

รายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการ

ทุนพัฒนานักวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 สำหรับสารในกลุ่มไดไพริโดไดอะเซพินโอนและการออกแบบโมเลกุล บนพื้นฐานของเคมีคอมพิวเตอร์

Quantitative Structure-activity Relationship Study of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor in the Class of Dipyridodiazepinones Analogues and Molecular Design, Based on Computational Chemistry Approach

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภา หารหนองบัว

วิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

ระยะเวลาการศึกษา 2 ปี (ระหว่าง 1 ธันวาคม 2540 ถึงวันที่ 30 พฤศจิกายน 2542)

รายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการ

ทุนพัฒนานักวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพของตัว
ยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 สำหรับสารในกลุ่มไดไพริ
โดติเอซีพีนोनและการออกแบบโมเลกุล บนพื้นฐานของเคมี
คอมพิวเตอร์

Quantitative Structure-activity Relationship Study of HIV-1

Reverse Transcriptase Inhibitor in the Class of

**Dipyridodiazepinones Analogues and Molecular Design, Based
on Computational Chemistry Approach**

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภา หารหนองบัว

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

ระยะเวลาที่ศึกษา 2 ปี (ระหว่าง 1 ธันวาคม 2540 ถึงวันที่ 30 พฤศจิกายน 2542)

กิติกรรมประกาศ

โครงการนี้สามารถดำเนินการได้ด้วยดีด้วยความเอื้อเฟื้อและช่วยเหลือจากหน่วยงานต่าง ๆ และผู้ร่วมงานหลายท่าน ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายสนับสนุนการเชิงวิชาการ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนเมธีวิจัย (RSA4080022) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของโครงการนี้และขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินสมทบทุนเมธีวิจัย ทำให้สามารถดำเนินการวิจัยได้ตามวัตถุประสงค์และระยะเวลาที่ได้ตั้งไว้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ จำรัส ลิ้มตระกูล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือตลอดจนคำปรึกษาในงานวิจัย และ Professor Dr.Peter Wolschann ที่ได้ให้คำปรึกษาและเอื้อเฟื้อข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยมาโดยตลอด ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยคือนางสาวพรพรรณ พิงโพธิ์ และนางสาวศิริกนก ประสิทธิ์โชคกุลที่ได้ช่วยทำงานวิจัยในโครงการนี้อย่างเต็มกำลังและความสามารถ ขอขอบคุณนางสาวลักขณา หล่อตระกูล นางสาวกานดา นิเวศานนท์ และนางสาวสุวิภา แสนอ่อน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนงานวิจัยในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้การสนับสนุนในด้านห้องปฏิบัติการเคมีคอมพิวเตอร์และเคมีประยุกต์ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการคอมพิวเตอร์สมรรถนะสูง สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (HPCC/NECTEC) ที่ได้เอื้อเฟื้อการคำนวณโดยโปรแกรม Sybyl6.5 บนเครื่อง SGI ขอขอบคุณสถาบันบริการคอมพิวเตอร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อการคำนวณบนเครื่อง SP2 และขอขอบคุณศูนย์คอมพิวเตอร์แห่งมหาวิทยาลัยเวียenna ในการเอื้อเฟื้อการคำนวณบนเครื่องคลัสเตอร์คอมพิวเตอร์

ขอขอบคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่ทำให้ข้าพเจ้ามีกำลังใจในการทำงานมาโดยตลอด

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของ ตัวยับยั้ง เอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ของสารกลุ่ม nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor สองอนุพันธ์คือ dipyridodiazepinone หรือ เนวราพิน และอนุพันธ์ของทีโบ ทั้งนี้ ได้นำโครงสร้างเริ่มต้นของโครงสร้างหลักคือเนวราพิน และทีโบจากผลการทดลองโดยวิธีผลึก เอกซ์เรย์ และได้ศึกษาโครงสร้างคอนฟอร์เมชันของตัวยับยั้งเนวราพินโดยระเบียบวิธีทางเคมีควอนตัม สองระเบียบวิธีคือ เชมิแฮมพิริคัล (AM1 PM3 และ MNDO) และแอบอินิซิโอ (HF/STO-3G และ HF/3-21G) พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกันโดยโครงสร้างมี 1 local minimum ที่มุมไดฮีดรอลเท่ากับ 208.5 นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบสมบัติทางโครงสร้างได้แก่ ค่าความยาวพันธะ และค่ามุมพันธะ กับผลจากการทดลองคือวิธีผลึกเอกซ์เรย์ และเมื่อนำโครงสร้างที่เสถียรที่สุดจากวิธี HF/6-31G ไปคำนวณค่า chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ โดยวิธีเดนซิตีฟังก์ชันแนล (B3LYP/6-311**G(2d,p)) ซึ่งสามารถทำนาย chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ ได้สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลอง และได้คำนวณโครงสร้างของสารอนุพันธ์ทุกโครงสร้างของตัวยับยั้งโดยวิธีโมเลกุลาร์โมเดลลิง ได้แก่ สารอนุพันธ์ของเนวราพินจำนวน 75 โครงสร้างและสารอนุพันธ์ของทีโบจำนวน 69 โครงสร้าง นำไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ (QSAR) โดย คำนวณสมบัติทางอิเล็กทรอนิกส์ได้แก่ค่าการกระจายของอิเล็กตรอนและสมบัติทางโครงสร้าง ได้แก่ ค่า partition coefficient ค่า molecular refractivity ค่า molecular surface area และค่า polarizability เพื่อนำมาใช้เป็นตัวอธิบายโครงสร้างของโมเลกุลทั้งนี้ ค่าความสามารถในการยับยั้ง เอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 กับตัวยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์ของเนวราพินนั้นมีสองชนิดคือ ชนิด wide type และ mutant type สำหรับอนุพันธ์ของทีโบนั้นศึกษาเฉพาะกัมมันตภาพที่มีต่อเอนไซม์ชนิด wide type เท่านั้น ผลการศึกษาสรุปได้ว่าแบบจำลอง QSAR สำหรับกลุ่มอนุพันธ์ของเนวราพินนั้น ให้ค่าความน่าเชื่อถือทางสถิติค่อนข้างต่ำในขณะที่แบบจำลอง QSAR ของอนุพันธ์ทีโบ ให้ค่า r เท่ากับ 0.869 ซึ่งนับว่าเป็นแบบจำลองที่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวอธิบาย โครงสร้างกับกัมมันตภาพได้เป็นอย่างดี และยังเป็นแบบจำลองที่มีความสามารถในการทำนายที่ดี ด้วยกล่าวคือมีค่า Q^2 เท่ากับ 0.677

นอกจากนี้แล้วโครงการวิจัยได้นำระเบียบวิธีวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามโมเลกุล(CoMFA) มาศึกษาในโครงการนี้ จากการปรับโครงสร้างโดยระเบียบวิธีคำนวณแบบแฮมิลตัน (เอเอ็ม 1)

ได้นำโครงสร้างโมเลกุลทั้งหมดวางทับกับโมเลกุลหลัก (alignment) ซึ่งได้แก่โครงสร้างที่มีกัมมันตภาพสูงสุดของแต่ละอนุพันธ์ เพื่อคำนวณอันตรกิริยาแบบ steric และ electrostatic ระหว่างโมเลกุล และทำการปรับเปลี่ยนชนิดของ probe atom ด้วย ผลการศึกษาโดยวิธีวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบ สนามโมเลกุลสามารถสร้างแบบจำลอง CoMFA โดยระเบียบวิธี Partial Least Squares และ cross-validation นอกจากนี้แล้ว ยังได้ทำการทำนายกัมมันตภาพของสารยับยั้งนอกเหนือจากที่ใช้ในการสร้างความสัมพันธ์ (test set) สำหรับอนุพันธ์เนวิราพินจำนวน 22 โครงสร้าง และอนุพันธ์ของทีโบจำนวน 23 โครงสร้าง ซึ่งทราบค่าการยับยั้งจากการทดลองแล้ว จากการศึกษาพบว่าแบบจำลอง CoMFA ที่ดีที่สุดนั้น ให้ผลการทำนายที่สอดคล้องกับค่าทางการทดลอง เมื่อนำแผนภาพ steric คอนทัวร์และ electrostatic คอนทัวร์มาพิจารณาพร้อมกับตัวอธิบายโมเลกุลจากวิธี QSAR รวมทั้งโครงสร้างของ hydrophobic cavity ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ ทำให้สามารถอธิบาย ความสำคัญอันตรกิริยาสเตอริกในโครงสร้างของตัวยับยั้งกับ binding site โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ ตำแหน่ง Tyrocinine 181 ได้เป็นอย่างดี และเมื่อมีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งดังกล่าวจาก tyrocinine เป็น cysteine จึงทำให้การยับยั้งชาตอันตรกิริยาสเตอริกในบริเวณนี้ โดยผลของอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติกช่วยให้มีการจับที่แข็งแรง ผลการศึกษานี้ นับเป็นการค้นพบที่สำคัญที่สามารถอธิบาย อันตรกิริยาที่แตกต่างกันของตัวยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์และมีการกลายพันธุ์ โดยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์โมเดลลิ่ง

ผลการศึกษาที่ได้เสนอมานี้ ได้ใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาปรับเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลที่คาดว่าจะมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์สูงสำหรับอนุพันธ์ของเนวิราพิน และอนุพันธ์ของทีโบ โดยได้เสนอโครงสร้างของโมเลกุลใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้จะได้ดำเนินการสังเคราะห์และทดสอบค่ากัมมันตภาพที่แท้จริงต่อไป

คำสำคัญ : เอช ไอ วี-1 ตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ การคำนวณเคมีควอนตัม การจำลองโมเลกุล ออกแบบโมเลกุล เนวิราพิน ทีโบ

Abstract

Non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) in the class of dipyrindodiazepinone or Nevirapine and TIBO analogues are studied. Starting geometry of both inhibitors are obtained from X-ray crystallographical data. Then, conformational analysis were performed, based on quantum chemical calculations both semiempirical (AM1, PM3 and MNDO) and ab-initio (HF/STO-3G and HF/3-21G). The results were compared to X-ray structures of inhibitor associated to the HIV-1 reverse transcriptase. The NMR spectra of the compound are calculated to obtain some information about its structure in solution. The structure of Nevirapine in the complex is analysed to study the intermolecular interactions between the inhibitor and the surrounding protein, which determine the geometry of the inhibition complex. Further, quantitative structure-activity relationships (QSAR) and comparative molecular field analysis (CoMFA) have been applied to explain structural requirements of HIV-1 reverse transcriptase inhibition. 75 derivatives of Nevirapine are divided into a training set of 53 compounds and a test set of 22 molecules. 69 derivatives of TIBO are grouped to be 46 molecules as training set and 23 compounds as test set. The best QSAR model is obtained only for TIBO analogues and satisfied in both statistical significance and predictive ability. The derived structural descriptors indicate the importance of electronic contributing towards the HIV-1 RT inhibition. The results are indicated that CoMFA models can be useful to discriminate structural requirements between wide type and mutant type of enzyme of these inhibitors. The obtained CoMFA models yield satisfied predictive ability regarding wide type and mutant type inhibition. Moreover, the contour maps highlight different characteristics for different types of enzyme. In addition, these contour maps agree with all experimental data for binding topology. Consequently, the obtained results provide beneficial information for better understanding the inhibitor-receptor interactions. These results can be helpful basis for design new compounds with increasing of the therapeutic potential of NNRTI analogues.

Keywords : HIV-1, reverse transcriptase inhibitor, quantum chemical calculations, molecular modelling, drug design, Nevirapine, TIBO

สารบัญ

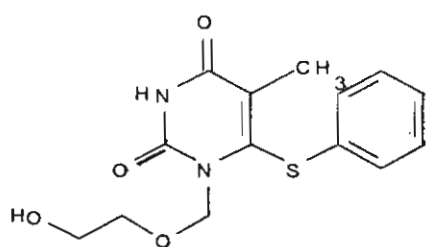
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iv
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	6
ผลการคำนวณ	19
สรุปและวิจารณ์ผล	69
หนังสืออ้างอิง	72
Output	75
ภาคผนวก	77

1. บทนำ

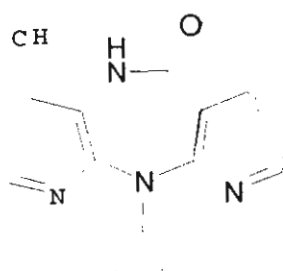
1.1 ความสำคัญของปัญหาที่ทำการวิจัย

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเอดส์ (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) นั้นเนื่องมาจากเชื้อไวรัส HIV (Human immunodeficiency virus) การรักษาในปัจจุบันสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้โดยใช้สารในกลุ่ม 2',3'-dideoxynucleoside เช่น 3'-azido-2',3'-dideoxy thymidine (AZT) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเอดส์และผู้ติดเชื้อเอดส์ ซึ่งสารชนิดนี้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 Reverse Transcriptase (HIV-1 RT) โดยเป็นเอนไซม์สำคัญที่ช่วยในการจำลองแบบ (replication) ในขั้นตอนการรวม viral RNA genome เข้าไปใน proviral DNA ก่อนที่จะรวมเข้าไปใน host genome จึงทำให้ RT เป็นจุดหมายสำคัญของ anti-AIDS treatments อย่างไรก็ตามตัวยาคินชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเอดส์ได้ในระดับหนึ่ง เพราะในปัจจุบันพบว่าไวรัสเอดส์เริ่มมีฤทธิ์ต้านทาน (resistance) ต่อยา AZT อีกทั้งยังมีฤทธิ์ข้างเคียงต่อผู้ป่วย ในระยะสิบปีที่ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์ได้สังเคราะห์สารประกอบเป็นจำนวนมากมายหลายชนิดซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจาก AZT ในจำนวนนี้พบว่า สารประกอบในกลุ่ม nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) เช่น 1-[(2-Hydroxyethoxy)-methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT) (รูปที่ 1(a)) tetrahydroimidazo [4,5,1-jk]benzodiazepine-2(1H)-thione (TIBO หรือ ทีโบ) (รูปที่ 1(b)) dipyrindodiazepinone (nevirapine หรือ เนวีราพีน) (รูปที่ 1(c)) และอนุพันธ์ของ 2-pyridinone (รูปที่ 1(d)) ที่สำคัญคือ NNRTI มีกัมมันตภาพ (activity) ที่ยับยั้งจำเพาะ (specific) ต่อ HIV-1 RT โดยไม่มีผลยับยั้งต่อ HIV-2 หรือ HIV ชนิดอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีกัมมันตภาพยับยั้งได้ที่มีความเข้มข้นต่ำจึงไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย ดังนั้นสารในกลุ่ม NNRTI จึงเป็นสารที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยร่วมกับ AZT

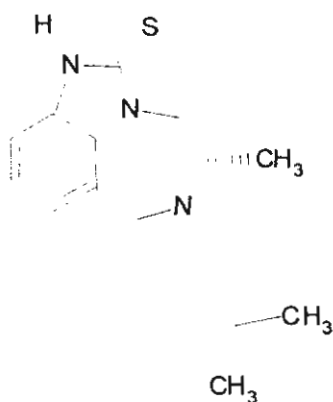
เป็นที่น่าสนใจว่าสารในกลุ่ม NNRTI นั้น มีความหลากหลายทางโครงสร้างผลจากการศึกษาโครงสร้างผลึกของตัวยับยั้ง dipyrindodiazepinone หรือ เนวีราพีน กับเอนไซม์ HIV-1 RT โดยวิธี X-ray crystallography ได้ชี้แนะกลไกการยับยั้งที่น่าจะเป็นไปได้ และในเวลาต่อมาได้มีการศึกษาโครงสร้างผลึกระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์ในกลุ่มอื่น คือ TIBO และ HEPT พบว่าตัวยับยั้งเหล่านี้ถึงแม้โครงสร้างของตัวยับยั้งจะมีความแตกต่างกันแต่การจับกับเอนไซม์และกลไกการออกฤทธิ์กลับมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือโครงสร้างของตัวยับยั้งที่จับกับเอนไซม์ภายใน hydrophobic cavity มีลักษณะที่มีความจำเพาะและจะปรับตัวให้มีโครงสร้างที่สามารถเข้าไปอยู่ใน cavity นั้นได้



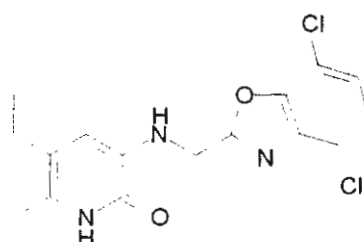
(a)



(b)



(c)



(d)

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ในกลุ่ม NNRTI (a) 1-[(2-Hydroxyethoxy)-methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT) (b) tetrahydroimidazo[4,5,1-jk]benzodiazepine-2(1H)-thione (TIBO หรือ ทีโบ) (c) dipyrindodiazepinone (nevirapine หรือ เนวีราพีน) และ (d) อนุพันธ์ของ 2-pyridinone

อย่างไรก็ตามกลไกในการยับยั้งของสารเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและยังเป็นปัญหาที่ยังต้องการคำอธิบาย จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การศึกษาวิจัยสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุลตัวยับยั้งกลุ่ม NNRTI ในด้านโครงสร้างทางอิเล็กทรอนิกส์ยังมีน้อยมาก จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาสมบัติทางโครงสร้างของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ในกลุ่ม NNRTI โดยวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัมและ Molecular Modelling การศึกษาทางโครงสร้างดังกล่าวนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญทางหนึ่งที่จะทำให้เกิดความเข้าใจและสามารถอธิบายถึงกลไกในของโครงสร้างที่มีผลต่อการยับยั้ง HIV-1 RT ดังกล่าว ตลอดจนอธิบายอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์ และจะเป็นข้อมูลทางโครงสร้างที่สำคัญในการออกแบบโมเลกุลตัวยับยั้งตัวใหม่ที่มีกัมมันตภาพสูง

1.2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและเอกสารอ้างอิง

ตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบนับเป็นสารสำคัญที่ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัส HIV-1 โดยตัวยับยั้งนี้จะหยุดการสังเคราะห์ proviral DNA ระหว่างที่เกิดการจำลองแบบของ viral RNA ปัจจุบันนี้สารที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV-1 คือ ยา AZT ddI และ ddC ซึ่งเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม 2',3'-dideoxynucleotide [1-2] ในปัจจุบันพบว่าสารในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย และเอนไซม์ HIV-1 RT เริ่มมีการต้านทานต่อยาชนิดนี้ [3] จึงทำให้การพัฒนาต้านเชื้อ HIV-1 มุ่งไปที่การวิจัยสารในกลุ่ม NNRTI ทั้งนี้เพราะสารในกลุ่มนี้ใช้ปริมาณสารน้อย (μM) ในการยับยั้งเชื้อ HIV-1 จึงไม่มี cytotoxic effect ข้างเคียงต่อผู้ป่วย [4-6] อีกทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งจำเพาะต่อ HIV-1 เท่านั้น [7-8] โดยไม่มีผลต่อการยับยั้ง HIV-2 หรือ retrovirus-associated RT

ในปี 1989 สารในกลุ่มของ TIBO และ HEPT นั้นได้ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งจำเพาะต่อ HIV-1 RT [9-12] และในปี 1990 De Clercq และคณะ จึงได้ค้นพบสารตัวใหม่คือ dipyrindodiazepinone (Nevirapine หรือ เนวिरาพีน) [13-14] สารในกลุ่มนี้ได้ถูกจัดเป็นสารกลุ่ม NNRTI ซึ่งมีความหลากหลายทางโครงสร้าง นับถึงปัจจุบันได้มีการสังเคราะห์สาร NNRTI ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างกันอีกหลายกลุ่ม [15-16] ในปี 1992 Kohlstaedt และคณะ [17] ได้วิเคราะห์โครงสร้างผลึกระหว่าง HIV-1 RT กับเนวिरาพีน ได้เป็นครั้งแรก โดยวิธีผลึกเอกซเรย์ (X-ray Crystallography) ($3.5 \text{ \AA}$ resolution) นับแต่นั้นมาได้มีผู้ศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ชนิดนี้กับตัวยับยั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเพิ่มความละเอียดของ resolution [18] แต่โครงสร้างที่พบไม่แตกต่างจากที่ Kohlstaedt ได้ศึกษาไว้มากนัก ข้อมูลทางโครงสร้างผลึกระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ดังกล่าวทำให้ทราบถึงกรดอะมิโนภายในโครงสร้างของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ hypophilic cavity ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดการจับกับตัวยับยั้ง (binding site) กล่าวคือส่วนของกรดอะมิโน เรซิดิว 100 Leu, 103 Lys, 106 Val, 108 Val, 138 Glu, 179 Val, 181 Tyr, 190 Gly, 230 Met และ 236 Pro กรดอะมิโนเหล่านี้ เป็นส่วนที่เกิดอันตรกิริยากับตัวยับยั้ง และอาจเกิดการ mutation ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการนำไปสู่การต้านทานของ HIV-1 ต่อดัวยับยั้ง

ได้มีการศึกษาถึงแนวทางการหลีกเลี่ยงต่อการต้านทานของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของตัวยับยั้ง เช่น Velazques, S. และคณะ [19] ได้ออกแบบและสังเคราะห์สารที่มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ให้มีโครงสร้างเป็น dimers และมีสูตรทั่วไปเป็น $[\text{ddN}]-(\text{CH}_2)_n-[\text{NNRTI}]$ โดยใช้สาร ddN (2',3'-dideoxynucleosides) เป็น AZT ส่วน NNRTI เป็น HEPT และ TSAO-T จากการศึกษาพบว่า $[\text{TSAO-T}]-(\text{CH}_2)_n-[\text{AZT}]$ dimers สามารถยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ได้แต่

ยังน้อยกว่า HEPT และ TSAO-T นอกจากนี้ยังพบว่า dimers ที่ประกอบด้วย TSAO-T ไม่เกิด cytotoxic ต่อเซลล์ นอกจากนี้ Johnson, K.A. และคณะ [20] ได้ศึกษากลไกการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 พบว่า NNRTI จะเข้าไปจับกับส่วนที่เป็น hydrophobic ในสารประกอบ enzyme-DNA โดยก่อให้เกิดความเป็นตัวเร่งของ enzyme หดไปจึงไม่เกิดปฏิกิริยาเคมีในขั้นการถ่ายแบบ ทั้งนี้ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide binding) หรือ การเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันโดยนิวคลีโอไซด์ (nucleoside-induced conformational change) แต่อย่างใด การศึกษาสมบัติของโมเลกุลของตัวยับยั้งในระดับโครงสร้างของอิเล็กตรอนและสนามพลังงานของโมเลกุล และการศึกษาโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์โดยวิธีโมเลคิวลาร์ โมเดลลิง จึงน่าที่จะเป็นหนทางหนึ่งซึ่งสามารถอธิบายกลไกในการเกิดปฏิกิริยาการยับยั้ง HIV-1 RT ของตัวยับยั้งในกลุ่ม NNRTI ได้

คณะผู้วิจัย [21] ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพ (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR) ของสารในกลุ่ม NNRTI กลุ่มแรกคือ HEPT โดยอาศัยสมบัติโครงสร้างอิเล็กตรอน (electronic structure) และสมบัติของโมเลกุล (molecular property) แสดงความสัมพันธ์ในรูปของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โดยวิธีถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple linear regression) และได้ตรวจสอบคุณภาพทางสถิติของแบบจำลองอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งคุณภาพในการทำนายกัมมันตภาพ (predictive ability) จากการศึกษาสามารถชี้ให้เห็นถึงตัวแปรทางโครงสร้างอิเล็กตรอนและสมบัติของโมเลกุลคือค่าพลังงานไฮเดรชันที่มีผลต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง นอกจากนี้แล้วยังได้ทำการศึกษาโดยวิธี 3D-QSAR (3-dimensional QSAR) [22] โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบสนามพลังงานของโมเลกุล (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) ซึ่งได้จากการคำนวณอันตรกิริยาประเภท steric และ electrostatic ของสารประกอบในกลุ่ม HEPT กับ probe atoms ชนิด C (sp^3) O (sp^3) และ H การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสนามพลังงานของโมเลกุลกับกัมมันตภาพใช้วิธี partial least squares โดยผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสนาม steric ของโมเลกุล (70% contribution) มีความสำคัญต่อกัมมันตภาพสูงกว่าสนาม electrostatic (30% contribution) การแสดงผลการศึกษาในรูปของแผนภาพสนาม steric และ electrostatic สามารถชี้แนะการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงได้

สำหรับงานวิจัยในโครงการที่เสนอนี้ นับว่าเป็นงานด้าน Computer-Aided Molecular Design บนพื้นฐานของเคมีควอนตัมของสารยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ในกลุ่มของ NNRTI คือ อนุพันธ์ของเนวิราพีน และยังได้ทำการศึกษากับอนุพันธ์ทีโบ อีกด้วย จึง

เป็นงานวิจัยที่จะทำให้ได้ข้อมูลทางโครงสร้างของตัวยับยั้งในกลุ่ม NNRTI ที่มีความสำคัญในอันที่จะอธิบายความจำเพาะของตัวยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งสามารถเสนอโครงสร้างของตัวยับยั้งใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงได้

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.3.1 เพื่อศึกษาสมบัติทางโครงสร้างทางอิเล็กทรอนิกส์และสมบัติของโมเลกุลซึ่งมีความสำคัญต่อกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ของสารยับยั้งในกลุ่ม NNRTI คืออนุพันธ์ของเนวิราพินและอนุพันธ์ของทีโบ

1.3.2 เพื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ของสารยับยั้งในกลุ่ม NNRTI โดยวิธี conventional QSAR และ 3D-QSAR

1.3.3 เพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1

1.3.4 นำข้อมูลทางโครงสร้างพื้นฐาน ที่ได้จากการศึกษาไปใช้เป็นแนวทางในการออกแบบสารประกอบตัวใหม่ที่มีศักยภาพสูง

2. วิธีการวิจัย

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 2.1.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ PCs (Pentium II) 133 MHz
- 2.1.2 เครื่องคอมพิวเตอร์ Workstation (Dec Alphastation model 250/4 266)
- 2.1.3 เครื่องคอมพิวเตอร์ IBM (SP2)
- 2.1.4 เครื่องคอมพิวเตอร์สมรรถนะสูง (SGI cluster computer)
- 2.1.5 เครื่องพิมพ์แบบเลเซอร์ (HP model 4L)
- 2.1.6 เครื่องพิมพ์แบบหมึกสี (Epson Stylus Color 600)
- 2.1.7 เครื่อง scanner (HP Scanjet 4)
- 2.1.8 โปรแกรมคำนวณทางเคมีควอนตัม (GAUSSIAN 94)
- 2.1.9 โปรแกรมคำนวณด้านโมเลกุลาร์โมเดลลิง (SYBYL 6.4 และ 6.5, Hyperchem 5.0, Chemplus 1.0, ALCHEMY2000)
- 2.1.10 โปรแกรมคำนวณด้านสถิติ (SPSS for Windows 7.0)
- 2.1.11 วัสดุคอมพิวเตอร์

2.2 ระเบียบวิธีวิจัย

2.2.1 การคำนวณโครงสร้างคอนฟอร์เมชัน

โครงสร้างเริ่มต้นของเนวราฟินได้จากข้อมูลทางผลึกเอกซเรย์ (รหัส 1VRT.pdb) และนำมาคำนวณโดยวิธีโมเลกุลาร์บิตัลสองระเบียบวิธีคือ เซมิเอมพีริคัล (MNDO, AM1 และ PM3) แอป อินซิโอ (HF/STO-3G, HF/3-21G และ HF/6-31G) โดยโปรแกรม GAUSSIAN 94 บนเครื่อง IBM (SP2) เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างที่เสถียรที่สุดของแต่ละวิธีและทำการเปรียบเทียบข้อมูลโดยวิธีผลึกเอกซเรย์ จากนั้นนำโครงสร้างที่เสถียรที่สุดที่ได้จากระเบียบวิธี HF/6-31G ไปคำนวณหาค่า $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของโครงสร้างเนวราฟินโดยระเบียบวิธีเดนซิตีฟังก์ชันแนล B3LYP/6-311++G(2d,p) และเปรียบเทียบกับค่าจากการทดลอง ข้อมูลที่ได้จากการคำนวณดังกล่าวจะนำไปสู่การอธิบายโครงสร้างของสารเนวราฟินที่เหมาะสมที่สุดและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับโครงสร้างของเอนไซม์

2.2.2 ข้อมูลกัมมันตภาพการยับยั้งของตัวยับยั้งเอนไซม์

ตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเฮช ไอ วี-1 ที่ใช้ในการศึกษา เป็นตัวยับยั้งในกลุ่ม NNRTIs ได้แก่ กลุ่มอนุพันธ์ของเนวราฟิน จำนวน 75 โมเลกุล และอนุพันธ์ของทีโอบี จำนวน 69 โมเลกุล โครงสร้างและความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ($\log 1/C$) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1-2.4 ทั้ง

นี้ ค่าความเข้มข้นยังผล (effective concentration, C) ในการป้องกันเซลล์ชนิด MT-4 ต่อ cytopathic effect ของเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ได้ 50% (50% inhibitory concentration, IC_{50}) [23] ในการศึกษาครั้งนี้ ค่าตัวแปรตาม (dependent variable) คือ ค่า $\log(1/C)$ ทั้งในการศึกษาโดยวิธี QSAR และ 3D-QSAR สำหรับการศึกษโดยวิธี 3D-QSAR นั้น อนุพันธ์ที่ศึกษาในแต่ละอนุพันธ์จะถูกแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ training set และ test set ดังแสดงในตารางที่ 2.2 และ 2.4

2.2.3 การสร้างและคำนวณโครงสร้างของโมเลกุลตัวยับยั้ง

โครงสร้างของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ของโมเลกุลเนเวราพีน และโมเลกุลทีโบ ได้จากข้อมูลผลึกเอกซเรย์ (x-ray crystallography) ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลโปรตีน (protein data bank) ซึ่งมีรหัส 1VRT.pdb และ HNV.pdb ตามลำดับ จากนั้นสารอนุพันธ์ของเนเวราพีนจำนวน 75 โมเลกุล และอนุพันธ์ของทีโบจำนวน 69 โมเลกุล จะถูกสร้างโดยใช้โปรแกรมโมเลกุลาร์โมเดลลิง ALCHEMY [24] และทำการคำนวณปรับโครงสร้างคอนฟอร์เมอร์โดยวิธี systematic search ที่มีอยู่ในโปรแกรม SYBYL 6.4 จากนั้นโครงสร้างทั้งหมดจะทำการคำนวณปรับโครงสร้างที่เสถียรที่สุด (full geometrical optimization) โดยระเบียบวิธีทฤษฎีโมเลกุลาร์ออร์บิทัล (molecular orbital theory) ทั้งแบบเคมีเอ็มพีรีคัล (AM1 PM3 และ MNDO) และแอบอินิซิโอ (HF/3-21G) ซึ่งการคำนวณดังกล่าวนี้จะทำการคำนวณโดยโปรแกรม GAUSSIAN 94 บนเครื่อง DEC Alphastation (model 250/4 266) เมื่อทำการคำนวณในขั้นตอนนี้เสร็จแล้วจึงจะได้ผลการคำนวณ ซึ่งเกี่ยวข้องกับข้อมูลการกระจายตัวของอิเล็กตรอน ซึ่งจะนำไปใช้ในการคำนวณสมบัติทางโครงสร้างต่าง ๆ ซึ่งจะแสดงไว้ในข้อ 2.2.4 และนำไปสร้างความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบ QSAR (ข้อ 2.2.4) และแบบ 3D-QSAR (ข้อ 2.2.5)

2.2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งโดยวิธี QSAR

ตัวอธิบายของโมเลกุล (molecular descriptor) จะใช้เป็นตัวแทนของสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุลโดยแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ

1. physicochemical properties ได้แก่ สมบัติ lipophilicity ($\log P$) [25] molar refractivity (MR) [26] polarizability (POL) [27] และ hydration energy (HE) [28] สมบัติดังกล่าวนี้ได้จากการคำนวณโดยโปรแกรม Hyperchem 5.0 และ Chemplus 1.0

2. electronic properties ได้แก่ ค่าความหนาแน่นของอิเล็กตรอน (electron density) ซึ่งจะใช้ค่าของประจุอิเล็กตรอน (atomic charges) สมบัติดังกล่าวนี้ได้จากการคำนวณโดยวิธีทฤษฎีโมเลกุลาร์ออร์บิทัล สองระเบียบวิธีคือเคมีเอ็มพีรีคัล และแอบ อินิซิโอ

จากนั้นจะนำตัวอธิบายของโมเลกุลและค่าสัมพันธภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 สร้างความสัมพันธ์ในเชิงแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ดังสมการที่ (1)

$$\log(1/IC_{50}) = \sum_{i=1} p_i q_i + \sum_{j=1} p_j M_j + c \quad (1)$$

โดยในที่นี้ค่า p_i และ p_j หมายถึงค่าสัมประสิทธิ์ (coefficients) ที่ได้จากการคำนวณโดยวิธีการถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple linear regression, MLR) ค่า q_i หมายถึงประจุอิเล็กทรอนิกส์ของอะตอมในแต่ละโมเลกุลที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี MLR ค่า M_j หมายถึงตัวอธิบาย physicochemical properties ของโมเลกุล การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จะพิจารณาค่าทางสถิติ ได้แก่ ค่า correlation coefficient (r), F-value (F), standard coefficient (sd), maximum outliers และความสามารถในการทำนาย (predictive ability หรือ Q^2) เพื่อวิเคราะห์สมการที่ดีที่สุด ซึ่งจะเป็นตัวอธิบายความสัมพันธ์ของโครงสร้างที่มีต่อสัมพันธภาพในการยับยั้งและนับได้ว่าสมการที่ได้จากการศึกษาเป็นสมการที่มีความเชื่อถือได้อย่างมีนัยสำคัญ (statistical significance) แผนภาพการศึกษาโดยระเบียบวิธี QSAR ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2.1

2.2.5 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับสัมพันธภาพในการยับยั้งโดยวิธี 3D-QSAR

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับสัมพันธภาพในการยับยั้งแบบ 3D-QSAR ในโครงการนี้จะใช้วิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามของโมเลกุล (Comparative Molecular Fields Analysis, CoMFA) [29] ซึ่งเป็นวิธีด้าน Computer-Aided Molecular Design ขั้นตอนสำคัญในการวิเคราะห์โดยวิธี CoMFA นั้นอาจแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนคือ

1. การวางโมเลกุล (Alignment rule)

ในวิธีคอมฟานั้นจะวางโมเลกุลทุก ๆ โครงสร้างภายในกล่องซึ่งมีขนาดที่กำหนด ทั้งนี้ขั้นตอนนี้จัดว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เนื่องจากผลการวิเคราะห์จะได้รับการเปรียบเทียบสนามของโมเลกุลสองแบบคือ อันตรกิริยาสเตอริก (steric interaction) และอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic interaction) ในการศึกษาจะใช้วิธีการวางโมเลกุลแบบวางทับ (superimposition)

2. การวิเคราะห์โดยวิธีคอมฟา (CoMFA analysis)

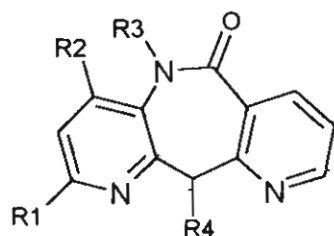
โมเลกุลที่ได้วางทับไปในขั้นตอนที่ 1 และจะถูกสร้างบริเวณใน 3 มิติ รอบ ๆ โมเลกุลเป็นโครงผลึกลูกบาศก์คอมฟา (CoMFA cubic lattice) ซึ่งจะทำให้ได้จุดตัด (grid point) รอบโมเลกุลจำนวนมาก ซึ่งจุดตัดดังกล่าวนี้จะเป็นตำแหน่งของโพรบอะตอม (probe atom) ซึ่งการวิเคราะห์จะคำนวณอันตรกิริยาระหว่างโพรบอะตอมกับโมเลกุลของตัวยับยั้งสองแบบคือ อันตรกิริยาสเตอริก และอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก จากนั้นค่าอันตรกิริยาดังกล่าวจะถูกบันทึกไว้ใน

ตาราง (ภาพที่ 2.2) เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยระเบียบวิธี cross-validation และการถดถอยพหุคูณแบบพาร์เชียล (Partial Least Squares) (ภาพที่ 2.3) การวิเคราะห์โดยวิธีคอมพอนาแสดงโดยสรุปได้ดังภาพที่ 2.4

3. การแปลผล (Interpretation)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากวิธีวิเคราะห์แบบคอมพอนั้น จะไม่สามารถแสดงได้เป็นสมการทั่วไป แต่การประเมินผลว่าแบบจำลองใดที่ให้ผลการทำนายค่ากัมมันตภาพดีที่สุดนั้นจะอาศัยค่าความสามารถในการทำนาย Q^2 เป็นจุดหลัก ซึ่งแบบจำลองที่ดีควรมีค่า Q^2 สูงกว่า 0.6 และการแปลผลจะแสดงในรูปของภาพคอนทัวร์ของสัมประสิทธิ์ (coefficient contour map) ทั้งนี้ คอนทัวร์แบบสเตอริกจะแสดงโดยสีเขียว (positive) และสีเหลือง (negative) ซึ่งหมายความว่าควรเพิ่มหมู่เกาะในโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบสเตอริกบริเวณที่แสดงโดยสีเขียว สำหรับคอนทัวร์แบบอิเล็กโตรสแตติกจะแสดงโดยสีแดง (positive) และ สีน้ำเงิน (negative) โดยความหมายคือควรเพิ่มหมู่แทนที่ในโครงสร้างโมเลกุลที่มีประจุเล็กน้อยสูงขึ้นเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติกบริเวณที่แสดงโดยสีแดง

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างของเนวิราพีนและอนุพันธ์ และแสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์
การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 ทั้งแบบการยับยั้ง WT RT และ Y181C RT.

