริสุทธิ์ซึ่งประกอบด้วยสมาชิก 80 ตัว และได้นำไลบรารีที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดส่งไปทดสอบสมบัติในการเป็นสารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสจาก *Plasmodium falciparum* ทั้งต่อเอ็นไซม์แบบธรรมชาติ (wild-type) และมิวแทนต์เอ็นไซม์ที่คือยาไฮโดรคลอควิน (A16VS108T) ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สารทุกตัวที่สังเคราะห์ขึ้นได้รับการพิสูจน์ยืนยันสูตรโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี (^1H NMR และ mass spectrometry) และสารประกอบใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนก็มีข้อมูล elemental analysis ด้วย รายละเอียดเกี่ยวกับสารที่สังเคราะห์ได้และส่งไปทดสอบบางส่วนรวบรวมอยู่ในหัวข้อ การทดลอง (บทที่ 8)

นอกจากนี้ในกรณีที่คีโตนที่เข้าทำปฏิกิริยามีความกะทัดรัด ยังได้ใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่กล่าวคือการใช้สารกำจัดน้ำ ได้แก่ไตรเอทิลออร์โทอะซิเตตร่วมกับวิธี two-component synthesis ระหว่างเอริลโบกัวไนด์กับคีโตนโดยมีกรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (บทที่ 2) ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีนชนิดอื่นอีกเป็นจำนวนมาก และได้ส่งไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์และฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย *in vitro* ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติเช่นเดียวกัน ตัวอย่างของสารที่สังเคราะห์ได้ส่งไปทดสอบรวบรวมอยู่ในตาราง 4.1



carbonyl compounds



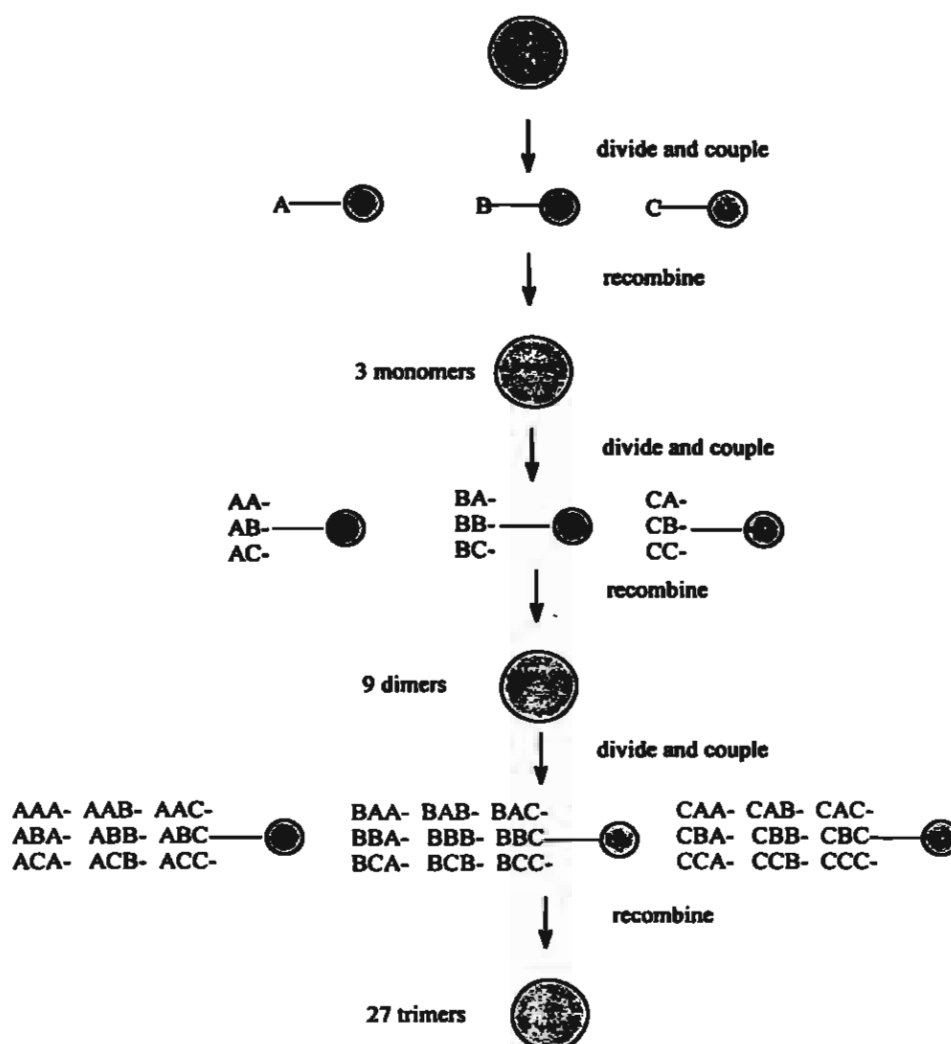
aryl biguanides

แผนภาพ 4.1 โครงสร้างของสารประกอบคาร์บอนิกและเฮริลไบกัวไนด์ที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนในรูปแบบไลบรารีของสารบริสุทธิ์

ตาราง 4.1 อนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน (I) ที่สังเคราะห์ได้ในรูปของสารบริสุทธิ์และส่งไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์

Code	Ar	R ¹	R ²	X
Cyc-3	4-MeC ₆ H ₄ -	Me	Et	Cl
Cyc-5		Me	ⁿ Pr	Cl
Cyc-7		Me	ⁱ Pr	Cl
Cyc-12		Et	Et	Cl
Cyc-8		Me	ⁿ Bu	Cl
Cyc-9		Me	ⁱ Bu	Cl
Cyc-16		-(CH ₂) ₅ -		Cl
Cyc-99		Me	ⁿ C ₅ H ₁₁	Cl
Cyc-101		Me	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂ -	Cl
Cyc-15		ⁿ Pr	ⁿ Pr	Cl
Cyc-11		Me	ⁿ C ₆ H ₁₃	Cl
Cyc-14		Et	ⁿ C ₅ H ₁₁	Cl
Cyc-64	4-ClC ₆ H ₄ -	Me	Et	Cl
Cyc-20		H	ⁱ Bu	Cl
Cyc-65		-(CH ₂) ₄ -		Cl
Cyc-66		Me	ⁿ Pr	Cl
Cyc-22		Me	ⁱ Pr	Cl
Cyc-24		Et	Et	Cl
Cyc-67		Me	ⁿ Bu	Cl
Cyc-23		Me	ⁱ Bu	Cl
Cyc-25		-(CH ₂) ₅ -		Cl
Cyc-69		Me	ⁿ C ₅ H ₁₁	Cl
Cyc-68		Me	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂ -	Cl
Cyc-70		ⁿ Pr	ⁿ Pr	Cl
Cyc-71		Me	ⁿ C ₆ H ₁₃	Cl
Cyc-72		Et	ⁿ C ₅ H ₁₁	Cl
Cyc-89	2,4,5-TcpO(CH ₂) ₃ O-	H	2,4,5-TcpO(CH ₂) ₃ OC ₆ H ₄ -	Cl
Cyc-47		H	4-HOC ₆ H ₄ -	Cl
Cyc-52		H	4-MeOC ₆ H ₄ -	Cl
Cyc-90		H	4-HO-,3-MeO-C ₆ H ₃ -	Cl
Cyc-91		H	4-BnOC ₆ H ₄ -	Cl
Cyc-92		H	4-NO ₂ C ₆ H ₄ -	Cl
Cyc-150		H	4-HOCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ -	Cl
Cyc-34 ^a		H	Me	Cl
Cyc-35		Me	Me	Cl
Cyc-196		H	Ph	Cl
Cyc-36	PhCH ₂ O-	H	Me	Cl
Cyc-37		Me	Me	Cl
Cyc-258		H	Ph	Cl
Cyc-38	HO-	Me	Me	Cl
Cyc-178	2-BnOC ₆ H ₄ -	Me	Me	Cl
Cyc-179	3-BnOC ₆ H ₄ -	Me	Me	Cl
Cyc-203		H	Ph	Cl
Cyc-180	4-BnOC ₆ H ₄ -	Me	Me	Cl
Cyc-201	4- ⁿ BuOC ₆ H ₄ -	Me	Me	Cl
Cyc-200		H	Ph	Cl
Cyc-202	3- ⁿ BuOC ₆ H ₄ -	Me	Me	Cl
Cyc-200		H	Ph	Cl
Cyc-205	4- ⁿ BuOC ₆ H ₄ -	Me	Me	Cl
Cyc-204		H	Ph	Cl

^a Tcp = trichlorophenyl



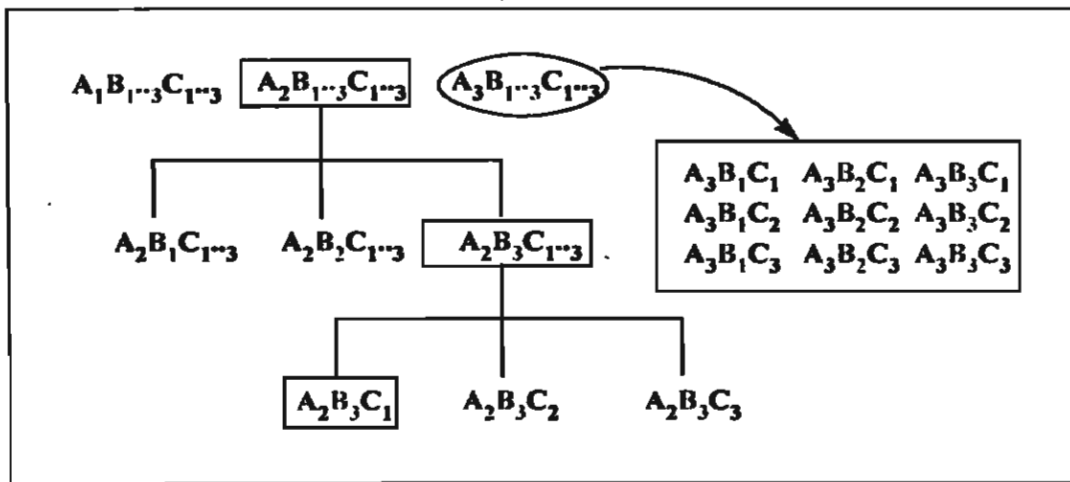
แผนภาพ 4.2 แสดงขั้นตอนของการสร้างคอมบินทอเรียลไลบรารีโดยเทคนิคการสังเคราะห์แบบแยกส่วน

สำหรับการสังเคราะห์ไลบรารีที่เป็นสารผสมจะอาศัยเทคนิคการสังเคราะห์แบบแยกส่วน (split synthesis หรือ split-and-mix synthesis) ซึ่งเป็นวิธีการพื้นฐานในการสังเคราะห์คอมบินทอเรียลไลบรารี² โดยวิธีนี้จะสามารถสังเคราะห์สารประกอบที่มีโครงสร้างหลักตามต้องการออกมาเป็นจำนวนมากพร้อมๆ กันในรูปสารผสมโดยที่หลักการของการสังเคราะห์แบบแยกส่วนสามารถสรุปได้ดังแผนภาพ 4.2

หลักการของวิธีการสังเคราะห์แบบแยกส่วนคือการสังเคราะห์โมเลกุลที่สนใจโดยอาศัยวัฏภาคของแข็ง ที่มีขนาดสม่ำเสมอและมีความจุเท่าๆ กันจำนวนหนึ่ง นำมาทำปฏิกิริยาควบคู่กับหน่วยโครงสร้างแรกชนิดต่างๆ เมื่อเสร็จแล้วจึงนำมารวมกัน และแยกออกเป็นส่วนๆ ใหม่ เพื่อที่จะนำไปทำปฏิกิริยาควบคู่กับหน่วยโครงสร้างที่สองชนิดต่างๆ ต่อเช่นเดิม เมื่อทำเช่นนี้ผ่านไป n รอบจำนวนของโมเลกุลที่จะได้ทั้งหมดก็จะเป็น x^n เมื่อ x คือจำนวนชนิดของหน่วยโครงสร้างแต่ละแบบที่ใช้ เช่น ในเปปไทด์ จะมีโมโนเมอร์เป็นกรดอะมิโน 20 ชนิด ดังนั้น ใน pentapeptide library จะมีจำนวน combination ที่เป็นไปได้คือ 20^5 (=3,200,000) combination และใน hexapeptide library คือ 20^6 (=64,000,000) จะเห็นได้ว่าเทคนิคนี้ช่วยให้สามารถสังเคราะห์

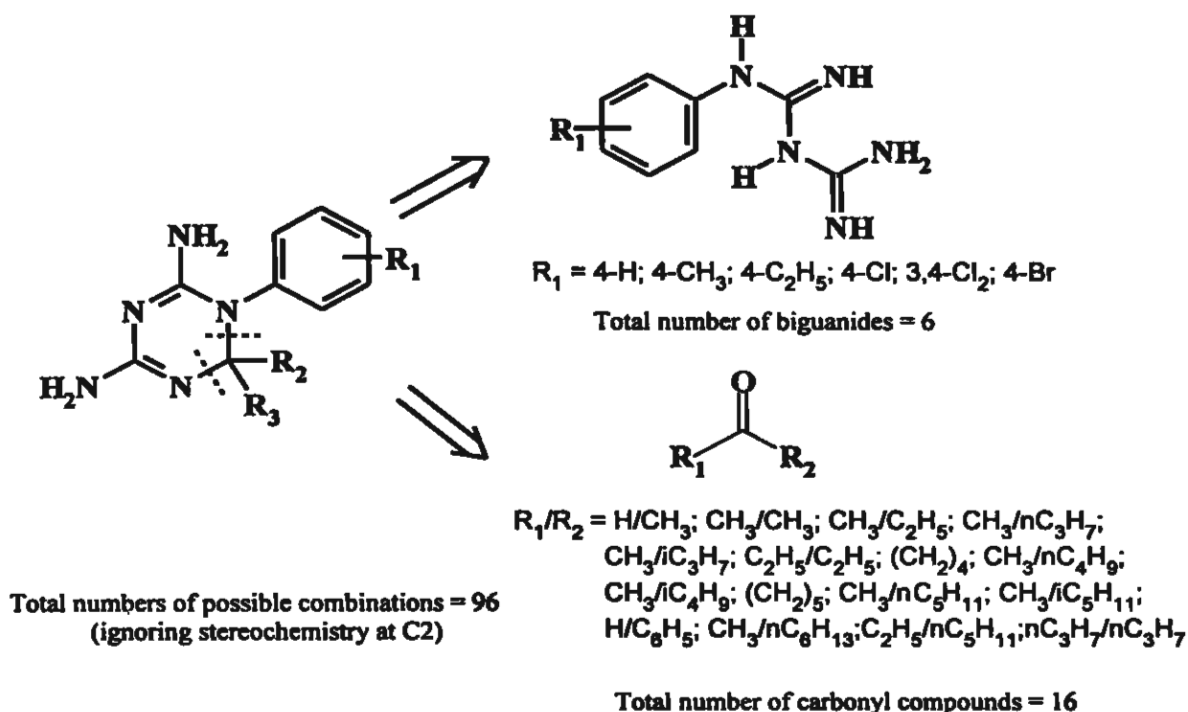
โมเดลที่แตกต่างกันได้เป็นจำนวนมากโดยใช้ขั้นตอนง่ายๆ เพียงไม่กี่ขั้น แม้ในระยะแรกเทคนิคการสังเคราะห์แบบแยกออกแบบมาเพื่อใช้กับการสังเคราะห์คอมบินโทเรียลไลบรารีในวิทยาศาสตร์ของแข็ง แต่ในงานวิจัยนี้จะนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้กับการสังเคราะห์คอมบินโทเรียลไลบรารีในวิทยาศาสตร์ละลาย ซึ่งไม่ค่อยมีตัวอย่างรายงานในเอกสารอ้างอิงมากนัก

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แม้เทคนิคการสังเคราะห์แบบแยกส่วนจะช่วยให้สามารถสังเคราะห์สารผสมเป็นจำนวนมากออกมาได้โดยง่าย การตรวจสอบหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจเพียงหนึ่งหรือสองตัวจากคอมบินโทเรียลไลบรารีในวิทยาศาสตร์ละลายซึ่งเป็นสารผสมที่ประกอบด้วยสารอื่นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันอีกเป็นจำนวนมากที่ไม่แสดงฤทธิ์หรือแสดงฤทธิ์น้อยวิธีการหนึ่งทำได้โดยการใช้เทคนิคที่เรียกว่า "คิคอนไวดูชัน"⁴⁴⁵ ซึ่งมีหลักการดังแสดงในแผนภาพ 4.3



แผนภาพ 4.3

ในการทำคิคอนไวดูชันนั้นจะต้องมีการออกแบบของไลบรารีล่วงหน้าเริ่มต้นจากการแบ่งไลบรารีออกเป็นส่วนย่อยๆ ที่เรียกว่าไลบรารีย่อยหรือสับไลบรารี (sublibrary) ตามจำนวนชนิดของหน่วยโครงสร้าง (building block) ที่ใช้ ยกตัวอย่างกรณีที่มีหน่วยโครงสร้าง 3 หน่วยคือ A, B และ C โดยที่หน่วยโครงสร้างย่อยแต่ละแบบมีได้แบบละ 3 ชนิด ได้แก่ A_1 - A_3 , B_1 - B_3 , และ C_1 - C_3 ซึ่งถ้านำหน่วยโครงสร้างย่อย A, B และ C มาประกอบกันเพื่อให้ได้ผลรวมทั้งหมดที่เป็นไปได้จะได้จำนวนสารที่มีสูตร ABC รวม 27 โครงสร้าง แต่ถ้าใช้การสังเคราะห์แบบแยกส่วนเพื่อสังเคราะห์คอมบินโทเรียลไลบรารีของ ABC นี้ สิ่งที่ได้จะเป็นของผสมที่ประกอบด้วยสาร 27 ชนิดซึ่งเป็นการยากที่จะตรวจสอบว่าสารใดคือตัวที่ต้องการ แต่ในเทคนิคคิคอนไวดูชันจะมีการสร้างไลบรารีย่อย 3 ไลบรารีซึ่งที่มีตำแหน่ง A ผันแปรโดยให้เป็น A_1 , A_2 และ A_3 ตามลำดับและให้ตำแหน่ง B และ C เป็นผลรวมอื่นที่เป็นไปได้ทั้งหมด (B_1 - B_3 และ C_1 - C_3) ถ้าผลการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของไลบรารีย่อยทั้งสามแล้วพบว่าไลบรารีย่อย A_2 มีฤทธิ์มากที่สุดก็กลับไปสร้างไลบรารีย่อยใหม่ โดยกำหนดตำแหน่ง A ให้เป็น A_2 แล้วให้ตำแหน่ง B ผันแปรจาก B_1 , B_2 และ B_3 ส่วนตำแหน่ง C ให้เป็นผลรวมที่เป็นไปได้ทั้งหมด (C_1 - C_3) ถ้าผลการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแสดงว่าไลบรารีย่อย B_3 มีฤทธิ์มากที่สุดก็กลับมาสังเคราะห์ไลบรารีย่อยใหม่ โดยให้ตำแหน่ง A และ B คงที่เป็น A_2B_3 และแปรผันตำแหน่ง C เป็น C_1 - C_3 ซึ่งคราวนี้จะเหลือสารที่ต้องสังเคราะห์เพียง 3 ชนิดและแต่ละชนิดเป็นสารบริสุทธิ์ซึ่งได้แก่ $A_2B_3C_1$, $A_2B_3C_2$ และ $A_2B_3C_3$ ผลการตรวจสอบครั้งสุดท้ายนี้จะทำให้ได้ $A_2B_3C_1$ โมเดลที่มีฤทธิ์มากที่สุดออกมา จะเห็นว่าจำนวนครั้งของการทดสอบจะเหลือเพียง $3+3+3 = 9$ ครั้ง แทนที่จะเป็น 27 ครั้งถ้าต้องตรวจสอบสารทั้งหมดทีละชนิด



แผนภาพ 4.4 แผนการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 4,6-โคอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน

การสกรีนคอมบิเนทอเรียลไลบรารีโดยเทคนิคคัดกรองไวรัสนี้ไม่ได้เป็นหลักประกันว่าจะต้องพบ โมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุดในไลบรารีเสมอไป เนื่องจากในการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของไลบรารีจะกระทำกับของผสม ซึ่งอาจมีฤทธิ์ที่เสริมกันหรือหักล้างกัน (synergistic หรือ antagonistic effect) หรือแม้จะไม่มีอันตรกิริยาเหล่านี้ก็ยังคงอาจตรวจไม่พบสารที่ต้องการเนื่องจากในไลบรารีขอย่อยนั้นอาจมีเพียงสารเดียวที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการผสมกับสารอื่นอีกหลายสิบสารซึ่งไม่มีฤทธิ์เลย ทำให้ตรวจสอบไม่พบฤทธิ์ทางชีวภาพ ในขณะที่อีกไลบรารีขอย่อยหนึ่งเป็นสารผสมที่แต่ละตัวมีฤทธิ์ทางชีวภาพทุกตัว แม้แต่ละตัวจะไม่มีฤทธิ์ที่ดีเป็นพิเศษก็ตาม แต่กลับตรวจพบฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นต้น อย่างไรก็ตามอย่างน้อยที่สุดถ้าเทคนิคคัดกรองไวรัสนี้ตรวจพบโมเลกุลเป้าหมายย่อมเป็นที่ชัดเจนว่าโมเลกุลจะแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการจริง แม้อาจจะพลาดโมเลกุลอื่นที่อาจมีฤทธิ์มากกว่าแต่ตรวจไม่พบเนื่องจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นก็ได้ เทคนิคนี้มีการนำไปใช้อย่างกว้างขวางมากที่สุดเทคนิคหนึ่งรองมาจากเทคนิคการเลือกด้วยเอ็นไซม์บนวิญญาคของแข็ง และเป็นทางเลือกที่มีการใช้มากที่สุดในไม่กี่ทางเลือกที่มีอยู่สำหรับการสกรีนคอมบิเนทอเรียลไลบรารีในวิทยาศาสตร์หลาย และนับได้ว่าเป็นเทคนิคที่ง่าย และประสบความสำเร็จค่อนข้างสูง แม้ว่าทางเลือกใหม่ๆ ก็ได้รับการพัฒนาขึ้นมาอยู่เรื่อยๆ⁶⁷

สำหรับการสังเคราะห์ไลบรารีของอนุพันธ์ของ 4,6-โคอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนในรูปแบบที่เป็นสารผสมในงานวิจัยนี้ได้วางแผนว่าจะสังเคราะห์ไลบรารีขอย่อยโดยให้สารผสมของเอริลโบกัวไนด์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบคาร์บอนิลแต่ละชนิดเพื่อให้ได้ไลบรารีขอย่อยของสารประกอบคาร์บอนิลนั้น (แผนภาพ 4.4) จากนั้นจึงนำไปแต่ละไลบรารีขอย่อยไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และเลือกไลบรารีขอย่อยที่ดีที่สุดออกมาเพื่อสังเคราะห์สมาชิกของไลบรารีขอย่อยนั้นทีละตัวแล้วจึงนำแต่ละตัวไปทดสอบอีกครั้งหนึ่ง เนื่องจากสารในกลุ่มนี้มีตำแหน่งให้เปลี่ยนหมู่แทนที่เพียง 2 ตำแหน่ง การทดสอบครั้งที่สองนี้จึงให้โครงสร้างของสารยับยั้งเอ็นไซม์ที่มีฤทธิ์มากที่สุดออกมาทันที ในขั้นแรกได้เริ่มต้นการศึกษาการสังเคราะห์ไลบรารีสารผสมในรูปแบบ

แบบของไลบรารีย่อยของคีโตน 6 ชนิด (MeCOMe, MeCOEt, MeCOⁱPr, MeCOⁱBu, cyclohexanone และ MeCOⁿC₆H₁₃) โดยแต่ละไลบรารีย่อยเริ่มต้นจากสารผสมที่ประกอบด้วยเอริลไบกัวไนด์ 7 ชนิด (Ar = 4-H, 4-Me, 4-Et, 4-Cl, 4-Br, 2,4-Cl₂ และ 3,4-Cl₂) ในสัดส่วนโมลเท่ากัน โดยใช้วิธีการ two-component condensation โดยมีไตรเอทิลออร์โทอะซิเตตอยู่ด้วย ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสเปกโตรเมตริก (ESI-MS) พบพิกของผลิตภัณฑ์ที่เป็น 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ที่คาดว่าจะพบทุกตัว (M+H⁺) (ตาราง 4.2)

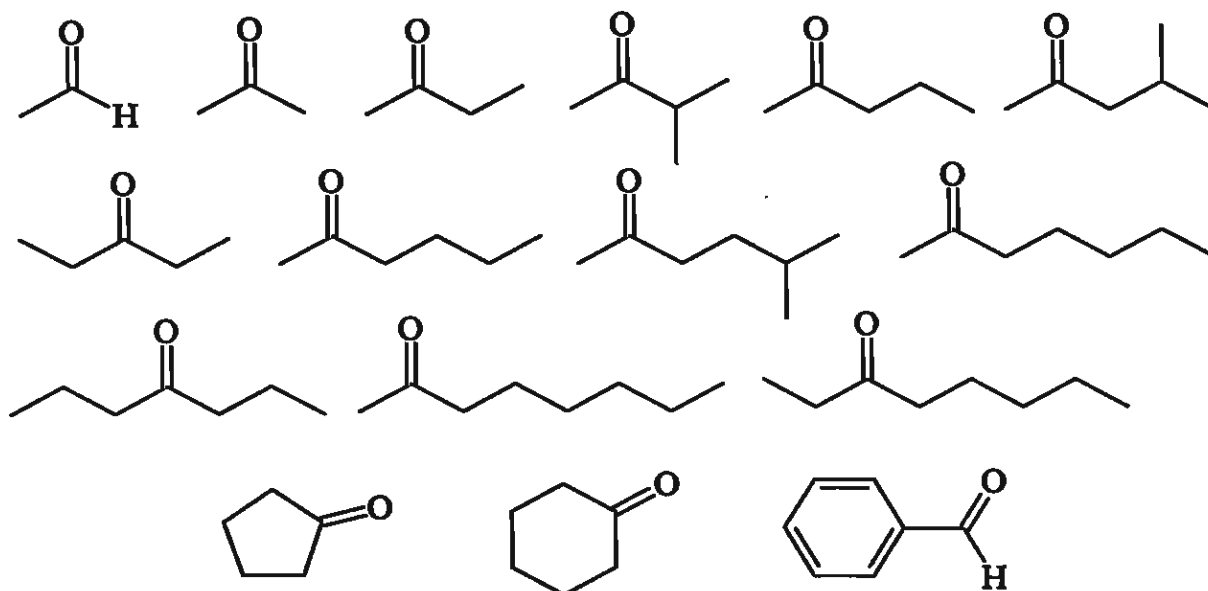
ตาราง 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ไลบรารีย่อยของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสเปกโตรเมตริก

Ketone Sub-Library	R, R'	R''-Ph	Calcd. mass (M.H ⁺)	Mass detected (M.H ⁺)
MeCOMe	-Me; -Me	4-H; 4-Me; 4-Et; 4-Cl; 2,4-Cl ₂ ; 3,4-Cl ₂ ; 4-Br	218, 232, 246, 252, 286, 286, 296	218, 232, 246, 252, 286, 286, 296
MeCOEt	-Me; -Et	4-H; 4-Me; 4-Et; 4-Cl; 2,4-Cl ₂ ; 3,4-Cl ₂ ; 4-Br	232, 246, 260, 266, 300, 300, 310	232, 246, 260, 266, 300, 300, 310
MeCO ⁱ Pr	-Me; - ⁱ C ₃ H ₇	4-H; 4-Me; 4-Et; 4-Cl; 2,4-Cl ₂ ; 3,4-Cl ₂ ; 4-Br	246, 260, 274, 280, 314, 314, 324	246, 260, 274, 280, 314, 314, 324
MeCO ⁱ Bu	-Me; - ⁱ Bu	4-H; 4-Me; 4-Et; 4-Cl; 2,4-Cl ₂ ; 3,4-Cl ₂ ; 4-Br	260, 274, 288, 294, 328, 328, 338	260, 274, 288, 294, 328, 328, 338
Cyclohexanone	-(CH ₂) ₅ -	4-H; 4-Me; 4-Et; 4-Cl; 2,4-Cl ₂ ; 3,4-Cl ₂ ; 4-Br	258, 272, 286, 292, 326, 326, 336	258, 272, 286, 292, 326, 326, 336
MeCO ⁿ C ₆ H ₁₃	-Me; - ⁿ C ₆ H ₁₃	4-H; 4-Me; 4-Et; 4-Cl; 2,4-Cl ₂ ; 3,4-Cl ₂ ; 4-Br	288, 302, 316, 322, 356, 356, 366	288, 302, 316, 322, 356, 356, 366

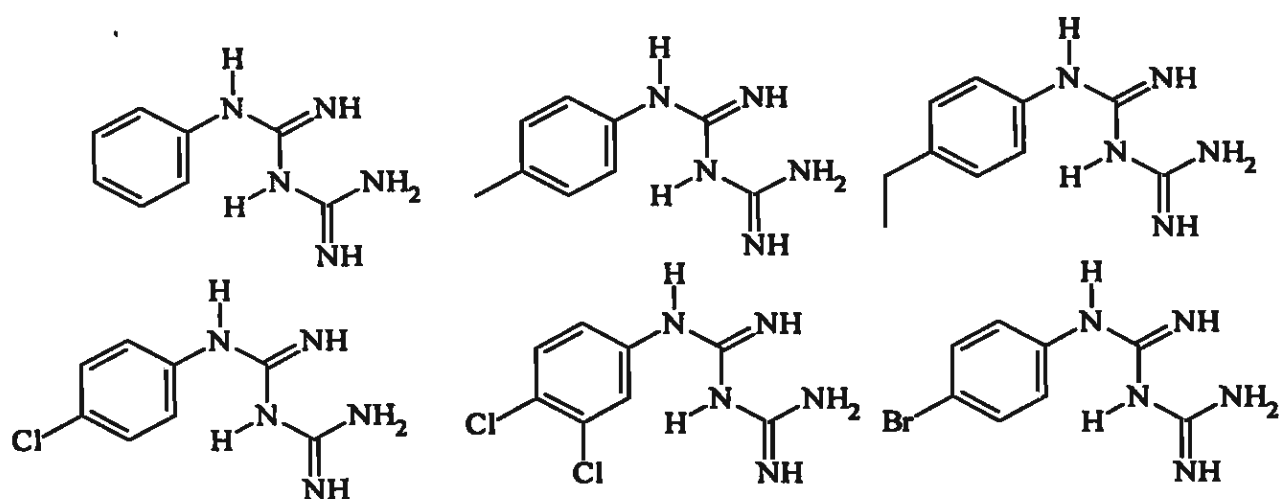
เนื่องจากข้อมูลการวิเคราะห์โดยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตริกไม่สามารถบอกถึงอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์แต่ละตัว และสิ่งเจือปนอื่นที่อาจมีอยู่ จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพของไลบรารีที่เป็นสารผสมโดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยความร่วมมือกับ ดร.อรุณศิริ ชิตางกูร และคณะ (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)* พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารผสมระหว่างอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด ได้แก่ Ar = 4-H, 4-Me, 4-Et, 4-Cl, 4-Br, 2,4-Cl₂ และ 3,4-Cl₂ โดยที่ R¹ และ R² คือ Me และมี counter ion เป็นคลอไรด์ คือคอลัมน์แบบ C-18 และใช้บัฟเฟอร์ไตรเอทิลแอมโมเนียมอะซิเตต 0.1 M / อะซิโตนไนไตรล์เป็นเฟสเคลื่อนที่ ผลการวิเคราะห์ไลบรารีสารผสมที่เตรียมจากสารผสมระหว่างเอริลไบกัวไนด์ (Ar = 4-H, 4-Me, 4-Et, 4-Cl, 4-Br, 2,4-Cl₂ และ 3,4-Cl₂) กับอะซิโตนพบว่ายังไม่บริสุทธิ์ และมีไบกัวไนด์ที่เป็นสารตั้งต้นปะปนอยู่ในปริมาณมาก แม้ว่าผลการวิเคราะห์ไลบรารีสารผสมนี้ด้วย MALDI และ ESI แมสสเปกโตรเมตริกไม่ปรากฏพิกของไบกัวไนด์อยู่เลย ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่ไบกัวไนด์มีความสามารถในการไอออไนซ์ได้น้อยกว่าไดไฮโดรไตรอะซีนนั่นเอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้เทคนิคเดียวในการยืนยันคุณภาพของไลบรารีได้ และ HPLC น่าจะเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการวิเคราะห์คุณภาพของไลบรารีของสารผสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ร่วมกับเทคนิคแมสสเปกโตรเมตริก (LC/MS)

ผลการวิเคราะห์ทำให้ทราบว่าเทคนิคที่ใช้ในการสังเคราะห์ไลบรารีที่ผ่านมายังไม่เหมาะสม จึงได้มีการปรับปรุงภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ไลบรารีเล็กน้อย กล่าวคือใช้สารประกอบคาร์บอนิล 5 อีควิวาเลนต์, กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (50 μL ต่อเอริลไบกัวไนด์ 1 โมล) และโครเอทิลออร์โทอะซิเตด (0.5 mL ต่อเอริลไบกัวไนด์ 1 โมล) ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีเมทานอลเป็นตัวทำละลาย ตามวิธีการที่ดีที่สุดที่ได้สำหรับการสังเคราะห์ไลบรารี (บทที่ 2) และตัด 2,4-ไดคลอโรฟีนิลไบกัวไนด์ออกจากไลบรารีเนื่องจากมันมีหมู่คลอรีนอยู่ที่ตำแหน่ง *ortho*- ซึ่งน่าจะมีผลทำให้ปฏิกิริยาเกิดช้ากว่าไบกัวไนด์ตัวอื่นเนื่องจาก steric effect และผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นยังแสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *ortho*- บนวงแหวนเบนซีนที่ตำแหน่ง N' จะทำให้การจับยึดกับเอ็นไซม์ DHFR ทั้งแบบ wild-type และแบบ mutant ลดลงอีกด้วยจึงไม่จำเป็นต้องนำมารวมไว้ในไลบรารี ผลการวิเคราะห์พบว่าภาวะใหม่นี้ให้ผลดีขึ้นกล่าวคือได้ผลิตภัณฑ์หลักตามต้องการ โดยมีอัตราส่วนฟีกใกล้เคียงกัน โดยมีฟีกเนื่องจากไบกัวไนด์และ rearranged product (II) ปะปนอยู่ในปริมาณเล็กน้อย การที่ได้ผลิตภัณฑ์ในอัตราส่วนเท่ากันแม้ว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาของไบกัวไนด์แต่ละชนิดกับคีโตนแต่ละชนิดจะไม่เท่ากันอธิบายได้ว่าเนื่องจากการสังเคราะห์ได้ใช้คีโตนในปริมาณมากเกินไป และแยกสังเคราะห์เป็นไลบรารีย่อย ซึ่งแต่ละไลบรารีจะมีไบกัวไนด์ 6 ชนิดทำปฏิกิริยากับคีโตนเพียงชนิดเดียว ดังนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาสัมพัทธ์ระหว่างคีโตนกับไบกัวไนด์แต่ละชนิดจึงไม่มีผลต่ออัตราส่วนของผลิตภัณฑ์เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้ว โดยคีโตนที่เกินมาสามารถกำจัดออกได้ง่ายโดยการระเหยและล้างออกด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ไลบรารีที่เป็นสารผสมแล้วจึงเริ่มการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของสารยับยั้งเอ็นไซม์โคโรนาโฟลเตรีคกเทศที่มีหมู่แทนที่ R^1 , R^2 และ R^3 แตกต่างกันโดยเริ่มจากหน่วยโครงสร้าง (building block) สองส่วนได้แก่ เอริลไบกัวไนด์ (R^1) และสารประกอบคาร์บอนิล (R^2 และ R^3) ที่แตกต่างกันดังแสดงในแผนภาพ 4.5

ได้ทดลองใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่ในการสังเคราะห์ไลบรารีที่เป็นสารผสมโดยเลือกสารผสมของเอริลไบกัวไนด์ 6 ชนิด ได้แก่ 4-phenylbiguanide, 4-methylphenylbiguanide, 4-ethylphenylbiguanide, 4-chlorophenylbiguanide, 4-bromophenylbiguanide, 3,4-dichlorophenylbiguanide ซึ่งแต่ละชนิดมีส่วนโดยโมลเท่ากันในรูปของเกลือไฮโดรคลอไรด์ ทำปฏิกิริยากับ 4-heptanone ที่มากเกินไปภายใต้ภาวะที่ดีที่สุดจากการศึกษาครั้งก่อน เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วจึงระเหยเอาคีโตนที่มากเกินไปออก ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเทคนิค HPLC พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการเกิดขึ้นครบทุกชนิดในสัดส่วนโมลที่ใกล้เคียงกัน (พิจารณาจากการเทียบพื้นที่ใต้ฟีกในโครมาโตแกรม โดยถือว่าทุกสารมี molar absorptivity ใกล้เคียงกัน) โดยมีสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นเจือปนอยู่น้อยมาก (แผนภาพ 4.6) การวิเคราะห์โดย ESI-mass spectrometry (แผนภาพ 4.7) ให้ผลที่สอดคล้องกันกล่าวคือพบฟีกเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ต้องการครบทั้ง 6 ตัวและไม่มีฟีกแปลกปลอมอื่นเจือปน ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้นอกจากจะมีประสิทธิภาพสูงในการสังเคราะห์สารในกลุ่ม 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไดอะซีนในสภาพที่เป็นสารบริสุทธิ์แล้วยังน่าจะเหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของสารกลุ่มนี้ในวิฤภาคสารละลายอีกด้วย

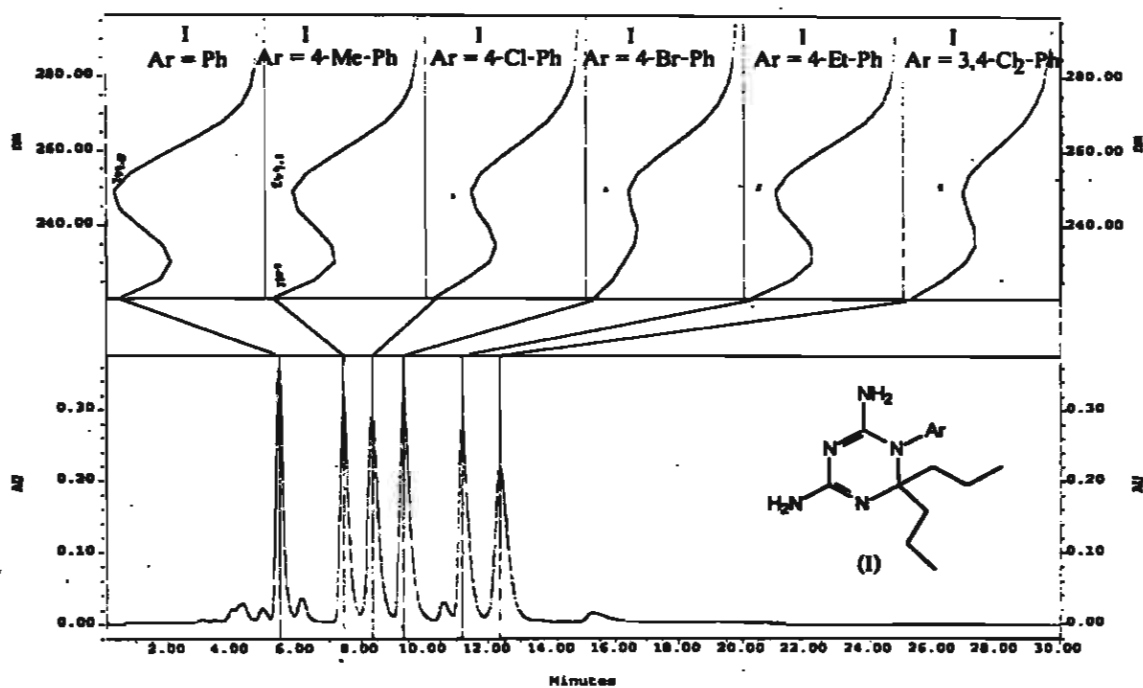


carbonyl compounds

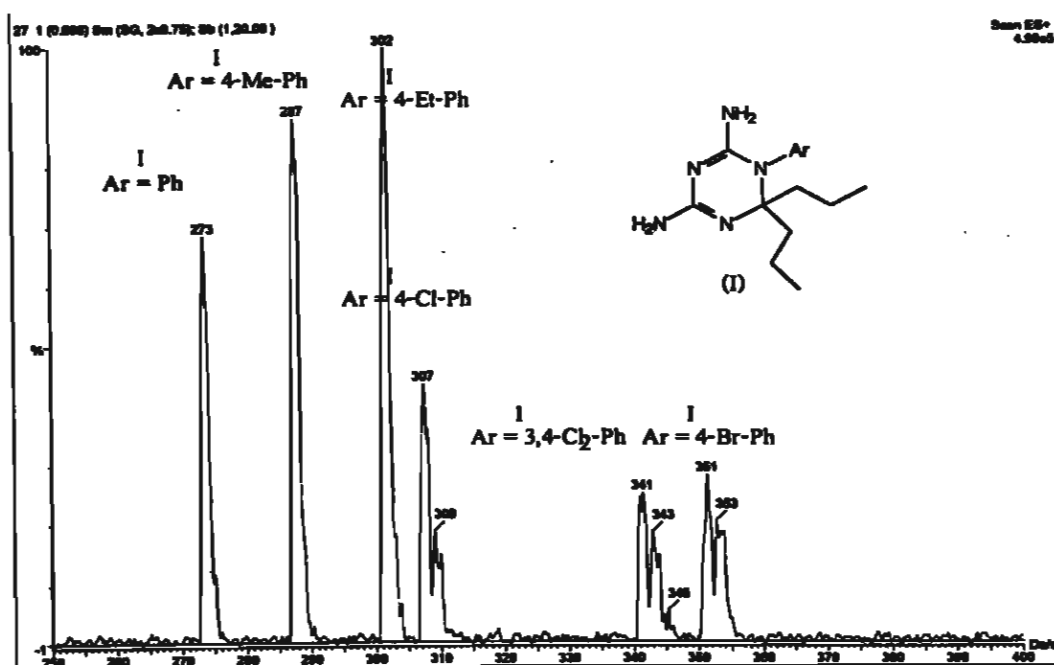


aryl biguanides

แผนภาพ 4.5 โครงสร้างของสารประกอบคาร์บอนิลและเอริลโบกัวไนด์ที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คอมบินโทเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนในรูปแบบไลบรารีของสารผสม

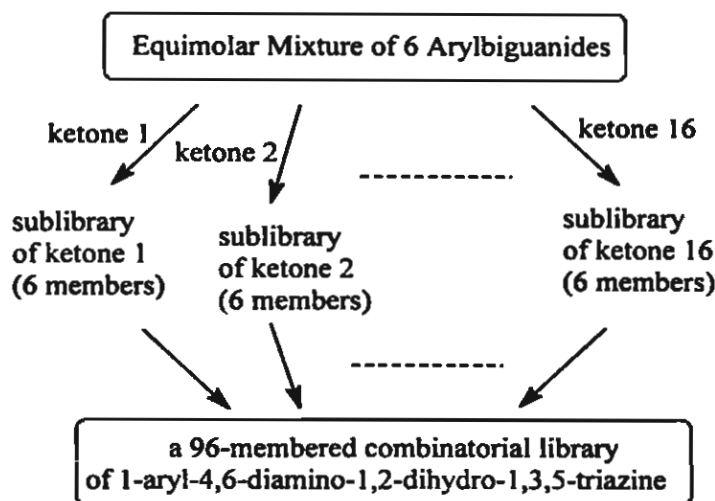


แผนภาพ 4.6 HPLC โครมาโตแกรมและ UV-สเปกตรัมของไลบรารีตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่างสารผสมของโบกัวไนด์ 6 ชนิดและ 4-เอปทาโน



แผนภาพ 4.7 Electrospray Ionisation mass spectrum ของไลบรารีตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่างสารผสมของโบกัวไนด์ 6 ชนิดและ 4-เอปทาโน

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ไลบรารีต้นแบบแล้วจึงได้เริ่มต้นสังเคราะห์ไลบรารีจริงโดยอาศัยหลักการของ split synthesis ดังแสดงในแผนภาพ 4.8



แผนภาพ 4.8 แผนการสังเคราะห์คอมบินาทอเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน

เมื่อแบ่งสารผสมของเอริลไบกัวไนด์ 6 ชนิดเป็น 16 ส่วนเท่าๆ กัน แล้วให้ทำปฏิกิริยากับสารประกอบคาร์บอนิล 16 ชนิด ได้ไลบรารีย่อย 16 ไลบรารี ซึ่งประกอบด้วยสารที่แตกต่างกันทั้งสิ้น $16 \times 6 = 96$ ชนิด (ยังไม่พิจารณาถึงออปติคัลไอโซเมอร์ ซึ่งเกิดจากการมีไครัลคาร์บอนที่ตำแหน่ง C²) ซึ่งผลการวิเคราะห์แต่ละไลบรารีย่อยด้วยเทคนิค HPLC และแมสสเปกโตรเมตรี พบว่ามีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นครบทุกตัวในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน (ดูข้อมูลประกอบในบทที่ 8 : การทดลอง) และมีสิ่งเจือปนอยู่น้อยมาก ยกเว้นไลบรารีที่เกิดจากการใช้ cyclopentanone และ 3-methyl-2-butanone เป็นสารตั้งต้นซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงออกมามากพอสมควร จึงอาจต้องปรับปรุงภาวะของการทำปฏิกิริยาอีกเล็กน้อยก่อนที่จะนำไลบรารีที่ได้ไปสกรีนเพื่อหาสารยับยั้งเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดต่อไป อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับรายงานที่เคยมีมาก่อนเมื่อเร็วๆ นี้เกี่ยวกับการสังเคราะห์คอมบินาทอเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ซึ่งอาศัยวิธีการสังเคราะห์แบบ three-component synthesis ดังเดิม พบว่าวิธีที่ได้จากงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพสูงกว่าและครอบคลุมขอบเขตของหมู่แทนที่ที่หลากหลายกว่ามาก

เอกสารอ้างอิงบทที่ 4

- ¹ E. J. Modest, Chemical and biological studies on 1,2-dihydro-s-triazines II. Three-component synthesis, *J. Org. Chem.*, 1956, **21**, 1-13.
- ² K. Lam, S. Salmon, E. Hersh, V. Hruly, W.M. Kamierski and R. Knapp, A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, *Nature*, 1991, **354**, 82-84.
- ³ a) H.M. Geysen, S.J. Rodda, T.J. Mason, G. Tribbick and P.G. Schooofs, *J. Immunol. Methods*, 1987, **102**, 259; b) H.M. Geysen, S.J. Rodda and T.J. Mason, A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant, *Mol. Immunol.*, 1986, **23**, 709-715.
- ⁴ R.A. Houghten, C. Pinilla, S.E. Blondelle, J.R. Appel, C.T. Dooley and J.H. Cuervo, Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery, *Nature*, 1991, **354**, 84-86.
- ⁵ X.-Y. Xiao and M.P. Nova, Radiofrequency encoding and additional techniques for the structure elucidation of synthetic combinatorial libraries in *Combinatorial Chemistry : Synthesis and Application*, S.R. Wilson and A. W. Czarnik Ed., John Wiley & Sons, New York, 1997
- ⁶ S.C. Berk and K.T. Chapman, Spatially arrayed mixture (SPAM) technology : synthesis of two-dimensionally indexed orthogonal combinatorial libraries, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**, 837-842.
- ⁷ R.H. Griffey, H. An, L.L. Cummins, H.J. Gaus, B. Haly, R. Herrmann and P.D. Cook, Rapid deconvolution of combinatorial libraries using HPLC fractionation, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 4067-4076.
- ⁸ N. Pongchaisirikul and N. Nalumpoon, Analysis of combinatorial libraries of dihydrofolate reductase inhibitors, Senior Project, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 1999.
- ⁹ H.K. Lee and W.K. Chui, Combinatorial Mixture Synthesis and Biological Evaluation of Dihydrophenyl Triazine Antifolates, *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, **7**, 1255-1262.

