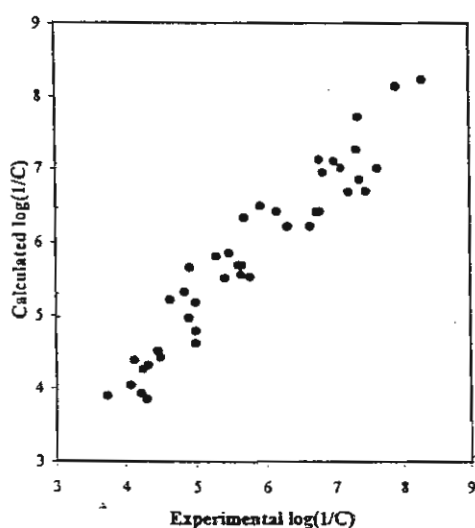


3.3.2 การศึกษา CoMFA ของอนุพันธ์ของทีโบ

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 χ ที่ได้จากแบบจำลอง CoMFA (model 8) ได้แสดงในภาพที่ 3.3.5

ค่าการทำนายกับมันตภาพในการยับยั้ง χ 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 โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของ lactice grid spacing แบบ 1 Å และ 2 Å

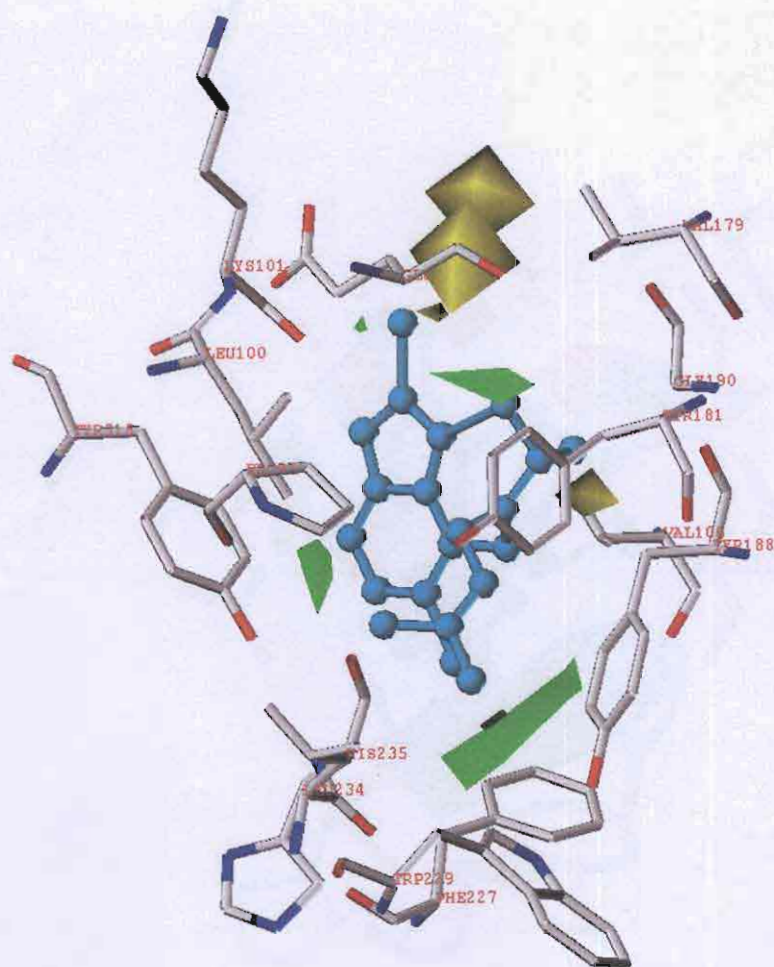
Probe atom	Grid (Å)	Noc	r_{cv}^2	s-press	r_{cv}^{2h}	s	F	Steric contb ^h
sp ³ O(-1.0)	1	5	0.585	0.868	0.958	0.273	182.805	77.6
	2	3	0.594	0.831	0.860	0.487	86.247	79.6