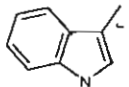
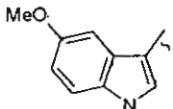
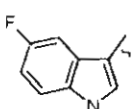
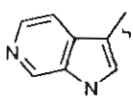
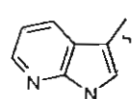


Cpds. No	R1	R2	R3	R4	Expt.log(I/C)	
					WT RT	Y181C RT
1	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.096	5.584
2	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.397	5.744
3	H	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.885	5.657
4	CH ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.698	5.999
5	CH ₂ CH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.920	5.920
6	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	H	C ₂ H ₅	5.999	5.999
7	C(CH ₃) ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	5.999	5.999
8	C=CHCOOCH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.744	6.173
9	C=CHCONH ₂	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.601	5.619
10	F	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.698	6.069
11	Cl	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.698	6.107
12	Cl	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.999	6.096
13	Cl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.044	6.035
14	NH ₂	H	CH ₃	C ₂ H ₅	5.999	5.999
15	NHCH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.720	6.148
16	NHC ₂ H ₅	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.637	5.885
17	NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.044	5.999
18	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.154	6.112
19	N(CH ₃)XCH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.999	5.999
20	N-3,4-didehydropyrrolidinyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.522	6.193
21	N-piperidinyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.522	5.999
22	N-morpholinyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.397	5.999
23	N-thiomorpholinyl	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.823	5.999
24	N-pyrrolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.044	6.677
25	OH	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.327	5.999
26	OCH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.397	6.221
27	OXCH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.920	5.958
28	SCH ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.698	5.999
29	2-furanyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.957	6.795
30	3-furanyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.397	6.957
31	2-pyrrolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.154	7.154
32	3-pyrrolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.522	7.397

(ตารางที่ 2.1 (ต่อ))

Cpds No	R1	R2	R3	R4	Expt.log(1-C)	
					WT RT	Y181C RT
33	3-pyrrolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.300	7.221
34	2-thienyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.853	6.376
35	5-imidazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.885	6.720
36	3-pyrazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.408	6.536
37	4-pyrazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.221	7.300
38	phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.637	5.853
39	3-(OCH ₃ -phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.823	6.677
40	3-NH ₂ -phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.154	6.251
41	4-OCH ₃ phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	5.853	5.494
42	4-OH-phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.154	6.567
43	2-pyridyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.744	5.795
44	3-pyridyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.744	6.355
45	3-(6-(OCH ₃ pyri dyl)	H	CH ₃	C ₂ H ₅	5.920	5.522
46	3-(6-(OH-pyri dyl)	H	CH ₃	C ₂ H ₅	5.958	5.999
47	3-(6-NH ₂ -pyridyl)	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.300	6.584
48	4-pyridyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.823	6.494
49	H	CH ₂ NHPh	H	C ₂ H ₅	7.221	5.862
50	H	CH ₂ O(Ph-p-NH ₂)	H	C ₂ H ₅	6.999	5.995
51	H	CH ₂ O(Ph-p-NHEt)	H	C ₂ H ₅	7.096	6.365
52	H	CH ₂ (Ph-o-OH)	H	C ₂ H ₅	6.720	5.950
53	OH	CH ₂ OCH ₂ Ph	H	C ₂ H ₅	6.957	5.970

ตารางที่ 2.2. โครงสร้างของอนุพันธ์ของเนวิราพินที่ใช้ทดสอบความสามารถในการทำนาย และแสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 จากการทดลอง

Cpds. No.	R1	R2	R3	R4	Expt. log (1/C)	
					WT RT	Y181C RT
T1	CH ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.154	5.920
T2	CH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.044	5.769
T3	C ₂ H ₅	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.853	6.376
T4	Cl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.096	6.677
T5	Br	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.522	5.677
T6	NHCH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.044	5.999
T7	NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.044	5.999
T8	N-pyrazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.507	6.251
T9	3-thienyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.999	6.522
T10	2-imidazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	5.431	6.130
T11	4-pyrazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.698	7.221
T12	2-OCH ₃ -phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.085	5.601
T13	3-OH-phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.999	6.744
T14	4-NH ₂ -phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.397	6.920
T15	H	CH ₂ OPh	H	C ₂ H ₅	6.920	5.587
T16	OH	CH ₂ Ph	H	C ₂ H ₅	6.467	5.885
T17	Ph-m-OMe	CHO	H	C ₂ H ₅	6.480	6.376
T18		H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.552	7.552
T19		H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.698	6.637
T20		H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.150	6.251
T21		H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.355	7.008
T22		H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.677	6.698

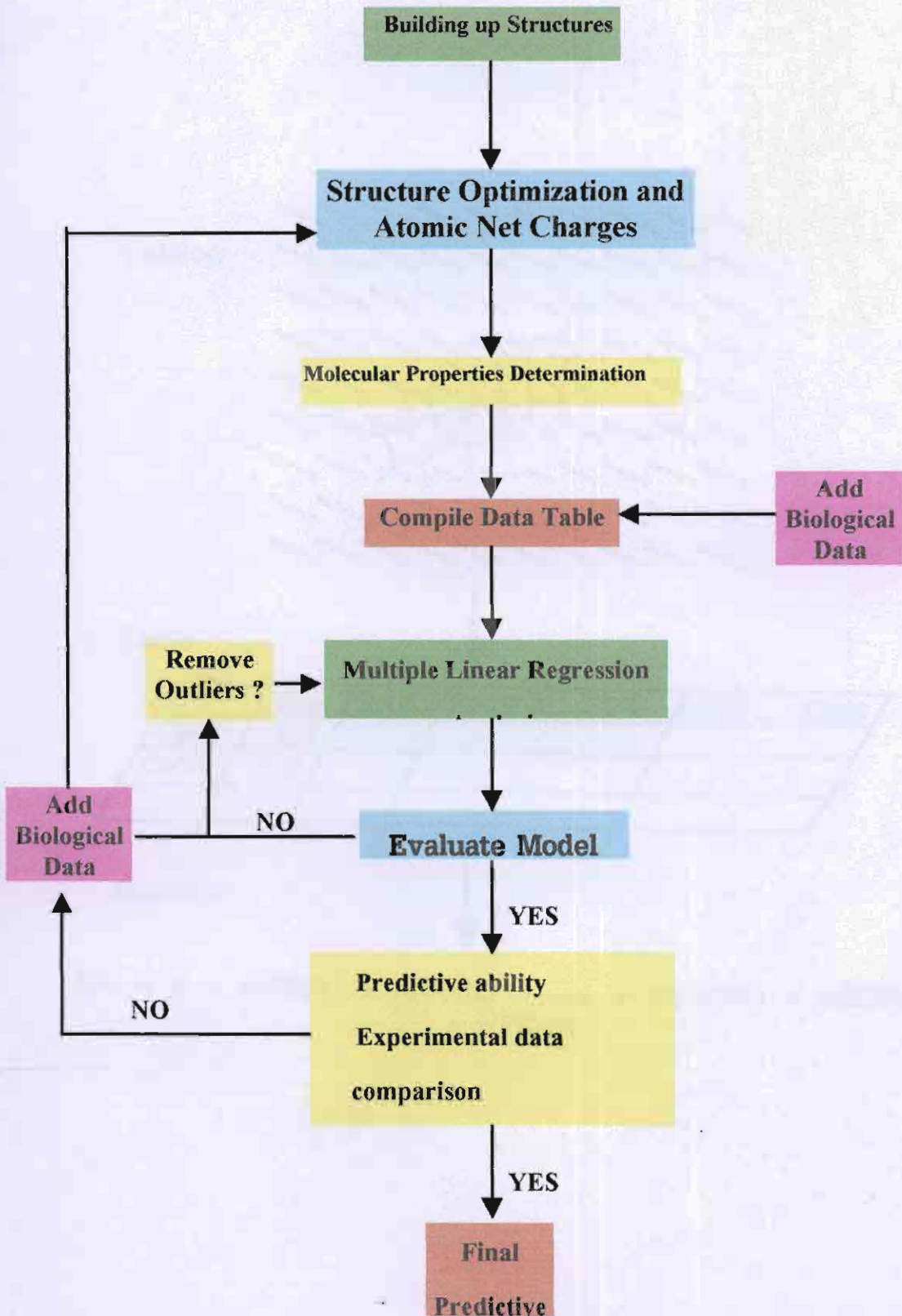
ตารางที่ 2.3 โครงสร้างของโมเลกุลทีโอบีและอนุพันธ์ และแสดงค่าสัมพันธภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ
เอช ไอ วี-1

Cpds.	R	X	Y	Z	Expt. log(1/C)	Calc. Log(1/C) ^b	residual
1	H	S	8-Cl	DMA ^c	7.340	8.006	-0.666
2	H	S	9-Cl	DMA	6.790	7.167	-0.377
3	5-CH ₂ CH ₃	O	-	2-MA ^d	4.300	4.958	-0.658
4	5-CH(CH ₃) ₂	O	-	2-MA	5.000	5.051	-0.051
5	5-CH(CH ₃) ₂	O	-	DMA	5.000	5.044	-0.044
6	5,5-di-CH ₃	O	-	2-MA	4.640	4.994	-0.354
7	4-CH ₃	O	-	2-MA	4.490	4.521	-0.031
8	4-CH ₃ (S)	S	9-Cl	2-MA	6.170	6.578	-0.408
9	4-CH ₃	S	9-Cl	CH ₂ CH(CH ₂) ₂	5.660	6.416	-0.756
10	4-CH(CH ₃) ₂	O	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.130	4.433	-0.303
11	4-CH(CH ₃) ₂	O	-	2-MA	4.900	4.419	0.481
12	4-CH ₂ CH ₂ CH ₃	O	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.740	3.598	0.142
13	4-CH ₂ CH ₂ CH ₃	O	-	2-MA	4.320	4.469	-0.149
14	7-CH ₃	O	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.080	5.021	-0.941
15	7-CH ₃	O	-	DMA	4.920	5.016	-0.096
16	7-CH ₃	O	8-Cl	DMA	6.840	6.671	0.169
17	7-CH ₃	O	9-Cl	DMA	6.790	5.787	1.003
18	7-CH ₃	S	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	5.610	6.260	-0.650
19	7-CH ₃	S	-	DMA	7.110	6.266	0.845
20	7-CH ₃	S	8-Cl	DMA	7.920	7.932	-0.012
21	7-CH ₃	S	9-Cl	DMA	7.640	7.115	0.525
22	4,5-di-CH ₃ (cis)	O	-	DMA	4.250	4.346	-0.096
23	4,5-di-CH ₃ (cis)	S	-	DMA	5.650	5.727	-0.077
24	4,5-di-CH ₃ (trans)	S	-	CH ₂ CH(CH ₂) ₂	4.870	4.725	0.145
25	4,5-di-CH ₃ (trans)	S	-	DMA	4.840	5.753	-0.913
26	4-keto-5-CH ₃	S	9-Cl	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.300	3.959	0.341
27	4,5-benzo	S	-	CH ₂ CH(CH ₂) ₂	5.000	4.944	0.056
28	5,7-di-CH ₃ (trans)	S	-	DMA	7.380	6.193	1.187
29	5,7-di-CH ₃ (cis)	S	-	DMA	5.940	6.265	-0.325
30	5,7-di-CH ₃ (R,R:trans)	O	9-Cl	DMA	6.640	5.771	0.869
31	5,7-di-CH ₃ (R,R:trans)	S	9-Cl	DMA	6.320	7.012	-0.692
32	5,7-di-CH ₃ (S,S:trans)	O	9-Cl	DMA	5.300	5.127	0.173
33	4,7-di-CH ₃ (trans)	S	-	DMA	4.590	4.423	0.167
34	5,6-CH ₂ C(=CHCH ₃)CH ₂ (S)	S	9-Cl	-	5.420	6.126	-0.706
35	6,7-(CH ₂) ₄	S	9-Cl	-	5.700	6.934	-1.234
36	5-CH ₃ (S)	S	8-Cl	DMA	8.300	7.880	0.420
37	5-CH ₃ (S)	O	9-Cl	DMA	6.740	5.840	0.900
38	5-CH ₃ (S)	S	9-Cl	DMA	7.370	7.066	0.304
39	5-CH ₃ (S)	S	9-Cl	CH ₂ CH(CH ₂) ₂	7.470	7.079	0.391
40	5-CH ₃ (S)	S	-	CH ₂ CH(CH ₂) ₂	7.220	6.261	0.959
41	5-CH ₃	O	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.220	5.127	-0.907
42	5-CH ₃	S	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	5.780	6.285	-0.505
43	5-CH ₃	O	-	2-MA	4.460	5.071	-0.611
44	5-CH ₃	S	-	DMA	7.010	6.281	0.729
45	5-CH ₃ (S)	O	-	DMA	5.480	5.054	0.426
46	5-CH ₃ (S)	S	-	2-MA	7.580	6.237	1.344

^a ภาพที่ 3.2.2. ^b คำนวณโดยสมการ (3.12). ^c DMA = 3,3-dimethylallyl, ^d 2-MA = 2-methylallyl

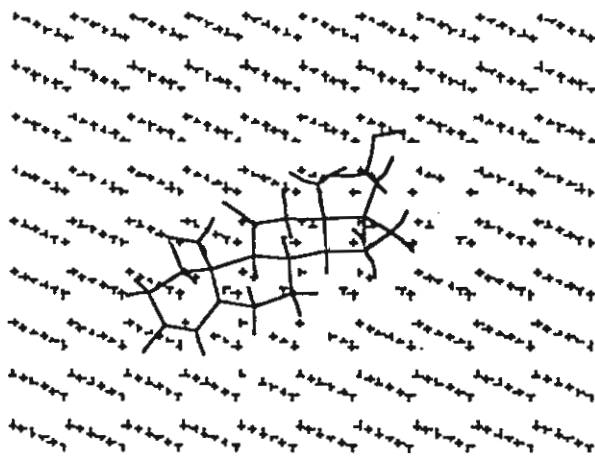
ตารางที่ 2.4 โครงสร้างของอนุพันธ์ของทีโอบีในกลุ่ม test set และค่าสัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์เอช ไอ วี-1

Cpds.	R	X	Y	Z	Expt.log(1/C)
T1	H	O	H	DMA	4.900
T2	H	O	H	2-MA	4.330
T3	H	O	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.050
T4	H	O	H	CH ₂ C(C ₂ H ₅)=CH ₂	4.430
T5	5-CH ₃ (S)	S	H	DMA	7.355
T6	5-CH ₃ (S)	O	H	CH ₂ CH=CH ₂	4.154
T7	5-CH ₃ (S)	O	H	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.999
T8	5-CH ₃ (S)	S	8-F	DMA	8.235
T9	5-CH ₃ (S)	O	8-Br	DMA	7.324
T10	5-CH ₃ (S)	S	8-Br	DMA	8.521
T11	5-CH ₃ (S)	S	8-CH ₃	DMA	7.865
T12	5-CH ₃ (S)	S	8-O-CH ₃	DMA	7.468
T13	5-CH ₃ (S)	S	9,10-di Cl	DMA	7.592
T14	5-CH ₃ (S)	O	8-CN	DMA	5.940
T15	5-CH ₃ (S)	S	8-CN	DMA	7.250
T16	CH ₃ (S)	O	8-CH ₃	DMA	6.000
T17	5-CH ₃ (S)	S	10-OCH ₃	DMA	5.330
T18	5-CH ₃ (S)	O	10-OCH ₃	DMA	5.180
T19	5-CH ₃ (S)	S	10-Br	DMA	5.970
T20	5-CH ₃ (S)	S	8-CHO	DMA	6.730
T21	5-CH ₃ (S)	O	8-I	DMA	7.060
T22	5-CH ₃ (S)	S	8-I	DMA	7.320
T23	5-CH ₃ (S)	O	8-C=CH	DMA	6.360
T24	5-CH ₃ (S)	S	8-C=CH	DMA	7.530



ภาพที่ 2.1 ภาพแสดงขั้นตอนสำคัญในการศึกษาโดยระเบียบวิธี QSAR

Lattice



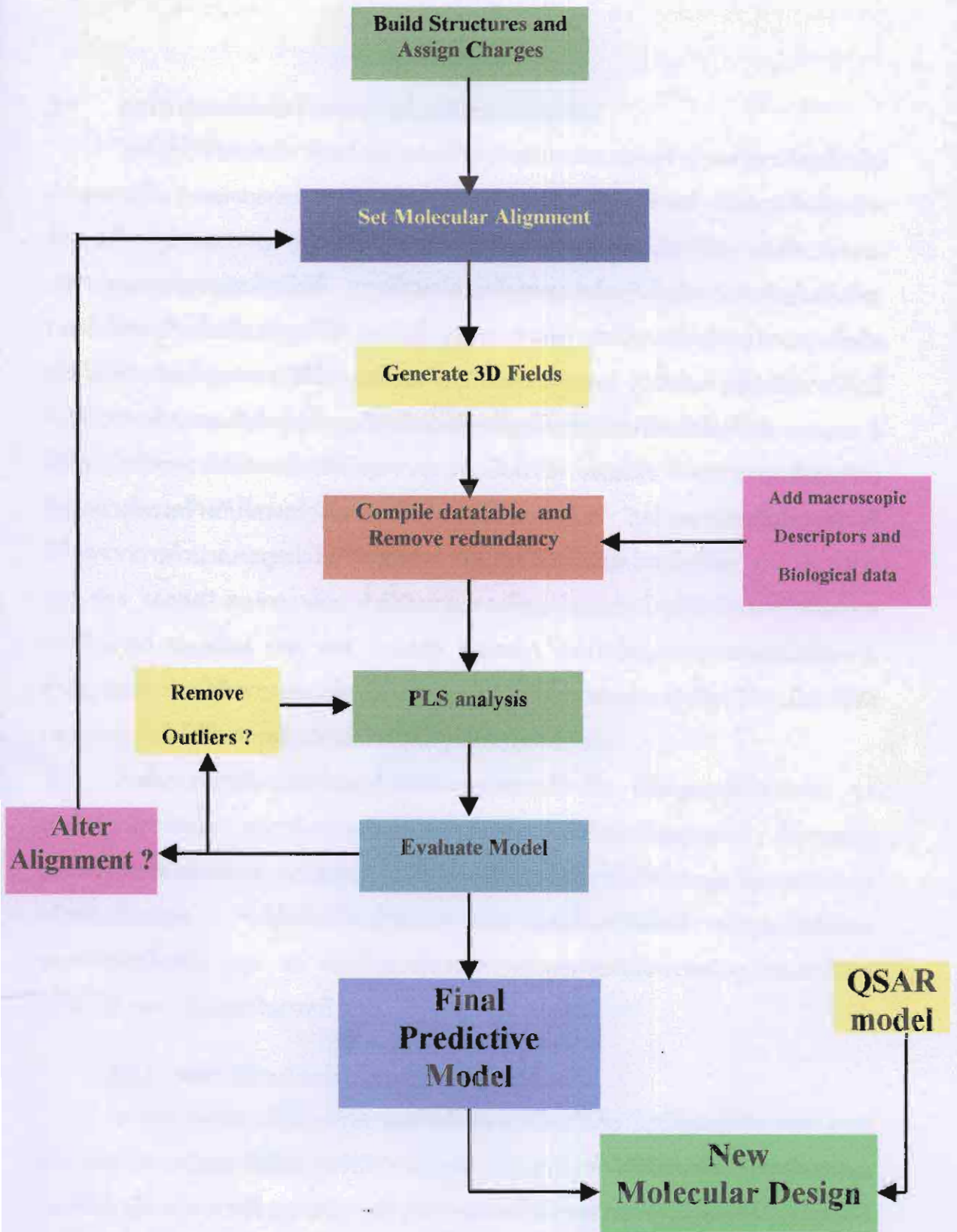
Table

	Bio	S001	S002		S998	E001		E998
Cpd1	5.1							
Cpd2	6.8							

Equation

$$Bio = y + a(S001) + b(S002) + + m(S998) + n(E001) + + z(E998)$$

ภาพที่ 2.2 แสดงการเก็บข้อมูลอันตรกิริยาแบบสเตอริกและอิเล็กทรอนิกส์
เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีคอมฟา



ภาพที่ 2.4 ภาพแสดงขั้นตอนสำคัญในการศึกษาโดยระเบียบวิธี 3D-QSAR แบบคอมพิวเตอร์

3. ผลการคำนวณ

3.1 การคำนวณโครงสร้างคอนฟอร์เมชันของเนวราพีน

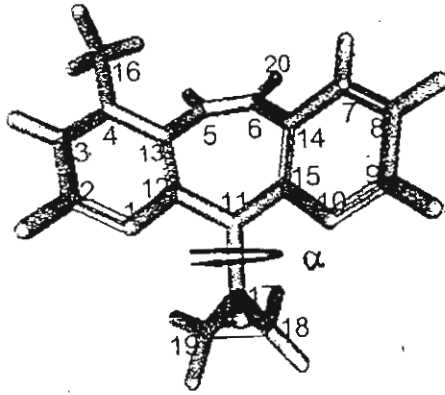
โครงสร้างของเนวราพีนนั้นประกอบด้วยวงเฮกซะโทไรอะตอมจำนวนสามวงโดยที่วงในส่วนกลางเป็น 7-membered ring และมีวงอะโรมาติกสองวง ดังนั้นโครงสร้างโมเลกุลจึงค่อนข้างมีความยืดหยุ่น (flexibility) สูง อย่างไรก็ตาม โครงสร้างที่จำเพาะของเนวราพีนเท่านั้นที่จะมีความเหมาะสมและจับกับเอนไซม์ได้ดี การศึกษาโครงสร้างคอนฟอร์เมชันจึงมีความสำคัญในอันที่จะบอกถึงโครงสร้างที่เสถียรที่สุดที่ได้จากการคำนวณทางทฤษฎี และโครงสร้างดังกล่าวจะน่าเชื่อถือหรือไม่อย่างน้อยที่สุดควรจะได้มีการเปรียบเทียบกับผลการทดลอง ดังนั้นในการดำเนินการวิจัยนี้ จึงได้ทำการคำนวณปรับโครงสร้างเนวราพีนที่เสถียรที่สุดโดยระเบียบวิธีเคมีเอ็มพีริคัล และแอบ อินิซิโอ เมื่อวิเคราะห์ได้โครงสร้างที่ดีที่สุดจากการระเบียบวิธีคำนวณแล้ว จึงจะทำการเปรียบเทียบข้อมูลทางโครงสร้างกับโครงสร้างโมเลกุลที่ได้จากวิธีผลึกเอกซ์เรย์ ในทำนองเดียวกันโครงสร้างที่ดีที่สุดจากการคำนวณจะถูกนำไปคำนวณค่าทำนายสมบัติทางสเปกโตรสโคปีคือ ค่า chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตราด้วย ทั้งนี้พบว่าผลการศึกษาโครงสร้างโดยวิธีผลึกเอกซ์เรย์และผลการศึกษาค่า chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรา จัดเป็นข้อมูลทางการทดลองที่มีความสำคัญ และจะช่วยให้ทราบว่าจะระเบียบวิธีทางทฤษฎีวิธีใดที่มีความเหมาะสมที่สุด ซึ่งระเบียบวิธีดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการสร้างโครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์ต่อไป

เริ่มต้นจากการพิจารณาโครงสร้างโมเลกุลของเนวราพีน ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 11 เป็นไซโคลโพรพิลนั้น พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการหมุนอิสระเป็นอย่างมาก ซึ่งการหมุนของวงไซโคลโพรพิลดังกล่าวจะมีผลกระทบต่อโครงสร้างของเนวราพีนทั้งโมเลกุล ในการปรับโครงสร้างที่เสถียรที่สุด จึงได้เลือกที่จะคำนวณค่าพลังงานของโมเลกุลเมื่อมีการหมุนมุมไดฮีดรอลของวงไซโคลโพรพิล (มุม α) รอบพันธะเดี่ยวระหว่างอะตอมของไนโตรเจนกับอะตอมคาร์บอนครั้งละ 30 องศา ดังแสดงในภาพที่ 3.1

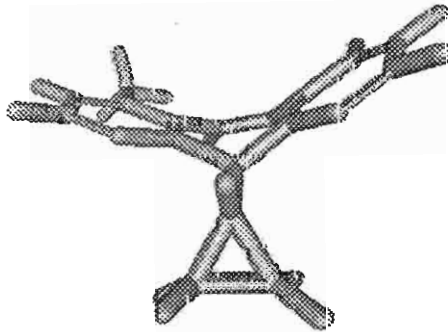
3.1.1. ผลการคำนวณปรับโครงสร้างคอนฟอร์เมชัน

โดยใช้การคำนวณวิธีโมเลคิวลาร์ออร์บิทัลสองระเบียบวิธีคือวิธีเคมีเอ็มพีริคัล (AM1 PM3 และ MNDO) และแอบ อินิซิโอ (HF/STO-3G และ HF/3-21G) ทำให้ได้ค่าพลังงานศักย์การหมุนรอบพันธะเดี่ยวตามภาพที่ 3.2 และภาพที่ 3.3 จากภาพที่ 3.2 พบว่าการคำนวณโดยวิธีเคมีเอ็มพีริคัลทั้งสามระเบียบวิธีให้ผลที่สอดคล้องกันกล่าวคือ โครงสร้างของเนวราพีนมีระดับพลังงานต่ำที่สุด 1 คอนฟอร์เมชันคือเมื่อมุม α เท่ากับ 208.5 องศา และเมื่อทำการคำนวณโดยระเบียบวิธีแอบ อินิซิโอ พบว่าให้ผลการปรับเปลี่ยนมุม α ที่สอดคล้องกัน และค่าระดับพลังงานที่ต่ำที่สุดของแต่ละ

ละระเบียบวิธีโดยการคำนวณแบบ อินิซิโอ แสดงไว้ดังตารางที่ 3.1 และภาพที่ 3.3 นอกจากนั้น
 แล้วยังได้นำโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณโดยวิธี HF/3-21G ไปคำนวณที่ระดับเบซิสเซ็ทสูงขึ้น
 คือ HF/6-31G เพื่อทำการคำนวณค่าพลังงานของโมเลกุลและนำไปเปรียบเทียบกับค่าพารามิเตอร์
 จากการทดลองด้วย

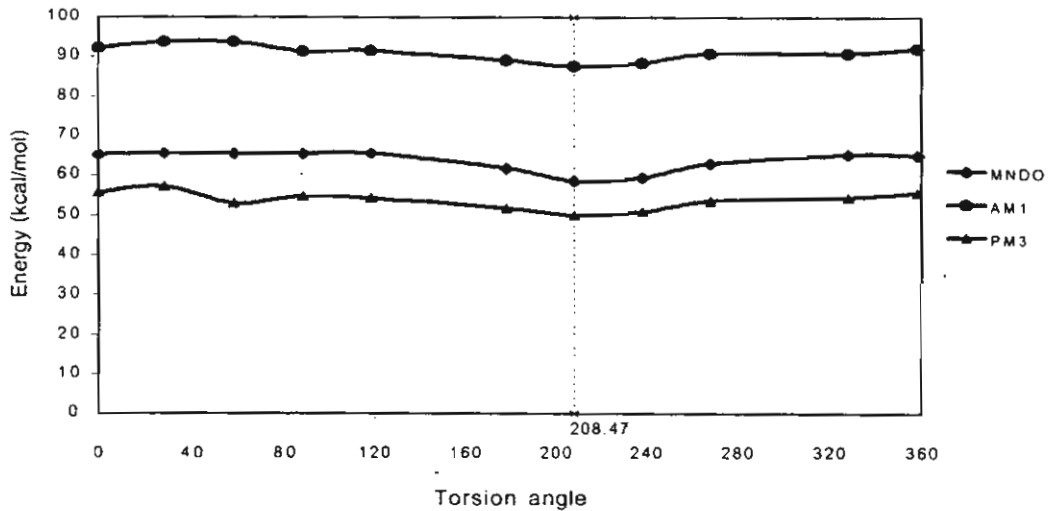


(a)



(b)

ภาพที่ 3.1 (a) แสดงโครงสร้างของเนวราฟีนและแสดงมุมการปรับเปลี่ยนโครงสร้างคอนฟอร์เมชัน
 ที่ใช้ในการศึกษา (มุม α) (b) แสดงโครงสร้างของเนวราฟีนมีลักษณะคล้ายผีเสื้อ (butterfly-like).



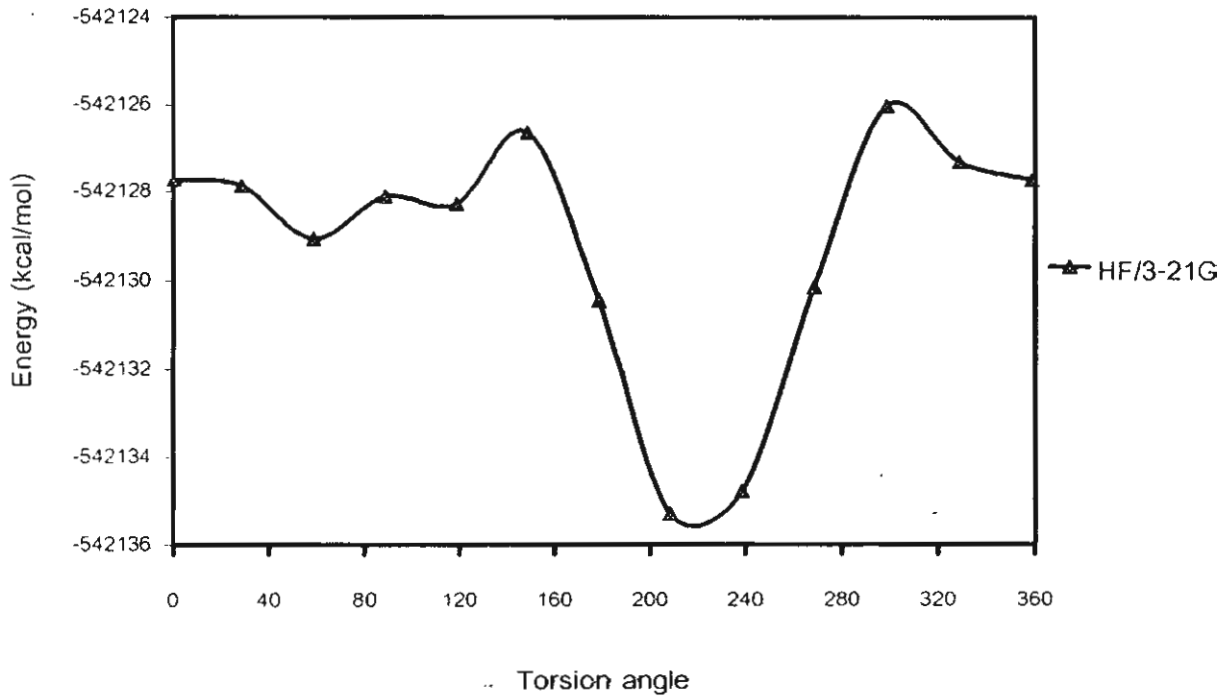
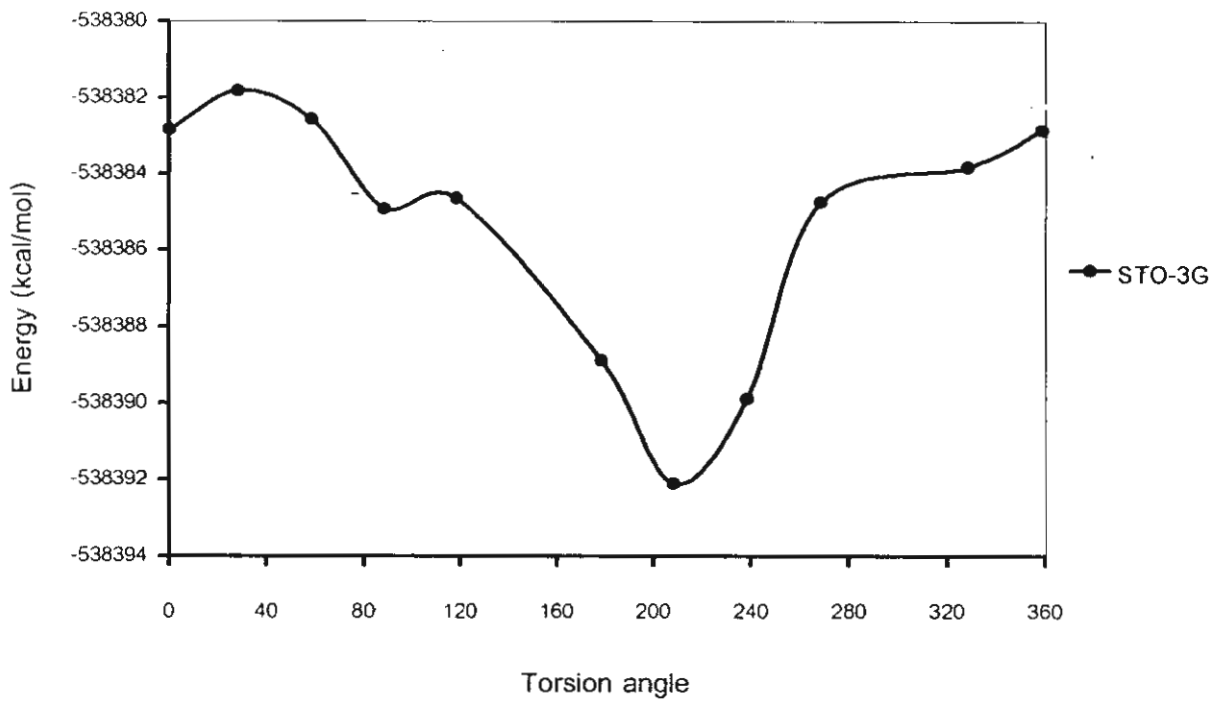
ภาพที่ 3.2 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าพลังงาน (kcal/mol) กับมุมไดฮีดรอลรอบพันธะเดี่ยวระหว่างอะตอมของไนโตรเจนกับคาร์บอนของมูมัลฟา โดยวิธีเคมีอมพิริคัล (AM1 PM3 และ MNDO).

ตารางที่ 3.1 แสดงระดับพลังงานที่ต่ำที่สุด (kcal/mol) โดยระเบียบวิธีการคำนวณแบบแอ็บ อินิชิโอที่เบสิสเซตต่างๆ

ระเบียบวิธีการคำนวณแบบแอ็บอินิชิโอ	ระดับพลังงานที่ต่ำที่สุด (kcal/mol)
STO-3G	-538,392.106
HF/3-21G	-542,135.290
HF/6-31G	-548,588.275

ในตารางที่ 3.2 ได้แสดงการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ของโครงสร้างคือ ค่าความยาวพันธะ ค่ามุมพันธะ และค่ามุมไดฮีดรอล ที่ได้จากการคำนวณโดยระเบียบวิธีต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว และแสดงการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากวิธีสลิคเอ็กซ์เรย์ ซึ่งจากการคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน พบว่าสำหรับการคำนวณความยาวพันธะนั้น ค่าความยาวพันธะที่ได้จากวิธีเคมีอมพิริคัล จะให้ค่าที่ใกล้เคียงกับค่าจากการทดลองมากที่สุด กล่าวคือมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่น้อยที่สุด สำหรับการคำนวณค่ามุมพันธะพบว่าระเบียบวิธีแอ็บ อินิชิโอ (HF/3-21G) จะให้ค่าที่ใกล้เคียงกับการทดลองมากที่สุด สำหรับมุมไดฮีดรอลของโครงสร้างพบว่าไม่สามารถเปรียบเทียบได้โดยตรง ทั้งนี้เนื่องจากค่ามุมไดฮีดรอลที่ได้จาก

วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดอันเนื่องมาจากอิทธิพลของโครงสร้างเล็กที่มีต่อโมเลกุล ในขณะที่การปรับโครงสร้างโดยวิธีคำนวณนั้นมีอิสระในการปรับโครงสร้างมากกว่า



ภาพที่ 3.3 การเปรียบเทียบผลการคำนวณโครงสร้างคอนฟอร์เมชันโดยวิธีแอบ อินิซิโอ ภาพบน โดยวิธี HF/STO-3G และ ภาพล่างโดยวิธี HF/3-21G

ตารางที่ 3.2 แสดงสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุลเนวิราฟีนที่เสถียรที่สุดที่ได้จากการคำนวณโดยวิธีต่างๆ เปรียบเทียบกับข้อมูลด้านโครงสร้างที่ได้จากการทดลองโดยวิธีผลึกเอกซเรย์

method	x-ray	Semiempirical			Ab initio (Hartree Fock)		
		MNDO	AM1	PM3	STO-3G	3-21G	6-31G
bond length (Å)							
N1-C2	1.352	1.350	1.339	1.350	1.354	1.329	1.336
C4-C16	1.519	1.508	1.482	1.487	1.526	1.513	1.509
C13-N5	1.420	1.416	1.398	1.435	1.441	1.406	1.409
N5-C6	1.330	1.415	1.387	1.424	1.442	1.364	1.382
C6-O20	1.239	1.230	1.249	1.226	1.223	1.221	1.226
C9-N10	1.351	1.352	1.340	1.347	1.350	1.328	1.335
N10-C15	1.339	1.355	1.369	1.365	1.356	1.324	1.338
C15-N11	1.424	1.434	1.439	1.447	1.451	1.406	1.415
N11-C12	1.488	1.438	1.444	1.456	1.459	1.414	1.426
N11-C17	1.460	1.460	1.447	1.478	1.471	1.448	1.452
SD		0.027	0.016	0.026	0.032	0.019	0.02
bond angle (degree)							
C2-N1-C12	118.56	118.36	118.36	119.73	115.91	120.03	118.43
N1-C12-N11	118.10	116.64	120.17	118.11	117.27	117.78	117.14
C9-N10-C15	118.12	118.29	117.99	120.09	116.86	120.36	118.87
N10-C15-N11	117.32	118.39	121.07	117.42	115.50	116.78	116.09
C15-N11-C17	114.28	118.15	115.73	116.88	114.10	116.70	115.88
N11-C17-C19	116.37	118.56	118.82	117.74	116.89	115.67	116.44
SD		1.4	1.39	1.02	0.91	0.9	0.6
torsion angle (degree)							
N1-C12-C13-C4	359.97	1.25	357.91	359.08	0.05	1.30	0.45
C13-N5-C6-O20	183.53	167.03	180.79	199.70	217.77	195.35	198.35
O20-C6-C14-C7	30.02	46.48	34.84	26.41	13.52	21.87	21.71
C12-N11-C17-C19	68.67	69.02	75.99	72.71	74.94	61.74	66.03
C15-N11-C17-C18	276.60	276.61	276.61	276.61	276.61	276.61	276.61
C14-C15-N11-C17	168.26	148.32	154.42	159.40	167.82	156.04	161.05
C13-C12-N11-C17	200.06	209.93	206.41	205.85	202.42	207.26	204.57

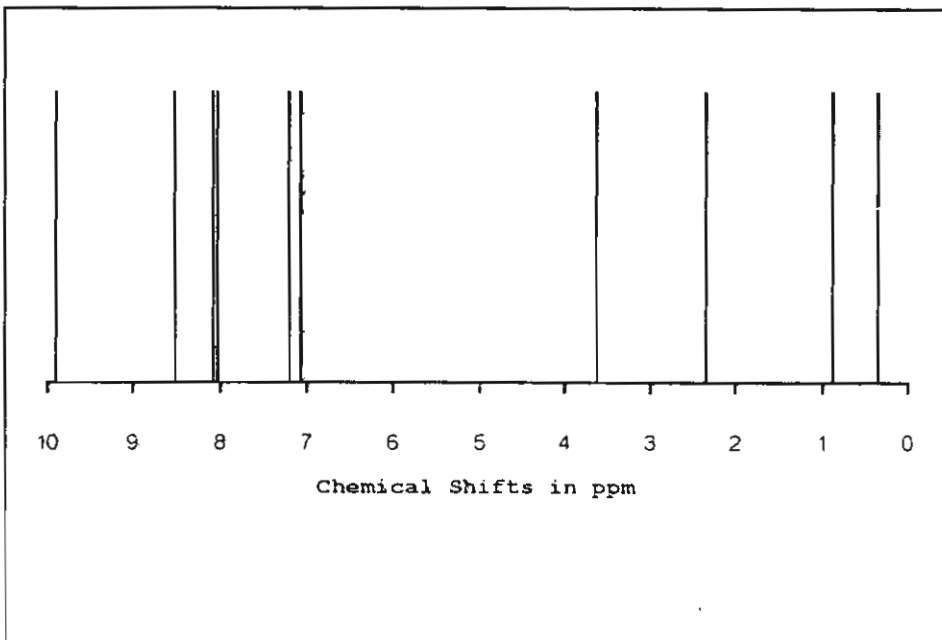
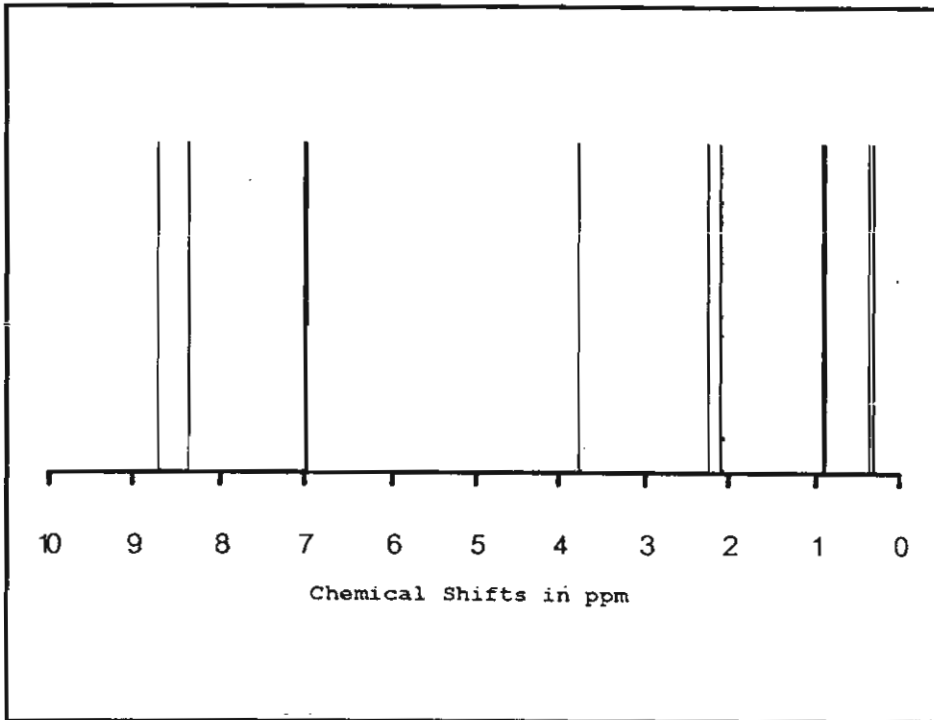
3.1.2 การคำนวณค่า chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$

โครงสร้างที่เสถียรที่สุดที่ได้จากวิธีแอบ อินิซิโอ (HF/6-31G) ได้นำไปคำนวณค่า chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ โดยวิธีเดนซิตีฟังก์ชันแนลที่เบซิสเซ็ท 6-31++G(2d,p) (B3LYP/6-31++G(2d,p) ค่า chemical shift จากการคำนวณแสดงได้ดังภาพที่ 3.4 (a) ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าการแบ่งสนามเป็นสองส่วนกล่าวคือเป็น high field และ low field ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลอง (ภาพที่ 3.4 (b)) [30] เมื่อพิจารณาจากค่า chemical shift ณ ตำแหน่งที่เห็นได้ชัดเจน เช่น C16 ($\delta=2.34$), C17 ($\delta=3.68$), C18 ($\delta=0.35$) และ C19 ($\delta=0.88$) ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบดังตารางที่ 3.3 พบว่าค่า chemical shift ที่ได้จากการคำนวณส่วนใหญ่จะเลื่อนไปทางด้านที่มีกำลังสนามแม่เหล็กสูงกว่า (high field) ซึ่งความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและการคำนวณมีค่าอยู่ในช่วงมาณ 0.01-0.2 ppm ดังนั้นผลจากการคำนวณ chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตร้าสามารถยืนยันได้ว่าคอนฟอร์เมชัน ที่มีค่ามุม α มีค่าเป็น 208.5 องศา ซึ่งได้จากการคำนวณโดยระเบียบวิธี HF/3-21G และนำไปคำนวณ full optimization โดยวิธี HF/6-31G นั้น สามารถให้โครงสร้างที่ดีที่สุดและเหมาะสมที่สุด

ตารางที่ 3.3 แสดงค่า chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตร้าที่ได้จากการคำนวณเปรียบเทียบกับค่าทดลอง

ตำแหน่งของอะตอม	chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ จากการคำนวณ (ppm)	chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ จากการทดลอง (ppm)
C16	2.24	2.34
C17	3.78	3.62
C18	0.35	0.35
C19	0.87	0.88

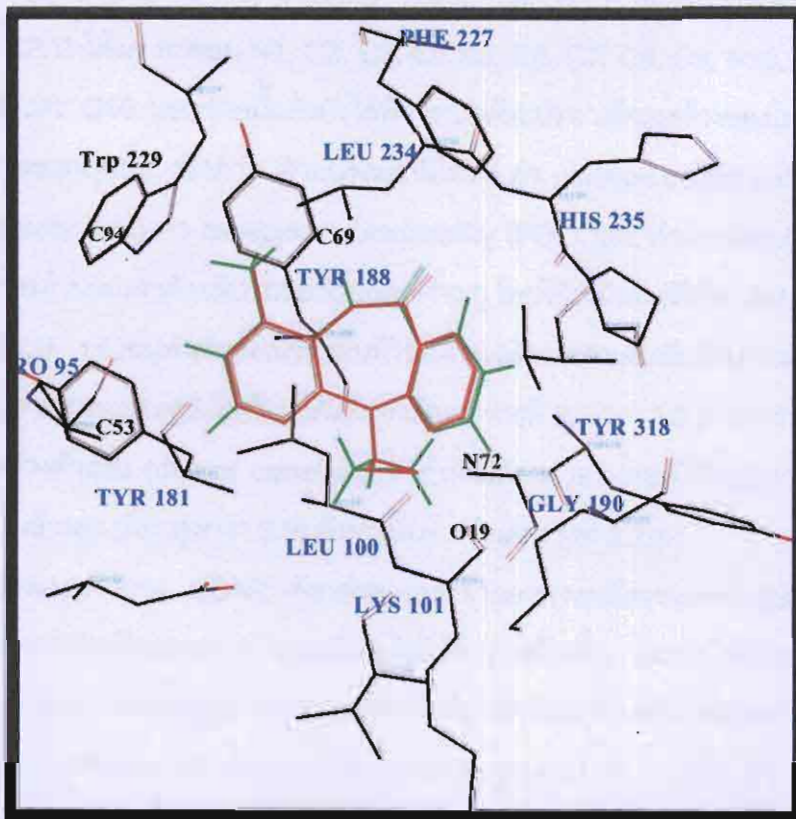
เมื่อนำโครงสร้างที่ได้จากการปรับโครงสร้างคอนฟอร์เมชันโดยระเบียบวิธี HF/6-31G มาเทียบกับโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างตัวบ่งชี้คือเนวิราพินกับเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ที่ได้ศึกษาโดยวิธีผลึกเอกซเรย์ พบว่าโครงสร้างจากการคำนวณซ้อนทับกันเกือบสนิทกับ โครงสร้างของผลึกเอกซเรย์ (root mean squares เท่ากับ 0.047) ดังแสดงในภาพที่ 3.5 แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของเนวิราพินที่ได้จากการคำนวณโดยระเบียบวิธีแอบ อินิซิโอ ให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองโดยวิธีผลึกเอกซเรย์ และ $^1\text{H NMR}$ สเปกตร้าซึ่งอาจกล่าวได้ว่าโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณนั้นสามารถใช้เป็นตัวแทนของโมเลกุลซึ่งอยู่ในระบบจริงได้ เมื่อได้ทำการวัดความยาวของ



