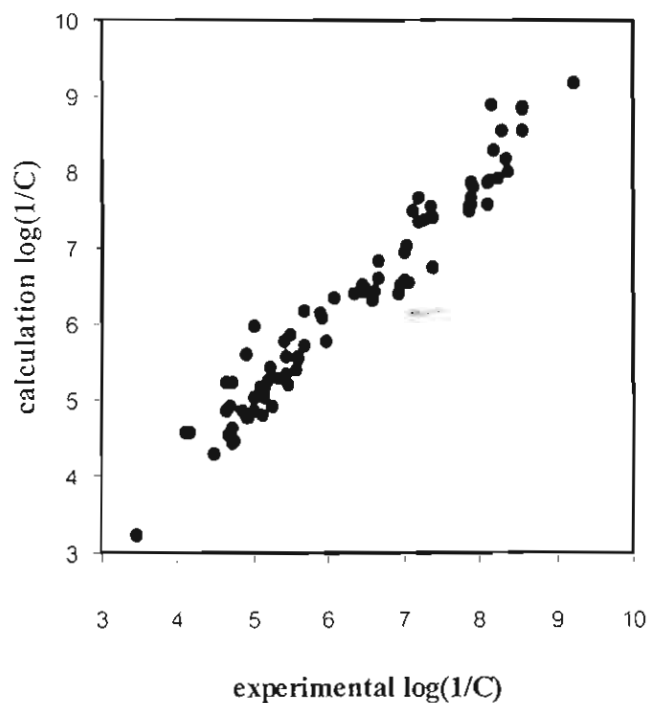


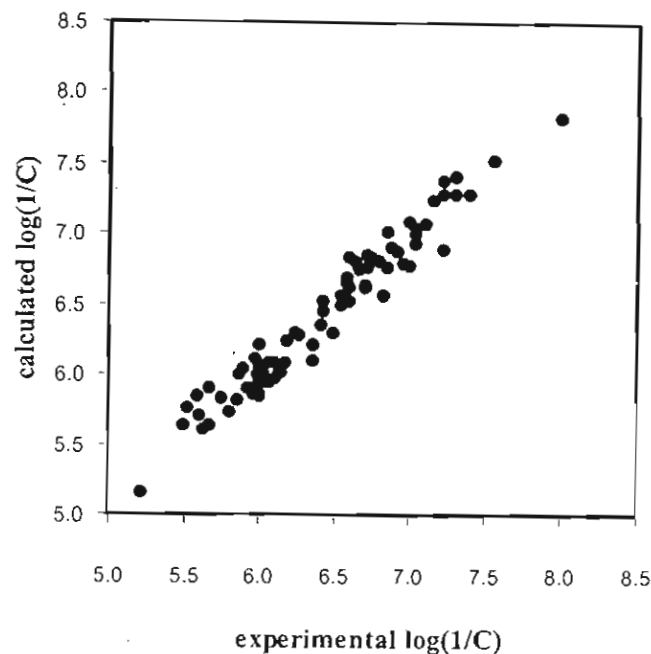
หมายเลข 35 เป็น outlier ของเอนไซม์ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ ในโครงสร้างที่มีหมู่ aryl ที่หมุนได้ในตำแหน่ง R1 นั้นทำให้สารวางตัวในการจับกับโพรงการจับของเอนไซม์แตกต่างจากสารอื่นๆ สารที่มีโครงสร้างลักษณะนี้คือสารหมายเลข 83 และ 85 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม มีหมู่ $\text{CH}_2\text{O}(\text{pyrid-3-yl})$ แทนที่ที่ตำแหน่ง C8 ซึ่งไม่สามารถเกิดอันตรกิริยากับโพรงการจับของเอนไซม์ได้ ทำให้ความสามารถในการยับยั้งลดลง ซึ่งการอธิบายในลักษณะนี้สามารถใช้อธิบาย outlier ของเอนไซม์ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ Y181C ได้ สารหมายเลข 81 เทียบกับสารหมายเลข 82 และสารหมายเลข 63 เทียบกับสารหมายเลข 62 ได้



ภาพที่ 3.5.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า calculated และ experimental WT HIV-1 RT inhibitory affinities ซึ่งคำนวณโดยวิธี non-cross-validation ของสมการ HQSAR model 12 ของสาร dipiridodiazepinone ในกลุ่ม training set