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

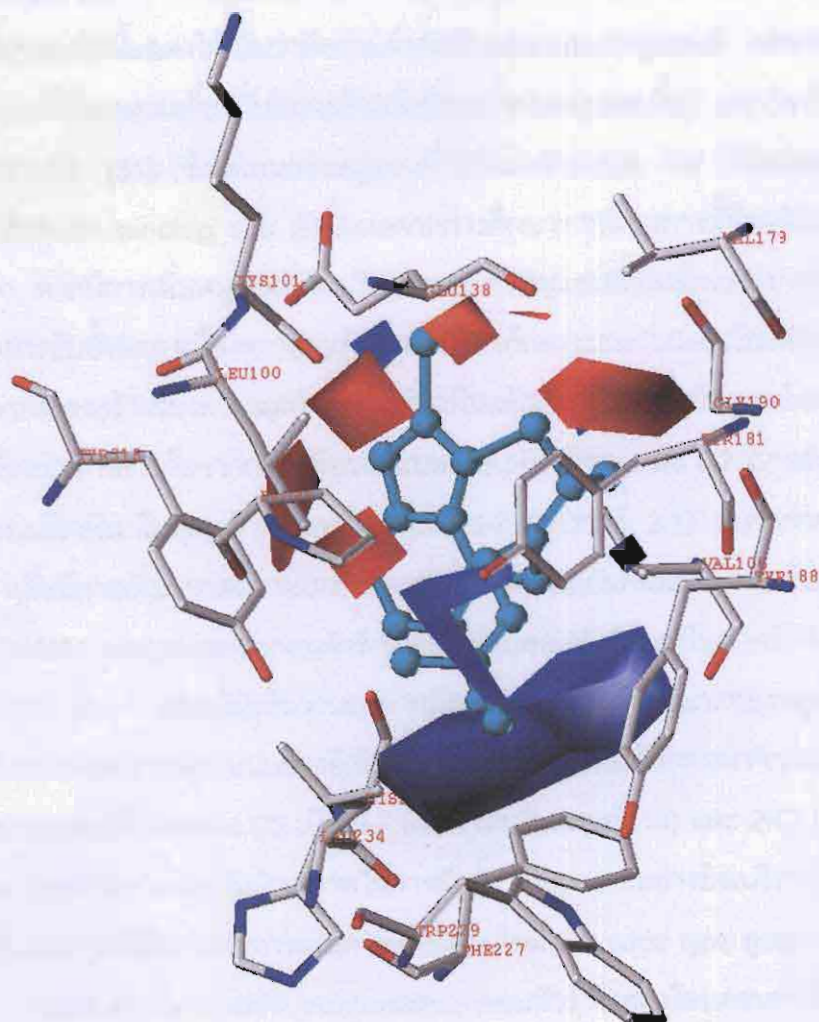
ตารางที่ 3.3.8 โครงสร้างของโมเลกุลอนุพันธ์ที่โบที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำนายและแสดงค่าสัมพันธภาพในการยับยั้งที่ได้จากการทดลองและการคำนวณโดยแบบจำลอง CoMFA (model 8)

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 แต่ขนาดของหมู่มัแทนที่ที่ถูกจำกัดโดยคอนทัวร์สีแดง 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 ($\log(1/C) = 7.397$) จึงนำเอาโมเลกุลนี้เป็นโมเลกุลเปรียบเทียบกับโมเลกุลใหม่ โดยจากการคำนวณด้วย CoMFA model 11 จะให้ค่าการทำนายกัมมันตภาพของโมเลกุลนี้เป็น $\log(1/C) = 7.279$ และจะใช้เป็นค่าเปรียบเทียบกับ

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 สำหรับกลุ่มอนุพันธ์ของเนวิราพินให้ค่าความน่าเชื่อถือทางสถิติค่อนข้างต่ำ โดยแบบจำลองที่ดีที่สุดนั้นมีค่า multiple correlation coefficient, r , เท่ากับ 0.568 เท่านั้น ในขณะที่ แบบจำลอง QSAR ของอนุพันธ์ที่โบ ให้ค่า r เท่ากับ 0.869 ซึ่งนับว่าเป็นแบบจำลองที่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวอธิบายโครงสร้างกับกัมมันตภาพได้เป็นอย่างดี และยังเป็นแบบจำลองที่มีความสามารถในการทำนายที่ดีด้วย กล่าวคือมีค่า Q^2 เท่ากับ 0.677 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ ดังนั้น สำหรับกลุ่มอนุพันธ์ของเนวิราพินจึงยังต้องมีการพัฒนาตัวอธิบายโครงสร้างของของโมเลกุลในกลุ่มต่อไป

นอกจากนี้แล้วโครงการวิจัยได้นำระเบียบวิธีวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามโมเลกุล (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) มาศึกษาในโครงการนี้ด้วย เพื่ออธิบายสมบัติของโครงสร้างที่สำคัญในการแสดงกัมมันตภาพยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ชนิดที่ไม่มี การกลายพันธุ์ (wild type RT) ในเอนไซม์ สำหรับอนุพันธ์ของเนวิราพินได้ศึกษากับเอนไซม์ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ (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 สำหรับอนุพันธ์เนวิราพินมี test set จำนวน 22 โครงสร้าง และอนุพันธ์ของทีโบ จำนวน 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 Tyrocin 181 ได้เป็นอย่างดี และเมื่อกรด amino ในตำแหน่งดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์จาก tyrocin เป็น cystaine จึงทำให้ขาดอันตรกิริยาสเตอริกระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ในบริเวณนี้ และอาจทำให้ตัวยับยั้งไม่สามารถแสดงกัมมันตภาพที่ดีได้ ซึ่งผลการศึกษานี้ นับเป็นการค้น

พบที่สำคัญที่สามารถอธิบายอันตรกิริยาที่แตกต่างกันของตัวยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์และมีการกลายพันธุ์ได้โดยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์โมเดลลิง

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 Derivatives. 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.