ภาพที่ 3.4 แสดงค่า $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของเนวราฟีนที่ได้จากการคำนวณโดยระเบียบวิธี เดนซิติฟังก์ชันแนล (B3LYP/6-311++G(2d,p)) (ภาพบน) และเปรียบเทียบกับค่าจากการทดลอง (ภาพล่าง) [30]

ระยะทางระหว่างอะตอมภายในโครงสร้างของเนวิราพินกับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณ 10 Å รอบโมเลกุลหรือ binding site นั้นพบว่ามีการดอะมิโนต่าง ๆ ต่อไปนี้ คือ Lys101, Tyr181, Tyr188, Gly190 และ Trp229 ซึ่งน่าจะเป็นส่วนที่เกิดอันตรกิริยากับตัวยับยั้ง

จะเห็นได้ว่าผลการศึกษาคอนฟอร์เมชันของโมเลกุลเนวิราพินจากการคำนวณทั้งสองระเบียบวิธีคือเคมีเอ็มพีรีคัลและแอบ อินิทิโอให้ผลตรงกันคือมี 1 local minimum โดยมีมุมไดฮีดรอล (α) เท่ากับ 208.5 จากการนำโครงสร้างที่ปรับคอนฟอร์เมชันโดยวิธี HF/3-21G และนำไปทำการคำนวณ full optimization โดย HF/6-31G นั้น พบว่าให้ค่าพารามิเตอร์ที่ให้ผลใกล้เคียงกับผลจากการทดลองโดยวิธีผลึกเอกซ์เรย์ นอกจากนี้แล้ว โครงสร้างคอนฟอร์เมชันดังกล่าวยังสามารถให้ผลการทำนายค่า chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ ที่ตรงกับค่าที่ได้จากการทดลองด้วย



ภาพที่ 3.5 โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลเนวิราพินที่ได้จากการคำนวณ (สีเขียว) วางทับกับโครงสร้างเชิงซ้อนของเนวิราพิน (สีแดง) กับเอนไซม์ที่ได้โดยวิธีผลึกเอกซ์เรย์ [31] และแสดงกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 Å หรือ binding site

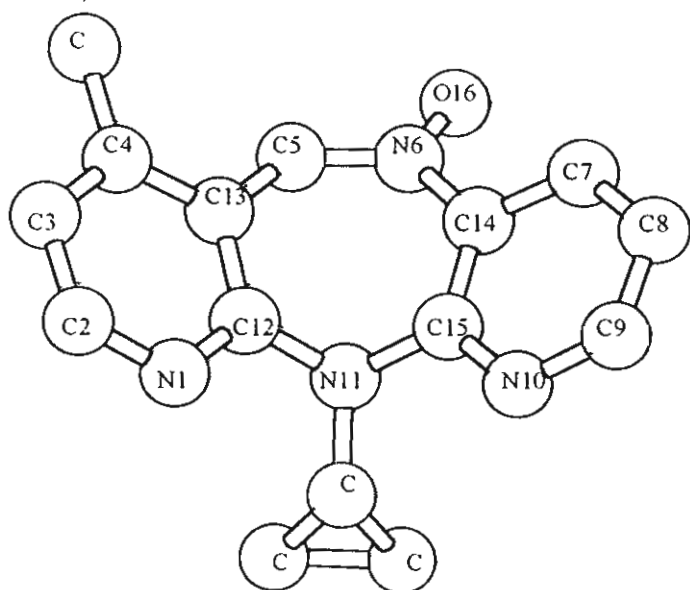
3.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 โดยวิธี QSAR

การวิจัยในโครงการนี้ได้ศึกษาการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง กับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 แบบดั้งเดิมหรือ QSAR ซึ่งเป็นการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางโครงสร้างกับกัมมันตภาพทางชีวภาพในแบบของแบบจำลองเชิงเส้น ทั้งนี้ในการศึกษาในโครงการนี้จะศึกษากับตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 สองกลุ่มคือ อนุพันธ์ของเนวิราพีนและอนุพันธ์ของทีโบ ซึ่งผลการศึกษาจะได้แสดงไว้ในหัวข้อสำคัญดังต่อไปนี้

3.2.1 การศึกษา QSAR ของอนุพันธ์ของเนวิราพีน

ในการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบนั้น การกำหนดตัวอธิบาย (descriptor) ในสมการเชิงเส้นพหุคูณได้จากตัวแปรทางโครงสร้างอิเล็กทรอนิกส์คือประจุสุทธิ (atomic net charge) ของอะตอมต่าง ๆ ที่อยู่ในโครงสร้างหลักของโมเลกุล (ภาพที่ 3.2.1) ได้แก่ อะตอม N1, C2, C3, C4 N5, C6, C7, C8, C9, N10, N11, C12, C13, C14, C15 และ O16 นอกจากนี้แล้วยังได้พิจารณาตัวแปรทางโครงสร้างของโมเลกุล ซึ่งมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวแปรเหล่านี้ได้แก่ ค่า partition coefficient ($\log P$) ค่า molecular refractivity (MR) ค่า molecular polarizability (POL) และ ค่า molecular surface area (MSA) ผลการคำนวณค่าตัวอธิบายของโมเลกุลต่าง ๆ โดยวิธีแฮมิลตัน (AM1) และแบบอินิชิโอ (HF/3-21G) ของอนุพันธ์ของเนวิราพีนที่ใช้ในการสร้างความสัมพันธ์กับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2.1 – 3.2.2 จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (mutual correlation) จะเห็นได้ว่าตัวอธิบายที่ใช้กันมีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรค่อนข้างสูง (มีค่าสูงกว่า 0.5) ดังจะเห็นจากในตารางที่ 3.2.3

ในการสร้างแบบจำลอง QSAR ดังกล่าว แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในรูปของสมการเชิงเส้นพหุคูณที่ได้จากตัวอธิบายทุก ๆ แบบที่เป็นไปได้จึงถูกสร้างขึ้น และทำให้ได้สมการแสดงความสัมพันธ์จำนวนมาก ดังนั้นคุณภาพของสมการจึงต้องพิจารณาจากตัวกำหนดทางสถิติ ได้แก่ ค่า correlation coefficient (r), ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s) ค่า F-value (F) เป็นต้น ดังนั้นสมการที่ดีที่สุดที่ประกอบด้วยหนึ่งตัวอธิบาย สองตัวอธิบาย สามตัวอธิบาย และอื่น ๆ จะถูกนำมาพิจารณาในกระบวนการสร้างแบบจำลอง QSAR ในที่นี้แบบจำลอง QSAR ที่ได้จะแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ตามชนิดของกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบที่มีอยู่สองกลุ่มคือ wild type และ mutant type และตามระเบียบวิธีการคำนวณค่าสมบัติทางอิเล็กทรอนิกส์และสมบัติของโมเลกุลที่มีสองระเบียบวิธีคือ แฮมิลตัน (AM1) และ วิธีแบบ อินิชิโอ (HF/3-21G)



ภาพที่ 3.2.1 โครงสร้างของเนวิราพีนและแสดงตำแหน่งของตัวแปรประจุที่ใช้เป็นตัวอธิบายในการสร้างแบบจำลอง QSAR

แบบจำลอง QSAR ที่ดีที่สุดที่ประกอบด้วยตัวอธิบายต่าง ๆ แสดงได้ดังในสมการที่ (3.1) – สมการที่ (3.6)

1. แบบจำลอง QSAR ที่สร้างความสัมพันธ์ระหว่างกัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์แบบ wild type (WT RT) และค่าการคำนวณตัวอธิบายที่ได้จากประจุสุทธิของอิเล็กตรอนและสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุล โดยคำนวณจากโครงสร้างของโมเลกุลตัวยับยั้งของเนวิราพีนโดยวิธี AM1

สมการที่มีหนึ่งตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 1.780 (\pm 1.228) N10 + 7.353 (\pm 0.295)$$

$$n = 53, r = 0.374, s = 0.535, F = 8.460$$

(3.1)

ตารางที่ 3.2.1 แสดงค่าการคำนวณตัวอธิบายโมเดลที่ได้จากวิธีคำนวณแบบเซมิเอมพีริคัล (AM1) ที่ใช้ในการศึกษา.

Cpds	n1	c2	c3	c4	n5	c6	c7	c8	c9	n10	n11	c12	c13	c14	c15	c16	MISA	MY	LogP	MIR
1	-0.187	-0.108	-0.229	-0.080	-0.454	0.441	-0.092	-0.275	-0.069	-0.210	-0.222	0.105	0.054	-0.186	0.168	-0.383	248.91	195.09	1.819	72.84
2	-0.194	-0.108	-0.229	-0.080	-0.454	0.442	-0.092	-0.275	-0.070	-0.214	-0.249	0.100	0.056	-0.186	0.164	-0.382	248.91	195.09	1.819	72.84
3	-0.194	-0.108	-0.236	-0.177	-0.385	0.444	-0.092	-0.275	-0.070	-0.215	-0.245	0.101	0.055	-0.185	0.161	-0.379	242.67	195.58	1.598	72.70
4	-0.197	-0.001	-0.225	-0.076	-0.452	0.442	-0.093	-0.275	-0.070	-0.215	-0.249	0.110	0.049	-0.185	0.163	-0.384	265.65	207.47	2.468	77.74
5	-0.194	0.002	-0.223	-0.077	-0.452	0.442	-0.093	-0.275	-0.070	-0.215	-0.248	0.108	0.051	-0.185	0.163	-0.384	286.73	220.84	2.937	82.27
6	-0.195	0.009	-0.220	-0.078	-0.452	0.442	-0.093	-0.275	-0.070	-0.215	-0.248	0.106	0.051	-0.185	0.164	-0.384	303.21	234.85	3.339	86.74
7	-0.194	0.018	-0.222	-0.078	-0.452	-0.211	-0.093	-0.275	-0.070	-0.215	-0.248	0.106	0.051	-0.185	0.164	-0.384	320.16	248.30	3.845	91.14
8	-0.178	-0.001	-0.208	-0.185	-0.385	0.445	-0.092	-0.273	-0.069	-0.213	-0.244	0.107	0.070	-0.186	0.159	-0.373	318.59	259.02	2.135	94.10
9	-0.185	0.011	-0.211	-0.183	-0.384	0.445	-0.092	-0.272	-0.069	-0.213	-0.244	0.108	0.067	-0.186	0.158	-0.374	309.34	246.35	1.239	91.15
10	-0.218	0.178	-0.249	-0.056	-0.452	0.442	-0.093	-0.272	-0.069	-0.211	-0.248	0.133	0.041	-0.184	0.160	-0.378	251.00	202.10	2.415	74.07
11	-0.176	0.010	-0.208	-0.074	-0.454	0.442	-0.092	-0.273	-0.068	-0.207	-0.220	0.121	0.056	-0.186	0.165	-0.378	279.33	218.13	2.761	81.17
12	-0.182	0.010	-0.208	-0.074	-0.454	0.443	-0.092	-0.273	-0.069	-0.211	-0.247	0.117	0.058	-0.186	0.161	-0.378	264.16	210.70	2.707	78.71
13	-0.183	0.010	-0.214	-0.173	-0.384	0.445	-0.092	-0.273	-0.069	-0.212	-0.243	0.118	0.056	-0.186	0.158	-0.375	262.99	211.17	2.487	78.56
14	-0.176	0.009	-0.215	-0.215	-0.384	0.444	-0.092	-0.273	-0.069	-0.207	-0.216	0.122	0.054	-0.186	0.162	-0.375	272.78	218.72	2.540	81.03
15	-0.255	0.147	-0.279	-0.137	-0.378	0.442	-0.094	-0.275	-0.072	-0.216	-0.246	0.150	0.004	-0.180	0.159	-0.385	260.34	205.07	1.513	77.71
16	-0.249	0.155	-0.279	-0.138	-0.378	0.442	-0.093	-0.274	-0.072	-0.216	-0.246	0.147	0.005	-0.180	0.159	-0.386	281.75	218.78	1.727	81.43
17	-0.249	0.153	-0.280	-0.138	-0.377	0.442	-0.094	-0.275	-0.073	-0.217	-0.246	0.147	0.005	-0.180	0.159	-0.386	295.92	232.64	2.070	86.17
18	-0.254	0.152	-0.260	-0.045	-0.447	0.440	-0.093	-0.274	-0.070	-0.217	-0.249	0.146	0.260	-0.179	0.161	-0.390	323.51	252.29	1.557	92.73
19	-0.252	0.166	-0.270	-0.143	-0.377	0.442	-0.094	-0.275	-0.072	-0.217	-0.246	0.146	0.007	-0.180	0.159	-0.386	297.93	232.34	2.089	86.72
20	-0.243	0.145	-0.250	-0.054	-0.449	0.440	-0.093	-0.274	-0.071	-0.216	-0.248	0.135	0.023	-0.182	0.161	-0.386	310.47	252.00	1.866	93.16
21	-0.252	0.164	-0.271	-0.142	-0.377	0.442	-0.094	-0.275	-0.072	-0.217	-0.246	0.147	0.007	-0.180	0.159	-0.386	311.25	248.79	2.443	95.07
22	-0.242	0.162	-0.281	-0.143	-0.378	0.442	-0.094	-0.275	-0.072	-0.217	-0.246	0.147	0.008	-0.180	0.159	-0.386	332.64	263.44	2.810	98.86
23	-0.241	0.116	-0.229	-0.164	-0.381	0.443	-0.093	-0.274	-0.071	-0.216	-0.245	0.128	0.034	-0.183	0.158	-0.377	319.40	259.25	1.746	95.79
24	-0.227	0.181	-0.248	-0.153	-0.381	0.444	-0.093	-0.272	-0.070	-0.213	-0.244	0.141	0.033	-0.183	0.157	-0.377	333.79	269.54	2.409	102.11
25	-0.274	0.162	-0.242	-0.145	-0.380	0.443	-0.093	-0.273	-0.071	-0.215	-0.246	0.146	0.016	-0.181	0.157	-0.381	304.25	245.79	3.212	92.45
26	-0.263	0.169	-0.243	-0.147	-0.380	0.443	-0.093	-0.273	-0.072	-0.216	-0.245	0.142	0.015	-0.181	0.158	-0.382	254.24	202.07	2.012	74.71
27	-0.256	0.168	-0.244	-0.146	-0.379	0.442	-0.093	-0.273	-0.071	-0.211	-0.219	0.147	0.013	-0.181	0.162	-0.383	273.43	216.86	2.044	79.48
28	-0.214	-0.149	-0.204	-0.068	-0.452	0.441	-0.092	-0.274	-0.070	-0.215	-0.248	0.120	0.048	-0.183	0.162	-0.070	283.94	224.29	2.098	81.94
29	-0.187	0.070	-0.207	-0.180	-0.383	0.444	-0.092	-0.274	-0.070	-0.215	-0.244	0.109	0.057	-0.185	0.160	-0.378	285.21	225.65	2.608	86.06

Figure 3.2.1 (f)

c_{pk}	$n1$	$c2$	$c3$	$c4$	$n5$	$c6$	$c7$	$c8$	$c9$	$n10$	$n11$	$c12$	$c13$	$c14$	$c15$	$c16$	MISA	MV	LogP	MR
30	-0.204	0.086	-0.221	-0.174	-0.382	0.444	-0.092	-0.274	-0.070	-0.216	-0.245	0.114	0.048	-0.184	0.160	-0.380	297.73	243.98	2.630	89.85
31	-0.188	0.088	-0.242	-0.168	-0.382	0.444	-0.093	-0.275	-0.070	-0.213	-0.245	0.118	0.044	-0.185	0.160	-0.384	307.34	246.67	2.866	89.98
32	-0.211	0.102	-0.229	-0.170	-0.380	0.443	-0.093	-0.276	-0.071	-0.217	-0.245	0.115	0.037	-0.182	0.161	-0.385	302.92	245.28	2.452	92.10
33	-0.205	0.102	-0.230	-0.170	-0.380	0.442	-0.092	-0.237	-0.071	-0.212	-0.219	0.119	0.034	-0.183	0.165	-0.385	305.83	245.46	2.688	92.22
34	-0.190	0.080	-0.221	-0.175	-0.383	0.444	-0.092	-0.274	-0.070	-0.215	-0.245	0.112	0.054	-0.245	0.160	-0.378	317.67	252.92	2.742	94.68
35	-0.188	0.091	-0.237	-0.169	-0.383	0.444	-0.093	-0.273	-0.070	-0.213	-0.245	0.120	0.049	-0.185	0.159	-0.377	303.99	253.04	2.973	96.30
36	-0.192	0.084	-0.206	-0.183	-0.382	0.444	-0.092	-0.275	-0.071	-0.216	-0.244	0.107	0.053	-0.184	0.160	-0.380	305.13	243.71	0.786	91.59
37	-0.202	0.100	-0.226	-0.170	-0.381	0.442	-0.092	-0.274	-0.071	-0.212	-0.219	0.120	0.041	-0.183	0.164	-0.381	304.34	242.06	2.408	90.78
38	-0.188	0.045	-0.222	-0.178	-0.383	0.444	-0.092	-0.275	-0.071	-0.215	-0.244	0.108	0.054	-0.185	0.160	0.135	312.81	249.47	2.063	93.61
39	-0.185	0.041	-0.218	-0.179	-0.383	0.444	-0.092	-0.274	-0.070	-0.214	-0.244	0.106	0.056	-0.056	0.160	-0.379	321.54	261.07	3.681	97.46
40	-0.186	0.042	-0.220	-0.179	-0.383	0.444	-0.092	-0.275	-0.070	-0.214	-0.244	0.106	0.054	-0.185	0.160	-0.379	346.28	282.71	3.429	103.93
41	-0.191	0.053	-0.224	-0.177	-0.383	0.444	-0.383	-0.275	-0.070	-0.214	-0.244	0.108	0.051	-0.185	0.160	0.160	334.67	270.69	2.898	102.16
42	-0.189	0.043	-0.189	-0.188	-0.383	0.444	-0.092	-0.275	-0.071	-0.216	-0.244	0.102	0.062	-0.185	0.159	-0.378	333.83	268.92	3.397	99.16
43	-0.183	0.047	-0.220	-0.178	-0.384	0.443	-0.092	-0.274	-0.070	-0.210	-0.218	0.114	0.055	-0.185	0.163	-0.377	314.00	254.75	2.769	94.93
44	-0.193	0.059	-0.224	-0.176	-0.383	0.444	-0.093	-0.274	-0.070	-0.213	-0.244	0.111	0.054	-0.185	0.160	-0.378	322.56	261.19	2.888	97.74
45	-0.193	0.057	-0.223	-0.176	-0.384	0.444	-0.093	-0.274	-0.070	-0.213	-0.244	0.111	0.055	-0.185	0.159	-0.377	342.07	274.64	2.815	102.08
46	-0.195	0.067	-0.228	-0.175	-0.383	0.444	-0.093	-0.275	-0.070	-0.213	-0.244	0.112	0.049	-0.185	0.160	-0.380	321.75	260.79	2.784	97.31
47	-0.177	0.031	-0.215	-0.181	-0.384	0.444	-0.092	-0.273	-0.069	-0.208	-0.217	0.112	0.060	-0.186	0.163	-0.376	326.10	264.17	2.285	100.32
48	-0.183	-0.183	-0.227	-0.095	-0.439	0.444	-0.090	-0.275	-0.069	-0.211	-0.221	0.104	0.082	-0.183	0.167	-0.386	320.96	261.84	2.888	97.74
49	-0.178	-0.117	-0.222	-0.140	-0.439	0.441	-0.090	-0.274	-0.070	-0.211	-0.220	0.099	0.094	-0.186	0.166	-0.375	345.78	269.79	2.612	103.29
50	-0.178	-0.120	-0.210	-0.133	-0.441	0.439	-0.093	-0.277	-0.069	-0.210	-0.220	0.091	0.090	-0.189	0.168	-0.375	353.46	276.56	2.146	106.04
51	-0.182	-0.114	-0.114	-0.086	0.072	0.442	-0.091	-0.275	-0.070	-0.209	-0.220	0.099	0.072	-0.187	0.165	-0.375	384.41	311.18	2.702	114.50
52	-0.192	0.151	-0.290	-0.055	-0.428	0.439	-0.092	-0.275	-0.070	-0.214	-0.247	0.133	0.051	-0.184	0.162	-0.383	333.08	265.64	3.201	101.70
53	-0.164	-0.164	-0.171	-0.208	-0.454	0.442	-0.091	-0.272	-0.070	-0.211	-0.246	-0.246	0.139	-0.189	0.158	-0.360	325.90	260.80	3.902	101.58

ตารางที่ 3.2.2 แสดงค่าการคำนวณตัวอธิบายได้จากประจุสุทธิของอิเล็กตรอนและสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุล โดยคำนวณจากวิธี HF/3-21G

Cpds	n1	c2	c3	c4	n5	c6	c7	c8	c9	n10	n11	c12	c13	c14	c15	c16	MSA	MY	LogP	MIR
1	-0.755	0.146	-0.342	0.018	-1.086	0.966	-0.088	-0.365	0.169	-0.756	-0.962	0.782	0.289	-0.337	0.014	-0.629	253.45	200.09	1.872	75.31
2	-0.766	0.150	-0.345	0.020	-1.083	0.967	-0.084	-0.369	0.175	-0.769	-0.965	0.784	0.283	-0.340	0.823	-0.629	238.74	193.37	1.819	72.84
3	-0.760	0.144	-0.351	-0.147	-1.044	0.992	-0.084	-0.370	0.174	-0.772	-0.959	0.767	0.274	-0.337	0.821	-0.635	243.57	193.27	1.598	72.70
4	-0.808	0.345	-0.309	0.026	-1.083	0.967	-0.084	-0.370	0.175	-0.770	-0.970	0.791	0.273	-0.340	0.822	-0.631	257.40	205.94	2.468	77.74
5	-0.811	0.379	-0.306	0.026	-1.082	0.967	0.203	0.194	0.201	-0.770	-0.969	0.789	0.273	-0.339	0.821	0.227	278.53	218.64	2.937	82.27
6	-0.817	0.413	-0.316	0.026	-1.084	0.967	-0.084	-0.370	0.175	-0.770	-0.970	0.795	0.272	-0.339	0.822	-0.631	294.21	231.84	3.339	86.74
7	-0.827	0.476	-0.299	0.023	-1.085	0.967	-0.084	-0.370	0.175	-0.770	-0.969	0.792	0.275	-0.340	0.823	-0.631	306.54	246.24	3.845	91.14
8	-0.815	0.318	-0.273	-0.148	-1.051	0.993	-0.084	-0.369	0.174	-0.771	-0.964	0.773	0.290	-0.337	0.819	-0.632	321.74	256.40	2.135	94.10
9	-0.822	0.329	-0.277	-0.146	-1.050	0.993	-0.084	-0.368	0.174	-0.771	-0.962	0.774	0.287	-0.337	0.818	-0.632	309.84	244.84	1.239	91.15
10	-0.825	0.819	-0.384	0.030	-1.082	0.967	-0.084	-0.368	0.176	-0.769	-0.975	0.802	0.270	-0.339	0.823	-0.626	246.27	200.35	2.415	74.07
11	-0.740	0.118	-0.269	0.024	-1.090	0.967	-0.087	-0.364	0.170	-0.754	-0.972	0.791	0.296	-0.337	0.813	-0.623	271.63	216.36	2.761	81.17
12	-0.752	0.123	-0.272	0.026	-1.087	0.968	-0.083	-0.368	0.176	-0.768	-0.976	0.795	0.289	-0.340	0.824	-0.624	257.00	209.61	2.707	78.71
13	-0.746	0.121	-0.282	-0.139	-1.047	0.993	-0.083	-0.368	0.176	-0.770	-0.969	0.779	0.278	-0.337	0.821	-0.630	257.47	209.67	2.487	78.56
14	-0.734	0.116	-0.279	-0.141	-1.050	0.993	-0.087	-0.364	0.169	-0.757	-0.964	0.775	0.286	-0.335	0.811	-0.630	267.63	216.44	2.540	81.03
15	-0.871	0.807	-0.349	-0.118	-1.038	0.992	-0.086	-0.370	0.174	-0.773	-0.968	0.798	0.225	-0.332	0.818	-0.642	255.01	202.48	1.513	77.71
16	-0.875	0.849	-0.355	-0.120	-1.038	0.992	-0.086	-0.371	0.174	-0.774	-0.968	0.796	0.224	-0.331	0.819	-0.642	274.52	216.10	1.727	81.43
17	-0.879	0.854	-0.357	-0.119	-1.038	0.992	-0.086	-0.370	0.173	-0.773	-0.966	0.795	0.223	-0.331	0.817	-0.642	288.33	229.45	2.070	86.17
18	-0.881	0.841	-0.347	0.044	-1.075	0.965	-0.086	-0.369	0.172	-0.770	-0.964	0.820	-0.145	-0.335	0.808	-0.637	326.58	249.10	1.557	92.73
19	-0.884	0.883	-0.375	-0.117	-1.040	0.992	-0.086	-0.370	0.173	-0.773	-0.963	0.804	0.223	-0.331	0.816	-0.642	286.92	228.48	2.088	86.72
20	-0.871	0.825	-0.379	0.037	-1.078	0.965	-0.085	-0.369	0.173	-0.771	-0.967	0.803	0.246	-0.336	0.819	-0.634	290.04	228.21	2.088	86.72
21	-0.881	0.886	-0.365	-0.120	-1.039	0.992	-0.086	-0.370	0.173	-0.773	-0.966	0.799	0.225	-0.331	0.817	-0.642	304.98	245.59	2.443	95.07
22	-0.888	0.878	-0.371	-0.116	-1.041	0.992	-0.086	-0.370	0.173	-0.773	-0.963	0.808	0.222	-0.331	0.816	-0.642	325.09	259.92	2.810	98.86
23	-0.888	0.875	-0.370	-0.116	-1.041	0.992	-0.086	-0.369	0.173	-0.773	-0.963	0.808	0.225	-0.331	0.815	-0.641	313.69	254.30	1.746	95.79
24	-0.913	-0.168	-0.363	0.044	-1.076	0.964	-0.086	-0.368	0.173	-0.770	-0.967	0.822	0.234	-0.335	0.815	-0.633	320.76	268.38	2.409	102.11
25	-0.862	0.867	-0.337	-0.129	-1.045	0.993	-0.085	-0.368	0.174	-0.771	-0.967	0.803	0.254	-0.334	0.817	-0.635	299.35	242.25	3.232	92.45
26	-0.865	0.801	-0.351	-0.127	-1.041	0.993	-0.085	-0.369	0.174	-0.773	-0.967	0.792	0.242	-0.333	0.818	-0.637	247.60	199.38	2.012	74.71
27	-0.864	0.849	-0.355	-0.130	-1.041	0.993	-0.085	-0.369	0.174	-0.773	-0.967	0.785	0.242	-0.333	0.819	-0.638	264.81	213.89	2.044	79.48
28	-0.855	0.845	-0.353	-0.132	-1.044	0.992	-0.089	-0.365	0.168	-0.760	-0.963	0.784	0.248	-0.330	0.809	-0.637	277.65	220.56	2.098	81.94
29	-0.787	0.023	-0.298	0.029	-1.082	0.967	-0.084	-0.368	0.174	-0.770	-0.966	0.792	0.272	-0.338	0.820	-0.628	277.57	226.32	2.608	86.06

Table 3.2.2 (cont)

Cpds	m1	c2	c3	c4	m5	c6	c7	c8	c9	m10	m11	c12	c13	c14	c15	c16	MISA	MV	LogP	MIR
30	-0.827	0.294	-0.256	-0.149	-1.047	0.993	-0.084	-0.369	0.174	-0.772	-0.966	0.770	0.283	-0.336	0.818	-0.635	294.16	240.67	2.630	89.85
31	-0.843	0.372	-0.278	-0.142	-1.047	0.993	-0.084	-0.369	0.174	-0.772	-0.965	0.782	0.274	-0.335	0.817	-0.635	297.92	241.75	2.866	89.98
32	-0.838	0.364	-0.280	-0.139	-1.046	0.993	-0.084	-0.370	0.175	-0.771	-0.968	0.783	0.271	-0.336	0.819	-0.636	302.55	242.30	2.452	92.10
33	-0.851	0.377	-0.282	-0.141	-1.045	0.993	-0.085	-0.370	0.173	-0.773	-0.965	0.779	0.266	-0.334	0.819	-0.639	299.57	242.19	2.688	92.22
34	-0.842	0.374	-0.279	-0.142	-1.048	0.992	-0.089	0.258	0.168	-0.761	-0.963	0.778	0.270	-0.332	0.809	-0.638	308.37	248.95	2.742	94.68
35	-0.828	0.395	-0.298	-0.143	-1.048	0.993	-0.084	-0.369	0.173	-0.771	-0.963	0.781	0.279	-0.335	0.817	-0.634	301.40	251.63	2.973	96.30
36	-0.834	0.366	-0.277	-0.140	-1.047	0.993	-0.084	-0.369	0.175	-0.771	-0.968	0.785	0.017	-0.336	0.818	-0.634	297.62	239.63	1.616	90.26
37	-0.836	0.338	-0.253	-0.150	-1.048	0.993	-0.084	-0.370	0.174	-0.773	-0.965	0.766	0.281	-0.336	0.820	-0.636	297.14	239.66	2.408	90.78
38	-0.841	0.369	-0.278	-0.141	-1.048	0.993	-0.088	-0.365	0.168	-0.760	-0.963	0.781	0.275	-0.332	0.808	-0.636	302.05	245.64	2.062	93.61
39	-0.840	0.407	-0.289	-0.142	-1.049	0.993	-0.084	-0.369	0.174	-0.772	-0.966	0.786	0.274	-0.336	0.819	-0.635	316.38	256.95	3.681	97.46
40	-0.838	0.405	-0.287	-0.142	-1.049	0.993	-0.084	-0.369	0.174	-0.772	-0.966	0.786	0.276	-0.336	0.819	-0.635	339.64	278.48	3.429	103.93
41	-0.832	0.400	-0.290	-0.143	-1.048	0.993	-0.084	-0.370	0.174	-0.772	-0.967	0.785	0.274	-0.336	0.820	-0.636	330.94	266.45	2.898	102.16
42	-0.844	0.412	-0.289	-0.141	-1.048	0.993	-0.084	-0.369	0.174	-0.772	-0.966	0.787	0.273	-0.335	0.819	-0.636	340.00	278.33	3.429	103.93
43	-0.853	0.421	-0.292	-0.139	-1.047	0.993	0.174	-0.370	0.174	-0.773	-0.965	0.788	0.266	-0.335	0.819	-0.638	309.86	252.26	2.769	94.93
44	-0.844	0.350	-0.245	-0.153	-1.049	0.993	-0.084	-0.369	0.173	-0.772	-0.961	0.769	0.285	-0.336	0.818	-0.635	309.93	257.76	2.888	97.74
45	-0.838	0.399	-0.280	-0.142	-1.052	0.993	-0.088	-0.365	0.168	-0.759	-0.963	0.790	0.283	-0.333	0.809	-0.633	335.04	272.38	2.815	102.08
46	-0.849	0.408	-0.289	-0.139	-1.048	0.993	-0.085	-0.369	0.174	-0.771	-0.966	0.791	0.272	-0.336	0.818	-0.635	313.80	258.17	2.784	97.31
47	-0.849	0.409	-0.288	-0.139	-1.048	0.993	-0.084	-0.369	0.174	-0.771	-0.966	0.791	0.274	-0.336	0.817	-0.634	320.73	261.17	2.285	100.32
48	-0.852	0.411	-0.292	-0.138	-1.047	0.993	-0.085	-0.370	0.174	-0.772	-0.966	0.791	0.267	-0.335	0.819	-0.637	307.51	258.95	2.888	97.74
49	-0.749	0.139	-0.336	-0.003	-1.108	0.972	-0.087	-0.365	0.167	-0.759	-0.963	0.769	0.327	-0.339	0.817	-0.632	329.57	260.73	2.612	103.29
50	-0.749	0.139	-0.337	-0.059	-1.120	0.972	-0.088	-0.365	0.166	-0.759	-0.965	0.773	0.340	-0.339	0.817	-0.628	346.90	268.33	2.146	106.04
51	-0.747	0.140	-0.330	-0.042	-1.131	0.970	-0.090	-0.366	0.167	-0.759	-0.969	0.770	0.340	-0.343	0.820	-0.624	381.30	305.11	2.702	114.50
52	-0.754	0.145	-0.346	0.067	-1.102	0.998	-0.082	-0.368	0.176	-0.761	-0.974	0.780	0.295	-0.340	0.834	-0.683	316.47	265.35	3.201	101.70
53	-0.827	0.814	-0.385	0.007	-1.125	0.986	-0.084	0.301	0.180	-0.774	-0.993	0.823	0.284	-0.342	0.835	-0.652	340.01	283.90	3.285	105.99

ตารางที่ 3.2.3 แสดงค่าความสัมพันธ์ทางสถิติแบบ (mutual correlation) ของตัวอธิบายที่ใช้ในการสร้างแบบจำลอง QSAR สำหรับอนุพันธ์ของเนวูราฟิน

	N1	C2	C3	C4	N5	C6	C7	C8	C9	N10	N11	C12	C13	C14	C15	C16	MR	MV	SA	LOGP	log (I/C)
N1	1.000	-0.689	0.710	-0.225	-0.003	-0.047	-0.052	-0.002	0.726	0.121	0.219	-0.460	0.628	0.014	0.414	-0.010	0.326	0.345	0.296	0.411	0.078
C2		1.000	-0.616	-0.086	0.017	0.033	-0.031	0.084	-0.513	0.026	-0.117	0.491	-0.512	0.032	-0.540	-0.033	-0.187	-0.224	-0.198	-0.264	0.236
C3			1.000	-0.100	0.421	-0.024	-0.002	-0.013	0.539	0.123	0.163	-0.489	0.520	-0.014	0.306	0.083	0.286	0.331	0.263	0.432	-0.008
C4				1.000	-0.190	-0.207	0.103	-0.086	0.140	-0.137	-0.144	0.227	-0.323	-0.073	0.452	-0.099	-0.359	-0.397	-0.300	-0.109	-0.325
N5					1.000	0.116	-0.018	0.025	-0.169	0.028	0.113	0.098	0.061	0.014	-0.065	0.005	0.218	0.144	0.160	0.082	0.079
C6						1.000	-0.019	0.020	-0.034	0.028	0.064	0.016	-0.020	0.019	-0.139	0.045	-0.004	-0.018	-0.068	-0.283	0.068
C7							1.000	0.023	-0.025	0.026	0.047	0.000	-0.016	0.018	0.053	-0.543	-0.180	-0.181	-0.175	-0.190	0.222
C8								1.000	-0.096	-0.021	0.093	0.017	-0.022	-0.009	0.193	-0.045	0.051	0.040	0.053	0.046	0.315
C9									1.000	0.064	0.171	-0.217	0.310	-0.024	0.422	-0.061	0.027	0.043	0.016	0.154	-0.063
N10										1.000	0.162	-0.018	0.063	-0.023	-0.074	-0.048	0.023	0.028	-0.002	0.045	0.182
N11											1.000	-0.011	0.129	-0.040	0.247	-0.089	0.242	0.189	0.212	0.092	0.064
C12												1.000	-0.445	0.022	-0.015	-0.005	-0.248	-0.478	-0.290	-0.389	0.074
C13													1.000	-0.018	0.174	0.048	0.182	0.223	0.139	0.359	0.015
C14														1.000	-0.054	-0.030	0.144	0.152	0.166	0.140	0.132
C15															1.000	-0.142	0.121	0.052	0.154	0.114	-0.055
C16																1.000	0.185	0.178	0.160	0.171	-0.247
MR																	1.000	0.959	0.982	0.426	0.168
MV																		1.000	0.967	0.480	0.133
SA																			1.000	0.433	0.123
LOGP																				1.000	0.075
log (I/C)																					1.000

สมการที่มีสองตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 2.946 (\pm 0.420) N10 + 3.063 (\pm 2.176) C6 + 6.224 (\pm 0.849)$$

$$n = 53, r = 0.506, s = 0.502, F=8.789 \quad (3.2)$$

2.. แบบจำลอง QSAR ที่สร้างความสัมพันธ์ระหว่างกัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์แบบ mutant type (Y181C RT) และค่าการคำนวณตัวอธิบายที่ได้จากประจุสุทธิของ อิเล็กตรอนและสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุล โดยคำนวณจากโครงสร้างของโมเลกุล ด้วยยับยั้งของเนวิราพินโดยวิธี AM1

สมการที่มีหนึ่งตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 2.019 (\pm 1.660) C8 + 6.742 (\pm 0.457)$$

$$n = 53, r = 0.320, s = 0.181, F=5.956 \quad (3.3)$$

สมการที่มีสองตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 1.732 (\pm 1.223) C8 - 2.295 (\pm 2.229) C4 + 6.347 (\pm 0.587)$$

$$n = 53, r = 0.415, s = 0.414, F=5.300 \quad (3.4)$$

สมการที่มีสามตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 3.348 (\pm 1.416) N10 + 2.649 (\pm 2.131) C6 + 3.163 (\pm 2.852) C4$$

$$+ 6.933 (\pm 1.038)$$

$$n = 53, r = 0.568, s = 0.483, F=7.970 \quad (3.5)$$

3. แบบจำลอง QSAR ที่สร้างความสัมพันธ์ระหว่างกัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์แบบ wild type (WT RT) และค่าการคำนวณตัวอธิบายที่ได้จากประจุสุทธิของ อิเล็กตรอนและสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุล โดยคำนวณจากโครงสร้างของโมเลกุล ด้วยยับยั้งของเนวิราพินโดยวิธี HF/3-21g

สมการที่มีหนึ่งตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = -16.440 (\pm 12.664) C6 + 23.173 (\pm 12.476)$$

$$n = 53, r = 0.400, s = 0.542, F=6.786 \quad (3.6)$$

4. แบบจำลอง QSAR ที่สร้างความสัมพันธ์ระหว่างกัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์แบบ mutant type (Y181C RT) และค่าการคำนวณตัวอธิบายที่ได้จากประจุสุทธิของ อิเล็กตรอนและสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุล โดยคำนวณจากโครงสร้างของโมเลกุล ด้วยยับยั้งของเนวิราพินโดยวิธี HF/3-21g

สมการที่มีหนึ่งตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = -2.050 (\pm 1.426) C_4 + 6.039 (\pm 0.161)$$

$$n = 53, r = 0.371, s = 0.419, F = 8.332 \quad (3.7)$$

จะเห็นว่าแบบจำลอง QSAR ของสารอนุพันธ์ของเนวิราพีนไม่สามารถสร้างสมการที่มีความน่าเชื่อถือได้มากนัก มีเพียงสมการที่ (3.2) และ (3.5) เท่านั้นที่มีค่า multiple correlation (r) สูงกว่า 0.5 แม้ว่าจะได้เพิ่มตัวอธิบายที่เหลือเข้าไปในสมการที่ (3.5) ก็ตาม แต่ไม่สามารถเพิ่มความสามารถในการสร้างสมการที่ดีขึ้นได้ เหตุผลสำคัญคือ ตัวอธิบายโครงสร้างของสารกลุ่มเนวิราพีนมี mutaul correlation สูงมาก แนวทางต่อไปคือการสร้างแบบจำลอง QSAR ของอนุพันธ์ของเนวิราพีนคือ การพิจารณาตัวอธิบายชนิดอื่น ๆ เช่น topological indices เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ตัวอธิบายชนิดที่เป็นโครงสร้างอิเล็กทรอนิกส์และสมบัติของโมเลกุลที่ใช้ในการวิจัยนี้สามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์ของสารอนุพันธ์ของทีโอบีได้เป็นอย่างดี ดังจะได้เสนอในหัวข้อต่อไป

3.2.2 การศึกษา QSAR ของอนุพันธ์ของทีโอบี

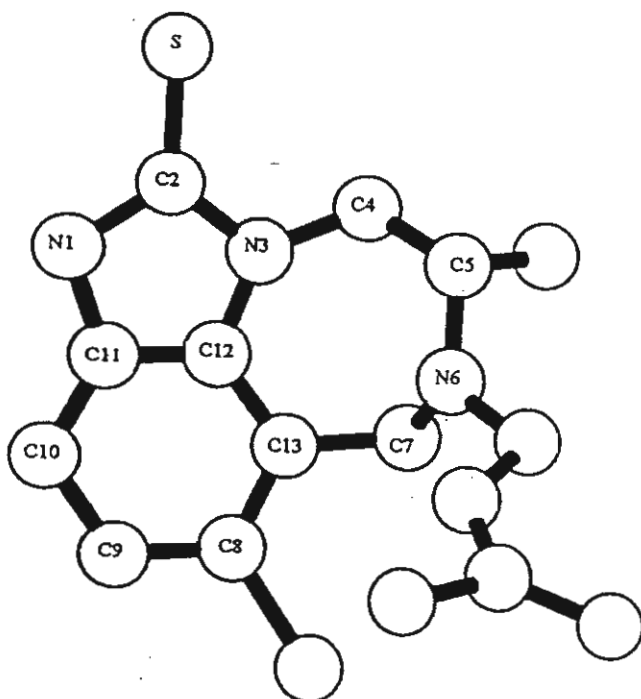
ในการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบของอนุพันธ์ของทีโอบีนั้นได้ใช้แนวทางเดียวกับการศึกษากับอนุพันธ์ของเนวิราพีน ทั้งนี้ตัวอธิบายโดยประจุสุทธิของอะตอม ของอะตอมต่าง ๆ ที่อยู่ในโครงสร้างหลักของโมเลกุล (ภาพที่ 3.2.2) ได้แก่ อะตอม N1, C2, N3, C4, C5, N6, C7, C8, C9, C10, C11, C12 และ C13 และโดยตัวแปรทางโครงสร้างของโมเลกุล ได้แก่ $\log P$, MR และ POL ผลการคำนวณค่าตัวอธิบายของโมเลกุลต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 3.2.4 และค่าความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปร ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2.5

จากนั้นได้สร้างแบบจำลอง QSAR ทุกแบบที่เป็นไปได้ ทั้งนี้สมการเชิงเส้นพหุคูณที่ประกอบด้วยตัวอธิบายจำนวนต่าง ๆ ที่ดีที่สุดสามารถสรุปได้ตามสมการ (3.8) – (3.17) ดังต่อไปนี้

สมการที่มีหนึ่งตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 22.423 (\pm 10.774) C_8 + 9.631 (\pm 1.885) \quad (3.8)$$

$$(n = 46, r = 0.534, s = 1.077, F = 17.951, Q^2 = 0.234, S_{\text{PRESS}} = 1.115)$$



ภาพที่ 3.2.2 โครงสร้างของโมเลกุลที่โบลแสดงตำแหน่งของตัวแปรประจุที่ใช้เป็นตัวอธิบายในการสร้างแบบจำลอง QSAR

สมการที่มีสองตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 19.698(\pm 9.288)C8 - 3.067(\pm 1.479)C2 + 9.890(\pm 1.1614) \quad (3.9)$$

$$(n = 46, r = 0.702, s = 0.918, F = 20.844, Q^2 = 0.435, S_{\text{PRESS}} = 0.958)$$