3.5.10 ความสามารถในการทำนายของสารชุดทดสอบ

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถของการทำนายของโมเดลที่ได้นั้น ต้องใช้สารชุดทดสอบซึ่งแบ่งเป็นสารในกลุ่มของ TIBO จำนวน 22 สาร HEPT จำนวน 19 สาร และ dipyridodiazepinone จำนวน 35 สาร เป็นตัววัดความสามารถในการทำนายค่ากัมมันตภาพของการยับยั้ง ได้แสดงการเปรียบเทียบผลของค่ากัมมันตภาพของการยับยั้ง ที่มาจากการวัดและที่มาจากการคำนวณในตารางที่ 3.5.2, 3.5.3 และ 3.5.4 ตามลำดับ สำหรับ TIBO พบว่า TIBO หมายเลข 18 และ TIBO หมายเลข 20 ให้ผลการทำนายค่ากัมมันตภาพจากการคำนวณใกล้เคียงกับค่าจากการทดลองมาก สำหรับ TIBO หมายเลข 3, 5, 7, 12, 15, และ 22 นั้นจัดว่าให้ค่าการทำนายอยู่ในระดับปานกลาง ในส่วนของ HEPT นั้นพบว่า HEPT หมายเลข 3, 5 และ 6 ให้ผลที่ดีและสอดคล้องกับการทดลอง HEPT หมายเลข 4, 11, 13, 15, 6, และ 18 ให้ค่าการทำนายอยู่ในระดับปกติ ในการตรวจสอบการคำนวณค่า $\log(1/C)$ ของอนุพันธ์ในกลุ่มของ dipyridodiazepinone ด้วยโมเดลที่ 17 พบว่า สารหมายเลข 3, 8 และ 28 ให้ผลการทำนายที่ดีมาก ส่วนสารหมายเลข 1-2, 4-6, 9, 13-14, 16-17, 19, 22-23, 25, 27, 29, 30 และ 33 ให้ผลที่สอดคล้องกับผลจากการทดลอง จะเห็นว่าโมเดลเหล่านี้ให้ผลที่สอดคล้องกันทั้ง 3 ชนิด ดังนั้นจึงสามารถใช้ทำนายค่าที่นอกเหนือจากสารในกลุ่ม training set ได้



ภาพที่ 3.5.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า calculated และ experimental Y181C HIV-1 RT inhibitory affinities ซึ่งคำนวณโดยวิธี non-cross-validation ของสมการ HQSAR model 16 ของสาร dipiridodiazepinone ในกลุ่ม training set

3.5.11 การแปลความหมายของโมเดล HQSAR

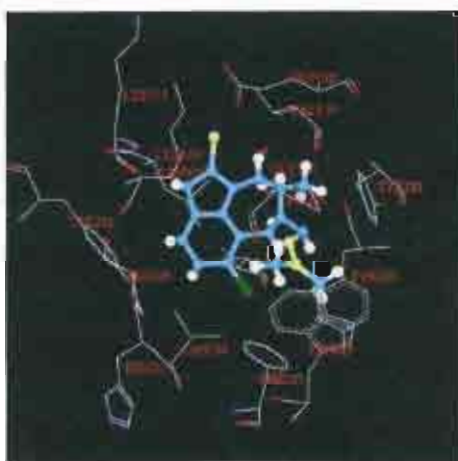
การแปลผลของแบบจำลอง HQSAR ซึ่งให้เห็นถึงองค์ประกอบที่สำคัญของโมเลกุลในการแสดงกัมมันตภาพในการยับยั้ง โดยจะแปลผลออกมาเป็นสี่ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงการกระจายตัวของกัมมันตภาพ โดยแผนภาพคอนทัวร์สีแดงเข้มชี้ให้เห็นว่ามีกัมมันตภาพการยับยั้งที่ต่ำ ขณะที่สีเขียวเหลืองจะชี้ให้เห็นว่าเป็นบริเวณที่มีกัมมันตภาพการยับยั้งที่สูง ส่วนที่มีการกระจายตัวเป็นแบบกึ่งกลางระหว่างสูงและต่ำจะเป็นสีขาว โครงสร้างของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่อยู่ในรูปโครงสร้างเชิงซ้อนกับตัวยับยั้งนั้นนำมาจากข้อมูลทางโครงสร้างการตกผลึก ทำการผสมระหว่างกรดอะมิโนที่อยู่รอบๆโพรงการจับของเอนไซม์กับตัวยับยั้งทั้ง 3 ชนิดคือ TIBO, HEPT และ dipiridodiazepinone เพื่อให้เข้าใจถึงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์



8a (tibo-r36)

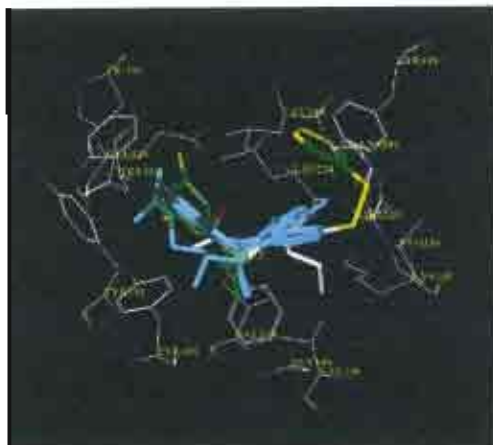


8b (tibo-r22)