บทที่ 5

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน

งานส่วนที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ของอนุพันธ์ของไซโคลกัวนิลทั้งที่เป็นสารบริสุทธิ์และไลบรารีกระทำที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติโดยมี ดร.ศุมาลี กำจรวงศ์ไพศาลและคณะเป็นผู้ดำเนินการทดสอบ ส่วนการสกรีนคอมบินทอเรียลไลบรารีโดยเทคนิคการไทเทรตด้วยเอนไซม์ดำเนินการโดย ดร.บงกช ธารชมพู นส.ชวະณี ศิริชัยวัฒน์ และคณะที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีนที่เป็นสารบริสุทธิ์

ผลการทดสอบสมบัติการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสของอนุพันธ์ของไซโคลกัวนิลดังกล่าว ประกอบกับข้อมูลที่ได้จากอนุพันธ์ของไซโคลกัวนิลอื่นที่ส่งเคราะห์จาก University of Oxford แสดงให้เห็นว่าสำหรับหมู่เอริลที่ตำแหน่ง N¹ ที่เหมือนกัน ความเกาะของหมู่อัลคิลที่ตำแหน่ง C² มีอิทธิพลต่อค่า K_i ต่อทั้ง wild type และ A16VS108T มีวแทนต์เอนไซม์อย่างมาก โดยที่ถ้าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C² มีขนาดใหญ่จะทำให้ค่า K_i ต่อ wild type เอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับไซโคลกัวนิล (I, Ar = 4-ClC₆H₄, R₁ = R₂ = Me) ซึ่งมีหมู่เมทิล 2 หมู่ที่ตำแหน่ง C² ที่น่าสนใจมากขึ้นคือค่า K_i ต่อมีวแทนต์เอนไซม์จะยิ่งสูงมากขึ้นไปอีก ดังจะเห็นได้จากอัตราส่วนของ K_i mutant/K_i wild type เอนไซม์ ที่มีค่าสูงกว่ากรณีของไซโคลกัวนิลเอง ซึ่งสอดคล้องกับแบบจำลองโมเลกุลของ Dr. Rastelli (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italy) ที่ได้มีการทำนายไว้ล่วงหน้าว่าการที่มีวแทนต์เอนไซม์คือต่อไซโคลกัวนิลนั้นเกิดจากการที่หมู่เมทิลหมู่หนึ่งในตำแหน่งที่จะเกิด non-bonding interaction กับกรดอะมิโนเวเลินที่ตำแหน่ง 16 (V16) ในมีวแทนต์เอนไซม์ ทำให้โมเลกุลของตัวยับยั้งประเภทนี้ให้ขยับเลื่อนไปจากตำแหน่งที่เหมาะสมในการจับยึดกับเอนไซม์ ซึ่ง interaction นี้จะไม่เกิดขึ้นในกรณีของ wild type เอนไซม์ซึ่งมีอะลาanine ที่ตำแหน่ง 16 (A16) เนื่องจากหมู่เมทิลของอะลาanine มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับหมู่ไฮโดรฟิสิกของเวเลิน ในขณะที่เมื่อแทนที่หมู่เมทิลที่ตำแหน่ง C² หมู่หนึ่งด้วยไฮโดรเจนจะพบว่าค่า K_i ต่อ A16VS108T มีวแทนต์เอนไซม์จะลดลงไปประมาณ 10 เท่าเมื่อเทียบกับไซโคลกัวนิลในขณะที่ค่า K_i ต่อ wild type เอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงมากนักซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานข้างต้น ส่วนอนุพันธ์ที่มีการแทนที่หมู่เมทิลทั้งสองหมู่ด้วยไฮโดรเจน (สารประกอบนี้สังเคราะห์โดย Dr. Rachel Quarrell, Oxford) ดังเช่น entry 2 ในตาราง 5.1 แม้จะให้ K_i ต่อ A16VS108T มีวแทนต์เอนไซม์ที่ดี แต่ก็อาจไม่มีประโยชน์ในการพัฒนาต่อไปเป็นยาเนื่องจากมันมีค่า K_i ต่อ wild-type เอนไซม์ที่ต่ำลงมากด้วย อนุพันธ์ที่มีหมู่แทนที่ R¹ และ R² ที่มีขนาดใหญ่อื่นๆ จะจับยึดกับ DHFR ทั้งแบบ wild-type และ mutant ได้ไม่ดี แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อหมู่ R² เป็นไฮโดรคาร์บอนที่ยาวขึ้นและไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขากลับจับยึดกับเอนไซม์ทั้งแบบ wild type และ A16VS108T มีวแทนต์ได้ดีกว่าไซโคลกัวนิลอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่าสายไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้สามารถเกิด interaction กับเอนไซม์ที่บริเวณอื่นซึ่งอาจห่างจากบริเวณ active site มากก็ได้ จึงเกิด binding energy มาชดเชยกับที่สูญเสียไปเนื่องจาก steric effect ผลงานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์แล้วในวารสาร Bioorganic & Medicinal Chemistry²(ตาราง 5.1 และตาราง 5.2)

ตาราง 5.1 ค่า K_i ของอนุพันธ์ของไซโคลกัวนิลซึ่งมีหมู่แทนที่เพียงหมู่เดียวหรือไม่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C² (entry 2-9) และมีหมู่แทนที่ที่มีความเกาะสูงที่ตำแหน่ง C² (entry 10-18)

Entry	R ¹	R ²	K _i -wt ^b (nM)	Rel. to Cyc	K _i -mut ^c (nM)	Rel. to Cyc	K _i -mut/K _i -wt
1	Me	Me	1.5±0.3 ^d	1.0	1,314±165 ^d	1.0	876
2	H	H	24.4±4.3	16.3	646±78	0.5	26
3	H	Me	4.1±0.0	2.7	127±14	0.1	31
4	H	Et	3.6±0.0	2.4	189±37	0.14	53
5	H	ⁿ C ₃ H ₇	4.6±0.2	3.1	107±32	0.08	23
6	H	ⁿ C ₄ H ₉	3.7±0.1	2.5	167±6.0	0.1	45
7	H	ⁱ C ₃ H ₇	60.5±10.1	40.3	1538±345	1.2	25
8	H	ⁱ C ₄ H ₉	3838±408	2558	82721±9888	63	22
9	H	Ph	4.1±0.3	2.7	62.7±1.4	0.048	15
10	Me	ⁿ C ₃ H ₇	3.5±0.4	2.3	9,229±547	7.0	2637
11	Me	ⁿ C ₄ H ₉	1.8±0.2	1.2	4,217±390	3.2	2343
12	Me	ⁿ C ₅ H ₁₁	1.2±0.1	0.8	3,594±446	2.7	2995
13	Me	ⁿ C ₆ H ₁₃	0.6±0.1	0.4	956±78	0.7	1593
14	Me	ⁱ C ₃ H ₇	36.5±4.1	24.3	44,791±5,872	34.1	1227
15	Me	ⁱ C ₄ H ₉	4.7±1.9	3.1	15,263±986	11.6	3247
16	Me	ⁱ C ₅ H ₁₁	1.7±0.1	1.1	5,755±545	4.4	3385
17	Et	Et	7.7±1.2	5.1	16,151±3,599	12.3	2098
18	Et	ⁿ C ₅ H ₁₁	19.3±3.8	12.9	18,041±1905	13.7	935

^a Ar = 4-ClC₆H₄-

^b wild type *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase

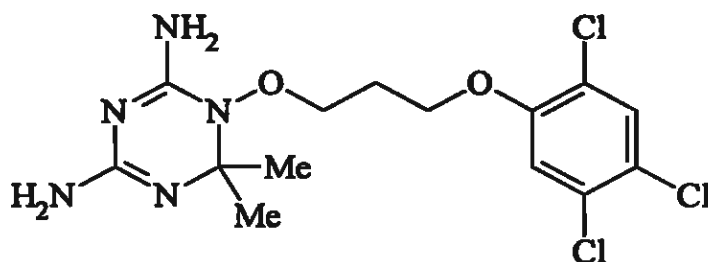
^c A16V+S108T mutant *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase

^d data from Sirawaraporn et al (1997)³

ตาราง 5.2 เปรียบเทียบค่า K_i ของอนุพันธ์ของไซโคลกัวนิลซึ่งมีหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง C² หนึ่งและสองหมู่

Ar	R ¹	R ²	K _i -wt (nM)	Rel. to Cyc	K _i -mut (nM)	Rel. to Cyc	K _i -mut / K _i -wt
2,4,5-trichlorophenoxy-propyloxy (WR99210)	Me	Me	0.5±0.1	0.33	2.4±0.4	0.0018	4.8
2,4,5-trichlorophenoxy-propyloxy	H	Me	0.3±0.0	0.2	0.8±0.1	0.0006	2.7
2,4,5-trichlorophenoxy-propyloxy	H	Ph	0.6±0.0	0.4	2.2±0.4	0.002	3.7
4-BrC ₆ H ₄ -	Me	Me	1.1±0.2	0.73	1948±366	1.48	1771
4-BrC ₆ H ₄ -	H	Me	5.7±0.5	3.8	202±17	0.2	35
4-BrC ₆ H ₄ -	H	Ph	2.9±1.2	1.9	90±11	0.07	31
4-MeC ₆ H ₄ -	Me	Me	1.8±0.2	1.2	1584±210	1.21	880
4-MeC ₆ H ₄ -	H	Me	23.4±1.9	15.6	186±22	0.1	8.0
4-MeC ₆ H ₄ -	H	Ph	7.7±2.0	5.1	170±14	0.13	22
3-ClC ₆ H ₄ -	Me	Me	3.7±0.6	2.5	340±28	0.3	92
3-ClC ₆ H ₄ -	H	Me	10.2±0.6	6.8	38.7±2.9	0.03	3.8
3-ClC ₆ H ₄ -	H	Ph	11.7±2.5	7.8	10±7	0.008	0.9
3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	Me	Me	1.1±0.4	0.73	130.7±13.4	0.1	119
3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	H	Me	1.4±0.2	0.9	17.8±0.8	0.014	12.7
3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	H	Ph	1.6±0.2	1.1	11±1.8	0.008	6.9

สิ่งที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือถ้าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C^2 หมู่หนึ่งเป็นไฮโดรเจนและอีกหมู่หนึ่งเป็นวงแหวนเบนซีน จะทำให้ K_i ของมันคือ A16VS108T มีวแทนต์เอ็นไซม์ลดลงมา 1-2 order of magnitude เมื่อเทียบกับเมื่อหมู่แทนที่นั้นเป็นหมู่ฮัลคิด (ตาราง 5.1, entry 9) และถ้ามีการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่บนวงแหวนเบนซีนให้เหมาะสม จะพบว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้บางตัวมี K_i ต่อมิวแทนต์ในระดับที่ใกล้เคียงกับ wild-type enzyme โดยที่ความสามารถในการยับยั้ง wild-type enzyme ก็ไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปมากนักด้วย จึงเชื่อว่า 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C^2 เป็นวงแหวนเบนซีน น่าจะเป็น lead compound ที่ดีกว่าพวกที่มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ฮัลคิดอย่างง่ายในการหาสารยับยั้งเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพทั้งต่อ wild type และ A16VS108T มีวแทนต์เอ็นไซม์



แผนภาพ 5.1 แสดงโครงสร้างของ WR99210

ในขณะเดียวกันก็ได้มีการศึกษาอิทธิพลของหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง N^1 ควบคู่กันไปด้วย (ตาราง 5.2) ผลการศึกษาความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งเอ็นไซม์พบว่าเมื่อวงแหวนเบนซีนที่ตำแหน่ง N^1 มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *ortho* จะทำให้ K_i ต่ทั้ง wild type และ A16VS108T มีวแทนต์เอ็นไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมาก ในขณะที่หมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *meta* มีแนวโน้มที่จะทำให้ค่า K_i ต่ wild type เอ็นไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่จะลดค่า K_i ต่ A16VS108T มีวแทนต์เอ็นไซม์ลงอย่างมาก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *meta* มีส่วนช่วยในการจับยึดของสารยับยั้งกับ A16VS108T มีวแทนต์เอ็นไซม์ ในขณะที่หมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *para* ดูเหมือนจะมีความจำเป็นในการช่วยในการจับยึดกับเอ็นไซม์แบบ wild type ข้อมูลสนับสนุนคือ 3,4-dichloro analogue ของไฮโคลกัวนิล (I, Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃, R¹ = R² = Me) สามารถจับกับเอ็นไซม์แบบ wild type ได้ดีกว่า *meta*-Cl analogue (I, Ar = 3-ClC₆H₄, R¹ = R² = Me) กล่าวคือ มี K_i เป็น 1.1 และ 3.7 nM ตามลำดับ และจับกับ A16VS108T มีวแทนต์เอ็นไซม์ได้ดีกว่าไฮโคลกัวนิลซึ่งมีหมู่คลอไรด์ที่ตำแหน่ง *para* อย่างเดียว กล่าวคือมี K_i เป็น 130.7 และ 1313.7 nM ตามลำดับ หมู่แทนที่ที่มีสภาพขั้ว (polarity) สูง เช่น hydroxy, carboxy, acetamido ที่ตำแหน่ง *para* มีแนวโน้มที่จะลดความสามารถในการจับยึดกับเอ็นไซม์ลง นอกจากนี้ยังพบอีกว่าถ้า N^1 เป็นหมู่แทนที่ที่ยืดหยุ่นได้ (flexible side chain) ดังที่พบใน WR99210 (I, Ar = 2,4,5-Cl₃C₆H₂OCH₂CH₂CH₂O-, R¹ = R² = Me) (แผนภาพ 5.1) จะเป็นตัวยับยั้งเอ็นไซม์ทั้งแบบ wild type และ A16VS108T มีวแทนต์เอ็นไซม์ได้ดีกว่าไฮโคลกัวนิลมาก แม้ว่าที่ตำแหน่ง C^2 จะเป็นหมู่ gem-dimethyl ก็ตาม แสดงว่าในกรณีของอนุพันธ์ที่มีหมู่แทนที่ที่ยืดหยุ่นได้ที่ตำแหน่ง C^2 นี้วงแหวนไตรอะซีนอาจอยู่ในคอนฟอร์เมชันที่แตกต่างจากเมื่อมีหมู่แทนที่เป็นวงแหวนเบนซีนซึ่งค่อนข้างไม่ยืดหยุ่น ผลที่ตามมาคือหมู่ gem-dimethyl ที่ตำแหน่ง C^2 อาจอยู่ในตำแหน่งที่ห่างจากเวกเตอร์ที่ตำแหน่ง 16 จึงไม่เกิดอันตรกิริยาที่ทำให้การจับยึดของตัวยับยั้งเอ็นไซม์ที่เป็นสาเหตุให้การจับยึดกับ A16VS108T มีวแทนต์เอ็นไซม์ลดลง ผลที่ตามมาคืออนุพันธ์ของ WR99210 ซึ่งหมู่เมทิลหนึ่งหมู่ถูกแทนที่ด้วยไฮโดรเจน (I, Ar = 2,4,5-Cl₃C₆H₂OCH₂CH₂CH₂O-, R¹ = H; R² = Me) ซึ่งเป็นสารใหม่ที่สังเคราะห์ได้ในงานวิจัยนี้จึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์แบบ A16VS108T มีวแทนต์เอ็นไซม์ได้ดีกว่า WR99210 เพียงไม่มากนักผลงานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Medicinal Chemistry แล้ว⁴

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบประเภท 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ในรูปที่เป็นไลบรารีของสารบริสุทธิ์แต่ละตัวแยกจากกัน ทำให้คณะผู้วิจัยเข้าใจถึงกลไกในการค้ำยาของมิวแทนต์เอ็นไซม์ และสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการออกแบบโมเลกุลใหม่ๆ ซึ่งคาดว่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์ที่ค้ำยต่อไปในอนาคต อนึ่ง สารที่สังเคราะห์ได้จากงานวิจัยนี้บางตัวมีศักยภาพสูงในการนำไปศึกษาฤทธิ์ด้านเชื่อมลาเรียทั้ง *in vitro* และ *in vivo* และการศึกษาทางพิษวิทยาเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาต่อไป งานส่วนนี้กำลังอยู่ในระหว่างดำเนินการ

5.2 การสกรีนคอมบิเนทอเรียลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนโดยเทคนิคคิกคอนไวลูชัน

ดังที่กล่าวมาข้างต้น การสกรีนไลบรารีโดยเทคนิคคิกคอนไวลูชันจะต้องมีการออกแบบของไลบรารีล่วงหน้าโดยแบ่งไลบรารีออกเป็นส่วนย่อยๆ (sublibrary) ตามชนิดของหน่วยโครงสร้างที่ใช้ ในที่นี่มีไลบรารีทั้งหมด 16 ไลบรารีย่อยของสารประกอบคาร์บอนิล 16 ชนิด โดยที่แต่ละไลบรารีย่อยมีสมาชิก 6 ตัว ผลการสกรีนไลบรารีย่อยด้วยเอ็นไซม์ไคไฮโดรโฟลตริดักเทสทั้งแบบ wild-type และ A16VS108T มิวแทนต์เป็นดังแสดงในตาราง 5.3

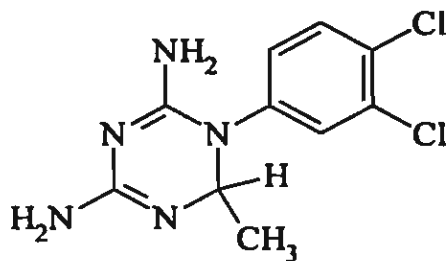
ตาราง 5.3 ผลการสกรีนไลบรารีย่อยของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ต่อเอ็นไซม์ไคไฮโดรโฟลตริดักเทส (รอบที่ 1)

Sublibrary ID	Ar	R ¹	R ²	K _i wt (nM)	K _i A16VS108T (nM)
cycloguanil	4-ClC ₆ H ₄ -	-Me	-Me	1.5±0.3	1313.7±164.5
CL-1	mixture of 4-H-C ₆ H ₄ - 4-ClC ₆ H ₄ - 4-BrC ₆ H ₄ - 4-MeC ₆ H ₄ - 4-EtC ₆ H ₄ - 3,4-Cl ₂ C ₆ H ₄ -	- ⁿ C ₃ H ₇	- ⁿ C ₃ H ₇	470.1±31.7	39546.2± 10152.6
CL-2		-Me	- ¹ C ₃ H ₇	36.4±1.4	27657.9±2096.2
CL-3		-Me	- ⁿ C ₆ H ₁₃	1.6±0.2	315.9±60.4
CL-4		-Me	-Me	2.4±0.0	1428.1±286.3
CL-5		-Me	- ⁿ C ₃ H ₇	6.1±0.6	3498.8±601.4
CL-6		-Me	-(CH ₂) ₂ CH(Me) ₂	3.9±0.3	1104.1±0.3
CL-7		-Et	- ⁿ C ₅ H ₁₁	42.9±2.6	12232.9±437.8
CL-8		-Me	- ⁿ C ₅ H ₁₁	4.9±0.4	1527.9±181.3
CL-9		-Me	-CH ₂ CH(Me) ₂	5.0±0.3	4301.2±246.0
CL-10		-H	-Ph	6.4±1.0	146.3±44.5
CL-11		-Et	-Et	11.4±1.7	5664±352.2
CL-12		-(CH ₂) ₅ -		414.2±57.6	5593.5±867.3
CL-13		-Me	- ⁿ C ₄ H ₉	5.5±0.3	2015.8±120.4
CL-14		-Me	-Et	4.0±0.5	1938.9±224.6
CL-15		-H	-Me	2.5±0.2	35.5±7.3
CL-16		-(CH ₂) ₄ -		19.4±3.2	667.6±98.5

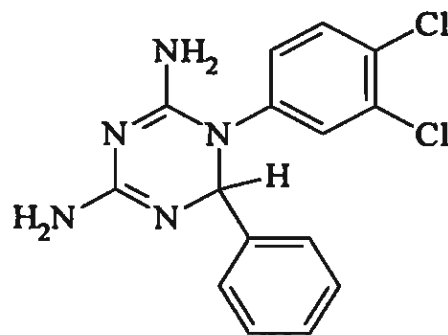
จากผลการทดลองพบว่าไลบรารีย่อยที่ให้ค่า K_i ต่อเอ็นไซม์ทั้งแบบ wild-type และแบบ A16VS108T มีวแทนต์ต่ำสุด 3 อันดับแรกได้แก่ไลบรารีย่อยของอะเซตติลไฮด์ (CL-15 : K_i wt 2.5 ± 0.2 ; K_i mut 35.5 ± 7.3 nM) เบนซาลดีไฮด์ (CL-10 : K_i wt 6.4 ± 1.0 ; K_i mut 146.3 ± 44.5 nM) และ 2-ออกทานโนน (CL-3 : K_i wt 1.6 ± 0.2 ; K_i mut 315.9 ± 60.4 nM) จึงได้ทำการสังเคราะห์สมาชิกของแต่ละไลบรารีย่อยรวม 18 สารเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพกัน ผลการทดลองเป็นดังแสดงในตาราง 5.4

ตาราง 5.4 แสดงผลการทดสอบ K_i ต่อเอ็นไซม์แบบ wild-type และ A16VS108T มีวแทนต์ของแต่ละสมาชิกของไลบรารีย่อยที่ให้ค่า K_i ต่ำสุด 3 อันดับแรก

Sublibrary ID	R ¹	R ²	Ar	K_i wt (nM)	K_i A16VS108T (nM)
CL-15	-H	-Me	C ₆ H ₅ -	1.5 ± 0.3	1313.7 ± 164.5
			4-ClC ₆ H ₄ -	4.1 ± 0.0	126.7 ± 13.6
			4-BrC ₆ H ₄ -	5.7 ± 0.5	201.7 ± 16.9
			4-MeC ₆ H ₄ -	23.4 ± 1.9	185.5 ± 22.4
			4-EtC ₆ H ₄ -	11.0 ± 3.0	322.1 ± 56.4
			3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	1.4 ± 0.2	17.8 ± 0.8
CL-10	-H	-Ph	C ₆ H ₅ -	49.1 ± 3.5	61.8 ± 15.6
			4-ClC ₆ H ₄ -	4.5 ± 0.2	49.3 ± 3.3
			4-BrC ₆ H ₄ -	2.9 ± 1.2	90.3 ± 11.4
			4-MeC ₆ H ₄ -	7.7 ± 2.2	170.4 ± 13.8
			4-EtC ₆ H ₄ -	12.1 ± 2.3	86.6 ± 10.8
			3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	1.6 ± 0.2	11.0 ± 1.8
CL-3	-Me	- ⁿ C ₆ H ₁₃	C ₆ H ₅ -	1.5 ± 0.8	180.2 ± 12.6
			4-ClC ₆ H ₄ -	0.7 ± 0.5	563.6 ± 150.7
			4-BrC ₆ H ₄ -	3.0 ± 1.8	2186.3 ± 338.2
			4-MeC ₆ H ₄ -	0.8 ± 0.6	823.1 ± 154.8
			4-EtC ₆ H ₄ -	1.1 ± 0.4	551.9 ± 39.4
			3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	1.4 ± 0.2	106.8 ± 32.2



(IX)



(X)

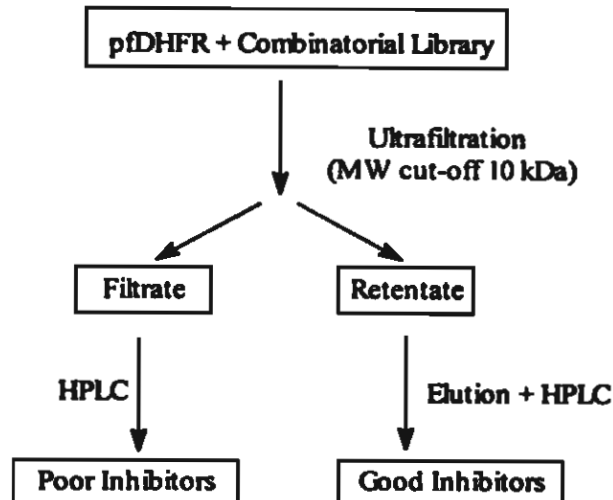
จากตาราง 5.4 พบว่าอนุพันธ์ของไซโคลกัวนิล (IX) และ (X) มีค่า K_i ต่อ wild-type และ A16VS108T มิวแทนต์เอ็นไซม์ต่ำที่สุด เป็นที่น่าสังเกตว่าสารทั้งสองมีหมู่ 3-chloro substituent และมีหมู่แทนที่เพียงหมู่เดียวที่ตำแหน่ง C^2 โดยที่อีกหมู่หนึ่งเป็นไฮโดรเจน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการสกรีนไลบรารีของสารบริสุทธิ์ (หัวข้อ 5.1)

ในอดีตได้มีผู้ค้นพบและศึกษา chlorocycloguanil ซึ่งเป็นสารประกอบที่คล้ายคลึงกับ (IX) และ (X) แต่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C^2 เป็นหมู่ gem-dimethyl เช่นเดียวกับไซโคลกัวนิลมาก่อนแล้วว่ามันมีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียได้ดีกว่าไซโคลกัวนิล แต่ก็มีความเป็นพิษสูงกว่าด้วยจึงมีที่ใช้ค่อนข้างจำกัด ดังนั้นการจะนำ (IX) และ (X) ไปพัฒนาต่อเป็นยาจึงต้องพิจารณาในแง่ของความเป็นพิษด้วยซึ่งต้องมีการทดสอบต่อไป

จากงานวิจัยที่ผ่านมาจึงสามารถสรุปได้ว่าการสังเคราะห์แบบแยกส่วนและเทคนิคคิกคอนไวลูชัน สามารถบ่งชี้โมเลกุลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสของ *Plasmodium falciparum* ที่ดีกว่าเดิมโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับมิวแทนต์เอ็นไซม์ จากคอมบินทอรีลไลบรารีที่เป็น สารผสมของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน จำนวน 96 ชนิด ในวิทยาศาสตร์หลาย โดยพบโมเลกุลที่มีสมบัติการจับยึดต่อมิวแทนต์เอ็นไซม์ที่ดีขึ้นมากถึง 2 ชนิดได้แก่ IX (I , $Ar = 3,4-Cl_2C_6H_3-$, $R^1 = H$, $R^2 = Me$) และ (X) (I , $Ar = 3,4-Cl_2C_6H_3-$, $R^1 = H$, $R^2 = Ph$) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง A16VS108T มิวแทนต์เอ็นไซม์อยู่ในช่วง 10-20 นาโนโมลาร์ซึ่งจัดว่าดีกว่าไซโคลกัวนิล (I , $Ar = 4-ClC_6H_4$, $R^1 = H$, $R^2 = Ph$) ซึ่งเป็นยาต้นแบบ ถึงประมาณ 100 เท่าโดยที่ความสามารถในการยับยั้งเอ็นไซม์แบบ wild type ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก อย่างไรก็ตามสารทั้งสองยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอ็นไซม์ทั้งแบบ wild type และ A16VS108T มิวแทนต์ที่ดีกว่าสารในกลุ่ม WR99210 และอนุพันธ์

5.3 แนวทางสกรีนคอมบินทอรีลไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ในวิทยาศาสตร์หลายโดยใช้เทคนิคการเลือกด้วยเอ็นไซม์

การสกรีนหาสมาชิกของคอมบินทอรีลไลบรารีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุด นอกจากการใช้เทคนิคคิกคอนไวลูชันซึ่งเป็นการสกรีนหาไลบรารีย่อยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุดก่อน แล้วจึงสังเคราะห์สมาชิกแต่ละตัวของไลบรารีย่อยนั้นออกมาเพื่อทดสอบอีกครั้งหนึ่งดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ยังมีอีกแนวคิดหนึ่งในการสกรีนคอมบินทอรีลไลบรารีโดยใช้หลักการเลือกด้วยเอ็นไซม์^{6,7} โดยจะใช้วิธีการไทเทรตไลบรารีของสารผสมด้วยเอ็นไซม์ปริมาณที่จำกัด ซึ่งจะทำให้มันจับยึดกับองค์ประกอบของไลบรารีที่จับยึดกับเอ็นไซม์ได้ดีที่สุดออกมาก่อน จากนั้นจึงใช้เทคนิคการกรองผ่านเมมเบรนเพื่อแยกเอ็นไซม์ที่จับยึดกับสารยับยั้งที่ดีที่สุดแล้วออกจากสารยับยั้งที่ไม่ดีเท่าซึ่งยังอยู่ในสารละลาย จากนั้นจึงวิเคราะห์สิ่งที่เหลืออยู่ในสารละลายหรือใช้ denaturing agent ที่เหมาะสมเพื่อชะตัวยับยั้งที่ดีที่สุดออกจากเอ็นไซม์แล้ววิเคราะห์โดยเทคนิคมาตรฐานเช่น HPLC หรือแมสสเปกโตรเมตรีว่าสารนั้นคืออะไร หลักการสกรีนไลบรารีโดยการเลือกด้วยเอ็นไซม์นี้สามารถสรุปได้ดังแผนภาพ 5.2



แผนภาพ 5.2 หลักการสกรีนคอมบินาทอรีไลบรารีโดยการเลือกด้วยเอ็นไซม์

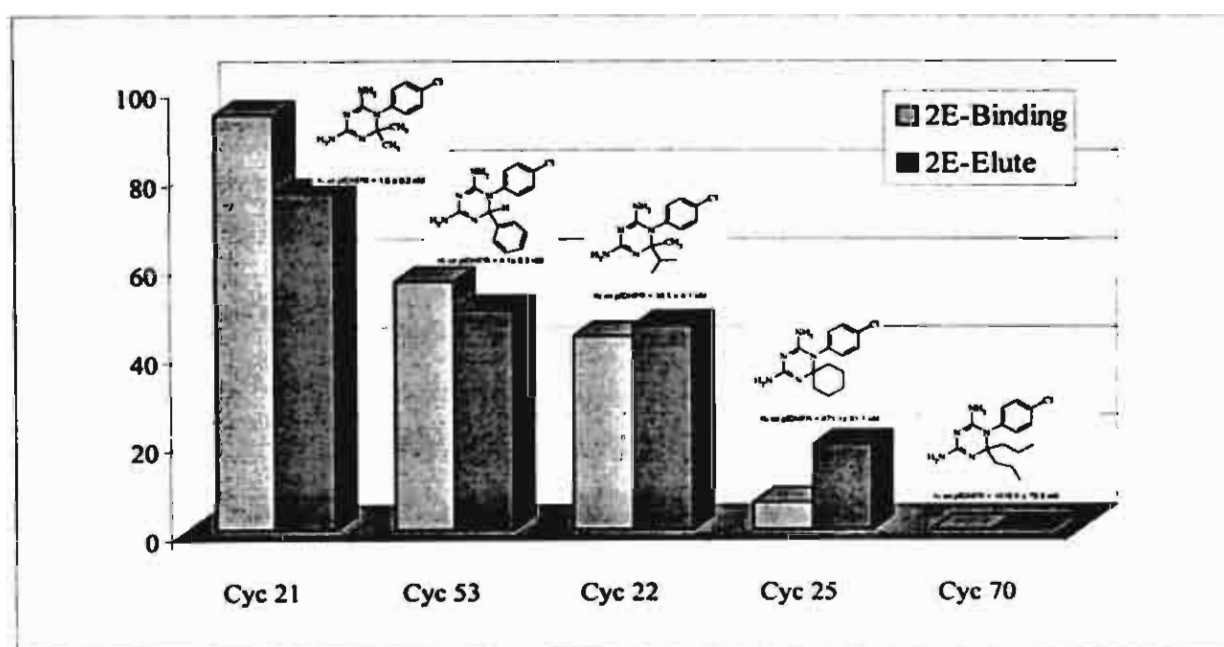
เพื่อพิสูจน์แนวคิดในการสกรีนไลบรารีโดยวิธีนี้ ได้มีการทดลองสร้างแบบจำลองของไลบรารีที่เป็นสารผสมโดยการผสมอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน 5 ชนิดที่มี K_i แตกต่างกันอยู่ในช่วงจาก $1-10^4$ nM สำหรับ wild type และ 10^2-10^5 nM สำหรับ A16VS108T มีวแทนต์เอ็นไซม์ ดังแสดงในตาราง 5.5 ในอัตราส่วนโมลที่เท่ากัน และได้มีการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการสกรีนไลบรารีนี้ในสถานะสารละลายเพื่อที่จะใช้เอ็นไซม์เลือกเอาอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีนที่เป็นตัวยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสที่ดีที่สุดออกจากสารผสมตัวอย่างนี้ ผลการทดลองเบื้องต้น โดยคณะวิจัยของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ แสดงให้เห็นว่าการไทเทรตสารผสมดังกล่าวด้วยเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสแบบ wild type แล้วนำสารละลายที่ได้ไปกำจัดเอ็นไซม์ออกโดยเทคนิคการกรองผ่านเมมเบรนแล้ววิเคราะห์สิ่งที่กรองได้โดยเทคนิค HPLC เพื่อหาว่าสารยับยั้งถูกจับด้วยเอ็นไซม์ไปเท่าใด (แผนภาพ 5.3, 2E binding) จากแผนภาพ 5.3 จะเห็นได้ว่าอัตราการลดลงของสารแต่ละชนิดไม่เท่ากันที่ความเข้มข้นของเอ็นไซม์หนึ่งๆ ซึ่งสอดคล้องกับ K_i ของแต่ละสาร กล่าวคือ Cyc-21 ซึ่งมี K_i ต่ำต่อ wild type เอ็นไซม์ต่ำที่สุดจะมีอัตราการลดลงเร็วที่สุด และอัตราการลดลงของ cyc-70 ซึ่งมี K_i สูงที่สุดจะช้าที่สุดตามลำดับ การวิเคราะห์สารยับยั้งที่ติดอยู่กับเอ็นไซม์หลังจากผ่านการ denature แล้วเพื่อจะเอาสารออกมา (แผนภาพ 5.3, 2E elute) ให้ผลในทำนองเดียวกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแนวคิดในการสกรีนคอมบินาทอรีไลบรารีโดยการเลือกด้วยเอ็นไซม์นี้มีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้

ตาราง 5.5 โครงสร้างและ K_i ต่อ wild type และ A16VS108T *P. falciparum* DHFR ของอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดรไตรอะซีน ที่เลือกมาเป็นไลบรารีตัวอย่างสำหรับการทดสอบการสกรีนไลบรารีของสารผสมในวิฤภาคสารละลาย

Code	Ar	R ¹	R ²	K_i (wt), nM	K_i (A16VS108T), nM
Cyc-53b	4-ClPh	H	Ph	4.1 ± 0.3	62.7 ± 1.4
Cyc-25	4-ClPh		$-(CH_2)_3-$	471.1 ± 91.7	7507.3 ± 530.6
Cyc-21	4-ClPh	Me	Me	1.5 ± 0.3	1313.7 ± 164.5
Cyc-22	4-ClPh	Me	ⁱ Pr	36.5 ± 4.1	44791.2 ± 5871.9
Cyc-70	4-ClPh	ⁿ Pr	ⁿ Pr	1010.6 ± 79.5	very high

ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นคือ selectivity ของเอ็นไซม์จะมากเพียงพหรือไม่ในกรณีที่สารยับยั้งตัวที่ดีที่สุดมีค่า K_i ไม่แตกต่างจากสารยับยั้งตัวที่ด้อยๆ ลงมามากนัก นอกจากนี้ยังอาจพบปัญหาในการสกรีนไลบรารีขนาดใหญ่ เช่นมีสมาชิกมากกว่า 20

ชนิด เนื่องจากการวิเคราะห์อาศัยเทคนิค HPLC ซึ่งจำเป็นต้องทราบ retention time ของแต่ละสมาชิกของไลบรารีก่อน แต่ถ้าใช้ร่วมกับเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีอาจช่วยให้สกรีนไลบรารีได้โดยไม่ต้องทราบ retention time แต่ความสำเร็จของการสกรีนก็ขึ้นอยู่กับว่าภาวะในการทำ HPLC คือพอที่จะสามารถแยกสารเป็นจำนวนมากในไลบรารีออกจากกันได้หรือไม่ อีกแนวทางหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้มากคือการใช้เทคนิคเลือกด้วยเอ็นไซม์นี้ร่วมกับการสกรีนไลบรารีโดยเทคนิคคิคอนไวลูชันซึ่งจะทำให้สามารถลดขั้นตอนการสังเคราะห์ซ้ำลงได้มาก และไม่มีปัญหาของไลบรารีขนาดใหญ่เกินไปเนื่องจากไลบรารีที่นำมาสกรีนด้วยเอ็นไซม์จะผ่านการคัดเลือกมาแล้วขั้นหนึ่ง แม้กระนั้นวิธีนี้ก็มีความยากวิธีหนึ่งในการสกรีนหาองค์ประกอบของไลบรารีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุด ทางคณะผู้วิจัยได้นำผลการศึกษานี้ไปยื่นขอจดสิทธิบัตรในประเทศไทยแล้ว



แผนภาพ 5.3 เปอร์เซนต์การจับยึดของอนุพันธ์ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีนในสารผสมเมื่อไทเทรตด้วยเอ็นไซม์ 2 อีคิวาเลนส์

เอกสารอ้างอิงบทที่ 5

¹ G. Rastelli, personal communication.

² G.Rastelli, W. Sirawaraporn, P. Sompornpisut, T. Vilaivan, S. Kamchonwongpaisan, R.Quarrell, G. Lowe, Y. Thebtaranonth and Y. Yuthavong, Interaction of pyrimethamine, cycloguanil, WR99210 and their analogues with *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase : structural basis of antifolate resistance, *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, 8, 1117-1128.

³ W. Sirawaraporn, T. Sathitkul, R. Sirawaraporn, Y. Yuthavong and D.V. Santi, Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 1124.

⁴ Y.Yuthavong, T. Vilaivan, N.Chareonsethakul, S.Kamchonwongpaisan, W.Sirawaraporn, R.Quarrell and G.Lowe, Development of a lead inhibitor for the A16V+S108T mutant of dihydrofolate reductase from the cycloguanil resistant strain (T9/94) of *Plasmodium falciparum*, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 2738-2744.

⁵ J. Curtis, M.T. Duraisingh, J.K. Trigg, H. Mbwana, D.C. Warhurst, C.F. Curtis, Direct evidence that Asparagine at position 108 of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase is involved in resistance to antifolate drugs in Tanzania, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1996, 90, 678-680.

⁶ S. Kaur, L. McGuire, D. Tang, G. Dollinger and V. Huebner, Affinity selection and mass spectrometry-based strategies to identify lead compounds in combinatorial libraries, *J. Protein. Chem.*, 1997, 16, 505-511.

⁷ S.R. Wilson, Introduction to combinatorial libraries : concepts and terms in Combinatorial chemistry : Synthesis and application, S.R. Wilson and A.W. Czarnik Ed, John Wiley & Sons, New York, 1997.

⁸ B. Tarnchompoo and S. Kamchonwongpaisan, unpublished results.

⁹ ยงยุทธ ยุทธวงศ์, บงกช ธารชมพู, สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล, จารุณี วานิชชนันกุล, ศุภัญญา ขงเกียรติตระกูล, ชะวะนี ศิริชัยวัฒน์, เพ็ญจิตร จิตรนาถทรัพย์, วรชาติ ศิริวราภรณ์, ยอดหทัย เทพธรานนท์ และธีรยุทธ วิไลวัลย์, "การพัฒนาและการใช้เอ็นไซม์ dihydrofolate reductase ของเชื้อมาลาเรียในการคัดเลือkdัวยับยั้งที่ดีจากกลุ่มของห้องสมุดดัยยับยั้งเชิงรวม (combinatorial libraries)", อยู่ระหว่างยื่นคำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พศ. 2522 แก้ไขเพิ่มเติมพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2535

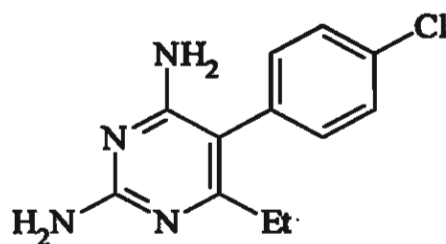
บทที่ 6

การสังเคราะห์คอมบินาทอเรียลไลบรารีของ 2,4-ไดอะมิโนพิริมิดีน

งานในส่วนนี้กระทำโดย ดร.บงกช ชารมพูน นส.ระวีณี ศิริชัยวัฒน์ และคณะจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และนำมารวมไว้ในที่นี้โดยสรุปเพื่อความสมบูรณ์ตามวัตถุประสงค์ของข้อเสนอโครงการเท่านั้น

6.1 การสังเคราะห์คอมบินาทอเรียลไลบรารีของอนุพันธ์ของไพริเมตามีน

ไพริเมตามีน (XIa) เป็นสารประกอบจำพวก 2,4-ไดอะมิโนพิริมิดีน ซึ่งมีสูตร โครงสร้างดังนี้

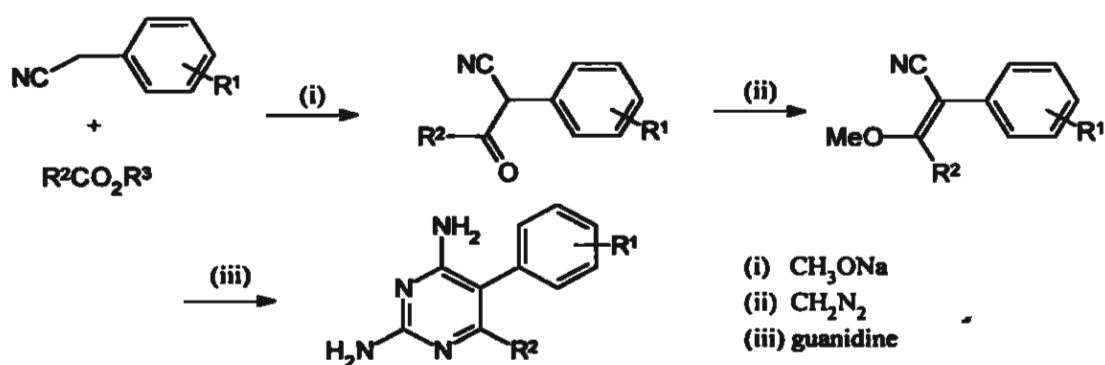


(XIa)

แม้จะมีสูตร โครงสร้างคล้ายคลึงกับไซโคลกัวนิล แต่รูปแบบของการจับยึดกับเอ็นไซม์ของสารยับยั้งทั้งสองมีความแตกต่างกันดังจะเห็นได้จากการที่เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่มีมิวแทนต์เอ็นไซม์แบบ A16VS108T ซึ่งคือต่อยาไซโคลกัวนิลจะไม่คือต่อยาไพริเมตามีน ปรากฏการณ์นี้สามารถอธิบายได้โดยใช้แบบจำลองโมเลกุลของ Dr. Rastelli²

อย่างไรก็ตาม แม้ไพริเมตามีนจะสามารถยับยั้งมิวแทนต์เอ็นไซม์แบบ A16VS108T ได้ดี แต่มันก็มีมิวแทนต์เอ็นไซม์อื่นที่คือต่อทั้งไพริเมตามีน และไซโคลกัวนิลด้วย ตัวอย่างของมิวแทนต์เหล่านี้ที่พบในธรรมชาติได้แก่ NS11+C59R+S108N และ NS11+C59R+S108N+I64L เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาหาอนุพันธ์ของไพริเมตามีนชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อเอ็นไซม์เหล่านี้ควบคู่ไปกับการพัฒนาอนุพันธ์ของไซโคลกัวนิลด้วย โดยอาศัยเทคนิคคอมบินาทอเรียลเป็นเครื่องมือ

สารประกอบในกลุ่มไพริเมตามีนสังเคราะห์ได้โดยปฏิกิริยาไซโคลคอนเดนเซชันระหว่างแอลฟาฟีนิลเบต้าเมทอกซีอะคริไลโนไทรล์กับกัวนิดินในเอทานอลที่อุณหภูมิ reflux

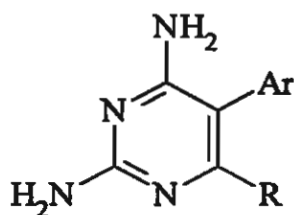


แผนภาพที่ 1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพริเมตามีน^{3,4}

โดยสารประกอบแอลฟาฟีนิลเบต้าเมทอกซีอะคริไลโนไทรล์ที่ต้องการสามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาเอซิติลเลชันของฟีนอลอะซิโดไโนไทรล์ตามด้วยปฏิกิริยาเมทิลเลชันของเอซิติลฟีนอลอะซิโดไโนไทรล์ที่ได้ด้วยโคเอไซม์เทนหรือโคเมทิลซัลเฟต

ในวิธีการแบบเดิมมีปัญหาอยู่ในขั้นตอนของการทำเอซิลเลชันซึ่งใช้โซเดียมเมทอกไซด์เป็นเบส และคาร์บอกซิลิกแอตเทอร์เป็นเอซิลเลตติ้งเอเจนต์ ปฏิกริยาดังกล่าวผันกลับได้จึงทำให้ได้ผลไม่ดึ้นัก คร.บงกชได้พัฒนาวิธีการใหม่ขึ้นมาโดยใช้ลิเทียมไดไฮโดรฟอสไฟไฟไมด์ (LDA) เป็นเบสและใช้แอซิดคลอไรด์เป็นเอซิลเลตติ้งเอเจนต์ ทำให้ได้วิธีการสังเคราะห์เอซิลฟีนิลอะซิไดโนไทรล์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม ส่วนขั้นตอนที่เหลือเป็นไปตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง โดยเริ่มต้นจากสารประกอบฟีนิลอะซิไดโนไทรล์ และแอซิดคลอไรด์ที่เหมาะสม สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพริเมตามีนได้เป็นจำนวนมาก ตัวอย่างของอนุพันธ์เหล่านี้เป็นดังแสดงในตาราง 6.1

ตาราง 6.1 อนุพันธ์ของไพริเมตามีน (XI) ที่สังเคราะห์ได้ในรูปของสารบริสุทธิ์และส่งไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์



(XI)

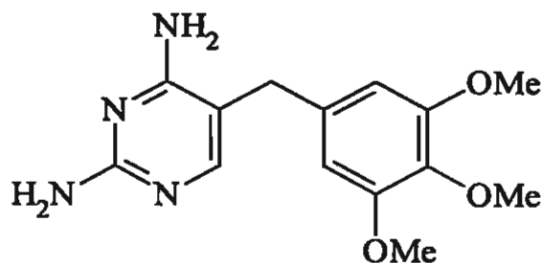
Code	Ar	R
Pyr-1	4-ClC ₆ H ₄ -	Et-
Pyr-2	4-ClC ₆ H ₄ -	ⁱ C ₃ H ₇ -
Pyr-3	4-ClC ₆ H ₄ -	ⁱ C ₄ H ₉ -
Pyr-4	4-ClC ₆ H ₄ -	Ph-
Pyr-5	4-ClC ₆ H ₄ -	4-MePh-
Pyr-6	4-ClC ₆ H ₄ -	4-MeOPh-
Pyr-7	4-ClC ₆ H ₄ -	ⁿ C ₃ H ₇ -
Pyr-8	4-ClC ₆ H ₄ -	ⁿ C ₉ H ₁₅ -
Pyr-9	4-ClC ₆ H ₄ -	C ₆ H ₁₁ -
Pyr-10	4-ClC ₆ H ₄ -	MeO-
Pyr-11	4-ClC ₆ H ₄ -	4- ⁱ BuPh-
Pyr-12	4-ClC ₆ H ₄ -	PhCH ₂ CH ₂ CH ₂ -
Pyr-13	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	Et
Pyr-14	2,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -	Et
Pyr-15	3,4-[OCH ₂ O]C ₆ H ₃ -	Et

โดยอาศัยวิธีการสังเคราะห์ใหม่นี้ คร.บงกชได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์คอมบินเนทอเรียลไลบรารีของไพริเมตามีนทั้งในวิฤภาคสารละลายและวิฤภาคของแข็ง และได้ศึกษาภาวะต้นแบบในการใช้เอ็นไซม์เพื่อสกรีนไลบรารีสารผสมของไพริเมตามีนจำนวน 21 ชนิดในวิฤภาคสารละลาย และพบว่าสามารถเลือกโมเลกุลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์มากที่สุดออกมาได้จริง (ดูรายละเอียดในบทที่ 5)