สมการที่มีสามตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 15.677(\pm 7.904)C8 - 3.521(\pm 1.242)C2 - 6.422(\pm 2.851)C4 + 8.666(\pm 1.443) \quad (3.10)$$

$$(n = 46, r = 0.812, s = 0.760, F = 27.13, Q^2 = 0.531, S_{\text{PRESS}} = 0.872)$$

ตารางที่ 3.2.4 แสดงค่าการคำนวณตัวอธิบายที่ได้จากประจุสุทธิของอิเล็กตรอนและสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุล โดยคำนวณวิธี AM1ที่ใช้ในการสร้างแบบจำลอง QSAR ของอนุพันธ์ของทีโบ

Cpds.	logP	MR	POL	N1	C2	N3	C4	C5	N6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13
1	3.630	56.453	34.436	-0.4068	0.0720	-0.2911	-0.1451	-0.1446	-0.3371	-0.0977	-0.0777	-0.1650	-0.1795	0.0234	0.0272	-0.0790
2	3.630	56.453	34.436	-0.4074	0.0745	-0.2939	-0.1421	-0.1445	-0.3383	-0.0911	-0.1722	-0.0701	-0.1745	0.0318	0.0225	-0.0917
3	4.854	48.804	31.183	-0.4628	0.4604	-0.3211	-0.1358	-0.0440	-0.3452	-0.0881	-0.1871	-0.1775	-0.1932	0.0374	0.0107	-0.0965
4	5.257	53.276	33.018	-0.4390	0.4508	-0.3274	-0.1318	-0.0362	-0.3470	-0.0854	-0.1824	-0.1812	-0.1862	0.0203	0.0162	-0.0991
5	5.571	57.884	34.853	-0.4324	0.4514	-0.3373	-0.1226	-0.0257	-0.3429	-0.0858	-0.1812	-0.1837	-0.1841	0.0137	0.0302	-0.1032
6	4.464	48.917	31.183	-0.4342	0.4546	-0.3406	-0.1216	0.0488	-0.3349	-0.0892	-0.1826	-0.1830	-0.1848	0.0159	0.0289	-0.1020
7	4.386	44.280	29.348	-0.4457	0.4457	-0.3010	-0.0599	-0.1125	-0.3684	-0.0781	-0.1867	-0.1785	-0.1893	0.0253	0.0086	-0.0971
8	3.730	56.263	34.436	-0.4074	0.0661	-0.2728	-0.0605	-0.1119	-0.3731	-0.0771	-0.1740	-0.0690	-0.1765	0.0316	0.0127	-0.0866
9	3.211	61.899	33.854	-0.4073	0.0749	-0.2876	-0.0437	-0.1292	-0.3487	-0.0850	-0.1779	-0.0675	-0.1777	0.0318	0.0246	-0.0892
10	4.840	56.242	31.375	-0.4388	0.4470	-0.3056	-0.0430	-0.0924	-0.3924	-0.0487	-0.1864	-0.1797	-0.1869	0.0174	0.0126	-0.0994
11	5.257	53.276	33.018	-0.4358	0.4495	-0.3140	-0.0397	-0.1055	-0.3823	-0.0706	-0.1851	-0.1810	-0.1859	0.0149	0.0176	-0.0997
12	4.834	56.372	31.375	-0.4428	0.4443	-0.3058	-0.0500	-0.1019	-0.3928	-0.0610	-0.1888	-0.3058	-0.1895	0.0223	0.0136	-0.0968
13	5.251	53.405	33.018	-0.4413	0.4454	-0.3001	-0.0556	-0.1138	-0.3677	-0.0777	-0.1857	-0.1787	-0.1885	0.0218	0.0041	-0.0939
14	3.969	47.246	27.705	-0.4446	0.4485	-0.3154	-0.1444	-0.1422	-0.3385	0.0051	-0.1865	-0.1789	-0.1883	0.0245	0.0149	-0.0938
15	4.700	48.888	31.183	-0.4409	0.4475	-0.3175	-0.1444	-0.1378	-0.3421	0.0033	-0.1847	-0.1797	-0.1878	0.0217	0.0135	-0.0910
16	5.328	53.382	33.111	-0.4372	0.4465	-0.3081	-0.1509	-0.1372	-0.3430	-0.0017	-0.0778	-0.1664	-0.1829	0.0236	0.0171	-0.0694
17	5.328	53.382	33.111	-0.4517	0.4541	-0.3153	-0.1456	-0.1380	-0.3429	0.0038	-0.1735	-0.0698	-0.1804	0.0395	0.0128	-0.0818

ตารางที่ 3.2.4 (ต่อ)

Cpds.	logP	MR	POL	N1	C2	N3	C4	C5	N6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13
18	2.685	54.735	30.865	-0.4077	0.0743	-0.2916	-0.1424	-0.1427	-0.3408	0.0048	-0.1857	-0.1779	-0.1857	0.0213	0.0226	-0.0930
19	3.419	56.377	34.343	-0.4080	0.0731	-0.2891	-0.1435	-0.1424	-0.3354	0.0031	-0.1859	-0.1778	-0.1859	0.0215	0.0208	-0.0927
20	4.044	60.871	36.271	-0.4079	0.0671	-0.2827	-0.1489	-0.1430	-0.3340	-0.0029	-0.0790	-0.1645	-0.1809	0.0238	0.0240	-0.0712
21	4.044	60.871	36.271	-0.4075	0.0616	-0.2761	-0.1557	-0.1318	-0.3513	0.0084	-0.1706	-0.0707	-0.1756	0.0314	0.0027	-0.0751
22	5.113	53.306	33.018	-0.4483	0.4499	-0.3043	-0.0399	-0.0424	-0.3357	-0.0908	-0.1890	-0.1769	-0.1913	0.0271	0.0102	-0.0968
23	3.829	60.795	36.178	-0.4077	0.0667	-0.2728	-0.0536	-0.0164	-0.3790	-0.0694	-0.1860	-0.1770	-0.1871	0.0211	0.0095	-0.0944
24	2.996	61.823	33.761	-0.4097	0.0766	-0.2798	-0.0028	-0.0449	-0.3356	-0.0874	-0.1907	-0.1771	-0.1885	0.0206	0.0271	-0.0490
25	3.829	60.795	36.178	-0.4074	0.0638	-0.2652	-0.0553	-0.0159	-0.3704	-0.0719	-0.1861	-0.1772	-0.1868	0.0205	0.0104	-0.0950
26	5.062	56.463	32.879	-0.4185	0.0679	-0.3371	0.3413	-0.0431	-0.3492	-0.0883	-0.1786	-0.0615	-0.1833	0.0525	0.0219	-0.0891
27	3.844	47.138	36.081	-0.4068	0.0871	-0.2571	0.0668	0.0508	-0.3603	-0.0615	-0.1845	-0.1758	-0.1850	0.0235	0.0247	-0.0974
28	3.829	60.795	36.178	-0.4069	0.0792	-0.3000	-0.1342	-0.0478	-0.3418	0.0048	-0.1842	-0.1788	-0.1858	0.0198	0.0257	-0.0916
29	3.829	60.795	36.178	-0.4072	0.0659	-0.2806	-0.1482	-0.0387	-0.3498	0.0112	-0.1824	-0.1793	-0.1856	0.0204	0.0050	-0.0843
30	5.741	57.801	34.946	-0.4476	0.4548	-0.3222	-0.1375	-0.0474	-0.3407	0.0066	-0.1724	-0.0712	-0.1789	0.0359	0.0179	-0.0841
31	4.457	65.298	38.106	-0.4067	0.0774	-0.2996	-0.1352	-0.0476	-0.3425	0.0054	-0.1718	-0.0709	-0.1754	0.0297	0.0270	-0.0835
32	5.741	57.801	34.946	-0.4369	0.4423	-0.2954	-0.1536	-0.0284	-0.3546	0.0106	-0.1722	-0.0776	0.0315	-0.0033	-0.0033	-0.0757
33	3.829	60.795	36.178	-0.4072	0.0640	-0.2679	-0.0624	-0.1092	-0.3718	0.0171	-0.1865	-0.1865	-0.1876	0.0201	0.0111	0.0111
34	3.216	54.391	33.662	-0.4071	0.0883	-0.3119	-0.0777	-0.0737	-0.3252	-0.0890	-0.1767	-0.0713	-0.1740	0.0271	0.0542	-0.0516
35	2.881	57.351	32.019	-0.4077	0.0682	-0.2844	-0.1523	-0.1251	-0.3626	0.0168	-0.1745	-0.0713	-0.1761	0.0306	0.0116	-0.0694
36	4.044	60.871	36.271	-0.4055	0.0790	-0.3014	-0.1348	-0.0438	-0.3433	-0.0954	-0.0774	-0.1661	-0.1799	0.0209	0.0344	-0.0763

Table 3.2.4 (cont)

Cpds.	logP	MR	POL	N1	C2	N3	C4	C5	N6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13
37	5.328	53.382	33.111	-0.4454	0.4553	-0.3423	-0.1360	-0.0420	-0.3423	-0.0883	-0.1714	-0.0714	-0.1779	0.0349	0.0174	-0.0895
38	4.044	60.871	36.271	-0.4064	0.0782	-0.2986	-0.1349	-0.0437	-0.3430	-0.0898	-0.1716	-0.0706	-0.1752	0.0301	0.0247	-0.0879
39	3.211	61.899	33.854	-0.4074	0.0753	-0.2893	-0.1414	-0.0290	-0.3686	-0.0726	-0.1754	-0.0702	-0.1759	0.0304	0.0222	-0.0897
40	2.583	57.405	31.926	-0.4075	0.0771	-0.2900	-0.1404	-0.0288	-0.3679	-0.0728	-0.1878	-0.1782	-0.1863	0.0204	0.0209	-0.0978
41	3.969	47.246	27.705	-0.4263	0.4465	-0.3215	-0.1380	-0.0488	-0.3421	-0.0871	-0.1830	-0.1813	-0.1839	0.0149	0.0174	-0.1017
42	2.685	54.735	30.865	-0.4071	0.0809	-0.3022	-0.1333	-0.0496	-0.3434	-0.0875	-0.1843	-0.1784	-0.1848	0.0212	0.0252	-0.0999
43	4.386	44.280	29.348	-0.4390	0.4517	-0.3284	-0.1345	-0.0494	-0.3409	-0.0877	-0.1826	-0.1809	-0.1861	0.0208	0.0174	-0.0997
44	3.415	56.377	34.343	-0.4068	0.0816	-0.3036	-0.1328	-0.0488	-0.3434	-0.0878	-0.1830	-0.1787	-0.1850	0.0205	0.0247	-0.0984
45	4.700	48.888	31.183	-0.4375	0.4498	-0.3249	-0.1350	-0.0418	-0.3416	-0.0885	-0.1832	-0.1809	-0.1863	0.0193	0.0172	-0.0982
46	3.101	51.768	32.508	-0.4069	0.0806	-0.2997	-0.1336	-0.0444	-0.3410	-0.0914	-0.1844	-0.1785	-0.1857	0.0207	0.0237	-0.0959

ตารางที่ 3.2.5 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปร (mutual correlation) ของตัวอธิบายที่ใช้ในการสร้างแบบจำลอง QSAR สำหรับอนุพันธ์ของโทปี

	Log P	MR	POL	NI	C2	N3	C4	C5	N6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	log(1/C)
Log P	1.000	-0.225	-0.005	-0.779	0.776	-0.559	0.114	0.093	0.093	0.066	0.060	-0.063	0.238	0.008	-0.363	-0.152	-0.307
MR		1.000	0.775	0.600	-0.627	0.469	-0.005	-0.069	-0.025	0.236	0.201	0.308	0.133	0.077	0.099	0.382	0.474
POL			1.000	0.532	-0.560	0.505	0.034	0.109	-0.143	0.207	0.277	0.299	-0.159	0.059	0.102	0.356	0.523
NI				1.000	-0.954	0.658	0.041	-0.004	-0.134	0.020	0.164	0.233	-0.053	-0.025	0.395	0.282	0.520
C2					1.000	-0.690	-0.128	0.050	0.163	-0.049	-0.141	-0.311	0.099	-0.189	-0.336	-0.320	-0.526
N3						1.000	0.015	-0.139	-0.167	0.261	0.070	0.004	0.060	-0.112	-0.185	0.366	0.247
C4							1.000	0.214	0.003	-0.283	-0.204	0.072	-0.124	0.371	0.045	0.030	-0.432
C5								1.000	-0.065	-0.446	-0.263	-0.111	0.109	-0.173	0.131	-0.238	-0.178
N6									1.000	0.017	0.026	0.004	-0.042	-0.079	0.086	-0.093	-0.091
C7										1.000	0.058	0.058	0.230	-0.056	-0.356	0.366	0.146
C8											1.000	0.070	0.052	0.024	0.236	0.223	0.534
C9												1.000	0.051	0.667	0.181	0.163	0.401
C10													1.000	-0.428	-0.284	0.115	0.036
C11														1.000	0.106	0.039	0.146
C12															1.000	0.066	0.281
C13																1.000	0.094
log(1/C)																	1.000

สมการที่มีตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 15.281(\pm 7.210)C8 - 2.982(\pm 1.186)C2 - 6.587(\pm 2.602)C4 \\ + 6.195(\pm 4.035)C9 + 9.382(\pm 1.396) \quad (3.11)$$

$$(n = 46, r = 0.851, s = 0.693, F = 26.926, Q^2 = 0.638, S_{PRESS} = 0.766)$$

สมการที่มีห้าตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 16.743(\pm 7.022)C8 - 3.320(\pm 1.175)C2 - 6.506(\pm 2.489)C4 \\ + 6.473(\pm 3.866)C9 - 12.312(\pm 11.227)C13 + 8.697(\pm 1.474) \quad (3.12)$$

$$(n = 46, r = 0.869, s = 0.662, F = 24.579, Q^2 = 0.677, S_{PRESS} = 0.724)$$

สมการที่มีหกตัวอธิบายที่ดีที่สุด คือ

$$\log(1/C) = 13.604(\pm 7.149)C8 - 5.415(\pm 2.085)C2 - 7.867(\pm 2.618)C4 \\ + 5.054(\pm 3.848)C9 - 13.552(\pm 10.671)C13 + 0.491(\pm 0.413)\log P \\ + 6.148 (\pm 2.610) \quad (3.13)$$

$$(n = 46, r = 0.887, s = 0.626, F = 23.887, Q^2 = 0.712, S_{PRESS} = 0.726)$$

จากสมการ (3.8) - (3.13) จะเห็นได้ว่าสมการทุกสมการมีนัยสำคัญทุกสมการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มตัวอธิบายในสมการที่ (3.9) และ (3.10) ได้เป็นสมการที่ (3.11) จะทำให้สมการมีความสัมพันธ์เชิงเส้นสูงขึ้นมาก ($r = 0.851$) และเมื่อพิจารณาความสามารถในการทำนาย (predictive ability) ของสมการแล้วพบว่า สมการที่ (3.11) - (3.13) มีความสามารถในการทำนายที่ยอมรับได้ เนื่องจากค่า Q^2 มีค่าสูงกว่า 0.6 ซึ่งเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ แต่สมการที่ (3.13) นั้นประกอบด้วยตัวอธิบายที่มีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรสูง (0.776) จึงไม่สามารถนำสมการนี้พิจารณาและต้องตัดสมการนี้ไป การสร้างสมการที่ประกอบด้วยตัวอธิบายเจ็ดแปด และเก้าตัวอธิบาย พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ของตัวอธิบายบางชนิดไม่มีนัยสำคัญ ดังแสดงในสมการที่ (3.14) - (3.16) (ตารางที่ 3.2.6) ซึ่งพิจารณาในเทอมของ %95 confidence เมื่อลดลงจำนวนตัวอธิบายในสมการที่ (3.13) โดยการตัดตัวอธิบาย C2 ออกไป ทำให้ได้สมการที่ (3.17) พบว่าสมการไม่มีนัยสำคัญเช่นกัน จึงทำให้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของโมเลกุลและกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 ของสารอนุพันธ์ของทีโอบีคือสมการที่ (3.12) โดยมีค่าทางสถิติได้แก่ $r = 0.869$, $s = 0.662$, $F = 24.579$ และ $Q^2 = 0.677$ ค่าการทำ

นายกัมมันตภาพในการยับยั้งสำหรับทุกอนุพันธ์ของทีโบโดยใช้สมการที่ (3.12) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 3.2.6 แสดงค่า 95%confidence, F and p statistics สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรในสมการที่ (3.14) - (3.17)

สมการที่	ตัวอธิบาย	ค่าสัมประสิทธิ์	ค่าความเชื่อมั่น (95%confidence)	F	p	significance
3.14	C8	13.009	± 7.168	13.499	0.001	
	C2	-6.194	± 2.424	26.759	0.000	
	C4	-8.104	± 2.630	38.922	0.000	
	C9	4.203	± 4.063	4.384	0.043	
	C13	-11.842	± 10.958	4.786	0.035	
	logP	0.514	± 0.413	6.376	0.016	
	N3	-8.550	± 13.818	1.569	0.218	not significance
3.15	C8	13.828	± 7.510	13.919	0.000	
	C2	-4.303	± 5.427	2.581	0.117	not significance
	C4	-7.163	± 3.580	16.438	0.000	
	C9	4.497	± 4.156	4.806	0.034	
	C13	-12.375	± 11.106	5.096	0.030	
	logP	0.161	± 0.675	0.107	0.740	not ignificance
	N3	-10.742	± 14.993	2.108	0.155	not significance
3.16	POL	0.097	± 0.055	0.624	0.435	
	C8	14.277	± 7.624	14.426	0.000	
	C2	-5.329	± 5.986	3.259	0.079	not significance
	C4	-7.163	± 3.598	16.309	0.000	
	C9	4.204	± 4.172	4.052	0.052	
	C13	-12.792	± 11.206	5.360	0.026	
	logP	0.056	± 0.922	0.012	0.913	not significance
	N3	-11.811	± 15.285	2.456	0.126	not significance

ตารางที่ 3.6 (ต่อ)

สมการที่	ตัวอธิบาย	ค่าสัมประสิทธิ์	ค่าความเชื่อมั่น (95%confidence)	F	p	significance
3.16(ต่อ)	POL	0.123	± 0.012	0.933	0.340	
	N1	-16.501	± 39.716	0.710	0.405	not significance
3.17	C8	20.296	± 8.537	22.764	0.000	
	C9	9.036	± 4.550	16.109	0.003	
	C4	-4.928	± 3.044	10.705	0.002	
	logP	-0.417	± 0.284	8.820	0.005	
	C13	-7.398	± 13.414	1.242	0.271	not significance

จากตัวอธิบายที่ปรากฏในแบบจำลอง QSAR สำหรับอนุพันธ์ของทีโอบีในสมการที่ (3.12) นั้นได้ชี้ให้เห็นว่า ตัวอธิบายโดยสมบัติของอิเล็กตรอนิกส์จัดเป็นตัวอธิบายที่สำคัญต่อกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ของอนุพันธ์ทีโอบี จากค่าสัมประสิทธิ์ของตัวอธิบายของ C8 และ C13 แสดงให้เห็นว่ากัมมันตภาพการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นได้หากมีการเพิ่มประจุของอิเล็กตรอนและการลดความหนาแน่นของอิเล็กตรอนบริเวณโดยรอบอะตอม C8 และ C13 ตามลำดับ จะเห็นได้จากผลการทดลองที่ได้มีการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C8 จากอะตอมไฮโดรเจน เป็น หมู่ CI (8-CI) ทำให้โมเลกุลทีโอบีมีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ของโมเลกุลสูงขึ้นอย่าง (โมเลกุลที่ 1 ในตารางที่ 2.3) ซึ่งผลจากการศึกษา QSAR นี้ จะได้นำไปประกอบกับการศึกษาโดยวิธี CoMFAของอนุพันธ์ทีโอบีต่อไป

3.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสามมิติ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสามมิติในโครงการนี้ ได้ใช้วิธีวิเคราะห์การเปรียบเทียบสนามโมเลกุล (Comparative Molecular Field Analysis) ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการออกแบบโครงสร้างของโมเลกุลยาตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง และได้ศึกษากับตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 สองกลุ่มคือ อนุพันธ์ของเนวิราพีนและทีโอบี ซึ่งผลการศึกษาคouldได้แสดงไว้ในหัวข้อสำคัญดังต่อไปนี้

3.3.1 การศึกษา CoMFA ของอนุพันธ์ของเนวิราพีน

ในการศึกษานี้ ได้ใช้โครงสร้างของอนุพันธ์ของเนวิราพีนทั้งหมด 53 โครงสร้างเป็น training set และอนุพันธ์อีก 22 โครงสร้างเป็น test set ดังที่ได้แสดงไว้แล้วในตารางที่ 2.1-2.2 ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของตัวยับยั้ง ๔ กับกัมมันตภาพสองแบบคือชนิด wild type และ mutant type

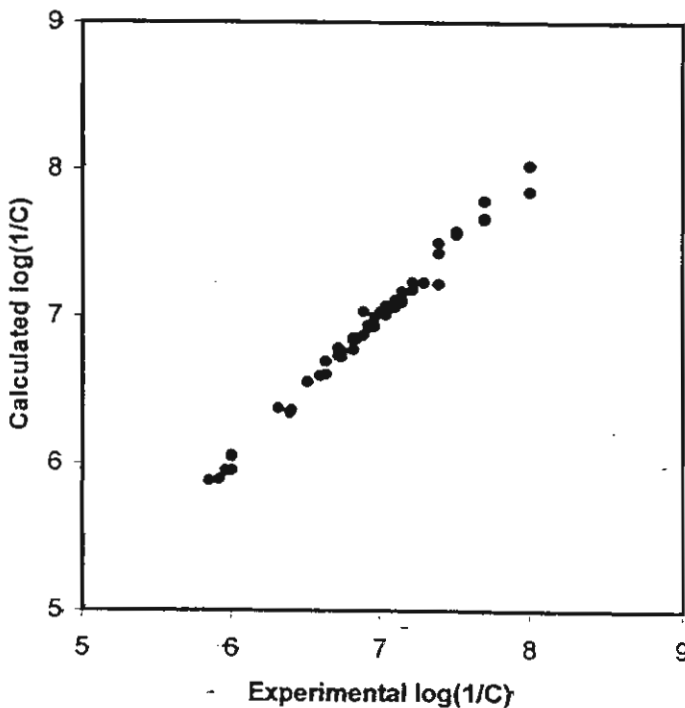
3.3.1.1 แบบจำลอง CoMFA สำหรับการยับยั้งเอนไซม์แบบ wild type

เนื่องจากการศึกษาโดยวิธี CoMFA นั้น จะต้องคำนวณค่าอันตรกิริยาระหว่าง probe atom กับทุก ๆ อะตอมในโมเลกุลของตัวยับยั้ง ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของ probe atom ต่าง ๆ คือ อะตอมคาร์บอนชนิด sp^3 (sp^3 C (+1)) อะตอมออกซิเจนชนิด (sp^3 O (-1)) และ อะตอมไฮโดรเจน (H(+1)) และขนาดของ grid spacing คือ 1 และ 2 Å ผลของการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปแบบจำลองแบบ CoMFA ของอนุพันธ์ของเนวิราพีนได้ดังแสดงในตารางที่ 3.3.1 - 3.3.2 จากข้อมูลในตารางที่แสดงผลของการสร้างแบบจำลอง CoMFA พบว่า probe atom ชนิด H (+1) และค่า grid spacing 2 Å ให้แบบจำลอง CoMFA (model 5) ที่ดีที่สุดกล่าวคือ ค่า $r^2_{cv} = 0.624$ ค่าทางสถิติอื่น ๆ ได้แก่ s-press มีค่า 0.354 และ noc = 10 จากการวิเคราะห์อันตรกิริยาจากแบบจำลองพบว่าอันตรกิริยาแบบสเตอริกและอิเล็กโตรสแตติกมีส่วนร่วมในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ชนิด wild type เป็น 58.5% และ 41.5% ตามลำดับ เมื่อได้สร้างแบบจำลองแบบดั้งเดิม ทำให้ได้ $r^2 = 0.989$ ค่า standard error of estimate = 0.062 ค่า F = 348.133 ค่าการทำนายกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ ที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA (model 5) สำหรับโมเลกุลของอนุพันธ์เนวิราพีนได้แสดงไว้ในภาพที่ 3.3.1

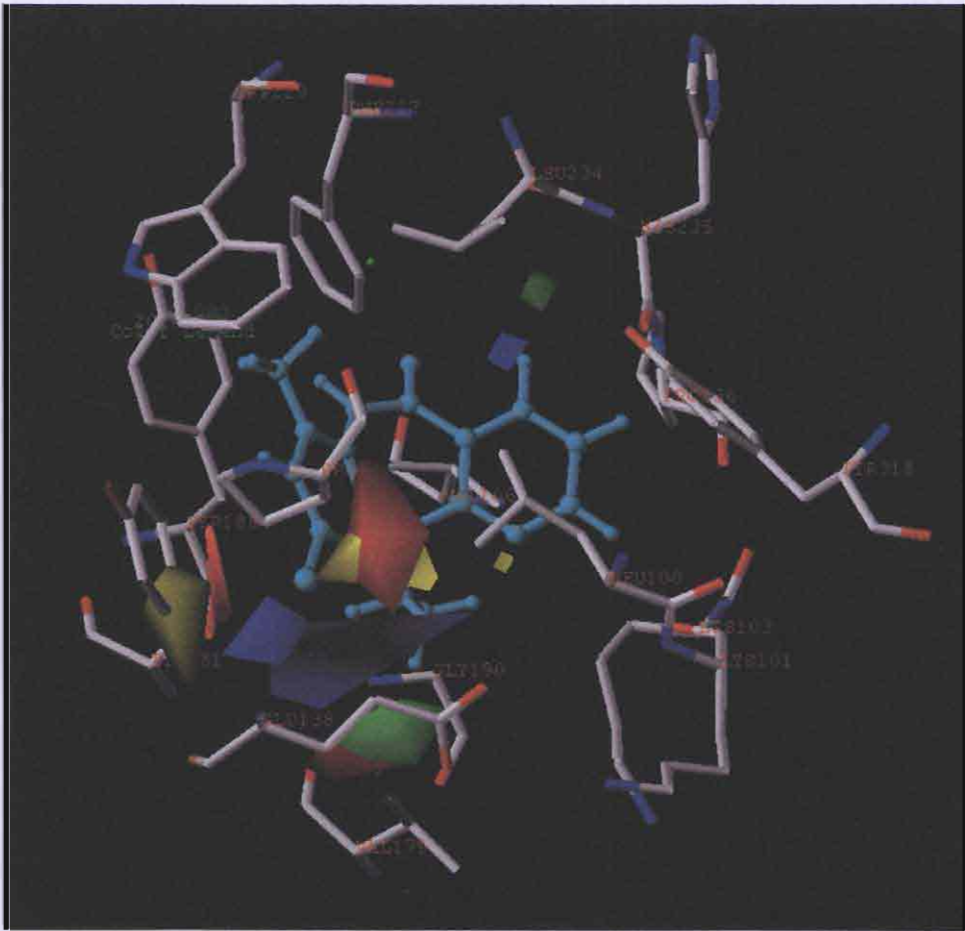
ค่าการทำนายกัมมันตภาพในการยับยั้ง ๔ ที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA (model 5) สำหรับโมเลกุลของอนุพันธ์เนวิราพีนที่ใช้เป็น test set จำนวน 22 โครงสร้าง ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3.3 พบว่าแบบจำลอง CoMFA สามารถให้ผลการทำนายกัมมันตภาพได้เป็นอย่างดี

สำหรับผลของการศึกษาโดยวิธี CoMFA นั้น จะแสดงอันตรกิริยาของตัวยับยั้งที่มีต่อ เอนไซม์สองแบบคือ อันตรกิริยาแบบสเตอริกและแบบอิเล็กโตรสแตติก โดยจากแบบจำลอง CoMFA ที่ดีที่สุด จะนำเอาค่าสัมประสิทธิ์ของตัวอธิบายในสมการแสดงเป็นแผนภาพคอนทัวร์ ทั้งนี้ positive coefficient contour map หมายถึงควรเพิ่มอันตรกิริยาในโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง และ negative coefficient contour map หมายถึงควรลดอันตรกิริยาในโครงสร้างโมเลกุลเพื่อลดความสามารถในการยับยั้ง ในการศึกษาการเสนออันตรกิริยาของ โครงสร้างโมเลกุลนั้นจะแสดงดังรายละเอียดต่อไปนี้ 1. Green coefficient contour map แสดงถึง การเพิ่มอันตรกิริยาแบบสเตอริกในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง 2. Yellow coefficient contour map แสดงถึง การลดอันตรกิริยาแบบสเตอริกในโมเลกุลจะช่วยลดความสามารถในการยับยั้ง 3. Red coefficient contour map แสดงถึง การเพิ่มอันตรกิริยาแบบสเตอริกในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง และ 4. Blue coefficient contour map แสดงถึง การลดอันตรกิริยาแบบสเตอริกในโมเลกุลจะช่วยลดความสามารถในการยับยั้ง

ผลจากการพิจารณา CoMFA contour map ได้แสดงไว้ในภาพที่ 3.3.2 โดยนอกจากจะ พิจารณา CoMFA contour map แล้ว ยังได้นำเอาโครงสร้างของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 บริเวณ binding cavity ที่เกิดการยับยั้งมาพิจารณา ซึ่งจะเป็นส่วนช่วยในการออกแบบโมเลกุล ของตัวยับยั้งเอนไซม์ เอช ไอ วี -1 ที่มีกัมมันตภาพสูงด้วย



ภาพที่ 3.3.1 กราฟแสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ชนิด wild type ที่ได้จากการทดลองและการทำนายโดยแบบจำลอง CoMFA (model 5)



ภาพที่ 3.3.2 แผนภาพคอนทัวร์จากการศึกษา CoMFA (model 5) สำหรับการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ
เอช ไอ วี-1 ชนิด wild type คอนทัวร์สีเขียวแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบสเตอริกสูง
คอนทัวร์สีเหลืองแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบสเตอริกต่ำ คอนทัวร์สีแดงแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบ
อิเล็กโตรสแตติกสูง และคอนทัวร์สีน้ำเงินแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติกต่ำ และ
แสดงโครงสร้างของโมเลกุลที่ 12 ซึ่งมีกัมมันตภาพในการยับยั้งสูงสุด

ตารางที่ 3.3.1 รูปแบบจำลอง CoMFA สำหรับกิจกรรมภาพในการยับยั้งเอนไซม์ชนิด wild type ของอนุพันธ์ของเนอีราฟีน โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของ probe atom

Model	Probe atom	Field type	noc	r_{cv}^2	s-press	r_{cv}^2	s	F	Outliers(residual)	Steric contrib ¹
1	sp ³ C(+1)	both	1	0.029	0.518	0.247	0.456	16.702	compd. no. 14 (-0.961)	65.6
		st	3	0.160	0.491	0.657	0.314	31.250		
		el	1	0.025	0.519	0.252	0.454	17.208		
2	sp ³ O(-1)	both	4	0.148	0.500	0.789	0.249	44.964	compd. no. 47 (0.523)	62.2
		st	5	0.280	0.464	0.822	0.231	43.550		
		el	1	0.025	0.519	0.252	0.454	17.203		
3	H(+1)	both	4	0.207	0.482	0.808	0.237	50.620	compd. no. 47 (0.581)	57.7
		st	9	0.354	0.460	0.957	0.120	93.810		
		el	1	0.025	0.519	0.252	0.454	17.203		
4 ^c	H(+1)	both	10	0.547	0.393	0.985	0.071	270.140	compd. no. 4 (0.562)	57.8
		st	4	0.432	0.410	0.801	0.243	47.156		
		el	7	0.185	0.508	0.859	0.211	38.445		
5 ^d	H(+1)	both	10	0.624	0.354	0.989	0.062	348.133	compd. no. 12 (0.152)	58.5
		st	10	0.528	0.597	0.967	0.104	119.015		
		el	7	0.233	0.488	0.859	0.178	54.075		

¹Conventional r_{cv}^2 . ²Steric contribution in %. ³Elimination of compd. no. 47 (remaining 52 compounds in the training set). ⁴Elimination of compds. no. 47 and 30 (remaining 51 compounds in the training set).

ตารางที่ 3.3.2 สรุปแบบจำลอง CoMFA สำหรับกัมมันตภาพในการยับยั้งการถ่ายแบบชนิด wild type ของอนุพันธ์ของเนวิราพีน โดยศึกษาการปรับเปลี่ยนชนิดของ lattice grid spacing แบบ 1 Å และ 2 Å

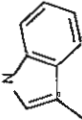
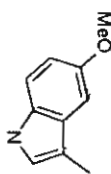
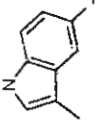
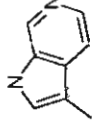
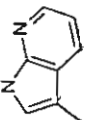
Probe atom	Grid (Å)	noc	r_{w}^2	s-press	r_{st}^2	s	F	Steric contb ^a
H (+1)	1	7	0.523	0.385	0.972	0.093	212.838	59.1
	2	10	0.642	0.354	0.989	0.062	348.133	58.5

^aConventional r_{st}^2 . ^bSteric contribution in %.

ตารางที่ 3.3.3 ผลการทำนายกับมันดภาพในการยับยั้งเอนไซม์ เอช ไอ วี-1 แบบ wide type และ mutant type สำหรับสารอนุพันธ์ของเนวิราพีนในกลุ่ม test set จำนวน 22 โครงสร้าง

C ₁ pos.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	WT RT		Y181C RT			
					Experimental log (1/C) ^a	Calculated log (1/C) ^a	Residual	Experimental log (1/C) ^a	Calculated log (1/C) ^b	Residual
^c T1	CH ₃	CH ₃	H	C ₆ H ₅	7.154	7.102	0.052	5.920	5.910	0.010
^c T2	CH ₃	H	CH ₃	C ₆ H ₅	7.044	6.858	0.186	5.769	5.701	0.068
^c T3	C ₆ H ₅	H	CH ₃	C ₆ H ₅	6.853	6.335	0.518	6.376	6.248	0.128
^c T4	Cl	H	CH ₃	C ₆ H ₅	7.096	6.923	0.173	6.677	5.926	0.751
^c T5	Br	H	CH ₃	C ₆ H ₅	7.522	6.892	0.630	5.677	5.775	-0.098
^c T6	NHCH ₂ C ₆ H ₄ OH	CH ₃	H	C ₆ H ₅	7.044	7.289	-0.245	5.999	5.672	0.327
^c T7	NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ OH	CH ₃	H	C ₆ H ₅	7.044	7.611	-0.567	5.999	5.819	0.180
^c T8	N-pyrazolyl	H	CH ₃	C ₆ H ₅	6.507	6.805	-0.298	6.251	6.545	-0.294
^c T9	3-thienyl	H	CH ₃	C ₆ H ₅	6.999	6.988	0.011	6.522	6.484	0.038
^c T10	2-imidazolyl	H	CH ₃	C ₆ H ₅	5.431	6.341	-0.910	6.130	6.141	-0.011
^c T11	4-pyrazolyl	H	CH ₃	C ₆ H ₅	7.698	6.927	0.771	7.221	6.770	0.451
^c T12	2-OC ₆ H ₄ -phenyl	H	CH ₃	C ₆ H ₅	6.085	5.940	0.145	5.601	5.407	0.194
^c T13	3-OH-phenyl	H	CH ₃	C ₆ H ₅	6.999	7.254	-0.255	6.744	6.072	0.672
^c T14	4-NH ₂ -phenyl	H	CH ₃	C ₆ H ₅	7.397	7.245	0.152	6.920	6.576	0.344
^d T15	H	CH ₂ OPh	H	C ₆ H ₅	6.920	6.606	0.314	5.587	5.940	-0.353
^d T16	OH	CH ₂ Ph	H	C ₆ H ₅	6.467	7.316	-0.849	5.885	6.010	-0.125
^d T17	Ph-m-OMe	CHO	H	C ₆ H ₅	6.480	7.249	-0.769	6.376	6.442	-0.066

ตารางที่ 3.3.3 (ต่อ)

Compds.	R1	R2	R3	R4	Experimental log(1/°)	WT RT Calculated log(1/°) ^a	Residual	Experimental log(1/°)	Y181C RT Calculated log(1/°) ^b	Residual
T18		H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.552	6.838	0.714	7.552	7.501	0.051
T19		H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.698	6.667	0.031	6.637	6.324	0.313
T20		H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.150	6.623	-0.473	6.251	5.978	0.273
T21		H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.355	6.668	0.687	7.008	6.688	0.320
T22		H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.677	6.447	0.230	6.698	6.923	-0.225

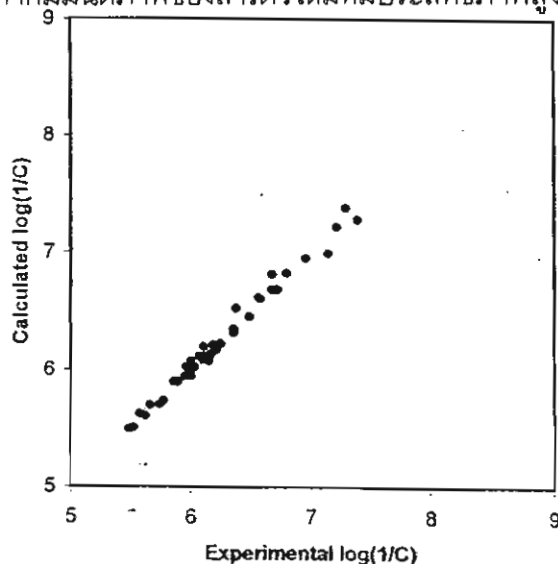
Calculated by CoMFA model 5. ^a Calculated by CoMFA model 11. ^b [23(a)], ^c [23(b)], ^d [23(c)].

3.3.1.2 แบบจำลอง CoMFA สำหรับการยับยั้งเอนไซม์แบบ mutant type

การศึกษาในโครงการนี้ได้ศึกษา CoMFA ของตัวยับยั้งของอนุพันธ์ของเนวิราพีนกับเอนไซม์การถ่ายแบบที่มี mutation ที่ตำแหน่ง tyrosine 181 ไปเป็น cysteine (Y181C) ผลจากการศึกษาชนิดของ probe atom, แบบต่าง ๆ และผลของการสร้างแบบจำลอง CoMFA พบว่า probe atom ชนิด sp^3C (+1) และค่า grid spacing 2 Å ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3.4 และ 3.3.5 จากการศึกษาคพบว่าแบบจำลอง CoMFA (model 11) ที่ดีที่สุด มีค่า $r^2_{\text{cv}} = 0.726$ และค่าทางสถิติอื่น ๆ ได้แก่ s-press มีค่า 0.262 และ noc = 9 จากการวิเคราะห์อันตรกิริยาจากแบบจำลองพบว่าอันตรกิริยาแบบสเตอริกและอิเล็กโตรสแตติกมีส่วนร่วมในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิด mutant type เป็น 46.8% และ 53.2% ตามลำดับ เมื่อได้สร้างแบบจำลองแบบดั้งเดิมทำให้ได้ค่า $r^2 = 0.989$ ค่า standard error of estimate = 0.059 ค่า $F = 316.470$ ค่าการทำนายสัมมนตภาพในการยับยั้ง χ ที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA (model 11) สำหรับโมเลกุลของอนุพันธ์เนวิราพีนได้แสดงไว้ในภาพที่ 3.3.3

ค่าการทำนายสัมมนตภาพในการยับยั้ง χ ที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA (model 11) สำหรับสารอนุพันธ์ของเนวิราพีนในกลุ่ม test set จำนวน 22 โครงสร้าง ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3.3 และพบว่าแบบจำลองดังกล่าวให้ค่าการทำนายสัมมนตภาพที่ดี

การเสนออันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์สองแบบคือ อันตรกิริยาแบบสเตอริกและแบบอิเล็กโตรสแตติก โดยจากแบบจำลอง CoMFA ที่ดีที่สุดนั้นแสดงได้ในทำนองเดียวกับการศึกษาการเอนไซม์ชนิด wide type กล่าวคือแสดงในรูปของแผนภาพคอนทัวร์ ดังแสดงในภาพที่ 3.3.4 และได้พิจารณาโครงสร้างของกรดอะมิโนที่อยู่ภายใน cavity ที่เกิดการยับยั้งด้วย ซึ่งจะมีส่วนช่วยในการทำนายค่าสัมมนตภาพของสารตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป



ภาพที่ 3.3.3 กราฟแสดงค่าสัมมนตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ชนิด mutant type ที่ได้จากการทดลองและการทำนายโดยแบบจำลอง CoMFA (model 11)

ตารางที่ 3.3.4 รูปแบบจำลอง CoMFA สำหรับกันมันตกภาพในการยับยั้งการถ่ายแบบชนิด mutant type ของอนุพันธ์ของเนวิราพีน โดยศึกษาการปรับเปลี่ยนชนิดของ probe atom

Model	Probe atom	Field type	noc	r_{cv}^2	s-press	r^2_{in}	s	F	Outliers(residual)	Steric contb ^a
6	sp ³ C(+1)	both	8	0.587	0.313	0.968	0.087	167.287	compd. no. 36 (0.151)	45.4
		st	3	0.301	0.386	0.942	0.120	68.131		
		el	4	0.407	0.359	0.791	0.213	45.458		
7	sp ³ C(-1)	both	5	0.506	0.332	0.928	0.128	99.462	compd. no. 24 (0.256)	50.4
		st	4	0.319	0.385	0.759	0.229	34.759		
		el	4	0.407	0.359	0.791	0.213	45.458		
8	H(+1)	both	4	0.500	0.330	0.886	0.158	93.298	compd. no. 42 (0.356)	47.5
		st	4	0.371	0.370	0.793	0.212	49.942		
		el	4	0.407	0.359	0.791	0.213	45.458		
9 ^c	sp ³ C(+1.0)	both	8	0.631	0.298	0.976	0.076	216.705	compd. no. 38 (-0.151)	46.7
		st	3	0.292	0.406	0.675	0.264	33.268		
		el	4	0.392	0.366	0.789	0.215	44.013		
10 ^d	sp ³ C(+1.0)	both	8	0.662	0.287	0.071	0.979	245.70	compd. no. 43 (0.109)	45.3
		st	3	0.287	0.394	0.679	0.264	33.074		
		el	4	0.388	0.369	0.790	0.216	43.253		

ตารางที่ 3.3.4 (ต่อ)

Model	Probe atom	Field type	noc	r_{cv}^2	s-press	r^{2n}	s	F	Outliers(residual)	Steric contb ^{1c}
11 ^c	sp ³ C(+1.0)	both	9	0.726	0.262	0.989	0.059	316.470	compd. no.32 (0.120)	46.8
		st	3	0.322	0.385	0.705	0.254	36.605		
		el	4	0.436	0.359	0.808	0.207	47.280		

^aConventional r^2 . ^bSteric contribution in %.

^cElimination of compd. no. 36 (remaining 52 compounds in the training set).

^dElimination of compds. no. 36 and 38 (remaining 51 compounds in the training set).