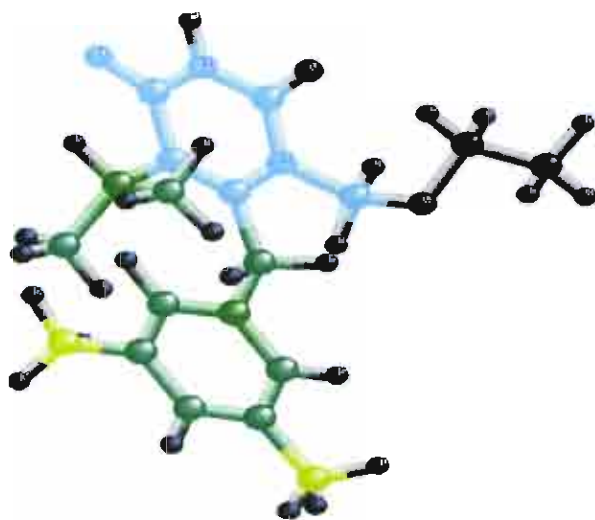


8c

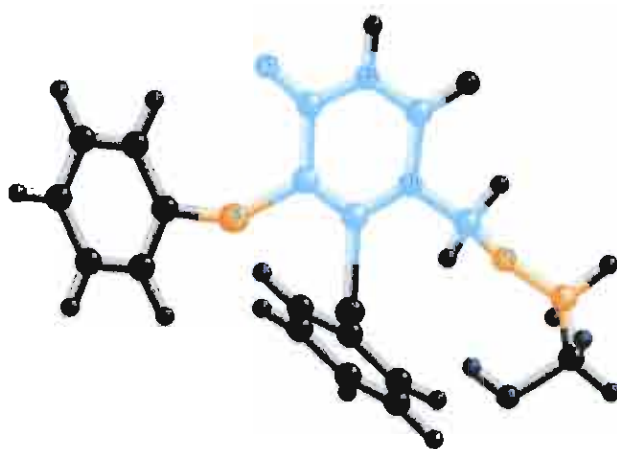
ภาพที่ 3.5.8 แสดงอันตรกิริยาที่ได้จาก HQSAR model 4 สำหรับสารอนุพันธ์ TIBO หมายเลข 38 (8a) และ 22 (8b) นอกจากนี้แล้วยังได้แสดงโครงสร้างสารหมายเลข 38 ภายในโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 (8c) ด้วย



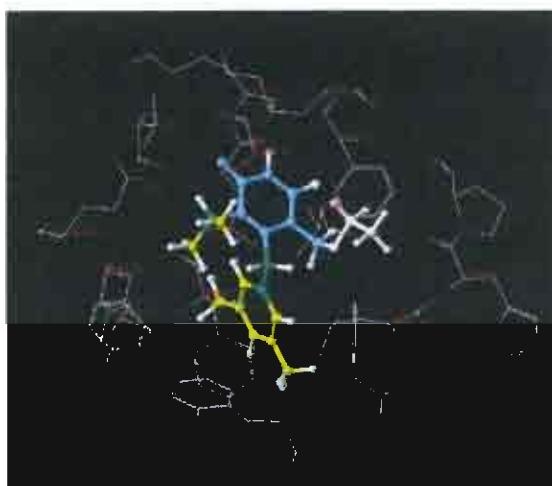
9a



9a (hept-78b)



9b (hept-05)



9c

ภาพที่ 3.5.9 แสดงอันตรกิริยาที่ได้จาก HQSAR model 7 สำหรับสารอนุพันธ์ HEPT หมายเลข 78 (9a) และ 5 (9b) นอกจากนี้แล้วยังได้แสดงโครงสร้างสารหมายเลข 78 ภายในโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 (9c) ด้วย

ได้เสนอ molecular hologram ของ TIBO จากโมเดลที่ 4 ในภาพที่ 3.5.8 ซึ่งจากรูปสรุปได้ว่า มีสีเขียวน้ำเงินที่บริเวณอะตอมของ S และสีแดงที่บริเวณอะตอมของ O ในตำแหน่ง C2 ดังนั้นจึงควรใช้ S แทน O ที่ตำแหน่ง C2 จะทำให้กัมมันตภาพของการยับยั้งเพิ่มขึ้น และยังมีสีแดงที่หมู่แทนที่ที่เป็นคลอโร บริเวณตำแหน่ง C8 และ C9 จึงเสนอว่าสารที่มีหมู่แทนที่ที่เป็น 8-Cl หรือ 9-Cl ในวงเบนซีนนั้นจะมีความสามารถในการยับยั้งสูงกว่าโมเลกุลอื่น นอกจากนี้ยังมีสีเขียวน้ำเงินในบริเวณที่เป็นหมู่ใหญ่ๆ เช่น 3,3-dimethylallyl, 2-methylallyl ที่ตำแหน่ง N6 ด้วย อย่างไรก็ตามหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่ ๆ เช่น $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ กลับลดกัมมันตภาพของการยับยั้ง จะเห็นได้ว่ามีสีแดงบริเวณหมู่แทนที่นี้ ส่วนที่เพิ่มเติมเข้ามาคือ มีสีส้มที่หมู่ alkyl ที่ตำแหน่ง C4 ซึ่งเป็นการลดกัมมันตภาพในการยับยั้ง ซึ่งผลเหล่านี้สอดคล้องกับแผนภาพคอนทัวร์จากการวิเคราะห์ด้วย CoMFA มีสีเขียวบริเวณ N6 ในวง diazepine ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับการทดลองที่ว่า หมู่แทนที่ dimethylallyl ที่ N6 นั้นเหมาะสมที่สุด กราฟ HQSAR ในภาพที่ 3.5.8a ถึง 3.5.8b นั้นสารที่มีกัมมันตภาพในการยับยั้งสูงสุดคือ สารหมายเลข 38 และ ต่ำสุดคือ สารหมายเลข 22 ในภาพที่ 3.5.8c นั้นได้แสดงโครงสร้างสารหมายเลข 38 และเรซิดิวส์ที่อยู่รอบ ๆ โพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี-1 ข้อสรุปที่ใกล้เคียงกันของ molecular fragment จากการวิเคราะห์ด้วย HQSAR กับโครงสร้างที่ได้จากการทดลองนั้นเป็นที่เห็นชัดว่ามีความสัมพันธ์กันกับเรซิดิวส์ที่อยู่รอบๆ สารยับยั้ง ในทำนองเดียวกันระหว่าง dimethylallyl side chain กับเรซิดิวส์ Tyr181 และ 188 และยังมี Cl ที่ตำแหน่ง C8 หรือ C9 กับเรซิดิวส์ Tyr188