ผลการทดสอบอนุพันธ์ของไพริเมตามีนที่สังเคราะห์ได้กับเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสแบบ wild-type พบว่าอนุพันธ์ Pyr 1 - Pyr 15 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์ใกล้เคียงกัน โดยมี K_i อยู่ในช่วงของ 0.1 - 1 nM ยกเว้นอนุพันธ์ 6-methoxy (Pyr-10) ซึ่งมี K_i ที่สูงแตกต่างออกไปมาก แสดงว่าหมู่ออกซิเจนที่ตำแหน่ง 6 ทำให้การจับยึดของเอ็นไซม์กับตัวยับยั้งลดน้อยลง การทดสอบกับเอ็นไซม์แบบมิวแทนต์ที่คือค้อยาไพริเมตามีนกำลังอยู่ระหว่างรอผลการทดสอบ

6.2 การสังเคราะห์คอมบิเนทอเรียลไลบรารีของอนุพันธ์ของไตรเมโทพริม

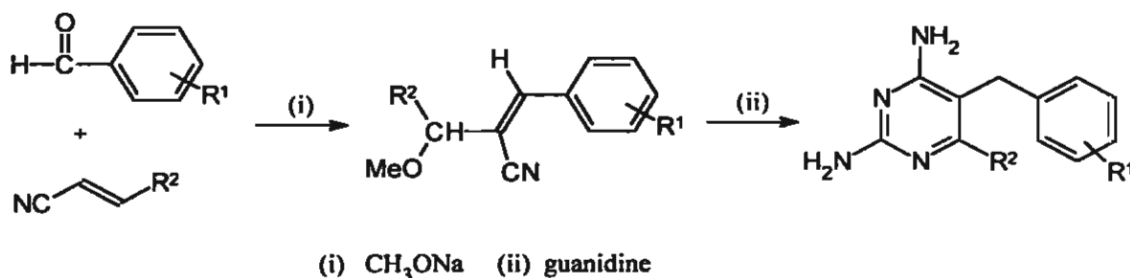
ไตรเมโทพริม (XIb) เป็นสารประกอบจำพวก 2,4-ไดอะมิโนพิริมิดีนอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีสูตร โครงสร้างดังนี้



(XIb)

ไตรเมโทพริมเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสแบบ wild-type ได้ไม่ดัดแปลง ($K_i = 10.3 \pm 0.5$ nM) เมื่อเทียบกับไพริเมตามีน ($K_i = 0.6 \pm 0.2$ nM) หรือไซโคลกัวนิล ($K_i = 1.5 \pm 0.3$ nM) สิ่งที่น่าสนใจของไตรเมโทพริมคือมันมีหมู่แทนที่ที่มีความยืดหยุ่นสูงกว่าไพริเมตามีนและไซโคลกัวนิล จึงอาจปรับตัวให้เข้ากับโครงสร้างของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสได้ดีกว่า จึงได้มีการศึกษาสารในกลุ่มนี้ควบคู่ไปด้วย

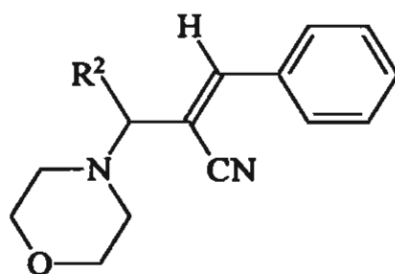
สารประกอบในกลุ่มไตรเมโทพริมสังเคราะห์ได้โดยปฏิกิริยาไซโคลคอนเดนเซชันระหว่างเมทอกซีอัลคิลฟีนิลอะครีโลไนไตรล์ กับกวานิดีนในเอทานอลที่อุณหภูมิ reflux



แผนภาพที่ 1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของไตรเมโทพริม^{4,5}

โดยสารประกอบเมทอกซีอัลคิลฟีนิลอะครีโลไนไตรล์ที่ต้องการสามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาอัลคิเลชันระหว่างอะโรมาติกอัลดีไฮด์กับผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากไมเคิลแอดดิชันของเมทอกซีไซโคลนเข้ากับอะครีโลไนไตรล์ ตามด้วยการกำจัดน้ำของผลิตภัณฑ์ที่ได้

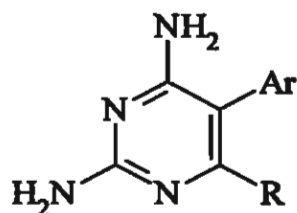
นส.ชะวະนีและดร.บงกชได้พัฒนาวิธีการใหม่ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของฟีนิลอะครีโลไนไตรล์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไซโคลคอนเดนเซชันได้ดีกว่าเมทอกซีอัลคิลฟีนิลอะครีโลไนไตรล์ โดยใช้มอร์โฟลีนเป็นนิวคลีโอไฟล์ในขั้นตอนแรกแทนเมทอกซีไซโคลน ซึ่งจะได้อินเทอร์มีเดียตเป็นมอร์โฟลิโนอะครีโลไนไตรล์ (XII) ดังนี้



(XII)

เมื่อให้มอร์โฟลิโนอะคริโลไนไทรล์ (XII) ทำปฏิกิริยากับกัวนิตินจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของไครเมโทพริตามต้องการ ตัวอย่างของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้เป็นดังแสดงในตาราง 6.2

ตาราง 6.2 อนุพันธ์ของไครเมโทพริ ที่สังเคราะห์ได้ในรูปของสารบริสุทธิ์และส่งไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์



(XI)

Code	Ar	R
Tri-1	3,4,5-(MeO) ₃ C ₆ H ₂ -	H-
Tri-2	3,4-(MeO) ₂ C ₆ H ₃ -	H-
Tri-3	3-MeO,4-EtOC ₆ H ₃ -	H-
Tri-4	4-MeOC ₆ H ₄ -	H-
Tri-5	4-MeC ₆ H ₄ -	H-
Tri-6	4-ClC ₆ H ₄ -	H-
Tri-7	3-MeO,4-BnOC ₆ H ₃ -	H-

โดยอาศัยวิธีการสังเคราะห์ใหม่นี้ น.ส.ชะวะนีได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์คอมบินเนทอเรียลไลบรารีของไพริเมตามีนทั้งในวิฤภาคสารละลายและวิฤภาคของแข็ง และได้ศึกษาภาวะต้นแบบในการใช้เอ็นไซม์เพื่อสกรีนไลบรารีสารผสมของไครเมโทพริในวิฤภาคสารละลาย ซึ่งงานส่วนนี้กำลังอยู่ระหว่างดำเนินการ

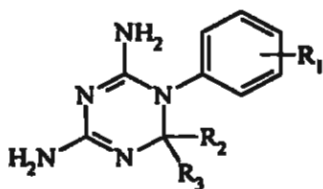
ผลการทดสอบอนุพันธ์ของไครเมโทพริที่สังเคราะห์ได้กับเอ็นไซม์โคไฮโดรโฟเลตรีดักเทสแบบ wild-type พบว่าอนุพันธ์ Tri 1 - Tri 6 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์ใกล้เคียงกัน โดยมี K_i อยู่ในช่วงของ 10 - 100 nM ยกเว้นอนุพันธ์ Tri 7 ซึ่งมี K_i ที่ต่ำกว่าตัวอื่น (2.2 ± 0.5 nM) การทดสอบกับเอ็นไซม์แบบมิวแทนต์กำลังอยู่ระหว่างรอผล

เอกสารอ้างอิงบทที่ 6

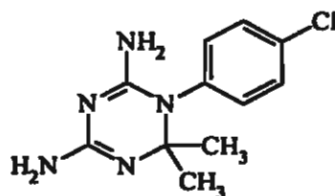
- ¹ B. Tarnchompoo and C. Sirichaiwat, unpublished results.
- ² G.Rastelli, W. Sirawaraporn, P. Sompornpisut, T. Vilaivan, S. Kamchonwongpaisan, R.Quarrell, G. Lowe, Y. Thebtaranonth and Y. Yuthavong, Interaction of pyrimethamine, cycloguanil, WR99210 and their analogues with *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase : structural basis of antifolate resistance, *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, 8, 1117-1128.
- ³ a) B. H. Chase and J. Walker, The preparation of enol ethers from certain β -ketonitriles, *J. Chem. Soc.*, 1953, 3518; b) a) W. Logemann, L. Almirante and L. Caprio, *Ber.*, 1954, 87, 435; c) P.R. Russell and G.H. Hitchings, 2,4-Diaminopyrimidines as antimalarials, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, 73, 3763-3770.
- ⁴ B. Roth and J. J. Burchall, *Methods in Enzymology*, 1971, 18, 779.
- ⁵ P. Stanbuck, R. Baltzly and H. M. Hood, A new synthesis of 5-benzylpyrimidines, *J. Org. Chem.*, 1963, 28, 1983-1988.

บทที่ 7

บทสรุป

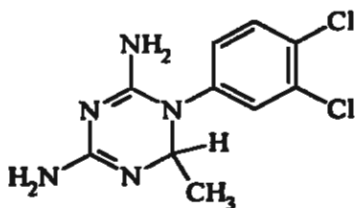


(i)

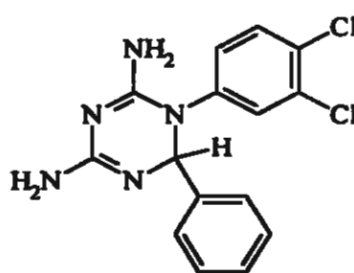


(ii)

ได้พัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับสังเคราะห์สารยับยั้งเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีคเทสในกลุ่ม 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน (i) ซึ่งมีศักยภาพสูงในการเป็นยาต้านมาลาเรีย กรรมวิธีนี้เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาปิควงแหวนโดยมีองค์ประกอบสองส่วนได้แก่เอริทโรบิกัวนีน และสารประกอบคาร์บอนิลโดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีสารกำจัดน้ำอยู่ด้วยภายใต้ภาวะที่คิที่ต่ำ สารตั้งต้นหลายชนิดทำปฏิกิริยาอย่างสะอาด มีปฏิกิริยาข้างเคียงน้อยมาก และสามารถทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ได้ง่ายโดยการล้างเท่านั้น ได้ใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ร่วมกับเทคนิคการสังเคราะห์แบบขนาน (parallel synthesis) และการสังเคราะห์แบบแยกส่วน (split and mix synthesis) ในการเตรียมคอมบิเนทอเรียลไลบรารีขนาดเล็กของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ในวัฏภาคสารละลายทั้งในรูปแบบที่เป็นสารบริสุทธิ์ และในรูปแบบของไลบรารีของสารผสม ผลการทดสอบไลบรารีที่เป็นสารบริสุทธิ์กับเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีคเทสจาก *P. falciparum* (pfDHFR) ทั้งแบบธรรมชาติและแบบ A16VS108T มิวแทนต์ซึ่งคือค็อกซาไซโคลกัวนิล (ii) ทำให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอ็นไซม์กับการค็อกซาของมิวแทนต์เอ็นไซม์โดยเฉพาะอย่างยิ่งบทบาทของหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C² ของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน และทำให้ค้นพบสารใหม่ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์ได้ดีขึ้น การทดสอบไลบรารีสารผสมซึ่งประกอบด้วยสมาชิก 96 ชนิดโดยใช้เทคนิคค็อกซาโคกัวนิลพบสารยับยั้งมิวแทนต์เอ็นไซม์แบบ A16VS108T ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมิวแทนต์เอ็นไซม์แบบ A16VS108T สูงไซโคลกัวนิลซึ่งเป็นยาค้นแบบประมาณ 100 เท่า ถึง 2 ชนิด ได้แก่ (iii) และ (iv) แม้ว่าจะยังมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่า WR99210 และอนุพันธ์ของมันที่ปราศจากหมู่เมทิลก็ตาม



(iii)



(iv)

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการใช้เคมีบนวัฏภาคของแข็งเพื่อการสังเคราะห์และทดสอบไลบรารีของ 4,6-ไดอะมิโน-1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน แต่พบว่าให้ผลไม่ดีเท่ากับการสังเคราะห์ในวัฏภาคสารละลาย และยังได้ทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคการเลือกด้วยเอ็นไซม์ในการบ่งชี้สารยับยั้งเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงจากไลบรารีที่เป็นสารผสมอีกด้วย ซึ่งพบว่าสามารถใช้เอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีคเทสแบบ wild type ในการคัดแยกสารยับยั้งเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจากไลบรารีจำลองซึ่งประกอบด้วยสมาชิก 5 ตัวที่มี K_i อยู่ระหว่าง 1-10⁴ nM ได้จริง

บทที่ 8

Experimental Details

8.1 Materials and Methods

Elemental analyses were performed by the Ms. A. Ungpakornkaew on a Perkin-Elmer CHN analyser model PE2400 series II (Chulalongkorn Research Equipment Centre, Bangkok).

Routine ^1H and ^{13}C nmr spectra were recorded on a Varian Gemini 200 spectrometer (Dyson Perrins Laboratory, Oxford) or a Bruker ACF 200 (Chulalongkorn University, Bangkok) operating at 200 MHz (^1H) and 50.28 MHz (^{13}C). High field nmr experiments were performed on a Bruker DRX400 (400 MHz) (National Science and Technology Development Agency, Bangkok). ^1H and ^{13}C chemical shifts are quoted in ppm relative to tetramethylsilane and were internally referenced to the residual protonated solvent signal.

MALDI-TOF mass spectrum was recorded by Ms N. Panchan on a Bruker Biflex mass spectrometer (The Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Chulalongkorn University, Bangkok) using CCA matrix. Masses are quoted as m/z unless otherwise stated, only the molecular ions and major fragments being quoted.

Absolute ethanol and other chemicals from standard suppliers were used without further purification. All samples were recrystallised from water, ethanol, methanol or mixture thereof and dried *in vacuo* before analysis and biological assay.

8.2 Synthesis of derivatives of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazines

Cycloguanil derivatives bearing two-germ dimethyl groups at the C^2 position were prepared by a three-component condensation reaction between an aromatic amine, dicyanodiamide and acetone in the presence of concentrated aqueous HCl as described in the literature.^{1,2} When the carbonyl compound is an aldehyde, a two component condensation between the carbonyl compound and an aryl biguanide,^{3,4} obtained from a reaction between an aromatic amine and dicyanodiamide in the presence of HCl as catalyst, or a one pot reaction in which the biguanide was pre formed before reaction with the carbonyl compound was found to be superior. Derivatives of formaldehyde were prepared in the same way as other aldehydes, except for methylal was used as a source of formaldehyde. Derivatives of higher ketones generally require a modified procedure in which triethyl orthoacetate is added as water scavenger. In most cases the desired products precipitated from the reaction medium (usually ethanol) as crystalline hydrochloride salt. In cases where the product did not crystallize from the reaction, the solvent was completely removed and the product precipitated by addition of lithium picrate. The picrate salt so obtained was converted back to the hydrochloride salt by treatment with a strongly basic anion exchange resin Amberlite IRA400 (Cl^- form). The samples for biological assays were recrystallized from ethanol or aqueous ethanol. All cycloguanil derivatives have been characterized by ^1H NMR and mass spectra (APCI or MALDI-TOF) and also by elemental analysis (CHN).

8.3 General synthesis of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine by 3-component methods.

Method A

A mixture of an aromatic amine (5–10 mmol), dicyanodiamide (1.1 eq.), concentrated HCl (1.1 eq) and a ketone (use as solvent if bp. <100 °C otherwise use 1.1 eq. in abs. EtOH) was heated under reflux for 6–18 h. The solution was cooled and the precipitate crystalline product were filtered off, washed with acetone and dried under vacuum followed by recrystallisation from alcohols or aqueous alcohols if necessary. The compounds synthesized by this method include :

1-(4-Methylphenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 4-MeC₆H₄; R¹ = R² = Me; X = Cl)

yield 54 % (100 mmol scale); δ_{H} (200 MHz; D₂O) 1.25 (s, 6H, 2xMe), 2.20 (2, 3H, Me-Ph), 7.00–7.25 (2xd A₂B₂ system, 2x2H, aromatic-H); δ_{C} (50.26 MHz; 1:1 D₂O+DMSO-*d*₆) 20.4 (CH₃-Ph), 26.5 (2xCH₃), 69.8 (CMe₂), 129.0, 130.7, 131.1 and 140.1 (aromatic-CH and C), 156.9 and 157.2 [2 x triazine-C(=N)NH₂]; *m/z* (MALDI-TOF) 232 (M.H⁺).

1-(2',4'-Dichlorophenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 2,4-Cl₂C₆H₃; R¹ = R² = Me; X = Cl)

yield 43 % (50 mmol scale) δ_{H} (200 MHz; DMSO-*d*₆) 1.16 and 1.50 (s, 6H, 2xMe), 7.55 (m, 1H, aromatic-C⁶H), 7.88 (m, 1H, aromatic-C⁵H), 9.45 (m, 1H, aromatic-C³H); δ_{C} (50.26 MHz; 1:1 D₂O+DMSO-*d*₆) 25.4 and 27.7 (2xCH₃), 70.2 (CMe₂), 129.3, 130.6, 131.8, 133.1, 134.5 and 135.2 (aromatic-CH and C), 156.5 and 157.9 [2 x triazine-C(=N)NH₂]; *m/z* (MALDI-TOF) 286 (M.H⁺).

1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃; R¹ = R² = Me; X = Cl)

yield 40 % (10 mmol scale) δ_{H} (400 MHz; D₂O) 1.36 (s, 6H, 2xMe), 7.27 (dd *J*=8.6, 2.5 Hz, 1H, aromatic-C⁶H), 7.58 (d *J*=2.5 Hz, 1H, aromatic-C²H), 7.62 (d *J*=8.6 Hz, 1H, aromatic-C⁵H); *m/z* (MALDI-TOF) 286 (M.H⁺).

1-(4'-Chlorophenyl)-2,2-cyclohexylidene-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 4-ClC₆H₄; R¹-R² = (CH₂)₅; X = Cl)

δ_{H} (400 MHz; D₂O) 0.85–1.00 (m, 2H, cyclohexyl CHH), 1.28–1.65 (m, 6H, cyclohexyl CH₂); 1.90–2.00 (m, 2H, CH₂), 7.35 and 7.50 (2xm, 5H, aromatic-CH); *m/z* (MALDI-TOF) 292 (M.H⁺).

1-(4'-Ethylphenyl)-2,2-cyclohexylidene-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 4-EtC₆H₄; R¹-R² = (CH₂)₅; X = Cl)

δ_{H} (400 MHz; D₂O) 0.85–1.00 (m, 2H, cyclohexyl CHH), 1.02 (3H, t, *J*=7 Hz, CH₃CH₂), 1.28–1.65 (m, 6H, cyclohexyl CH₂); 1.90–2.00 (m, 2H, CH₂), 2.25 (2H, q, *J*=7 Hz, CH₃CH₂), 7.10 and 7.24 (2x2H, AB doublet, *J*=8 Hz, aromatic C-H); *m/z* (MALDI-TOF) 286 (M.H⁺).

1-Phenyl-2,2-cyclohexylidene-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride(I; Ar = C₆H₅; R¹-R² = (CH₂)₅; X = Cl) δ_{H} (400 MHz; D₂O) 0.85-1.00 (m, 2H, cyclohexyl CHH), 1.28-1.65 (m, 6H, cyclohexyl CH₂); 1.90-2.00 (m, 2H, CH₂), 7.35 and 7.50 (2xm, 5H, aromatic-CH); m/z (MALDI-TOF) 258 (M.H⁺)*1-(4'-Methylphenyl)-2,2-cyclohexylidene-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = 4-MeC₆H₄; R¹-R² = (CH₂)₅; X = Cl)yield 60 % (10 mmol scale) δ_{H} (400 MHz; D₂O) 0.82-0.88 (m, 1H, cyclohexyl CHH), 1.25-1.31 (m, 4H, cyclohexyl CH₂); 1.33-1.54 (m, 3H, cyclohexyl CH₂) 1.86-1.88 (m, 2H, CH₂), 2.26 (s, 3H, Me), 7.13 and 7.26 (2xd A₂B₂ system J = 8.3 Hz, 2x2H, aromatic-H); m/z (MALDI-TOF) 272 (M.H⁺).*1-(4'-Bromophenyl)-2,2-cyclohexylidene-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = 4-BrC₆H₄; R¹-R² = (CH₂)₅; X = Cl)yield 58 % (10 mmol scale) δ_{H} (400 MHz; D₂O) 0.82-0.88 (m, 1H, cyclohexyl CHH), 1.25-1.31 (m, 4H, cyclohexyl CH₂); 1.33-1.54 (m, 3H, cyclohexyl CH₂) 1.86-1.88 (m, 2H, CH₂), 7.13 and 7.26 (2xd A₂B₂ system J = 8.3 Hz, 2x2H, aromatic-H); m/z (MALDI-TOF) 336 (M.H⁺).*1-(2',4'-Dichlorophenyl)-2,2-cyclohexylidene-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = 2,4-Cl₂C₆H₃; R¹-R² = (CH₂)₅; X = Cl)yield 21 % (10 mmol scale) δ_{H} (400 MHz; D₂O) 0.99 (m, 1H, cyclohexyl CHH), 1.23-1.40 (m, 3H, cyclohexyl CH₂); 1.52-1.6 (m, 4H, cyclohexyl CH₂) 1.74 (m, 1H, cyclohexyl CH₂), 2.19 (m, 1H, CH₂), 7.44-7.50 (m, 2H, aromatic-C⁵H and C⁶H), 7.57 (d J = 2.5 Hz, 1H, aromatic-C⁷H), 7.69 (s, 1H, aromatic-C⁸H); m/z (MALDI-TOF) 326 (M.H⁺).*1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2,2-cyclohexylidene-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃; R¹-R² = (CH₂)₅; X = Cl)yield 40 % (10 mmol scale) δ_{H} (400 MHz; D₂O) 0.85-1.00 (m, 1H, cyclohexyl CHH), 1.30-1.45 (m, 4H, cyclohexyl CH₂); 1.50-1.65 (m, 3H, cyclohexyl CH₂) 1.85-1.95 (m, 2H, CH₂), 7.25 (dd J = 8.6, 2.5 Hz, 1H, aromatic-C⁶H), 7.57 (d J = 2.5 Hz, 1H, aromatic-C⁷H), 7.63 (d J = 8.6 Hz, 1H, aromatic-C⁸H); m/z (MALDI-TOF) 326 (M.H⁺).*1-(4'-Methylphenyl)-2-phenyl-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = 4-MeC₆H₄; R¹ = H; R² = Ph; X = Cl)yield 53 % (10 mmol scale) δ_{H} (400 MHz; D₂O) 2.18 (s, 3H, Me), 5.93 (s, 1H, C²H), 6.94 and 7.11 (2xd A₂B₂ system J = 7.7 Hz, 2H, MePh-N= aromatic-H), 7.24-7.34 (m, 5H, PhCH= aromatic H); m/z (MALDI-TOF) 280 (M.H⁺).

Method B

A mixture of an aromatic amine (5-10 mmol), dicyanodiamide (1.1 eq.), *p*-toluenesulfonic acid dihydrate (1.1 eq) and a ketone (use as solvent if bp. <100 °C otherwise use 1.1 eq. in abs. EtOH) was heated under reflux for 6-18 h. The solution was cooled and evaporated to a small volume. In some cases the residual oil solidified on cooling, otherwise crystallisation could be induced by trituration with acetone or ether. The crystalline product were collected by filtration, washed with acetone and dried under vacuum. The compounds synthesized by this method include :

1-(4'-Methylphenyl)-2-methyl-2-ethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine p-toluenesulfonate

(I; Ar = 4-MeC₆H₄; R¹ = Me; R² = Et; X = OTs)

yield 44 % (10 mmol scale) δ_H (400 MHz; D₂O) 0.86 (t J=7.4 Hz, 3H, β-CH₃), 1.22 (s, 3H, α-CH₃), 1.60 and 1.84 (2xdq J = 7.5, 15 Hz, 2x2H, β-CH₂), 2.28 (2xs, 6H, 2xMePh), 7.17 (m, 2H, MePhN= aromatic H), 7.25, 7.28 and 7.56 (3xd J = 8.1, 8.3 and 8.2 Hz, 3x2H, aromatic H); m/z (MALDI-TOF) 246 (M.H⁺).

1-(4'-Methylphenyl)-2-methyl-2-n-propyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine p-toluenesulfonate

(I; Ar = 4-MeC₆H₄; R¹ = Me; R² = ⁿPr; X = OTs)

yield 23 % (5 mmol scale) δ_H (400 MHz; D₂O) 0.78 (t J=7.4 Hz, 3H, γ-CH₃), 1.20 (s, 3H, α-CH₃), 1.35 (m, 2H, β-CH₂), 1.55 and 1.77 (2xm, 2H, α-CH₂), 2.28 (2xs, 6H, 2xMePh), 7.20 and 7.28 (2xd, 2x3H, MePhN= aromatic H), 7.32 and 7.60 (2xd, 2x3H, p-TsO aromatic H); m/z (MALDI-TOF) 260 (M.H⁺).

1-(4'-Methylphenyl)-2,2-diethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine p-toluenesulfonate

(I; Ar = 4-MeC₆H₄; R¹ = Et; R² = Et; X = OTs)

yield 47 % (10 mmol scale) δ_H (400 MHz; DMSO-d₆) 0.89 (t J=7.0 Hz, 6H, β-CH₃), 1.55 (q J = 7.2 Hz, 4H, α-CH₂) 2.29 and 2.36 (2xs, 2xH, 2xMePh), 7.13, 7.22, 7.34 and 7.49 (4xd, J = 7.7, 8.2, 8.0, 7.9 Hz, aromatic H); m/z (MALDI-TOF) 260 (M.H⁺).

1-(4'-Methylphenyl)-2-methyl-2-n-hexyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine p-toluenesulfonate

(I; Ar = 4-MeC₆H₄; R¹ = Me; R² = ⁿC₆H₁₃; X = OTs)

yield 8 % (5 mmol scale) δ_H (400 MHz; DMSO-d₆) 0.83 (t J=6.6 Hz, 3H, ω-CH₃), 1.20-1.40 (11H, m, CH₂ and α-CH₃), 1.55 and 1.68 (2xm, 2H, α-CH₂), 2.28 and 2.35 (2xs, 2x3H, 2xMePh), 7.14 (d J = 8.1 Hz, 2H, p-TsO aromatic H), 7.15 and 7.23 (2xm, 2H, MePhN= aromatic H), 7.32-7.35 (m, 2H, MePhN= aromatic H), 7.50 (d J = 8.1 Hz, 2H, p-TsO aromatic H); m/z (MALDI-TOF) 302 (M.H⁺).

Method C

Same as method B but 5 equivalents of trimethyl orthoformate was added to the reaction mixture after 1 hr of refluxing and the reflux was continued for further 4-6 h. The reaction was worked up as usual.

1-(4'-Methylphenyl)-2-methyl-2-isobutyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine p-toluenesulfonate

(I; $Ar = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$; $R^1 = \text{Me}$; $R^2 = \text{tBu}$; $X = \text{OTs}$)

yield 18 % (5 mmol scale) δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.89 (dd $J=6.3, 2.1$ Hz, 6H, 2 γ -CH₃), 1.19 (s, 3H, α -CH₃), 1.70 (m, 1H, β -CH), 1.51 and 1.75 (2x dd $J = 13.9, 5.3$ Hz, 2H, α -CH₂), 2.28 and 2.35 (2xs, 2x3H, 2xMePh), 7.14 (d $J = 8.0$ Hz, 2H, p -TsO aromatic H), 7.22 (2x d $J = 7.63$ Hz, 2H, MePhN= aromatic H), 7.34 (2x d $J = 7.8$ Hz, 2H, MePhN= aromatic H), 7.50 (d $J = 8.0$ Hz, 2H, p -TsO aromatic H); m/z (MALDI-TOF) 274 (M.H⁺).

8.4 General synthesis of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine by 2-component methods.

To a suspension of the arylbiguanide.HCl (5-10 mmol) in an appropriate volume of absolute EtOH (5-10 mL) containing conc. HCl (0.08-0.1 mL/mmol) was added the aldehyde (1-2 eq). The reaction mixture was heated at reflux until a negative biguanide test was obtained (30 min to several hours). On cooling in the fridge, a white crystalline solid precipitated which was collected by filtration and washed with EtOH, acetone then Et₂O and air dried.

1-(4'-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $Ar = 4\text{-ClC}_6\text{H}_4$; $R^1 = \text{Me}$; $R^2 = \text{Me}$; $X = \text{Cl}$)

9.30 g, yield 62 % (50 mmol scale); Found C, 46.0; H, 5.6; N, 24.2 % (C₁₁H₁₃N₃Cl₂ requires C, 45.8; H, 5.3; N, 24.3 %); δ_{H} (D₂O, 400 MHz) 1.38 (6H, s, 2xMe), 7.35 and 7.54 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 252 (M.H⁺).

1-(4'-Chlorophenyl)-2-methyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $Ar = 4\text{-ClC}_6\text{H}_4$; $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{Me}$; $X = \text{Cl}$)

2.01 g, yield 49 % (15 mmol scale); Found C, 43.8; H, 4.9; N, 25.4 % (C₁₀H₁₃N₃Cl₂ requires C, 43.8; H, 4.8; N, 25.6 %); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 1.20 (3H, d, $J=6$ Hz, Me-2), 5.06 (1H, q, $J=6$ Hz, H-2), 7.22 and 7.40 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (APCI+) 238 (100 %, M.H⁺).

1-(4'-Chlorophenyl)-2-ethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $Ar = 4\text{-ClC}_6\text{H}_4$; $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{Et}$; $X = \text{Cl}$)

3.97 g, yield 92 % (15 mmol scale); Found C, 45.9; H, 5.2; N, 24.2 % (C₁₁H₁₃N₃Cl₂ requires C, 45.8; H, 5.2; N, 24.3 %); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.94 (3H, t, $J=6.5$ Hz, CH₃), 1.52 (2H, m, CH₂), 4.84 (1H, dd, $J=6.5, 4$ Hz, H-2), 7.22 and 7.38 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (APCI+) 252 (100 %, M.H⁺).

1-(4'-Chlorophenyl)-2-propyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $Ar = 4\text{-ClC}_6\text{H}_4$; $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{Pr}$; $X = \text{Cl}$)

1.30 g, yield 86 % (5 mmol scale); Found C, 45.6; H, 5.7; N, 21.5 % (C₁₂H₁₇N₃Cl₂+H₂O requires C, 45.0; H, 6.0; N, 21.9 %); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.65 (3H, t, CH₃), 1.15 (2H, m, CH₂), 1.55 (2H, m, CH₂), 4.94 (1H, dd, $J=6.4$ Hz, H-2), 7.25 and 7.42 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 266 (M.H⁺).

1-(4'-Chlorophenyl)-2-isopropyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 4-ClC₆H₄; R¹ = H; R² = ⁱPr; X = Cl)

0.97 g, yield 59 % (5.5 mmol scale); Found C, 47.6; H, 5.6; N, 23.1 % (C₁₂H₁₇N₃Cl₂ requires C, 47.7; H, 5.7; N, 23.2 %); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.65 and 0.75 (6H, 2xd, $J=6.8$ Hz, 2xMe), 1.88 (1H, m, CHMe₂), 4.74 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-2), 7.24 and 7.40 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (APCI+) 266 (100 %, M.H⁺).

1-(4'-Chlorophenyl)-2-tert-butyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 4-ClC₆H₄; R¹ = H; R² = ^tBu; X = Cl)

0.55 g, yield 31 % (5.5 mmol scale); Found C, 49.3; H, 6.0; N, 22.1 % (C₁₃H₁₉N₃Cl₂ requires C, 49.4; H, 6.1; N, 22.2 %); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.66 (9H, s, 3xMe), 4.65 (1H, s, H-2), 7.31 (4H, m, aromatic C-H); m/z (APCI+) 280 (100 %, M.H⁺).

1-(4'-Chlorophenyl)-2-butyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 4-ClC₆H₄; R¹ = H; R² = ⁿBu; X = Cl)

1.40 g, yield 89 % (5 mmol scale); Found C, 41.2; H, 6.9; N, 18.5 % (C₁₃H₁₉N₃Cl₂ + 3.5 H₂O requires C, 41.1; H, 7.3; N, 18.5 %); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.60 (3H, t, $J=6.5$ Hz, Me), 1.08 (4H, m, 2xCH₂), 1.55 (2H, m, CH₂), 4.96 (1H, dd, $J=6.5, 4$ Hz, H-2) 7.25 and 7.40 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 280 (100 %, M.H⁺).

1-(4'-Chlorophenyl)-2-phenyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 4-ClC₆H₄; R¹ = H; R² = Ph; X = Cl)

1.82 g, yield 55 % (10 mmol scale); Found C, 53.4; H, 4.4; N, 20.9 % (C₁₅H₁₃N₃Cl₂ requires C, 53.6; H, 4.50; N, 20.8 %); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 5.84 (1H, s, H-2), 6.90 (2H, part of AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H), 7.05 (7H, m, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 300 (100 %, M.H⁺).

1-(4'-Chlorophenyl)-2-cyclohexyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 4-ClC₆H₄; R¹ = H; R² = ^cHex; X = Cl)

1.63 g, yield 95% (5 mmol scale); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.96 (4H, m, 2xCH₂), 1.24 (1H, m, CH-2), 1.57 (6H, m, 3xCH₂), 4.70 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 7.24 and 7.42 (2x2H, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 306 (M.H⁺).

1-(4'-Bromophenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 4-BrC₆H₄; R¹ = Me; R² = Me; X = Cl)

2.60 g, yield 78 % (10 mmol scale); Found C, 39.5; H, 5.11; N, 19.4 % (C₁₁H₁₃N₃BrCl+CH₃OH requires C, 39.5; H, 5.25; N, 19.2 %); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 1.28 (6H, s, 2xMe), 7.16 and 7.58 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 296, 298 (M.H⁺).

1-(4'-Bromophenyl)-2-methyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 4-BrC₆H₄; R¹ = H; R² = Me; X = Cl)

1.71 g, yield 53 % (10 mmol scale); Found C, 37.4; H, 4.1; N, 21.7 % ($C_{10}H_{13}N_3BrCl$ requires C, 37.7; H, 4.1; N, 22.0 %); δ_H (D_2O , 200 MHz) 1.16 (3H, d, $J=6$ Hz, Me-2), 5.00 (1H, q, $J=6$ Hz, H-2), 7.14 and 7.55 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 282, 284 (100 %, $M.H^+$).

1-(4'-Bromophenyl)-2-ethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $Ar = 4-BrC_6H_4$; $R^1 = H$; $R^2 = Et$; $X = Cl$)

3.09 g, yield 93 % (10 mmol scale); Found C, 39.9; H, 4.6; N, 21.1 % ($C_{11}H_{15}N_3BrCl$ requires C, 39.7; H, 4.6; N, 21.0 %); δ_H (D_2O , 200 MHz) 0.74 (3H, t, $J=6.5$ Hz, CH_3), 1.50 (2H, m, CH_2), 4.92 (1H, dd, $J=6.5, 4$ Hz, H-2), 7.20 and 7.50 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 296, 298 ($M.H^+$).

1-(4'-Bromophenyl)-2-propyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $Ar = 4-BrC_6H_4$; $R^1 = H$; $R^2 = nPr$; $X = Cl$)

1.28 g, yield 74 % (5 mmol scale); Found C, 39.8; H, 5.1; N, 19.1 % ($C_{12}H_{17}N_3BrCl + H_2O$ requires C, 39.5; H, 5.2; N, 19.2 %); δ_H (D_2O , 200 MHz) 0.68 (3H, t, $J=6$ Hz, CH_3), 1.18 (2H, m, CH_2), 1.60 (2H, m, CH_2), 4.92 (1H, dd, $J=6, 4$ Hz, H-2), 7.20 and 7.50 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 310, 312 ($M.H^+$).

1-(4'-Bromophenyl)-2-isopropyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $Ar = 4-BrC_6H_4$; $R^1 = H$; $R^2 = iPr$; $X = Cl$)

1.22 g, yield 71 % (5 mmol scale); Found C, 41.4; H, 4.8; N, 20.2 % ($C_{12}H_{17}N_3BrCl$ requires C, 41.6; H, 4.9; N, 20.2 %); δ_H (D_2O , 200 MHz) 0.66 and 0.76 (6H, 2xd, $J=7$ Hz, 2xMe), 1.88 (1H, m, $CHMe_2$), 4.78 (1H, d, $J=3$ Hz, H-2), 7.18 and 7.56 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 310, 312 ($M.H^+$).

1-(4'-Bromophenyl)-2-butyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $Ar = 4-BrC_6H_4$; $R^1 = H$; $R^2 = nBu$; $X = Cl$)

1.57 g, yield 87% (5 mmol scale); δ_H (D_2O , 200 MHz) 0.62 (3H, t, $J = 6$ Hz, CH_3), 1.08 (4H, m, 2x CH_2), 1.55 (2H, m, CH_2), 4.90 (1H, dd, $J = 6, 4$ Hz, H-2), 7.16 and 7.56 (2x2H, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 324, 326 ($M.H^+$).

1-(4'-Bromophenyl)-2-phenyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $Ar = 4-BrC_6H_4$; $R^1 = H$; $R^2 = Ph$; $X = Cl$)

1.77 g, yield 93 % (5 mmol scale); Found C, 47.4; H, 4.0; N, 18.4 % ($C_{15}H_{15}N_3BrCl$ requires C, 47.3; H, 4.0; N, 18.4 %); δ_H (D_2O , 200 MHz) 5.88 (1H, s, H-2), 6.88 and 7.34 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H), 7.16 (5H, m, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 344, 346 ($M.H^+$).

1-(4'-Bromophenyl)-2-cyclohexyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $Ar = 4-BrC_6H_4$; $R^1 = H$; $R^2 = cHex$; $X = Cl$)

1.73 g, yield 90% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.95 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$), 1.24 (1H, m, CH_2), 1.58 (6H, m, $3\times\text{CH}_2$), 4.70 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 7.20 and 7.58 (2x2H, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 351 (M.H^+).

1-(4'-Methylphenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{Me}$; $\text{R}^2 = \text{Me}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

15.9 g, yield 59 % (100 mmol scale); Found C, 50.4; H, 6.9; N, 24.1 % ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{Cl} + \text{H}_2\text{O}$ requires C, 50.4; H, 7.0; N, 24.5 %); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 1.26 (6H, s, $2\times\text{Me}$), 2.20 (3H, s, Me-4'), 7.08 and 7.25 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 232 (100 %, M.H^+).

1-(4'-Methylphenyl)-2-methyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Me}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.68 g, yield 27 % (10 mmol scale); Found C, 43.8; H, 6.20; N, 22.8 % ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{Cl} + \text{HCl} + 0.7\text{H}_2\text{O}$ requires C, 43.6; H, 6.12; N, 23.1 %); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 1.18 (3H, d, $J=6.5$ Hz, Me-2), 2.15 (3H, s, Me-4'), 5.05 (1H, q, $J=6.5$ Hz, H-2), 7.08 and 7.20 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 218 (M.H^+).

1-(4'-Methylphenyl)-2-ethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Et}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

2.07 g, yield 77 % (10 mmol scale); Found C, 53.8; H, 6.6; N, 26.1 % ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{Cl}$ requires C, 53.8; H, 6.8; N, 26.2 %); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.72 (3H, t, $J=6$ Hz, CH_3), 1.65 (2H, m, CH_2), 2.18 (3H, s, Me-4'), 4.94 (1H, dd, $J=6.5$ Hz, H-2), 7.15 and 7.25 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 232 (M.H^+).

1-(4'-Methylphenyl)-2-propyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Pr}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.18 g, yield 83 % (5 mmol scale); Found C, 49.5; H, 6.8; N, 21.9 % ($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{Cl} + \text{HCl}$ requires C, 49.1; H, 6.6; N, 22.0 %); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.64 (3H, t, $J=7$ Hz, CH_3), 1.15 (2H, m, CH_2CH_3), 1.60 (2H, m, CH_2CH_2), 2.18 (3H, s, Me-4'), 4.94 (1H, dd, $J=6.4$ Hz, H-2), 7.12 and 7.22 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 246 (M.H^+).

1-(4'-Methylphenyl)-2-isopropyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{iPr}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.19 g, yield 85 % (5 mmol scale); Found C, 47.5; H, 6.8; N, 20.2 % ($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{Cl} + \text{HCl} + \text{CH}_3\text{OH}$ requires C, 48.0; H, 7.2; N, 20.0 %); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.65 and 0.75 (6H, 2xd, $J=7$ Hz, $2\times\text{Me}$), 1.88 (1H, m, CHMe_2), 2.18 (3H, s, Me-4'), 4.82 (1H, d, $J=3$ Hz, H-2), 7.12 and 7.22 (2x2H, AB doublet, $J=8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 246 (M.H^+).

1-(4'-Methylphenyl)-2-butyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Bu}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.87 g, yield 59% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.62 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, CH_3), 1.08 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$), 1.58 (2H, m, CH_2), 2.20 (3H, s, CH_3 -4'), 4.92 (1H, dd, $J = 6, 4$ Hz, H-2), 7.12 and 7.22 ($2\times 2\text{H}$, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 260 (M.H^+).

1-(4'-Methylphenyl)-2-phenyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Ph}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.85 g, yield 58 % (10 mmol scale); Found C, 60.9; H, 5.5; N, 22.1 % ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{Cl}$ requires C, 60.8; H, 5.8; N, 22.2 %); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 2.16 (3H, s, Me-4'), 5.96 (1H, s, H-2), 6.94 and 7.12 ($2\times 2\text{H}$, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H), 7.30 (5H, m, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 280 (M.H^+).

1-(4'-Methylphenyl)-2-cyclohexyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{cHex}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.94 g, yield 59% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.94 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$), 1.21 (1H, m, CH_2), 1.58 (6H, m, $3\times\text{CH}_2$), 2.20 (3H, s, CH_3 -4'), 4.68 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 7.12 and 7.22 ($2\times 2\text{H}$, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 286 (M.H^+).

1-(4'-Ethylphenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-EtC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{Me}$; $\text{R}^2 = \text{Me}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.34 g, yield 48 % (10 mmol scale); Found C, 54.1; H, 6.9; N, 24.6 % ($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{Cl} + 0.3 \text{H}_2\text{O}$ requires C, 54.2; H, 7.2; N, 24.3 %); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 1.02 (3H, t, $J = 7$ Hz, CH_3CH_2), 1.25 (6H, s, $2\times\text{Me}$), 2.25 (2H, q, $J = 7$ Hz, CH_3CH_2), 7.10 and 7.24 ($2\times 2\text{H}$, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 246 (M.H^+).

1-(4'-Ethylphenyl)-2-methyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-EtC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Me}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.58 g, yield 43% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 1.01 (3H, t, $J = 7$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 1.16 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, 2-CH_3), 2.05 (2H, q, $J = 7.4$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 4.93 (1H, q, $J = 6.4$ Hz, H-2), 7.13 and 7.24 ($2\times 2\text{H}$, AB doublet, $J = 8.2$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 232 (M.H^+).

1-(4'-Ethylphenyl)-2-propyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-EtC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Pr}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.93 g, yield 63% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.70 (3H, t, $J = 6$ Hz, $2\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 1.04 (3H, t, $J = 6$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 1.24 (2H, m, $2\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 1.56 (2H, m, $2\text{-CH}_2\text{CH}_2$), 2.56 (2H, q, $J = 7$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 4.86 (1H, dd, $J = 6, 4$ Hz, H-2), 7.18 and 7.28 ($2\times 2\text{H}$, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 260 (M.H^+).

1-(4'-Ethylphenyl)-2-isopropyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-EtC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{iPr}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.92 g, yield 62% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.70 and 0.84 (6H, 2xd, $J = 6$ Hz, $2\times\text{CH}_3$), 1.05 (3H, t, $J = 6$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 1.98 (1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.54 (2H, q, $J = 6.4$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 4.86 (1H, d, $J = 3$ Hz, H-2), 7.22 and 7.32 ($2\times 2\text{H}$, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 260 (M.H^+).

1-(4'-Ethylphenyl)-2-butyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-EtC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Bu}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.83 g, yield 54% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.66 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, 2-CH_3), 1.06 (3H, t, $J = 7$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 1.12 (4H, m, $2'\text{-}2\times\text{CH}_2$), 1.62 (2H, m, $2'\text{-CH}_2$), 2.54 (2H, q, $J = 6.4$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 4.96 (1H, dd, $J = 6.4, 4$ Hz, H-2), 7.18 and 7.28 ($2\times 2\text{H}$, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 274 (M.H^+).

1-(4'-Ethylphenyl)-2-phenyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-EtC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Ph}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.28 g, yield 78% (5 mmol scale); Found C, ; H, ; N, % ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{Cl}$ requires C, 61.9; H, 6.1; N, 21.2%); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.91 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 2.36 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 5.95 (1H, s, H-2), 6.87 and 7.03 ($2\times 2\text{H}$, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H), 7.17 (5H, s, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 294 (M.H^+).

1-(4'-Ethylphenyl)-2-cyclohexyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 4\text{-EtC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Hex}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.40 g, yield 24% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.96 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$), 1.04 (3H, t, $J = 7$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 1.22 (1H, m, CH-2), 1.58 (6H, m, $3\times\text{CH}_2$), 2.54 (2H, q, $J = 6.4$ Hz, $4'\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 4.68 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 7.18 and 7.28 ($2\times 2\text{H}$, AB doublet, $J = 8$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 300 (M.H^+).

1-Phenyl-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = \text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^1 = \text{Me}$; $\text{R}^2 = \text{Me}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.69 g, yield 67 % (10 mmol scale); Found 51.9; H, 7.0; N, 27.7 % ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{Cl}$ requires C, 52.0; H, 6.4; N, 27.6 %); δ_{H} (D_2O , 400 MHz) 1.45 (6H, s, $2\times\text{Me}$), 7.40 and 7.55 (2xm, 5H, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 218 (100 %, M.H^+).

1-Phenyl-2-methyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = \text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Me}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.61 g, yield 51% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 1.16 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH_3 -2), 4.96 (1H, q, $J = 6$ Hz, H-2), 7.20 and 7.36 (5H, 2xm, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 204 (M.H^+).

1-Phenyl-2-ethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = \text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Et}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.47 g, yield 37% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.72 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, CH_3CH_2 -2), 1.54 (2H, m, $2\text{-CH}_3\text{CH}_2$), 4.84 (1H, dd, $J = 6.4, 4$ Hz, H-2), 7.22 and 7.36 (5H, 2xm, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 218 (M.H^+).