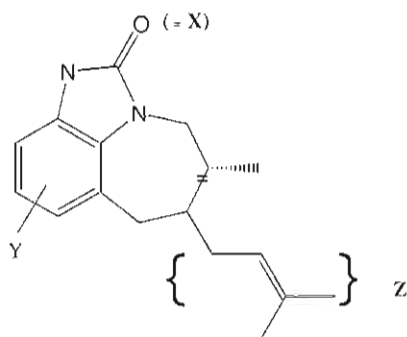


Figure 1. General structure of tetrahydroimidazo [4,5,1-jk][1,4] benzodiazepinone.

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

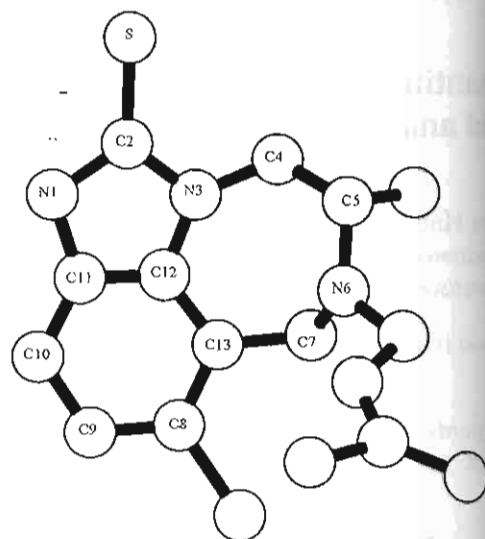


Figure 2. Structure of TIBO, obtained from complexed structure between TIBO and HIV-1 reverse transcriptase [9]; the atom numbering as used in this study is indicated.

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).

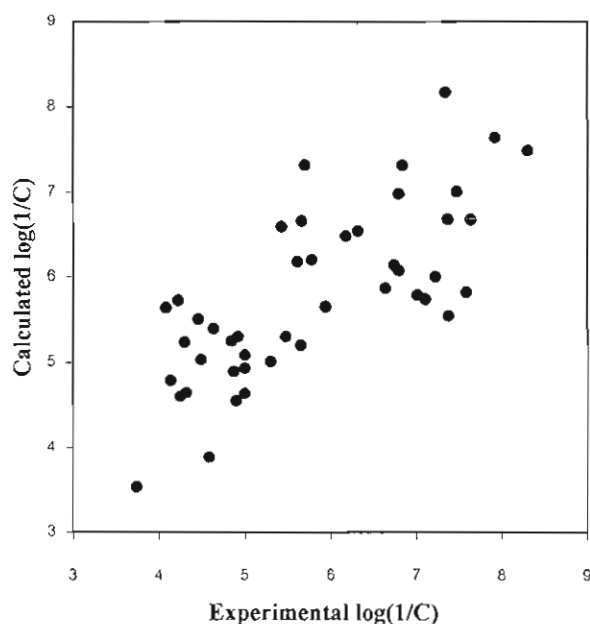
present study, both in statistical significance and predictive ability. The variables used in this equation have no mutual correlation as shown in Table 4. The multiple correlation coefficient of this equation is 0.869 and it accounts for 75.5% of the variation in the biological data. The experimental 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

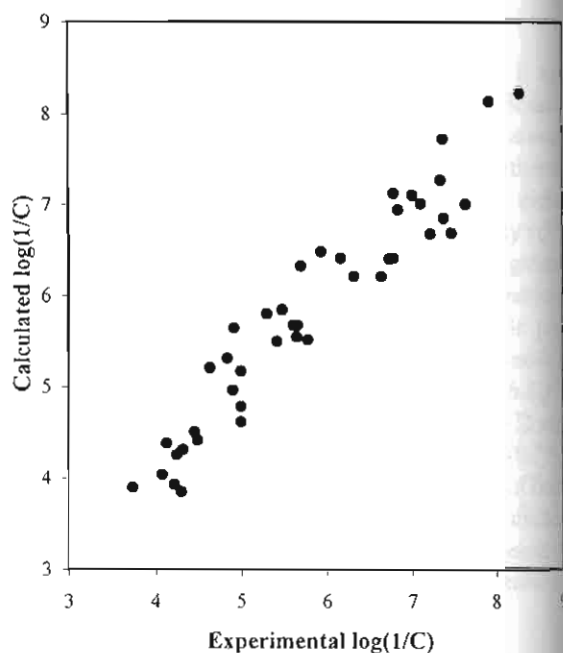
Table 6. The statistic results with lattice grid space by 1 Å and 2 Å