เมื่อพิจารณาอนุพันธ์ของ HEPT จากโมเดลที่ 12 พบว่าหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ isopropyl ที่ตำแหน่ง C5 นั้นจะเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเนื่องจากมีสีเขียวบริเวณนี้ ขณะที่หมู่แทนที่ที่เป็น aryl เช่น methyl หรือ ethyl นั้นลดประสิทธิภาพการยับยั้ง และหมู่ที่เป็นวงอะโรแมติกจะลดกัมมันตภาพของการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ด้วย ส่วนหมู่ที่เป็น CH_2Ph (3, 5-di-Me) ที่ตำแหน่ง C6 มีสีเขียวบริเวณนี้ดังนั้นจะเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้ง สำหรับหมู่ OCH_2 ที่ตำแหน่ง N1 มีสีแดงส้มเป็นบริเวณที่จะไปลดกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี-1 ขณะที่ EtOCH_2 จะเพิ่มการยับยั้ง (มีสีเขียวน้ำเงิน) ในรูป 3.5.9a นั้นได้แสดงโครงสร้างของสารหมายเลข 78 ซึ่งเป็นสารที่มีกัมมันตภาพในการยับยั้งสูงสุด ส่วนรูป 3.5.9b นั้นแสดงโครงสร้างของสารหมายเลข 5 ซึ่งเป็นสารที่มีกัมมันตภาพในการยับยั้งต่ำที่สุด ในภาพที่ 3.5.9c แสดงโครงสร้างของสารหมายเลข 78 และเรซิดิวส์ที่อยู่รอบๆ โพรงการจับของเอนไซม์ ซึ่งผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับแผนภาพคอนทัวร์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี CoMFA ซึ่งพบว่าที่ตำแหน่ง C5 เป็นบริเวณที่ขอบความเป็น steric ที่ C5 มีวง thymine ซึ่งจะเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้ง อย่างไรก็ตามขนาดของหมู่แทนที่ที่ต้องไม่ใหญ่เกินไป จากข้อมูลของ HQSAR และ CoMFA ให้ผลที่ตรงกับ

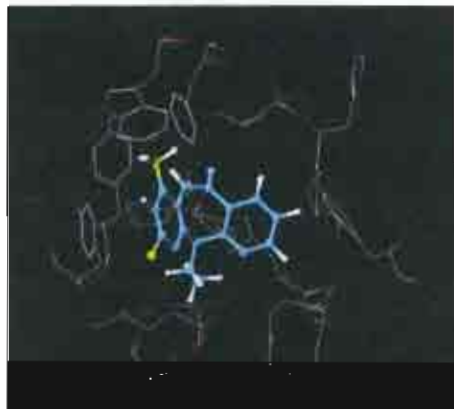
การทดลองที่ว่า หมู่แทนที่ isopropyl นั้นเป็นหมู่ที่เหมาะสมที่สุดที่ตำแหน่ง C5 เพราะว่ามีข้อจำกัดในแง่ของโปรแกรมจับ หมู่แทนที่ที่ใหญ่เกินไปจะลดทอนคุณภาพในการยับยั้ง



10a (w8364-r9)



10b (w8462-005)



10c

ภาพที่ 3.5.10 แสดงอันตรกิริยาที่ได้จาก HQSAR model 12 สำหรับสารอนุพันธ์ dipyridodiazepinone หมายเลข 12 (10a) and 7 (10b) นอกจากนี้แล้วยังได้แสดงโครงสร้างสารหมายเลข 12 ภายในโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 (10c) ด้วย

สำหรับอนุพันธ์ของ dipyridodiazepinone ที่ออกฤทธิ์กับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิม ซึ่งผลจากการศึกษาด้วย HQSAR ได้ผลที่ดีที่สุดโมเดลที่ 12 ได้ข้อเสนอแนะถึงการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของการเกิดอันตรกิริยา คอนทอร์สียะวน้ำเงินที่มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ halogen ที่ตำแหน่ง C2 และมีหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง C4 ส่งผลให้มีศักยภาพในการเกิดอันตรกิริยาสูงขึ้นมาก ในทางตรงกันข้ามหมู่แทนที่อะลิฟาติกที่มีขนาดใหญ่ เช่น isopropyl หรือ tertiary butyl ที่ตำแหน่งเดียวกันนี้จะไปลดศักยภาพในการยับยั้ง (แสดงโดยสีแดง) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HQSAR พบว่าสารหมายเลข 12 มีการยับยั้งเอนไซม์สูงที่สุด และสารหมายเลข 5 มีการยับยั้งเอนไซม์ต่ำที่สุด ซึ่งแสดงอยู่ในภาพที่ 3.5.10a และ 3.5.10b ผลจากการวิเคราะห์นี้ให้ผลที่สอดคล้องกับผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี CoMFA มีการกระจายตัวของ steric และ electrostatic มากที่บริเวณ C2 และ C4 ที่วง tricyclic ซึ่งมีคอนทอร์สียะวสีเหลืองรอบๆ R1 บนวง tricyclic และยังมีคอนทอร์สียะวขนาดใหญ่ใกล้ๆกับบริเวณนี้ ดังนั้นแสดงว่าบริเวณนี้ไม่ต้องการหมู่ขนาดใหญ่และควรเพิ่มการกระจายตัวของอิเล็กตรอนในโมเลกุลจะทำให้การจับของตัวยับยั้งเพิ่มขึ้น ซึ่งผลเหล่านี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่รายงานว่า อนุพันธ์ที่ 2-F และ 2-Cl นั้นมีศักยภาพในการยับยั้งสูงกว่า (สารหมายเลข 7-10 ในตารางที่ 3.5.1) ในทำนองเดียวกัน สารหมายเลขที่ 12 จึงแสดงศักยภาพในการยับยั้งสูงที่สุด สำหรับภาพที่ 3.5.10c แสดงโครงสร้างเชิงซ้อนของ dipyridodiazepinone กับ เอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ความสำคัญของ molecular fragment จากวิธี HQSAR นั้นมีความสำคัญสามารถอธิบายถึงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างวง aromatic ของเรซิดิว Tyr181 และ วง tricyclic ของ C2 ขณะเดียวกันต้องคำนึงถึงข้อจำกัดของขนาดของโพรงการจับและหมู่แทนที่ที่ต้องมีขนาดไม่ใหญ่เกินไป เพราะจะส่งผลให้การเกิดอันตรกิริยาลดลง