1-Phenyl-2-propyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride(I; Ar = C₆H₅; R¹ = H; R² = ⁿPr; X = Cl)0.50 g, yield 38% (5 mmol scale); δ_H (D₂O, 200 MHz) 0.66 (3H, t, J = 7 Hz, CH₃CH₂), 1.18 (2H, m, CH₃CH₂), 1.52 (2H, m, CH₂CH₂), 4.86 (1H, dd, J = 6.4, 4 Hz, H-2), 7.22 and 7.36 (5H, 2xm, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 232 (M.H⁺).*1-Phenyl-2-isopropyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = C₆H₅; R¹ = H; R² = ⁱPr; X = Cl)0.43 g, yield 32% (5 mmol scale); δ_H (D₂O, 200 MHz) 0.64 and 0.78 (6H, 2xd, J = 6.8 Hz, 2xCH₃), 1.90 (1H, m, CH(CH₃)₂), 4.76 (1H, d, J = 3.2 Hz, H-2), 7.26 and 7.38 (5H, 2xm, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 232 (M.H⁺).*1-Phenyl-2-butyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = C₆H₅; R¹ = H; R² = ⁿBu; X = Cl)0.25 g, yield 18% (5 mmol scale); δ_H (D₂O, 200 MHz) 0.62 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH₃), 1.10 (4H, m, 2xCH₂), 1.54 (2H, m, CH₂), 4.88 (1H, dd, J = 6, 4 Hz, H-2), 7.22 and 7.36 (5H, 2xm, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 246 (M.H⁺).*1-Phenyl-2-cyclohexyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*0.93 g, yield 60% (5 mmol scale); δ_H (D₂O, 200 MHz) 0.94 (4H, m, 2xCH₂), 1.21 (1H, m, CH-2), 1.57 (6H, m, 3xCH₂), 4.74 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 7.26 and 7.40 (5H, 2xm, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 272 (M.H⁺).*1-Phenyl-2-phenyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = C₆H₅; R¹ = H; R² = Ph; X = Cl)δ_H (D₂O, 200 MHz) 5.88 (1H, s, H-2), 7.00 and 7.20 (10H, 2xm, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 266 (M.H⁺).*1-(3'-Chlorophenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = 3-ClC₆H₄; R¹ = Me; R² = Me; X = Cl)0.86 g, yield 60 % (5 mmol scale); Found C, 44.9; H, 5.5; N, 23.4 % (C₁₁H₁₃N₅Cl₂+0.4 H₂O requires C, 44.7; H, 5.4; N, 23.7 %); δ_H (D₂O, 200 MHz) 1.30 (6H, s, 2xMe), 7.10-7.50 (m, 4H, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 252 (M.H⁺).*1-(3'-Chlorophenyl)-2-methyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = 3-ClC₆H₄; R¹ = H; R² = Me; X = Cl)0.24 g, yield 18 % (5 mmol scale, using ^tPrOH as solvent, very poor yield when MeOH or EtOH was used.); Found C, 43.9; H, 4.7; N, 25.4 % (C₁₀H₁₃N₅Cl₂ requires C, 43.8; H, 4.8; N, 25.6 %); δ_H (D₂O, 200 MHz) 1.18 (3H, d, J=6 Hz, Me-2), 4.98 (1H, q, J=6 Hz, H-2), 7.20 and 7.35 (m, 4H, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 238 (M.H⁺).*1-(3'-Chlorophenyl)-2-ethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride*(I; Ar = 3-ClC₆H₄; R¹ = H; R² = Et; X = Cl)

1.38 g, yield 96% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.76 (3H, t, $J = 7$ Hz, CH_3CH_2 -2), 1.68 (2H, m, CH_3CH_2 -2), 4.98 (1H, dd, $J = 6.5$, 4 Hz, H-2), 7.24 and 7.40 (m, 4H, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 252 (M.H^+).

1-(3'-Chlorophenyl)-2-propyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 3\text{-ClC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = n\text{Pr}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.18 g, yield 78% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.68 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, CH_3CH_2), 1.18 (2H, m, CH_3CH_2), 1.60 (2H, m, CH_2CH_2), 4.96 (1H, dd, $J = 6.5$, 4 Hz, H-2), 7.22 and 7.38 (m, 4H, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 266 (M.H^+).

1-(3'-Chlorophenyl)-2-isopropyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 3\text{-ClC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = i\text{Pr}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.19 g, yield 79% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.66 and 0.76 (6H, 2xd, $J = 7$ Hz, $2\times\text{CH}_3$), 1.90 (1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.76 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 7.22 and 7.36 (m, 4H, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 266 (M.H^+).

1-(3'-Chlorophenyl)-2-butyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 3\text{-ClC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = n\text{Bu}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.04 g, yield 66% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.62 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH_3), 1.08 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$), 1.60 (2H, m, CH_2), 4.94 (1H, dd, $J = 6.8$, 4 Hz, H-2), 7.20 and 7.36 (m, 4H, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 280 (M.H^+).

1-(3'-Chlorophenyl)-2-cyclohexyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 3\text{-ClC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = c\text{Hex}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.82 g, yield 48% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.96 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$), 1.24 (1H, m, CH -2), 1.61 (6H, m, $3\times\text{CH}_2$), 4.74 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 7.25 and 7.39 (m, 4H, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 306 (M.H^+).

1-(3'-Chlorophenyl)-2-phenyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 3\text{-ClC}_6\text{H}_4$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Ph}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.51 g, yield 90 % (5 mmol scale); Found C, 46.9; H, 4.4; N, 18.0 % ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O}$ requires C, 46.4; H, 4.2; N, 18.0 %); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 5.95 (1H, s, H-2), 6.90-7.30 (m, 9H, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 300 (M.H^+).

1-(2',4'-Dichlorophenyl)-2-methyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Me}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.63 g, yield 41% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 1.08 and 1.18 (3H, 2xd, $J = 7$ Hz, CH_3 -2 minor and major atropomer), 4.94 and 5.05 (1H, 2xq, $J = 6$ Hz, H-2 major and minor), 7.32 and 7.56 (3H, s, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 272 (M.H^+).

1-(2',4'-Dichlorophenyl)-2-ethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Et}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.49 g, yield 93% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.69 and 0.72 (3H, 2xt, $J = 7$ Hz, CH_3CH_2 -2 minor and major atropomer), 1.53 and 1.62 (2H, 2xm, CH_3CH_2 -2 minor and major), 4.72 and 4.88 (1H, 2xdd, $J = 6, 4$ Hz, H-2 major and minor), 7.32 and 7.56 (3H, 2xs, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 286 (M.H^+).

1-(2',4'-Dichlorophenyl)-2-propyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = n\text{Pr}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.26 g, yield 75% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.64 and 0.68 (3H, 2xt, $J = 7$ Hz, CH_3CH_2 minor and major atropomer), 1.18 (2H, m, CH_3CH_2), 1.52 (2H, m, CH_2CH_2), 4.74 and 4.91 (1H, 2xdd, $J = 6, 4$ Hz, H-2 major and minor), 7.32 and 7.56 (3H, 2xs, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 300 (M.H^+).

1-(2',4'-Dichlorophenyl)-2-isopropyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = i\text{Pr}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.51 g, yield 92% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.68 and 0.78 (6H, 2xd, $J = 7$ Hz, $2\times\text{CH}_3$), 1.92 (1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.79 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 7.32 and 7.58 (3H, 2xs, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 300 (M.H^+).

1-(2',4'-Dichlorophenyl)-2-butyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = n\text{Bu}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

0.88 g, yield 50% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.58 and 0.64 (3H, 2xt, $J = 7$ Hz, CH_3 minor and major atropomer), 1.12 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$), 1.58 (2H, m, CH_2), 4.78 and 4.94 (1H, 2xdd, $J = 6.5, 4$ Hz, H-2 major and minor), 7.34 and 7.58 (3H, 2xs, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 314 (M.H^+).

1-(2',4'-Dichlorophenyl)-2-cyclohexyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = c\text{Hex}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.69 g, yield 90% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.99 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$), 1.26 (1H, m, CH -2), 1.60 (6H, m, $3\times\text{CH}_2$), 4.66 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 7.35 and 7.60 (3H, 2xs, aromatic C-H).

1-(2',4'-Dichlorophenyl)-2-phenyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Ph}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

1.38 g, yield 74% (5 mmol scale); δ_{H} (DMSO-d_6 , 200 MHz) 5.72 and 6.20 (1H, 2xs, H-2 major and minor atropomer), 6.75 (1H, 2xs, NH), 7.20-8.00 (m, aromatic C-H); 9.10 and 9.25 (2xs, NH), m/z (MALDI-TOF) 334 (M.H^+).

1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2,2-dimethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; $\text{Ar} = 3,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$; $\text{R}^1 = \text{Me}$; $\text{R}^2 = \text{Me}$; $\text{X} = \text{Cl}$)

2.28 g, yield 71 % (10 mmol scale); Found C, 40.8; H, 4.3; N, 21.4 % ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Cl}_3$ requires C, 41.0; H, 4.4; N, 21.7 %); δ_{H} (D_2O , 400 MHz) 1.38 (6H, s, $2\times\text{Me}$), 7.26 (1H, dd, $J = 8.5, 2.6$ Hz, aromatic-CH), 7.60 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, aromatic CH), 7.65 (d, 1H $J = 8.5$ Hz, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 286 (M.H^+).

*1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2-methyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride**(I; Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃; R¹ = H; R² = Me; X = Cl)*

2.24 g, yield 76 % (10 mmol scale); Found C, 33.4; H, 4.3; N, 19.0 % (C₁₀H₁₂N₃Cl₃ + HCl + H₂O requires C, 33.1; H, 4.2; N, 19.3 %); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 1.18 (3H, d, $J=6.5$ Hz, Me), 5.04 (1H, q, $J=6.5$ Hz, H-2), 7.15 (1H, dd, $J=8.5, 2.6$ Hz, aromatic C-H) and 7.50 (2H, m, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 272 (100 %, M.H⁺).

*1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2-ethyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride**(I; Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃; R¹ = H; R² = Et; X = Cl)*

1.28 g, yield 91 % (4.5 mmol scale); Found C, 40.8; H, 4.4; N, 21.7 % (C₁₁H₁₄N₃Cl₃ requires C, 40.8; H, 4.4; N, 21.7 %); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.72 (3H, t, $J=7$ Hz, CH₃), 1.56 (2H, m, CH₂), 4.84 (1H, dd, $J=6.4$ Hz, H-2), 7.18 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz, aromatic C-H) and 7.52 (2H, m, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 286 (100 %, M.H⁺).

*1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2-propyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride**(I; Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃; R¹ = H; R² = ⁿPr; X = Cl)*

1.21 g, yield 82% (4.4 mmol scale); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.72 (3H, t, $J=7$ Hz, CH₃CH₂), 1.20 (2H, m, CH₃CH₂), 1.58 (2H, m, CH₂CH₂), 4.91 (1H, dd, $J=6, 4$ Hz, H-2), 7.22 (1H, dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, aromatic C-H) and 7.56 (2H, m, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 300 (M.H⁺).

*1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2-isopropyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride**(I; Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃; R¹ = H; R² = ⁱPr; X = Cl)*

1.17 g, yield 79% (4.4 mmol scale); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.70 and 0.80 (6H, 2xd, $J=7$ Hz, 2xCH₃), 1.92 (1H, m, CH(CH₃)₂), 4.79 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2), 7.25 (1H, dd, $J=8.5, 2.4$ Hz, aromatic C-H) and 7.58 (2H, m, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 300 (M.H⁺).

*1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2-butyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride**(I; Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃; R¹ = H; R² = ⁿBu; X = Cl)*

1.50 g, yield 97% (4.4 mmol scale); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.66 (3H, t, $J=6.8$ Hz, CH₃), 1.12 (4H, m, 2xCH₂), 1.60 (2H, m, CH₂), 4.94 (1H, dd, $J=6, 4$ Hz, H-2), 7.22 (1H, dd, $J=8.5, 2.5$ Hz, aromatic C-H) and 7.56 (2H, m, aromatic C-H); m/z (MALDI-TOF) 314 (M.H⁺).

*1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2-pentyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride**(I; Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃; R¹ = H; R² = ⁿC₅H₁₁; X = Cl)*

0.83 g, yield 45% (5 mmol scale); δ_{H} (D₂O, 200 MHz) 0.63 (3H, t, $J=6.5$ Hz, CH₃), 1.12 (6H, m, 3xCH₂), 1.57 (2H, m, CH₂), 4.91 (1H, dd, $J=6, 4$ Hz, H-2), 7.21 (1H, dd, $J=8.6, 2.4$ Hz, aromatic C-H) and 7.54 (2H, m, aromatic C-H).

*1-(3',4'-dichlorophenyl)-2-heptyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride**(I; Ar = 3,4-Cl₂C₆H₃; R¹ = H; R² = ⁿC₇H₁₅; X = Cl)*

0.16 g, yield 8% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 0.63 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, CH_3), 1.01 (10H, m, $5 \times \text{CH}_2$), 1.53 (2H, m, CH_2), 4.88 (1H, dd, $J = 6, 4$ Hz, H-2), 7.22 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, aromatic C-H) and 7.53 (2H, m, aromatic C-H).

1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2-cyclohexyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 3,4- $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Hex}$; X = Cl)

1.52 g, yield 81% (5 mmol scale); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 1.01 (4H, m, $2 \times \text{CH}_2$), 1.26 (1H, m, CH_2), 1.60 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 4.72 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 7.22 (1H, dd, $J = 6, 4$ Hz, aromatic C-H) and 7.56 (2H, m, aromatic C-H).

1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2-phenyl-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine hydrochloride

(I; Ar = 3,4- $\text{Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3$; $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{Ph}$; X = Cl)

1.17 g, yield 63 % (5 mmol scale); Found C, 48.7; H, 4.0; N, 18.7 % ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Cl}_2$ requires C, 48.6; H, 3.8; N, 18.9 %); δ_{H} (D_2O , 200 MHz) 5.92 (1H, s, H-2), 6.90 (1H, dd, $J = 8.0, 2.5$ Hz, aromatic-CH), 7.10-7.30 (7H, m, aromatic CH); m/z (MALDI-TOF) 334 (M.H^+).

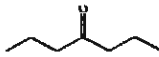
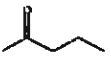
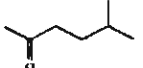
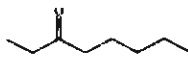
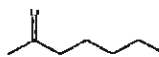
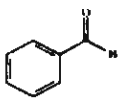
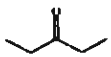
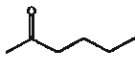
8.5 General procedure for synthesis of combinatorial library of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine by modified-three component synthesis.

To suspension of the mixture of arylbiguanide.HCl in absolute MeOH (5 mL) containing carbonyl ketone or aldehyde (5 mmol) was added the triethyl orthoacetate (0.75 mL) and conc.HCl (0.023 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature until a negative biguanide test was obtained (24-120hr). The residue from evaporation of the solvent was triturated with acetone/ether, filtered and washed with ether. The solid precipitate was air dried and recrystallized from methanol/ether if necessary.

8.6 General procedure for synthesis of combinatorial library of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine by two component synthesis.

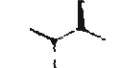
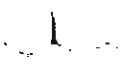
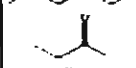
To suspension of the mixture of arylbiguanide.HCl (4-H,4-Me,4-Cl,4-Br,4-Et and 3,4Cl₂-Ph) in absolute MeOH (5 mL) containing the ketone or aldehyde (5 mmol) was added triethyl orthoacetate (0.75 mL) and conc.HCl (0.023 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature until a negative biguanide test was obtained (24-120hr). The residue from evaporation of the solvent was triturated and washed with ether. The solid was collected by filtration and air dried. The data were collected in Table 8.1, Table 8.2 and Appendix 1

Table 8.1 Synthesis data of combinatorial libraries when mixture of biguanide is 4-H,4-Me,4-Cl,4-Br,4-Et and 3,4-Cl₂ Phenylbiguanide.

no.	carbonyl compound	reaction time (hr)	MW.(Ave.).HCl(cal)		weight(g).HCl		%yield
			biguanide	cycloguanil	biguanide	cycloguanil	
1		120	251.06	346.1454	0.2512	0.2776	80
2		125	251.06	318.1141	0.251	0.2314	73
3		120	251.06	360.1611	0.251	0.2903	81
4		120	251.06	290.5662	0.251	0.2328	80
5		72	251.06	318.1141	0.2509	0.2514	79
6		72	251.06	346.1454	0.2511	0.2855	82
7		72	251.06	360.1611	0.2509	0.3255	90
8		72	251.06	346.1454	0.2515	0.2872	82
9		24	251.06	332.1298	0.2513	0.3136	94
10		113	251.06	331.4344	0.2511	0.3312	100
11		113	251.06	318.1141	0.2511	0.2992	94
12		123	251.06	330.1141	0.2512	0.3246	98
13		113	251.06	332.1298	0.2513	0.3123	93
14		48	251.06	304.0985	0.2512	0.2511	82
15*		20*	251.06	305.5985	0.251	0.2450	80
16		72	251.06	316.0985	0.2515	0.2788	88

* Isopropanol was used and no triethyl orthoacetate in reaction.

Table 8.2 m/z (ESI or MALDI-TOF) data of sublibraries of 4,6-dihydro-1,3,5-triazines

no.	carbonyl compounds	4-H		4-Me		4-Cl		4-Br		4-Et		3,4-Cl ₂	
		M.H ⁺	M.H ⁺	M.H ⁺	M.H ⁺	M.H ⁺	M.H ⁺	M.H ⁺	M.H ⁺	M.H ⁺	M.H ⁺	M.H ⁺	M.H ⁺
		obs.	cal.	obs.	cal.	obs.	cal.	obs.	cal.	obs.	cal.	obs.	cal.
1		273.0	274.2	287.0	288.2	307.0	308.2	351.0	352.1	302.0	302.2	341.0	342.1
2		246.0	246.2	260.0	260.2	279.2	280.1	324.0	324.1	274.0	274.2	314.0	314.1
3		288.3	288.2	302.3	302.2	322.3	322.2	366.2	366.1	316.3	316.3	356.3	356.1
4		218.0	218.1	232.0	232.2	251.9	252.1	296.0	296.1	246.0	246.2	287.0	286.0
5		246.0	246.2	260.4	260.2	280.0	280.1	324.0	324.1	274.4	274.2	314.0	314.1
6		274.4	274.2	288.4	288.2	308.4	308.2	352.0	352.1	302.4	302.2	342.0	342.1
7		287.9	288.2	301.8	302.2	320.9	321.2	365.9	366.1	315.9	316.3	355.9	356.1
8		273.9	274.2	287.9	288.2	308.1	308.2	352.1	352.1	301.9	302.2	342.1	342.1
9		260.1	260.2	274.1	274.2	294.0	294.1	338.1	338.1	288.1	288.2	328.0	328.1
10		266.3	266.1	280.4	280.2	300.3	300.1	344.1	344.1	294.4	294.2	334.3	334.1
11		245.0	246.2	259.0	260.2	280.0	280.1	324.0	324.1	274.0	274.2	314.0	314.1
12		257.0	258.2	271.0	272.2	291.0	292.1	335.0	336.1	286.0	286.2	325.0	326.1
13		259.0	260.2	273.0	274.2	293.0	294.1	338.0	338.1	287.0	288.2	327.0	328.1
14		232.2	231.2	246.2	246.2	266.2	266.1	310.2	310.1	260.3	260.2	301.1	300.1
15		204.0	204.1	218.0	218.1	237.9	238.1	281.9	282.0	232.0	232.2	271.9	272.0
16		243.9	244.2	257.9	258.2	278.0	278.1	322.0	322.1	271.9	272.2	312.0	312.1

^aAll sublibrary were analyzed by reverse phase hplc (mobile phase : triethylammoniumacetate 0.1 M pH7 : acetonitrile gradient from 15-60 %acetonitrile over a period of 15 min. All libraries showed only 6 major peaks corresponding to the dihydrotriazine products)

8.7 Enzyme assays and Inhibition by Cycloguanil Analogues

The activities of wild-type and A16VS108T mutant dihydrofolate reductase from *Plasmodium falciparum* were determined spectrophotometrically according to the literature method.⁵ The reaction (1 mL) contained 1 x DHFR buffer (50 mM TES, pH 7.0, 75 mM β -mercaptoethanol, 1 mg/mL bovine serum albumin), 100 μ L each of the substrate H_2 folate and cofactor NADPH, and an appropriate amount (0.001–0.005 units) of the affinity chromatography-purified enzymes. Inhibition of the enzymes by Cyc and its analogues was carried out by determination of the K_i values of the inhibitors for the enzymes by fitting to the equation $IC_{50} = K_i(1+[S]/K_m)^6$ where IC_{50} is the concentration of inhibitor which inhibits 50 % of the enzyme activity under the standard assay condition and K_m is the Michaelis constant for the substrate H_2 folate.

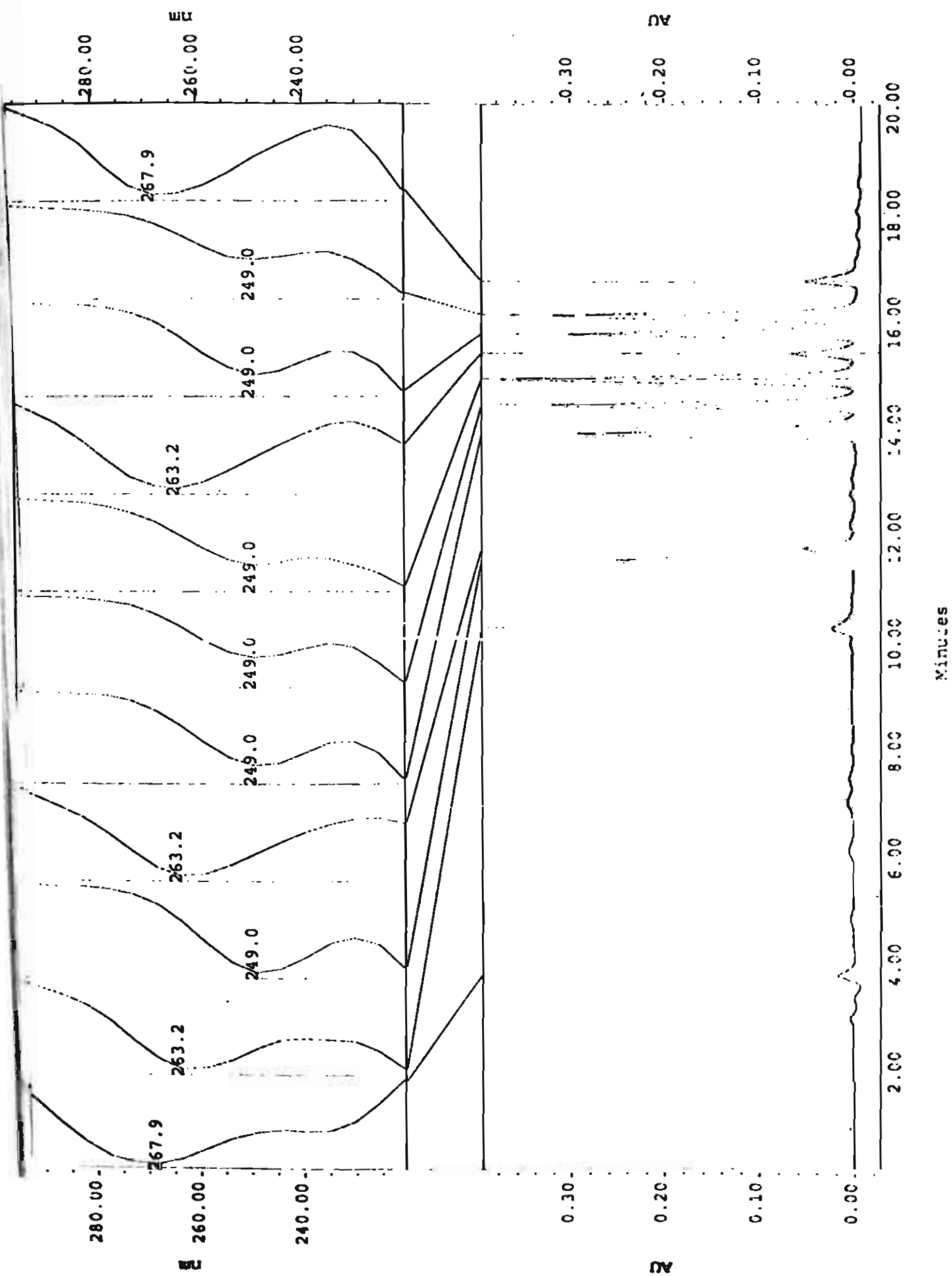
เอกสารอ้างอิงบทที่ 8

- ¹ H. C. Carrington, A. F. Crowther and G. J. Stacey, Synthetic Antimalarials. Part XLIX. The structure and synthesis of the dihydrotriazine metabolite of proguanil, *J. Chem. Soc.*, 1954, 1017-1031.
- ² E. J. Modest, Chemical and biological studies on 1,2-dihydro-s-triazines II. Three-component synthesis, *J. Org. Chem.*, 1956, **21**, 1-13.
- ³ E.J. Modest and P. Levine, Chemical and biological studies on 1,2-dihydro-s-triazines. III. Two-component synthesis, *J. Org. Chem.*, 1956, **21**, 14-21.
- ⁴ L.D. Colebrook, H.G. Giles, A. Rosowsky, W.E. Bentz, J.R. Fehlnr, Chemical and biological studies on 1,2-dihydro-s-triazines XIX. Nuclear magnetic resonance investigation of hindered internal rotation in 1-aryl derivatives, *Can. J. Chem.*, 1976, **54**, 3757-3765.
- ⁵ W. Sirawaraporn, P. Prapunwattana, R. Sirawaraporn, Y. Yuthavong, D.V. Santi, The dihydrofolate reductase domain of *Plasmodium falciparum* Thymidilate Synthase-Dihydrofolate Reductase, *J. Biol. Chem.*, 1993, **29**, 21637-21644.
- ⁶ H.I. Segel in Enzyme Kinetics : Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems, Wiley Interscience, New York, 1975.

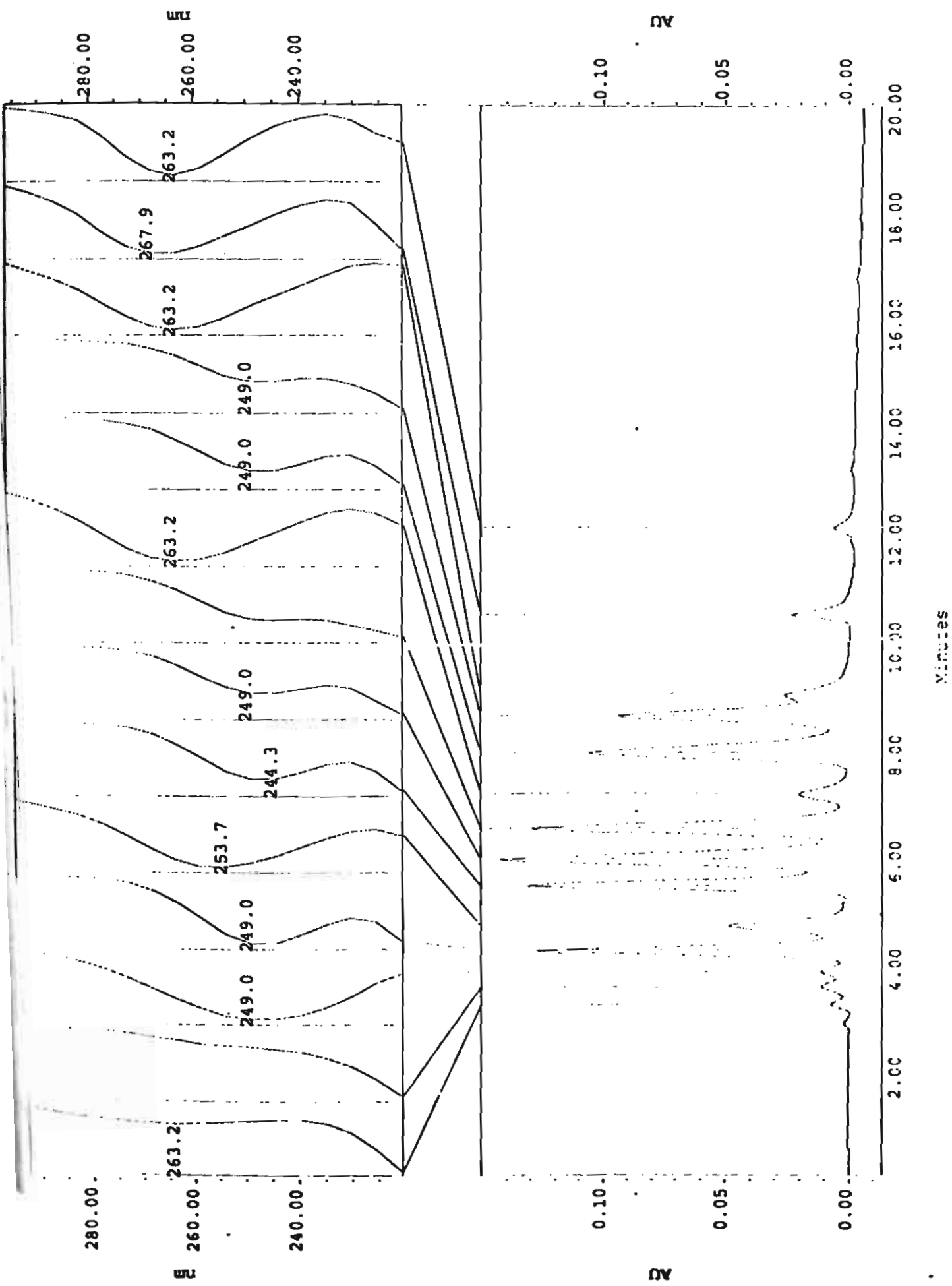
ภาคผนวก 1

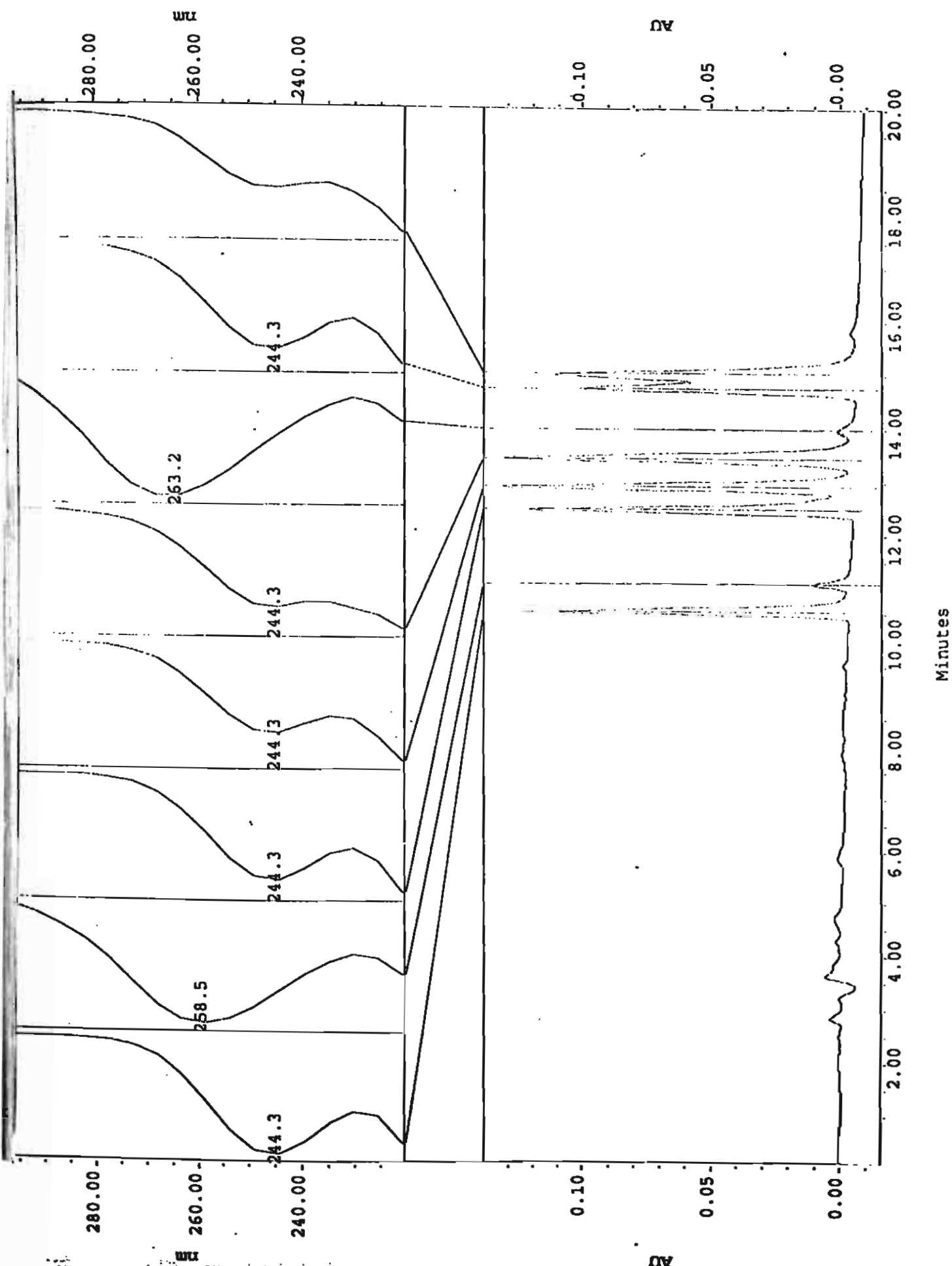
HPLC Chromatogram และ Mass Spectrum ของ คอมบิเนทอเรียลไลบรารี
ของ 4,6-ไดอะมิโน 1,2-ไดไฮโดร-1,3,5-ไตรอะซีน ที่สังเคราะห์ได้

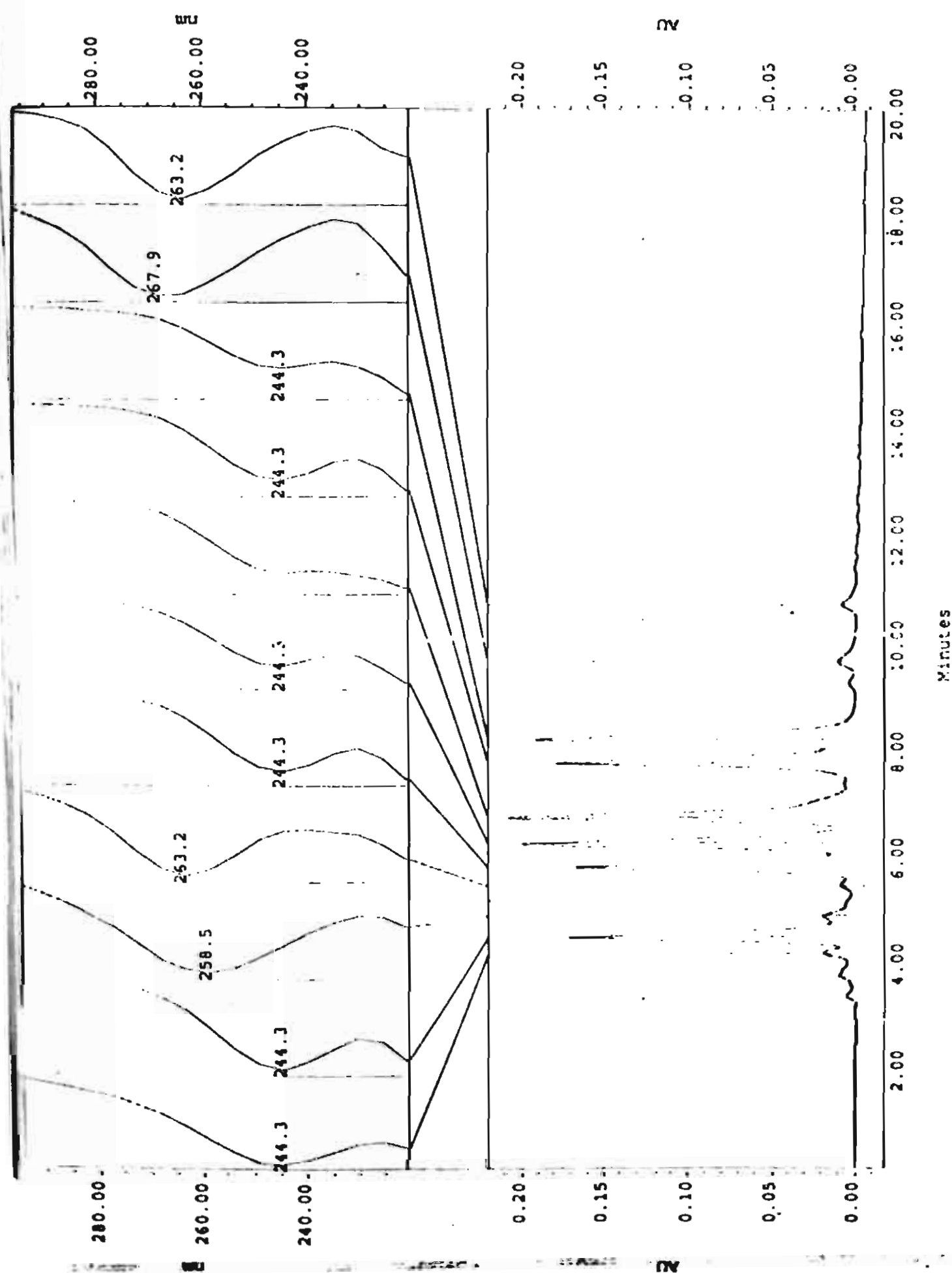
All sublibrary were analyzed by C-18 reverse phase hplc (mobile phase : triethylammonium acetate 0.1 M pH 7.0 + acetonitrile gradient from 15-60 %acetonitrile over a period of 15 min. In all cases only 6 major peaks corresponding to the dihydrotriazine products were detected)

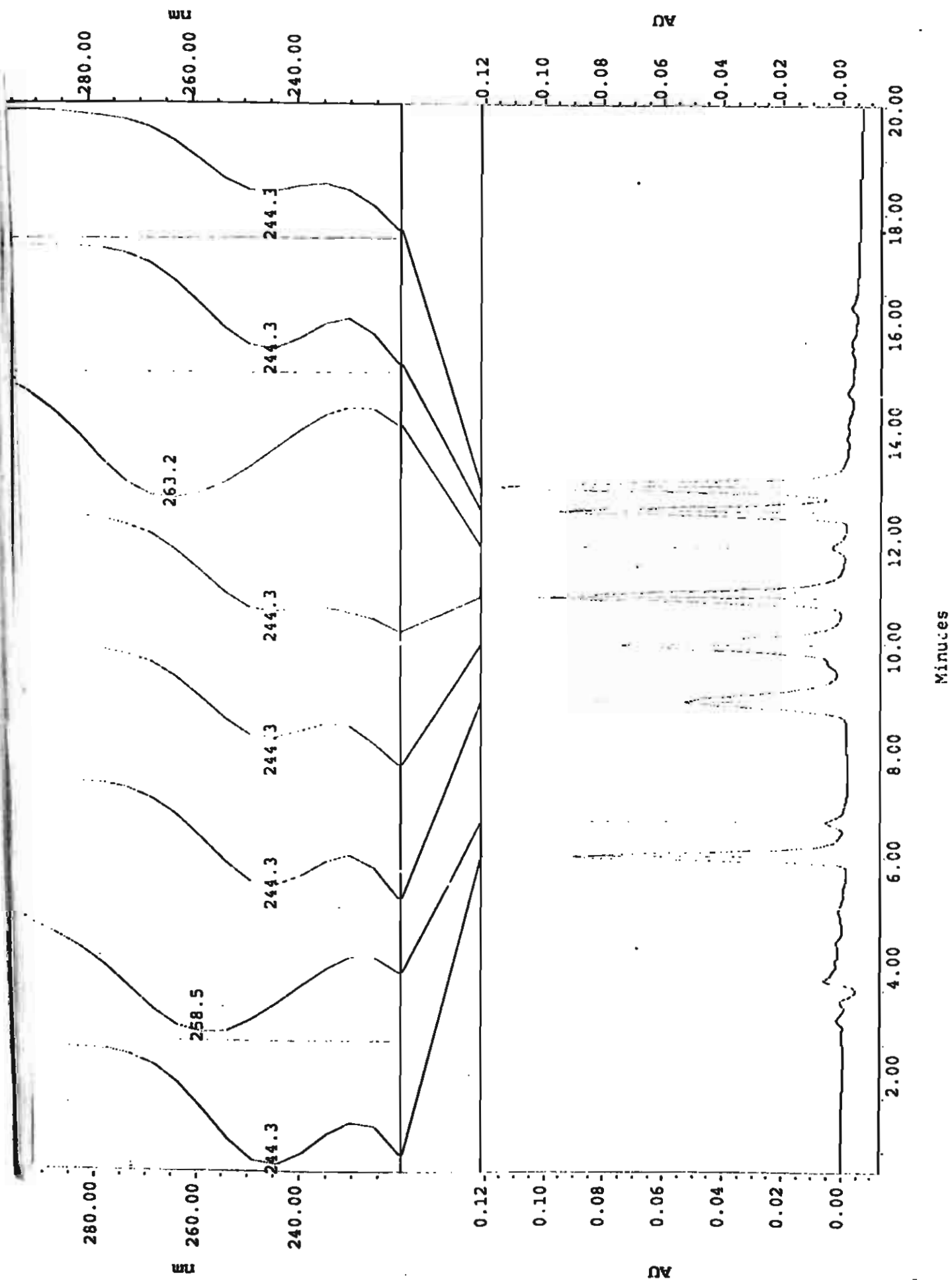


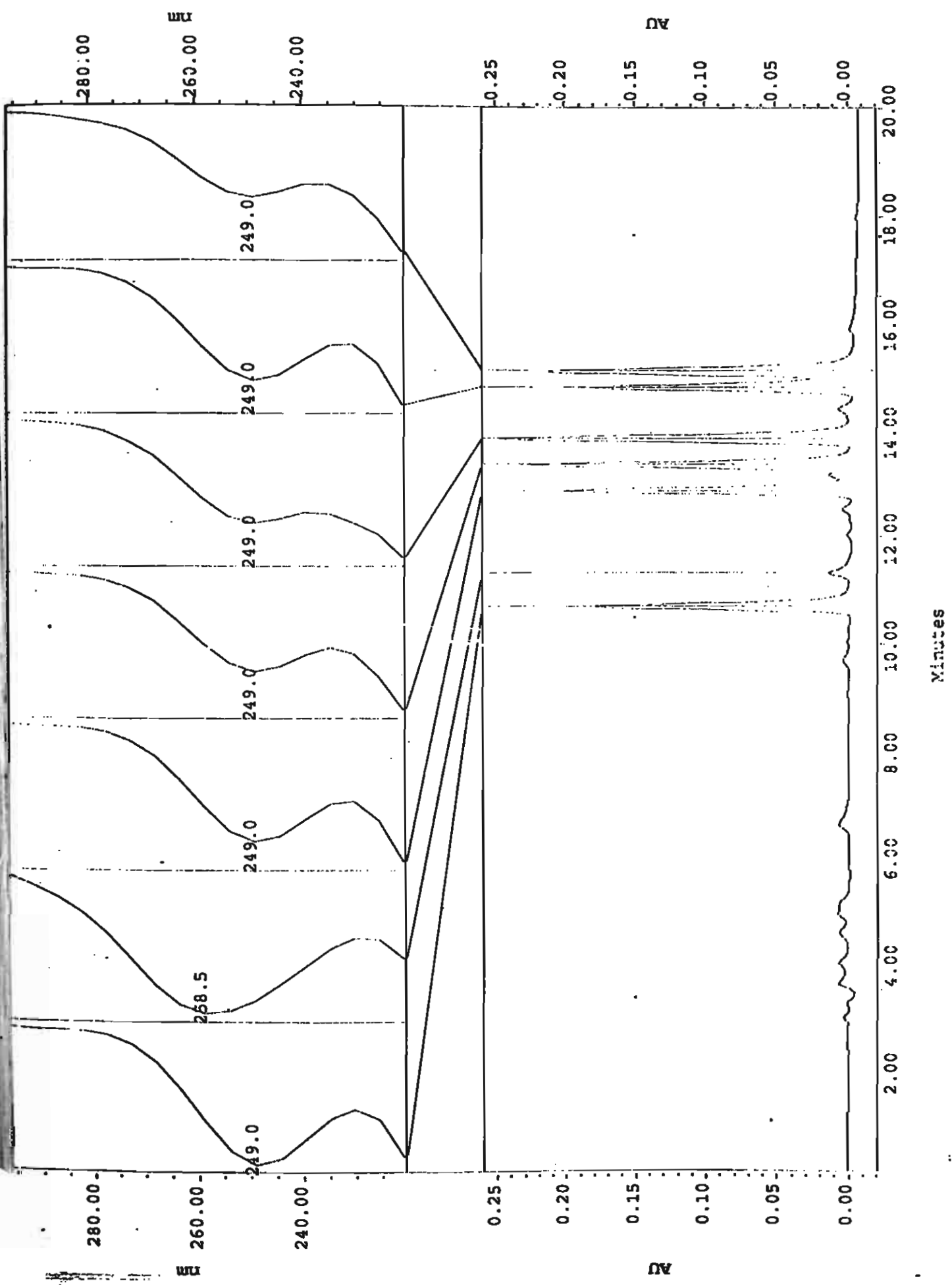
Millennium PCA Spectrum Index Plot - Sample Name: 00-27.17-607A, Wavelength: 254.0 nm