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

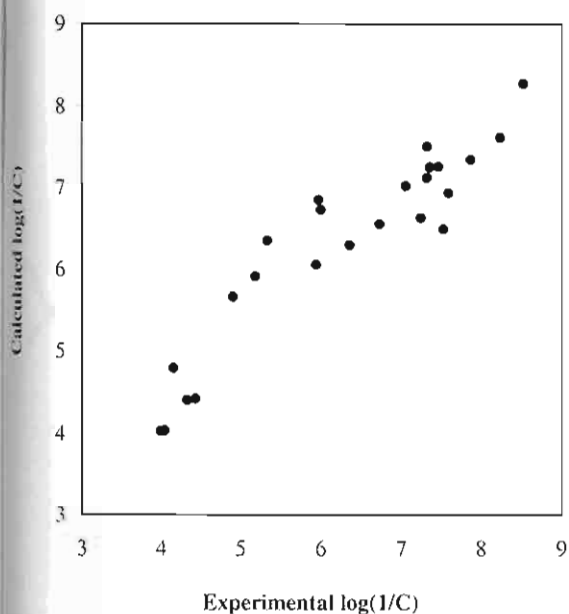


Figure 5. Plot of calculated versus experimental HIV-1 RT inhibitory affinities ($\log(1/C)$) obtained from non-cross-validation of CoMFA model 8 for test set compounds.

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

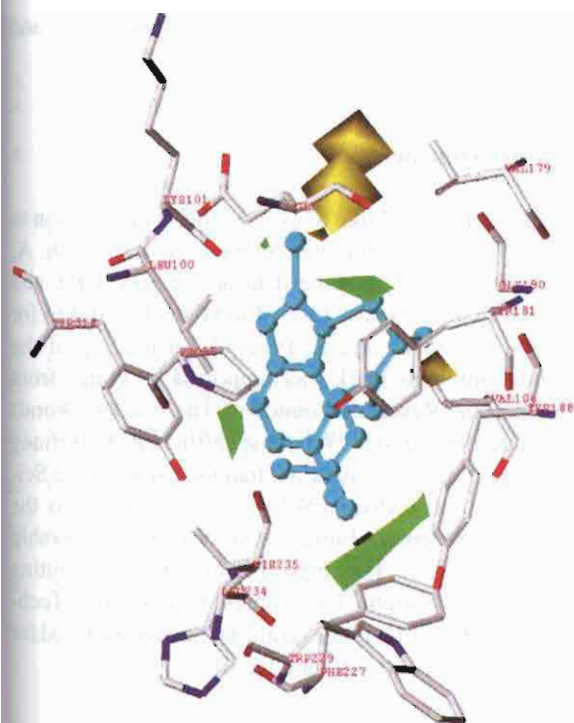


Figure 6. CoMFA steric STDEV*COEFF contour plot from the analysis based on the 3D-QSAR model 8 with no cross-validation. Sterically favored areas are represented by green regions. Sterically unfavored areas are represented by yellow regions. Compound 36 is displayed inside the fields as a ball and stick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

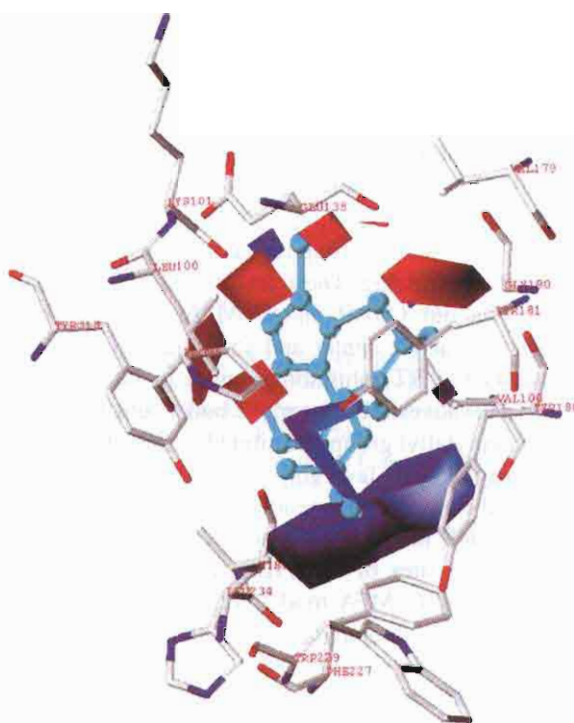


Figure 7. CoMFA electrostatic STDEV*COEFF contour plot from the analysis based on the 3D-QSAR model 8 with no cross-validation. Negative charge favored areas are represented by red regions. Negative charge unfavored areas are represented by blue regions. Compound 36 is displayed inside the fields as 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 Try188 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