ในส่วนของตัวยับยั้งที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ Y181C นั้นอธิบายได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HQSAR โมเดลที่ 17 ซึ่งพบว่ามีสีเหลืองและเหลืองที่ CH_2SPh และ CH_2OPh ที่ตำแหน่ง C8 ซึ่งจะเพิ่มศักยภาพการยับยั้ง ในทางตรงกันข้ามมีสีแดงและแดงส้มที่หมู่แทนที่ที่เป็น non-aromatic เช่น $(\text{CH}_2)_2\text{CONH}_2$, $(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ และ $(\text{CH}_2)_2\text{CN}$ ที่ตำแหน่งเดิม ซึ่งจะลดศักยภาพการยับยั้ง จากโมเดลที่ 17 นี้ได้แสดงความต้องการทางด้านโครงสร้างที่สำคัญสำหรับตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพไว้ในภาพที่ 3.5.11a-3.5.11b เป็นการเปรียบเทียบระหว่างสารหมายเลข 87 ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งที่สูงกับสารหมายเลข 40 ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ต่ำ ผลที่ได้จากการศึกษาสารอนุพันธ์ dipyridodiazepinone ที่มีผลต่อเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 และที่มีผลต่อเอนไซม์ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ Y181C นั้นมีความแตกต่างกัน สิ่งที่สังเกตได้คือมีสีเหลืองที่หมู่แทนที่ที่เป็น Cl ที่ตำแหน่ง C2 และ CH_3 ที่ตำแหน่ง C4 แต่ไม่พบในโมเดลที่ 17 ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับข้อเท็จจริงที่ว่า สารหมายเลข 12 นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุดในกรณีของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิม แต่ไม่ใช่ในกรณีของ

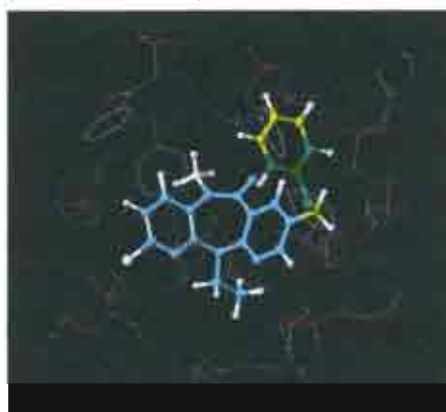
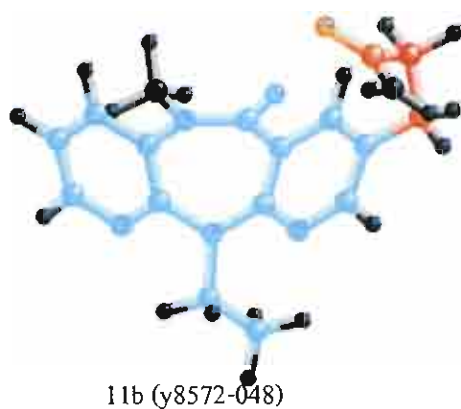
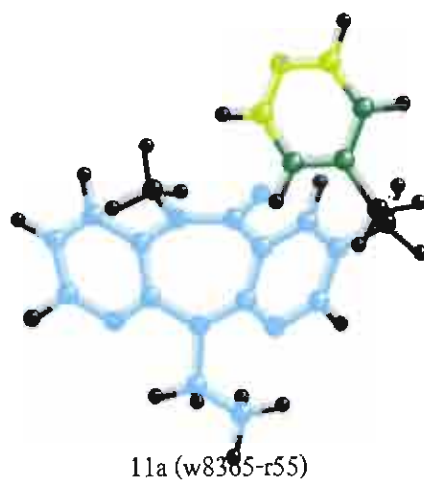
เอนไซม์ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ Y181C แต่กลับเป็นสารหมายเลข 87 ที่มีหมู่แทนที่ CH_2SPh ที่ C8 มีค่าสูงที่สุด ผลที่ได้มีข้อมูลจากการศึกษาด้วยระเบียบวิธี CoMFA สนับสนุนที่ชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดที่มีการกลายพันธุ์ โดยที่บริเวณนี้มีคอนทัวร์สีเขียวขนาดใหญ่ซ้อนทับสีแดง แสดงว่าเป็นบริเวณที่ควรมีหมู่แทนที่ขนาดใหญ่ และมีการกระจายตัวของอิเล็กตรอนมาก สำหรับข้อมูลทางด้านโครงสร้างการตกผลึกของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ Y181C พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ทำให้สูญเสียอันตรกิริยาของวง aromatic ของ tyrosine และตัวยับยั้ง เพราะฉะนั้นการเปลี่ยนแปลงของ steric และ electrostatic ในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ ภาพที่ 3.5.11c จึงแสดงความสำคัญของโครงสร้างตัวยับยั้งที่เสนอโดยวิธี HQSAR กับกัมมันตภาพของการยับยั้งของสารอนุพันธ์ dipyridodiazepinone ที่ออกฤทธิ์กับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดที่มีการกลายพันธุ์ Y181C