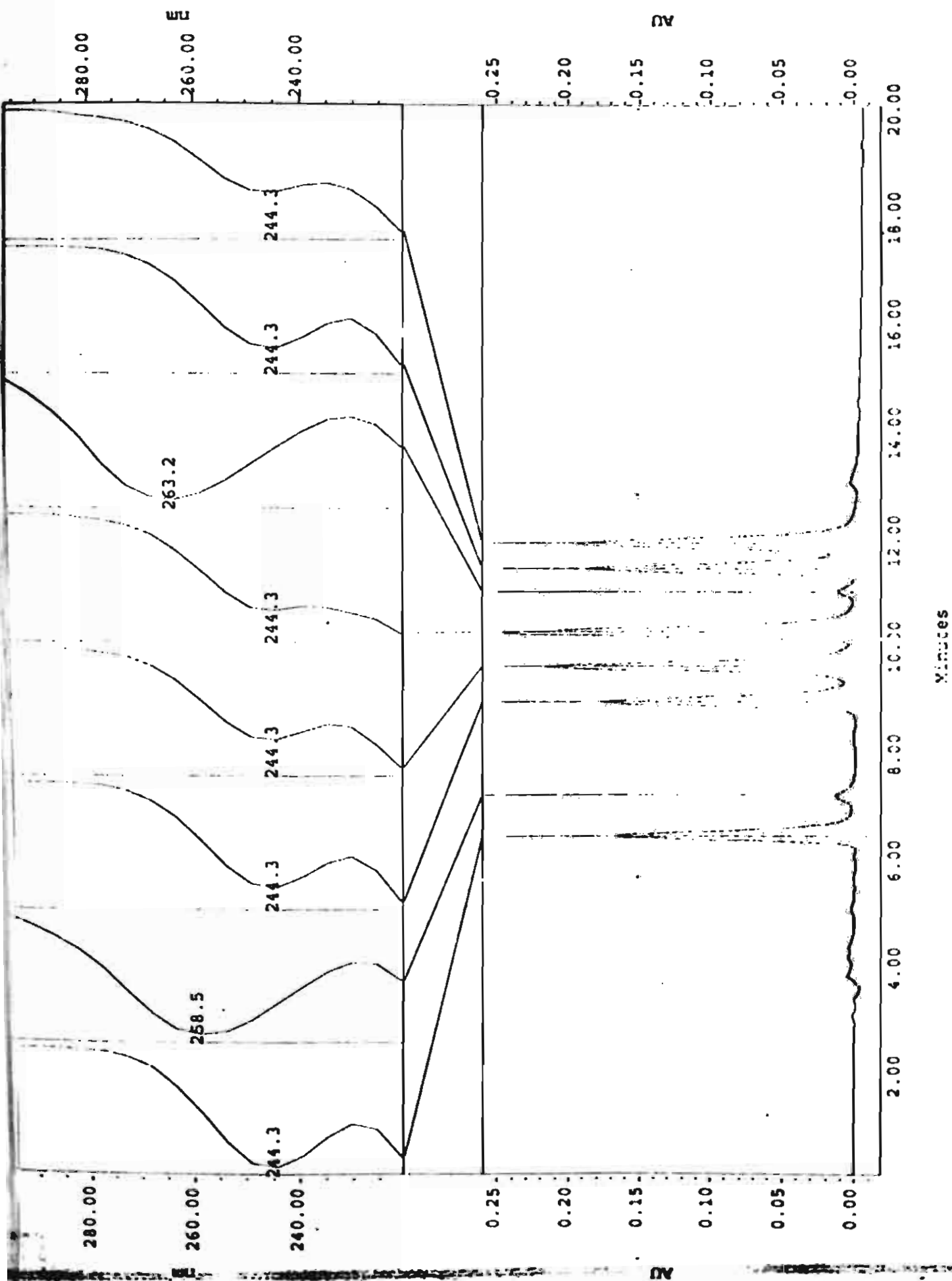


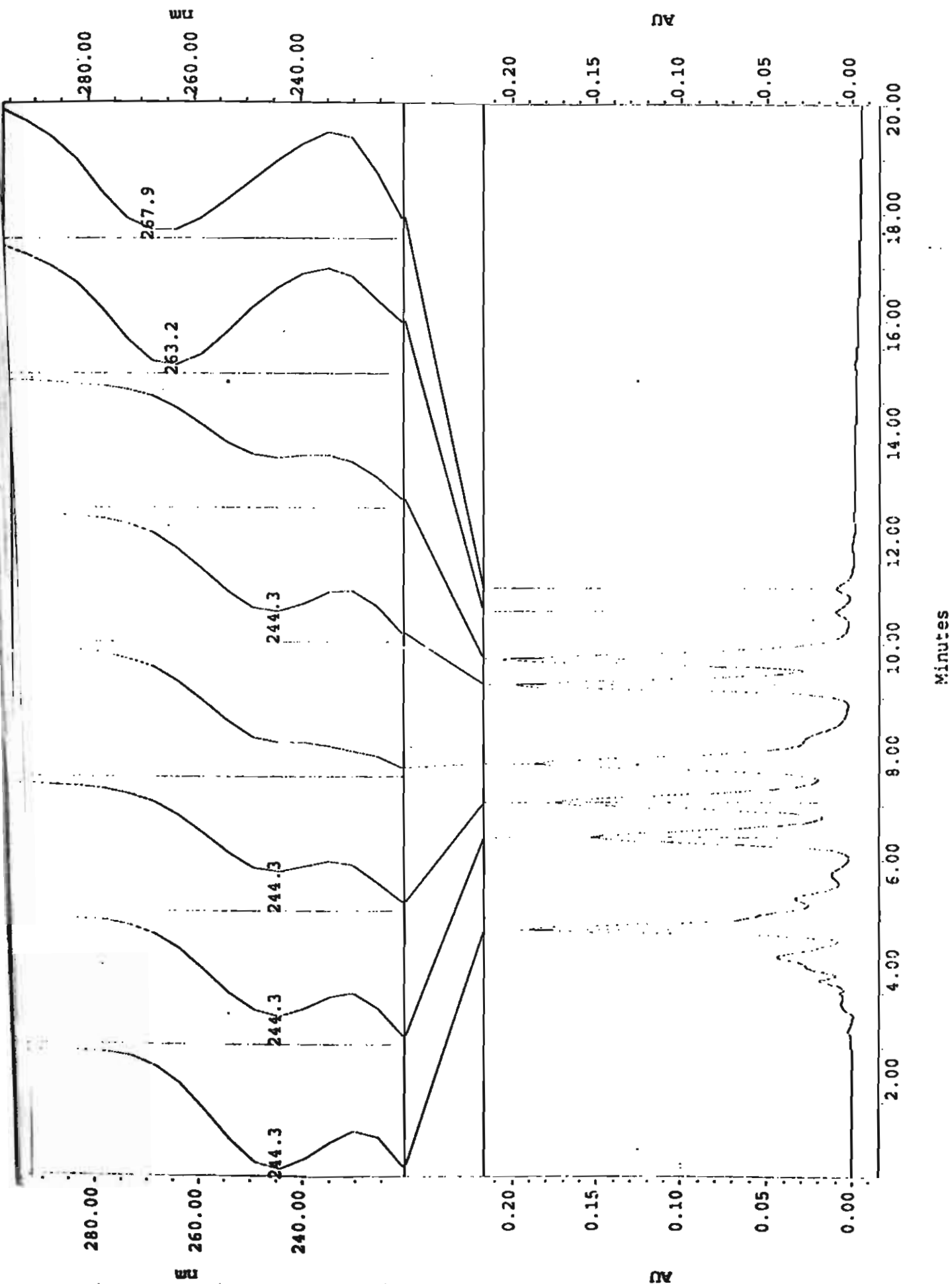


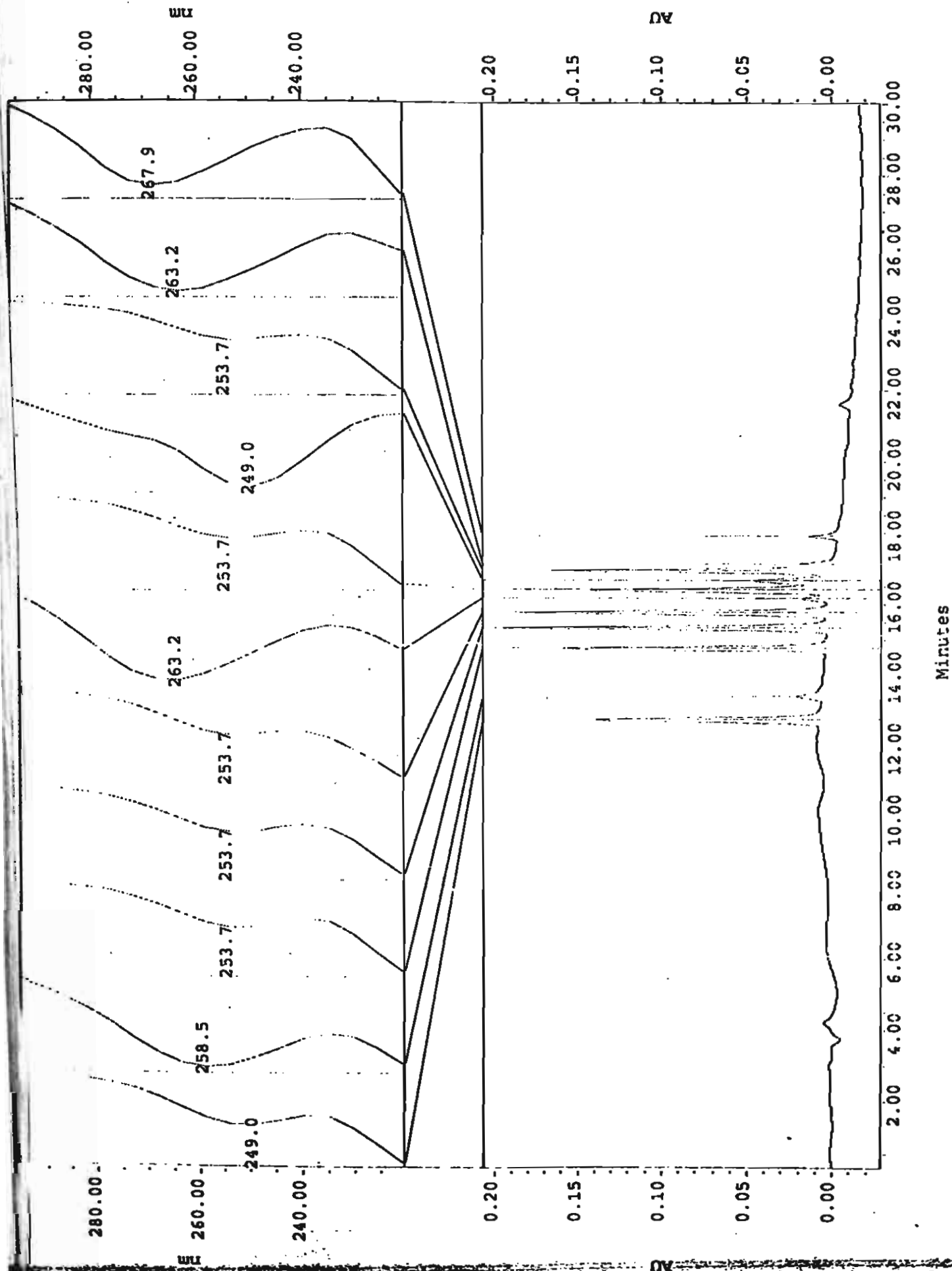


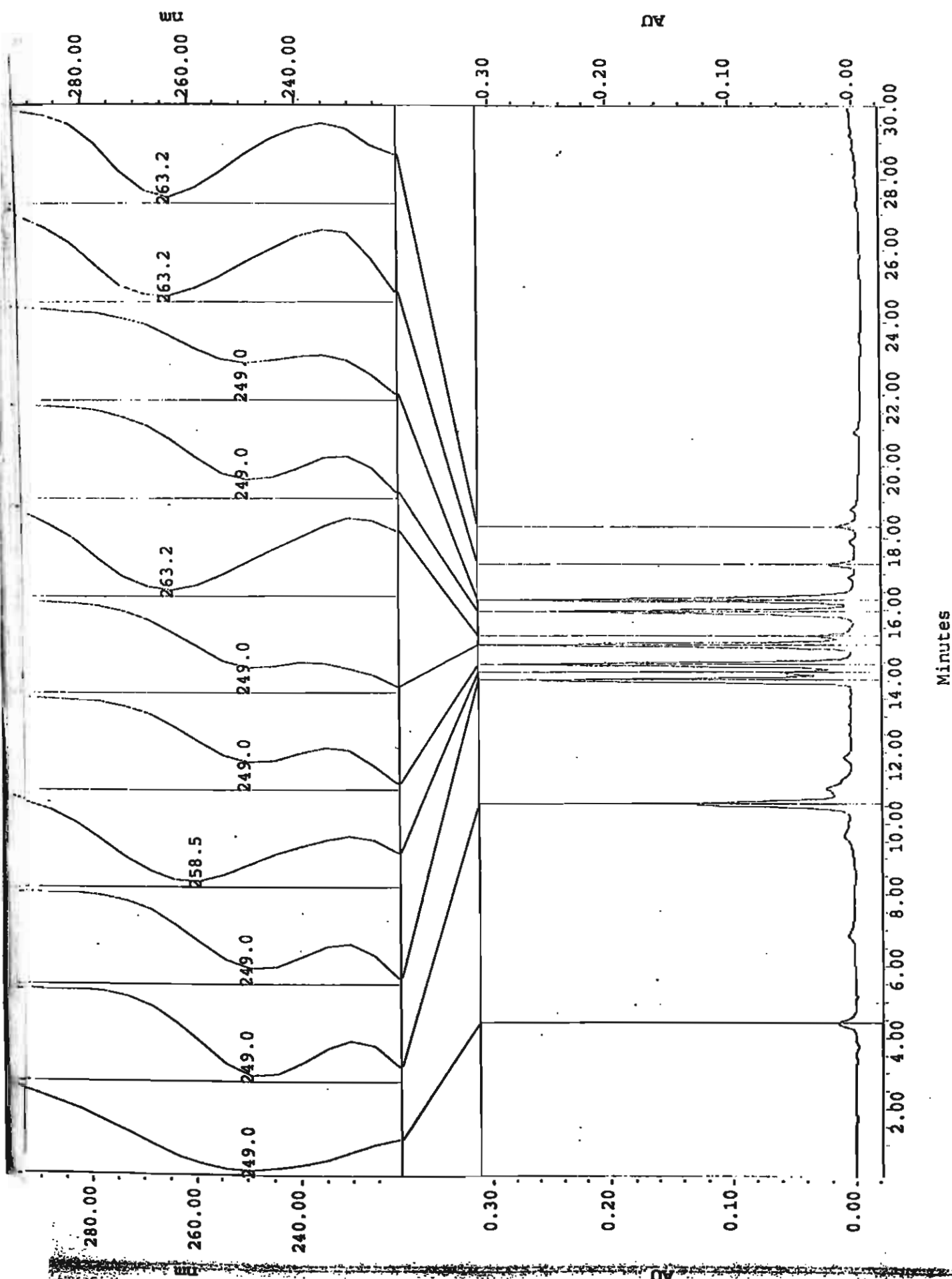


Millennium PDA Spectrum Index Plot - SampleName cor3-oct(2,, WVL:n Cht - PDA 254.0 nm (0m5A

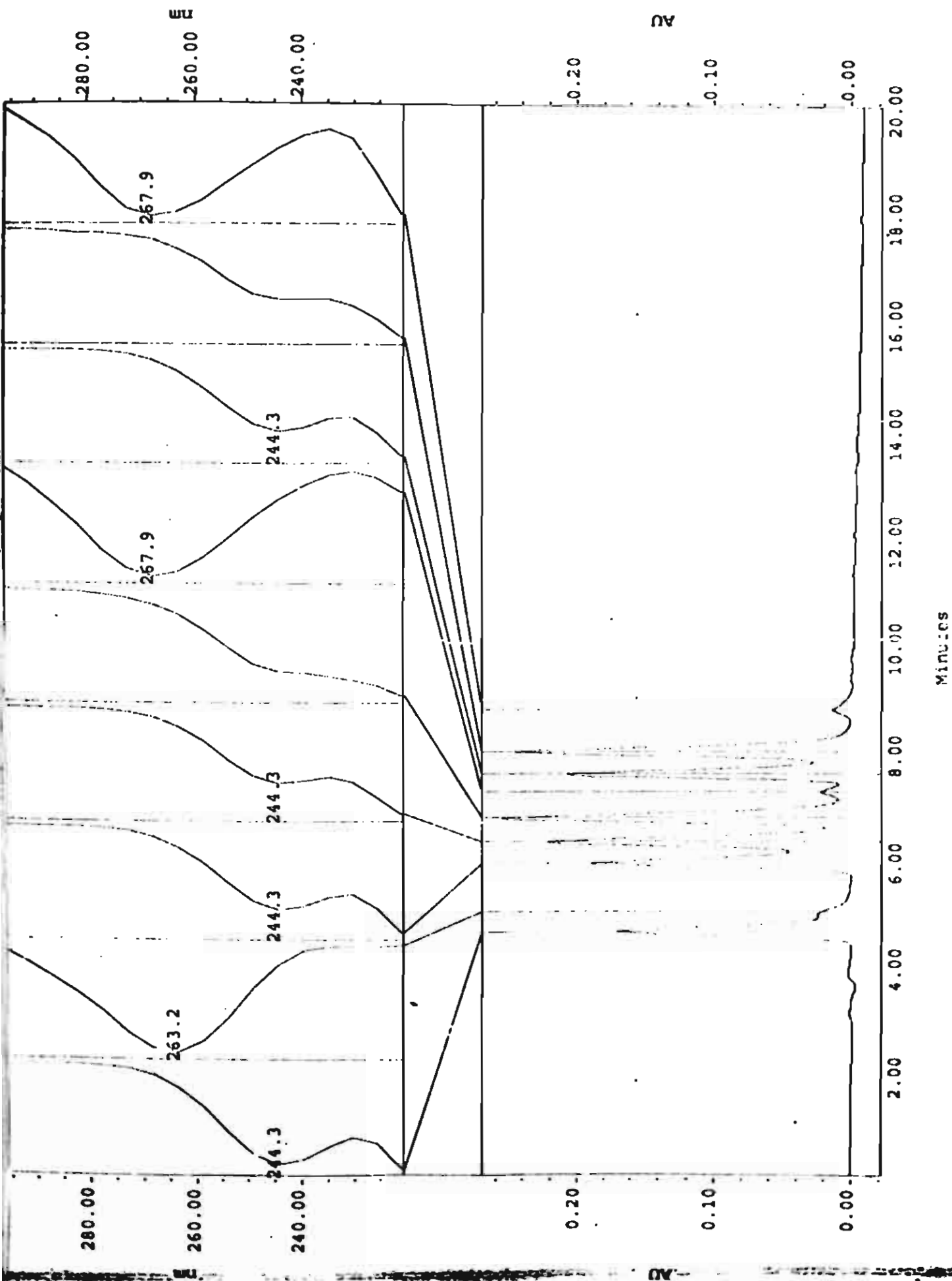


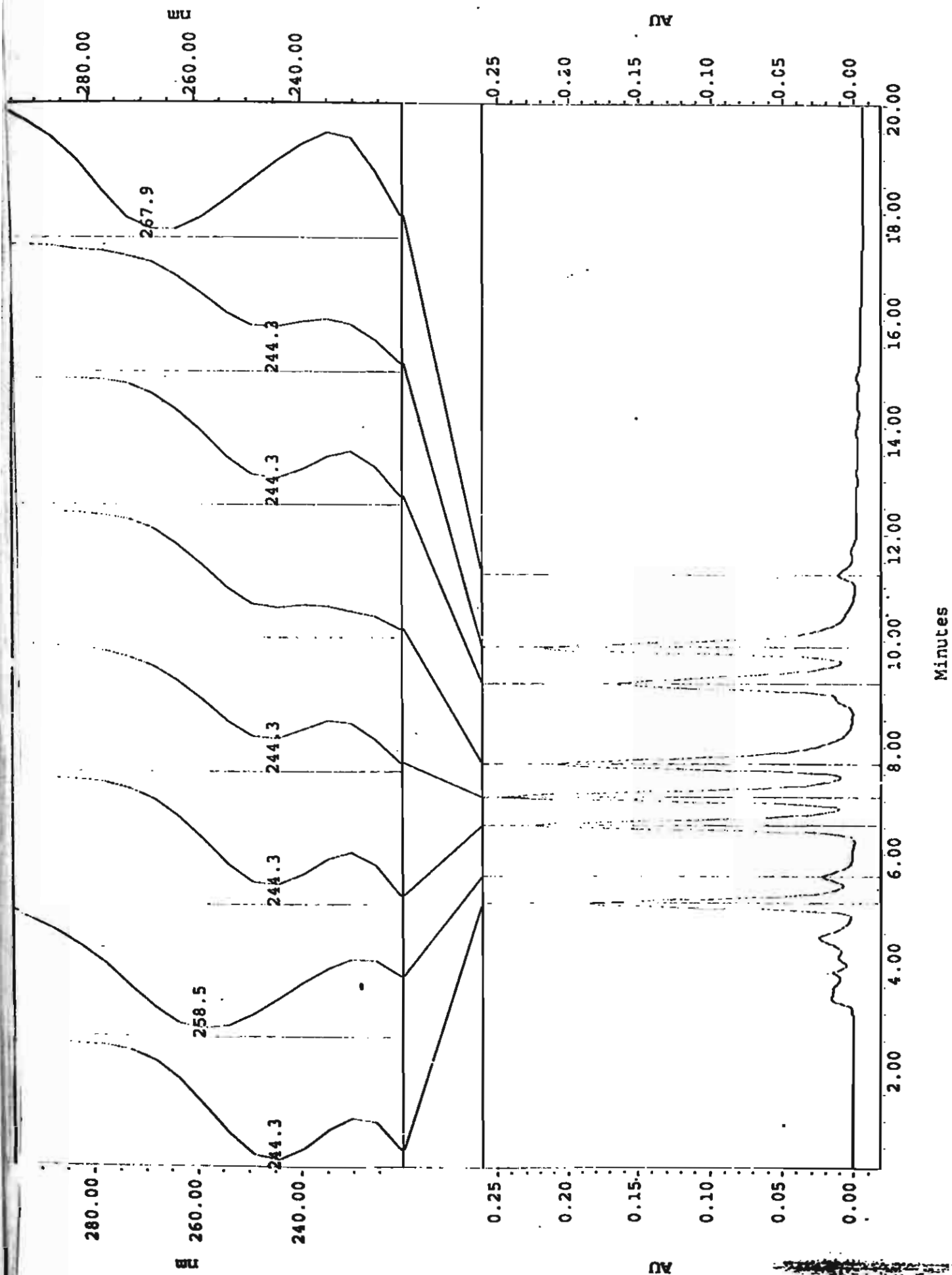


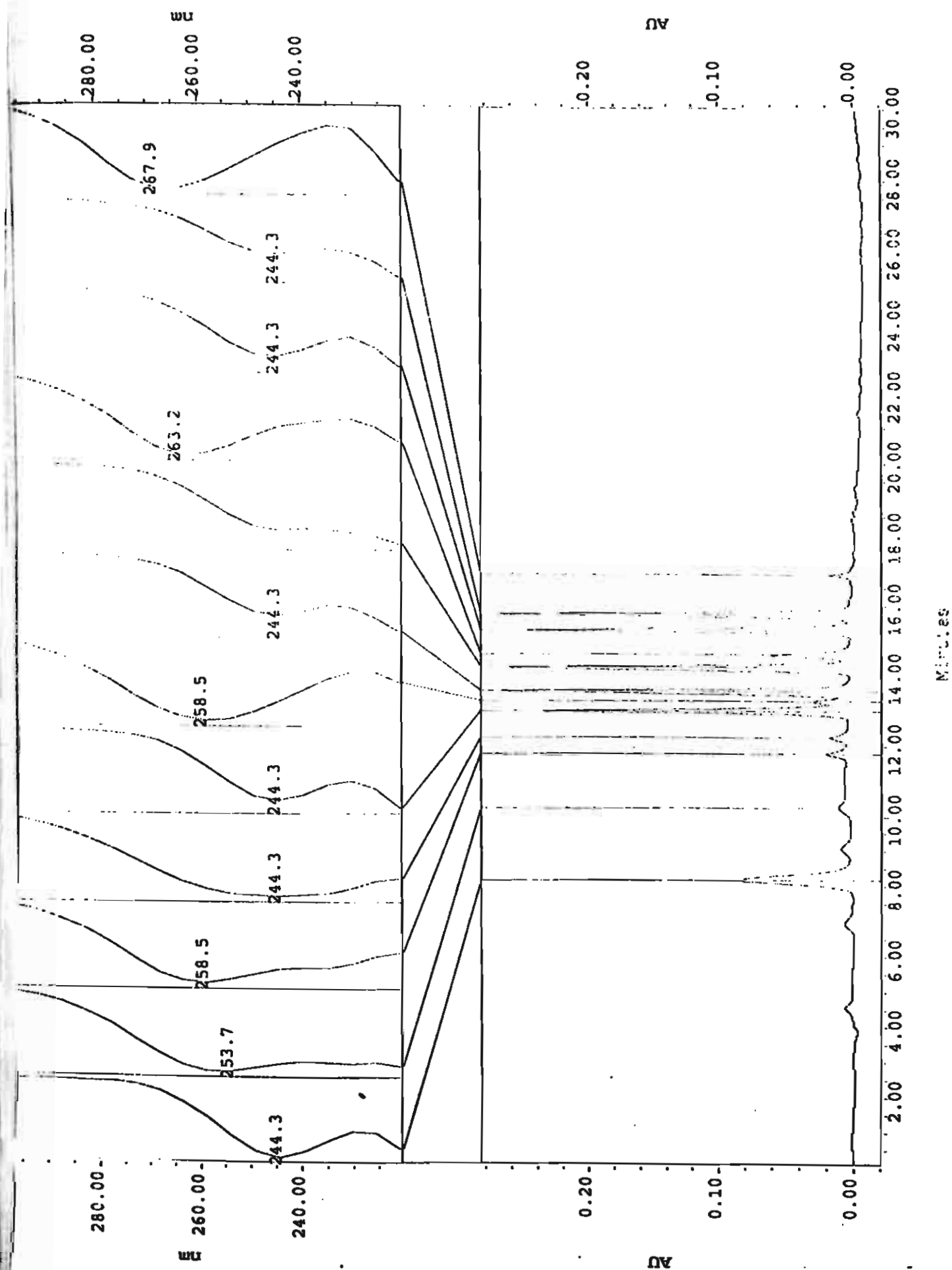


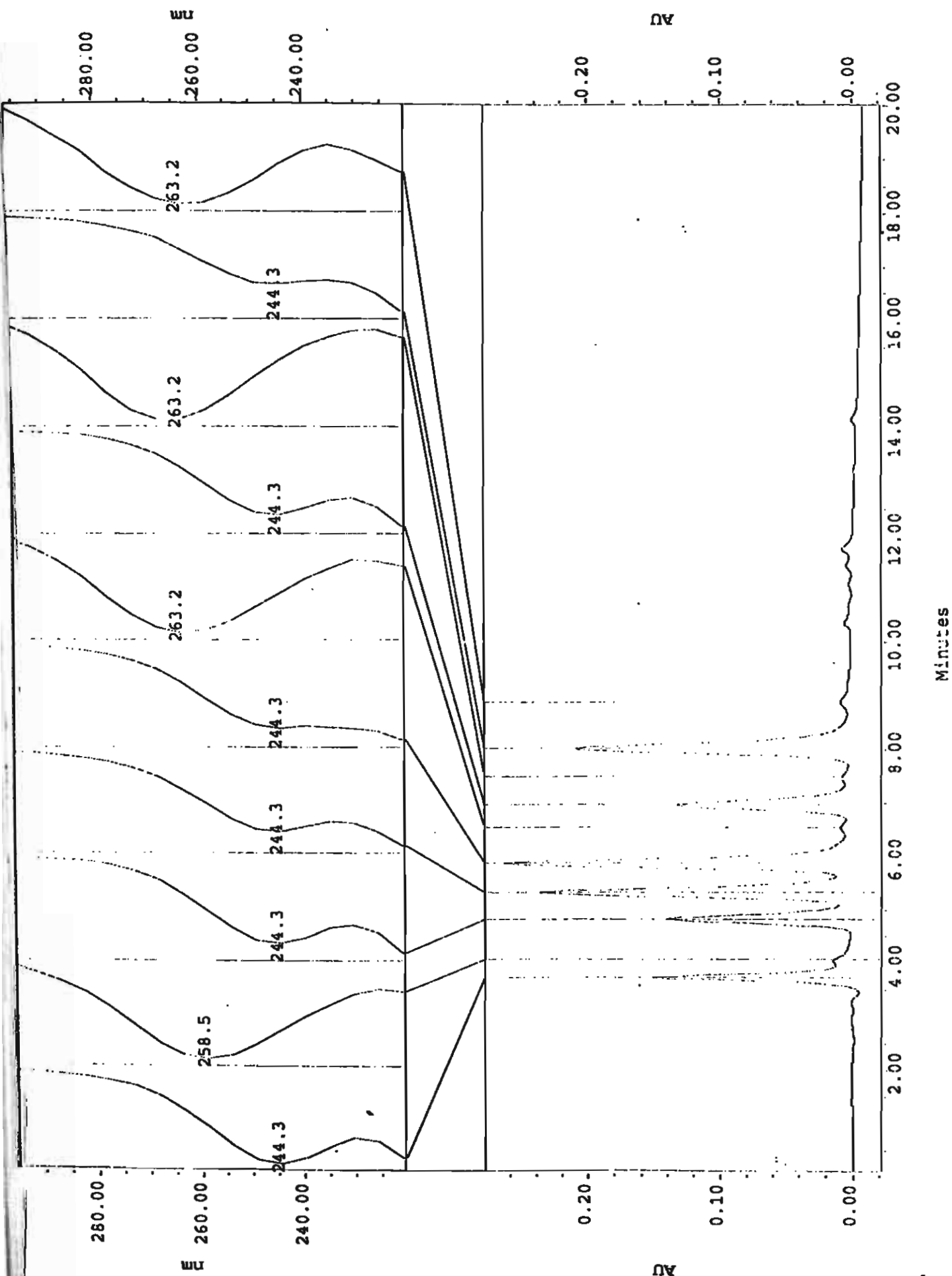


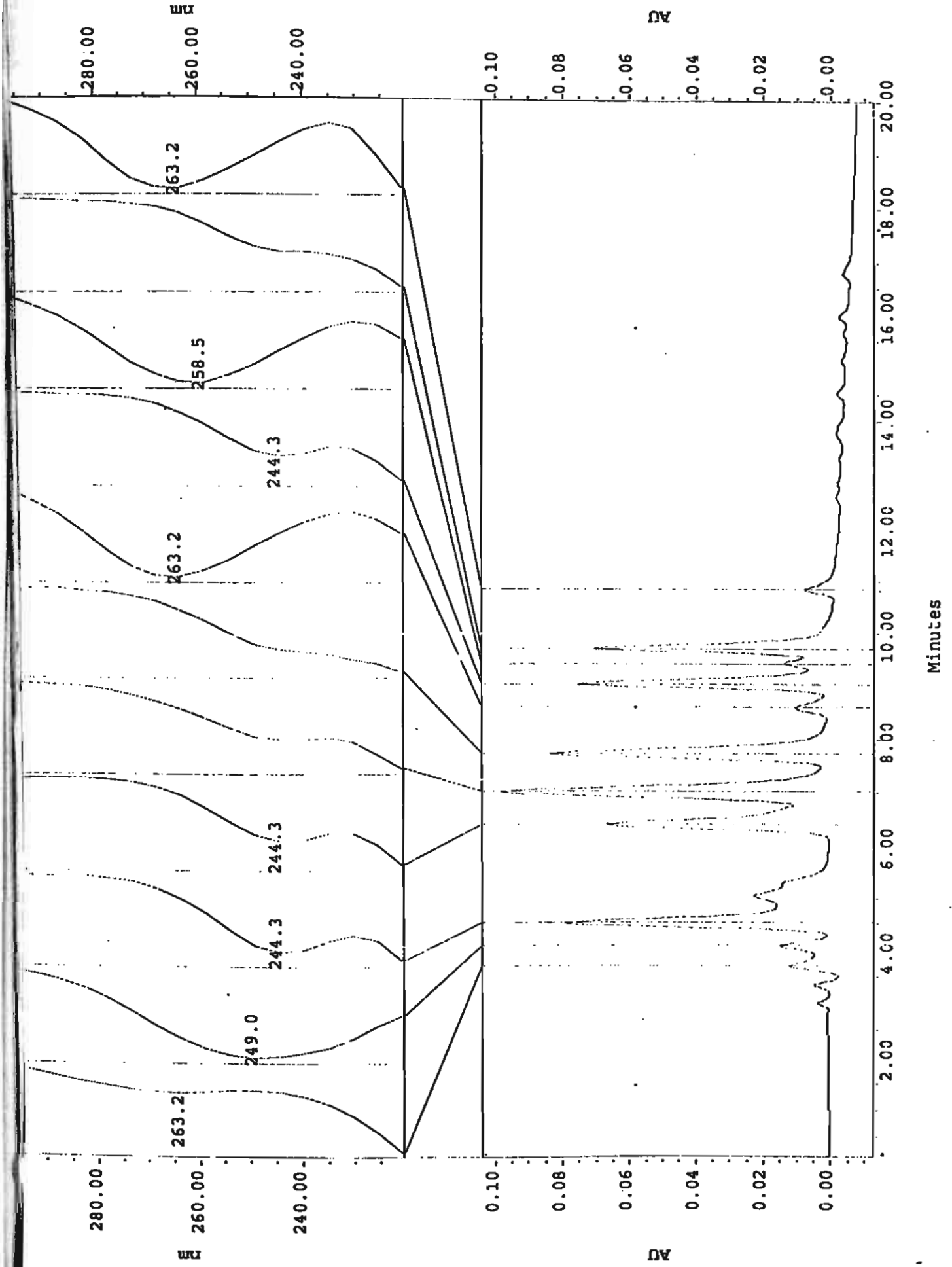
#----- PDA Spectrum Index Plot - SampleName: com_55, Wavelength: PDA 254.0 nm

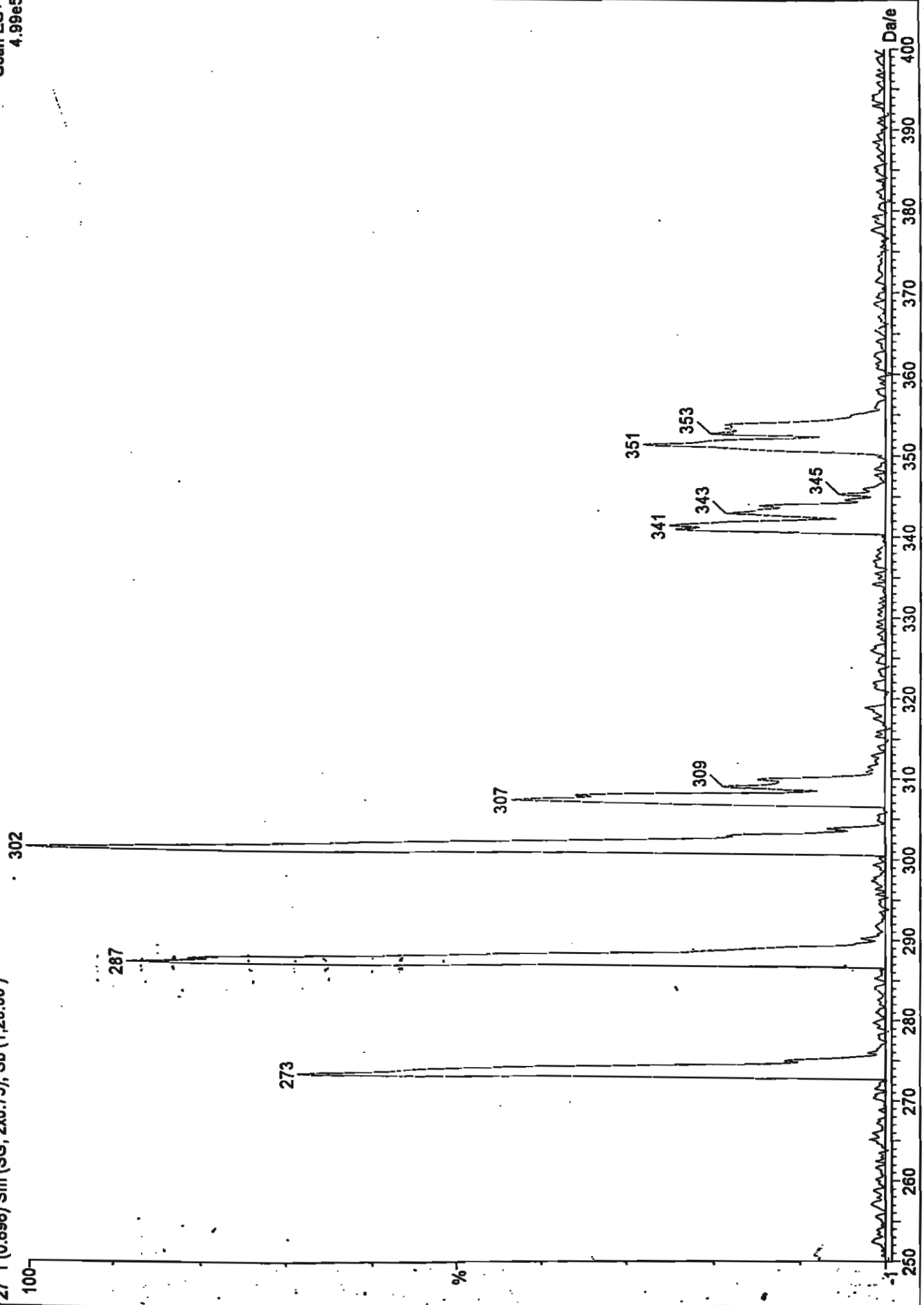






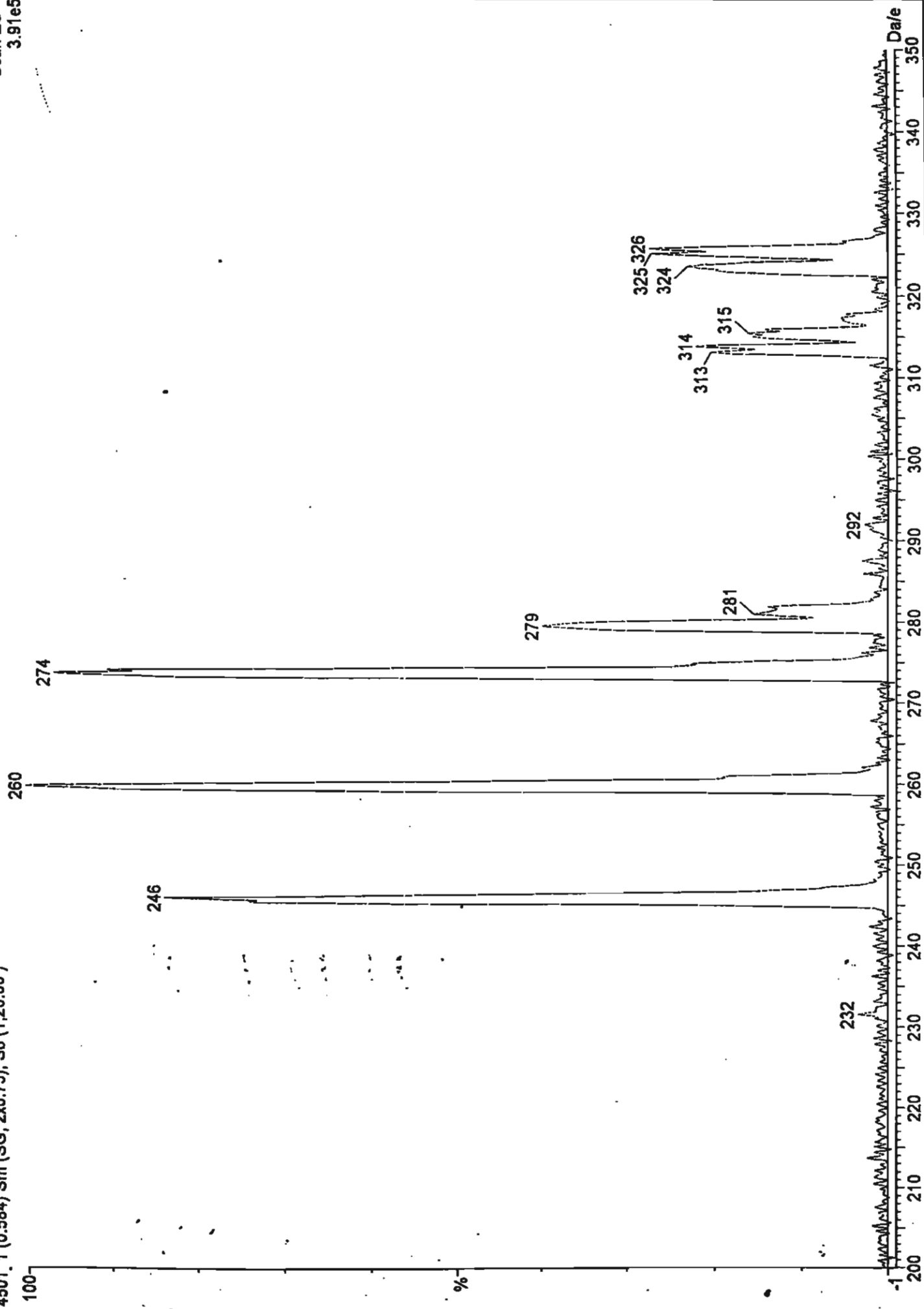




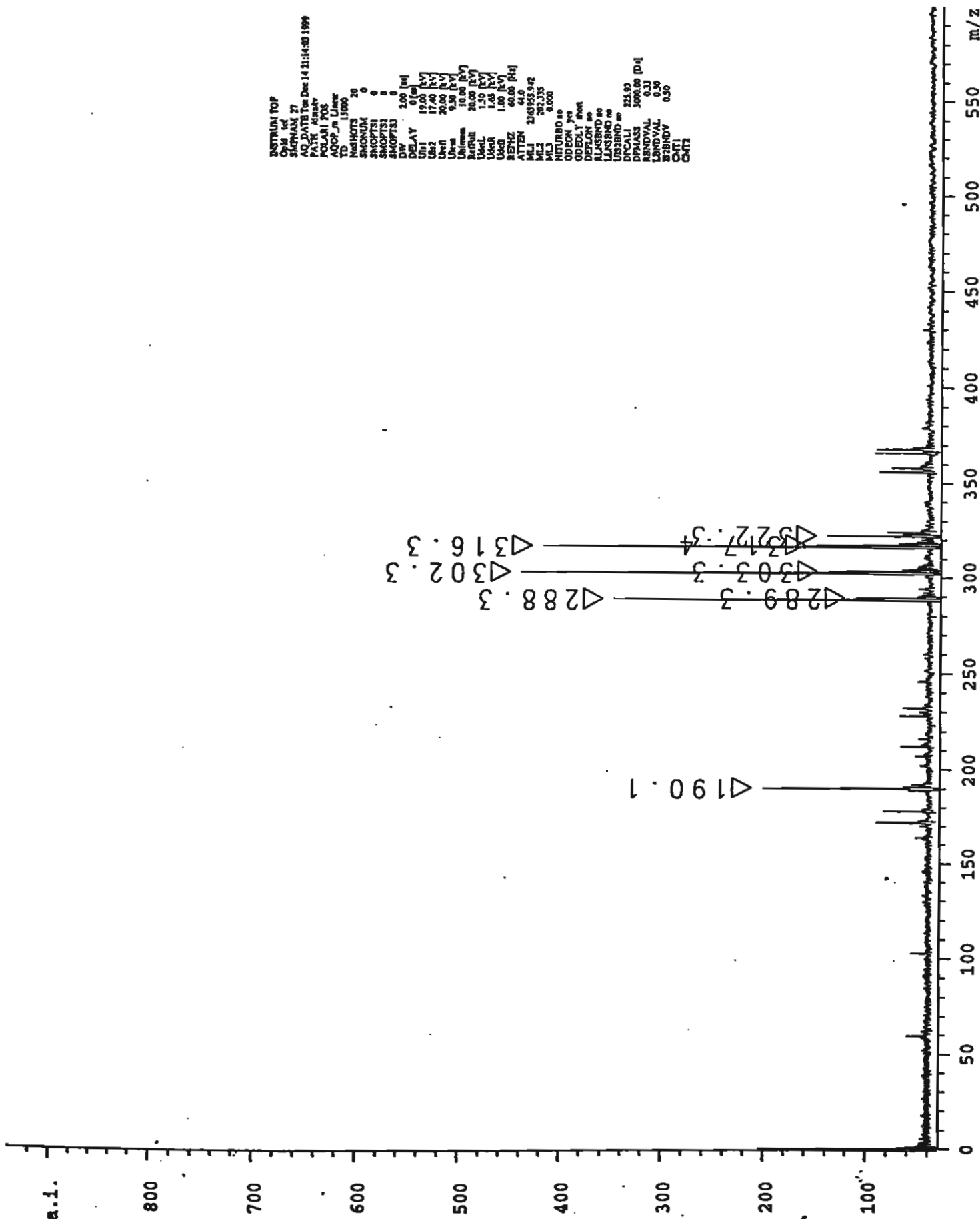


Scan ES+
3.91e5

4501_1 (0.584) Sm (SG, 2x0.75); Sb (1,20.00)



/data/tv/27/1Lin/pdata/1 tof Tue Dec 14 21:14:35 1999



2000

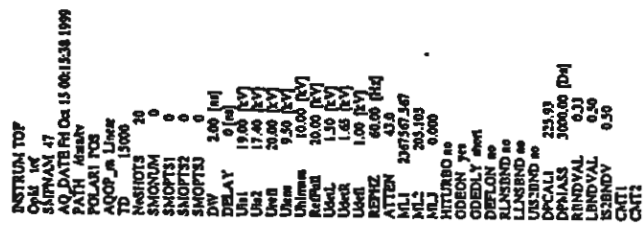
1500

1000.

500

/data/tv/47/1Lin/pdata/1 tof Fri Oct 15 00:16:32 1999

CL-4



a.i.