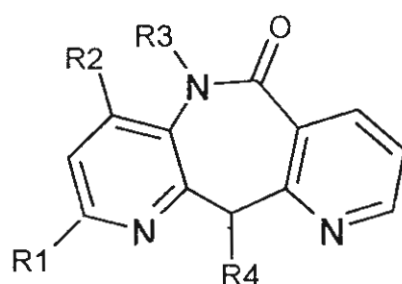
1. Merluzzi, V.J., Hargrave, K.D., Labadia, M.J., Qrozinger, K., Skoog, M., Wu, J.C., Shinh, C., Shinh, C.-K., Eckner, K., Hattooy S. and Sullivan, L.L. Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science*. 1990, **250**, 1411-1413.
2. Kohlsatedt, L.A., Wang, 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

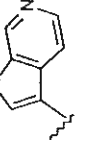
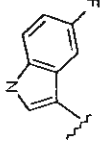
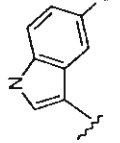
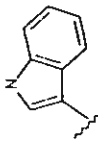
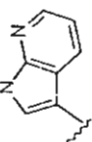


Table 2. (Continued)

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 dipyrroliodiazepinone compounds at different probe atoms.

Model	Probe atom	Field type	noc	r^2_{cv}	s-press	r^2_{ta}	s	F	Outliers(residual)	Steric contrib ^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).