ข้อสังเกตอื่น ๆ ที่น่าสนใจที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี HQSAR ของสารอนุพันธ์ทั้งสามชนิดหลัก การทำการวางซ้อนทับของ HIV-1-RT/TIBO, HIV-1-RT/nevirapine และ HIV-1-RT/HEPT บนพื้นฐานของการซ้อนทับกับในแนวแกนหลักของอะตอมในบริเวณโพรงการจับ พบว่ามีลักษณะเป็นตัวยับยั้งที่มีลักษณะการวางตัวเป็นรูปผีเสื้อในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ และยังสามารถแสดงการซ้อนทับกันของ molecular fragment ที่ได้จาก HQSAR ในภาพที่ 3.5.12 พบว่าบริเวณที่เพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้งจะเห็นได้ว่ามีสีเขียวและเหลือง มีหมู่แทนที่ dimethylallyl ที่ตำแหน่ง N6 ของ TIBO หมู่ CH_2Ph (3,5-di-methyl) ที่ตำแหน่ง C6 ของ HEPT และ Cl ที่ตำแหน่ง C2 รวมทั้งหมู่ CH_3 ที่ตำแหน่ง C4 ของ dipyridodiazepinone ซึ่งผลสรุปนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบโครงสร้างเชิงซ้อนของ HIV-1/TIBO R86183 กับตัวยับยั้งที่อยู่ในกลุ่ม non-nucleoside โมเลกุลอื่นๆ ผลที่ศึกษาโดยวิธี HQSAR ที่ได้นั้นสามารถใช้อธิบายให้เห็นถึงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นของสารทั้ง 3 อนุพันธ์หลักของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวีได้

3.5.12 การเปรียบเทียบกับผลการศึกษาโดยวิธี QSAR แบบอื่น ๆ

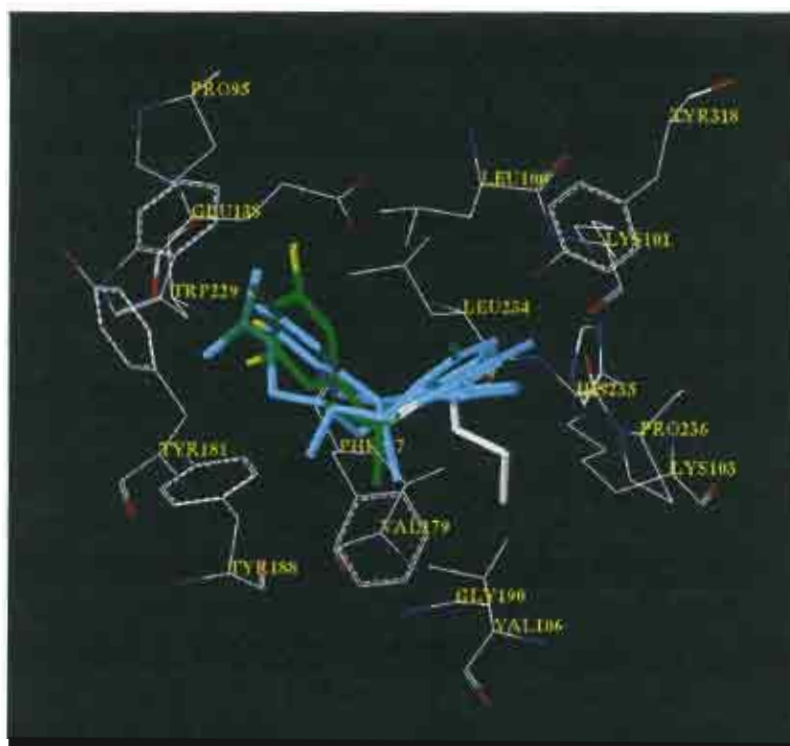
ดังที่ได้เคยศึกษาสารในกลุ่ม NNRTIs ด้วยระเบียบวิธี 2D-QSAR และ 3D-QSAR มาก่อน จึงนำมาผลนั้นมาไว้เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง HQSAR ที่ได้ในโครงการนี้กับผลการศึกษาของวิธี QSAR แบบอื่น ๆ ซึ่งผลการเปรียบเทียบได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.5.6 และพบว่า QSAR ของทุก ๆ อนุพันธ์หลักของ NNRTIs นั้นมีความสามารถในการทำนายเทียบได้กับผลที่ได้จากการศึกษาโดยวิธี CoMFA ในกรณีเปรียบเทียบ HQSAR กับ 2D-QSAR พบว่า HQSAR ให้ผลที่ดีกว่า โดยพิจารณาได้จากการวิเคราะห์ด้วย HQSAR ของสารอนุพันธ์ dipyridodiazepinone ที่ออกฤทธิ์กับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดที่มีการกลายพันธุ์