700

600

500

400

300

200

100

0

50

100

150

200

250

300

350

400

450

500

550

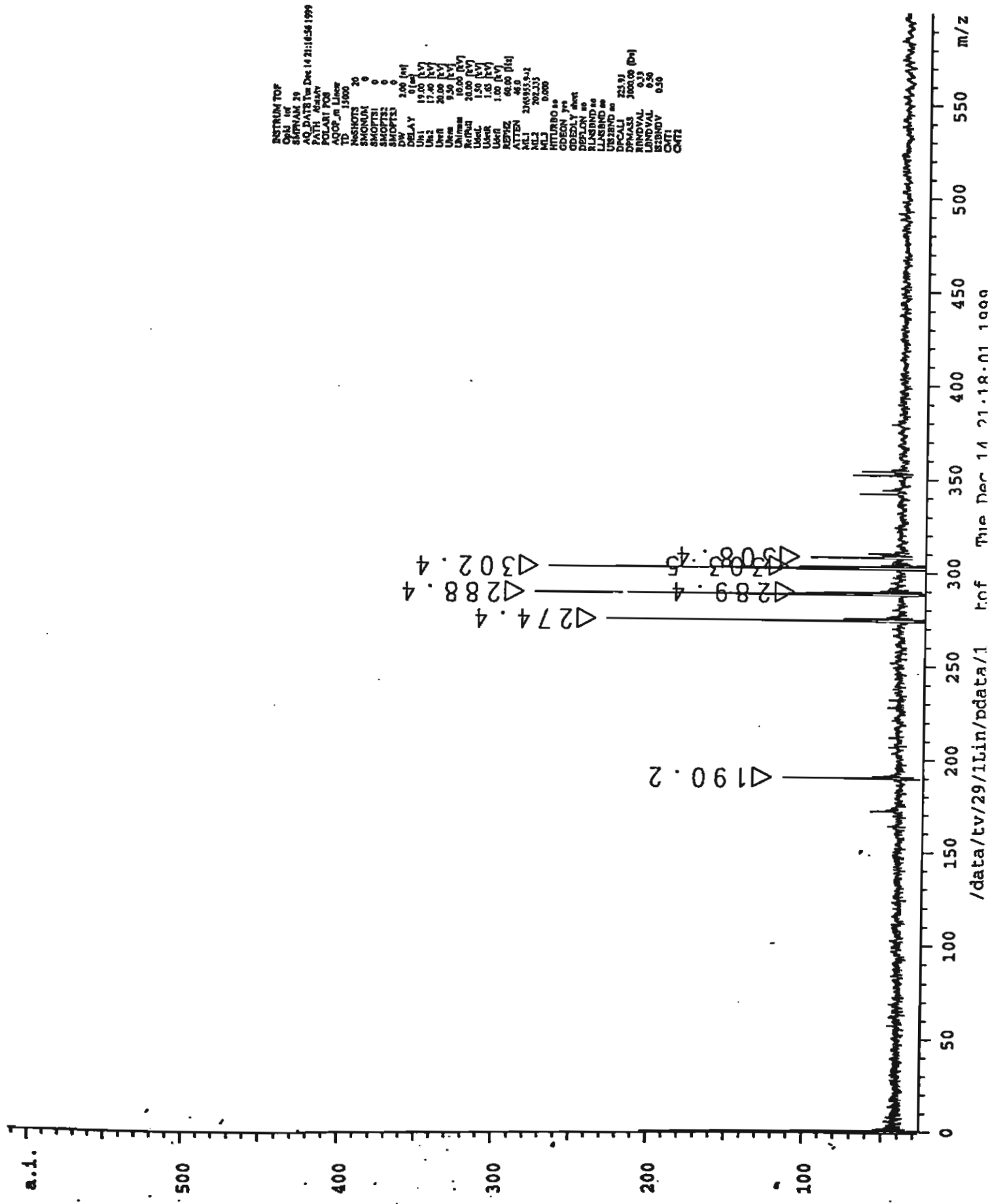
m/z

INSTRUM TOP
Oxid In
SAMPNAM 28
AQ_DATE Tue Dec 14 21:15:13 1999
PATH Alamy
POLARI POS
AQOP_m Lines
TD 12000
MOSHOTS 20
SIMONUM 0
SMOPTSI 0
SMOPTSI2 0
SMOPTSI3 0
SMOPTSI4 0
DW 2.00 [m]
DELAY 0 [m]
U01 19.00 [kV]
U02 17.40 [kV]
U03 20.00 [kV]
U04 9.50 [kV]
U05 10.00 [kV]
RefP01 20.00 [kV]
U06 1.50 [kV]
U07 1.50 [kV]
U08 1.50 [kV]
U09 1.50 [kV]
REFVZ 46.00 [m]
ATTEN 44
NL1 2365951.942
NL2 202.375
NL3 0.000
HITURBO no
GDEON yes
GDEOLY short
DEFLON no
RLSENDO no
LLSENDO no
US2BND no
PCALI 231.09
PCAL2 200.00 [pA]
RENDVAL 0.33
L2BNDV 0.30
CNT1
CNT2

Δ246.4
Δ260.4
Δ274.4
Δ275.4

CL-5

/data/tv/28/1Lin/pdata/1 tof Tue Dec 14 21:15:35 1999

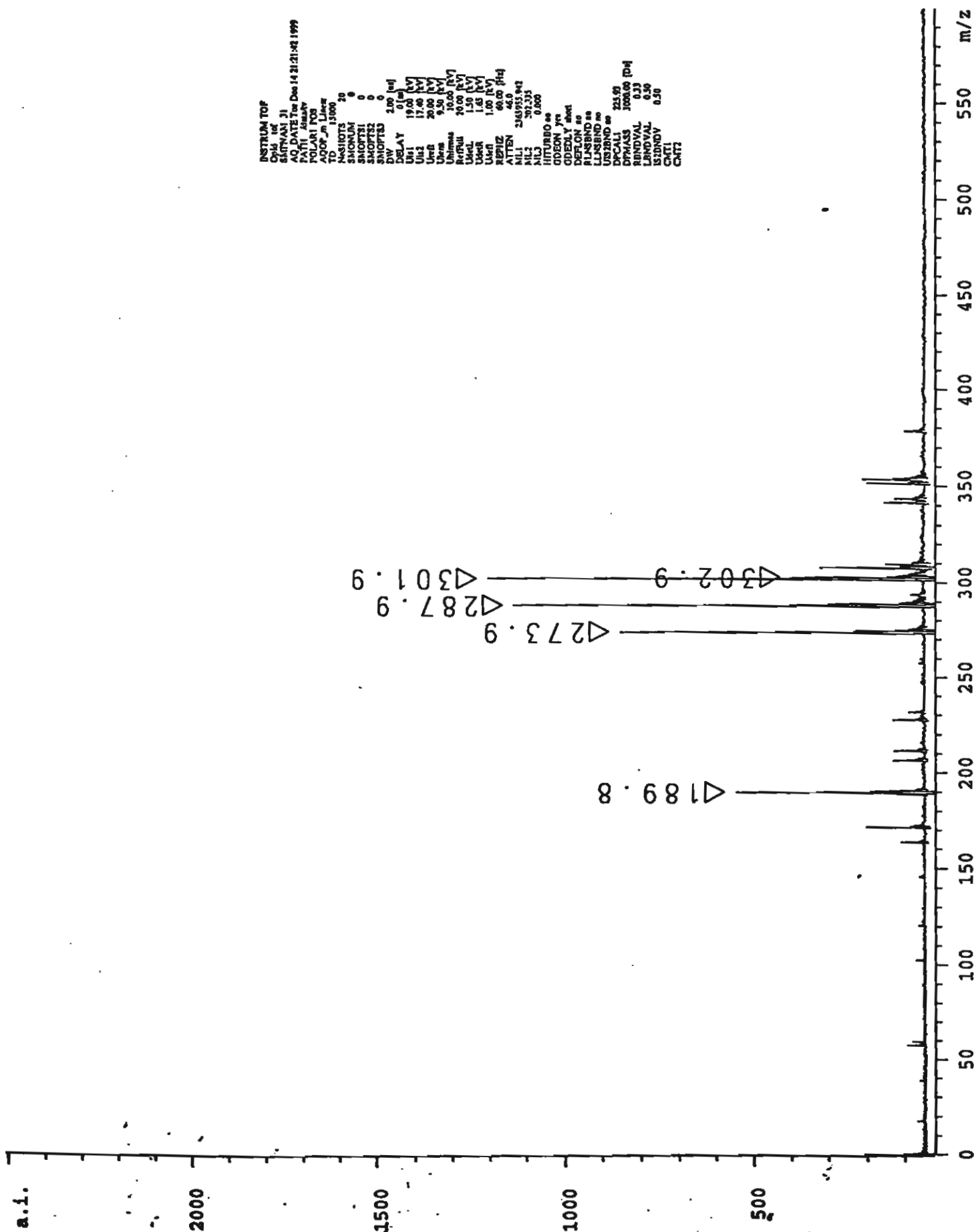


RSTHIN TOP
 Q1: 10
 S1: 10
 S2: 10
 S3: 10
 S4: 10
 S5: 10
 S6: 10
 S7: 10
 S8: 10
 S9: 10
 S10: 10
 S11: 10
 S12: 10
 S13: 10
 S14: 10
 S15: 10
 S16: 10
 S17: 10
 S18: 10
 S19: 10
 S20: 10
 S21: 10
 S22: 10
 S23: 10
 S24: 10
 S25: 10
 S26: 10
 S27: 10
 S28: 10
 S29: 10
 S30: 10
 S31: 10
 S32: 10
 S33: 10
 S34: 10
 S35: 10
 S36: 10
 S37: 10
 S38: 10
 S39: 10
 S40: 10
 S41: 10
 S42: 10
 S43: 10
 S44: 10
 S45: 10
 S46: 10
 S47: 10
 S48: 10
 S49: 10
 S50: 10
 S51: 10
 S52: 10
 S53: 10
 S54: 10
 S55: 10
 S56: 10
 S57: 10
 S58: 10
 S59: 10
 S60: 10
 S61: 10
 S62: 10
 S63: 10
 S64: 10
 S65: 10
 S66: 10
 S67: 10
 S68: 10
 S69: 10
 S70: 10
 S71: 10
 S72: 10
 S73: 10
 S74: 10
 S75: 10
 S76: 10
 S77: 10
 S78: 10
 S79: 10
 S80: 10
 S81: 10
 S82: 10
 S83: 10
 S84: 10
 S85: 10
 S86: 10
 S87: 10
 S88: 10
 S89: 10
 S90: 10
 S91: 10
 S92: 10
 S93: 10
 S94: 10
 S95: 10
 S96: 10
 S97: 10
 S98: 10
 S99: 10
 S100: 10

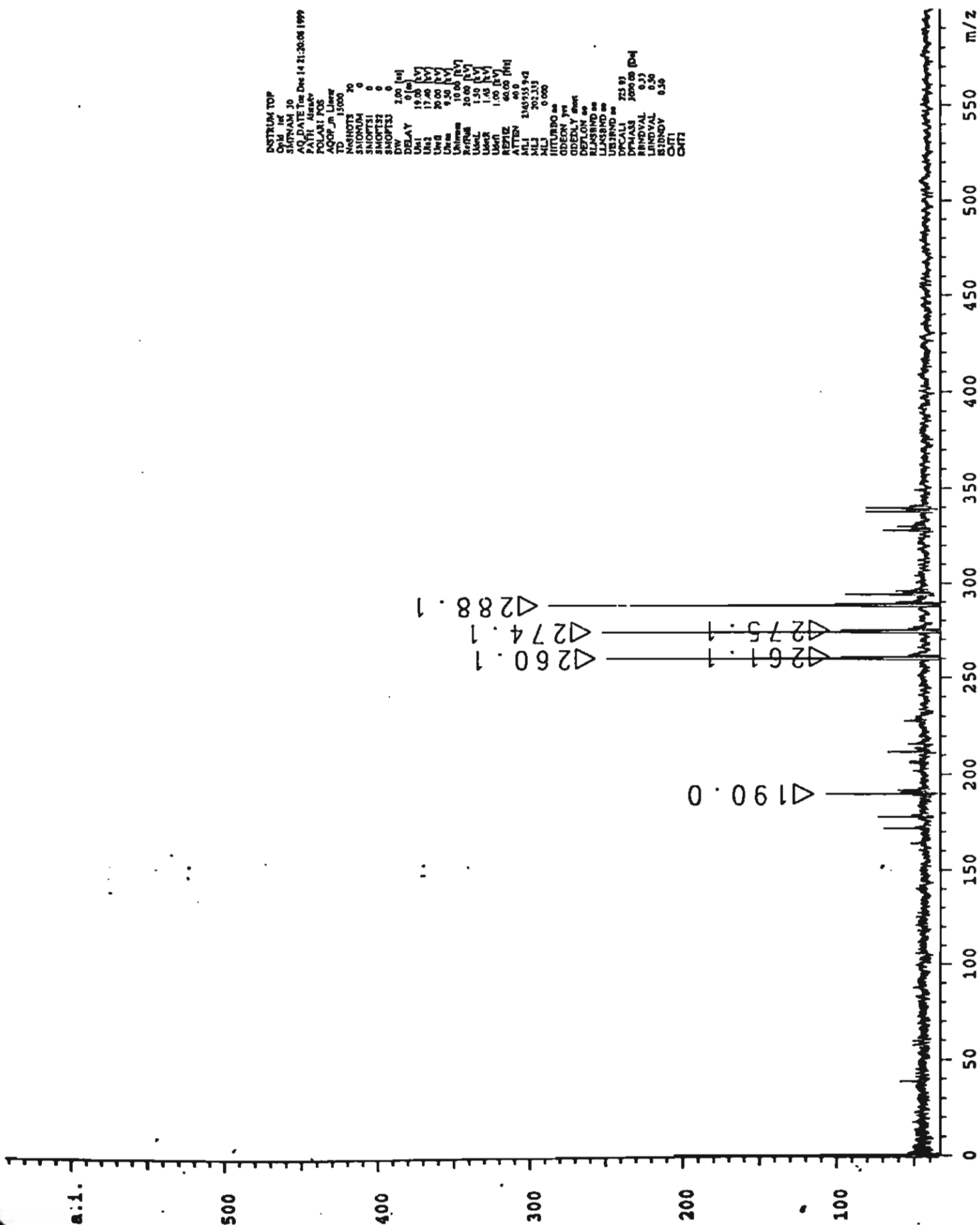
CL-6

$$\begin{array}{r} 287.9 \\ + 301.8 \\ \hline 589.7 \end{array}$$

E. m... r - 14 07. 03 1966



INSTRUM TOP
OpId 14
SAMPNAM 30
AQ_DATE Tue Dec 14 21:20:06 1999
PATH: Aduv
POLAR: POS
ACQ_Pn: User
TIME 15000
NASHOT1 20
NASHOT2 0
NASHOT3 0
SMOFTS1 0
SMOFTS2 0
SMOFTS3 0
DW 2.00 [ns]
DELAY 0 [ns]
Ua1 19.00 [V]
Ua2 17.40 [V]
Ua3 20.00 [V]
Ua4 9.20 [V]
Ua5 19.00 [V]
Ua6 20.00 [V]
Ua7 1.40 [V]
Ua8 1.40 [V]
Ua9 1.00 [V]
REPTIZ 60.00 [Hz]
ATTEN 40.0
AELI 2345155.943
MLJ 202.333
MLJ 0.000
HITURBO 0
GDECON 1
GDECON 1
DEFCON 1
DEFCON 1
BLASND 0
BLASND 0
UB3RND 0
DPCALI 723.93
DPMAS3 3000.00 [Da]
RINDVAL 0.33
RINDVAL 0.36
RINDOV 0.36
CMT1
CMT2



a.i.

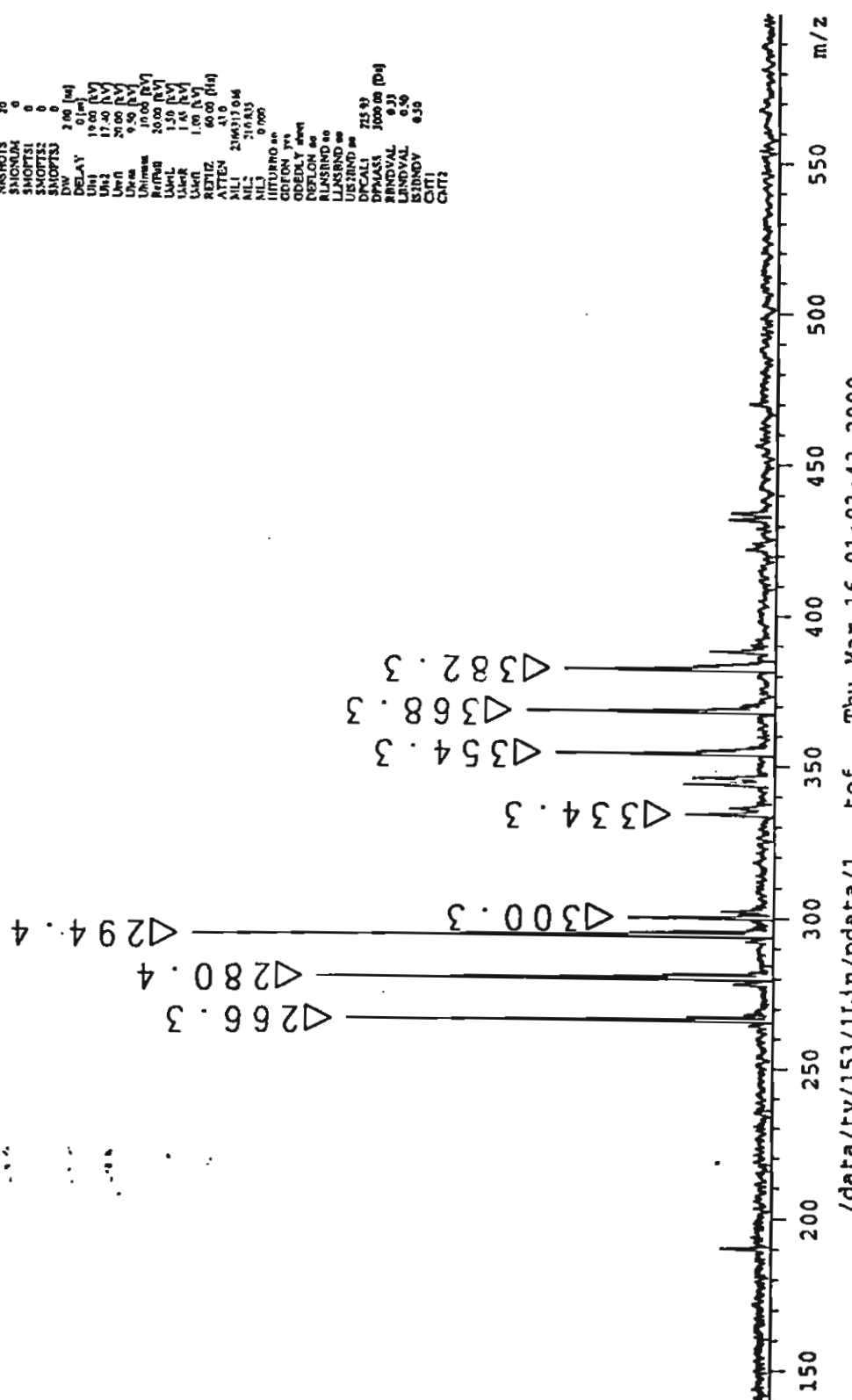
500

400

300

200

100



INSTRUM TOP

QVAL 14

SHIPNAM 153

ACQ DATE Thu Mar 16 01:03:43 2000

PATH /data/tv/153/1Lin/pdata/1

COLLIM FOS

ACQF_m Uter 2000

NSHOT2 20

SNOWIN 0

SNOPTS1 0

SNOPTS2 0

SNOPTS3 0

DW 2.00 [us]

DELAY 0 [us]

UW1 10.00 [V]

UW2 17.50 [V]

UW3 20.00 [V]

UW4 9.50 [V]

UW5 10.00 [V]

UW6 15.00 [V]

UW7 15.00 [V]

UW8 15.00 [V]

RTDIZ 60.00 [Hz]

ATTEN 31.0

MIL 216431.014

MIL2 216.833

MIL3 0.700

INTURRO an

CODEFON yes

CODEDLY 2000

REFLON 00

ALASIND 00

LASIND 00

ESTIND 00

DPVAL 715.92

DPVAL2 1000.00 [Hz]

BRNOVAL 0.31

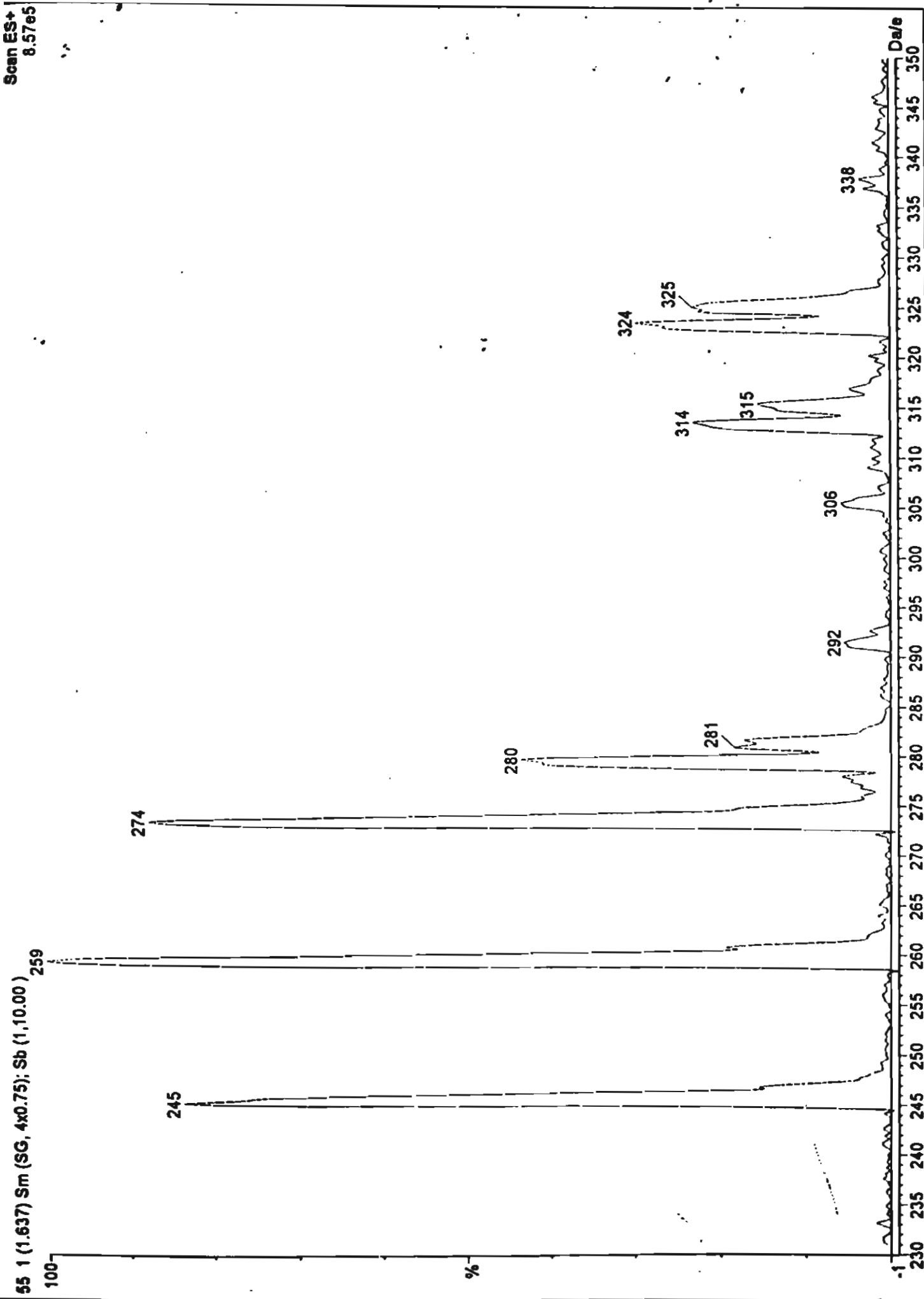
BRNOVAL 0.30

BRNOVAL 0.30

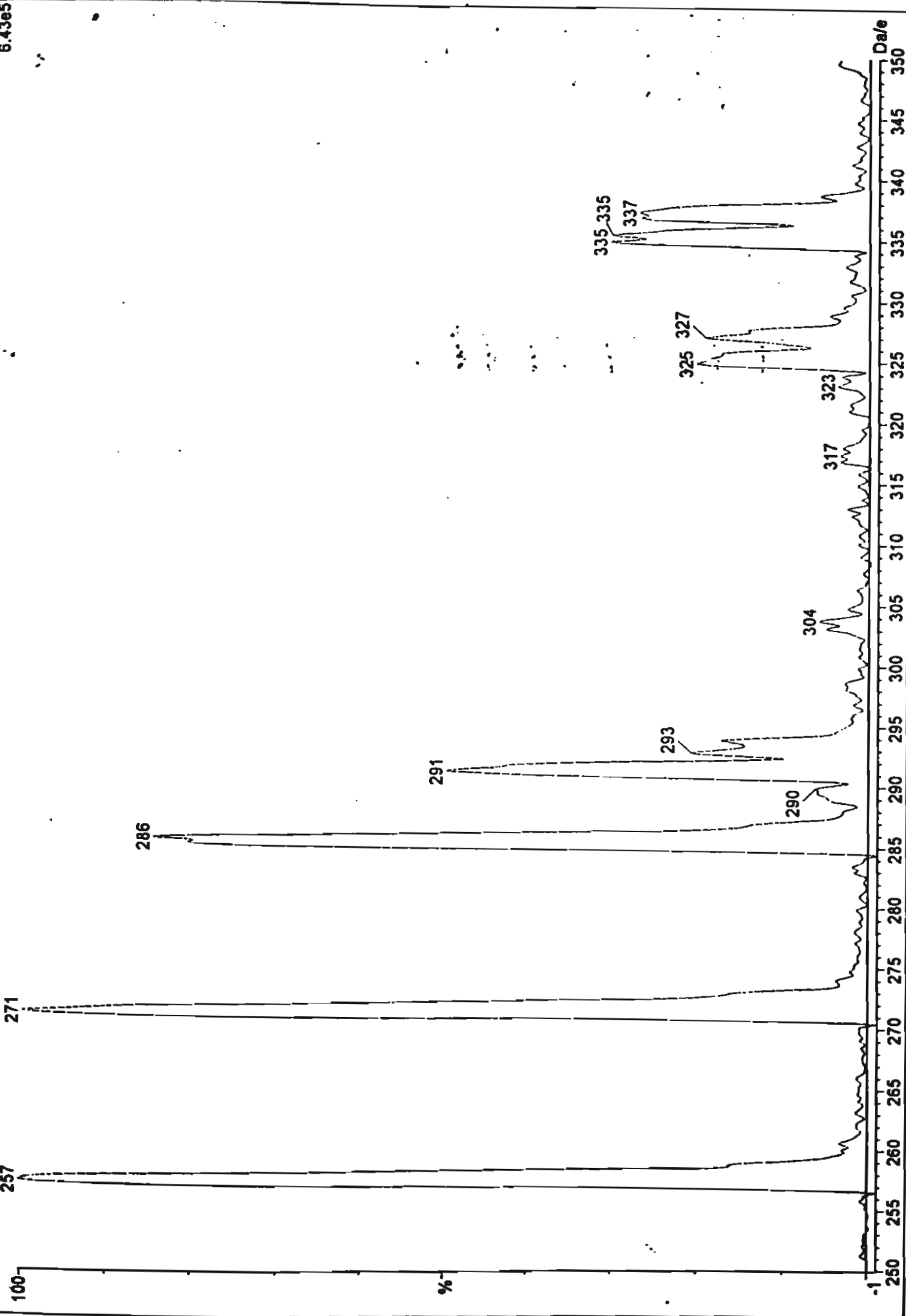
CNT1

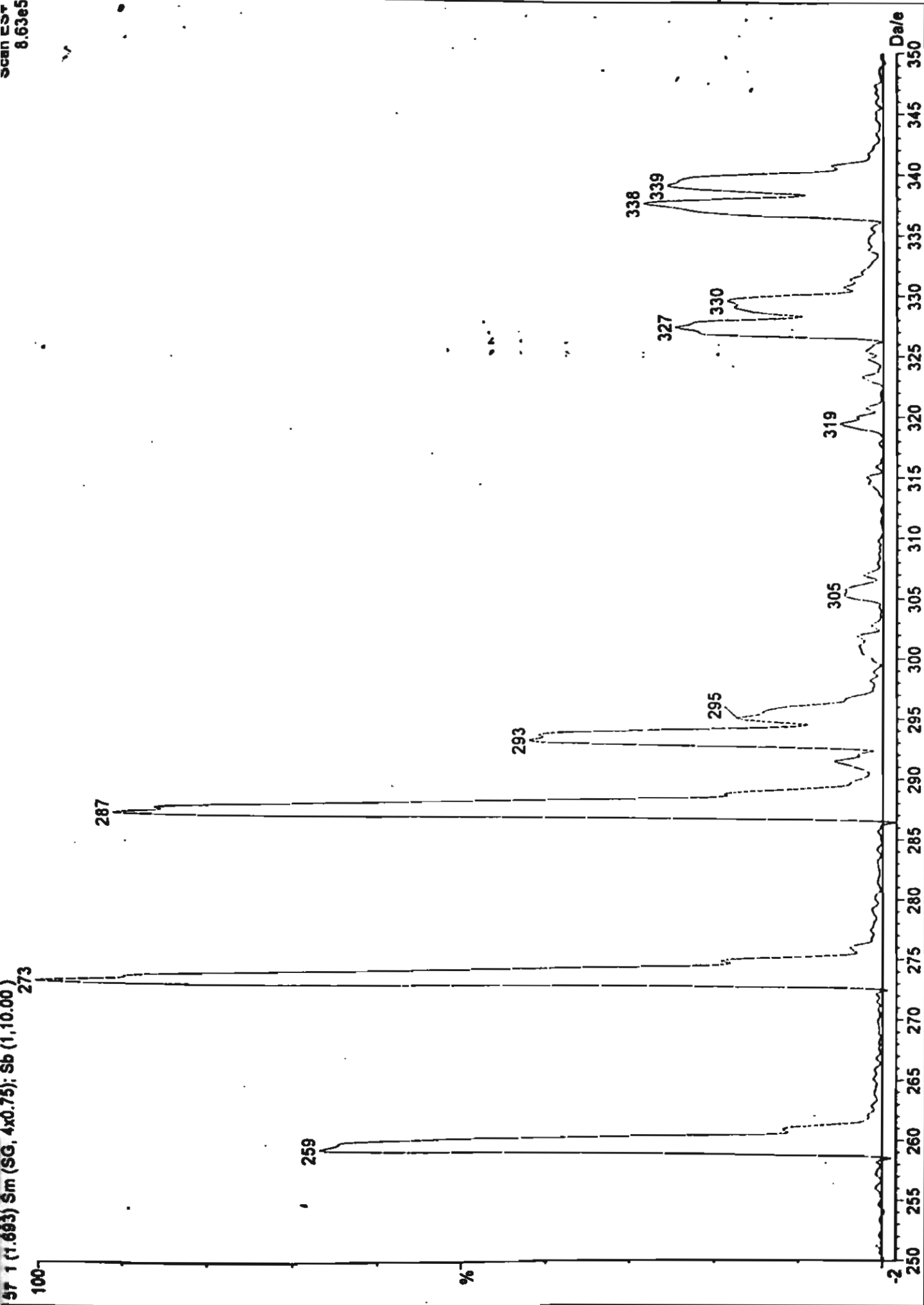
CNT2

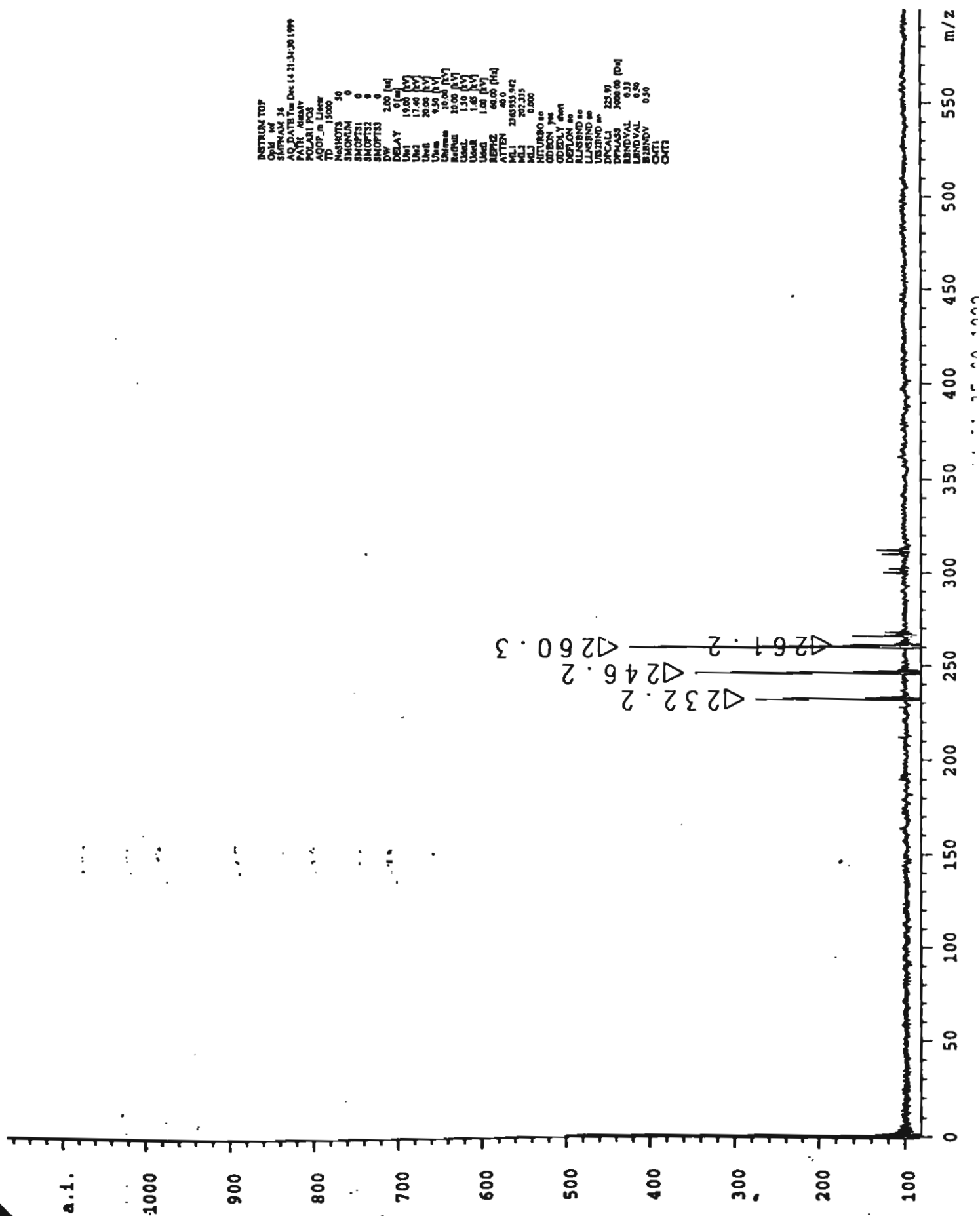
Scan ES+
8.57e5



CL-11







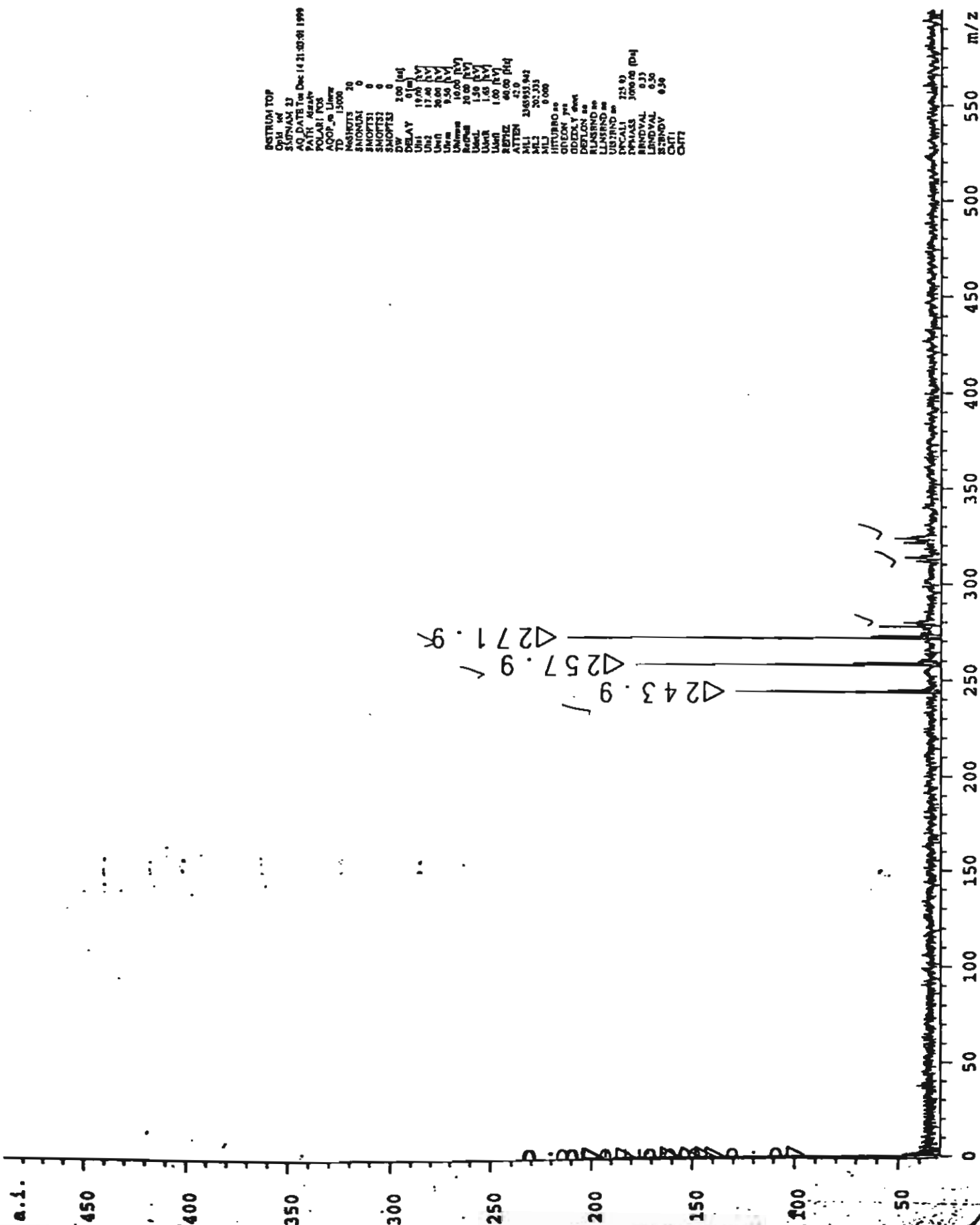
0

$\triangleleft 271.9$
 $\triangleleft 281.9$

$$\begin{array}{r} \Delta 204.0 \\ \Delta 218.0 \\ \hline \Delta 232.0 \end{array}$$

/data/cv/130/1Lin/pdata/1 tof Thu Mar 9 00:18:11 2000

/data/tv/23/1Lin/pdata/1 tof Tue Dec 14 21:03:51 1999



ภาคผนวก 2

Reprints ของผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว



Interaction of Pyrimethamine, Cycloguanil, WR99210 and their Analogues with *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase: Structural Basis of Antifolate Resistance

Giulio Rastelli,^a Worachart Sirawaraporn,^{b,*} Pornthep Sompornpisut,^c Tirayut Vilaivan,^c Sumalee Kamchonwongpaisan,^d Rachel Quarrell,^c Gordon Lowe,^c Yodhathai Thebtaranonth^f and Yongyuth Yuthavong^d

^aDipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Modena e Reggio Emilia, Via Campi, 183-41100 Modena, Italy

^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^cDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^dNational Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Bangkok 10400, Thailand

^eDyson Perrins Laboratory, South Parks Road, Oxford University, Oxford OX1 3QY, UK

^fDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Received 29 October 1999; accepted 15 January 2000

Abstract—The nature of the interactions between *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (pfDHFR) and antimalarial antifolates, i.e., pyrimethamine (Pyr), cycloguanil (Cyc) and WR99210 including some of their analogues, was investigated by molecular modeling in conjunction with the determination of the inhibition constants (K_i). A three-dimensional structural model of pfDHFR was constructed using multiple sequence alignment and homology modeling procedures, followed by extensive molecular dynamics calculations. Mutations at amino acid residues 16 and 108 known to be associated with antifolate resistance were introduced into the structure, and the interactions of the inhibitors with the enzymes were assessed by docking and molecular dynamics for both wild-type and mutant DHFRs. The K_i values of a number of analogues tested support the validity of the model. A 'steric constraint' hypothesis is proposed to explain the structural basis of the antifolate resistance. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

The dihydrofolate reductase (DHFR) domain of *Plasmodium falciparum* bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) is one of the few well-defined targets in malarial chemotherapy. The enzyme catalyzes the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) dependent reduction of dihydrofolate to tetrahydrofolate. DHFR has received considerable attention as it is the target of pyrimethamine

(Pyr) and cycloguanil (Cyc) and other antifolates used for prophylaxis and treatment of *P. falciparum* infection. The rapid emergence of antifolate resistant *P. falciparum* has unfortunately compromised the clinical utilities of the drugs, and thus highlights the urgent need to search for new effective antifolate antimalarials.

Analysis of the gene encoding DHFR from *P. falciparum* parasites obtained from geographically distant sources and with different degrees of resistance suggested the association of antifolate resistance with point mutations of the gene coding for *P. falciparum* DHFR.^{1–9} Mutations of one or more residues at amino acid positions 16, 51, 59, 108, and 164 of the *P. falciparum* DHFR were identified to be involved in antifolate resistance. Evidence available recently also supports the hypothesis that antifolate resistance in malaria evolved in a step-wise selection of mutants, with multiple mutations subsequent to a single S108N mutation, and that

Abbreviations: Cyc, cycloguanil; Pyr, pyrimethamine; pfDHFR, *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase; RMS, root mean square; TES, *N*-tris (hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethane-sulfonic acid; H₂folate, 7,8-dihydrofolate; fs, femto-second; RESP, restrained electrostatic potential.

*Corresponding author. Tel.: +662-245-5195; fax: +662-248-0375; e-mail: scwsr@mahidol.ac.th

mutants which do not survive in nature were either poorly resistant to the drugs or had insufficient catalytic activity of DHFR to support DNA synthesis.¹⁰

While the parasites with A16V + S108T double mutation in the *dhfr* gene are resistant to Cyc but susceptible to Pyr, those with cross resistance to both drugs have either single or multiple mutations at amino acid residues 51, 59, 108 and 164.^{5–7,11} Since the structures of Pyr and Cyc are very closely similar, the questions arise as to why Cyc-resistant but Pyr-sensitive evolved while the reverse has never been reported in the natural isolates, and whether the binding of Pyr and Cyc to the wild-type and the mutant DHFRs are different. Similar questions can also be raised with WR99210, a dihydrotriazine whose structure is closely related to Cyc. The fact that WR99210 is highly effective against both Pyr-sensitive and -resistant parasites *in vivo*¹² and the DHFRs *in vitro*¹³ has made WR99210 an attractive compound for further studies.

In order to address the problems of binding modes of Pyr, Cyc, and WR99210, structural data of *P. falciparum* DHFR are needed. In the absence of pfDHFR structure from X-ray diffraction analysis, it is necessary to construct and predict the structure of the enzyme by a homology modeling approach.¹⁴ Such modeling approach has been exploited for the prediction of the structure of the new drug leads capable of inhibiting *P. falciparum* DHFR at micromolar and submicromolar levels.¹⁵ Using the model built from the 3D-structure of *Leishmania major* DHFR-TS, McKie et al.¹⁶ predicted that the S108N mutation of the *P. falciparum* DHFR would lead to a steric clash with the *p*-Cl atom of Pyr. The hypothesis was readily tested by modifying the Pyr structure to avoid the steric constraint, hence resulting in two Pyr analogues which are highly effective against Pyr-resistant DHFR and malarial parasites.¹⁶ Indeed, through analysis of a number of physicochemical characteristics of residues at position 108 of *P. falciparum* DHFR and compared with their activities against a series of drugs including Pyr, Cyc, TMP (trimethoprim), and WR99210, Warhurst has recently pointed out that mutant DHFRs with bulky groups at residue 108 would cause steric constraint and hence result in poor binding with the inhibitor.¹⁷

In this paper, we describe the construction of a homology model of DHFR domain of the bifunctional *P. falciparum* DHFR-TS, and the structures of the complexes between Pyr, Cyc and WR99210 with the wild-type, A16V, S108T, and A16V + S108T mutant enzymes. We predict from the model that A16V mutation of *P. falciparum* DHFR imposes a steric conflict for binding to Cyc as opposed to Pyr and WR99210, and that the steric conflict becomes more pronounced when combined with mutation at residue 108 in the A16V + S108T double mutants. The hypothesis was tested against experimental data on the binding strengths of analogues of these drugs to both wild-type and mutant enzymes. This model was used to design and synthesize new compounds which were tested against wild-type and resistant *P. falciparum* *in vitro*.

Materials and Methods

Homology modeling of *Plasmodium falciparum* DHFR

The structure of the DHFR domain of *P. falciparum* bifunctional DHFR-TS was obtained from homology modeling simulations. The model was constructed by alignment of *P. falciparum* DHFR primary sequence¹⁸ with the DHFR sequences of which the crystal structures are already known; these include DHFRs from *Escherichia coli*,¹⁹ *Lactobacillus casei*,²⁰ human,^{21,22} chicken liver²³ and *Pneumocystis carinii*.²⁴ Unfortunately, the *Leishmania major* bifunctional DHFR-TS was not included into the sequence alignment as the crystal structure was not publicly available at the time the model was built. The alignment of *P. falciparum* DHFR sequence¹⁸ was carefully checked by using the available sequence alignment evaluation functions within MODELLER 3.0,²⁵ and by superimposing the structurally conserved regions of the available DHFR crystal structures.

The model of pfDHFR was constructed using MODELLER 3.0.²⁵ A primary homology model was constructed based on the conserved regions of most DHFRs by removing the sequences of the two insertions, i.e., residues 22–38 and 64–98. Next, several models were constructed on the whole sequence by adding one at a time the local alignments found to fill the two insertions. Local alignments were predicted using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)²⁶ at the National Center for Biotechnology Information, NCBI (web site hyperlink <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). A stringent significant threshold of 3 was adopted for the BLAST search. Then, combinations of these, and finally all the local alignments were introduced. The model showing the best score as judged by the value of the Modeller objective function, and with the least root mean square (RMS) deviation with respect to the conserved regions of the DHFR templates, was saved for further refinement with molecular dynamics. The quality of the stereochemistry and of the structures was validated using the PROCHECK²⁷ and WHATIF tools available at the Biotech Validation Suite for Protein Structures (web site <http://biotech.embl-heidelberg.de:8400/>).

Molecular dynamics refinement of the structure

The pfDHFR structure resulting from MODELLER was refined by means of molecular mechanics and molecular dynamics calculations using AMBER 4.1²⁸ and the all-atom force field by Cornell et al.²⁹ Bond lengths involving hydrogens were constrained using the SHAKE algorithm³⁰ and a time step of 2.0 femtosecond (fs). Molecular dynamics were performed at 300 K using a residue-based cut-off of 10 Å. Pairlists were updated every 25 time steps. Hydrogens were added to the structure predicted by MODELLER using the stored internal coordinates of the AMBER all-atom data base and then minimized, the heavy atoms being kept fixed in their original positions. All Lys and Arg residues were positively charged and Glu and Asp residues were negatively charged.

The reduced form of the cofactor (NADPH) was used for the calculations, according to the tighter binding of NADPH over NADP^+ to DHFR.^{31–33} Force field parameters for NADPH were adapted from previous simulations that employed the oxidized form (NADP^+) of the cofactor.³⁴ The geometry of the reduced nicotinamide ring was fully optimized at the 6-31G* level using Gaussian 94, and partial charges on atoms were calculated from an electrostatic potential fit to a 6-31G* ab-initio wave function, followed by a standard RESP (restrained electrostatic potential) fit.^{35,36} Bond, angle, dihedral and van der Waals parameters of the nicotinamide ring were assigned consistently with the Cornell et al. force field, and then tested for their ability to reproduce the 6-31G* optimized geometry. The remaining adenosine and phosphate parameters of NADPH were taken from NADP^+ .³⁴

Molecular mechanics and molecular dynamics calculations on the two long insertions in the pfDHFR sequence were performed first to allow more relaxation of the non-conserved and less validated regions of the structure without affecting the geometry of the most conserved regions. The two loops were energy-minimized with 3000 steps of conjugate gradient minimization, followed by 10 ps molecular dynamics at 300 K. This protocol was repeated 10 times, with energy-minimization after each molecular dynamics. To perform these first molecular mechanics and molecular dynamics calculations, a distance-dependent dielectric constant with a dielectric multiplication constant of 4 was used to simulate the presence of water.

In order to include the effects of explicit water molecules at the active site of DHFR, the final structure obtained was solvated with a spherical cap of 2113 TIP3P³⁷ water molecules centered on the center of mass of pfDHFR. Calculations were continued using a dielectric constant of 1 and the explicit water molecules. In order to allow the equilibration of the solvent around the protein residues, 100 ps molecular dynamics at 300 K were performed on the water molecules. Then, the whole system (enzyme, water, and NADPH) was energy-minimized with 3000 steps, with 5 Kcal/mol restraint applied on the backbone atoms of the enzyme with the exception that the backbone atoms of loops 1 and 2 were left free. The restraint was imposed in order to avoid initial large drifts from the homology model structure, which is based on experimentally-validated structures of DHFRs. Then, 2000 steps of minimization without any constraints were performed, and the resulting structure was compared with the homology model and the DHFR templates to ensure that the conserved regions maintained similar 3D-structure. A 200 ps molecular dynamics simulation at 300 K was then performed on the whole system with a 1 Kcal/mol restraint on the backbone atoms. Whilst performing molecular dynamics, coordinates were collected every 0.2 ps and averaged every 10 ps for visual inspection. Finally, 2000 steps of energy-minimization without constraints were performed. The values of RMS deviations between the final pfDHFR model and the crystal structures of DHFRs from different sources used for homology modeling

were calculated. The considerably low RMS deviations, 1.40 with *E. coli*, 1.47 with *L. casei*, 1.21 with human, 1.24 with chicken liver, and 1.26 with *P. carinii*, revealed that the pfDHFR model was close to these structures.

Docking of pyrimethamine, cycloguanil and WR99210, and molecular dynamics of the complexes

The inhibitors were docked into the active site of pfDHFR, using the final structure obtained from the explicit solvent molecular dynamics calculations. The inhibitors were modeled as protonated state at N1, as evidenced by the NMR studies of both the bound and free states of Pyr, methotrexate (MTX) and trimethoprim (TMP).^{38,39} The protonated amino portions of the inhibitors were initially positioned to interact with the anionic side chain of D54. This choice was strongly suggested by the binding modes of other antifolates with the conserved aspartic or glutamic acid residue corresponding to D54 of the pfDHFR in the available crystal structures of DHFRs from different sources. While Pyr and Cyc have conformationally constrained structures, the more conformationally flexible 2',4',5'-trichlorophenoxy propyloxy group of WR99210 was docked into the active site using the orientations of folate and MTX in the available crystal structures as guidelines.

To obtain a set of atomic charges for the inhibitors, their structures were completely optimized at the STO-3G basis set level, using Gaussian 94. Charges were calculated from an electrostatic potential fit to a 6-31G* ab-initio wave function, followed by a standard RESP fit. Atom types were assigned consistently with the Cornell et al. force field,²⁹ and some parameters were adjusted to reproduce the STO-3G optimized geometry. The parameters for the chlorine atoms of the inhibitors were as previously described.⁴⁰

The molecular mechanics and molecular dynamics calculations of the complexes with the inhibitors were performed in explicit water molecule environment. The same solvation sphere of the pfDHFR–NADPH binary complex was used, but the water molecules that are replaced by the inhibitors were removed from the structure. Two thousand steps of minimization on the inhibitor, NADPH, the water molecules and all the protein residues within 10 Å from the inhibitor were performed, followed by 300 ps molecular dynamics at 300 K. A 1 Kcal/mol restraint on the backbone atoms was applied to avoid undesirable drifts from the initial structure.

Molecular dynamics of the pfDHFR mutant complexes

The mutant pfDHFRs complexed with Pyr, Cyc and WR99210 were constructed by changing alanine to valine (A16V), serine to threonine (S108T), and both (A16V + S108T) in the corresponding structures of the wild-type pfDHFR–inhibitor complexes. Five hundred steps of energy-minimization were performed on the inhibitor and the mutated residue only in order to position the side chain of valine and/or threonine with respect to the inhibitor and to relieve steric conflicts due

to the growing of the bulkier amino acid side chains. This was followed by 1000 steps of minimization on the protein residues within 10 Å from the inhibitor, the inhibitor, and all the water molecules. The molecular dynamics at 300 K was then started from these minimized complexes and run for over 300 ps. The 1 Kcal/mol restraint on the backbone atoms was applied as usual.

Synthesis of derivatives of cycloguanil and WR99210

Compounds I, II, III, XIV and XV were prepared by a three-component condensation between 4-chloroaniline, dicyanodiamide and acetone in the presence of concentrated HCl (I) or two-component condensation between the arylbiguanides and the aldehydes (II, III, XIV and XV) both in the presence of concentrated HCl according to the literature.^{41–45} The new compound IV was synthesized by a three-component condensation between 4-chloroaniline, dicyanodiamide and methylal. Compounds V–XII were synthesized by a modified two-component condensation⁴⁴ between the corresponding biguanides and ketones in the presence of concentrated HCl as catalyst and triethyl orthoacetate as water scavenger, the details of which will be published elsewhere (Vilaivan et al., in preparation). All cycloguanil derivatives were isolated as monohydrochloride salts and were purified by crystallization from water or water-ethanol. New compounds gave clean ¹H nmr and mass spectra (APCI or MALDI) and provide satisfactory elemental analysis (C,H,N).