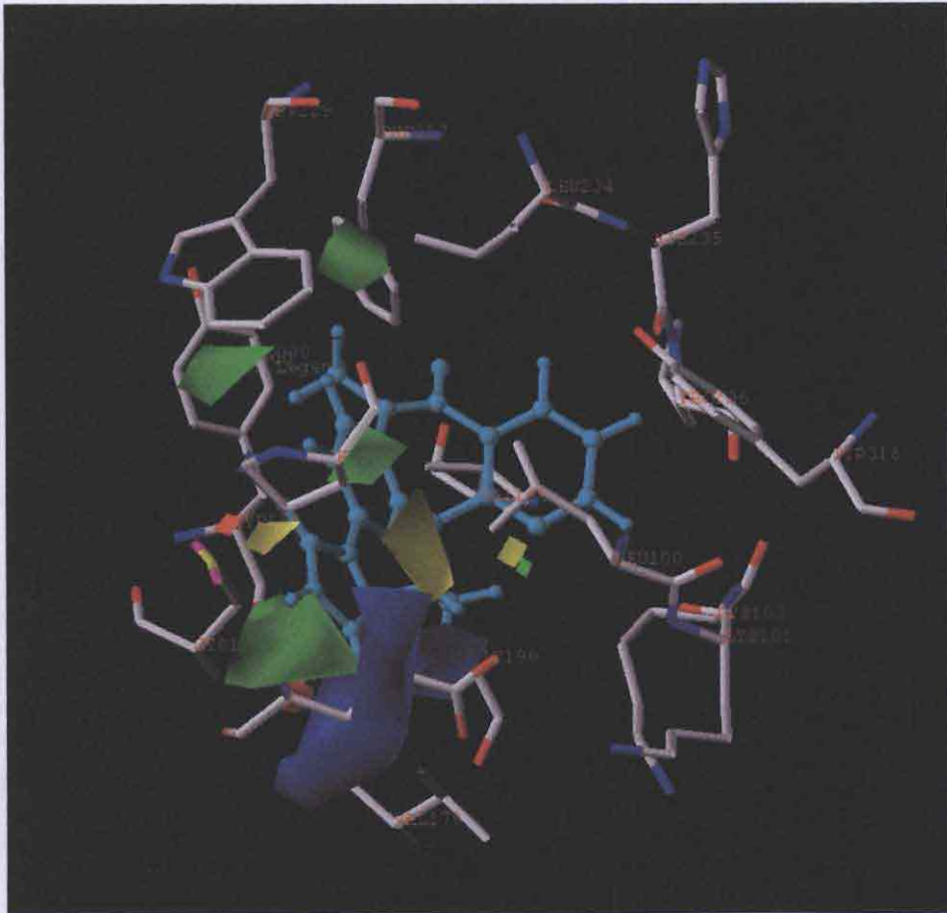
^eElimination of compds. no. 36, 38 and 43 (remaining 50 compounds in the training set).

๕

ตารางที่ 3.3.5 สรุปแบบจำลอง CoMFA สำหรับกับมโนภาพในการยับยั้งการถ่ายแบบชนิด mutant type ของอนุพันธ์ของเนวิราพีน โดยศึกษาการปรับเปลี่ยนชนิดของ lattice grid spacing แบบ 1 Å และ 2 Å

Probe atom	Grid (Å)	Noc	r_{cv}^2	s-press	r^{2n}	s	F	Steric contb ^b
sp ³ C(+1.0)	1	9	0.658	0.293	0.991	0.048	474.071	49.6
	2	9	0.726	0.262	0.989	0.059	316.470	45.2

^aConventional r^2 . ^bSteric contribution in %.



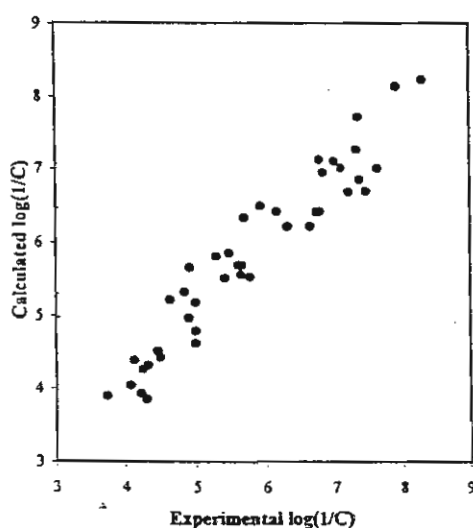
ภาพที่ 3.3.4 แผนภาพคอนทัวร์จากการศึกษา CoMFA (model 11) สำหรับการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ชนิด mutant type คอนทัวร์สีเขียวแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบสเตอริกสูง คอนทัวร์สีเหลืองแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบสเตอริกต่ำ คอนทัวร์สีแดงแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติกสูง และคอนทัวร์สีน้ำเงินแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติกต่ำ และแสดงโครงสร้างของโมเลกุล เนวีราพิน โมเลกุลที่ 32 ซึ่งมีกัมมันตภาพในการยับยั้งสูงสุด

3.3.2 การศึกษา CoMFA ของอนุพันธ์ของทีโบ

ในการศึกษา CoMFA ของตัวยับยั้งของอนุพันธ์ของทีโบกับเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ได้ดำเนินการเช่นเดียวกับการศึกษากับอนุพันธ์ของเนวิราพีน ผลจากการศึกษาชนิดของ probe atom แบบต่าง ๆ และผลของการสร้างแบบจำลอง CoMFA พบว่า probe atom ชนิด $sp^3C (+1)$ และค่า grid spacing 2 Å ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3.6 และ 3.3.7 จากการศึกษาพบว่าแบบจำลอง CoMFA (model 8) ที่ดีที่สุดมีค่า $r^2_{cv} = 0.771$ และค่าทางสถิติอื่น ๆ ได้แก่ s-press มีค่า 0.612 และ noc = 3 จากการวิเคราะห์อันตรกิริยาจากแบบจำลองพบว่าอันตรกิริยาแบบสเตอริกและอิเล็กโตรสแตติกมีส่วนร่วมในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ชนิด mutant type เป็น 81.8% และ 18.2% ตามลำดับ เมื่อได้สร้างแบบจำลองแบบดั้งเดิม ทำให้ได้ $r^2 = 0.941$ ค่า standard error of estimate = 0.312 ค่า F = 195.028 ค่าการทำนายกับมันตภาพในการยับยั้ง ฯ ที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA (model 8) ได้แสดงในภาพที่ 3.3.5

ค่าการทำนายกับมันตภาพในการยับยั้ง ฯ ที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA (model 8) สำหรับอนุพันธ์ของทีโบสำหรับกลุ่ม test set จำนวน 23 โครงสร้างได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3.3 และแบบจำลอง CoMFA ดังกล่าวให้ผลการทำนายกับมันตภาพสำหรับโมเลกุลได้เป็นอย่างดี

การเสนออันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์สองแบบคือ อันตรกิริยาแบบสเตอริก และแบบอิเล็กโตรสแตติก โดยจากแบบจำลอง CoMFA ที่ดีที่สุดนั้นแสดงได้ในทำนองเดียวกับการศึกษากับอนุพันธ์ของเนวิราพีน กล่าวคือแสดงในรูปของแผนภาพคอนทัวร์ ดังแสดงในภาพที่ 3.3.6 และ 3.3.7 และยังได้พิจารณาโครงสร้างของกรดอะมิโนที่อยู่ภายใน hydrophobic cavity ที่เกิดการจับ ซึ่งจะมีส่วนช่วยในการทำนายค่ากับมันตภาพของสารตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง



ภาพที่ 3.3.5 กราฟแสดงค่ากับมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ของอนุพันธ์ของทีโบ ที่ได้จากการทดลองและการทำนายโดยแบบจำลอง CoMFA (model 11)

ตารางที่ 3.3.6 รูปแบบจำลอง CoMFA สำหรับศึกษามีผลภาพในการยับยั้งการถ่ายแบบเชื้อ ไอ จี-1 ของอนุพันธ์ของทีโม โดยศึกษาการปรับเปลี่ยนชนิดของ probe atom

Model	Probe atom	Field type	noc	r ² _{av}	s-press	r ² _h	s	F	Outliers(residual)	Steric contb ¹⁾
1	sp ³ C(+1)	both	3	0.570	0.854	0.847	0.510	77.590	cpd.39(-1.197)	79.3
		st	3	0.541	0.883	0.822	0.549	64.863		
		el	2	0.369	1.023	0.731	0.668	58.468		
	sp ³ O(-1)	both	3	0.594	0.831	0.860	0.487	86.247	cpd.53(-1.005)	79.6
		st	3	0.579	0.846	0.832	0.535	69.179		
		el	2	0.369	1.023	0.731	0.668	58.468		
2	H(+1)	both	3	0.544	0.880	0.850	0.505	79.079	cpd.28(1.05)	74.7
		st	3	0.541	0.883	0.822	0.549	64.863		
		el	2	0.369	1.023	0.731	0.668	58.468		
	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.629	0.796	0.877	0.459	97.07	cpd.46(0.908)	79.5
		st	3	0.603	0.822	0.847	0.519	72.74		
		el	3	0.475	0.958	0.880	0.458	73.344		
3	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.657	0.756	0.887	0.434	104.743	cpd.39(1.01)	79.7
		st	3	0.629	0.786	0.853	0.494	77.669		
		el	4	0.533	0.894	0.900	0.412	88.238		
	H(+1)	both	3	0.544	0.880	0.850	0.505	79.079	cpd.28(1.05)	74.7
		st	3	0.541	0.883	0.822	0.549	64.863		
		el	2	0.369	1.023	0.731	0.668	58.468		
4	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.629	0.796	0.877	0.459	97.07	cpd.46(0.908)	79.5
		st	3	0.603	0.822	0.847	0.519	72.74		
		el	3	0.475	0.958	0.880	0.458	73.344		
	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.657	0.756	0.887	0.434	104.743	cpd.39(1.01)	79.7
		st	3	0.629	0.786	0.853	0.494	77.669		
		el	4	0.533	0.894	0.900	0.412	88.238		

ตารางที่ 3.3.6 (ต่อ)

Model	Probe atom	Field type	noc	r_{cv}^2	s-press	r_{cv}^{2h}	s	F	Outliers (residual)	Steric contb ^h
6 ⁱ	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.689	0.712	0.901	0.402	118.543	cpd.15(0.996)	80.2
		st	3	0.660	0.744	0.869	0.462	86.547		
		el	4	0.471	0.941	0.890	0.430	76.565		
		both	3	0.721	0.680	0.919	0.367	143.049	cpd.40(0.901)	81.5
7 ⁱ	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.721	0.680	0.919	0.367	143.049	cpd.40(0.901)	81.5
		st	3	0.700	0.705	0.897	0.413	110.53		
		el	4	0.469	0.951	0.899	0.414	82.425		
		both	3	0.771	0.612	0.941	0.312	195.028	cpd.21(0.662)	81.8
8 ⁱ	Sp ³ O(-1.0)	both	3	0.771	0.612	0.941	0.312	195.028	cpd.21(0.662)	81.8
		st	2	0.741	0.644	0.920	0.363	141.242		
		el	2	0.487	0.905	0.785	0.586	69.785		

ⁱconventional r_{cv}^2 , ^hsteric contribution in %, ^eelimination of compd. N.33, (remaining 45 comps in the training set), ^delimination of comps N. 33 and 46, (remaining 44 comps in the training set), ^eelimination of comps N.33, 46 and 39, (remaining 43 comps in the training set), ^feliminations of comps N.33, 46, 39 and 15, (remaining 42 comps in the training set), ^leliminations of comps N.33, 46, 39 15 and 40, (remaining 41 comps in the training set).

ตารางที่ 3.3.7 สรุปแบบจำลอง CoMFA สำหรับกับมันตกภาพในการยับยั้งการถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ของอนุพันธ์ของทีบี โดยศึกษาการปรับเปลี่ยนชนิดของ lactice grid spacing แบบ 1 Å และ 2 Å

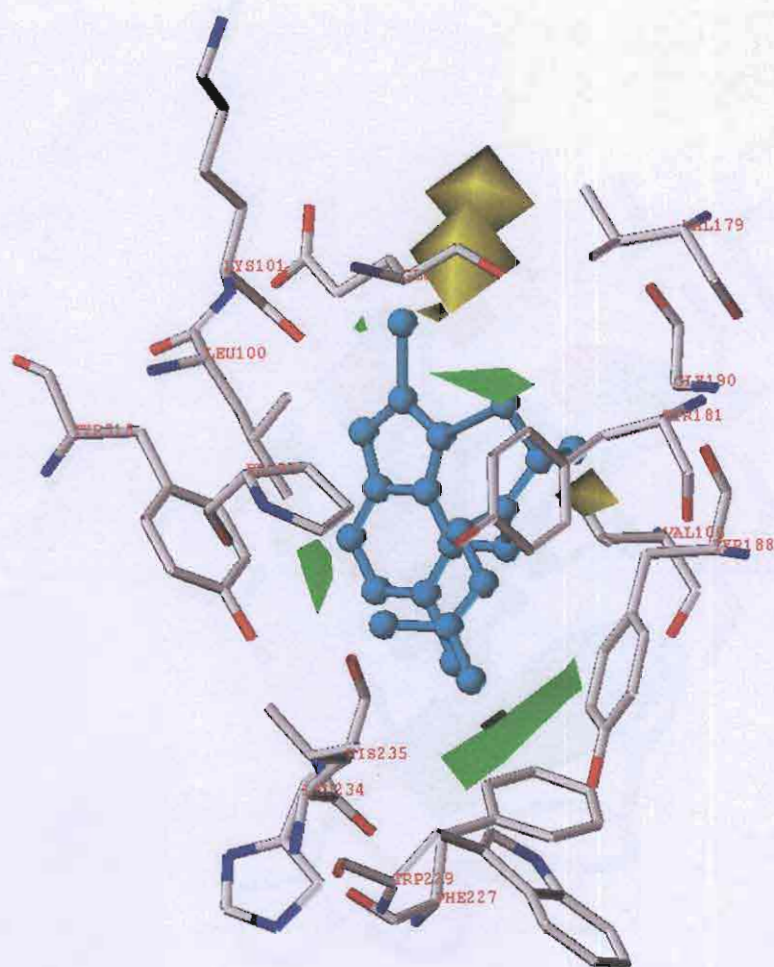
Probe atom	Grid (Å)	Noc	r_{cv}^2	s-press	r_{cv}^{2h}	s	F	Steric contb ^h
sp ³ O(-1.0)	1	5	0.585	0.868	0.958	0.273	182.805	77.6
	2	3	0.594	0.831	0.860	0.487	86.247	79.6

^aconventional r_{cv}^2 , ^hsteric contribution in %

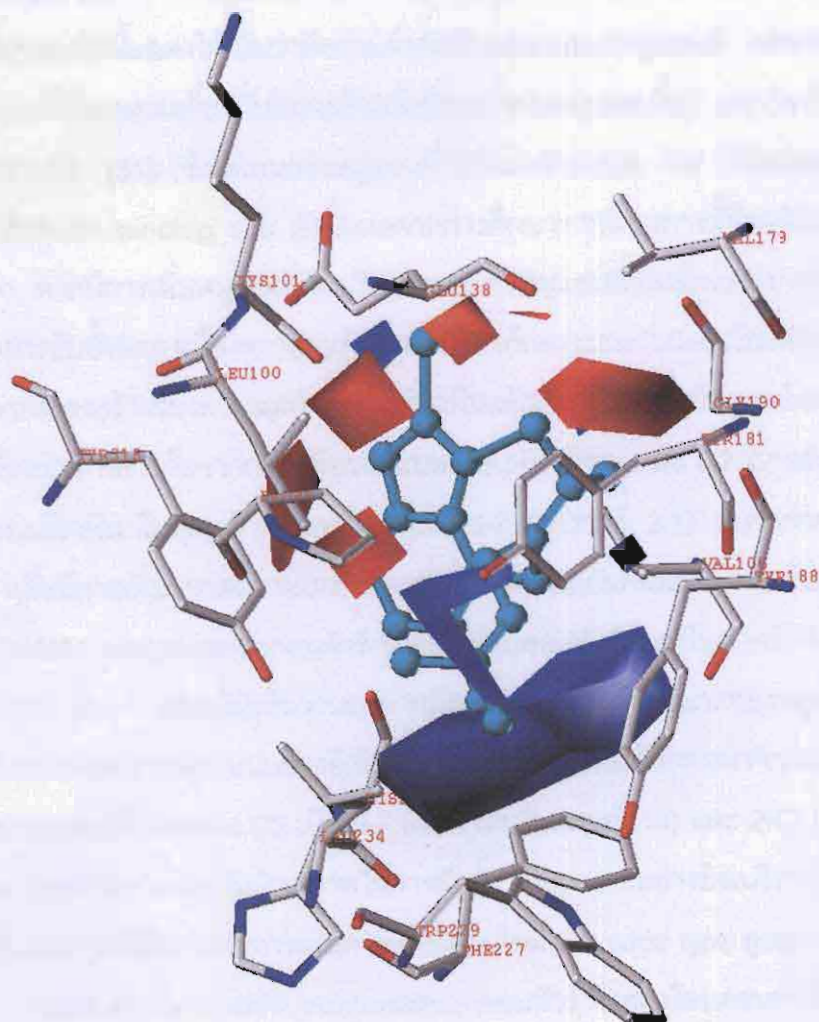
ตารางที่ 3.3.8 โครงสร้างของโมเลกุลอนุพันธ์ที่โบที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำนายและแสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งที่ได้จากการทดลองและการคำนวณโดยแบบจำลอง CoMFA (model 8)

Cpds.	R	X	Y	Z	Expt.log(1/C)	Calc.log(1/C) ^a	Residual
T1	H	0	H	DMA	4.900	5.663	-0.763
T2	H	0	H	2-MA	4.330	4.405	-0.075
T3	H	0	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.050	4.037	0.013
T4	H	0	H	CH ₂ C(C ₂ H ₅)=CH ₂	4.430	4.423	0.003
T5	5-CH ₃ (S)	S	H	DMA	7.355	7.248	0.107
T6	5-CH ₃ (S)	0	H	CH ₂ CH=CH ₂	4.154	4.796	-0.642
T7	5-CH ₃ (S)	0	H	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.999	4.029	-0.030
T8	5-CH ₃ (S)	S	8-F	DMA	8.235	7.613	0.622
T9	5-CH ₃ (S)	0	8-Br	DMA	7.324	7.501	-0.177
T10	5-CH ₃ (S)	S	8-Br	DMA	8.521	8.273	0.248
T11	5-CH ₃ (S)	S	8-CH ₃	DMA	7.865	7.338	0.527
T12	5-CH ₃ (S)	S	8-O-CH ₃	DMA	7.468	7.256	0.212
T13	5-CH ₃ (S)	S	9,10-di Cl	DMA	7.592	6.938	0.654
T14	5-CH ₃ (S)	O	8-CN	DMA	5.940	6.051	-0.111
T15	5-CH ₃ (S)	S	8-CN	DMA	7.250	6.630	0.620
T16	CH ₃ (S)	O	8-CH ₃	DMA	6.000	6.730	-0.730
T17	5-CH ₃ (S)	S	10-OCH ₃	DMA	5.330	6.352	-1.022
T18	5-CH ₃ (S)	O	10-OCH ₃	DMA	5.180	5.906	-0.726
T19	5-CH ₃ (S)	S	10-Br	DMA	5.970	6.850	-0.880
T20	5-CH ₃ (S)	S	8-CHO	DMA	6.730	6.548	0.182
T21	5-CH ₃ (S)	O	8-I	DMA	7.060	7.020	0.040
T22	5-CH ₃ (S)	S	8-I	DMA	7.320	7.120	0.200
T23	5-CH ₃ (S)	O	8-C=CH	DMA	6.360	6.293	0.067

^a Calculated by CoMFA model 8



ภาพที่ 3.3.6 แผนภาพคอนทัวร์จากการศึกษา CoMFA (model 8) สำหรับการยับยั้งเอนไซม์ถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ของอนุพันธ์ของทีโม คอนทัวร์สีเขียวแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบสเตอริกสูง คอนทัวร์สีเหลืองแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบสเตอริกต่ำ และแสดงโครงสร้างของโมเลกุลทีโม โมเลกุลที่ 36 ซึ่งมีกัมมันตภาพ ในการยับยั้งสูงสุด



ภาพที่ 3.3.7 แผนภาพคอนทัวร์จากการศึกษา CoMFA (model 8) สำหรับการยับยั้ง เอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอ วี-1 ของอนุพันธ์ของทีโอบี คอนทัวร์สีแดงแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติกสูง และคอนทัวร์สีน้ำเงินแสดงถึงมีอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติกต่ำ และแสดงโครงสร้างของโมเลกุลทีโอบี โมเลกุลที่ 36 ซึ่งมีกัมมันตภาพในการยับยั้งสูงสุด

3.4 อันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์ เอช ไอ วี-1

จากแผนภาพ CoMFA คอนทัวร์ที่ศึกษาระหว่างเนวิราพีนและเอนไซม์แบบ wide type และเอนไซม์แบบ mutant type สามารถชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างอันตรกิริยาของตัวยับยั้งที่มีต่อการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองชนิด กล่าวคือ จากภาพที่ 3.3.2 ได้แสดงภาพ CoMFA คอนทัวร์สี่เหลี่ยมรอบ ๆ หมู่มัแทนที่ R2 ของวง tricyclic ของเนวิราพีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณซึ่งซ้อนทับกับกรดอะมิโน Tyr181 ซึ่งคอนทัวร์นี้แสดงให้เห็นว่ามีความจำกัดด้านขนาดของหมู่มัแทนที่ ผลการศึกษานี้ได้ตรงกับผลการทดลองที่ได้รายงานเกี่ยวกับโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างของเอนไซม์ เอช ไอ วี-1 กับตัวยับยั้ง 4 ชนิดที่แตกต่างกัน [31] ซึ่งได้เสนอว่าหมู่มัแทนที่ที่บริเวณตำแหน่ง C2 เป็นส่วนที่มีอันตรกิริยากับ residues ที่บริเวณ binding site ดังนั้นผลจากการศึกษาจากโครงการนี้จึงสนับสนุนข้อมูลดังกล่าว และเสนอว่า หากมีการเพิ่มหมู่มัแทนที่ในบริเวณรอบ ๆ หมู่มัแทนที่ของตำแหน่ง C2 จะมีผลให้ความสามารถในการยับยั้งลดลงเนื่องจากสูญเสียอันตรกิริยาที่เหมาะสมกับวงอะโรมาติกของ Tyr181 เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเนวิราพีนแล้วพบว่าโครงสร้างบางโครงสร้างที่สอดคล้องกับผลการศึกษานี้ กล่าวคือจากการเปรียบเทียบสารอนุพันธ์ที่ตำแหน่ง C2 (2 alkyl derivative) ในอนุพันธ์ของเนวิราพีน โมเลกุลที่ 4 และโมเลกุลที่ 6-7 (ตารางที่ 2.1) พบว่าค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งลดลงเมื่อมีการเพิ่มขนาดความเกะกะของหมู่มัแทนที่แบบอัลคิลที่ตำแหน่ง C2 นอกจากนี้แล้วแผนภาพ CoMFA electrostatic คอนทัวร์ ซึ่งแสดงโดยคอนทัวร์สีแดงในภาพที่ 3.3.2 บริเวณรอบ ๆ ตำแหน่ง C2 นั้น แสดงให้เห็นว่านอกจากมีความจำกัดในด้านขนาดของหมู่มัแทนที่แล้ว ยังควรพิจารณาถึงการเพิ่มความหนาแน่นของอิเล็กตรอนด้วย และเมื่อได้พิจารณาจากผลการทดลองจะพบว่า การเพิ่มหมู่มัแทนที่ที่ตำแหน่ง C2 เป็น 2-F (เนวิราพีนโมเลกุลที่ 10) และ 2-Cl (เนวิราพีนโมเลกุลที่ 11-13) นั้น ช่วยให้มีการเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนวิราพีนโมเลกุลที่ 12 นั้น จัดได้ว่าเป็นโมเลกุลที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ชนิด wide type สูงสุด (experimental log (1/C) มีค่า 7.999) สำหรับ CoMFA electrostatic คอนทัวร์ ที่แสดงโดยคอนทัวร์สีน้ำเงิน ได้ชี้ให้เห็นว่า บริเวณใกล้เคียงกับ Glu138 ควรมีความหนาแน่นอิเล็กตรอนน้อย ๆ และควรเพิ่มหมู่มัแทนที่ของโครงสร้างของตัวยับยั้งที่บริเวณนี้ด้วย ซึ่งจะเห็นได้จากแผนภาพคอนทัวร์สีเขียวที่แสดงไว้ ผลจากการศึกษานี้ได้สนับสนุนผลการทดลองที่พบว่าเมื่อเปลี่ยนเป็นหมู่มัแทนที่ตำแหน่ง C2 ทำให้กัมมันตภาพในการยับยั้งสูงขึ้น (เนวิราพีนโมเลกุลที่ 30-33 ในตารางที่ 2.1)

สำหรับการพิจารณาอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์จากแผนภาพ CoMFA คอนทัวร์ (ภาพที่ 3.3.4) นั้นพบว่าหมู่มัแทนที่ที่ตำแหน่ง C2 นั้นควรมีการเพิ่มความเกะกะมากขึ้นเพื่อเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้ง แต่ขนาดของหมู่มัแทนที่ถูกจำกัดโดยคอนทัวร์สีแดง โดยเมื่อ

พิจารณาจากข้อมูลโครงสร้างของตัวยับยั้งแล้วจะเห็นว่า เมื่อเพิ่มขนาดของหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C2 ในโมเลกุลของเนวิราพินโมเลกุลที่ 1, 2, 4 และ 10-13 ทำให้เพิ่มค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง แต่ถ้าขนาดของหมู่แทนที่ดังกล่าวใหญ่เกินไป เช่นในโมเลกุลของเนวิราพินโมเลกุลที่ 17-20 กลับทำให้ลดค่ากัมมันตภาพ นอกจากนี้แล้วแผนภาพของ electrostatic contour ที่บริเวณหมู่แทนที่ R1 และใกล้เคียงกับหมู่อะมิโน Glu138 นั้นแสดงให้เห็นว่าควรเพิ่มความเป็นประจุบวกในบริเวณนี้ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาโครงสร้างของโมเลกุลเนวิราพินที่ 30-33 ซึ่งมีหมู่แทนที่เป็นหมู่เอริลที่ตำแหน่งนี้ จะเห็นได้ว่าหมู่เอริลไม่เพียงแต่เพิ่มความเกะกะมากขึ้นแต่ยังเป็นส่วนที่รองรับประจุบวกได้เป็นอย่างดีและสามารถเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ชนิด mutant type เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนของแผนภาพ electrostatic contour สำหรับเอนไซม์ชนิด wide type กับ mutant type แล้วพบว่า มีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่สนับสนุนว่าเนวิราพินโมเลกุลที่ 30-33 มีกัมมันตภาพในการยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์ทั้งสองแบบได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้แล้วการเพิ่มความเกะกะในบริเวณที่ใกล้เคียงกับหมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ C5 และเป็นหมู่ที่อยู่ใกล้กับกรดอะมิโน Tyr188 และ Trp229 โดยจะเห็นได้จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 2.1 ที่แสดงหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ CH_3 ที่ตำแหน่ง C5 จะเพิ่มค่ากัมมันตภาพสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่มีหมู่แทนที่ ($\text{R3} = \text{H}$) จากผลการศึกษาอาจสรุปได้ว่าอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ชนิด mutant type นั้น มีอันตรกิริยาทั้งแบบสเตอริกและอิเล็กโตรสแตติก โดยที่อันตรกิริยาแบบสเตอติกเป็นส่วนช่วยในการทำให้เกิดการจับกับเอนไซม์ (binding) ที่แข็งแรงและรวมทั้งช่วยในการจัดทิศทางของโมเลกุลที่เหมาะสม โดยที่ความจำเพาะในการยับยั้งนั้นเป็นส่วนที่เกิดเนื่องจากอันตรกิริยาแบบสเตอริกกับหมู่อะมิโนในบริเวณ hydrophobic cavity ของเอนไซม์

3.5 การออกแบบโมเลกุลสารใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง

ผลจากการศึกษาที่ได้จาก QSAR และ CoMFA เป็นพื้นฐานสำคัญที่ได้ช่วยในการออกแบบโครงสร้างโมเลกุลใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนั้นจะพิจารณาจากแผนภาพ CoMFA contour และใช้แบบจำลอง CoMFA ที่ดีที่สุดของแต่ละอนุพันธ์ทำนายค่ากัมมันตภาพ และมีโมเลกุลที่มีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์เอช ไอ วี-1 สูงสุดเป็นโมเลกุลเปรียบเทียบ ผลการทำนายโมเลกุลใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงของอนุพันธ์เนวิราพินและทีโบได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3.9 – 3.3.10 ตามลำดับ

3.5.1 การเสนอแนะโครงสร้างของอนุพันธ์ของเนวิราพินใหม่ที่มีกัมมันตภาพสูง

เริ่มจากการพิจารณาเนวิราพินโมเลกุลที่ 32 หรือ โมเลกุล A ในตารางที่ 3.3.9 ซึ่งมีค่ากัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์ชนิด mutant type สูงสุด ($\log (1/C) = 7.397$) จึงนำเอาโมเลกุลนี้เป็นโมเลกุลเปรียบเทียบค่ากัมมันตภาพกับโมเลกุลใหม่ โดยจากการคำนวณด้วย CoMFA model 11 จะให้ค่าการทำนายกัมมันตภาพของโมเลกุลนี้เป็น $\log (1/C) = 7.279$ และจะใช้เป็นค่าเปรียบเทียบต่อไป

จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ R1 ให้เป็นอะตอม H (โมเลกุลที่ 1-10) หรือ หมู่อัลคิลอื่น ๆ เช่น โมเลกุลที่ 11-24 ดังแสดงในตารางที่ 3.3.9 ค่ากัมมันตภาพจะต่ำกว่าค่ากัมมันตภาพของโมเลกุลที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ แต่เมื่อลองเปลี่ยนหมู่แทนที่ R1 ให้เป็นหมู่ pyrrolyl หรือ หมู่ pyrrazoly (โมเลกุลที่ 25-29) แล้วพบว่า สามารถพัฒนาค่ากัมมันตภาพขึ้นได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งหมู่ 4-pyrrazoly ที่มีค่าการทำนายกัมมันตภาพสูงกว่าโมเลกุลเปรียบเทียบคือ มีค่า $\log (1/C) = 7.308$

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลเนวิราพินจึงพิจารณา หมู่ R2 R3 และ R4 ต่อไป ซึ่งพบว่าหมู่ R4 มีข้อจำกัดในส่วนของขนาดและความยาวของสายโซ่ ดังนั้นเมื่อพิจารณาโครงสร้างของโมเลกุลที่ปรับเปลี่ยนใหม่ ได้แก่ โมเลกุลที่ 30-43 พบว่าการปรับเปลี่ยนหมู่ R2 เป็น NO_2 ในโมเลกุลที่ 43 จะให้ค่าทำนายกัมมันตภาพสูงขึ้นเป็น $\log (1/C) = 7.595$ ทั้งนี้ ได้สอดคล้องกับ CoMFA คอนทัวร์ที่เสนอแนะว่าหมู่ R2 ควรจะมีการเพิ่ม electrostatic interaction ด้วย

เมื่อพิจารณาการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ในตำแหน่ง R1 เป็นหมู่ pyrrolyl และ pyrrazolyl ที่มีการแทนที่ภายในวงดังกล่าว เช่น ในโมเลกุลของ 44-64 พบว่า ให้ค่าการทำนายกัมมันตภาพอยู่ในช่วง 7.127-7.361 โดยมีโมเลกุล 64 ที่มีหมู่แทนที่ที่เป็น 5-Cl-3-pyrrolyl ให้ค่าการทำนายกัมมันตภาพดีที่สุด เมื่อพิจารณาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในโมเลกุลที่ 65-84 พบว่า โมเลกุลที่ 72 75 81 และ 84 ซึ่งมีหมู่ R1 เป็น 3-substituted-4-pyrrazoly และหมู่ R2 เป็น F และ NO_2 โดยมี R3 และ R4 เป็นหมู่ CH_3 และ CHCH_2CH_2 ตามลำดับ ให้ค่าทำนายกัมมันตภาพการยับยั้งที่ดีที่สุดกล่าวคือมีค่าอยู่ในช่วง 7.609-7.626 และเป็นช่วงกัมมันตภาพที่สูงกว่าโมเลกุลเปรียบเทียบเป็นอย่างมาก

โครงสร้างของโมเลกุลที่มีค่าการทำนายกัมมันตภาพที่ดีเหล่านี้ จะได้นำไปพิจารณาเพื่อทำการสังเคราะห์และทดสอบกัมมันตภาพต่อไป และอาจมีส่วนช่วยในการพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ที่ดีต่อไปได้ในอนาคต

ตารางที่ 3.3.9 แสดงโครงสร้างของโมเลกุลใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงของอนุพันธ์ของเนวิราพิน ที่มีผลต่อเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ชนิด mutant type และทำนายค่ากัมมันตภาพโดยแบบจำลอง CoMFA ที่ดีที่สุด (model 11)

Cpds.	R1	R2	R3	R4	Calcd. - log (1/C)
A	3-pyrrolyl	H	CH3	CH2CH3	7.279
1	H	H	H	H	5.834
2	H	H	H	CH3	5.981
3	H	H	H	CH2CH3	6.240
4	H	H	H	CHCH2CH	6.150
5	H	H	H	CH(CH3)2	6.123
6	H	H	H	CH2C6H5	5.666
7	H	H	H	CH2CH2CH3	5.372
8	H	CH3	CH3	CH2CH3	6.013
9	H	H	CH3	CH2CH3	6.343
10	H	CH3	H	CH2CH3	6.091
11	CH3	H	CH3	CH2CH3	6.382
12	CH2CH3	H	CH3	CH2CH3	6.031
13	CH2CH2CH3	H	CH3	CH2CH3	6.194
14	CH(CH3)2	H	CH3	CH2CH3	5.953
15	F	H	CH3	CH2CH3	6.937
16	Cl	H	CH3	CH2CH3	6.614
17	Br	H	CH3	CH2CH3	6.625
18	NH2	H	CH3	CH2CH3	6.504
19	NHCH2CH3	H	CH3	CH2CH3	6.459
20	N(CH3)2	H	CH3	CH2CH3	5.774
21	N(CH3)CH2CH2OH	H	CH3	CH2CH3	6.658
22	OH	H	CH3	CH2CH3	6.402
23	OCH3	H	CH3	CH2CH3	6.481
24	SCH3	H	CH3	CH2CH3	6.252
25	2-furanyl	H	CH3	CH2CH3	6.820
26	3-furanyl	H	CH3	CH2CH3	6.953
27	2-pyrrolyl	H	CH3	CH2CH3	6.990
28	3-pyrrazoly	H	CH3	CH2CH3	7.139
29	4-pyrrazoly	H	CH3	CHCH2CH2	7.308
30	3-pyrrolyl	Cl	CH3	CH2CH3	7.279
31	3-pyrrolyl	Br	CH3	CH2CH3	7.282
32	3-pyrrolyl	F	CH3	CH2CH3	7.273
33	3-pyrrolyl	CH3	CH3	CH2CH3	7.411
34	3-pyrrolyl	OH	CH3	CH2CH3	7.312
35	3-pyrrolyl	OCH3	CH3	CH2CH3	7.391
36	3-pyrrolyl	NO2	CH3	CH2CH3	7.453
37	4-pyrrazoly	Cl	CH3	CHCH2CH2	7.385
38	4-pyrrazoly	Br	CH3	CHCH2CH2	7.397
39	4-pyrrazoly	F	CH3	CHCH2CH2	7.375
40	4-pyrrazoly	CH3	CH3	CHCH2CH2	7.492

ตารางที่ 3.3.9 (ต่อ)

Cpds.	R1	R2	R3	R4	Calcd. log (1/C)
41	4-pyrrazolyl	OH	CH3	CHCH2CH2	7.377
42	4-pyrrazolyl	OCH3	CH3	CHCH2CH2	7.483
43	4-pyrrazolyl	NO2	CH3	CHCH2CH2	7.595
44	5-CH3-3-pyrrolyl	H	CH3	CH2CH3	7.237
45	5-OCH3-3-pyrrolyl	H	CH3	CH2CH3	7.191
46	2-Cl-3-pyrrolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.269
47	2-Br-3-pyrrolyl	H	CH3	CH2CH3	7.223
48	2-F-3-pyrrolyl	H	CH3	CH2CH3	7.194
49	2-CH3-3-pyrrolyl	H	CH3	CH2CH3	7.155
50	2-OCH3-3-pyrrolyl	H	CH3	CH2CH3	7.127
51	2-OH-3-pyrrazolyl	H	CH3	CH2CH3	7.207
52	3-Cl-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.256
53	3-Br-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.259
54	3-F-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.243
55	3-OH-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.154
56	3-CH3-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.196
57	5-Cl-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.229
58	5-Br-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.244
59	5-F-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.256
60	5-CH3-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.133
61	5-OH-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.187
62	5-OCH3-4-pyrrazolyl	H	CH3	CHCH2CH2	7.153
63	5-Cl-3-pyrrolyl	Cl	CH3	CH2CH3	7.361
64	5-Cl-3-pyrrolyl	Br	CH3	CH2CH3	7.364
65	5-Cl-3-pyrrolyl	F	CH3	CH2CH3	7.357
66	5-Cl-3-pyrrolyl	CH3	CH3	CH2CH3	7.486
67	5-Cl-3-pyrrolyl	OCH3	CH3	CH2CH3	7.502
68	5-Cl-3-pyrrolyl	OH	CH3	CH2CH3	7.545
69	5-Cl-3-pyrrolyl	NO2	CH3	CH2CH3	7.522
70	3-Cl-4-pyrrazolyl	Cl	CH3	CHCH2CH2	7.406
71	3-Cl-4-pyrrazolyl	Br	CH3	CHCH2CH2	7.423
72	3-Cl-4-pyrrazolyl	F	CH3	CHCH2CH2	7.622
73	3-Cl-4-pyrrazolyl	CH3	CH3	CHCH2CH2	7.524
74	3-Cl-4-pyrrazolyl	OH	CH3	CHCH2CH2	7.527
75	3-Cl-4-pyrrazolyl	NO2	CH3	CHCH2CH2	7.616
76	3-Br-4-pyrrazolyl	Cl	CH3	CHCH2CH2	7.408
77	3-Br-4-pyrrazolyl	Br	CH3	CHCH2CH2	7.427
78	3-Br-4-pyrrazolyl	F	CH3	CHCH2CH2	7.395
79	3-Br-4-pyrrazolyl	CH3	CH3	CHCH2CH2	7.530
80	3-Br-4-pyrrazolyl	OH	CH3	CHCH2CH2	7.573
81	3-Br-4-pyrrazolyl	NO2	CH3	CHCH2CH2	7.617
82	3-F-4-pyrrazolyl	CH3	CH3	CHCH2CH2	7.562
83	3-F-4-pyrrazolyl	OH	CH3	CHCH2CH2	7.568
84	3-F-4-pyrrazolyl	NO2	CH3	CHCH2CH2	7.609

3.5.2 การเสนอแนะโครงสร้างใหม่ของอนุพันธ์ของทีโบที่มีกัมมันตภาพสูง

การออกแบบโมเลกุลตัวยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์ของทีโบนั้น ได้พิจารณาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ในที่นี้คือโมเลกุลที่ 36 ในตารางที่ 2.3 หรือโมเลกุล B ในตารางที่ 3.3.10 โดยอาศัยแผนภาพ CoMFA คอนทัวร์ และทำนายค่ากัมมันตภาพโดยใช้แบบจำลอง CoMFA model 8 ทั้งนี้การคำนวณค่ากัมมันตภาพของโมเลกุลเปรียบเทียบมีค่าเป็น $\log(1/C) = 8.293$ ซึ่งให้ค่าใกล้เคียงกับค่ากัมมันตภาพจากการทดลองมาก

จากแผนภาพ CoMFA คอนทัวร์ (ภาพที่ 3.3.6 และ 3.3.7) พบว่าหมู่แทนที่บริเวณ C2 หรือ X นั้นมีความจำเพาะและจำกัดอยู่เพียงอะตอม S หรือ O สำหรับหมู่แทนที่ Z นั้นมีความจำกัดในด้านขนาดและความยาวของสายโซ่ ในการพิจารณาขั้นแรกจึงทำการปรับเปลี่ยนเฉพาะหมู่แทนที่ R ของโมเลกุลทีโบ เป็นหมู่อัลคิลต่าง ๆ ดังแสดงในโมเลกุลที่ 1-20 จะเห็นได้ว่าโมเลกุลต่าง ๆ เหล่านี้มีค่าการทำนายกัมมันตภาพที่ต่ำกว่าโมเลกุลเปรียบเทียบ โดยโมเลกุลที่ 1 ที่มีหมู่ $R = 5\text{-CH}_3(\text{S})$ และมีค่า $\log(1/C) = 7.770$ เมื่อนำโมเลกุลที่ 1 นี้มาพิจารณาปรับเปลี่ยนหมู่ Z เป็นสายโซ่ที่มีความยาวต่าง ๆ กันในโมเลกุลที่ 21-34 พบว่ามีบางโครงสร้างที่สามารถให้ค่าการทำนายกัมมันตภาพสูงกว่าโมเลกุลเปรียบเทียบ กล่าวคือโมเลกุลที่ 33 และ 34 ที่มีหมู่ Z เป็น $\text{CH}_2\text{CCl}=\text{CCH}_2\text{BrCH}_2\text{Cl}$ และ $\text{CH}_2\text{CCl}=\text{CCH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$ ให้ค่ากัมมันตภาพเป็น $\log(1/C) = 8.310$ และ 8.308 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของโมเลกุลโดยการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ Y ที่ตำแหน่ง C8 และ C9 ของโมเลกุลทีโบ (โมเลกุลที่ 35-45) สามารถให้ค่ากัมมันตภาพที่สูงขึ้นเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีหมู่แทนที่เป็น 8-Cl และ/หรือ 9-Cl ทั้งนี้ค่าทำนายกัมมันตภาพของโมเลกุลเหล่านี้มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 8.173-8.835 และโมเลกุลที่ 35 ที่มีหมู่แทนที่เป็น 8-Cl ให้ค่าทำนายกัมมันตภาพสูงที่สุด เมื่อลองปรับเปลี่ยนหมู่ X เป็นอะตอมออกซิเจนในโมเลกุลที่ 46-48 ไม่สามารถพัฒนาค่าทำนายกัมมันตภาพให้สูงขึ้นไปกว่านี้ได้

โครงสร้างของโมเลกุลที่มีค่าการทำนายกัมมันตภาพที่ดีทั้งของอนุพันธ์ของเนวิราพิน และอนุพันธ์ของทีโบที่ถูกเสนอนี้ จะได้นำไปพิจารณาเพื่อทำการสังเคราะห์และทดสอบกัมมันตภาพการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ต่อไป และอาจมีส่วนช่วยในการพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ที่ดีต่อไปได้ในอนาคต