Y181C ให้ค่า $r^2_{cv} = 0.74$ และของเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดดั้งเดิมให้ค่า $r^2_{cv} = 0.62$ ซึ่งให้ค่าที่ดีเมื่อเทียบกับโมเดลอื่นๆ



ภาพที่ 3.5.11 แสดงอันตรกิริยาที่ได้จาก HQSAR model 17 สำหรับสารอนุพันธ์ dipyridodiazepinone หมายเลข 87 (11a) และ 50 (11b) นอกจากนี้แล้วยังได้แสดงโครงสร้างสารหมายเลข 87 ภายในโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี -1 ที่มีการกลายพันธุ์ Y181C (11c) ด้วย

ในทำนองเดียวกันกับ TIBO โมเดลที่ได้จากการศึกษาด้วยระเบียบวิธี HQSAR นั้นให้ค่า r^2_{cv} ที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับความสามารถในการทำนายของโมเดลที่ได้จากการศึกษาสารอนุพันธ์ HEPT ด้วยระเบียบวิธี QSAR ที่ผ่านมา ได้เคยศึกษา 2D QSAR โดยใช้ค่าประจุของอะตอมจากการคำนวณทางเคมีควอนตัม topological indices ความสามารถในการละลายในไขมัน molecular refractivity เป็นค่าที่ใช้อธิบายสมบัติต่างๆของสาร ผลการทดลองที่ได้พบว่า molecular holograms จากการศึกษาด้วย HQSAR ให้ผลที่ดีสามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ของตัวยับยั้งทั้ง 3 อนุพันธ์หลัก ในระเบียบวิธี QSAR มีแนวทางการวางตัวของโมเลกุลของตัวแปรอิสระนั้นพบว่า ระเบียบวิธี HQSAR เป็นวิธีที่มีข้อดีมากกว่าวิธีอื่นๆในระเบียบวิธี 2D QSAR สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างที่สำคัญสำหรับตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1



ภาพที่ 3.5.12 ภาพการวางซ้อนทับของโมเลกุล TIBO (สารหมายเลข 38), HEPT สารหมายเลข 78), dipyrindodiazepinone (สารหมายเลข 12 และ สารหมายเลข 27), และการแสดง HQSAR color coded จากโมเดลที่ดีที่สุด โดยวางซ้อนทับกับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ HIV-1 RT

ตารางที่ 3.5.6 แสดงการเปรียบเทียบผลการศึกษา QSAR ที่ได้เคยทำการศึกษามาก่อนเทียบกับผลของ HQSAR

Dataset	Biological activity	Methods	r^2_{cv}	r^2
TIBO	HIV-1 WT RT	MLR-QSAR ^a	0.68	0.87
		HQSAR ⁱ	0.73	0.91
		CoMFA ^b	0.77	0.94
HEPT	HIV-1 WT RT	MLR-QSAR ^c	0.89	0.960
		PLS-QSAR ^d	0.83	-
		MLR-QSAR ^e	0.78	-
		Neural network ^f	-	0.95
		HQSAR ⁱ	0.84	0.96
		CoMFA ^g	0.85	0.94
Dipyridodiazepinones	HIV-1 WT RT	MLR-QSAR ^h	0.60	-
		Neural network ^h	0.63	-
		HQSAR ⁱ	0.62	0.86
		CoMFA ⁱ	0.64	0.84
		CoMSIA ⁱ	0.65	0.95
Dipyridodiazepinones	HIV-1 Y181C RT	MLR-QSAR ^h	0.63	0.83
		Neural network ^h	0.68	-
		HQSAR ⁱ	0.74	0.91
		CoMFA ⁱ	0.78	0.98
		CoMSIA ⁱ	0.75	0.98

^a Hannongbua, S.; Pungpo, P.; Limtrakul, J.; Wolschann P. *J.Comp. Aided Mol. Des.*, 1999, 13, 563.

^b Pungpo, P.; Hannongbua, S. *J. Mol. Graph. Mod.*, 2000, 18, 581.

^c Lucio, J.M.; Ferriti, F.H. *J.Chem.Inf.Comp.Sci.*, 1997,37, 392.

^d Klein, C.Th.; Lawtrakul, L.; Hannongbua, S.; Wolschann, P. *Sci.Pharm.* 2000, 68, 25.

^e Tronchet, J.M.J.; Grigorov, M.; Dolatshahi, N.; Monaud, F.; Weber, J. A. *Eur.J.Med.Chem.*, 1997, 32, 279.

^f Jalali-Heravi, M.; Parastar, F. *J.Chem.Inf.Comp.Sci.*, 2000, 40, 147.

^g Hannongbua, S.; Nivasanond, K.; Lawtrakul, L.; Pungpo, P.; Wolschann, P. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2001, 41, 848.

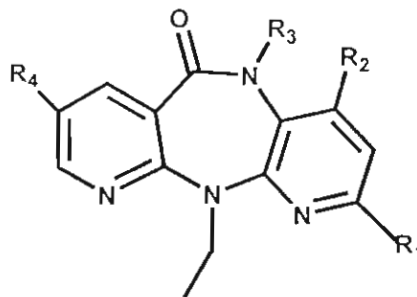
^h Prasithchokekul, S.; Pungpo, P.; Hannongbua, S.; Ecker, G.; Wolschann, P. Prediction of Dipyridodiazepinone Derivative Series of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. Using Multiple Linear Regression and Artificial Neural Networks. In the Proceedings of the 5th Annual National Symposium on Computational Science and Engineering, June 12-20, 2001, Bangkok, pp. 351-360.