Preparation of pfDHFRs and inhibitor binding studies

The recombinant plasmids pET-pfDHFR (wild-type) and pET-pfDHFR (A16V+S108T) were prepared as previously described¹⁰ and were employed for the preparation of enzymes used for testing the compounds synthesized in the present study. Purification of both wild-type and mutant pfDHFRs was achieved by affinity chromatography on MTX-Sepharose CL-6B column.⁴⁶ The activity of pfDHFR was determined spectrophotometrically by monitoring the decrease in absorbance at 340 nm at 25°C according to the standard assay method described previously.⁴⁶ For determination of the *K_i* values of a number of synthesized analogues, the assay reactions were initiated with affinity-purified enzyme (~0.005–0.01 U ml⁻¹), and the initial velocities in the presence of varying concentrations of inhibitors were analyzed by non-linear least square fit using KaleidagraphTM software. Other analyses of the protein were as earlier described.¹⁰

Results

The alignment of the sequence of pfDHFR with the sequences of DHFRs from selected sources of which the X-ray structures are known is shown in Figure 1. There is significant homology among the DHFRs compared, with the exception that the pfDHFR sequence contained two extra insertions between residues 22–38 and residues 64–98. Our initial pfDHFR model was therefore

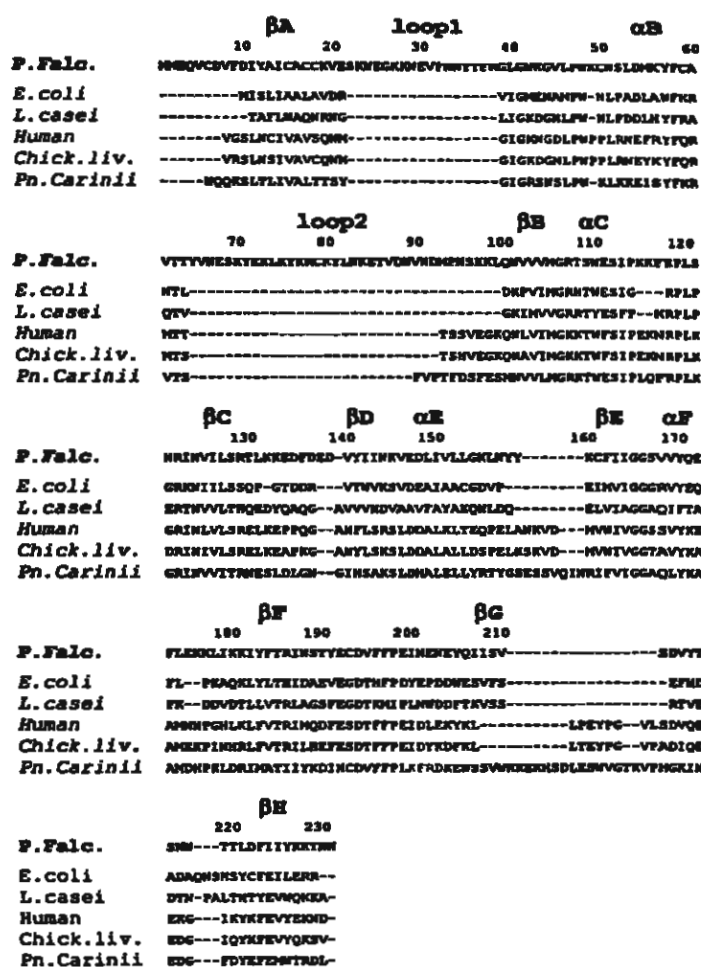


Figure 1. Alignment of the amino acid sequences of dihydrofolate reductase of *Plasmodium falciparum*,¹⁸ *Escherichia coli*,⁴⁹ *Lactobacillus casei*,⁵⁰ human,^{51,52} chicken liver⁵³ and *Pneumocystis carinii*.⁵⁴ The percentages of the identical amino acids between *P. falciparum* DHFRs and DHFRs from *E. coli*, *L. casei*, human, chicken liver, and *P. carinii* are 29, 24, 32, 32, and 24%, respectively. The elements of secondary structure are indicated as α , β , and loop.

constructed without the sequences of the two insertions. The resulting model was then used to check for the folding of the conserved regions, to make superimpositions and comparisons with other known templates.

The local alignments of the two extra sequences of pfDHFR were predicted from BLAST.²⁶ A stringent significance threshold of 3 was adopted, resulting in two significant homologous segments for loop 1 and five for loop 2. The predicted alignments were restored into the DHFR model. As for loop 1, the local alignments predicted to fill this insertion significantly reduced the quality of the model and also markedly affected the structure of the most conserved regions. On the contrary, one out of the five local alignments that BLAST identified to fill the second insertion gave an acceptable initial arrangement of loop 2 without affecting the quality and the structure of the conserved regions. Therefore, the initial homology model was constructed using the best local alignment only for loop 2. The loop 1, however, was subsequently constructed manually and then appended to the structure previously obtained

from MODELLER, with some adjustment. It is important that the homology model be maintained as close as possible to the experimentally-validated DHFRs in the conserved regions, though only an initial guess of the conformation could be obtained at this stage for the two loops. Extensive molecular dynamics calculations were performed in order to obtain the best conformation, first on the two loops and subsequently on the whole pfDHFR structure. A restraint on the backbone atoms of the conserved regions of DHFR during molecular dynamics prevented undesirable drifts from the crystal structures of the templates. The final model obtained is graphically displayed in Figure 2.

The overall folding of pfDHFR is very similar to that previously reported for other DHFRs.⁴⁷ An eight-stranded β -sheet (β A– β H) consisting of seven parallel strands and a carboxyl terminal antiparallel strand composes the core of the protein. Four α helices (α B, α C, α E, α F) are packed against the β sheet core. The two-turn character of helix α E, which is present in the human and chicken liver DHFRs but not in the *E. coli* and *L. casei* DHFRs, is not predicted in the pfDHFR structure. The remaining residues are involved in loops, which connect elements of secondary structure.

NADPH is bound to pfDHFR in an extended conformation similar to that previously reported for co-factor binding to other DHFRs, with nearly all the protein-cofactor interactions being conserved within available crystal structures (data not shown). The nicotinamide ring is bound near the center of the molecule in a cleft formed by the divergence of β E and β A. The A-side of nicotinamide is directed towards the opening of the active site. The 3'-carboxamide amino group hydrogen bonds to the backbone oxygen of A16, and the

carboxamide carbonyl hydrogen bonds to the backbone nitrogen of A16.

Docking of Pyr, Cyc, and WR99210 into the active site of the pfDHFR models was performed to investigate the interactions of the drugs with various amino acid residues in the active site of both wild-type and A16V+S108T mutant DHFR models. The selected active site residues of the wild-type pfDHFR model that interacted with Cyc (shown as green) is illustrated in Figure 3A; the 6-amino group of Cyc hydrogen bonds to one carboxylate oxygen of D54, which in turn forms hydrogen bond to T185, and the protonated N1-H of Cyc hydrogen bonds to the other carboxylate oxygen of D54. The bidentate hydrogen bonding observed with the residue D54 is not uncommon and indeed is consistent with the specific hydrogen bonding interactions established between the amino functions of antifolates and the conserved aspartic or glutamic acid side chains of other DHFRs whose crystal structures are available. The 4-amino group of Cyc hydrogen bonds to the backbone oxygens of I164 and I14, while the 2,2'-dimethyl groups are in contact with A16, L46, and F58 side chains. Finally, the 3-chlorophenyl substituent of Cyc stacks against the nicotinamide ring of NADPH, with the chlorine atom close to S108 and I112. The binding of Pyr and WR99210 to the wild-type DHFR was found to be very similar to Cyc (Fig. 3, Panel A), whereas this is not the case for the A16V+S108T mutant pfDHFR (Fig. 3, Panel B). The differences in the orientation and binding interactions of the inhibitors were better highlighted from the superimpositions of the inhibitors in the active site of the wild-type pfDHFR model. As shown in Figure 4, the three inhibitors, i.e., Pyr (yellow), Cyc (green) and WR99210 (red), were very well superimposed and showed nearly identical interactions

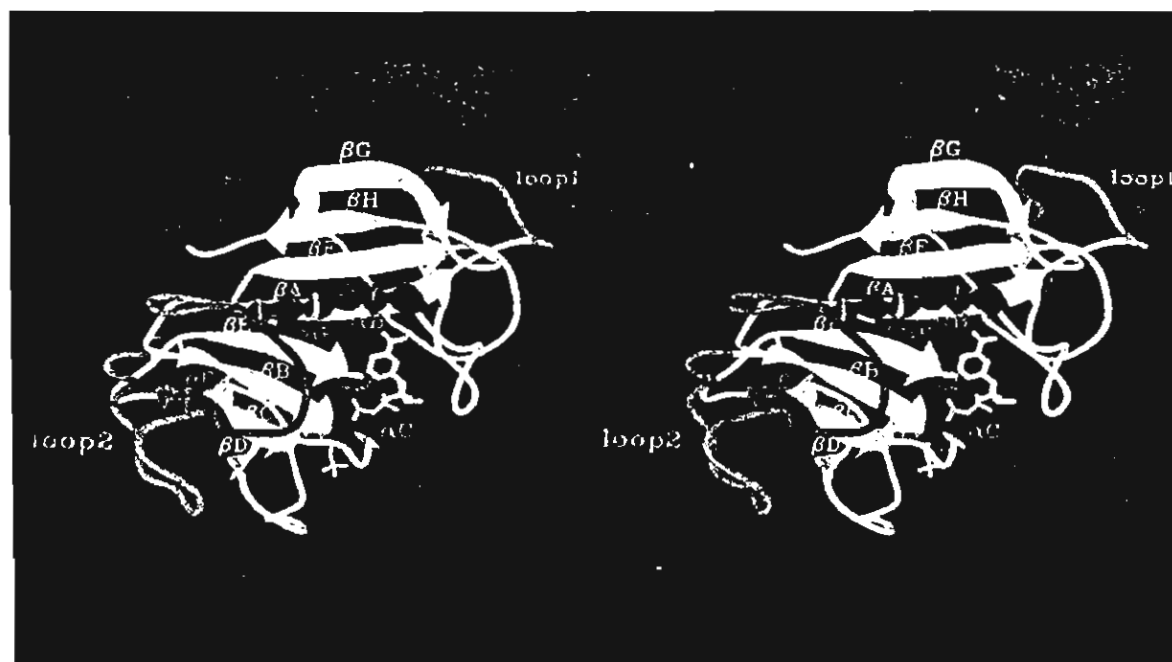


Figure 2. Stereoviews showing the overall folding of *Plasmodium falciparum* DHFR. β sheets are colored in yellow, α helices are colored in red. The loops are white, with the exception of loops 1 and 2 corresponding to the two insertions in pfDHFR which are colored in blue. NADPH is colored in cyan.

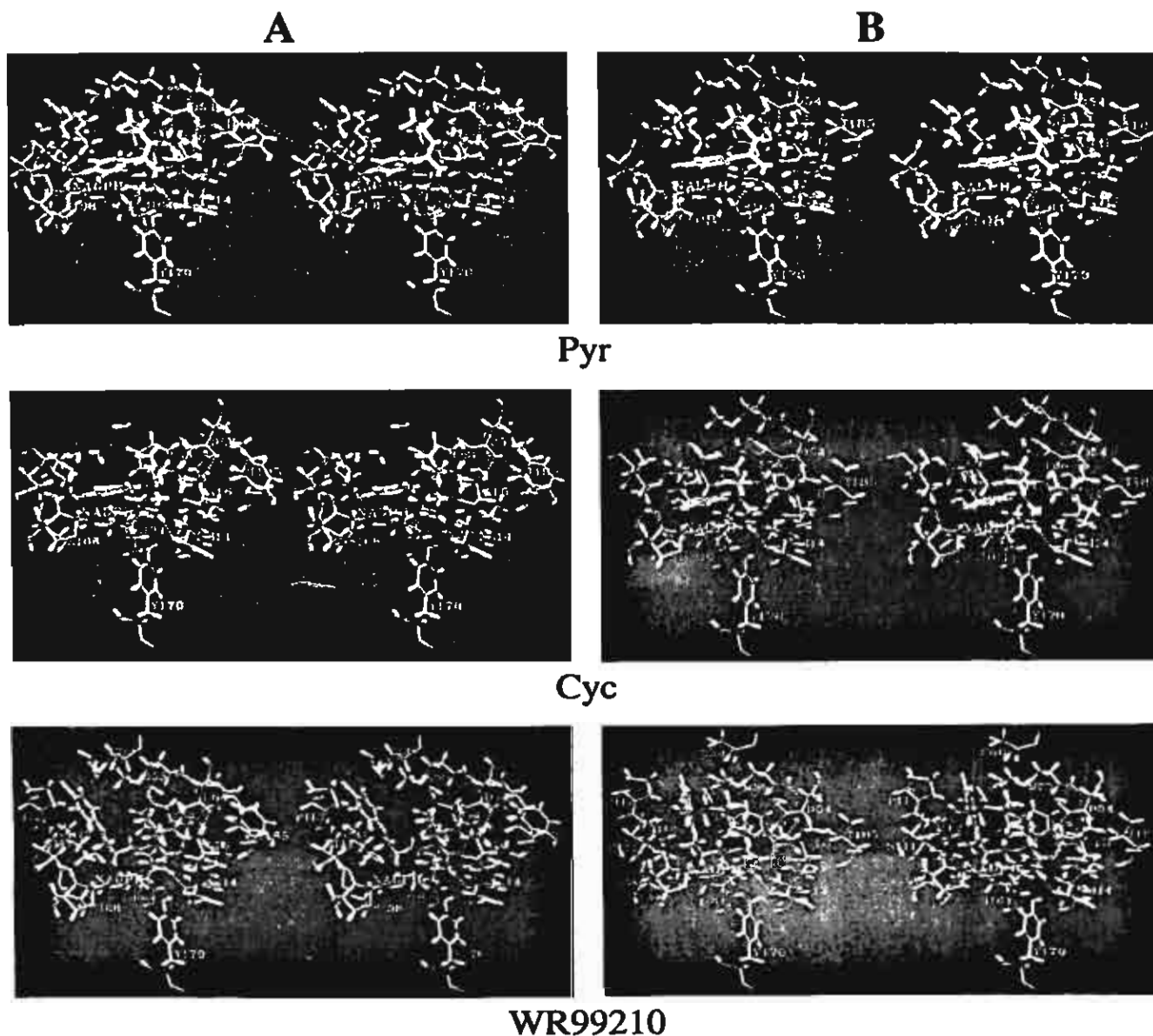


Figure 3. Stereoviews of wild-type (Panel A) and A16V + S108T (Panel B) pDHFRs showing active site residues involved in the interaction with Pyr (yellow), Cyc (green), and WR99210 (red). The residues shown are I14, A16, C50, D54, M55, F58, S108, S111, I112, P113, I164, Y170 and NADPH molecule.

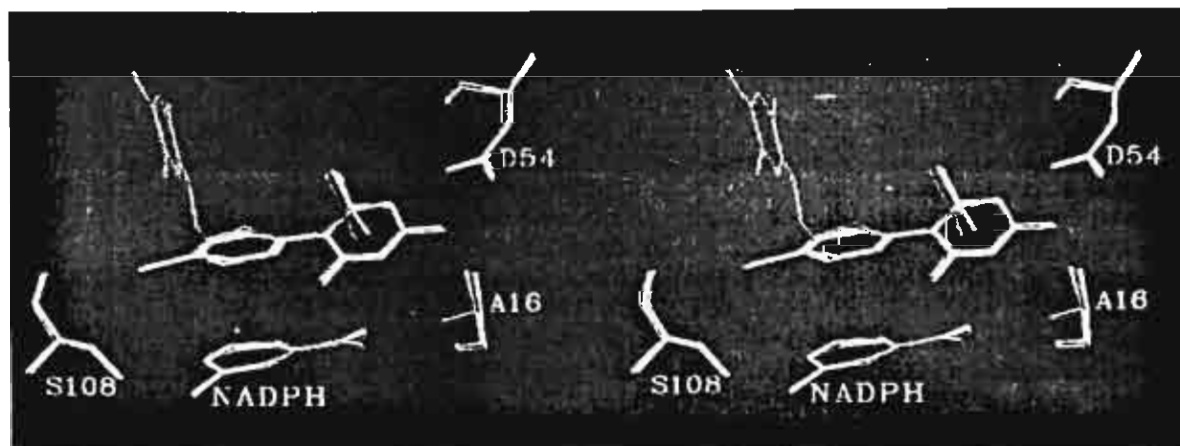


Figure 4. Stereoviews showing the superimpositions of inhibitors bound at the active site of wild-type pDHFR. Residues A16, D54, S108, and the nicotinamide ring of NADPH are shown with the inhibitors Pyr (yellow), Cyc (green), and WR99210 (red).

with the same residues as those described for Cyc. However, while the chlorophenyl substituent of Cyc and Pyr stacks against the nicotinamide ring of NADPH and is directed toward S108, the flexible trichlorophenoxy propyloxy of WR99210 is almost perpendicular with the nicotinamide ring and is not in contact with the cofactor. Interestingly, one water molecule binds over the nicotinamide ring, making hydrogen bonds with the N1 nitrogen of the nicotinamide and the 2'-hydroxyl of the ribose. The trichlorophenoxy propyloxy substituent of WR99210 is in contact with C50, M55, S111, and P113 (see Fig. 3A and B).

The effects of single and double mutations at amino acid residues 16 and 108 on the binding of Pyr, Cyc and WR99210 were further investigated (Fig. 5). The molecular dynamics stimulation of the Pyr complexed with A16V mutant model revealed minimal changes of orientation and binding interactions with respect to that of the wild-type enzyme complex (Fig. 5A). By contrast, the complex between Cyc and the A16V mutant was significantly different from the complex with the wild-type enzyme; the inhibitor was displaced from its position in the wild-type complex due to the steric conflict with valine in A16V mutant (Fig. 5B). Superimposition between Cyc and Pyr in the wild-type complexes indicated that one of the two 2,2'-methyl substituents of Cyc was located much closer (1.4 Å) to the methyl of the A16 side chain with respect to the 6-ethyl substituent of Pyr, the former being in Van der Waals contact with the methyl of A16 whereas the latter is significantly more distant (data not shown). Therefore, the steric demand imposed by the A16V mutation should be much more pronounced for Cyc than for Pyr, although hydrogen bonding interactions with D54, I14, and I164 are still present. The displacement of Cyc in the structure of the A16V mutant is illustrated in Figure 5B. While the displacement of the triazine ring of Cyc did not seem to affect the ability to make hydrogen bond between the drug and D54, I14, and I164, the orientation of the chlorophenyl ring of the inhibitor bound to the A16V enzyme was found to be significantly different from that of the wild-type enzyme. This is due to Cyc being bound in a locked region comprising A16 and D54 for the dihydrotriazine ring, nicotinamide, and S108 for the chlorophenyl ring of the inhibitor. Interestingly, the stacking interactions with the nicotinamide ring of NADPH were completely lost in the A16V mutant and one water molecule was found in place of the chlorophenyl ring (data not shown).

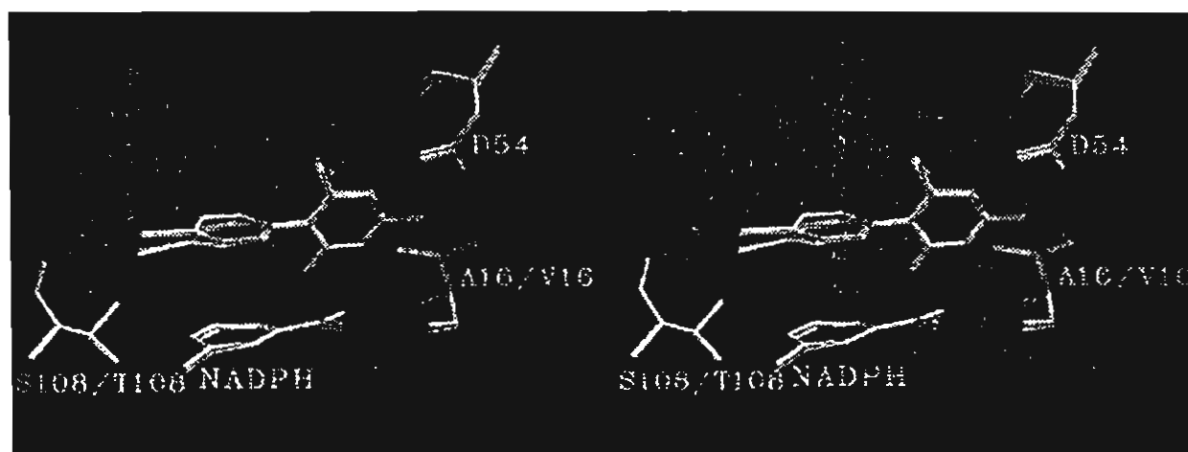
The dihydrotriazine rings of WR99210 and Cyc are identical and therefore are predicted to bind the A16V mutant pDHFR in the same orientation. As a consequence, the 2,2'-dimethyl substituents of WR99210 should also be in steric conflict with the valine side chain of the A16V mutant. Figure 5C illustrates the superimpositions of WR99210 bound to wild-type, A16V, S108T and A16V+S108T double mutant DHFR models. A slight displacement from its optimal position occupied in the wild-type complex was noted when the inhibitor was bound to the pDHFRs with A16V mutation. The model shows that the trichlorophenoxy

propyloxy substituent of WR99210 is not forced to change its orientation significantly in the A16V mutant. Instead, its flexible side chain allows it to be free from being locked between the residues A16, D54, nicotinamide, and S108 as observed in the structure of the wild-type complex. Therefore it is likely that the steric demand imposed by V16 would not significantly affect the orientation of the drug upon binding to the pDHFRs with the A16V mutation (Fig. 5C).

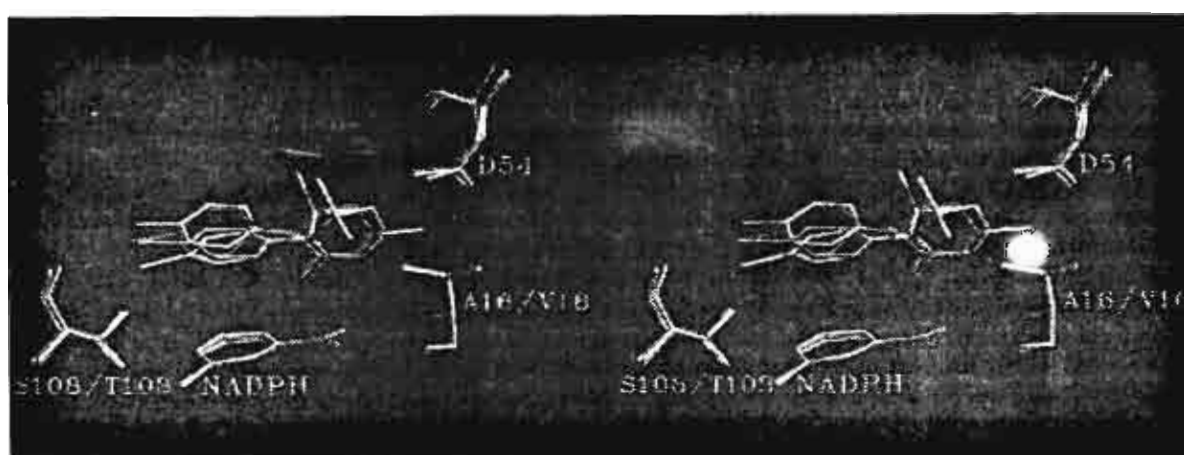
The bindings of Pyr, Cyc, and WR99210 to the mutant model of DHFR with single S108T mutation were also investigated. Generally, all the three inhibitors bind to the S108T mutant model with similar orientation as in the wild-type complex, albeit with some minor differences. The bulkier side chain of the T108 mutant slightly affects the position of the chlorophenyl ring of Pyr and Cyc (Fig. 5A and B). However, the orientation of the propyloxy substituent of WR99210 is not affected upon binding to pDHFR with the S108T mutation (Fig. 5C).

The model indicates that the 6-ethyl substituent of Pyr is not in steric conflict with A16V+S108T pDHFR despite the locking of the inhibitor between residues 16, 54, nicotinamide, and 108. Therefore, Pyr is predicted to bind the double mutant DHFR with no appreciable differences as compared to the binding to the wild-type, A16V, and S108T single mutant enzymes (Fig. 5A). As previously illustrated for the A16V and S108T mutant, the steric conflict with V16 must be relatively small and therefore no significant displacement of the inhibitors was detected. The situation is very different for Cyc. In the A16V+S108T double mutant, however, the chlorophenyl ring is further displaced from nicotinamide owing to steric conflicts with T108, while the position of the dihydrotriazine ring of Cyc is not different to that of the A16V mutant (Fig. 5B). Binding of WR99210 is similar to Cyc in its dihydrotriazine moiety but the inhibitor is not locked toward nicotinamide and is also much more flexible. As a result, slight displacement of the dihydrotriazine ring has no consequences for the overall binding in the double mutant enzyme (Fig. 5C). The steric clash between the V16 side chain of the A16V mutant pDHFR is clearly evidenced for Cyc binding, but not for Pyr binding (Fig. 6).

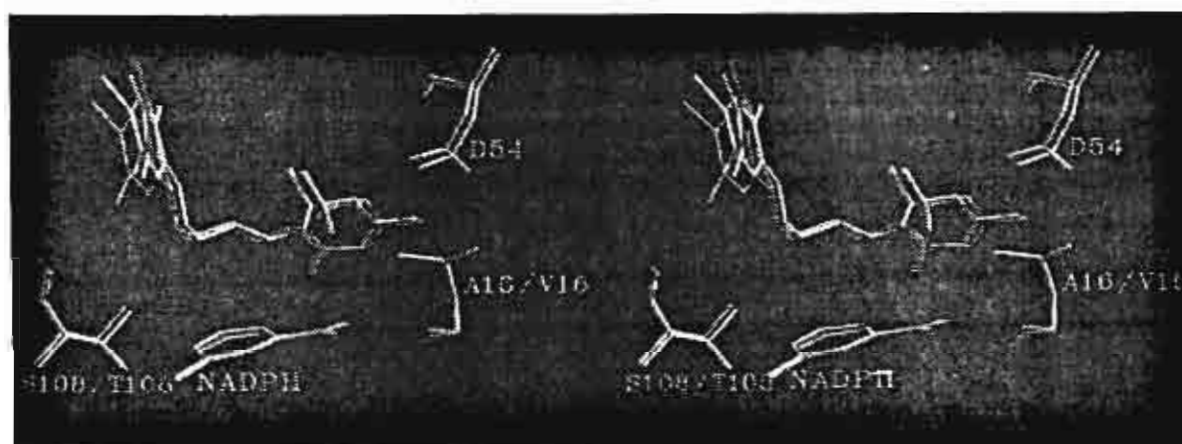
In order to verify the homology model of *P. falciparum* DHFR and to exploit the model for the prediction of binding of inhibitors and/or development of strategies for the design of the best effective inhibitor(s) targeted against antifolate resistant malaria, we have synthesized a number of Cyc derivatives and tested against both wild-type and A16V+S108T mutant pDHFRs. Our premise is that resistance to Cyc in the A16V+S108T mutant is the result of steric conflict imposed by a bulkier side chain of V16. To test the hypothesis, Cyc derivatives with one substituent (ethyl or methyl group) or no substituent at position R₂, and those with bulky substituents at both R₁ and R₂ positions of the dihydrotriazine ring were synthesized. The binding affinity (K_i) values were then determined and the ratios of K_i -mut/ K_i -wt were compared. Table 1 summarizes the K_i



(A)



(B)



(C)

Figure 5. Superimpositions of inhibitors bound to wild-type (yellow), A16V (red), S108T (cyan) and A16V + S108T (white) pDHFRs. The inhibitors shown are (A) Pyr; (B) Cyc; (C) WR99210.

values for the wild-type and the A16V + S108T mutant DHFRs. The relative loss in binding affinity of the Cyc derivatives is reflected by the elevation of K_i -mut/ K_i -wt ratio. As shown in Table 1, the compounds II and III inhibited the wild-type pDHFR with K_i values 2–3 times higher than that of Cyc, but exhibited 7–10 times lower K_i values for the A16V + S108T mutant pDHFR

than the Cyc. As a result, the K_i -mut/ K_i -wt ratios for the compound II and III were ~17–28 times lower than that of the Cyc parent compound. Removal of both methyl groups at the 2-R₁ and 2-R₂ positions gave rise to compound IV (didesmethyl Cyc), which has a K_i value for the wild-type enzyme about 16-fold higher than that of Cyc, whereas the K_i value for the A16V + S108T enzyme

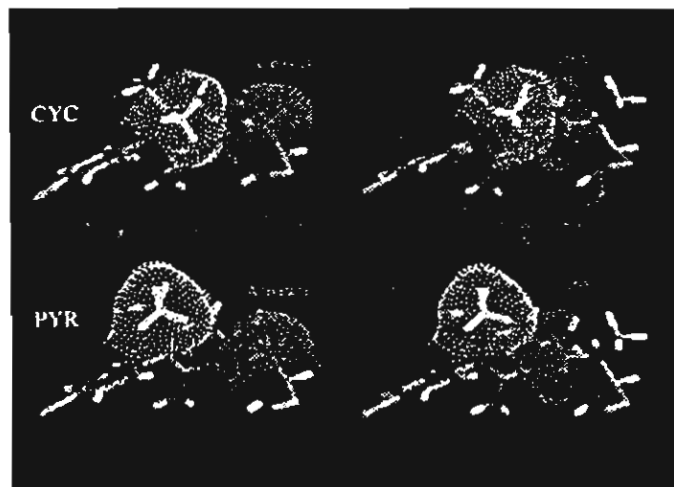


Figure 6. Display of the surface of the side chain residue of amino acid A16 (red) and A16V (purple) interacting with one of the 2,2'-methyl substituents of Cyc (yellow) and 6-ethyl substituent of Pyr (yellow).

was about 2-fold lower than Cyc. As a consequence, the ratio of K_i -mut/ K_i -wt for the compound IV was 34-fold lower than that for Cyc (Table 1).

Our studies were further extended to investigate the binding between Cyc derivatives with bulky 2,2' di-substituents and the wild-type and A16V+S108T mutant DHFRs. Nine compounds (compounds V–XIII) were selected for the evaluation. Except for compounds IX and XIII, which exhibited high K_i values, all other seven derivatives gave K_i values for the wild-type enzyme that were comparable to that for Cyc. When tested with the A16V+S108T enzyme, the K_i values of these derivatives except compound VIII were all higher than that of Cyc, resulting in relatively high ratios of K_i -mut/ K_i -wt.

The K_i values for WR99210 (compound XIV, Table 2) and other Cyc derivatives were compared with their 2-monomethyl derivatives (Table 2). Removal of one methyl from position 2- R_1 of WR99210 (compound

XV, Table 2) resulted in a 2- and 3-fold decrease in the K_i values for the wild-type and the A16V+S108T enzymes, respectively. The compound XVI with 4'-Br- C_6H_4 at 3-R position (Table 2) only slightly increased the K_i for the wild-type pDHFR by 2-fold, but dramatically elevated the K_i for the A16V+S108T enzyme by 800-fold. The steric conflict observed in the compound XVI was relieved by replacing the methyl group at position 2- R_1 with hydrogen. The resulting compound XVII was then found to exhibit a 10-fold lower K_i for the A16V+S108T enzyme as compared to the compound XVI, albeit the manipulation slightly affected the binding affinity of the inhibitor to the wild-type enzyme. Likewise, similar effect was also found for compounds XVIII and XIX, where changes were made at the positions 2- R_1 and 3-R (Table 2).

Discussion

Resistance to antifolates Pyr and Cyc in malaria parasites has been shown to be associated with point mutations in the *dhfr* gene.^{1,5,7,46} Cross resistance to both drugs is generally found to involve combinations of N51I, C59R, S108N, and I164L mutations, whereas parasites resistant to Cyc but susceptible to Pyr are associated with mutation at residues 16 and 108 (A16V+S108T). In the present study, we sought to understand the molecular interactions between the DHFR of *P. falciparum* and antimalarial antifolates Pyr, Cyc, and WR99210, to predict the effect of mutation(s) on the binding of the inhibitors to the enzyme, and to address the importance of the mutation(s) at different residues in conferring resistance to the antifolates.

We describe a homology model of *P. falciparum* DHFR based on sequence alignment of the DHFR sequences of *E. coli*, *L. casei*, human, chicken liver, and *P. carinii*. Our model was built using the conserved regions of a number of known DHFR templates, and the structures of the unique regions in pDHFR were subsequently assigned to avoid undesirable perturbation of

Table 1. K_i values for the cycloguanil derivatives with only one or no substituent at position R_1 (compounds I–IV) and bulky substituents at positions R_1 and R_2 (compounds V–XIII)^a

Compound	2- R_1	2- R_2	K_i -wt ^b (nM)	Rel to Cyc	K_i -mut ^c (nM)	Rel to Cyc	K_i -mut ^c / K_i -wt ^b
I	Me	Me	1.5 ± 0.3 ^d	1.0	1314 ± 165 ^d	1.0	876
II	H	Me	4.1 ± 0.0	2.7	127 ± 14	0.1	31
III	H	Et	3.6 ± 0.0	2.4	189 ± 37	0.14	53
IV	H	H	24.4 ± 4.3	16.3	646 ± 78	0.5	26
V	Me	<i>n</i> -Pr	3.5 ± 0.4	2.3	9229 ± 547	7.0	2637
VI	Me	<i>n</i> -Bu	1.8 ± 0.2	1.2	4217 ± 390	3.2	2343
VII	Me	<i>n</i> -Pen	1.2 ± 0.1	0.8	3594 ± 446	2.7	2995
VIII	Me	<i>n</i> -Hex	0.6 ± 0.1	0.4	956 ± 78	0.7	1593
IX	Me	<i>i</i> -Pr	36.5 ± 4.1	24.3	44,791 ± 5872	34.1	1227
X	Me	<i>i</i> -Bu	4.7 ± 1.9	3.1	15,263 ± 986	11.6	3247
XI	Me	<i>i</i> -Pen	1.7 ± 0.1	1.1	5755 ± 545	4.4	3385
XII	Et	Et	7.7 ± 1.2	5.1	16,151 ± 3599	12.3	2098
XIII	Et	<i>n</i> -Pen	19.3 ± 3.8	12.9	18,041 ± 1905	13.7	935

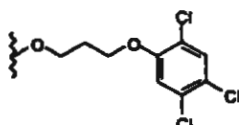
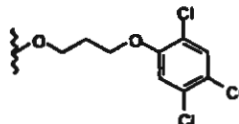
^aMe, methyl; Et, ethyl; Pr, propyl; Bu, butyl; Pen, pentyl; Hex, hexyl.

^bWild-type pDHFR.

^cpDHFR (A16V+S108T).

^dData from Sirawaraporn et al.¹⁰

Table 2. K_i values for the WR99210 and other cycloguanil derivatives compared with their 2-monomethyl derivatives

Compound	3-R	2-R ₁	2-R ₂	K_i -wt ^a (nM)	Rel to WR99210	K_i -mut ^b (nM)	Rel to WR99210	K_i -mut ^b / K_i -wt ^a
XIV (WR99210)		Me ^c	Me	0.5 ± 0.1	1.0	2.4 ± 0.4	1.0	4.8
XV		H	Me	0.3 ± 0.0	0.6	0.8 ± 0.1	0.3	2.7
XVI	4'-Br-C ₆ H ₄	Me	Me	1.1 ± 0.2	2.2	1948 ± 366	812	1771
XVII	4'-Br-C ₆ H ₄	H	Me	5.7 ± 0.5	11.4	202 ± 17	84	35
XVIII	4'-Me-C ₆ H ₄	Me	Me	1.8 ± 0.2	3.6	1584 ± 210	660	880
XIX	4'-Me-C ₆ H ₄	H	Me	23.4 ± 1.9	46.8	186 ± 22	78	8.0

^aWild-type pfDHFR.^bpfDHFR (A16V + S108T).^cMe, methyl.

the overall conformation of the structure. The overall topology of the pfDHFR is similar to the DHFRs from other sources (Fig. 2), except for its two extra-loop insertions located at the enzyme surface. Unlike those previously reported by other workers,^{18,48} the model presented in this paper was built based not only on the alignments among the DHFR sequences, but also on their 3D-structural conservation. The homology noted at least from residue 10, therefore, makes the alignment more meaningful and enables analysis of residue 16 which is crucial for Cyc-resistance. In the present study, the structures of A16V and A16V + S108T mutant pfDHFRs were also built from the wild-type template and docking of the antifolates Pyr, Cyc, and WR99210 was performed using both wild-type and mutant structures.

Our structural models show that the ethyl and methyl substituents of Pyr and Cyc, respectively, are directed towards the methyl side chain of A16 in the wild-type pfDHFR. As a result, it is very likely that the bulkier side chain of valine in the A16V mutant of pfDHFR would cause steric conflicts with these substituents, and therefore may explain Cyc resistance for these mutants. However, such effect does not occur in the case of Pyr; the inhibitor binds equally well with the same orientation and binding interactions to A16V + S108T mutant pfDHFR as well as the wild-type enzyme, evidence which is in accord with the earlier observations by many groups that the A16V + S108T mutant is susceptible to Pyr.^{5,7,10,11}

Although Cyc is predicted to bind to the wild-type pfDHFR in a similar way to Pyr, one of its two 2,2'-dimethyl substituents is significantly closer to the side chain of residue 16 than is the ethyl group of Pyr. This would inevitably generate steric constraint for binding to Cyc when the bulkier side chain of valine is present at position 16 as in the A16V and A16V + S108T mutants. Since Cyc is predicted to bind in a locked region which is composed of A16 and D54 for the dihydrotriazine

ring, and nicotinamide and S108 for the chlorophenyl ring of the inhibitor, A16V + S108T mutation would result in steric constraint and cause displacement of both the dihydrotriazine moiety and the chlorophenyl ring from its optimal position as depicted for the wild-type enzyme, giving rise to a remarkable loss of binding affinity for Cyc and hence resistance to Cyc for the A16V + S108T mutant pfDHFR.

The displacement of WR99210, however, is relatively minor when compared with Cyc. This is likely due to the reason that the more flexible trichlorophenyl propoxy side chain of WR99210 is not locked between nicotinamide and S108 as observed for the chlorophenyl ring of Cyc. Therefore, the steric demand imposed by valine 16 only slightly affects the orientation of WR99210 and leaves unaffected binding interactions with other protein residues, in agreement with the finding that WR99210 is highly effective against the resistant mutants.

Our model predicts that binding of the derivatives with only one or no substituent at position 2 should be less affected by the mutation than Cyc. This would be reflected in the values of the ratios of the K_i for the A16V + S108T mutant enzyme and the wild-type enzyme (K_i -mut/ K_i -wt). In order to test this model, a number of Cyc derivatives were synthesized and the binding affinities to the wild-type and mutant enzymes were studied. It was found that K_i -mut/ K_i -wt values for the derivatives with only one or no substituent at position 2 are lower than for Cyc, as predicted (compounds II–IV, Table 1). Furthermore, 2,2'-disubstituted derivatives of Cyc with bulky substituents tend to have higher K_i -mut/ K_i -wt ratios, as expected (compounds V–XIII, Table 1). The favorable effect on binding of the removal of the 2-methyl group was also found for WR99210 (Table 2). However, this effect is far less than for Cyc derivatives with p-chloro-, bromo- or methyl-phenyl substituents, because WR99210 is not locked, and can already interact well with the mutant enzyme even with

both 2-methyl groups present. The overall results obtained from this study are in support of the steric constraint hypothesis. Further it reveals the important steric role in binding between the substituents at position 2 of Cyc to the active residue(s) of the pfDHFR, which could have profound implications for the development of new and effective inhibitors against antifolate resistant parasites.

Conclusion

The homology models of wild-type, A16V, S108T, and A16V+S108T *P. falciparum* DHFRs were built based on multiple sequence alignment and homology modeling procedures. The models were used to address the molecular interactions between the active site residues of the enzymes and antifolates Cyc, Pyr and WR99210. We proposed a 'steric constraint' hypothesis and demonstrated its validity by testing with inhibitor analogues using the wild-type and relevant mutant pfDHFRs. The models not only explain the Cyc resistance but also Pyr susceptibility in relation to the A16V mutation of the pfDHFR domain. In addition, it has allowed us for the first time to better understand the molecular basis of cross resistance between Cyc and Pyr, which have been known to involve mutations at residues 51, 59, 108 and 164 of the pfDHFR domain. Further, the modeling of the interaction between pfDHFR and WR99210 has also provided ideas that could lead to the development of new and more effective second generation antifolate antimalarials.

Acknowledgements

This research is supported by grants from World Health Organization (TDR) to WS, the European Union (INCO-DC IC18CT970223) to YY and GL, and The University of Modena (Ricerca Orientata) to GR. TV is supported by The Thailand Research Fund (PDF/57/2540). We thank Rachada Sirawaraporn and Kaneung Chitcholtan for their excellent technical assistance.

References

- Cowman, A. F.; Morry, M. J.; Biggs, B. A.; Cross, G. A. M.; Foote, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 9109.
- Snewin, V. A.; England, S. M.; Sims, P. F. G.; Hyde, J. E. *Gene* 1989, 76, 41.
- Basco, L. K.; de Pecoulas, P. E.; Le Bras, J.; Wilson, C. M. *Exp. Parasitol.* 1996, 82, 97.
- Basco, L. K.; de Pecoulas, P. E.; Wilson, C. M.; Le Bras, J.; Mazabraud, A. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995, 69, 135.
- Foote, S. J.; Galatis, D.; Cowman, A. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 3014.
- Hyde, J. *Parasitol. Today* 1989, 5, 252.
- Peterson, D. S.; Walliker, D.; Wellems, T. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 9114.
- Thaithong, S.; Chan, S.-W.; Songsomboon, S.; Wilairat, P.; Seesod, N.; Sueblinwong, T.; Goman, M.; Ridley, R.; Beale, G. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, 52, 149.

- Zolg, J. W.; Plitt, J. R.; Chen, G.-X.; Palmer, S. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989, 36, 253.
- Sirawaraporn, W.; Sathitkul, T.; Sirawaraporn, R.; Yuthavong, Y.; Santi, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 1124.
- Peterson, D. S.; Milhous, W. K.; Wellems, T. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 3018.
- Childs, G. E.; Lambros, C. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1986, 80, 177.
- Hekmat-Nejad, M.; Rathod, P. K. *Exp. Parasitol.* 1997, 87, 222.
- Sanchez, R.; Sali, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997, 7, 206.
- Toyoda, T.; Brobey, R. K. B.; Sano, G.-I.; Horii, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 235, 515.
- McKie, J. H.; Douglas, K. T.; Chan, C.; Roser, S. A.; Yates, R.; Read, M.; Hyde, J. E.; Dascombe, M. J.; Yuthavong, Y.; Sirawaraporn, W. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 1367.
- Warhurst, D. C. *Drug Discovery Today* 1998, 3, 538.
- Bzik, D. J.; Li, W.-B.; Horii, T.; Inselburg, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 8360.
- Reyes, V. M.; Sawaya, M. T.; Brown, K. A.; Kraut, J. *Biochemistry* 1995, 34, 2710.
- Bolin, J. T.; Filman, D. J.; Matthews, D. A.; Hamlin, R. C.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 13650.
- Oefner, C.; D'Arcy, A.; Winkler, F. K. *Eur. J. Biochem.* 1988, 174, 377.
- Lewis, W. S.; Cody, V.; Galitsky, N.; Luft, J. R.; Pangborn, W.; Chunduru, S. K.; Spencer, H. T.; Appleman, J. R.; Blakley, R. L. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 5057.
- McTigue, M. A.; Davies II, J. F.; Kaufman, B. T.; Kraut, J. *Biochemistry* 1992, 31, 7264.
- Champness, J. N.; Achari, A.; Ballantine, S. P.; Bryant, P. K.; Delves, C. J.; Stammers, D. K. *Structure* 1994, 2, 915.
- Sali, A.; Blundell, T. L. *J. Mol. Biol.* 1993, 234, 779.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. *J. Mol. Biol.* 1990, 215, 403.
- Laskowski, R. A.; McArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. *J. Appl. Cryst.* 1993, 26, 283.
- Pearlman, D. A.; Case, D. A.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Cheatman III, T. E.; Ferguson, D. M.; Kollman, P. A. *AMBER 4.1*. University of California: San Francisco, 1995.
- Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5179.
- van Gusteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. *Mol. Phys.* 1977, 34, 1311.
- Penner, M. H.; Frieden, C. *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 5366.
- Fierke, C. A.; Johnson, K. A.; Benkovics, S. J. *Biochemistry* 1987, 26, 4085.
- Appleman, J. R.; Howell, E. E.; Kraut, J.; Blakley, R. L. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 5579.
- Costantino, L.; Rastelli, G.; Vescovini, K.; Cignarella, G.; Vianello, P.; Corso, A. D.; Cappiello, M.; Mura, U.; Barlocco, D. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 4396.
- Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A. *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 10269.
- Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* 1995, 16, 1357.
- Jørgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* 1983, 79, 926.
- Cocco, L.; Roth, B.; Temple, Jr., C.; Montgomery, J. A.; London, R. E.; Blakley, R. L. *Arch. Biochem. Biophys.* 1983, 226, 567.
- Cocco, L.; Groff, J. P.; Temple, Jr., C.; Montgomery, J. A.; London, R. E.; Matwiyoff, N. A.; Blakley, R. L. *Biochemistry* 1981, 20, 3972.
- Varney, A.; Helissen, S.; Wipff, G.; Collet, A. *J. Comput. Chem.* 1998, 19, 820.

- 41 Carrington, H. C., Crowther, A. F., Stacey, G. J. *J. Chem. Soc.* 1954, 1017
- 42 Colebrook, L. D., Giles, H. G., Rosowsky, A., Bentz, W. E. *Can. J. Chem.* 1976, 54, 3757
- 43 Modest, E. J. *J. Org. Chem.* 1956, 21, 1
- 44 Modest, E. J., Levine, P. *J. Org. Chem.* 1956, 21, 14
- 45 Mamalis, P., Green, J., Outred, D. J., Rix, M. *J. Chem. Soc.* 1962, 3915
- 46 Sirawaraporn, W., Prapunwattana, P., Sirawaraporn, R., Yuthavong, Y., Santi, D. V. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 21637
- 47 Blakley, R. L., Benkovic, S. J. In *Folates and Pteridines*; Blakley, R. L., Benkovic, S. J., Eds.; Wiley: New York, 1984; Vol. 1, pp 191–253
- 48 Lemcke, T., Christensen, I. T., Jørgensen, F. S. *Bioorg. Med. Chem.* 1999, 7, 1003
- 49 Smith, D. R., Calvo, J. M. *Nucleic Acids Res.* 1980, 8, 2255
- 50 Freisheim, J. H., Bitar, K. G., Reddy, A. V., Blankenship, D. T. *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 6437
- 51 Masters, J. N., Attardi, G. *Gene* 1983, 21, 59
- 52 Chen, M.-J., Shimada, T., Moulton, A. D., Cline, A., Humphres, R. K., Maizel, J., Nienhuis, A. W. *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 3933
- 53 Kumar, A. A., Blankenship, D. T., Kaufman, B. T., Freisheim, J. H. *Biochemistry* 1980, 19, 667
- 54 Edman, J. C., Edman, U., Cao, M., Lundgren, B., Kovacs, J. A., Santi, D. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 8625

Development of a Lead Inhibitor for the A16V+S108T Mutant of Dihydrofolate Reductase from the Cycloguanil-Resistant Strain (T9/94) of *Plasmodium falciparum*[†]

Yongyuth Yuthavong,[‡] Tirayut Vilaivan,[§] Netnapa Chareonsethakul,[§] Sumalee Kamchonwongpaisan,[‡] Worachart Sirawaraporn,^{||} Rachel Quarrell,[⊥] and Gordon Lowe^{*⊥}

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Bangkok 10400, Thailand; Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand, and The Dyson Perrins Laboratory, Oxford University, South Parks Road, Oxford, OX1 3QY, U.K.