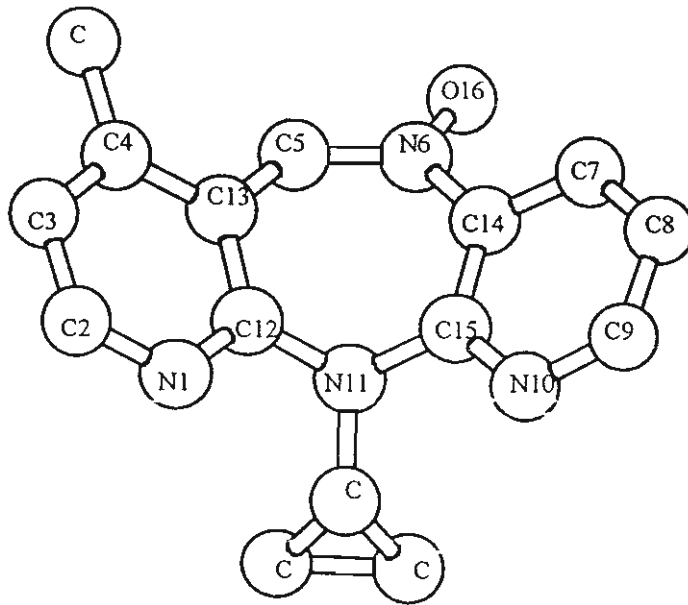


Figure 1

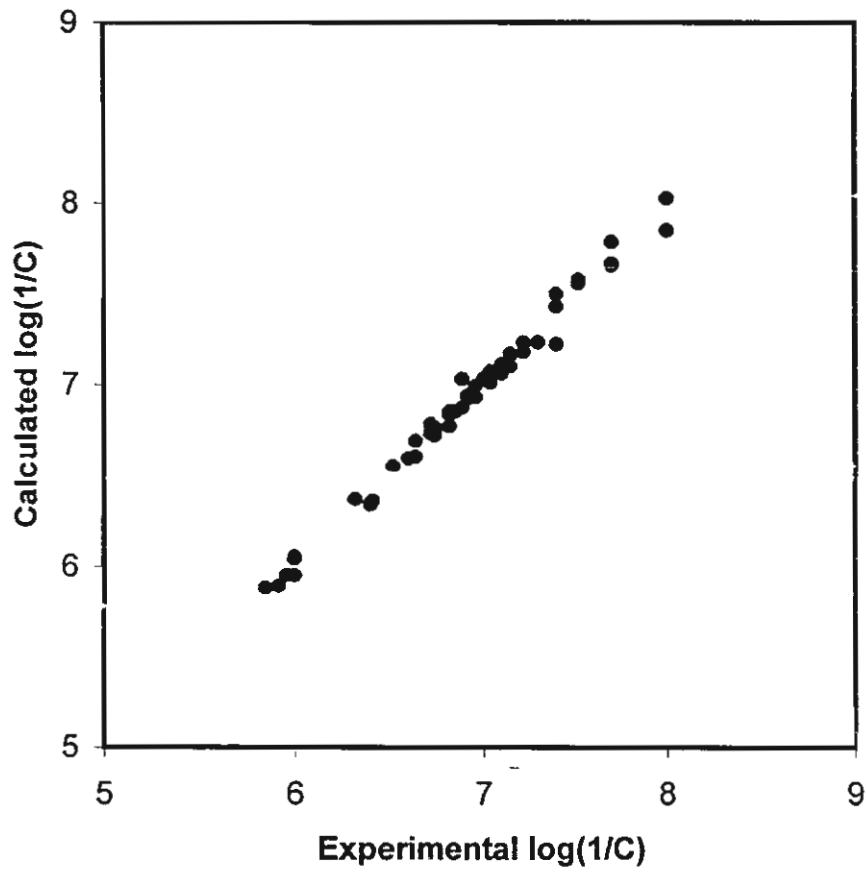


Figure 2

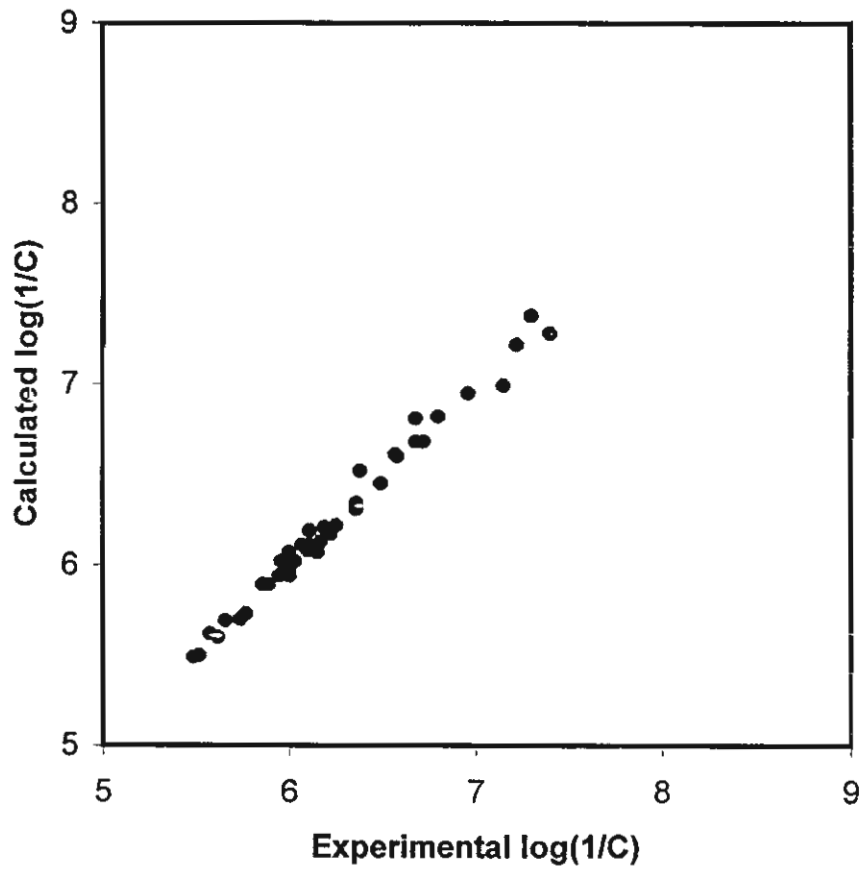