ตารางที่ 3.3.10 แสดงโครงสร้างของโมเลกุลใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงของอนุพันธ์ของทีโบ ที่มีผลต่อเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 และทำนายค่ากัมมันตภาพโดยแบบจำลอง CoMFA ที่ดีที่สุด (model 8)

Cpds.	R	X	Y	Z	Expt. log(1/C)	Calcd. log(1/C) ^a
B	5-CH ₃ (S)	S	8-Cl	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	8.300	8.293
1	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.770
2	5-CH ₃ (R)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.421
3	5-CH ₂ CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.621
4	5-CH ₂ CH ₃ (R)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.442
5	5-CH ₂ CH ₂ CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.571
6	5-CH ₂ CH ₂ CH ₃ (R)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.416
7	5-i-Pr(S)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.331
8	5-i-Pr(R)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.431
9	5-CH=CH ₂ (S)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		6.532
10	5-CH=CH ₂ (R)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		6.003
11	4-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.281
12	4-CH ₃ (R)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.542
13	4-CH ₂ CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.270
14	4-CH ₂ CH ₃ (R)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.348
15	4-CH ₂ -CH ₂ CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.000
16	4-CH ₂ -CH ₂ CH ₃ (R)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.169
17	4-i-Pr(S)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.113
18	4-i-Pr(R)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		7.040
19	4-CH=CH ₂ (S)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		6.199
20	4-CH=CH ₂ (R)	S	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂		6.117
21	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=CHCH ₃		6.766
22	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃		6.041
23	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		6.286
24	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=CH ₂		3.408
25	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂		3.469
26	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CCl=C(CH ₃) ₂		8.011
27	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CBr=C(CH ₃) ₂		7.998
28	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=CCH ₃ CH ₂ Cl		7.994
29	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=CCH ₃ CH ₂ Br		7.996
30	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=CCH ₂ ClCH ₂ Cl		8.065
31	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=CCH ₂ BrCH ₂ Br		8.072
32	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CH=CCH ₂ ClCH ₂ Br		8.068
33	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.310
34	5-CH ₃ (S)	S	H	CH ₂ CCl=CCH ₂ ClCH ₂ Cl		8.308
35	5-CH ₃ (S)	S	8-Cl	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.835
36	5-CH ₃ (S)	S	9-Cl	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.328
37	5-CH ₃ (S)	S	8-Br	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.780
38	5-CH ₃ (S)	S	9-Br	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.313
39	5-CH ₃ (S)	S	9-F	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.320
40	5-CH ₃ (S)	S	8-CH ₃	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.747

ตารางที่ 3.3.10 (ต่อ)

Cpds.	R	X	Y	Z	Expt.	Calcd.
					log(1/C)	log(1/C) ^a
41	5-CH ₃ (S)	S	9-CH ₃	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.414
42	5-CH ₃ (S)	S	8,9-Cl,Cl	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.774
43	5-CH ₃ (S)	S	8,9-Cl,Br	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.723
44	5-CH ₃ (S)	S	8,9-Br,Cl	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.729
45	5-CH ₃ (S)	S	8,9-Br,Br	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.173
46	5-CH ₃ (S)	O	8-Cl	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		8.017
47	5-CH ₃ (S)	O	8-Br	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		7.936
48	5-CH ₃ (S)	O	8-CH ₃	CH ₂ CCl=CCH ₂ BrCH ₂ Cl		7.899

^a calculated by CoMFA model 8

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผล

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ของสารกลุ่ม nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor สองอนุพันธ์คือ dipyridodiazepinone หรือ เนวिरาพีน และอนุพันธ์ของทีโบ โดยมีจำนวนโครงสร้างโมเลกุลในอนุพันธ์ของเนวिरาพีนจำนวน 75 โมเลกุล และโครงสร้างของทีโบจำนวน 69 โมเลกุล ทั้งนี้ได้นำโครงสร้างเริ่มต้นของโครงสร้างหลักคือเนวिरาพีนและทีโบจากผลการทดลองโดยวิธีผลึกเอกซเรย์ จากนั้นได้ศึกษาโครงสร้างคอนฟอร์เมชันของตัวยับยั้งเนวिरาพีนโดยระเบียบวิธีทางเคมีควอนตัมสองระเบียบวิธีคือ เซมิเอมพิริคัล (AM1 PM3 และ MNDO) และแอบอินิซิโอ (HF/STO-3G และ HF/3-21G) จากผลการศึกษาพบว่าการคำนวณทั้งสองระเบียบวิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน กล่าวคือค่าพลังงานของโมเลกุลมีคอนฟอร์เมชันที่เสถียรที่สุดเพียง 1 local minimum ที่มุมไดฮีดรอลของวงไซโคลโพรพิลเท่ากับ 208.5 และได้คำนวณ full optimization ของคอนฟอร์เมชันนี้ด้วยวิธี HF/6-31G ด้วย จากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบพารามิเตอร์ของโครงสร้าง ได้แก่ ค่าความยาวพันธะ และค่ามุมพันธะ กับผลจากการทดลองคือ วิธีผลึกเอกซเรย์ นอกจากนี้แล้วยังได้ทำการคำนวณสมบัติทางสเปกโตรสโคปีโดยใช้โครงสร้างที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี HF/6-31G เพื่อคำนวณค่า chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ ด้วยวิธีเดนซิตีฟังก์ชันแนล (B3LYP/6-311**G(2d,p)) ผลการคำนวณพบว่าสามารถทำนาย chemical shift ของ $^1\text{H-NMR}$ ได้สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลอง ดังนั้นระเบียบวิธีที่ใช้ในการคำนวณโครงสร้างจึงเป็นระเบียบวิธีที่เชื่อถือได้ และโครงสร้างของตัวยับยั้งที่ได้จากการคำนวณนี้ได้นำไปใช้ในการจำลองโมเลกุลและสร้างโครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเนวिरาพีนและทีโบ

ในงานวิจัยต่อมาได้ทำการสร้างโครงสร้างของตัวยับยั้งโดยวิธีโมเลคิวลาร์โมเดลลิง ได้แก่สารอนุพันธ์ของเนวिरาพีนจำนวน 75 โครงสร้างและสารอนุพันธ์ของทีโบจำนวน 69 โครงสร้าง จากนั้นได้นำไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 โดยวิธี QSAR โดยคำนวณสมบัติทางอิเล็กทรอนิกส์ได้แก่ค่าการกระจายของอิเล็กตรอนและสมบัติทางโครงสร้างได้แก่ค่า partition coefficient ค่า molecular refractivity ค่า molecular surface area และค่า polarizability เพื่อนำมาใช้เป็นตัวอธิบายโครงสร้างของโมเลกุลตัวยับยั้ง ทั้งนี้ ค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 กับตัวยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์ของเนวिरาพีนนั้นมีสองชนิดคือ ชนิด wide type และ mutant type สำหรับอนุพันธ์ของทีโบนั้นศึกษาเฉพาะกัมมันตภาพ

ที่มีต่อเอนไซม์ชนิด wide type ผลการศึกษาพบว่าแบบจำลอง QSAR สำหรับกลุ่มอนุพันธ์ของเนวราพีนให้ค่าความน่าเชื่อถือทางสถิติค่อนข้างต่ำ โดยแบบจำลองที่ดีที่สุดนั้นมีค่า multiple correlation coefficient, r , เท่ากับ 0.568 เท่านั้น ในขณะที่ แบบจำลอง QSAR ของอนุพันธ์ทีโอบ ให้ค่า r เท่ากับ 0.869 ซึ่งนับว่าเป็นแบบจำลองที่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวอธิบายโครงสร้างกับกัมมันตภาพได้เป็นอย่างดี และยังเป็นแบบจำลองที่มีความสามารถในการทำนายที่ดีด้วย กล่าวคือมีค่า Q^2 เท่ากับ 0.677 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ ดังนั้น สำหรับกลุ่มอนุพันธ์ของเนวราพีนจึงยังต้องมีการพัฒนาตัวอธิบายโครงสร้างของโมเลกุลในกลุ่มต่อไป

นอกจากนี้แล้วโครงการวิจัยได้นำระเบียบวิธีวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามโมเลกุล (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) มาศึกษาในโครงการนี้ด้วย เพื่ออธิบายสมบัติของโครงสร้างที่สำคัญในการแสดงกัมมันตภาพยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ชนิดที่ไม่มี การกลายพันธุ์ (wild type RT) ในเอนไซม์ สำหรับอนุพันธ์ของเนวราพีนได้ศึกษากับเอนไซม์ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ (Y181C RT) ด้วย โครงสร้างของโมเลกุลทั้งหมดที่ได้คำนวณไว้แล้วจากการศึกษาโดยวิธี QSAR จะถูกนำไปวางทับกับโมเลกุลหลัก (alignment) ซึ่งได้แก่โครงสร้างที่มีกัมมันตภาพสูงสุดของแต่ละอนุพันธ์ เพื่อคำนวณอันตรกิริยาแบบ steric และ electrostatic ระหว่างโมเลกุล ซึ่งจะต้องทำการปรับเปลี่ยนชนิดของ probe atom ด้วย ผลการศึกษาโดยวิธีวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามโมเลกุลสามารถสร้างแบบจำลอง CoMFA ได้เป็นอย่างดี โดยระเบียบวิธี Partial Least Squares และ cross-validation ซึ่งต้องมีการทดสอบความสามารถในการทำนายกัมมันตภาพทั้งในส่วนของการ training set และ test set โดยการทำนายกัมมันตภาพของสารยับยั้งนอกเหนือจากที่ใช้ในการสร้างความสัมพันธ์ สำหรับอนุพันธ์เนวราพีนมี test set จำนวน 22 โครงสร้าง และอนุพันธ์ของทีโอบจำนวน 23 โครงสร้าง ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้มีค่าการยับยั้งเอนไซม์จากการทดลองแล้ว ผลจากการศึกษาพบว่าแบบจำลอง CoMFA ให้ผลการทำนายกัมมันตภาพที่สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลอง เมื่อนำแผนภาพ steric คอนทัวร์และ electrostatic คอนทัวร์ ที่ได้จากการศึกษา มาพิจารณาร่วมกับตัวอธิบายโมเลกุลจากวิธี QSAR รวมทั้งโครงสร้างของ hydrophobic cavity ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ ทำให้สามารถอธิบายความสำคัญของอันตรกิริยาแบบสเตอริกในโครงสร้างของตัวยับยั้งกับ hydrophobic cavity ของเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย amino acid residues โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Tyrosine 181 ได้เป็นอย่างดี และเมื่อกรด amino ในตำแหน่งดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์จาก tyrosine เป็น cysteine จึงทำให้ขาดอันตรกิริยาสเตอริกระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ในบริเวณนี้ และอาจทำให้ตัวยับยั้งไม่สามารถแสดงกัมมันตภาพที่ดีได้ ซึ่งผลการศึกษานี้ นับเป็นการค้น

พบที่สำคัญที่สามารถอธิบายอันตรกิริยาที่แตกต่างกันของตัวยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์และมีการกลายพันธุ์ได้โดยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์โมเดลลิง

ผลการศึกษาที่ได้เสนอมานี้ทั้งหมดนี้ได้ใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาปรับเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลที่คาดว่าจะมีกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์สูงสำหรับอนุพันธ์ของเนวิราพีนและอนุพันธ์ของทีโบ โดยได้เสนอโครงสร้างของโมเลกุลใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งจะได้พิจารณาสังเคราะห์โมเลกุลเหล่านี้และทดสอบค่ากัมมันตภาพที่แท้จริง และอาจทำให้มีการพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ที่ดีต่อไป

หนังสืออ้างอิง

- [1] Larder, B.A., and Kemp, S.D., *Science*, 246, 1155-1158 (1989).
- [2] Huang, P., Farquhar, D., Plunkett, W., *J.Biol.Chem.*, 265, 11914 (1990).
- [3] Tan, C.-K., Civil, R., Mian, A.M., So, A.G., Downey, K.M., *Biochemistry*, 30, 4831 (1991).
- [4] Balzarini, J., Karlsson, A., and De Clercq, E., *Mol.Pharmacol.*, 44, 694-701 (1993).
- [5] De Clercq, E., *J.Med.Chem.*, 38, 2491-2517 (1995).
- [6] Joao, H.C., De Vreese, K., Pauwels, R., De Clercq, E., Henson, G.W., and Bridger, G.J., *J.Med.Chem.*, 38, 3865-3873 (1995).
- [7] Tanaka, H., Takashima, H., Ubasawa, M., Sekiya, K., Nitta, I., Baba, M., Shigeta, S., Walker, R.T., De Clercq, E., and Miyasaka, T., *J.Med.Chem.*, 35, 337-345 (1992).
- [8] Tanaka, H., Takashima, H., Ubasawa, M., Sekiya, K., Nitta, I., Baba, M., Shigeta, S., Walker, R.T., De Clercq, E., and Miyasaka, T., *J.Med.Chem.*, 35, 4713-4719 (1992).
- [9] Debyser, Z., Pauwels, R., Andreies, K., Desmyter, J., Kukla, M., Janssen, P.A.J., De Clercq, E., *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 88, 1451 (1991).
- [10] Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Schols, D., Kukla, M.J., Breslin, H.J., Raeymaeckers, A., Van Gelder, J., Woesten-borghs, R., Heykants, J., Schellekens, H., Janssen, M.A.C., De Clercq, E., Janssen, P.A.J., *Nature*, 343, 470 (1990).
- [11] Baba, M., Tanaka, H., De Clercq, E., Pauwels, R., Balzarini, J., Schols, D., Nakashima, H., Perno, C.-F., Walker, R.T., Miyasaka, T., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 165, 1375 (1989).
- [12] Miyasaka, T., Tanaka, H., Baba, M., Hayakawa, H., Walker, R.T., Balzarini, J., De Clercq, E., *J.Med.Chem.*, 32, 2507 (1989).
- [13] Merluzzi, V.J., Hargrave, K.D., Labadia, M., Grozinger, K., Skoog, M., Wu, J.C., Shih, C.-K., Eckner, K., Hattox, S., Adams, J., Rosenthal, A.S., Faanes, R., Eckner, R.J., Koup, R.A., Sullivan, J.L., *Science*, 250, 1411 (1990).

- [14] Hargrave, K.D., Proudfoot, J.R., Grozinger, K.G., Cullen, E., Kapadia, S.R., Patel, U.R., Fuchs, V.U., Mauldin, S.C., Vious, J. Behnek, M.L., Klunder, J.M., Pal, K., Skiles, J.W., McNeil, D.W., Rose, J.M., Chow, G.C., Skoog, M.T., Wu, J.C., Schmidt, G., Engel, W.W., Eberlein, W.G., Saboe, T.D., Campbell, S.J., Rosenthal, A.S., and Adams, J., *J.Med.Chem.*, 1991, 34, 2231-2241 (1991).
- [15] De Clercq, E., *Med.Res.Rev.*, 13, 229 (1993).
- [16] De Clercq, E., *Exp.Opin.Invest.Drugs*, 3, 253 (1994).
- [17] Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., and Steitz, T.A., *Science*, 256, 1783 (1992).
- [18] Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L., Clark, R., Hizi, A., Hughes, S.H., and Arnold, E., *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 90, 6320 (1993).
- [19] Velazquez, S., Alvarez, R., San-Felix, A., Jimeno, M.L., De Clercq, E., Balzarini, J., and Camarasa, M.J., *J.Med.Chem.*, 38, 1641-1649 (1995).
- [20] Spence, R.A., Kati, W.M., Anderson, D.S., and Johnson, K.A., *Science*, 267, 988-993 (1995).
- [21] Hannongbua, S., Lawtrakul, L., and Limtrakul, J., *J.Comp.-Aided.Mol.Des.*, 10, 145-152 (1996).
- [22] Hannongbua, S., Lawtrakul, L., Sottriffer, C.A., and Rode, B.M., *Quant.Struct.-Act.Relatsh.*, 15, 1-6 (1996).
- [23] (a) Proudfoot, J.R., Hargrave, K.D., Kapadia, S.R., Patel, U.R., Grozinger, K.G., McNeil, D.W., Cullen, E., Cardozo, M., Tong, L., Kelly, T.A., Mauldin, S.C., Fuchs,V.U., Vitous, J., West, M., Klunder, J., Raghavan, P., Skiles, J.W., Mui, P., Rose, J., David, E., Richmond, D., Suklivan, J. L., Farina, V., Shih, C.K.,Grob and Adams, J. Novel non-nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. 4. 2-substituted dipyrindodiazepinones as potent inhibitors of both wild type and cysteine-181 reverse transcriptase enzyme, *J.Med.Chem.*, 1995, 38, 4830.
- (b) Kelly, T.A., Proudfoot, J. R., McNeil, D.W., Patel R.U.P, David, E, Hargrave, K.P., Peter M., Cardozo, M., Agarwal, A. and Adams, J. Novel non-nucleoside inhibitors of human

immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. 5. 4-substituted and 2,4-disubstituted analogs of nevirapine J.Med.Chem., 1995, 38, 4839.

(c) Kelly, T.A., McNeil, D.W., Rose, J.M., David, E., Shih, C.K. and Grob, P.M. Novel non-nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. 6. 2-Indol-3-yl- and 2-azaindol-3-yl-dipyridodiazepinones. J.Med. Chem. 1997, 40,2430.

[24] ALCHEMY2000, Tripos Associates Inc., St. Louis, MO, 1998.

[25] Bodor, N., Gabanyi, Z., and Wong, C., J.Am.Chem.Soc., 1989, 111, 3783.

[26] (a) Ghose, A.K., and Crippen, G.M., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1987, 27, 21.

(b) Viswanadhan, V.N., Ghose, A.K., Revankar, G.N., and Robind, R.K.,
J. Chem.Inf.Comput.Sci., 1989, 29, 163.

[27] Miller, K.J., J.Am.Chem.Soc., 1990, 112, 8533.

[28] ChemPlus 1.0, Hypercube Inc., Waterloo, ON, 1993.

[29] Cramer, R.D., III, Patterson, D.E., and Bunce, J.D., J. Am. Chem. Soc., 1988, 110, 5959.

[30] Hargrave, K.D., Proudfoot, J.R., and Grozinger, K.G., J. Med. Chem. 1991, 34, 2231.

[31] Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., Somers, D., Ross, C., Kirby, I., Keeling, J., Darby, G., Jones, Y., Stuart, D., and Stammers, D., Nat. Struct. Biol., 1995, 2, 293.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Hannongbua, S*, Pungpo, P., Limtrakul, J. and Wolschann, P., Quantitative Structure-Activity Relationships and Comparative Molecular Field Analysis of TIBO Derivatives HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors, *J. Comp.-Aided Mol. Des.*, 1999, 13, 563-577.
2. Pungpo, P and Hannongbua, S*, Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Study on HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors in the Class of Dipyridodiazepinone Derivatives, Using Comparative Molecular Field Analysis. *submitted for publication.*
3. Hannongbua, S*, Prasithichokekul, S., and Pungpo, P., Molecular Calculations on the Conformational Analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors of Nevirapine, *to be submitted.*

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Hannongbua, S*, Pungpo, P., Limtrakul, J., and Wolschann, P., 3D-QSAR Analysis and Molecular Design of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor of TIBO Derivatives. In Proceedings of 2nd Annual National Symposium on Computational Science and Engineering, National Science and Technology Development Agency, Bangkok, March 26th -27th, 1998, p. 37-54.
2. Pungpo, P. and Hannongbua, S., Comparative Molecular Field Analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase in the Class of Dipyridodiazepinone DerivativesL Comparison of Different Alignment Rules. In The Proceedings of the 3rd Annual National Symposium on Computational Science, organized by NSTDA/GREC/CSEP on March 24th-26th, 1999, Chulalongkorn University, Bangkok, 216-234.
3. Hannongbua, S., Prasithichokekul, S., and Pungpo, P., Computer-Aided Molecular Modelling of Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, Based on QSAR and 3D-QSAR methods. To be presented in the 13th European Symposium on Quantitative

Structure-Activity Relationships, Heinrich Heine Universitaet Duesseldorf, Germany, Aug
27th – Sep 1st, 2000.

ภาคผนวก

Quantitative structure-activity relationships and comparative molecular field analysis of TIBO derivatised HIV-1 reverse transcriptase inhibitors

Supa Hannongbua^{a,*}, Pornpan Pungpo^a, Jumras Limtrakul^a & Peter Wolschann^b

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand; ^bInstitut für Theoretische Chemie und Strahlenchemie der Universität Wien, Währinger Strasse 17, A-1090 Wien, Austria

Received 11 September 1998; Accepted 8 March 1999

Key words: HIV-1, molecular modeling, NNRTIs, QSAR, quantum chemical calculations, TIBO derivatives, 3D-QSAR

Summary

Quantitative structure-activity relationships (QSAR) and Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) have been applied in order to explain the structural requirements of HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) inhibitory activity of TIBO derivatives on the MT-4 cells. The best QSAR model is satisfactory in both statistical significance and predictive ability. The derived structural descriptors indicate the importance of electronic contributions toward the HIV-1 RT inhibition of this class of compounds. However, it could not reveal any hydrophobic influence because of high collinearity between C2 and log *P* variables. In order to cope with steric interaction in the correlation, 3D-QSAR was performed using CoMFA. The obtained CoMFA model shows high predictive ability, $r_{cv}^2 = 0.771$, and clearly demonstrates its potential in the steric feature of the molecules through contour maps, explaining a majority (81.8%) of the variance in the data. Consequently, these results can be useful in identifying the structural requirements of TIBO derivatives and helpful for better understanding the HIV-1 RT inhibition. Eventually, they provide a beneficial basis to design new and more potent inhibitors of HIV-1 RT.

Introduction

TIBO or tetrahydroimidazo-[4, 5, 1-jk][1, 4]-benzodiazepinone (Figure 1), one of the most specific and potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication, and its derivatives were developed by Pauwels et al. [1]. The available kinetic [2–4] and structural [5–7] studies make it clear that NNRTIs inhibit the enzyme noncompetitively and they all bind at a common allosteric site in HIV-1 RT. However, the effectivity is reduced by the very rapid development of drug-resistance mutations [8]. This causes a limitation to the potential utilization of this inhibitor. Numerous experimental investigations on complex structures of HIV-1 RT with TIBO and other NNRTIs [9, 10] have been performed, however the mechanism of action of

this inhibitor as well as of drug resistance has still not been clarified. During complexation of HIV-1 RT with NNRTIs, the side chain and backbone of residues surrounding the pocket adjust to each bound drug in a common fashion. These results reveal that this protein is able to accommodate inhibitors of different chemical structures. The flexibility of the HIV-1 RT binding pocket implies that it may be not feasible to generate a generic NNRT binding site that could be used to model RT in the search for more potent drugs.

Our previous studies on HIV-1 RT inhibitors indicated that electronic and molecular properties of the inhibitors obtained from quantum calculations can be used as the structural descriptors [11, 12]. By considering the common features observed with these chemically divergent NNRTI, we have attempted to investigate the functional roles of particular groups. In order to get a closer insight into the structural requirements for a powerful inhibitor, we have extended our studies to include a series of compounds that show

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: fs-ispb@ku.ac.th; Tel. 066-2-9428034; Fax. 066-2-5793955.

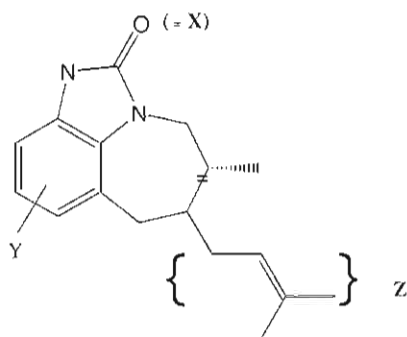


Figure 1. General structure of tetrahydroimidazo [4,5,1-jk][1,4] benzodiazepinone.

widely different potencies. The compounds studied belong to the TIBO chemical series (Table 1).

In an attempt to cope with such problems, it is required to have a precise and detailed understanding of the important structure-activity relationships. Therefore, a quantitative structure-activity relationship (QSAR) study [13] was performed. In this procedure, atomic net charges obtained from molecular orbital calculations were used as the electronic descriptor. In addition, lipophilicity ($\log P$), molar refractivity (MR) and molar polarizability (POL), were used as molecular properties. In order to use a more general approach to deal with steric interaction, Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA), developed by Cramer et al. [14], was employed. This analysis aims to establish a relationship between HIV-1 RT inhibition of TIBO analogues and steric and electrostatic fields around them.

In the present work, QSAR and CoMFA have been performed for the first time with aims of (a) determining quantitative structure-activity relationship and structural requirements of HIV-1 NNRTI in the class of TIBO derivatives, (b) obtaining information about the structural characteristics underlying the inhibition of this class of compounds.

Methods of calculation

Biological data

The chemical structures of 46 TIBO derivatives are illustrated in Table 1, together with their biological activities, expressed as $\log(1/C)$, where C is the effective concentration of a compound required to achieve 50% (IC_{50}) protection of MT-4 cell against the cytopathic effect of HIV-1. The $\log(1/C)$ value was used as the

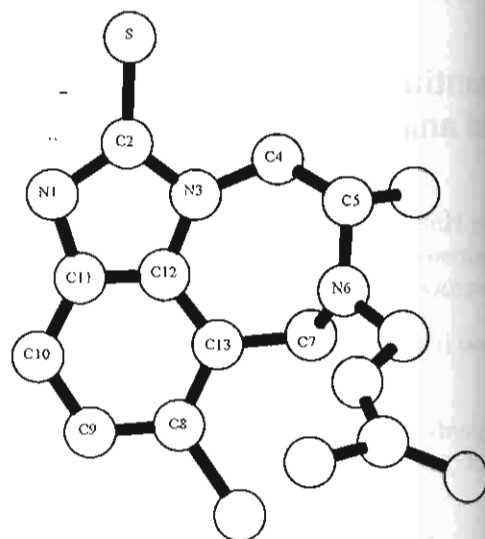


Figure 2. Structure of TIBO, obtained from complexed structure between TIBO and HIV-1 reverse transcriptase [9]; the atom numbering as used in this study is indicated.

dependent variable in SAR analysis. In CoMFA, these 46 TIBO derivatives are used as training set. Addition of 24 compounds (compounds T1-T24) was done in order to test the validation of the model (test set, see Table 8). The activity data of these inhibitors was taken from References 15, 28 and 30.

Calculations of structural properties for QSAR analysis

The starting geometry of TIBO (Figure 2) is obtained from a crystallographic structure of the enzyme-inhibitor complex [9]. Modification of substituents of all TIBO derivatives was done by ALCHEMY III [16]. Full geometry optimization of all structures was carried out with the AM1 semiempirical molecular orbital method [17], implemented in the GAUSSIAN 94 program [18] on a DEC AlphaStation model 250/4 266. Consequently, partial atomic charges were derived. Based on optimized geometry, molecular properties were calculated by the Chemplus 1.0 program [19]. Molecular polarizability (POL) can be expressed as the sum of atomic polarizabilities, plus corrections depending on the types of bonds present. These have been presented as approximate sums of bond polarizabilities [20]. The other investigated molecular descriptors, MR and $\log P$, were determined by the same procedure as described in the previous study [11]. The multiple linear regression (MLR) in SPSS for Windows Release 6.0 [21] was used to develop a

Table 1. Structure of TIBO derivatives^a, experimental and calculated log (1/C) HIV-1 RT inhibitory affinities

Compd. No	R	X	Y	Z	log(1/C)		Residual
					Experimental	Calculated ^b	
1	H	S	8-Cl	DMA ^c	7.340	8.006	-0.666
2	H	S	9-Cl	DMA	6.790	7.167	-0.377
3	5-CH ₂ CH ₃	O	-	2-MA ^d	4.300	4.958	-0.658
4	5-CH(CH ₃) ₂	O	-	2-MA	5.000	5.051	-0.051
5	5-CH(CH ₃) ₂	O	-	DMA	5.000	5.044	-0.044
6	5,5-di-CH ₃	O	-	2-MA	4.640	4.994	-0.354
7	4-CH ₃	O	-	2-MA	4.490	4.521	-0.031
8	4-CH ₃ (S)	S	9-Cl	2-MA	6.170	6.578	-0.408
9	4-CH ₃	S	9-Cl	CH ₂ CH(CH ₂) ₂	5.660	6.416	-0.756
10	4-CH(CH ₃) ₂	O	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.130	4.433	-0.303
11	4-CH(CH ₃) ₂	O	-	2-MA	4.900	4.419	0.481
12	4-CH ₂ CH ₂ CH ₃	O	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.740	3.598	0.142
13	4-CH ₂ CH ₂ CH ₃	O	-	2-MA	4.320	4.469	-0.149
14	7-CH ₃	O	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.080	5.021	-0.941
15	7-CH ₃	O	-	DMA	4.920	5.016	-0.096
16	7-CH ₃	O	8-Cl	DMA	6.840	6.671	0.169
17	7-CH ₃	O	9-Cl	DMA	6.790	5.787	1.003
18	7-CH ₃	S	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	5.610	6.260	-0.650
19	7-CH ₃	S	-	DMA	7.110	6.266	0.845
20	7-CH ₃	S	8-Cl	DMA	7.920	7.932	-0.012
21	7-CH ₃	S	9-Cl	DMA	7.640	7.115	0.525
22	4,5-di-CH ₃ (cis)	O	-	DMA	4.250	4.346	-0.096
23	4,5-di-CH ₃ (cis)	S	-	DMA	5.650	5.727	-0.077
24	4,5-di-CH ₃ (trans)	S	-	CH ₂ CH(CH ₂) ₂	4.870	4.725	0.145
25	4,5-di-CH ₃ (trans)	S	-	DMA	4.840	5.753	-0.913
26	4-keto-5-CH ₃	S	9-Cl	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.300	3.959	0.341
27	4,5-benzo	S	-	CH ₂ CH(CH ₂) ₂	5.000	4.944	0.056
28	5,7-di-CH ₃ (trans)	S	-	DMA	7.380	6.193	1.187
29	5,7-di-CH ₃ (cis)	S	-	DMA	5.940	6.265	-0.325
30	5,7-di-CH ₃ (R,R: trans)	O	9-Cl	DMA	6.640	5.771	0.869
31	5,7-di-CH ₃ (R,R: trans)	S	9-Cl	DMA	6.320	7.012	-0.692
32	5,7-di-CH ₃ (S,S: trans)	O	9-Cl	DMA	5.300	5.127	0.173
33	4,7-di-CH ₃ (trans)	S	-	DMA	4.590	4.423	0.167
34	5,6-CH ₂ C(=CHCH ₃)CH ₂ (S)	S	9-Cl	-	5.420	6.126	-0.706
35	6,7-(CH ₂) ₄	S	9-Cl	-	5.700	6.934	-1.234
36	5-CH ₃ (S)	S	8-Cl	DMA	8.300	7.880	0.420
37	5-CH ₃ (S)	O	9-Cl	DMA	6.740	5.840	0.900
38	5-CH ₃ (S)	S	9-Cl	DMA	7.370	7.066	0.304
39	5-CH ₃ (S)	S	9-Cl	CH ₂ CH(CH ₂) ₂	7.470	7.079	0.391
40	5-CH ₃ (S)	S	-	CH ₂ CH(CH ₂) ₂	7.220	6.261	0.959
41	5-CH ₃	O	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.220	5.127	-0.907
42	5-CH ₃	S	-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	5.780	6.285	-0.505
43	5-CH ₃	O	-	2-MA	4.460	5.071	-0.611
44	5-CH ₃	S	-	DMA	7.010	6.281	0.729
45	5-CH ₃ (S)	O	-	DMA	5.480	5.054	0.426
46	5-CH ₃ (S)	S	-	2-MA	7.580	6.237	1.344

^aSee Figure 1.^bCalculated by Equation 5.^cDMA = 3,3-dimethylallyl.^d2-MA = 2-methylallyl.

QSAR model. The validity of the model was proven by multiple correlation coefficients (r), standard deviation (s) and F -test value. The reliability of the model was indicated in terms of predictive $r^2(Q^2)$.

Alignment rule and CoMFA analysis

The alignment rule, i.e., the positioning of a molecular model within a fixed lattice, is the most important input variable in CoMFA. In this study, all TIBO structures were fully optimized by *ab initio* calculations with the HF/3-21G basis set. The availability of crystallographic data for the HIV-1 RT/TIBO complex structure offered a possibility for alignment rule, i.e., minimization within the active site. To reduce the computational complexity, a substructure sphere of 12 Å radius centered on the ligand of the inhibitor/enzyme complex was defined as active site. The rigid fragments common to investigated compounds were superimposed to the equivalent atoms in a TIBO template molecule. Backbone atoms of the selected active site were kept rigid during minimization. Side chain atoms and ligand atoms were allowed to relax. After minimization, these ligands were extracted from the active site. For the active site, partial atomic charges were loaded from the SYBYL Biopolymer dictionary (Kollman all atom method). Partial atomic charges required for calculations of electrostatic interaction were computed by the MOPAC program [22] in SYBYL 6.4 [23], using the semiempirical method AM1.

A CoMFA cubic lattice, with 2 Å grid spacing, was generated around these molecules based on the molecular volume of the structures. These dimensions ensured that the grid extended beyond the molecular dimensions by 4.0 Å in all directions. In this investigation, three different atoms, sp^3 carbon atom with +1 charge (default probe atom in SYBYL), sp^3 oxygen atom with -1 charge and H atom with +1 charge, served as probe atoms. The probe atom was placed at each lattice point and the interactions of the steric and electrostatic fields with each atom in the molecule were all calculated with CoMFA standard scaling and then put in a CoMFA QSAR table. In order to speed up the analysis and reduce the amount of noise, the minimum sigma value was set to 2.0 kcal/mol and energy cutoff values of 30 kcal/mol were selected for both electrostatic and steric fields.

For the CoMFA model, partial least-squares (PLS) methodology was employed to perform the correlation between the steric and electrostatic properties

and inhibitory activity. The orthogonal latent variables were extracted by the NIPALS algorithm [24] and subjected to full cross-validation (leave-one-out method). The analyses were carried out with a maximum of ten components, and subsequently, using the number of component (noc) at which the difference in the r_{cv}^2 value to the next one was less than 0.02 [25]. Following the cross-validated analysis, a non cross-validated analysis was performed using the optimal number of components previously identified and was then employed to analyze the CoMFA results.

Predictive ability

The overall predictive ability of the analysis was expressed in terms of Q^2 or r_{cv}^2 in QSAR and CoMFA, respectively, which is defined as

$$Q^2 \text{ or } r_{cv}^2 = (SSY - PRESS)/SSY,$$

where SSY represents the variance of the biological activities of molecules around the mean value and PRESS is the prediction error sum of squares derived from the leave-one-out method. The uncertainty of the prediction is defined as

$$SPRESS = [PRESS/(n - k - 1)]^{1/2},$$

where k is the number of variables in the model and n is the number of compounds used in the study.

Results

QSAR analysis

The following atomic net charges of various atoms in tricyclic rings, N1, C2, N3, C4, C5, N6, C7, C8, C9, C10, C11, C12 and C13, illustrated in Figure 1, were considered as electronic variables. In order to account for molecular properties of molecules, partition coefficients ($\log P$), molecular refractivity (MR) and molecular polarizability (POL) were employed. All investigated variables are presented in Table 2.

All possible combinations of parameters were considered to develop the QSAR model. A large number of satisfactory statistical models was obtained. The quality of models, judged by r , s , F , Q^2 and $SPRESS$, was statistically tested. Consequently, Equations 1-9 were consecutively evaluated. Based on statistics for the coefficients of variables of Equations 7-9 (Table 3) and possible chance correlations [26] (Table 4), the use of more than six independent variables was not

2. Atomic net charge and molecular properties for compounds in Table 1, used in the QSAR study

log P	MR	POL	N1	C2	N3	C4	C5	N6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13
3.630	56.453	34.436	-0.4068	0.0720	-0.2911	-0.1451	-0.1446	-0.3371	-0.0977	-0.0777	-0.1650	-0.1795	0.0234	0.0272	-0.0790
3.630	56.453	34.436	-0.4074	0.0745	-0.2939	-0.1421	-0.1445	-0.3383	-0.0911	-0.1722	-0.0701	-0.1745	0.0318	0.0225	-0.0917
4.854	48.804	31.183	-0.4628	0.4604	-0.3211	-0.1358	-0.0440	-0.3452	-0.0881	-0.1871	-0.1775	-0.1932	0.0374	0.0107	-0.0965
5.257	53.276	33.018	-0.4390	0.4508	-0.3274	-0.1318	-0.0362	-0.3470	-0.0854	-0.1824	-0.1812	-0.1862	0.0203	0.0162	-0.0991
5.571	57.884	34.853	-0.4324	0.4514	-0.3373	-0.1226	-0.0257	-0.3429	-0.0858	-0.1812	-0.1837	-0.1841	0.0137	0.0302	-0.1032
4.464	48.917	31.183	-0.4342	0.4546	-0.3406	-0.1216	0.0488	-0.3349	-0.0892	-0.1826	-0.1830	-0.1848	0.0159	0.0289	-0.1020
4.386	44.280	29.348	-0.4457	0.4457	-0.3010	-0.0599	-0.1125	-0.3684	-0.0781	-0.1867	-0.1785	-0.1893	0.0253	0.0086	-0.0971
3.730	56.263	34.436	-0.4074	0.0661	-0.2728	-0.0605	-0.1119	-0.3731	-0.0771	-0.1740	-0.0690	-0.1765	0.0316	0.0127	-0.0866
3.211	61.899	33.854	-0.4073	0.0749	-0.2876	-0.0437	-0.1292	-0.3487	-0.0850	-0.1779	-0.0675	-0.1777	0.0318	0.0246	-0.0892
4.840	56.242	31.375	-0.4388	0.4470	-0.3056	-0.0430	-0.0924	-0.3924	-0.0487	-0.1864	-0.1797	-0.1869	0.0174	0.0126	-0.0994
5.257	53.276	33.018	-0.4358	0.4495	-0.3140	-0.0397	-0.1055	-0.3823	-0.0706	-0.1851	-0.1810	-0.1859	0.0149	0.0176	-0.0997
4.834	56.372	31.375	-0.4428	0.4443	-0.3058	-0.0500	-0.1019	-0.3928	-0.0610	-0.1888	-0.3058	-0.1895	0.0223	0.0136	-0.0968
5.251	53.405	33.018	-0.4413	0.4454	-0.3001	-0.0556	-0.1138	-0.3677	-0.0777	-0.1857	-0.1787	-0.1885	0.0218	0.0041	-0.0939
3.969	47.246	27.705	-0.4446	0.4485	-0.3154	-0.1444	-0.1422	-0.3385	0.0051	-0.1865	-0.1789	-0.1883	0.0245	0.0149	-0.0938
4.700	48.888	31.183	-0.4409	0.4475	-0.3175	-0.1444	-0.1378	-0.3421	0.0033	-0.1847	-0.1797	-0.1878	0.0217	0.0135	-0.0910
5.328	53.382	33.111	-0.4372	0.4465	-0.3081	-0.1509	-0.1372	-0.3430	-0.0017	-0.0778	-0.1664	-0.1829	0.0236	0.0171	-0.0694
5.328	53.382	33.111	-0.4517	0.4541	-0.3153	-0.1456	-0.1380	-0.3429	0.0038	-0.1735	-0.0698	-0.1804	0.0395	0.0128	-0.0818
2.685	54.735	30.865	-0.4077	0.0743	-0.2916	-0.1424	-0.1427	-0.3408	0.0048	-0.1857	-0.1779	-0.1857	0.0213	0.0226	-0.0930
3.419	56.377	34.343	-0.4080	0.0731	-0.2891	-0.1435	-0.1424	-0.3354	0.0031	-0.1859	-0.1778	-0.1859	0.0215	0.0208	-0.0927
4.044	60.871	36.271	-0.4079	0.0671	-0.2827	-0.1489	-0.1430	-0.3340	-0.0029	-0.0790	-0.1645	-0.1809	0.0238	0.0240	-0.0712
4.044	60.871	36.271	-0.4075	0.0616	-0.2761	-0.1557	-0.1318	-0.3513	0.0084	-0.1706	-0.0707	-0.1756	0.0314	0.0027	-0.0751
5.113	53.306	33.018	-0.4483	0.4499	-0.3043	-0.0399	-0.0424	-0.3357	-0.0908	-0.1890	-0.1769	-0.1913	0.0271	0.0102	-0.0968
3.829	60.795	36.178	-0.4077	0.0667	-0.2728	-0.0536	-0.0164	-0.3790	-0.0694	-0.1860	-0.1770	-0.1871	0.0211	0.0095	-0.0944
2.996	61.823	33.761	-0.4097	0.0766	-0.2798	-0.0028	-0.0449	-0.3356	-0.0874	-0.1907	-0.1771	-0.1885	0.0206	0.0271	-0.0490
3.829	60.795	36.178	-0.4074	0.0638	-0.2652	-0.0553	-0.0159	-0.3704	-0.0719	-0.1861	-0.1772	-0.1868	0.0205	0.0104	-0.0950
5.062	56.463	32.879	-0.4185	0.0679	-0.3371	0.3413	-0.0431	-0.3492	-0.0883	-0.1786	-0.0615	-0.1833	0.0525	0.0219	-0.0891
3.844	47.138	36.081	-0.4068	0.0871	-0.2571	0.0668	0.0508	-0.3603	-0.0615	-0.1845	-0.1758	-0.1850	0.0235	0.0247	-0.0974
3.829	60.795	36.178	-0.4069	0.0792	-0.3000	-0.1342	-0.0478	-0.3418	0.0048	-0.1842	-0.1788	-0.1858	0.0198	0.0257	-0.0916
3.829	60.795	36.178	-0.4072	0.0659	-0.2806	-0.1482	-0.0387	-0.3498	0.0112	-0.1824	-0.1793	-0.1856	0.0204	0.0050	-0.0843
5.741	57.801	34.946	-0.4476	0.4548	-0.3222	-0.1375	-0.0474	-0.3407	0.0066	-0.1724	-0.0712	-0.1789	0.0359	0.0179	-0.0841
4.457	65.298	38.106	-0.4067	0.0774	-0.2996	-0.1352	-0.0476	-0.3425	0.0054	-0.1718	-0.0709	-0.1754	0.0297	0.0270	-0.0835
5.741	57.801	34.946	-0.4369	0.4423	-0.2954	-0.1536	-0.0284	-0.3546	0.0106	-0.1722	-0.0776	0.0315	-0.0033	-0.0033	-0.0757
3.829	60.795	36.178	-0.4072	0.0640	-0.2679	-0.0624	-0.1092	-0.3718	0.0171	-0.1865	-0.1865	-0.1876	0.0201	0.0111	0.0111
3.216	54.391	33.662	-0.4071	0.0883	-0.3119	-0.0777	-0.0737	-0.3252	-0.0890	-0.1767	-0.0713	-0.1740	0.0271	0.0542	-0.0516
2.881	57.351	32.019	-0.4077	0.0682	-0.2844	-0.1523	-0.1251	-0.3626	0.0168	-0.1745	-0.0713	-0.1761	0.0306	0.0116	-0.0694
4.044	60.871	36.271	-0.4055	0.0790	-0.3014	-0.1348	-0.0438	-0.3433	-0.0954	-0.0774	-0.1661	-0.1799	0.0209	0.0344	-0.0763
5.328	53.382	33.111	-0.4454	0.4553	-0.3423	-0.1360	-0.0420	-0.3423	-0.0883	-0.1714	-0.0714	-0.1779	0.0349	0.0174	-0.0895
4.044	60.871	36.271	-0.4064	0.0782	-0.2986	-0.1349	-0.0437	-0.3430	-0.0898	-0.1716	-0.0706	-0.1752	0.0301	0.0247	-0.0879
3.211	61.899	33.854	-0.4074	0.0753	-0.2893	-0.1414	-0.0290	-0.3686	-0.0726	-0.1754	-0.0702	-0.1759	0.0304	0.0222	-0.0897
2.583	57.405	31.926	-0.4075	0.0771	-0.2900	-0.1404	-0.0288	-0.3679	-0.0728	-0.1878	-0.1782	-0.1863	0.0204	0.0209	-0.0978
3.969	47.246	27.705	-0.4263	0.4465	-0.3215	-0.1380	-0.0488	-0.3421	-0.0871	-0.1830	-0.1813	-0.1839	0.0149	0.0174	-0.1017
2.685	54.735	30.865	-0.4071	0.0809	-0.3022	-0.1333	-0.0496	-0.3434	-0.0875	-0.1843	-0.1784	-0.1848	0.0212	0.0252	-0.0999
4.386	44.280	29.348	-0.4390	0.4517	-0.3284	-0.1345	-0.0494	-0.3409	-0.0877	-0.1826	-0.1809	-0.1861	0.0208	0.0174	-0.0997
3.415	56.377	34.343	-0.4068	0.0816	-0.3036	-0.1328	-0.0488	-0.3434	-0.0878	-0.1830	-0.1787	-0.1850	0.0205	0.0247	-0.0984
4.700	48.888	31.183	-0.4375	0.4498	-0.3249	-0.1350	-0.0418	-0.3416	-0.0885	-0.1832	-0.1809	-0.1863	0.0193	0.0172	-0.0982
3.101	51.768	32.508	-0.4069	0.0806	-0.2997	-0.1336	-0.0444	-0.3410	-0.0914	-0.1844	-0.1785	-0.1857	0.0207	0.0237	-0.0959

$$\begin{aligned}\log(1/C) = & 16.743(\pm 7.022)C8 - 3.320(\pm 1.175)C2 \\ & - 6.506(\pm 2.489)C4 + 6.473(\pm 3.866)C9 \\ & - 12.312(\pm 11.227)C13 + 8.697(\pm 1.474) \\ (n = 46, r = 0.869, s = 0.662, F = 24.579, \\ Q^2 = 0.677, S_{PRESS} = 0.724),\end{aligned}\quad (5)$$

$$\begin{aligned}\log(1/C) = & 13.604(\pm 7.149)C8 - 5.415(\pm 2.085)C2 \\ & - 7.867(\pm 2.618)C4 + 5.054(\pm 3.848)C9 \\ & - 13.552(\pm 10.671)C13 \\ & + 0.491(\pm 0.413)\log P \\ & + 6.148(\pm 2.610), \\ (n = 46, r = 0.887, s = 0.626, F = 23.887, \\ Q^2 = 0.712, S_{PRESS} = 0.726).\end{aligned}\quad (6)$$

In the above correlation, n is the number of compounds used to derive the model, F is overall F -statistics for the addition of each successive term, and values in parentheses are the 95% confidence limit of each coefficient. The statistics for the coefficients are summarized in Table 3. The correlation matrix for the variables is given in Table 4. In order to examine the predictive power of the model, a cross-validation test was performed on the data set.