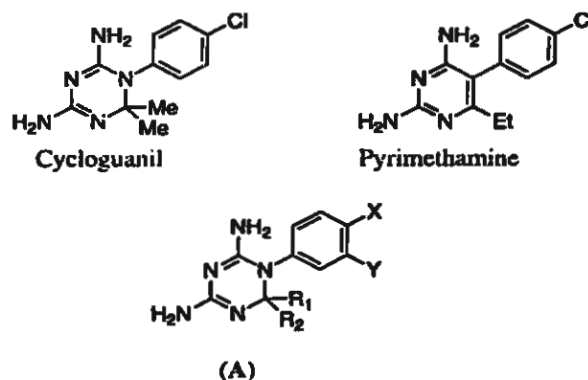
Received February 4, 2000

The Ala16Val+Ser108Thr (A16V+S108T) mutant of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (DHFR) is a key mutant responsible for cycloguanil-resistant malaria due to steric interaction between Val-16 and one of the C-2 methyl groups of cycloguanil. 4,6-Diamino-1,2-dihydrotriazines have been prepared, in which both methyl groups of cycloguanil are replaced by H or by H and an alkyl or phenyl group, and their inhibition constants against wild-type and mutant DHFR determined. The S108T mutation is considered to decrease cycloguanil binding further through the effect on the orientation of the *p*-chlorophenyl group. By moving the *p*-chloro-substituent to the *m*-position in the chlorophenyl group, the activity against the A16V+S108T mutant enzyme is improved, and this effect is reinforced by the *p*-chloro substituent in the 3,4-dichlorophenyl group. A lead compound has been found with inhibitory activity similar to that of cycloguanil against the wild-type DHFR and about 120-fold more effective than cycloguanil against the A16V+S108T mutant enzyme. The activity of this compound against *P. falciparum* clone (T9/94 RC17) which harbors the A16V+S108T DHFR is about 85-fold greater than cycloguanil.

Introduction

Despite continued efforts aimed at complete eradication of malaria, the disease remains a major health threat in many areas of the world, especially in tropical and subtropical countries including Africa.¹ The widespread occurrence of drug-resistant *Plasmodium falciparum* suggests that the effectiveness of the few antimalarials currently in use will have a limited life span and has highlighted the urgent need for the discovery and development of novel antimalarial agents aimed at combating the emerging resistant parasites.

Cycloguanil (Cyc) and its closely related compound pyrimethamine (Pyr) are potent inhibitors of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (pDHFR), one of a few well-defined drug targets for malaria therapy. Both compounds have been extensively employed, either alone or in combination with sulfa-drugs, as prophylactic agents for the treatment of malaria. Unfortunately, resistance of the malaria parasite to the drugs has rapidly emerged and compromised their clinical utility. Analysis of DHFR sequences of several Pyr- and Cyc-resistant *P. falciparum* isolates from different geographical origins with different drug sensitivities revealed that



resistance to Pyr and Cyc is associated with point mutations in the DHFR.^{2–7} The mutations in pDHFR thus far reported are amino acid residues 16, 51, 59, 108, and 164. Mutant pDHFRs involving mutations at residues 51, 59, 108, and 164 confer cross-resistance to Pyr and Cyc, while those involving mutation at residue 16 (A16V) are resistant to Cyc but susceptible to Pyr. The importance of residue 16 for binding Cyc has been investigated using the mutants obtained via mutagenesis of a synthetic gene.⁸ Recently, a three-dimensional homology model of pDHFR was constructed to aid understanding of the structural basis of antifolate resistance in malaria.⁹ The studies led to a hypothesis which proposed that resistance to Cyc is due to a steric clash for Cyc binding as a result of A16V mutation of the pDHFR, and that mutation of residue 108 (S108T) further reinforces the steric constraint for Cyc binding through displacement of the *p*-chlorophenyl group of the

[†] Abbreviations: Cyc, cycloguanil; Pyr, pyrimethamine; DHFR, dihydrofolate reductase; pf, *Plasmodium falciparum*.

^{*} Address correspondence to Professor Gordon Lowe. Phone: +44 (0)1865 275649. Fax: +44 (0)1865 275674. E-mail: gordon.lowe@chem.ox.ac.uk.

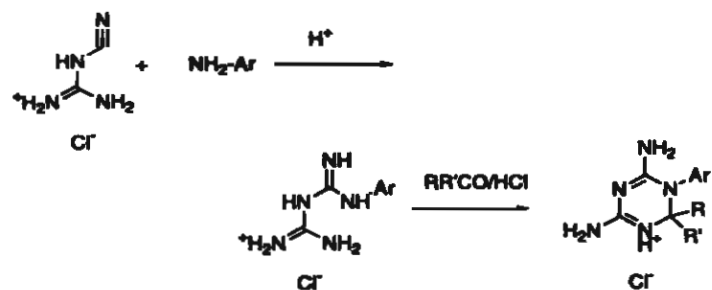
[‡] NSTDA Bangkok.

[§] Chulalongkorn University.

^{||} Mahidol University.

[⊥] Oxford University.

Scheme 1



inhibitor from the nicotinamide ring of the cofactor. Validation of the hypothesis was achieved by testing both the wild-type and A16V+S108T mutant pfDHFRs against Cyc analogues devoid of one or both methyl groups.⁹

In this paper, we describe further modifications to the structure of Cyc in a search for more effective inhibitors of A16V+S108T pfDHFR which are also effective against the wild-type enzyme. Given the important roles of A16V and S108T mutations on Cyc binding, we designed and synthesized a number of Cyc analogues in which the groups at C-2 and N-1 were varied, and we tested them against both wild-type and A16V+S108T pfDHFRs. The studies have led to the discovery of a lead which is as effective as Cyc against the wild-type pfDHFR, but is over 120-fold more effective than Cyc against the A16V+S108T mutant enzyme. The relative effectiveness of the lead was also investigated against the resistant *P. falciparum* strain T9/94, a mutant parasite harboring the A16V+S108T mutant enzyme. Its IC₅₀ value is 180-fold lower than that of Cyc, and it retains similar activity to Cyc against the wild-type *P. falciparum*.

Results and Discussion

Chemical Syntheses. 4,6-Diamino-1,2-dihydrotriazines, such as Cyc, are generally made in two steps from dicyandiamide and an aniline under acidic conditions to first generate arylbiguanides which are then reacted with an appropriate carbonyl compound in the presence of an acid catalyst to give the 4,6-diamino-1,2-dihydrotriazine substituted at N-1 and C-2.^{10,11} The arylbiguanide may be isolated before further reaction, or the two-step procedure may be performed in the same reaction vessel (Scheme 1). This is an attractive feature of the chemistry and lends itself to the techniques of combinatorial chemistry.¹² However, one should be aware that the rate of formation of the biguanides is

strongly influenced by the nucleophilicity of the aniline, and for this reason we have chosen to use a parallel synthesis protocol. Previous attempts to prepare the didemethyl analogue of Cyc (2) were unsuccessful,^{10,11} and we confirm that the standard protocol using formalin or paraformaldehyde does not give the required product. However, when dimethoxymethane is used as the formaldehyde equivalent, the required product is formed in excellent yield. Other Cyc derivatives were prepared according to the literature methods^{10,11} without modification, except that in some cases addition of a miscible water scavenger such as triethyl orthoacetate was found to give improved results, although this is rarely necessary when the carbonyl component is an aldehyde.

Inhibition of Wild-Type and A16V+S108T pfDHFRs. The data in Table 1 summarize the inhibition constant (*K_i*) values of Cyc and analogues in which the substituents at C-2 were varied, while the group at N-1 (*p*-chlorophenyl) was unmodified. As reported previously,⁸ Cyc (1) binds to the wild-type pfDHFR with the *K_i* value of ~1.5 nM, but it binds approximately 876-fold less tightly to the A16V+S108T mutant enzyme. On the basis of our working hypothesis, we surmise that the poor binding of Cyc to A16V+S108T enzyme might be attributed to one of the methyl substituents at the C-2 position of Cyc. To test this hypothesis, we designed and synthesized a number of Cyc derivatives in which one substituent at C-2 was H and the other varied from H (2), methyl (3), ethyl (4), *n*-propyl (5), *n*-butyl (6), isopropyl (7), *tert*-butyl (8), and phenyl (9). The effects of the substituents on binding to both wild-type and A16V+S108T DHFRs were assessed by determination of the ratios of the *K_i* values for the A16V+S108T mutant enzyme and the wild-type enzyme (*K_i*-mut./*K_i*-wt) as well as their *K_i* values relative to Cyc. Table 1 shows that the didemethylcycloguanil (2), in which both methyl groups at position C-2 were replaced by H, is ~2-fold more effective against the A16V+S108T pfDHFR than Cyc but inhibited the wild-type enzyme ~16-fold less effectively than Cyc. The monomethyl analogue (3) has improved binding affinity (~10-fold) for the A16V+S108T DHFR, but was about 2.7-fold less effective than Cyc for the wild-type enzyme. Since the compound tested was a racemic mixture, if only one enantiomer is active, the relative *K_i* value of the effective enantiomer could be up to twice that of the value shown. If this is the case, the *K_i* value of Cyc analogue (3) for the wild-type enzyme is within the range reported for Cyc.⁸

Table 1. Inhibition Constants (*K_i*) of Cyc (1) and Its Analogues (A; X = Cl, Y = H) against the Wild-Type and A16V+S108T Mutant DHFRs of *P. falciparum* and Their Growth Inhibition (IC₅₀) against *P. falciparum* Clones with Wild-Type (TM4/8.2) and Mutant (T9/94 RC17) Enzymes

compd	R ₁	R ₂	<i>K_i</i> (wt) ^a (nM)	rel. to Cyc	<i>K_i</i> (mut.) ^b (nM)	rel. to Cyc	<i>K_i</i> (mut.)/ <i>K_i</i> (wt)	IC ₅₀ TM4 (nM)	IC ₅₀ T9/94 (nM)	IC ₅₀ ratio T9/94:TM4
1	Me	Me	1.5 ± 0.3 ^c	1.0	1314 ± 16 ^c	1	876	40 ± 12	2430 ± 571	60.75
2	H	H	24.4 ± 4.3 ^d	16	646 ± 77 ^d	0.5	26	952	313 ± 18	0.33
3	H	Me	4.1 ± 0.0 ^d	2.7	127 ± 14 ^d	0.09	31	348 ± 144	347 ± 116	1.00
4	H	Et	3.6 ± 0.0 ^d	2.4	189 ± 37 ^d	0.14	52	40 ± 2	486 ± 220	12.15
5	H	Pr ⁿ	4.6 ± 0.2	3.1	107 ± 32	0.08	23	65	365 ± 116	5.62
6	H	Bu ⁿ	3.7 ± 0.1	2.5	167 ± 6.0	0.1	45	111	250 ± 109	2.25
7	H	Pr ⁱ	60.5 ± 10.1	40.3	1538 ± 345	1.2	25	2908	2818 ± 438	0.97
8	H	Bu ^t	3838 ± 408	2558	82721 ± 9888	63	22	>25000	65386 ± 7516	<2.6
9	H	Ph	4.5 ± 0.2	3.0	49 ± 3	0.04	11	27 ± 11	44 ± 15	1.63

^a Wild-type pfDHFR. ^b A16V+S108T mutant pfDHFR. ^c Data from ref 8. ^d Data from ref 9.

Table 2. Inhibition Constants (K_i) of Cyc (1) and Its Analogues (A; X = Br, Y = H) against the Wild-Type and A16V+S108T Mutant DHFRs of *P. falciparum* and Their Growth Inhibition (IC_{50}) against *P. falciparum* Clones with Wild-Type (TM4/8.2) and Mutant (T9/94 RC17) Enzymes

cmpd	R ₁	R ₂	K_i (wt) ^a (nM)	rel. to Cyc	K_i (mut.) ^b (nM)	rel. to Cyc	K_i (mut.)/ K_i (wt)	IC_{50} TM4 (nM)	IC_{50} T9/94 (nM)	IC_{50} ratio T9/94:TM4
10	Me	Me	1.1 ± 0.2	0.7	1947 ± 366	1.5	1770	31	2759 ± 153	89
11	H	Me	5.7 ± 0.5	3.8	202 ± 17	0.15	35	132	277 ± 32	2.1
12	H	Et	2.7 ± 0.3	1.8	99 ± 7.0	0.08	37	68	220 ± 96	3.24
13	H	Pr ⁿ	2.6 ± 0.8	1.7	127 ± 11	0.1	49	63	250 ± 110	3.97
14	H	Pr ⁱ	30 ± 4.0	20	1195 ± 53	0.9	40	638	725 ± 277	1.14
15	H	Ph	2.9 ± 1.2	1.9	90 ± 11	0.07	31	47 ± 8	180 ± 62	3.86

^a Wild-type pfDHFR. ^b A16V+S108T mutant pfDHFR.**Table 3.** Inhibition Constants (K_i) of Cyc (1) and Its Analogues (A; X = Me, Y = H) against the Wild-Type and A16V+S108T Mutant DHFRs of *P. falciparum* and Their Growth Inhibition (IC_{50}) against *P. falciparum* Clones with Wild-Type (TM4/8.2) and Mutant (T9/94 RC17) Enzymes

cmpd	R ₁	R ₂	K_i (wt) ^a (nM)	rel. to Cyc	K_i (mut.) ^b (nM)	rel. to Cyc	K_i (mut.)/ K_i (wt)	IC_{50} TM4 (nM)	IC_{50} T9/94 (nM)	IC_{50} ratio T9/94:TM4
16	Me	Me	1.8 ± 0.2	1.2	1584 ± 210	1.21	880	65	3617 ± 337	55.64
17	H	Me	23.0 ± 1.9	15	185 ± 22	0.14	7.9	462 ± 35	464 ± 208	1.00
18	H	Et	5.9 ± 0.2	3.9	128 ± 4.0	0.10	22	273	517 ± 419	1.89
19	H	Pr ⁿ	13.7 ± 0.8	9.1	188 ± 12	0.14	14	167	152	0.91
20	H	Pr ⁱ	167 ± 11	111	1460 ± 161	1.11	8.7	8223	3446 ± 759	0.42
21	H	Ph	7.7 ± 2.0	5.1	170 ± 14	0.13	22	136 ± 8.3	39 ± 9	0.29

^a Wild-type pfDHFR. ^b A16V+S108T mutant pfDHFR.**Table 4.** Inhibition Constants (K_i) of Cyc (1) and Its Analogues (A; R₁ = R₂ = R, Y = H) against the Wild-Type and A16V+S108T Mutant DHFRs of *P. falciparum* and Their Growth Inhibition (IC_{50}) against *P. falciparum* Clones with Wild-Type (TM4/8.2) and Mutant (T9/94 RC17) Enzymes

cmpd	R	X	K_i (wt) ^a (nM)	rel. to Cyc	K_i (mut.) ^b (nM)	rel. to Cyc	K_i (mut.)/ K_i (wt)	IC_{50} TM4 (nM)	IC_{50} T9/94 (nM)	IC_{50} ratio T9/94:TM4
1	Me	Cl	1.5 ± 0.3 ^c	1.0	1314 ± 164 ^c	1.0	876	40 ± 12	2430 ± 571	60.75
22	Me	H	20.0 ± 5.2	13	1375 ± 236	1.05	69	546	445 ± 1	0.82
23	Me	F	4.6 ± 0.7	3.0	1633 ± 269	1.20	355	294	1001 ± 466	3.40
2	H	Cl	24.4 ± 4.3	16	646 ± 77	0.5	26	952	313 ± 18	0.33
24	H	H	329 ± 27	220	585 ± 70	0.4	1.8	11632	356 ± 57	0.03
25	H	F	270 ± 28	180	469 ± 71	0.4	1.7	9661	312 ± 36	0.03

^a Wild-type pfDHFR. ^b A16V+S108T mutant pfDHFR. ^c Data from ref 8.

The K_i values of monoethyl (4), mono-*n*-propyl (5), and mono-*n*-butyl (6) analogues for the wild-type and A16V+S108T pfDHFRs were comparable to that for the monomethyl (3) analogue, implying that the C-2 substituents of these analogues did not appreciably influence or improve the binding affinities of the inhibitors compared with analogue 3. However, as predicted, the K_i values for both wild-type and A16V+S108T pfDHFRs were greatly increased when the C-2 substituents were branched (and therefore bulkier) alkyl groups, as observed with analogues 7 and 8. Interestingly, analogue 9, in which one substituent at the C-2 is H and the other a phenyl group, inhibited the A16V+S108T pfDHFR with the K_i value of ~49 nM, a value which is 27-fold lower than that observed for Cyc (1). The above results indicate the crucial role of residue 16 for Cyc binding and suggest the importance of the phenyl group at position C-2 for achieving effective inhibition of the A16V+S108T pfDHFR.

To investigate the significance of the *p*-chloro group on the N-1 substituent of Cyc, two series of Cyc analogues were synthesized in which the N-1 *p*-chlorophenyl group is replaced by *p*-bromophenyl and *p*-tolyl groups. Their K_i values against the wild-type and the mutant pfDHFRs are shown in Table 2 and Table 3. Inhibition constants for the wild-type and mutant enzymes by *p*-bromophenyl (10 to 15) and *p*-tolyl (16 to 21) analogues showed a trend similar to those where the N-1 substituent is *p*-chlorophenyl (Table 1). How-

ever, as the *p*-substituent changes in polarity and size, the monophenyl compounds became progressively less effective against the A16V+S108T mutant enzyme; the K_i values for the mutant enzyme of analogues 9, 15, and 21 being 49, 90, and 170 nM, respectively.

The contribution of the *p*-chloro substituent toward the binding affinities of the inhibitors to pfDHFRs was investigated. The C-2 substituents of Cyc were either kept unmodified as dimethyl groups or removed (substituted with H), and the *p*-chloro substituent of *p*-chlorophenyl group at N-1 in Cyc was replaced with either H or F. The analogues were then tested against the wild-type and the A16V+S108T mutant pfDHFRs (Table 4). The results in Table 4 revealed that replacement of the *p*-chloro group with H (analogues 22 and 24) did not affect the K_i values for the A16V+S108T mutant DHFR but substantially increased the K_i values for the wild-type enzyme. Replacement of the chlorine by fluorine, however, resulted in a 3–14-fold decrease in the binding affinities of the inhibitors to the wild-type enzyme (analogues 23 and 25, Table 4). The data imply that the *p*-chloro substituent of the *p*-chlorophenyl group is important for binding to the wild-type enzyme and that replacement of the chlorine by a smaller group has relatively little effect on the binding of the inhibitor to the A16V+S108T pfDHFR.

We next investigated the Cyc analogues in which an additional chlorine atom was placed at the *m*-position of the *p*-chlorophenyl substituent. The importance of

Table 5. Inhibition Constants (K_i) of Cyc (1) and Its Analogues (A; Y = Cl) against the Wild-Type and A16V+S108T Mutant DHFRs of *P. falciparum* and Their Growth Inhibition (IC_{50}) against *P. falciparum* Clones with Wild-Type (TM4/8.2) and Mutant (T9/94 RC17) Enzymes

compd	R ₁	R ₂	X	K_i (wt) ^a (nM)	rel. to Cyc	K_i (mut.) ^b (nM)	rel. to Cyc	K_i (mut.)/ K_i (wt)	IC_{50} TM4 (nM)	IC_{50} T9/94 (nM)	IC_{50} ratio T9/94:TM4
26	Me	Me	H	3.7 ± 0.6	2.5	340 ± 28	0.3	92	60 ± 13	298 ± 54	4.97
27	Me	Me	Cl	1.1 ± 0.4	0.73	130.7 ± 13.4	0.1	119	4 ± 1	307 ± 99	76.75
28	H	Me	H	10.2 ± 0.6	6.8	38.7 ± 2.9	0.03	3.8	ND ^c	28 ± 4	ND ^c
29	H	Me	Cl	1.4 ± 0.2	0.9	17.8 ± 0.8	0.014	12.7	35	19 ± 8	0.54
30	H	Ph	H	11.7 ± 2.5	7.8	10 ± 7	0.008	0.9	455 ± 228	24 ± 8	0.05
31	H	Ph	Cl	1.6 ± 0.2	1.1	11 ± 1.8	0.008	6.9	40 ± 25	29 ± 2	0.72

^a Wild-type pfDHFR. ^b A16V+S108T mutant pfDHFR. ^c Not determined.

m-chloro substituent was recently shown in Pyr to improve the effectiveness against the C59R+S108N mutant pfDHFR.¹³ As shown in Table 5, the Cyc analogue with *m*-chlorophenyl group (26) inhibited the wild-type pfDHFR with the K_i value ~2.5 times higher than that of Cyc (1), but it was about 3-fold more effective than Cyc against the A16V+S108T mutant enzyme. Replacement of the *p*-chlorophenyl group of Cyc with the 3,4-dichlorophenyl substituent yielded analogue 27, which was about as effective as Cyc against the wild-type DHFR but inhibited the A16V+S108T mutant enzyme about 10 times better than Cyc. Indeed, analogue 27, also known as chlorocycloguanil, is a potent inhibitor of wild-type pfDHFR and has been used as an effective agent for the treatment of malaria.¹⁴ Replacing one of the C-2 methyl groups of the *m*-chlorophenyl analogue by H yielded analogue 28 which showed a significant decrease in the K_i value for the A16V+S108T pfDHFR, but the analogue inhibited the wild-type enzyme ~7-fold less effectively than Cyc (1). Addition of a chloro group to analogue 28 gave the monomethyl analogue with the 3,4-dichlorophenyl group at position N-1 (29). While the K_i value for analogue 29 was similar to that of Cyc (1) against the wild-type pfDHFR, the binding affinity for the A16V+S108T enzyme was dramatically improved, being about 73-fold more effective than Cyc.

The effects of *m*-chlorophenyl and 3,4-dichlorophenyl substituents at N-1 were further tested in the most promising lead compound in which the groups at C-2 were H and phenyl (9) (Table 1). Analogues 30 and 31 were over 120-fold more effective than Cyc against the A16V+S108T mutant pfDHFR. While analogue 30 was about 8-fold less effective than Cyc against the wild-type enzyme, analogue 31 was about as effective as Cyc (Table 5).

In Vitro Antiplasmodial Activity. The activities of the Cyc analogues against *P. falciparum* were tested in vitro, both in the wild-type clone (TM4/8.2) and the Cyc-resistant clone, which harbors the A16V+S108T pfDHFR (T9/94 RC17). The data in Table 1 shows that some of the 2-monosubstituted analogues of Cyc, namely ethyl, *n*-propyl, and phenyl, have IC_{50} values against the wild-type parasite which are comparable to that of the parent compound. Furthermore, all the compounds have relatively low resistance factors (ratios of IC_{50} for T9/94 to TM4) in comparison to Cyc, some with factors of 1 or less. All compounds except for isopropyl and *tert*-butyl derivatives are much more effective than Cyc against the resistant parasite. The most notable compound in Table 1 is the phenyl derivative, which is almost twice as effective against the wild-type parasite and is over 50 times more effective than Cyc against

the resistant parasite. The data in Tables 2 and 3 show the same trend as in Table 1, in that the resistance factors for the 2-monosubstituted derivatives are all lower than those for the 2,2-dimethyl parent compounds. All the 2-monosubstituted compounds in Tables 2 and 3 are more effective against the resistant parasite than the parent compounds. However, none of the compounds in Tables 2 and 3 are as effective as the parent compounds against the wild-type parasite.

The Cyc analogues in Table 4, in which the *p*-chloro substituents had been replaced by sterically less demanding groups, have higher IC_{50} values against the wild-type parasite than those for the parent compounds, generally reflecting the higher K_i values. The low values of resistance factors reflect the poor activities against the wild-type parasite rather than relatively high activities against the resistant parasite.

Table 5 shows the effect on the antiplasmodial activities of Cyc analogues in which dimethyl is changed to a 2-monosubstituted group and the *p*-chloro is replaced by an *m*-chloro or 3,4-dichloro group. All the 2-monosubstituted compounds show excellent activities against the resistant parasite, with IC_{50} values approximately 100 times lower than that of Cyc. Both the 2-monosubstituted and the 3,4-dichlorophenyl derivatives (29 and 31) have comparable activities to Cyc against the wild-type parasite.

Preliminary results on human DHFR with some 2-monosubstituted analogues of Cyc show relatively high K_i values (data not shown), suggesting that these compounds are probably of low toxicity and therefore might be suitable for further investigation as lead compounds in the search for new effective antimalarials against antifolate-resistant *P. falciparum*.

Conclusions

1-(3',4'-Dichlorophenyl)-2-monosubstituted-4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazines (29 and 31) are useful lead compounds, being at least as effective against the mutant resistant *P. falciparum* strain (T9/94 RC17) as against the wild-type strain (TM4/8.2). They are as effective as Cyc against the wild-type strain of *P. falciparum* and approximately 100-fold more effective than Cyc against the resistant *P. falciparum* strain (T9/94 RC17).

Experimental Section

Methods and Materials. *m*-Chloroaniline was distilled under reduced pressure before use. All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Ltd., Lancaster, Avocado Ltd., BDH, or other standard suppliers, and they were used without further purification. Reagent grade acetone and absolute alcohol were used.

Table 6. Tabulated Elemental, Mass, and NMR Analysis Data for Cyc Analogues 1–31

cpd	X	Y	R ₁	R ₂	yd%	anal.	formula	MH ⁺ ^a	NMR details (200 MHz unless otherwise specified)
1	Cl	H	Me	Me	62	CHN	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ Cl ₂	252 (iii)	¹ H (D ₂ O, 400 MHz) 1.38 (6H, s, 2 × Me), 7.35 and 7.54 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C–H)
2	Cl	H	H	H	79	CHN	C ₉ H ₁₁ N ₅ Cl ₂	224 (i)	¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) 4.71 (2H, s, CH ₂), 6.98 (1H, s br ex, NH), 7.48 (4H, dd, J _{AB} = 8, Ar-C-H), 7.65 (2H, s, NH ₂), 7.85 (1H, s br ex, NH), 8.74 (1H, s, NH ⁺)
3	Cl	H	H	Me	49	CHN	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ Cl ₂	238 (i)	¹ H (D ₂ O) 1.20 (3H, d, J = 6 Hz, Me-2), 5.06 (1H, q, J = 6 Hz, H-2), 7.22 and 7.40 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, Ar-C-H)
4	Cl	H	H	Et	92	CHN	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ Cl ₂	252 (ii)	¹ H (D ₂ O) 0.94 (3H, J = 6.5 Hz, CH ₃), 1.52 (2H, m, CH ₂), 4.84 (1H, dd, J = 6.5, 4 Hz, H-2), 7.22 and 7.38 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, Ar-C-H)
5	Cl	H	H	Pr ^a	86	HN ^b	C ₂₁ H ₁₇ N ₅ Cl ₂ ·H ₂ O	266 (ii)	¹ H (D ₂ O) 0.65 (3H, t, CH ₃), 1.15 (2H, m, CH ₂), 1.55 (2H, m, CH ₂), 4.94 (1H, dd, J = 6, 4 Hz, H-2), 7.25 and 7.42 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H)
6	Cl	H	H	Bu ^a	89	CHN	C ₁₃ H ₁₉ N ₅ Cl ₂ ·3.5H ₂ O	280 (iii)	¹ H (D ₂ O) 0.60 (3H, t, J = 6.5 Hz, Me), 1.08 (4H, m, 2 × CH ₂), 1.55 (2H, m, CH ₂), 4.96 (1H, dd, J = 6.5, 4 Hz, H-2), 7.25, 7.40 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, Ar-C-H)
7	Cl	H	H	Pr ^c	59	CHN	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ Cl ₂	266 (i)	¹ H (D ₂ O) 0.65 and 0.75 (6H, 2 × d, J = 6.8 Hz, 2 × Me), 1.88 (1H, m, CHMe ₂), 4.74 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-2), 7.24, 7.40 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, Ar-C-H)
8	C	H	H	Bu ^c	31	CHN	C ₁₃ H ₁₉ N ₅ Cl ₂	280 (i)	¹ H (D ₂ O) 0.66 (9H, s, 3 × Me), 4.65 (1H, s, H-2), 7.31 (4H, m, aromatic C-H)
9	C	H	H	Ph	55	CHN	C ₁₅ H ₁₅ N ₅ Cl ₂	300 (iii)	¹ H (D ₂ O) 5.84 (1H, s, H-2), 6.90 (2H, part of AB doublet, J = 8 Hz, Ar-C-H), 7.05 (7H, m, Ar-C-H)
10	Br	H	Me	Me	78	CHN	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ BrCl	246 (iii)	¹ H (D ₂ O) 1.28 (6H, s, 2 × Me), 7.16 and 7.58 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H)
11	Br	H	H	Me	53	CHN	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ BrCl	282, 284 (iii)	¹ H (D ₂ O) 1.16 (3H, d, J = 6 Hz, Me-2), 5.00 (1H, q, J = 6 Hz, H-2), 7.14 and 7.55 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H)
12	Br	H	H	Et	93	CHN	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ BrCl	296, 298 (iii)	¹ H (D ₂ O) 0.74 (3H, t, J = 6.5 Hz, CH ₃), 1.50 (2H, m, CH ₂), 4.92 (1H, dd, J = 6.5, 4 Hz, H-2), 7.20 and 7.50 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H)
13	Br	H	H	Pr ^a	74	CHN	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ BrCl·H ₂ O	310, 312 (iii)	¹ H (D ₂ O) 0.68 (3H, t, J = 6 Hz, CH ₃), 1.18 (2H, m, CH ₂), 1.60 (2H, m, CH ₂), 4.92 (1H, dd, J = 6, 4 Hz, H-2), 7.20 and 7.50 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H)
14	Br	H	H	Pr ^c	71	CHN	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ BrCl	310, 312 (iii)	¹ H (D ₂ O) 0.66 and 0.76 (6H, 2 × d, J = 7 Hz, 2 × Me), 1.88 (1H, m, CHMe ₂), 4.78 (1H, d, J = 3 Hz, H-2), 7.18 and 7.56 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H)
15	Br	H	H	Ph	93	CHN	C ₁₅ H ₁₅ N ₅ BrCl	344, 346 (iii)	¹ H (D ₂ O) 5.88 (1H, s, H-2), 6.88 and 7.34 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H), 7.16 (5H, m, aromatic C-H)
16	Me	H	Me	Me	59	CHN	C ₁₂ H ₂₀ N ₅ OCi	232 (iii)	¹ H (D ₂ O) 1.26 (6H, s, 2 × Me), 2.20 (3H, s, 4'-Me), 7.08 and 7.25 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, Ar-C-H)
17	Me	H	H	Me	27	CHN	C ₁₁ H ₁₆ N ₅ Cl·HCl·0.7H ₂ O	218 (iii)	¹ H (D ₂ O) 1.18 (3H, d, J = 6.5 Hz, Me-2), 2.15 (3H, s, Me-4'), 5.05 (1H, q, J = 6.5 Hz, H-2), 7.08 and 7.20 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H)
18	Me	H	H	Et	77	CHN	C ₁₂ H ₁₈ N ₅ Cl	232 (iii)	¹ H (D ₂ O) 0.72 (3H, t, J = 6 Hz, CH ₃), 1.65 (2H, m, CH ₂), 2.18 (3H, s, Me-4'), 4.94 (1H, dd, J = 6, 5 Hz, H-2), 7.15 and 7.25 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H)
19	Me	H	H	Pr ^a	87	CHN	C ₁₃ H ₂₀ N ₅ Cl·HCl	246 (iii)	¹ H (D ₂ O) 0.64 (3H, t, J = 7 Hz, CH ₃), 1.15 (2H, m, CH ₂ CH ₂), 1.60 (2H, m, CH ₂ CH ₂), 2.18 (3H, s, Me-4'), 4.94 (1H, dd, J = 6, 4 Hz, H-2), 7.12 and 7.22 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H)
20	Me	H	H	Pr ^c	85	HN ^c	C ₁₃ H ₂₀ N ₅ Cl·HCl·CH ₃ OH	246 (iii)	¹ H (D ₂ O) 0.65 and 0.75 (6H, 2 × d, J = 7 Hz, 2 × Me), 1.88 (1H, m, CHMe ₂), 2.18 (3H, s, Me-4'), 4.82 (1H, d, J = 3 Hz, H-2), 7.12 and 7.22 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H)
21	Me	H	H	Ph	58	CHN	C ₁₆ H ₁₈ N ₅ Cl	280 (iii)	¹ H (D ₂ O) 2.16 (3H, s, Me-4'), 5.96 (1H, s, H-2), 6.94 and 7.12 (2 × 2H, AB doublet, J = 8 Hz, aromatic C-H), 7.30 (5H, m, aromatic C-H)
22	H	H	Me	Me	67	CN ^d	C ₁₁ H ₁₆ N ₅ Cl	218 (iii)	¹ H (D ₂ O, 400 MHz) 1.45 (6H, s, 2 × Me), 2.25 (2H, q, J = 7 Hz, CH ₂), 7.40, 7.55 (2 × m, 5H, Ar-C-H)
23	F	H	Me	Me	93	CHN	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ FCi	235 (i)	¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) 1.31 (6H, s, 2 × Me), 6.42 (1H, s br ex, NH), 7.29–7.47 (6H, m, Ar-C-H and NH ₂), 7.67 (1H, s br ex, NH), 9.01 (1H, s, NH ⁺). ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆) 27.6 (2C, 2 × Me), 70.1 (1C, CMe ₂), 117.4 + 117.9 (2C, Ar-C-F ortho), 131.7 (1C, CN ₃), 133.0 + 133.2 (2C, Ar-C-F meta), 158.24 (1C, Ar-C-F ipso), 160.1 (1C, CN ₃), 165.6 (1C, Ar-C-N). ¹⁹ F (DMSO- <i>d</i> ₆ , 250 MHz) –112.5 (1F, Ar-F)
24	H	H	H	H	85	CHN	C ₉ H ₁₂ N ₅ Cl	190 (i)	¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) 4.78 (2H, s, CH ₂), 6.89 (1H, s br ex, NH), 7.34–7.58 (m, 7H, Ar-C-H and NH ₂), 7.80 (1H, s br ex, NH), 8.58 (1H, s, NH ⁺)
25	F	H	H	H	95	CHN	C ₉ H ₁₁ N ₅ FCi	208 (i)	¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) 1.31 (6H, s, 2 × Me), 6.42 (1H, s br ex, NH), 7.29–7.47 (6H, m, Ar-C-H and NH ₂), 7.67 (1H, s br ex, NH), 9.01 (1H, s, NH ⁺). ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆) 27.6 (2C, 2 × Me), 70.1 (1C, CMe ₂), 117.4 + 117.9 (2C, Ar-C-F ortho), 131.7 (1C, CN ₃), 133.0 + 133.2 (2C, Ar-C-F meta), 158.24 (1C, Ar-C-F ipso), 160.1 (1C, CN ₃), 165.6 (1C, Ar-C-N). ¹⁹ F (DMSO- <i>d</i> ₆ , 250 MHz) –112.5 (1F, Ar-F)
26	H	Cl	Me	Me	60	CHN	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ Cl ₂ ·0.4H ₂ O	252 (iii)	¹ H (D ₂ O) 1.30 (6H, s, 2 × Me), 7.10–7.50 (m, 4H, Ar-C-H)
27	Cl	Cl	Me	Me	71	CHN	C ₁₁ H ₁₄ N ₅ Cl ₃	286 (iii)	¹ H (D ₂ O, 400 MHz) 1.38 (6H, s, 2 × Me), 7.26 (1H, dd, J = 8.5, 2.6 Hz, Ar-CH), 7.60 (1H, d, J = 2.6 Hz, Ar-CH), 7.65 (d, 1H, J = 8.5 Hz, Ar-C-H)

Table 6. Continued

cpd	X	Y	R ₁	R ₂	yd%	anal.	formula	MH ⁺ ^a	NMR details (200 MHz unless otherwise specified)
28	H	Cl	H	Me	18	CHN	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ Cl ₂	238 (iii)	¹ H (D ₂ O) 1.18 (3H, d, <i>J</i> = 6 Hz, Me-2), 4.98 (1H, q, <i>J</i> = 6 Hz, H-2), 7.20, 7.35 (m, 4H, Ar-C-H)
29	Cl	Cl	H	Me	76	CHN	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ Cl ₃ ·2HCl·H ₂ O	272 (iii)	¹ H (D ₂ O) 1.18 (3H, d, <i>J</i> = 6.5 Hz, Me), 5.04 (1H, q, <i>J</i> = 6.5 Hz, H-2), 7.15 (1H, d, <i>J</i> = 8.5, 2.6 Hz, Ar-C-H), 7.50 (2H, m, Ar-C-H)
30	H	Cl	H	Ph	90	HN ^c	C ₁₅ H ₁₅ N ₅ Cl ₂ ·H ₂ O	300 (iii)	¹ H (D ₂ O) 5.95 (1H, s, H-2), 6.90–7.30 (m, 9H, Ar-C-H)
31	Cl	Cl	H	Ph	63	CHN	C ₁₁ H ₁₄ N ₅ Cl ₃	334 (iii)	¹ H (D ₂ O) 5.92 (1H, s, H-2), 6.90 (1H, dd, <i>J</i> = 8.0, 2.5 Hz, Ar-CH), 7.10–7.30 (7H, m, Ar-CH)

^a Mass spectrometric methods are (i) APCI+, (ii) ESI, (iii) MALDI-TOF. ^b C calcd 45.0; found 45.6. ^c C calcd 48.0; found 47.5. ^d H calcd 6.4; found 7.0. ^e C calcd 46.4; found 46.9.

Parallel synthesis reactions were performed in a Radley multiple synthesis block of 56 wells, equipped with a "Big Bill" rotating shaker, a water-cooled condensing stage, and a J-KEM programmable thermocouple and controller. Reagents were heated and refluxed in 4 mL capacity ReactiVials equipped with 10 cm condensing tubes inserted into Teflon-coated seals and caps. Reactions involving highly volatile solvents were contained under SubaSeals vented using balloon leaks.

Positive-ion chemical ionization mass spectrometry was carried out as APCI in 1:1 methanol/dichloromethane as carrier solvent (Dyson Perrins Laboratory, University of Oxford). MALDI-TOF mass spectra were recorded on a Bruker Biflex mass spectrometer (Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Chulalongkorn University, Bangkok). ESI spectra were obtained using a Fisons Instrument Trio 2000 mass spectrometer (Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Bangkok) operating in ESI mode. Masses given are molecular ions and major fragments only, and they are quoted as *m/z* unless otherwise stated. Elemental analysis (C, H, N) was performed by the Oxford University Inorganic Laboratory service and by Ms. A. Ungpakornkaew on a Perkin-Elmer CHN analyzer model PE2400 series II (Chulalongkorn Research Equipment Centre, Bangkok). Routine ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 200 spectrometer, a Bruker AMX250 spectrometer (both Dyson Perrins Laboratory, Oxford), or a Bruker ACF200 (Chulalongkorn University, Bangkok) operating at 200 MHz (¹H) and 50.28 MHz (¹³C). High field NMR experiments were performed on a Bruker DRX400 (400 MHz) (National Science and Technology Development Agency, Bangkok). ¹H and ¹³C chemical shifts are quoted in ppm relative to tetramethylsilane and were internally referenced to the residual protonated solvent signal.

Chemical Syntheses of 4,6-Diamino-1,2-dihydrotriazine Analogues. The Cyc derivatives bearing gem-dimethyl groups at the C-2 position were prepared by a three-component condensation reaction between an aromatic amine, dicyandiamide, and acetone in the presence of concentrated aqueous HCl as described in the literature (Scheme 1).¹⁰ When the carbonyl compound is an aldehyde, a two-component condensation between the carbonyl compound (1–2 equiv or as solvent) and an aryl biguanide,^{11,15,16} obtained from a reaction between an aromatic amine and dicyandiamide in the presence of HCl as catalyst, or a one-pot reaction in which the biguanide was preformed before reacting with the carbonyl compound was sometimes found to be superior. Derivatives of formaldehyde were prepared in the same way as other aldehydes, except that dimethoxymethane was used as a source of formaldehyde. In most cases the desired products precipitated from the reaction medium (usually ethanol) as the crystalline hydrochloride salt. In cases where the product did not crystallize from the reaction, the solvent was completely removed and the product was precipitated by addition of lithium picrate. The picrate salt so obtained was converted back to the hydrochloride salt by treatment with a strongly basic anion-exchange resin Amberlite IRA400 (Cl⁻ form). The products were recrystallized from ethanol, methanol, or aqueous alcohols. All Cyc derivatives were characterized by ¹H NMR, mass spectra (APCI, ESI, or MALDI-TOF), and elemental analysis (CHN). The full detailed analysis and the data of the Cyc analogues are shown in Table 6.

Enzyme Assays and Inhibition by Cyc Analogues. The activities of wild-type and A16V+S108T mutant pfdHFRs were determined spectrophotometrically according to the method previously described.¹⁷ The reaction (1 mL) contained 1× DHFR buffer (50 mM TES, pH 7.0, 75 mM β-mercaptoethanol, 1 mg/mL bovine serum albumin), 100 μM each of the substrate H₂ folate and cofactor NADPH, and an appropriate amount (0.001–0.005 units) of the affinity-purified enzymes. Inhibition of the enzymes by Cyc and its analogues was carried out by determination of the *K_i* values of the inhibitors for the enzymes by fitting to the equation $IC_{50} = K_i (1 + ([S]/K_m))$,¹⁸ where *IC*₅₀ is the concentration of inhibitor which inhibits 50% of the enzyme activity under the standard assay condition and *K_m* is the Michaelis constant for the substrate H₂/folate. The resistance factors which determine the effectiveness of the inhibitor against the mutant pfdHFR over the wild-type enzyme were assessed from the values of the ratios of the *K_i* for the A16V+S108T mutant enzyme and the wild-type enzyme (*K_i*-mut/*K_i*-wt).

Drug Screening against *Plasmodium falciparum* in Vitro. Two clones of *P. falciparum*, TM4/8.2 (wild-type DHFR) and T9/94 RC17 (A16V+S108T DHFR),¹⁹ from diverse sources (generous gifts from the Malaria Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand) were maintained continuously in human erythrocytes at 37 °C under 3% CO₂ in RPMI 1640 culture media supplemented with 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.2% NaHCO₃, 40 μg/mL gentamicin, and 10% human serum.²⁰ In vitro antimalarial activity was determined by using the [³H] hypoxanthine incorporation method.²¹

The drugs were initially dissolved in DMSO and diluted with the culture media. Aliquots (25 μL) of the drug having different concentrations were dispensed into 96-well plates, and 1.5% cell suspension of parasitized erythrocytes with 1–2% parasitemia (200 μL) were added. The final concentration of DMSO (0.1%) did not affect the growth of the parasite. The mixtures were incubated in a 3% CO₂ incubator at 37 °C. After 24 h of incubation, 25 μL (0.25 μCi) of [³H]-hypoxanthine was added to each well, and the parasite cultures were further incubated under the same conditions for 18–24 h prior to harvesting the parasite DNA onto 96-well microplates with built-in glass fiber filters (Unifilter TM plates, Packard, USA). The filters in the plates were air-dried, and then 22 μL of liquid scintillation fluid (Microscint, Packard) was added. The radioactivity on the filters was then measured using a microplate scintillation counter (TopCount, Packard, USA). The concentration of inhibitor which inhibits 50% of the parasite growth (*IC*₅₀) was determined from the sigmoidal curve obtained by plotting the percentages of [³H]-hypoxanthine incorporation against the concentrations of the drug used.

Acknowledgment. This research was supported by grants from the World Health Organization (TDR) to W.S., the European Union (INCO-DC IC18CT970223) to Y.Y. and G.L., the Thailand Research Fund (Contract No. PDF/57/2540) to T.V., and the Thailand TDR (98-1-MAL-22-003) to S.K.

References

- (1) Wirth, D. Malaria: A 21st Century Solution for an Ancient Disease. *Nature Med.* 1998, 4, 1360–1362.

- (2) Cowman, A. F.; Merry, M. J.; Biggs, B. A.; Cross, G. A. M.; Foote, S. J. Amino Acid Changes Linked to Pyrimethamine Resistance in the Dihydrofolate Reductase Thymidylate Synthase Gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85, 9109-9113.
- (3) Peterson, D. S.; Walliker, D.; Wellem, T. E. Evidence that a Point Mutation in Dihydrofolate Reductase Thymidylate Synthase Confers Resistance to Pyrimethamine in *Falciparum* Malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85, 9114-9118.
- (4) Hyde, J. E. Point Mutations and Pyrimethamine Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 1989, 5, 252-255.
- (5) Foote, S. J.; Galatis, D.; Cowman, A. F. Amino Acids in the Dihydrofolate Reductase Thymidylate Synthase Gene of *Plasmodium falciparum* Involved in Cycloguanil Resistance Differ from Those Involved in Pyrimethamine Resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 3014-3017.
- (6) Peterson, D. S.; Milhous, W. K.; T. E. Wellem. Molecular Basis of Differential Resistance to Cycloguanil and Pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 3018-3022.
- (7) Basco, L. K.; Eldin de Preoules, P. H.; Wilson, C. M.; Le Bras, J. Point Mutations in the Dihydrofolate Reductase Gene as the Molecular Basis for Pyrimethamine and Cycloguanil Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1995, 69, 135-138.
- (8) Sirawaraporn, W.; Sathithul, T.; Sirawaraporn, R.; Yuthavong, Y.; Santi, D. V. Antifolate Resistant Mutants of *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94, 1124-1129.
- (9) Rastelli, G.; Sirawaraporn, W.; Sompornpisut, P.; Vilaivan, T.; Kamchonwongpaisan, S.; Quarrell, R.; Lowe, G.; Thebtaranonth, Y.; Yuthavong, Y. Interactions of Pyrimethamine, Cycloguanil and WR99210 and Their Analogues with *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase: Structural Basis for Antifolate Resistance. *Bioorg Med Chem* 2000, 8, 1117-1128.
- (10) Modest, E. J. Chemistry and Biological Studies on 1,2-Dihydro-5-triazines. II. Three Component Synthesis. *J Org Chem* 1956, 21, 1-13.
- (11) Modest, E. J.; Levine, P. Chemical and Biological Studies on 1,2-Dihydro-5-triazines. III. Two component Synthesis. *J Org Chem* 1956, 21, 14-20.
- (12) Lee, H. K.; Chui, W. K. Combinatorial Mixture Syntheses and Biological Evaluation of Dihydrophanyl Triazine Antifolates. *Bioorg Med Chem* 1999, 7, 1255-1262.
- (13) McKie, J. H.; Douglas, K. T.; Chan, C.; Rowe, S. A.; Yates, R.; Read, M.; Hyde, J. E.; Daurumbe, M. J.; Yuthavong, Y.; Sirawaraporn, W. Rational Drug Design Approach for Overcoming Drug Resistance: Application to Pyrimethamine Resistance in Malaria. *J Med Chem* 1998, 41, 1367-1370.
- (14) Curtis, J.; Duraisingh, M. T.; Trigg, J. K.; Mbeana, H.; Warhurst, D. C.; Curtis, C. F. Direct Evidence that Asparagine at Position 108 of the *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase is Involved in Resistance to Antifolate Drugs in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998, 90, 678-680.
- (15) Carrington, H. C.; Crowther, A. F.; Stacey, G. J. Synthetic Antimalarials. Part XLIX. The Structure and Synthesis of the Dihydrotriazine Metabolite of Proguanil. *J Chem Soc* 1954, 1017-1031.
- (16) Colebrook, L. D.; Giles, H. G.; Kosowsky, A.; Bantz, W. F.; Fehner, J. R. Chemical and Biological Studies on 1,2-Dihydro-5-triazines. XIX. A Nuclear Magnetic Resonance Investigation of Hindered Internal Rotation in 1-Aryl Derivatives. *Can J Chem* 1976, 54, 3757-3765.
- (17) Sirawaraporn, W.; Prapunwattana, P.; Sirawaraporn, R.; Yuthavong, Y.; Santi, D. V. The Dihydrofolate Reductase Domain of *Plasmodium falciparum* Thymidylate Synthase Dihydrofolate Reductase. *J Biol Chem* 1993, 268, 21637-21644.
- (18) Segel, I. H. In *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*; Segel, I. H., Ed.; Wiley Interscience: New York, 1975; pp 100-160.
- (19) Thaitong, S.; Chan, S. W.; Songsomboon, S.; Wilairat, P.; Seesod, N.; Sueblinwong, T.; Goman, M.; Ridley, R.; Beale, G. Pyrimethamine Resistant Mutations in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1992, 52, 149-158.
- (20) Trager, W.; Jensen, J. B. Human Malarial Parasites in Continuous Culture. *Science* 1976, 193, 673-675.
- (21) Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. Quantitative Assessment of Antimalarial Activity in vitro by a Semiautomated Microdilution Technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979, 16, 710-718.

JM0009181