Figure 3

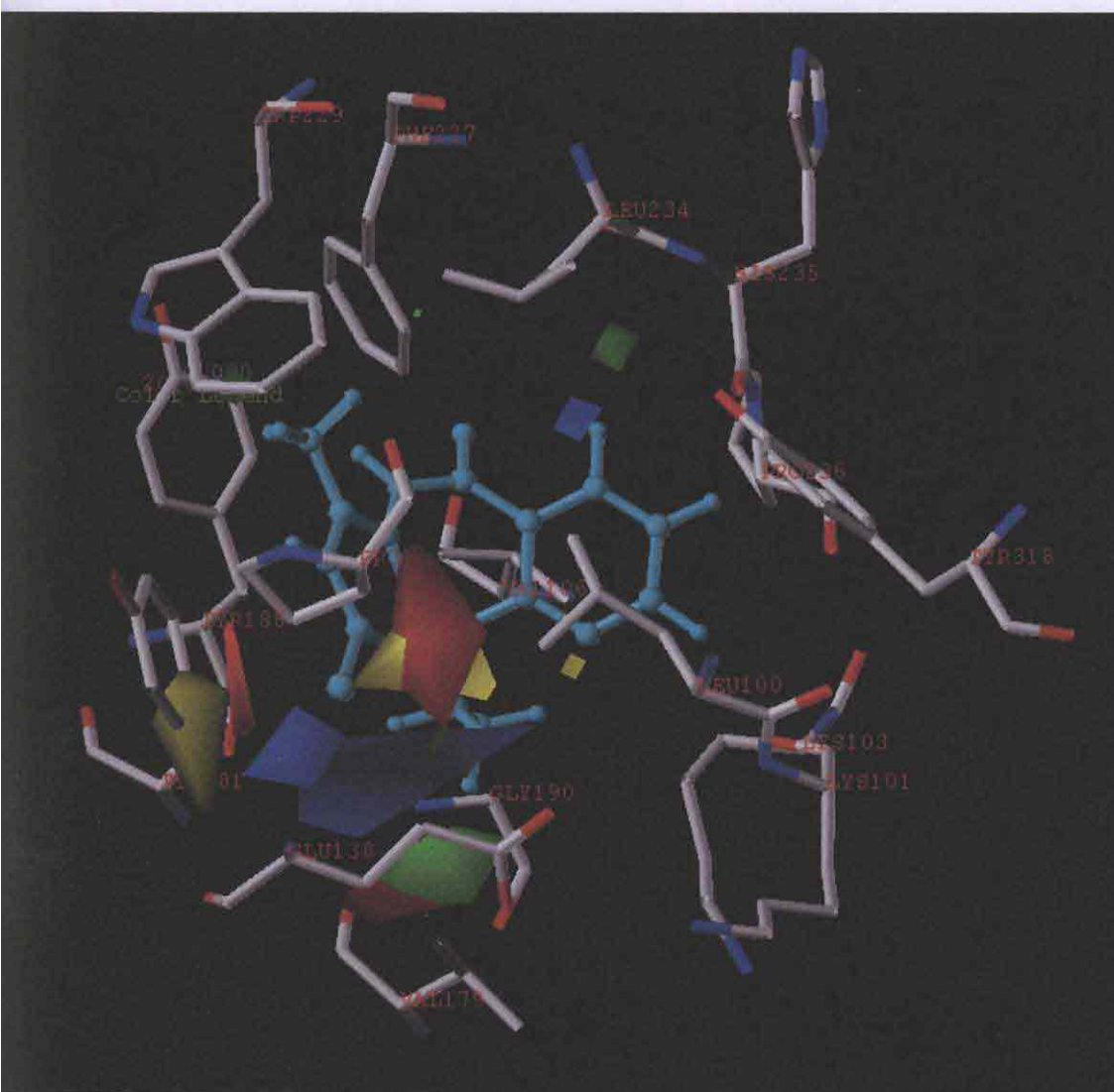


Figure 6

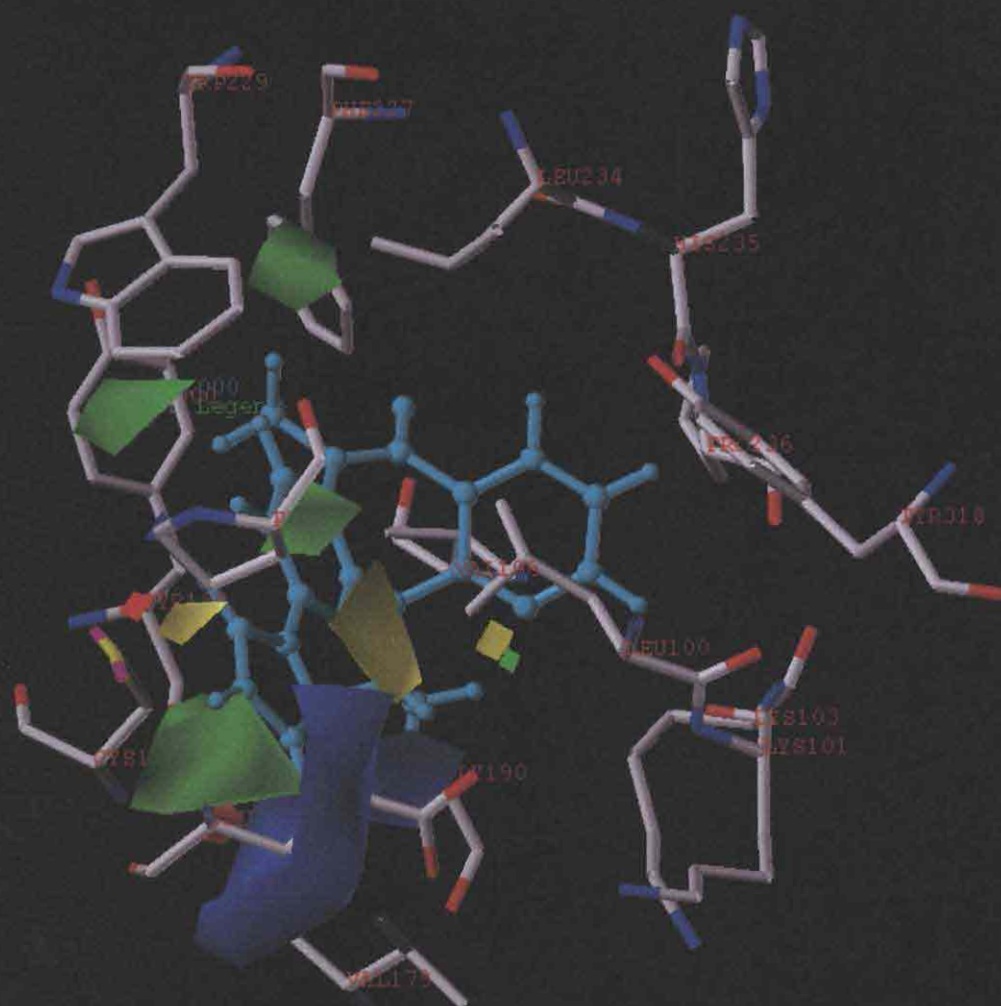