CoMFA analysis

Initially, a critical step in the construction of the CoMFA model was the attainment of an alignment rule. All TIBO compounds were fully optimized using *ab initio* calculations with the HF/3-21G basis set and the corresponding minimum energy conformers were aligned as described before. The effect of the probe atom was investigated for the reason that CoMFA depends on the interaction energy between probe atoms and molecules. All obtained analyses included both field types, i.e. steric and electrostatic fields. In addition, separated analysis of only steric or electrostatic field types was also performed. CoMFA with a default setting probe (sp^3C) yielded a model with r_{cv}^2 of 0.570 (model 1) as shown in Table 5. Regarding the other probe atom, sp^3O (-1), produced better r_{cv}^2 (model 2, $r_{cv}^2 = 0.594$) than those obtained from sp^3C and H ($+1$) (model 3, $r_{cv}^2 = 0.544$). It is important to note that steric field type models indicate higher predictive ability than that obtained from electrostatic field type models as shown in models 1–3.

The atomic charge of the sp^3O probe atom was thus selected for the next investigation on the effect

of lattice spacing. The results of grid-CoMFA tests are summarized in Table 6. The r_{cv}^2 indicated that the grid spacing set to 2 Å was suitable. A decrease in grid spacing leads to increasing the number of interaction energy values; however, it also increases the noise in PLS analysis.

Discussion

QSAR model

According to the QSAR models listed above, it was found that all equations show statistical significance. The decrease of F -value on addition of more parameters into Equations 2 and 3, producing Equation 4, indicates that the suitable equation would be either Equation 2 or 3. However, the predictive ability (Q^2) was not acceptable as the Q^2 value should be greater than 0.6 [27]. Therefore, only three models, Equations 4, 5, and 6 were considered to be reasonable predictive models. A comparison of these three models shows that the predictive ability of Equation 6 (Q^2) is the highest (0.712). This equation contains $C2$ and $\log P$ variables which show high collinearity (0.776, see Table 4). In order to evaluate the reliability of both variables in the equation, $C2$ or $\log P$ were excluded from Equation 6. After taking out $\log P$, the result is identical to Equation 5. By this procedure, omitting $C2$ produced Equation 10.

$$\begin{aligned}\log(1/C) = & 20.296(\pm 8.597)C8 \\ & + 9.036(\pm 4.550)C9 \\ & - 4.928(\pm 3.044)C4 \\ & - 0.417(\pm 0.28)\log P \\ & - 7.398(\pm 13.414)C13 \\ & + 11.2315(\pm 2.126) \\ (n = 46, r = 0.797, s = 0.807, F = 13.903, \\ Q^2 = 0.536, S_{PRESS} = 0.910)\end{aligned}\quad (10)$$

It is observed that the statistical criteria of Equation 10 were lower than that of Equation 5. In addition, such a model contained one insignificant coefficient of $C13$ as expressed by the confidence interval and F -statistics (Table 3).

In comparing the quality of models, Equation 5 and Equation 4, it is evident that Equation 5 shows higher predictive ability (0.677). Consequently, Equation 5 was considered to be the best QSAR model in the

Table 5. Summary of CoMFA models with 46 TIBO compounds at different probe atoms

Model	Probe atom	Field type	Noc	r_{cv}^2	s-press	r^{2a}	s	F	Outliers (residual)	Steric contb ^b
1	sp ³ C(+1)	both	3	0.570	0.854	0.847	0.510	77.590	cpd.39(-1.197)	79.3
		st	3	0.541	0.883	0.822	0.549	64.863		
		el	2	0.369	1.023	0.731	0.668	58.468		
2	sp ³ O(-1)	both	3	0.594	0.831	0.860	0.487	86.247	cpd.33(-1.005)	79.6
		st	3	0.579	0.846	0.832	0.535	69.179		
		el	2	0.369	1.023	0.731	0.668	58.468		
3	H(+1)	both	3	0.544	0.880	0.850	0.505	79.079	cpd.28(1.05)	74.7
		st	3	0.541	0.883	0.822	0.549	64.863		
		el	2	0.369	1.023	0.731	0.668	58.468		
4 ^c	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.629	0.796	0.877	0.459	97.07	cpd.46(0.908)	79.5
		st	3	0.603	0.822	0.847	0.519	72.74		
		el	3	0.475	0.958	0.880	0.458	73.344		
5 ^d	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.657	0.756	0.887	0.434	104.743	cpd.39(1.01)	79.7
		st	3	0.629	0.786	0.853	0.494	77.669		
		el	4	0.533	0.894	0.900	0.412	88.238		
6 ^c	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.689	0.712	0.901	0.402	118.543	cpd.15(0.996)	80.2
		st	3	0.660	0.744	0.869	0.462	86.547		
		el	4	0.471	0.941	0.890	0.430	76.565		
7 ^f	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.721	0.680	0.919	0.367	143.049	Cpd.40(0.901)	81.5
		st	3	0.700	0.705	0.897	0.413	110.53		
		el	4	0.469	0.951	0.899	0.414	82.425		
8 ^g	sp ³ O(-1.0)	both	3	0.771	0.612	0.941	0.312	195.028	Cpd.21(0.662)	81.8
		st	2	0.741	0.644	0.920	0.363	141.242		
		el	2	0.487	0.905	0.785	0.586	69.785		

^aConventional r^2 .^bSteric contribution in %.^cElimination of compd. N. 33 (remaining 45 compds in the training set).^dElimination of compds N. 33 and 46 (remaining 44 compds in the training set).^eElimination of compds N. 33, 46 and 39 (remaining 43 compds in the training set).^fElimination of compds N. 33, 46, 39 and 15 (remaining 42 compds in the training set).^gElimination of compds N. 33, 46, 39, 15 and 40 (remaining 41 compds in the training set).

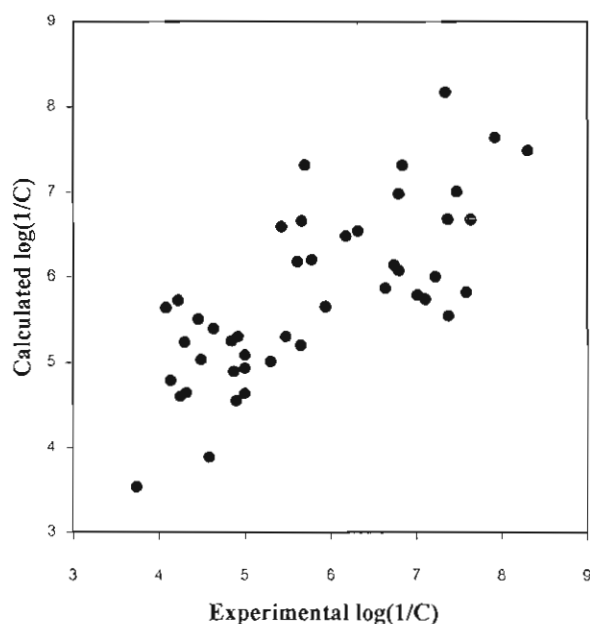
present study, both in statistical significance and predictive ability. The variables used in this equation have no mutual correlation as shown in Table 4. The multiple correlation coefficient of this equation is 0.869 and it accounts for 75.5% of the variation in the biological data. The experimental versus the calculated affinities obtained from Equation 5 are reported in Table 1 and plotted in Figure 3.

Inspection of the best QSAR model (Equation 5) apparently indicates the importance of electronic characteristic contribution to the HIV-1 RT inhibition of TIBO analogues. Among the atomic charge variables, five indicators, C8, C2, C4, C9 and C13 were found to be the main parameters of influence in the correlation. It can be seen from all QSAR equations (Equations 1-10) that atomic charge at the C8-position seems to

be the major contributor to the affinity. The positive value of the coefficient for this term suggests that low electron density on the C8-position correlates with increased pharmacological activity. Therefore, the presence of a strong electron-withdrawing substituent at this position is required. This is also in agreement with the empirical observation that compounds substituted by 8-Cl and/or 9-Cl atoms in the benzene ring are more active than those without it [28]. Consequently, the influence of the C9 parameter on biological activity could be explained in the same manner. In contrast, the coefficient of C2 showing a negative sign suggests that the lower positive charge at such positions leads to a higher affinity. Substitution of a sulfur atom for an oxygen atom at the C2-position lowers the positive charge on the site. This was consistently found by

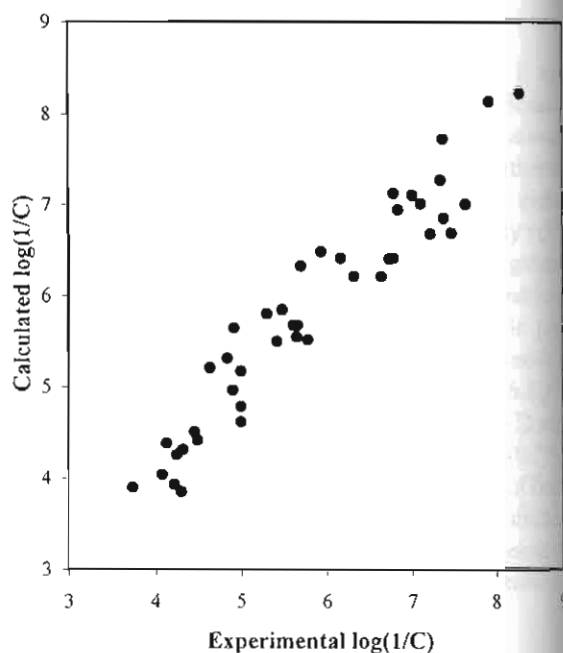
Table 6. The statistic results with lattice grid space by 1 Å and 2 Å

Probe atom	Grid (Å)	Noc	r_{cv}^2	s-press	r^2 ^a	-s	F	Steric contb ^b
sp ³ O(-1.0)	1	5	0.585	0.868	0.958	0.273	182.805	77.6
	2	3	0.594	0.831	0.860	0.487	86.247	79.6

^aConventional r^2 .^bSteric contribution in %.Figure 3. Comparison of experimental with calculated HIV-1 affinities ($\log(1/C)$) obtained from conventional QSAR (Equation 5).

Kukla et al. [29] who reported that the replacement of urea (one) with a thiourea (thione) at this position always yielded much more potent derivatives. It may be assumed that both sulfur and oxygen may be involved in some charge transfer interactions with the receptor. Considering the presence of the C4 atomic variable in the correlation, it indicates the importance of partial atomic charge on the carbon attached to the *R*-substituent. Its negative coefficients bring the desirable optimum electron density at this position. Due to there being a ring juncture between the benzene and diazepine rings of C13, the changes of substitution at several positions in cyclic rings also affect the variations of electron densities at each position, resulting in pharmacological activity.

Regarding the molecular parameters employed in the QSAR study, addition of a lipophilicity term, represented by $\log P$ to Equation 5, as presented in

Figure 4. Plot of calculated versus experimental HIV-1 RT inhibitory affinities ($\log(1/C)$) obtained from non-cross-validation of CoMFA model 8 for training set compounds.

Equation 6, produced better statistical results. However, a high intercorrelation between $\log P$ and C2 (0.776, listed in Table 4) was encountered. Therefore, this model was found to be unreliable. It is also observed that other molecular properties, i.e. MR, a measure of substituent bulk, and POL were not accounted for in the obtained QSAR model. It could be explained by the high collinearity between both variables to each other and to C2.

It is interesting to note that atomic net charge of TIBO analogues, carried out by ab initio geometrical optimization with HF/3-21G basis sets, were also used as parameters in QSAR analysis. Nevertheless, we have consistently found that the quality of the QSAR models, obtained by ab initio (on the HF/3-21G level) charges, could not be improved, both in statistical

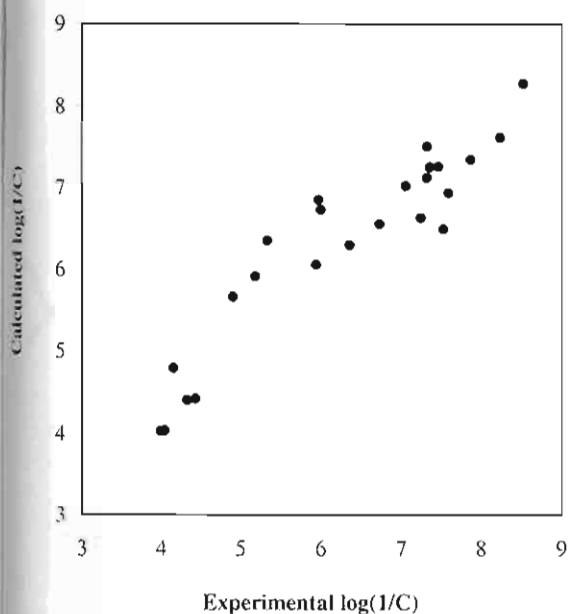


Figure 5. Plot of calculated versus experimental HIV-1 RT inhibitory affinities ($\log(1/C)$) obtained from non-cross-validation of CoMFA model 8 for test set compounds.

significance and predictive ability, compared to those obtained from AM1 charges*.

CoMFA model

Model 2 expresses a higher level of internal consistency compared to the standard method (model 1), but one compound (compound 33) is significantly out of line as shown in Table 7. Inspection of outliers obtained from other CoMFA models was done and the maximum residual value is shown in Table 5. As compound 33 was found to be a maximum outlier, therefore, elimination of this compound from the CoMFA analysis produced model 4. However, a residual is still in the same range as obtained by compound 33. The consecutive outliers, compounds 46, 39, 15 and 40, were then removed, resulting in models 5, 6, 7 and 8, respectively. The final model, model 8, satisfied both predictive ability ($r_{cv}^2 = 0.771$) and maximum outlier. The differences seen in connection with these outliers cannot be explained by the model. However, it was observed that the 4,7-dimethyl substituents (trans) of compound 33 are different from other di-substituents in these analogues. Compounds 39 and 40 seem very identical to each other, except that the difference occurs in Y-substituent (9-Cl). Both are

Table 7. Experimental and calculated $\log(1/C)$ HIV-1 RT inhibitory affinities of training TiBO compounds, based on CoMFA analysis

Compd No.	Expt. $\log(1/C)$	Calc. $\log(1/C)^a$	Residual
1	7.340	7.305	0.035
2	6.790	7.197	-0.407
3	4.300	3.806	0.494
4	5.000	4.603	0.397
5	5.000	5.089	-0.089
6	4.640	5.078	-0.438
7	4.490	4.661	-0.171
8	6.170	6.182	-0.012
9	5.660	5.576	0.084
10	4.130	4.300	-0.170
11	4.900	4.945	-0.045
12	3.740	4.073	-0.333
13	4.320	4.190	0.130
14	4.080	3.754	0.326
15	4.920	5.772	-0.852
16	6.840	7.065	-0.225
17	6.790	6.477	0.313
18	5.610	5.349	0.261
19	7.110	7.130	-0.020
20	7.920	8.266	-0.346
21	7.640	7.000	0.640
22	4.250	4.115	0.135
23	5.650	5.613	0.037
24	4.870	5.519	-0.649
25	4.840	5.061	-0.221
26	4.300	5.039	-0.739
27	5.000	4.724	0.276
28	7.380	6.495	0.885
29	5.940	6.449	-0.509
30	6.640	6.070	0.570
31	6.320	6.070	0.250
32	5.300	5.689	-0.389
33	4.590	5.595	-1.005
34	5.420	5.703	-0.283
35	5.700	6.321	-0.621
36	8.300	8.296	0.004
37	6.740	6.463	0.277
38	7.370	7.630	-0.260
39	7.470	6.469	1.001
40	7.220	6.520	0.700
41	4.220	3.791	0.429
42	5.780	5.410	0.370
43	4.460	4.762	-0.302
44	7.010	6.997	0.013
45	5.480	5.977	-0.497
46	7.580	6.605	0.975

*Unpublished data.

^a Calculated by CoMFA model 2.

Table 8. Structure and predicted log (1/C) HIV-1 RT inhibitory affinities of the tested TIBO compounds

Cpds	R	X	Y	Z	Expt. log(1/C)	Calc. log(1/C) ^a	Residual
^b T1	H	O	H	DMA	4.900	5.663	-0.763
^b T2	H	O	H	2-MA	4.330	4.405	-0.075
^b T3	H	O	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.050	4.037	0.013
^b T4	H	O	H	CH ₂ C(C ₂ H ₅)=CH ₂	4.430	4.423	0.003
^c T5	5-CH ₃ (S)	S	H	DMA	7.355	7.248	0.107
^b T6	5-CH ₃ (S)	O	H	CH ₂ CH=CH ₂	4.154	4.796	-0.642
^b T7	5-CH ₃ (S)	O	H	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.999	4.029	-0.030
^c T8	5-CH ₃ (S)	S	8-F	DMA	8.235	7.613	0.622
^c T9	5-CH ₃ (S)	O	8-Br	DMA	7.324	7.501	-0.177
^c T10	5-CH ₃ (S)	S	8-Br	DMA	8.521	8.273	0.248
^c T11	5-CH ₃ (S)	S	8-CH ₃	DMA	7.865	7.338	0.527
^c T12	5-CH ₃ (S)	S	8-O-CH ₃	DMA	7.468	7.256	0.212
^c T13	5-CH ₃ (S)	S	9,10-di Cl	DMA	7.592	6.938	0.654
^c T14	5-CH ₃ (S)	O	8-CN	DMA	5.940	6.051	-0.111
^c T15	5-CH ₃ (S)	S	8-CN	DMA	7.250	6.630	0.620
^c T16	CH ₃ (S)	O	8-CH ₃	DMA	6.000	6.730	-0.730
^c T17	5-CH ₃ (S)	S	10-OCH ₃	DMA	5.330	6.352	-1.022
^c T18	5-CH ₃ (S)	O	10-OCH ₃	DMA	5.180	5.906	-0.726
^c T19	5-CH ₃ (S)	S	10-Br	DMA	5.970	6.850	-0.880
^c T20	5-CH ₃ (S)	S	8-CHO	DMA	6.730	6.548	0.182
^c T22	15-CH ₃ (S)	O	8-I	DMA	7.060	7.020	0.040
^c T22	5-CH ₃ (S)	S	8-I	DMA	7.320	7.120	0.200
^c T23	5-CH ₃ (S)	O	8-C=CH	DMA	6.360	6.293	0.067
^c T24	5-CH ₃ (S)	S	8-C=CH	DMA	7.530	6.489	1.041

^aCalculated by CoMFA model 8.^bReference 30.^cReference 28.

similar to compound 38. The similarity of compound 46 is also involved by the 5-CH₃(S) substitution as shown in compound 45. Finally, CoMFA cannot distinguish the structural similarity of compounds 15 and 14. Steric and electrostatic contributions of model 8 are 81.8% and 18.2%, respectively, with $r_{cv}^2 = 0.771$, $S_{PRESS} = 0.612$, $noc = 3$. Other statistical results obtained are that the conventional r^2 is 0.941, standard error of estimate is 0.312, F is 195.028 and probability (P) of obtaining this value of F if r^2 were actually zero (prob. of $r^2 = 0$) is lower than 0.001. The non-cross-validated analysis of model 8 is plotted in Figure 4.

Prediction for compounds in the test set

The obtained CoMFA model (model 8) was used to predict the inhibitory activity of compounds in the test set. The observed and predicted inhibitory activities of 24 compounds (T1-T24) are listed in Table 8. The residual values indicated that our CoMFA model can

predict the activity of TIBO derivatives not included in the training set. The model accurately predicted the activities for compounds T2, T3, T4, T7, T21 and T23 and generally predicted for T5, T6, T8-T15, T20 and T22. Comparison of predicted and experimental activities of the test set is plotted in Figure 5.

Steric and electrostatic contributions

The CoMFA steric and electrostatic fields for all 46 TIBO compounds are summarized as contour maps in Figures 6 and 7. Steric and electrostatic interactions between enzyme-inhibitor are also considered, therefore, amino acid residues surrounding the TIBO compound in the complex structure were merged into both figures. In Figure 6, the green and yellow contour maps represent regions of space whose occupancy by ligand, respectively, increases or decreases the receptor binding affinity. There are favorable steric regions corresponding to the location around the N6 side chain in the diazepine ring. Furthermore, there is a slightly

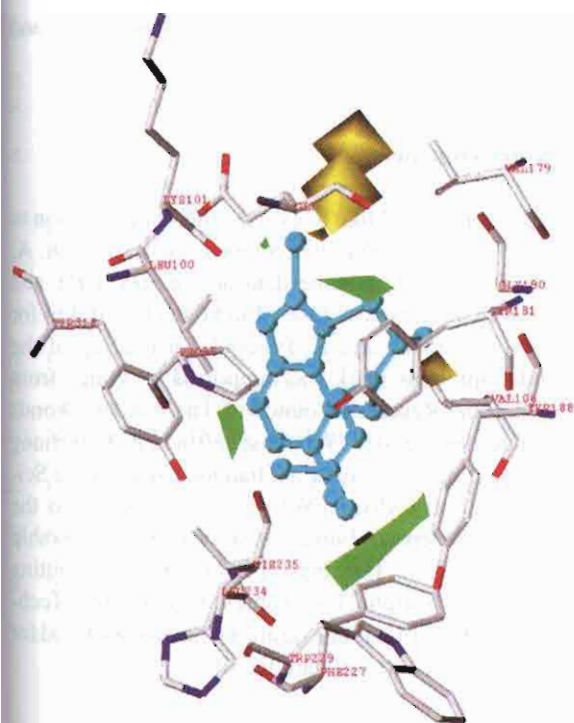


Figure 6. CoMFA steric STDEV*COEFF contour plot from the analysis based on the 3D-QSAR model 8 with no cross-validation. Sterically favored areas are represented by green regions. Sterically unfavored areas are represented by yellow regions. Compound 36 is displayed inside the fields as a ball and stick representation.

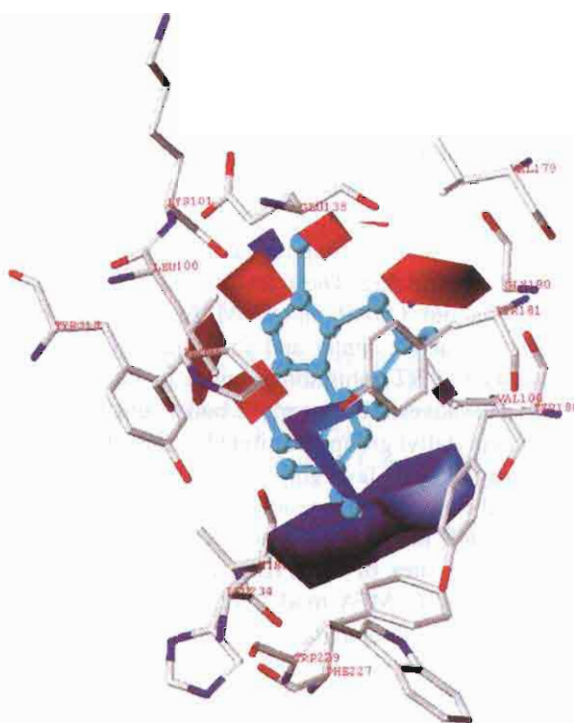


Figure 7. CoMFA electrostatic STDEV*COEFF contour plot from the analysis based on the 3D-QSAR model 8 with no cross-validation. Negative charge favored areas are represented by red regions. Negative charge unfavored areas are represented by blue regions. Compound 36 is displayed inside the fields as a ball and stick representation.

green contour located at the substituent attached to the C8-position. It is indicated that an additional bulky atom at this site would increase the activity but the dimension of this substituent should not be too large. This suggestion agrees with the trend observed experimentally that the dimethylallyl group is the optimal group of N6-substitution for inhibitory activity [30]. One of the positive steric regions, the green contour region near the position of Tyr181, one of the important amino acid residues in the binding site, may suggest that there are steric interactions between the aromatic ring of Tyr181 and N6 side chain, i.e., dimethylallyl group, and CH₃ attached to the C5 position. That means losing favorable interactions between the aromatic ring of Tyr181 and the TIBO compound may decrease the affinity of this inhibitor. This is also in agreement with the experimental results [9]. The mutation of Tyr181 → Cys apparently eliminates favorable contacts of the aromatic ring of the tyrosine and the bound inhibitor, reducing the NNRTI binding. These results can reveal the importance of the steric feature of molecules contributing to affinity through

contour maps. It should be mentioned here that the contribution of the C5 parameter can not be estimated in QSAR analysis. Therefore, CoMFA results provide an opportunity to serve with this factor.

The electrostatic contribution contour map is depicted in Figure 7. The positive electrostatic contours are shown in blue and the negative contours are shown in red. A blue electrostatic contour region located at the substituent attached to the C2 position and the larger blue regions located at C8 and C9 substitute positions produce the favorable positive charges. These results complement the obtained QSAR model, particularly the relationship between the net atomic charge and the nature of the substituent on the atom. The low positive charges of the C2 atom in all compounds and a negative coefficient of this variable in Equation 5 indicate that the lower the positive charge, the higher the inhibitory activity. Red electrostatic contour regions, close to the benzene ring and close to the imidazole moiety, suggest that high negative charges in these areas enhance affinity.

Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Study on HIV-1 Reverse Transcriptase inhibitors in the Class of Dipyrindodiazepinone Derivatives, Using Comparative Molecular Field Analysis

Pornpan Pungpo and Supa Hannongbua*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, THAILAND

Abstract

Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship (3D QSAR) using Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) was applied to a set of dipyrindodiazepinone derivatives against wild-type (WT) and mutant type (Y181C) reverse transcriptase. Starting geometry of dipyrindodiazepinone was obtained from x-ray crystallographical data. All 75 derivatives, divided into a training set of 53 compounds and a test set of 22 molecules, were then constructed and fully geometry optimization were performed, based on semiempirical molecular orbital calculations (AM1). CoMFA was used to discriminate structural requirements between WT and Y181C inhibitory activities of these inhibitors. The obtained CoMFA models yield satisfied predictive ability regarding WT and Y181C inhibitions, $r^2_{cv} = 0.624$ and 0.726 , respectively. CoMFA contour maps reveal that steric and electrostatic interactions corresponding to WT inhibition are 58.5% and 41.5%, respectively, while steric and electrostatic effects have approximately equal contributions towards explaining Y181C inhibitory activities. The contour maps highlight different characteristics for different types of wild type and mutant type HIV-1 RT. In addition, these contour maps agree with all experimental data for binding topology. Consequently, the obtained results provide beneficial information for better understanding the inhibitor-receptor interactions. These results can be helpful basis for design new compounds with increasing of the therapeutic potential in respect to WT and Y181C inhibitions of dipyrindodiazepinone analogues.

Keywords : *HIV-1 RT, Nevirapine, NNRTI, CoMFA, 3D-QSAR, quantum chemical calculations, Molecular Modelling*

*correspondance author, Tel. 066-2-9428900, Fax: 066-2-5793955, e-mail : fscisph@ku.ac.th

Introduction

11-Cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one or nevirapine (Figure 1), developed by Merluzzi *et al.* [1] represents the first member of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) to receive approval for the treatment of human immunodeficiency virus (HIV) infections. This drug binds to an allosteric region on the protein and induces conformational changes thereby inactivating the enzyme [2-5]. Like other NNRTIs, however, nevirapine causes drug resistant variants of HIV-1, both in cell culture and in patients. The primary cause of viral resistance to nevirapine is the mutation which substitutes cysteine for tyrosine 181 in RT (Y181C RT) [6-8] associated to most reported NNRTIs [9]. This Y181C RT is less sensitive to nevirapine than the wild type enzyme. Most of these mutations act by directly changing the shape of the pocket contacted by the inhibitor. Common feature among these are mutations of Tyr181, which confer some degree of resistance to all of the nonnucleoside compounds [10-14], and Tyr188, which also has significant effects on the binding of a variety of nonnucleoside drugs [15]. The most commonly occurring spontaneous mutation of Tyr181 is a replacement with cysteine [16-18]. Any small variation induced by a single point mutation can bring a significant impact on the sensitivity of virus to members of NNRTIs, and high-level resistance can develop correspondently [19]. Therefore, some aspects of the structural basis for the mechanisms of resistance for HIV-1 inhibitor have largely remained problems to be solved.

In our previous works, quantitative structure-activity relationships (QSAR) for NNRTIs have been studied in an effort to find common structural features among NNRTIs [20-22]. These studies have provided valuable information in terms of electronic descriptors that effect inhibitor binding to reverse transcriptase. Further, HIV-1 RT inhibitors in the class of 1-[(2-hydroxyethoxy)-methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT) and benzodiazepinone analogues (TIBO) derivatives were investigated by means of three dimensional quantitative structure-activity relationships (3D-QSAR) using comparative molecular field analysis (CoMFA) [22-23]. The results are successful in establishing the relationship between steric and electrostatic fields around molecules with their biological activities through contour maps. The structure of HEPT in the complex was also analysed, based on molecular orbital calculations [24-25], to study the intermolecular interactions between the inhibitor and the surrounding protein which determine the geometry of the inhibition complex.

In the present study, CoMFA was applied to a class of dipyridodiazepinone derivatives with the aims of determining QSAR and discriminating structural requirements of these inhibitors between WT and Y181C inhibitory activities.

Methods of Calculations

Biological data

The chemical structures of dipyrindodiazepinone derivatives and their inhibitory activities against both wild type (WT RT) and mutant type (Y181C) are reported in references 16-18. The potency has been defined as $\log (1/C)$, where C is the effective inhibitory concentration of compound required to achieve 50% (IC₅₀) protection of MT-4 cell against the cytopathic effect of HIV-1. In the analysis, the structures of the 53 dipyrindodiazepinone compounds serve as training set (Table 1). 22 additional inhibitors were used as test set to evaluate the predictive ability of the resulting models (Table 2).

Molecular modelling and quantum chemical calculations

Starting geometry of dipyrindodiazepinone is obtained from crystallographic structure of the enzyme inhibitor complex [10]. Modification of substituents of all dipyrindodiazepinones was performed by ALCHEMY 2000 program [26]. The lowest energy conformer was examined using the systematic search technique available in Sybyl6.4 program [27]. Subsequently, full geometry optimization of all structures was carried out, based on AM1 semiempirical molecular orbital method which implemented in the GAUSSIAN 94 program [28] on the DEC Alphastation (model 250-4266). Therefore, partial atomic charges required for calculations of electrostatic interactions were obtained. In addition, in order to evaluate electronic contribution of inhibitors, electrostatic potential of molecules were calculated, using ab-initio (HF/3-21G) calculations by Gaussian94. Electron distributions were visualized by MOLDEN program [29].

Alignment rules and CoMFA analysis

The alignment rule, i.e., the positioning of a molecular model within a fixed lattice, is the most crucial element of the analysis. In the present study, field fit procedure in Sybyl6.5 [30] was adopted. The resemblance of a molecule to the template is considered in terms of both electrostatic and steric fields. Thus, the selected conformation is oriented so as to minimize the difference between its field values at the lattice points and those of the template field. An underlying assumption in QSAR analysis is that all molecules in the data set showing high activity bind to their receptor in a similar way. For these reasons, compounds 12 and 32 were retained as the template structure of the alignment rule for wild type and mutant HIV-1 RT inhibitors, respectively. The electrostatic and steric fields were computed using Tripos Force Field.

A three dimensional cubic lattice, with 2 Å grid spacing, was generated automatically around these molecules and ensured that the grid extended beyond the molecular dimensions

by 4.0 Å in all directions. In this study, three different atoms, sp^3 carbon atom with +1 charge (default probe atom in Sybyl), sp^3 oxygen atom with -1 charge and H atom with +1 charge served as probe atoms. The probe atom was placed at each lattice point and its steric and electrostatic interactions with each atom in the molecule were all computed with CoMFA standard scaling and then compiled in a CoMFA QSAR table. The minimum-sigma value was set to 2.0 kcal/mol in order to speed up the analysis and reduce the amount of noise. The energy cutoff values of 30 kcal/mol were selected for both electrostatic and steric field. Then, partial least squares technique (PLS) was employed to derive a 3D-QSAR model expressing the correlation between the steric and electrostatic properties and inhibitory activities. The orthogonal latent variables were extracted by the NIPALS-algorithm [31] and subjected to full cross-validation (leave-one-out method). The analyses were carried out with a maximum of ten components, and subsequently, using the number of component (noc) at which the difference in the r^2_{cv} value to the next one was less than 0.05 [32]. Consequently, a non cross-validated analysis was performed using the optimal number of components previously identified and was then employed to analyze the CoMFA results.

Predictive ability

Q^2 or r^2_{cv} were used to evaluate the overall predictive ability of the model, illustrated as the following

$$r^2_{cv} = (SSY - PRESS)/SSY$$

where SSY represents the variance of the biological activities of molecule around the mean value and PRESS is the prediction error sum of squares derived from the leave-one-out method. The uncertainty of the prediction is defined as

$$S_{PRESS} = [PRESS/(n-k-1)]^{1/2},$$

where k is the number of variables in the model and n is the number of compounds used in the study.

Results and Discussion

CoMFA results

CoMFA models for WT-RT inhibition

At first, the effect of the probe atoms was investigated since CoMFA results depend on the interaction energy between probe atoms and molecules. All obtained analysis included steric and electrostatic fields. In addition, separated analysis of only steric or electrostatic field was also considered. The statistical results of correlation models are summarized in Tables 3-6. CoMFA with default setting probe atom, $sp^3C(+1)$, produced a model with a low predictive ability, $r^2_{cv} = 0.029$ (model 1), as shown in Table 3. While other types of probe atoms, i.e.,

sp^3O (-1) and H (+1) yielded better r^2_{cv} (model 2, $r^2_{\text{cv}} = 0.148$ and model 3, $r^2_{\text{cv}} = 0.207$, respectively). However, the predictive power is rather low and some compounds are significantly out of line. Inspection of outliers derived from CoMFA model was performed and the maximum residual value is presented in Table 3. As compounds 47 was found to be a maximum outlier, consequently, elimination of this compound from CoMFA analysis yielded model 4. Interestingly, the predictive ability of model is drastically increased ($r^2_{\text{cv}} = 0.547$). However, a residual is still in the same range as produced by compound 47. Consecutively outlier, compound 4, was removed resulting in model 5. Therefore, the final model is satisfied both predicted ability ($r^2_{\text{cv}} = 0.624$) and maximum outlier. The reason for the difference appeared in connection with these outliers cannot be explained by the model. However, it was observed that structures of compounds 45, 46 and 47 seem very equivalent to each other, i.e., the difference occurred in substitutions on the phenyl ring. Furthermore, CoMFA model cannot distinguish the structural similarity of compounds 4 and 2.

Based on above results, the H probe atom was chosen for further studies on the effect of lattice spacing. The results of grid-CoMFA analysis, summarized in Table 4, indicated that 2 Å grid spacing was a good choice for this set of molecule. A decrease in grid spacing increases the number of probe atoms in a region. However, it generates more noise in PLS analysis and leads to a worse r^2_{cv} value in this case.

Apparently, model 5, obtained from including both steric and electrostatic fields in the analysis, shows the best predictive ability QSAR model with $r^2_{\text{cv}} = 0.624$, $s\text{-press} = 0.354$ and $\text{noc} = 10$. Steric and electrostatic contributions of this model are 58.5% and 41.5%, respectively. Using only steric or electrostatic interaction energy provided worse value of predictive ability, $r^2_{\text{cv}} = 0.528$ and 0.233, respectively (Table 3). Eventhough, steric interaction explains a majority of variance in the data, both steric and electrostatic interactions play an important role in WT HIV-1 RT inhibition. Other statistical characteristics obtained are that the conventional r^2 is 0.989, standard error of estimate is 0.062, F is 348.133 and probability (P) of obtaining this value of F if r^2 were actually zero (prob. of $r^2 = 0$) is lower than 0.001. The experimental and calculated affinities of model derived from non-cross-validated analysis of model 5 is plotted in Figure 2.

CoMFA models for Y181C inhibition

For further analysis, the CoMFA results with respect to Y181C inhibition were investigated. The statistics of the CoMFA models developed under different probe atoms were summarized in Table 5. For the default CoMFA setting, a r^2_{cv} of 0.587 could be derived (model 6). With regard to other probe atoms, sp^3O (-1) and H(+1), yielded worse predictive

models than those obtained from $sp^3C(+1)$ (model 7, $r^2_{cv} = 0.506$ and model 8, $r^2_{cv} = 0.500$, respectively). Model 6 expresses a higher level of internal consistency compare to other models. Inspections of outliers obtained from CoMFA models was done and the maximum residual value is also presented in Table 5. Due to a maximum outlier of compound 36, elimination of this compound yielded a better model (model 9). Nevertheless, a residual is still in the same range as derived from compound 36. Consequently, the consecutive outliers, compounds 38 and 43 were removed, resulting in model 10 and 11, respectively. Interestingly, as compound 43 was removed from CoMFA analysis, the quality of model was increased in a high extent (model 10, $r^2_{cv} = 0.662$ and model 11, $r^2_{cv} = 0.726$). Finally, model 11 is satisfied both predictive ability and maximum outlier. The reason observed in the connection with these outliers depends on the structural similarity. Compounds 36 and 37 are very similar to each other, except that the difference appears at R1 substituent (C_2H_5 and C_3H_5) and at R2 position (3-pyrazolyl and 4-pyrazolyl). Compounds 43 and 44 are different on R1 (C_2H_5 and C_3H_5) and R2 substitutions (2-pyridyl and 3-pyridyl). Unsubstituted phenyl ring at C2 position of compound 38 is particular different from others in the same series.

The effect of grid spacing on CoMFA results was also studied. The r^2_{cv} indicated that grid spacing set to 2 Å was suitable for this data set as reported in Table 6. The reason could be explained in the same manner of WT-inhibition.

Inspection of the best QSAR model (model 11) in the series of Y181C RT inhibition, revealed that this model has 46.8% contribution from steric field and 53.2% contribution from electrostatic field, with the $r^2_{cv} = 0.726$ and $s\text{-press} = 0.262$ and $noc = 9$. Both steric and electrostatic effects have approximately equal contributions to explaining Y181C inhibitory activity. These strongly supported by predictive power of CoMFA results obtained from separated field. Eventhough, a model derived by electrostatic field shows a slightly higher than that of steric field, using only steric or electrostatic interaction energy provides worse value of predictive ability. Regarding other statistical results, the conventional r^2 obtained by PLS for the final model is 0.989, standard error of estimate is 0.262, F is 316.470 and probability (p) of obtaining this value of F if r^2 were actually zero (prob. of $r^2 = 0$) is < 0.001 . The experimental and calculated affinities of model derived from model 11 is depicted in Figure 3.

Prediction for compounds in the test set

As the the CoMFA models 5 and 11 show the highest predictive power for WT and Y181C RT inhibition, respectively. Both models were used to predict the inhibitory activities of compounds in the test set. The comparison of observed and predicted inhibitory activities

of 22 compounds by models 5 and 11 are given in Table 2. These clearly show the usefulness of the models on dipyrindodiazepinone derivatives not included in Training set. This is indicated that the derived CoMFA models can well predict for activities of compounds in the test set. However, it seems that model 11 are more external predictive ability than model 5. Model 11 can accurately predicted for compounds T1, T2, T5, T9, T10, T17 and T18, whereas, model 5 can well predict only for 3 compounds; T1, T9 and T19.