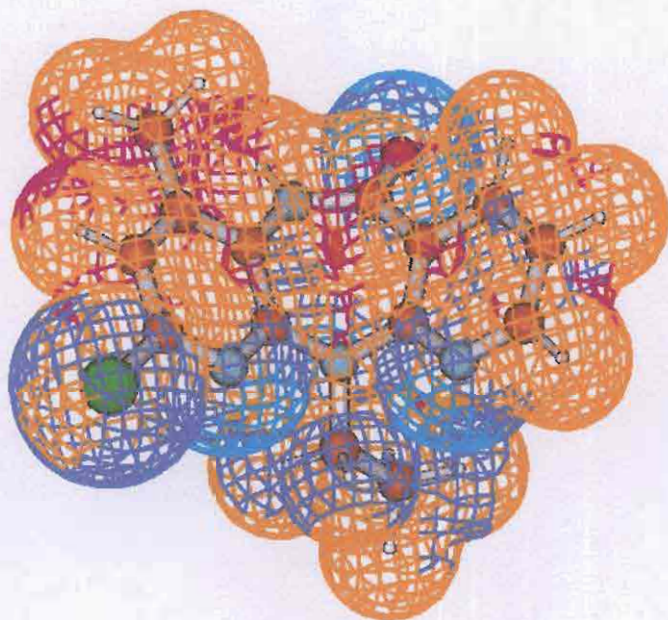
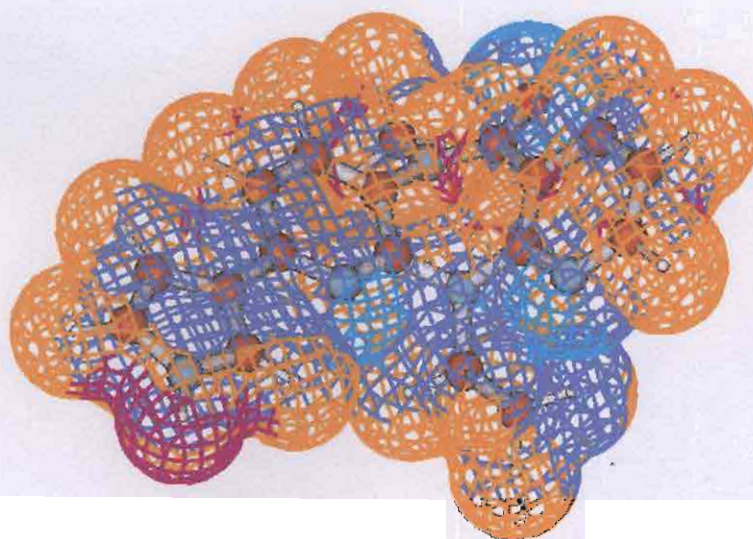


Figure 7



ESP of compound 12



ESP of compound 32

Figure 8