Steric and electrostatic contributions

The steric and electrostatic contributions for all dipyrindodiazepinone compounds are summarized in Figure 4 and Figure 5 derived from WT and Y181C inhibition CoMFA models, respectively. In order to get better understanding of steric and electrostatic interactions between enzyme and inhibitors, amino acid residues surrounding dipyrindodiazepinone compound in binding pocket were merged into both figures. The green contour maps indicate favorable steric effects in this regions, i.e., incorporation of bulkier groups will enhance the inhibitory activity. On the other hand, yellow contour maps represent that bulkier groups in those regions are detrimental the receptor binding affinity. Concerning CoMFA electrostatic fields, a lower electron density within the inhibitors near blue and red contours, increase or decrease the affinity, respectively.

Steric and electrostatic contributions for WT-RT inhibition

With respect to CoMFA contour maps obtained from WT RT inhibition, Figure 4 presents yellow contours around R2 substitution on the tricyclic ring, especially a yellow one overlapping with Tyr181 residue. These contours reveal a limitation to the size of substituent tolerated at this position. The observation which reported high resolution structures of HIV-1 RT complexed to four different NNIs [10] indicated that C2 position and substituent attached to C2 of dipyrindodiazepinone derivatives make significant interactions with residues in the binding site. That means the increase in steric bulk of side chain leads to steric conflict and lossing favorable interactions to the aromatic ring of Tyr181. This steric constrain is apparent in comparing 2 alkyl derivative (compound 4) and compounds 6-7, listed in Table 1, where there is a decrease in potency with the larger substituent. Additionally, a large red electrostatic contour region closed to R2 position, overlapping yellow contour, indicates that high negative charges in this area enhance the affinity. It could be suggested that unfavorable bulky group and high negative charges are required in this area. This suggestion is supported by experimental data, reported in Table 1, that 2-F derivative (compounds 10) and 2-Cl derivative (compounds 11-13) yielded high potency. In particular, compound 12 shows the

highest potency for WT inhibition in this data set. In order to get better elucidation on electron distributions of inhibitors, effecting to binding affinity, the electrostatic potential of molecules were evaluated and presented in Figure 6(a). It could be strongly confirmed that compound 12 places its Cl atom, indicating significantly negative charged parts, into the region where is favorable for more negative charge. Blue contour, close to Glu138 residue, suggests that low electron density in this area will have a positive effect on biological activity. The steric contour map also shows green contour in the vicinity of Glu138. This reveals that substituent at C2 position should have bulky substituent in this region as well as it should contain atom providing positive charge toward Glu138. This suggestion agrees with the trend observed experimentally that 2-aryl substitutions yield effective inhibitors (compounds 30-33, Table 1).

Steric and electrostatic contributions for Y181C -RT inhibition

Figure 5 shows the contributions of the steric and electrostatic fields to Y181C RT inhibition. A large green contour corresponds the location of the group attached to C2 position on tricyclic ring systems. However, the tolerated steric requirements of this region are highlighted by yellow contours located on each side of favorable steric region. It is indicated that steric occupancy with bulky groups would increase affinity but the dimension of the substituents should be not too large. These suggestions are supported by observed compounds in the training set. Effective inhibitors against WT RT possessing less bulky substituents at C2 position such as compounds 1, 2, 4 and 10-13 have greatly diminished activities against Y181C RT (see Table 1). Compounds 17-20 occupying C2 position with too large substituents display a significantly reduced potency against Y181C RT as well. In addition, a predominantly feature of the electrostatic contour plot in this analysis is the presence of a large blue contour in the vicinity of R1 substituent close to Glu138 residue in binding pocket. This contour indicates that more positive charges in this region are favorable for binding affinity. As additional examples of compounds 30-33, the aryl substitution for R1 substituents, are given. These substituents not only orient their pyrrolyl moieties into the green contour area, but also place these groups into the region indicated to be favorable to accommodate positive charges, yielding highly potent activity for Y181C RT. It can be observed by comparison of compounds 17-20 and compounds 30-33. Especially, compound 32 expresses the highest activity against Y181C RT. The electrostatic potential of compound 32 (Figure 6(b)), showing positive charge part (pink color) located on N atom in pyrrolyl ring, can confirm this suggestion. A proton attached to this N atom may involve the H-bonding interactions with amino acid residues. As a blue contour is also presented in CoMFA contour map obtained from WT inhibition in the approximately similar region, this may be a reason

why compounds 30-33 show excellent inhibition of both WT and Y181C RT. In addition, there are favorable steric regions near substituent attached to C5 position which close to Tyr188 and Trp229. This is also in agreement with the experimental results, Table 1, that the substitution with CH_3 at this position confers better activity than that of H atom. Based on the obtained results, it could be suggested that not only steric interactions contribute to the Y181C inhibitory activity, but also electrostatic interactions are important to explain the variance in the data. This is consistently found by Ren *et. al.* [10] which stated that electrostatic interactions (charge and hydrogen bond) contribute to the final strength of binding and may assist in the orientation of the compound but specificity comes from the interactions with bulky hydrophobic residues.

As crystal structures of nevirapine and its derivatives complexed with HIV-1 RT were presented [3,10], it strongly indicates that there are favorable contacts of aromatic ring of Tyr181 and the bound inhibitor. Significant interactions between Glu138 and the NO_2 group attached to C2 position of tricyclic ring are presented. In addition, the favorable interactions between Tyr188 and Trp229 and the bound inhibitor are also indicated. Concerning WT inhibition, a substituent possessing unfavorable bulky group and high negative charges should be occupied in C2 position. Otherwise steric conflict could be introduced, yielding worse binding affinity. With regard to Y181C RT inhibition, substitution of Tyr181 by cysteine residue replaces the large aromatic side chain with a thiol group. It is clear that favorable interactions of aromatic ring of Tyr181 and the bound inhibitor was eliminated. This mutation causes not only a decrease in the steric bulk of side chains but also the distributions of charges are changed. For these reasons, the affinity of inhibitors could be significantly reduced. Based on our finding, it could be suggested that pyrrolyl group is the optimal group of C2 substitution for the lacking aromatic amino acid at position 181. A loss of aromaticity could be compensated by the presence of pyrrolyl group, which may drive binding of inhibitor and receptor. In addition, the charge distributions of this group are favorable for strength binding. These results show close agreement with our CoMFA models which highlight the different structural requirements for WT and Y181C inhibitions of dipyrroldiazepinone derivatives.

Conclusions

3D QSAR model using the CoMFA methodology of dipyrroldiazepinone derivatives for inhibition of both wild-type and Y181C RT were derived. CoMFA shows to be helpful method to discriminate structural requirements between WT and Y181C inhibitory activities of these inhibitors. In this study, the obtained QSAR models are reasonable based on both statistical significance and predictive ability. The CoMFA contour maps reveal that steric

interactions play more significantly role with respect to WT inhibition, while steric and electrostatic effects have approximately equal contributions towards explaining Y181C inhibitory activities. These contour maps show good consistent with inhibitor-receptor complexation derived by experimental data. Accordingly, these results lead to a better understanding of important drug-receptor interactions and structural requirements in the class of dipyrindodiazepinone compounds. Finally, 3D-QSAR information provides a helpful guideline to design and predict the affinity of novel compounds with enhance wild-type and Y181C RT inhibitory activities prior to synthesis.

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. P. Wolschann for valuable suggestions and discussion, Dr. Surapoj Wongyai for providing of SYBYL6.4. The grants providing by the Thailand Research Funds (RSA4080022), the Golden Jubilee Ph.D. project (3.C.KU/41/B.1) and KURDI are gratefully acknowledged. Appreciations are due to the computing center of University of Vienna for providing of calculations in the cluster computer and to the high performance computing center of the National Electronics and Computer Technology of Thailand (NECTEC) for providing of SYBYL 6.5 calculations on SGI.

References

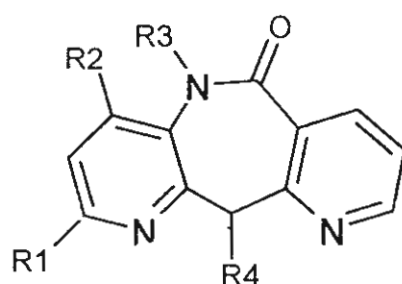
1. Merluzzi, V.J., Hargrave, K.D., Labadia, M.J., Qrozinger, K., Skoog, M., Wu, J.C., Shinh, C., Shinh, C.-K., Eckner, K., Hattooy S. and Sullivan, L.L. Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science*. 1990, **250**, 1411-1413.
2. Kohlsatedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A. and Steitz, T. A. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*. 1992, **256**, 1783-1790.
3. Smerdon, S.J., Jager, J., Wang, J., Kohlstaedt, L.A., Friedman, J.M., Rice, P.A. and Steitz, T.A. Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, **91**, 3911-3915.
4. Wu, J.C., Warren, T.C., Adams, J., Proudfoot, J., Skiles, J., Raghavan, P., Perry, C., Potocki, I., Farina, P.R. and Grob, P.M. A novel dipyrindodiazepinone inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase acts through a nonsubstrate binding site. *Biochemistry*. 1991, **30**, 2022-2026.
5. Cohen, K.A., Hopkins, J., Ingraham, R.H., Pargellis, C., Wu, J.C., Palladino, D.E., Kinkade, P., Warren, T.C., Rogers, S. and Adams, J. Characterization of the binding site

- for nevirapine (BI-RG-587), a nonnucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* 1991, **266**, 14670-14674.
6. Richman, D., Shih, C.K., Lowy, I., Rose, J., Prodanovich, P., Goff, S. and Griffin, J. Human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to nonnucleoside inhibitors of reverse transcriptase arise in tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991, **88**, 11241-11245.
 7. Mager, P.P., A Check on Rational Drug Design: Molecular Simulation of the Allosteric Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Med. Res. Rev.* 1997, **17**, 235-237.
 8. Balzarini, J., Karlsson, A., Sardana, V.V., Emini, E.A., Camarasa, M.J. and De Clercq, E. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-specific reverse transcriptase (RT) inhibitors may suppress the replication of specific drug-resistant (E138K) RT HIV-1 mutants or select for highly resistant (Y181C-->C181I)RT HIV-1 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, **91**, 6599-6603.
 9. De Clercq, E. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) for the treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infections: strategies to overcome drug resistance development. *Med. Res. Rev.* 1996, **16**, 125-157.
 10. Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., Somers, D., Ross, C., Kirby, I., Keeling, J., Darby, G., Jones, Y., Stuart, D. and Stammers, D. High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat. Struct. Biol.* 1995, **2**, 293-302.
 11. Ding, J., Das, K., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Janssen, P.A., Hughes, S.H. and Arnold, E. Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors. *Nat. Struct. Biol.* 1995, **2**, 407-415.
 12. Das, K., Ding, J., Hsiou, Y., Clark, A.D. Jr., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Pauwels, R., Janssen, P.A., Boyer, P.L., Clark, P., Smith, R.H. Jr., Kroeger, Smith M.B., Michejda, C.J., Hughes, S.H. and Arnold, E. Crystal structures of 8-Cl and 9-Cl TIBO complexed with wild-type HIV-1 RT and 8-Cl TIBO complexed with the Tyr181Cys HIV-1 RT drug-resistant mutant. *J.Mol.Biol.* 1996, **264**, 1085-1100.
 13. Tantillo, C., Ding, J., Jacobo-Molina, A., Nanni, R.G., Boyer, P.L., Hughes, S.H., Pauwels, R., Andries, K., Janssen, P.A. and Arnold, E. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse

- transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J. Mol. Biol.* 1994, **243**, 369-387.
14. Ding, J., Das, K., Tantillo, C., Zhang, W., Clark, A.D. Jr., Jessen, S., Lu, X., Hsiou, Y., Jacobo-Molina, A. and Andries, K. Structure of HIV-1 reverse transcriptase in a complex with the non-nucleoside inhibitor alpha-APA R 95845 at 2.8 Å resolution. *Structure.* 1995, **3**, 365-379.
 15. Hsiou, Y., Das K., Ding, J., Clark Jr., A.D., Kleim, J., roesner, M., Winkler, I., Riess, G., Hughes, S.H., and Arnold, E. The structure of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY 097:inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance. *J.Mol.Biol.* 1998, **284**, 313-323.
 16. Proudfoot, J.R., Hargrave, K.D., Kapadia, S.R., Patel, U.R., Grozinger, K.G., McNeil, D.W., Cullen, E., Cardozo, M., Tong, L., Kelly, T.A., Mauldin, S.C., Fuchs, V.U., Vitous, J., West, M., Klunder, J., Raghavan, P., Skiles, J.W., Mui, P., Rose, J., David, E., Richmond, D., Suklivan, J. L., Farina, V., Shih, C.K., Grob and Adams, J. Novel non-nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. 4. 2-substituted dipyrindiazepinones as potent inhibitors of both wild type and cysteine-181 reverse transcriptase enzyme. *J.Med.Chem.* 1995, **38**, 4830-4838.
 17. Kelly, T.A., Proudfoot, J. R., McNeil, D.W., Patel R.U.P, David, E, Hargrave, K.P., Peter M., Cardozo, M., Agarwal, A. and Adams, J. Novel non-nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. 5. 4-substituted and 2,4-disubstituted analogs of nevirapine *J.Med.Chem.* 1995, **38**, 4839-4847.
 18. Kelly, T.A., McNeil, D.W., Rose, J.M., David, E., Shih, C.K. and Grob, P.M. Novel non-nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. 6. 2-Indol-3-yl- and 2-azaindol-3-yl-dipyrindiazepinones. *J.Med. Chem.* 1997, **40**, 2430-2435.
 19. Hoegberg, M., Sahlberg, C., Engelhardt, P., Noreen, R., Kangasmetsae, J., Johansson, N.G., Oeberg, B., Vrang, L., Zhang, H., Sahlberg, B., Unge, T., Loevgren, S., Fridborg, K., and Baeckbro, K. Urea-PETT compounds as a new class of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. 3. Synthesis and further structure-activity relationships studies of PETT analogues. *J.Med.Chem.* 1999, **42**, 4150-4160.
 20. Hannongbua, S., Lawtrakul, L., and Limtrakul, J., Structure-activity correlation study of HIV-1 inhibitors: Electronic and molecular parameter, *J.Comp. Aided Mol.Des.* 1996, **10**, 145-152.

21. Lawtrakul, L., Hannongbua, S. Quantitative structure-activity relationships of HIV-1 RT inhibitors in the class of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-5,6-substituted thymine [HEPT] analogues. *Sci. Pharm.* 1999, **67**, 43-56.
22. Hannongbua, S., Pungpo, P., Limtrakul, J. and Wolschann P. Quantitative structure-activity relationships and comparative molecular field analysis of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor of TIBO derivatives. *J.Comp. Aided Mol. Des.* 1999, **13**, 563-577.
23. Hannongbua, S., Lawtrakul, L., Sottriffer, C.A., and Rode, B.M. Comparative molecular field analysis of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in the Class of 1[(2-Hydroxyethoxy) -methyl]-6-(phenylthio)thymine. *Quant.Struct.-Act. Relat.* 1996, **15**, 389-394.
24. Lawtrakul, L., Hannongbua, S., Beyer, A., Wolschann, P. Conformational study of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT). *J.Biol.Chem.* 1999, **380**, 265-267.
25. Lawtrakul, L., Hannongbua, S., Beyer, A., Wolschann, P. Molecular calculations on the conformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT). *Monatsch. Chem.* 1999, inpress.
26. Alchemy 2000, Tripos Associates Inc., St. Louis MO, 1998.
27. SYBYL 6.4, Tripos Associates Inc., 1699 South Hanley Road, Suite 303, St. Louis, Missouri, 63144, USA.
28. GAUSSIAN 94, Carnegie Office Park, Building 6, Pittsburgh, PA 15106, USA.
29. Molden 3.6, Centre for Molecular and Biomolecular Informatics, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands.
30. SYBYL 6.5, Tripos Associates Inc., 1699 South Hanley Road, Suite 303, St. Louis, Missouri, 63144, USA.
31. Wold, S., Johansson, E., Cocchi, M., and Kubinyi, H., 3D QSAR in Design : Theory, Methods and Applications, Leiden, ESCOM 1993, pp. 523-549.
32. SYBYL Molecular Modelling Software, version 6.3, SYBYL Ligand Base Design, Tripos Associates, Inc., St.Louis, MO 63144, USA, 1996 , p. 229.

Table 1 Structure of dipyridodiazepinone derivatives and experimental biological activities against both WT RT and Y181C RT.



ds. No.	R1	R2	R3	R4	Experimental log(1/C)	
					WT RT	Y181C RT
1	H	CH ₃	H	C ₃ H ₅	7.096	5.584
2	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.397	5.744
3	H	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.885	5.657
4	CH ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.698	5.999
5	CH ₂ CH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.920	5.920
6	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	H	C ₂ H ₅	5.999	5.999
7	C(CH ₃) ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	5.999	5.999
8	C=CHCOOCH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.744	6.173
9	C=CHCONH ₂	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.601	5.619
10	F	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.698	6.069
11	Cl	CH ₃	H	C ₃ H ₅	7.698	6.107
12	Cl	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.999	6.096
13	Cl	H	CH ₃	C ₃ H ₅	7.044	6.035
14	NH ₂	H	CH ₃	C ₂ H ₅	5.999	5.999
15	NH CH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.720	6.148
16	NH C ₂ H ₅	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.637	5.885
17	NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.044	5.999
18	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.154	6.112
19	N(CH ₃)CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.999	5.999
20	N-3,4-dihydropyrrolidinyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.522	6.193
21	N-piperidinyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.522	5.999
22	N-morpholinyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.397	5.999
23	N-thiomorpholinyl	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.823	5.999
24	N-pyrrolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.044	6.677
25	OH	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.327	5.999
26	OCH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.397	6.221
27	OCH ₃	H	CH ₃	C ₃ H ₅	6.920	5.958
28	SCH ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.698	5.999
29	2-furanyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.957	6.795
30	3-furanyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.397	6.957
31	2-pyrrolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.154	7.154
32	3-pyrrolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.522	7.397
33	3-pyrrolyl	H	CH ₃	C ₃ H ₅	7.300	7.221
34	2-thienyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.853	6.376
35	5-imidazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.885	6.720
36	3-pyrazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.408	6.536
37	4-pyrazolyl	H	CH ₃	C ₃ H ₅	7.221	7.300
38	phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.637	5.853
39	3-OCH ₃ -phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.823	6.677
40	3-NH ₂ -phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.154	6.251
41	4-OCH ₃ -phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	5.853	5.494
42	4-OH-phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.154	6.567

ble 1 (Continued)

ds. No.	R1	R2	R3	R4	Experimental log(1/C)	
					WT RT	Y181C RT
43	2-pyridyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.744	5.795
44	3-pyridyl	H	CH ₃	C ₃ H ₅	6.744	6.355
45	3-(6-OCH ₃ pyri dyl)	H	CH ₃	C ₂ H ₅	5.920	5.522
46	3-(6-OH-pyri dyl)	H	CH ₃	C ₂ H ₅	5.958	5.999
47	3-(6-NH ₂ -pyridyl)	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.300	6.584
48	4-pyridyl	H	CH ₃	C ₃ H ₅	6.823	6.494
49	H	CH ₂ NHPh	H	C ₃ H ₅	7.221	5.862
50	H	CH ₂ O(Ph-p-NH ₂)	H	C ₃ H ₅	6.999	5.995
51	H	CH ₂ O(Ph-p-NHEt)	H	C ₃ H ₅	7.096	6.365
52	H	CH ₂ (Ph-o-OH)	H	C ₃ H ₅	6.720	5.950
53	OH	CH ₂ OCH ₂ Ph	H	C ₂ H ₅	6.957	5.970

Table 2. Structure and predicted log (1/C) WT and Y181C HIV-1 RT inhibitory affinities of the tested dipyrroliodiazepinone compounds.

Cpds. No.	R1	R2	R3	R4	WT RT			Y181C RT		
					Experimental	Calculated	Residual	Experimental	Calculated	Residual
					log (1/C)	log (1/C) ^a		log (1/C)	log (1/C) ^b	
^c T1	CH ₃	CH ₃	H	C ₃ H ₅	7.154	7.102	0.052	5.920	5.910	0.010
^c T2	CH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.044	6.858	0.186	5.769	5.701	0.068
^c T3	C ₂ H	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.853	6.335	0.518	6.376	6.248	0.128
^c T4	Cl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.096	6.923	0.173	6.677	5.926	0.751
^c T5	Br	H	CH ₃	C ₃ H ₅	7.522	6.892	0.630	5.677	5.775	-0.098
^c T6	NHCH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.044	7.289	-0.245	5.999	5.672	0.327
^c T7	NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.044	7.611	-0.567	5.999	5.819	0.180
^c T8	N-pyrazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.507	6.805	-0.298	6.251	6.545	-0.294
^c T9	3-thienyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.999	6.988	0.011	6.522	6.484	0.038
^c T10	2-imidazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	5.431	6.341	-0.910	6.130	6.141	-0.011
^c T11	4-pyrazolyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.698	6.927	0.771	7.221	6.770	0.451
^c T12	2-OCH ₃ -phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.085	5.940	0.145	5.601	5.407	0.194
^c T13	3-OH-phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.999	7.254	-0.255	6.744	6.072	0.672
^c T14	4-NH ₂ -phenyl	H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.397	7.245	0.152	6.920	6.576	0.344
^d T15	H	CH ₂ OPh	H	C ₃ H ₅	6.920	6.606	0.314	5.587	5.940	-0.353
^d T16	OH	CH ₂ Ph	H	C ₂ H ₅	6.467	7.316	-0.849	5.885	6.010	-0.125
^d T17	Ph-m-OMe	CHO	H	C ₂ H ₅	6.480	7.249	-0.769	6.376	6.442	-0.066
^c T18		H	CH ₃	C ₂ H ₅	7.552	6.838	0.714	7.552	7.501	0.051

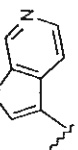
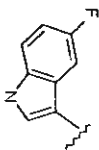
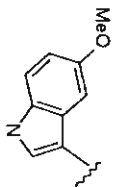
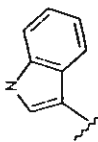
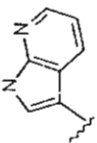


Table 2. (Continued)

Table 2 (Continued)										
Cpds. No.	R1	R2	R3	R4	WT RT			Y181C RT		
					Experimental log (1/C)	Calculated log (1/C) ^a	Residual	Experimental log (1/C)	Calculated log (1/C) ^b	Residual
^c T22		H	CH ₃	C ₂ H ₅	6.677	6.447	0.230	6.698	6.923	-0.225

^a Calculated by CoMFA model 5, ^b Calculated by CoMFA model 11^c Reference 16, ^d Reference 17, ^e Reference 18

Table 5. Summary of CoMFA models for Y181C HIV-1 RT inhibition with 53 dipyrroliadiazepinone compounds at different probe atoms.

Model	Probe atom	Field type	noc	r_{cv}^2	s-press	r_{2a}^2	s	F	Outliers(residual)	Steric cont ^b
6	sp ³ C(+1)	both	8	0.587	0.313	0.968	0.087	167.287	compd. no. 36 (0.151)	45.4
		st	3	0.301	0.386	0.942	0.120	68.131		
		el	4	0.407	0.359	0.791	0.213	45.458		
7	sp ³ O(-1)	both	5	0.506	0.332	0.928	0.128	99.462	compd. no. 24 (0.256)	50.4
		st	4	0.319	0.385	0.759	0.229	34.759		
		el	4	0.407	0.359	0.791	0.213	45.458		
8	H(+1)	both	4	0.500	0.330	0.886	0.158	93.298	compd. no. 42 (0.356)	47.5
		st	4	0.371	0.370	0.793	0.212	49.942		
		el	4	0.407	0.359	0.791	0.213	45.458		
9 ^c	sp ³ C(+1.0)	both	8	0.631	0.298	0.976	0.076	216.705	compd. no. 38 (-0.151)	46.7
		st	3	0.292	0.406	0.675	0.264	33.268		
		el	4	0.392	0.366	0.789	0.215	44.015		
10 ^d	sp ³ C(+1.0)	both	8	0.662	0.287	0.071	0.979	245.70	compd. no. 43 (0.109)	45.3
		st	3	0.287	0.394	0.679	0.264	33.074		
		el	4	0.388	0.369	0.790	0.216	43.253		
11 ^e	sp ³ C(+1.0)	both	9	0.726	0.262	0.989	0.059	316.470	compd. no. 32 (0.120)	46.8
		st	3	0.322	0.385	0.705	0.254	36.605		
		el	4	0.436	0.359	0.808	0.207	47.280		

^aConventional r^2 . ^bSteric contribution in %.

^cElimination of compd. no. 36 (remaining 52 compounds in the training set).

^dElimination of compds. no. 36 and 38 (remaining 51 compounds in the training set).

^eElimination of compds. no. 36, 38 and 43 (remaining 50 compounds in the training set).

Table 6. The statistic results within lattice grid space by 1 Å and 2 Å for Y181C HIV-1 RT inhibition.

Probe atom	Grid (Å)	noc	r_{cv}^2	s-press	r^{2a}	s	F	Steric cont ^b
sp ³ C(+1.0)	1	9	0.658	0.293	0.991	0.048	474.071	49.6
	2	9	0.726	0.262	0.989	0.059	316.470	45.2

^aConventional r^2 . ^bSteric contribution in %.

Figure Captions

Figure 1 Structure of 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*:2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one and the atomic numbering as used in this study is indicated.

Figure 2 Plot of calculated versus experimental WT HIV-1 RT inhibitory affinities obtained from non-cross-validation of CoMFA model 5 for training set compounds.

Figure 3 Plot of calculated versus experimental Y181C HIV-1 RT inhibitory affinities obtained from non-cross-validation of CoMFA model 11 for training set compounds.

Figure 4 CoMFA steric and electrostatic STDEV*COEFF contour plots from the analysis of the 3D-QSAR model 5 with non-cross-validation based on WT HIV-1 RT inhibition. Green contours refer to sterically favored regions; yellow contours indicate disfavored area. Blue contours refer to positive charge favoring areas; red contours indicate negative charge favoring areas. Compound 12 is displayed inside the fields as ball and stick presentation.

Figure 5 CoMFA steric and electrostatic STDEV*COEFF contour plots from the analysis of the 3D-QSAR model 11 with non-cross-validation based on Y181C HIV-1 RT inhibition. Green contours refer to sterically favored regions; yellow contours indicate disfavored area. Blue contours refer to positive charge favoring areas; red contours indicate negative charge favoring areas. Compound 32 is displayed inside the fields as ball and stick presentation.

Figure 6 Electrostatic potential of compounds 12 (a) and 32 (b), the highest active molecule for WT and Y181C inhibition, respectively. The cold colors (blue-violet) indicate negatively charged parts of molecules. Positively charged parts are displayed in warm colors (pink-red).

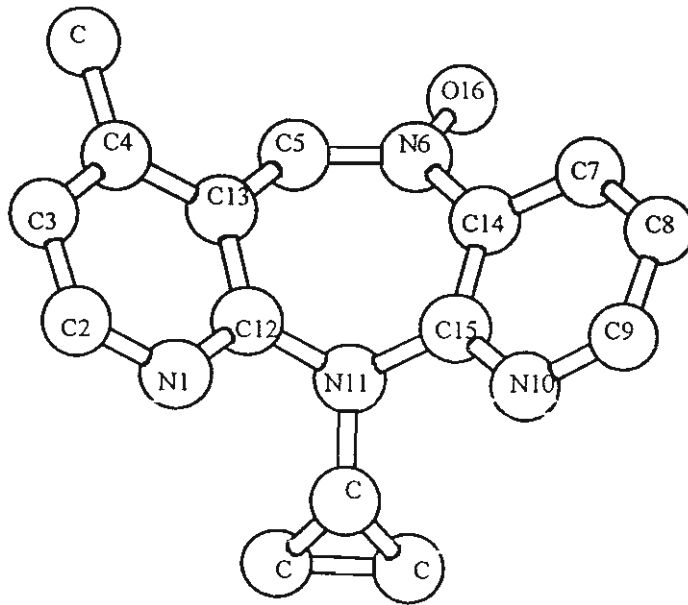
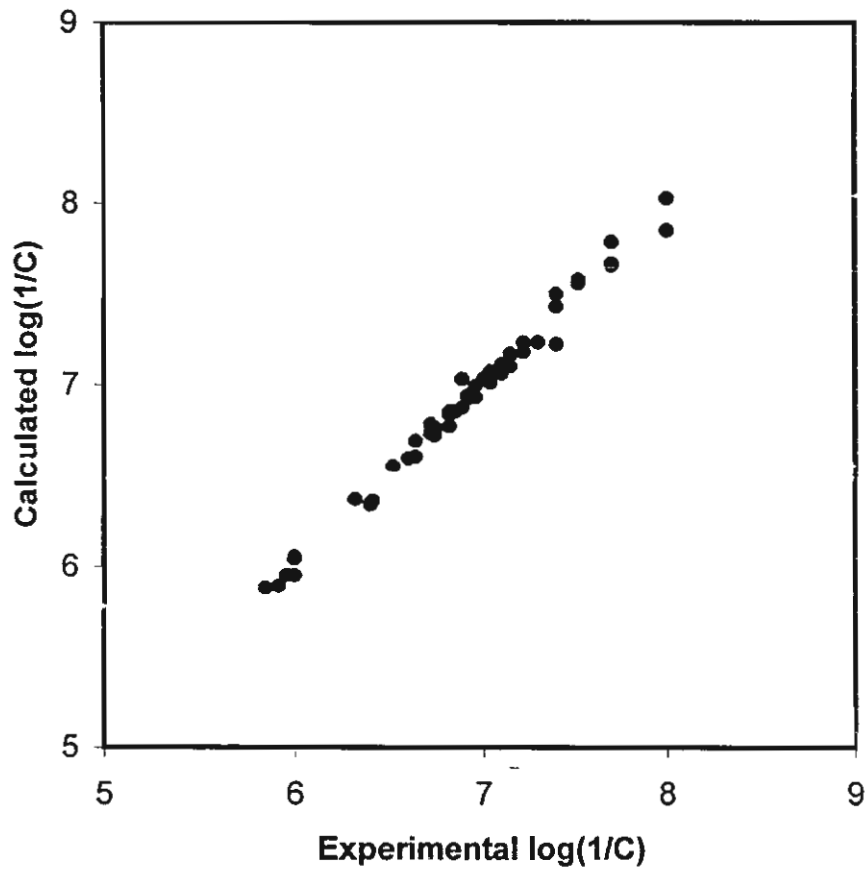


Figure 1

**Figure 2**

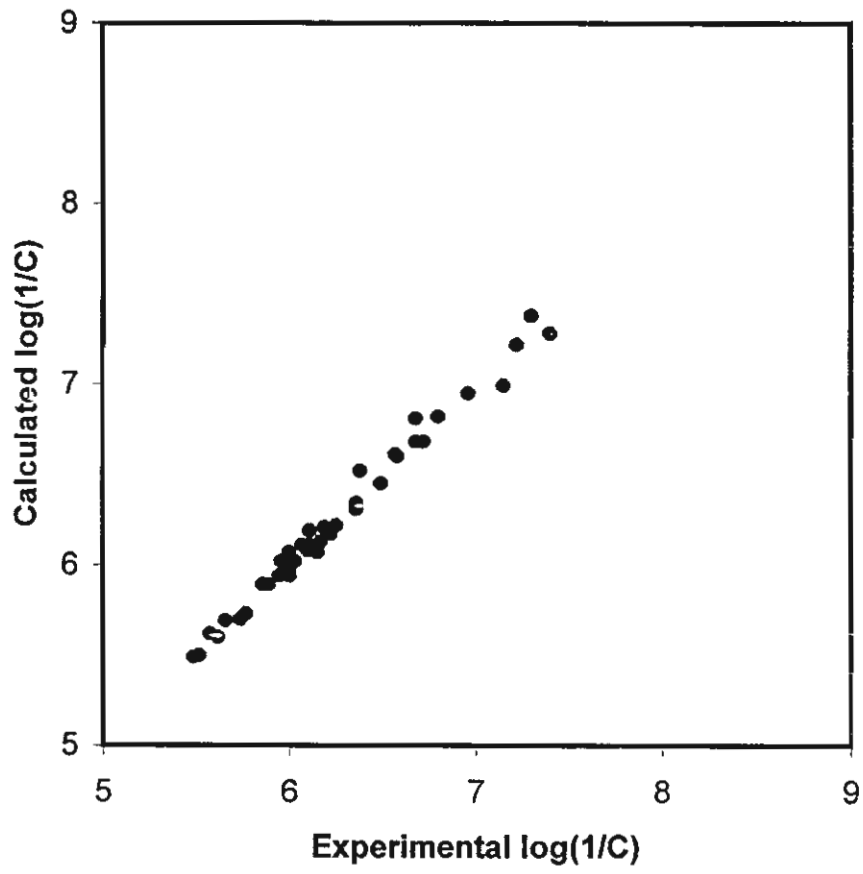


Figure 3

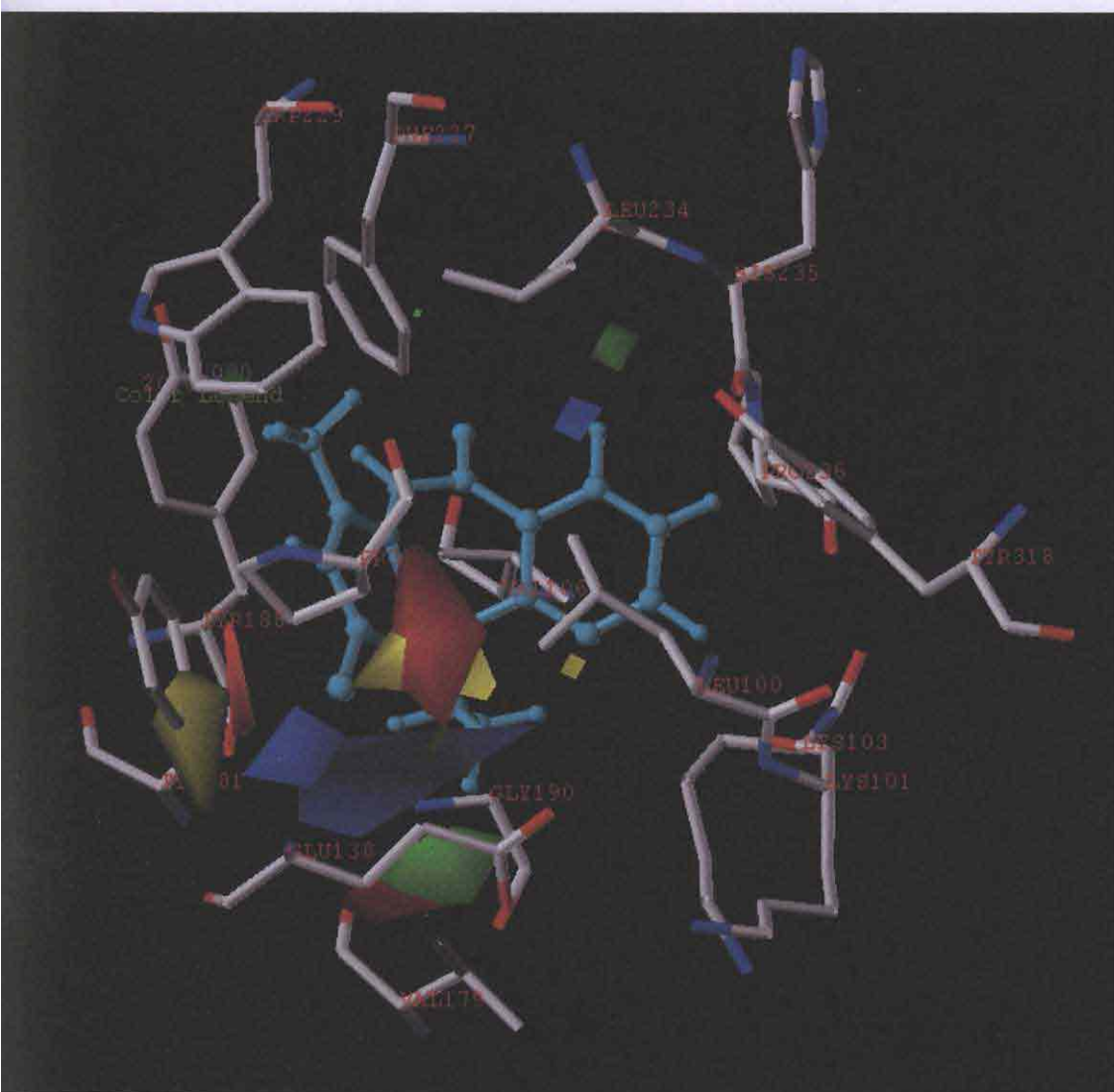


Figure 6

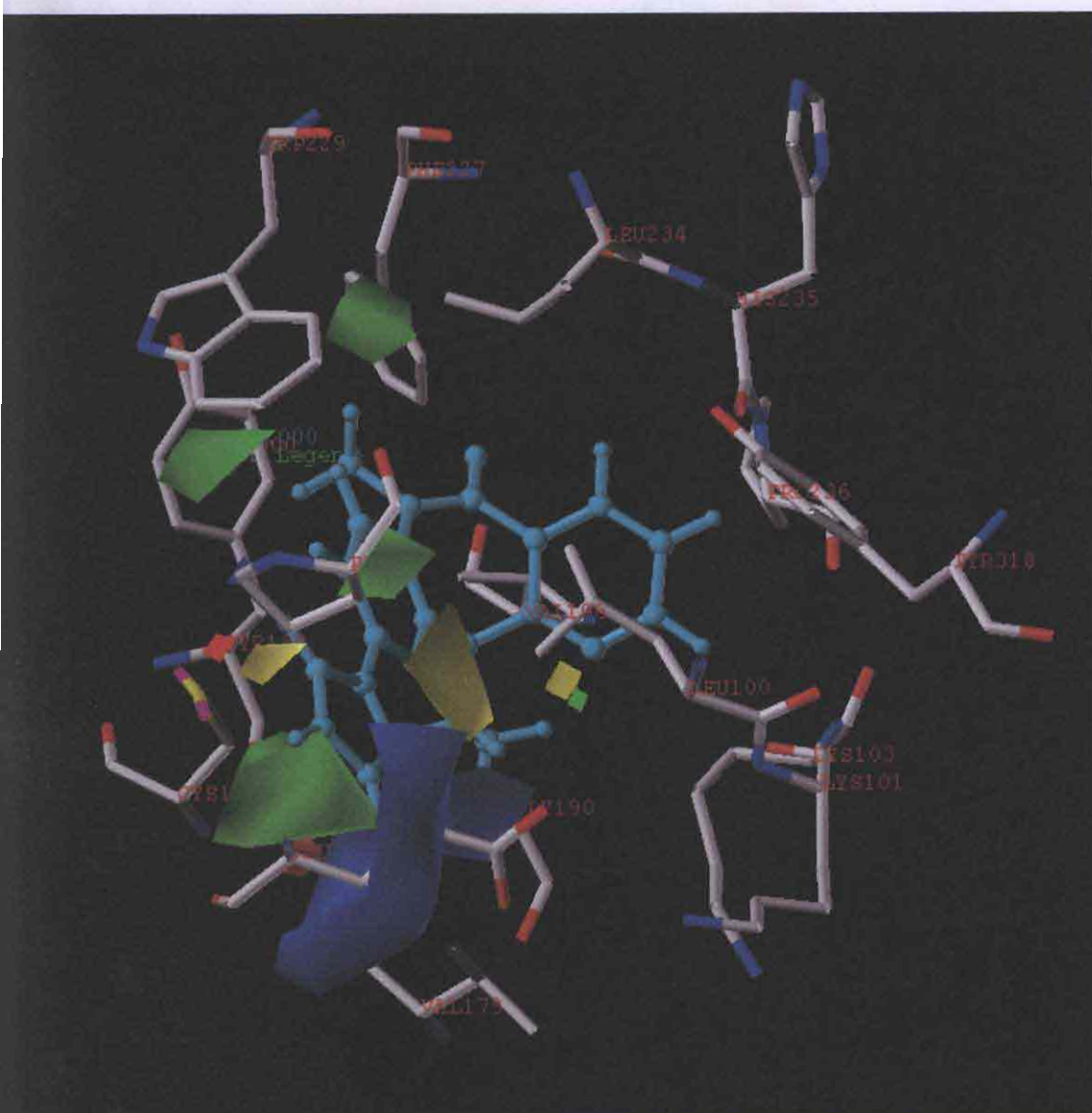
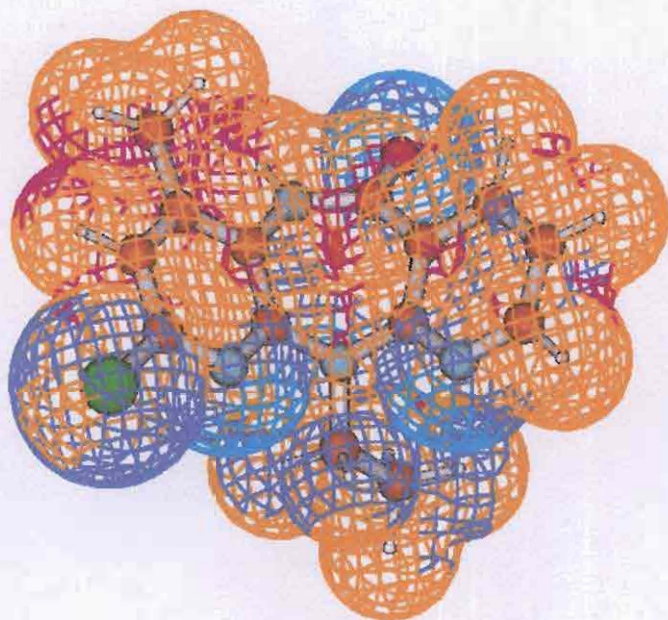
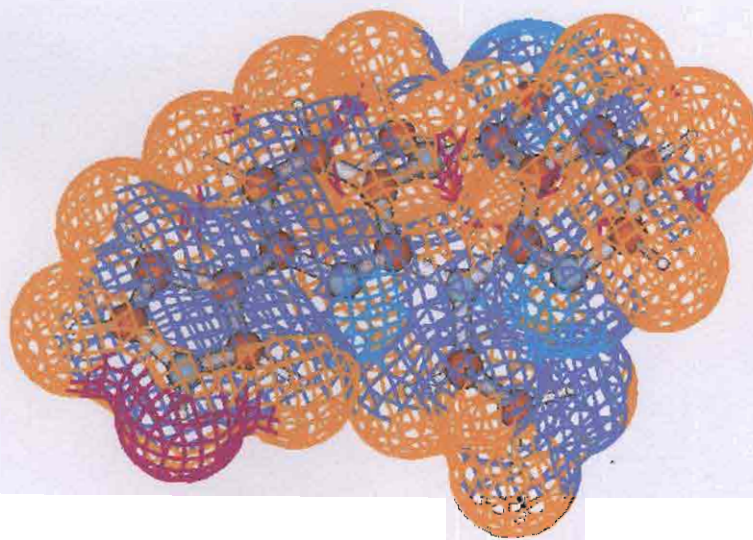


Figure 7



ESP of compound 12



ESP of compound 32

Figure 8