ⁱ Pungpo, P.; Hannongbua, S. *Curr.Med.Chem.*, 2003, 10, 1661-1667.

^j Pungpo, P.; Wolschann, P.; Hannongbua, S. Molecular Modelling and Inhibitor-Enzyme Interaction study Reverse Transcriptase Inhibitors. In the Proceedings of the International Conference on Bioinformatics 2002: North-South Networking, Feb 6-8, 2002, Le Royal Meridien, Bangkok, Thailand, 26.

3.6 การคำนวณระบบของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็น ซีสเตอีน ด้วยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ ซิมูเลชัน

งานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งศึกษาความยืดหยุ่นของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซิสเตอีน ด้วยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ ซิมูเลชัน และนำเสนอตัวยับยั้งใหม่ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ เนวिरาพีน ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น ซึ่งออกแบบด้วยระเบียบวิธี 3D-QSAR หรือ CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) และทดลองนำโมเลกุลที่ออกแบบนี้มาจับในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซิสเตอีน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ผลที่ได้จะทำให้เข้าใจธรรมชาติของตัวยับยั้งมากขึ้นและสามารถนำไปสู่การตัดสินใจที่จะสังเคราะห์ตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไปได้



ภาพที่ 3.6.1 โครงสร้างของ เนวिरาพีน

3.6.1 ขั้นตอนการคำนวณ

โครงสร้างเริ่มต้นของเอนไซม์และตัวยับยั้ง นำมาจากโครงสร้างทางเอกซเรย์ รหัส 1VRT เดิมไฮโดรเจนอะตอมในโครงสร้างของเอนไซม์และตัวยับยั้ง แล้วเติมประจุแบบ Kollman-United ให้กับเอนไซม์ และเติมประจุแบบ Gasteiger-Marsili ให้กับตัวยับยั้งตามลำดับ อันตรกิริยาและประสิทธิภาพในการยับยั้งของ เนวिरาพีน และอนุพันธ์ของ เนวिरาพีน กับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์และที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซิสเตอีน คำนวณโดยใช้โปรแกรม DOCK4.0 สำหรับการปรับแต่งโครงสร้างเอนไซม์เป็นโครงสร้างที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซิสเตอีน ทำโดยใช้โปรแกรม Sybyl6.8

ทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ ซิมูเลชัน กับโครงสร้างของเอนไซม์ การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซีสเทอีน เริ่มจากการทำ energy minimization เพื่อลดแรงผลักดันของอะตอมในโครงสร้างเอนไซม์ โดยกำหนดระยะ cutoff เป็น 12 Å สำหรับการคำนวณแรง van der Waals ส่วน electrostatic term คำนวณโดยไม่กำหนดระยะ cutoff หลังจากนั้น ใส่เกลือ โซเดียม และคลอไรด์ ไอออน เพื่อให้ระบบเป็นกลาง กำหนด time step เป็น 2 fs กำหนดอุณหภูมิของระบบให้ค่อยๆเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 298 เคลวิน ภายใน 60 ps กำหนด coupling time เป็น 0.2 ps หลังจากนั้นให้อุณหภูมิคงที่ ที่ 298 เคลวิน เป็นเวลา 600 ps เก็บ trajectories เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป การคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ ซิมูเลชันนี้ ใช้โปรแกรม AMBER7.0 ซึ่งคำนวณบนเครื่องคอมพิวเตอร์ Linux PC 2.4 GHz

โครงสร้าง และประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์และที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซีสเทอีน ของ เนวिरาพีน และอนุพันธ์ของ เนวिरาพีน แสดงในตารางที่ 1 โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งจะแสดงในรูปของ $\log(1/IC_{50})$ ซึ่ง IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50%

สุดท้าย ทิศทางในการจับของอนุพันธ์ใหม่ของ เนวिरาพีน ภายในโพรงการจับของเอนไซม์ และอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ ทำนายโดยใช้โปรแกรม DOCK4.0 อนุพันธ์ใหม่ของ เนวिरาพีน และประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ที่คำนวณได้ แสดงในตารางที่ 3.6.1 ซึ่งโครงสร้างอนุพันธ์ใหม่ของ เนวिरาพีน ได้ออกแบบตามแบบจำลองที่ได้จากระเบียบวิธี QSAR และ 3D-QSAR โครงสร้างทั้งหมด สร้างขึ้นด้วยโปรแกรม Hyperchem6.0 และคำนวณ optimized ด้วยระเบียบวิธีทางควอนตัม HF/3-21G โดยใช้โปรแกรม GAUSSIAN98 ซึ่งคำนวณบนเครื่องคอมพิวเตอร์ Linux PC 2.4 GHz ประจุของตัวยับยั้งใส่ตามแบบของ Mulliken, Gasteiger-Marsili และ Gasteiger-Hückel ตามลำดับ ส่วนอันตรกิริยาที่ทำนายได้จากโปรแกรม DOCK4.0 คำนวณมาจาก force field scoring function ซึ่งเป็นการประมาณอันตรกิริยาทาง molecular mechanic ที่ประกอบด้วยส่วนของ van der Waals และ electrostatic

ตารางที่ 3.6.1 โครงสร้างอนุพันธ์ใหม่ของ เนวिरาพีน และค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์

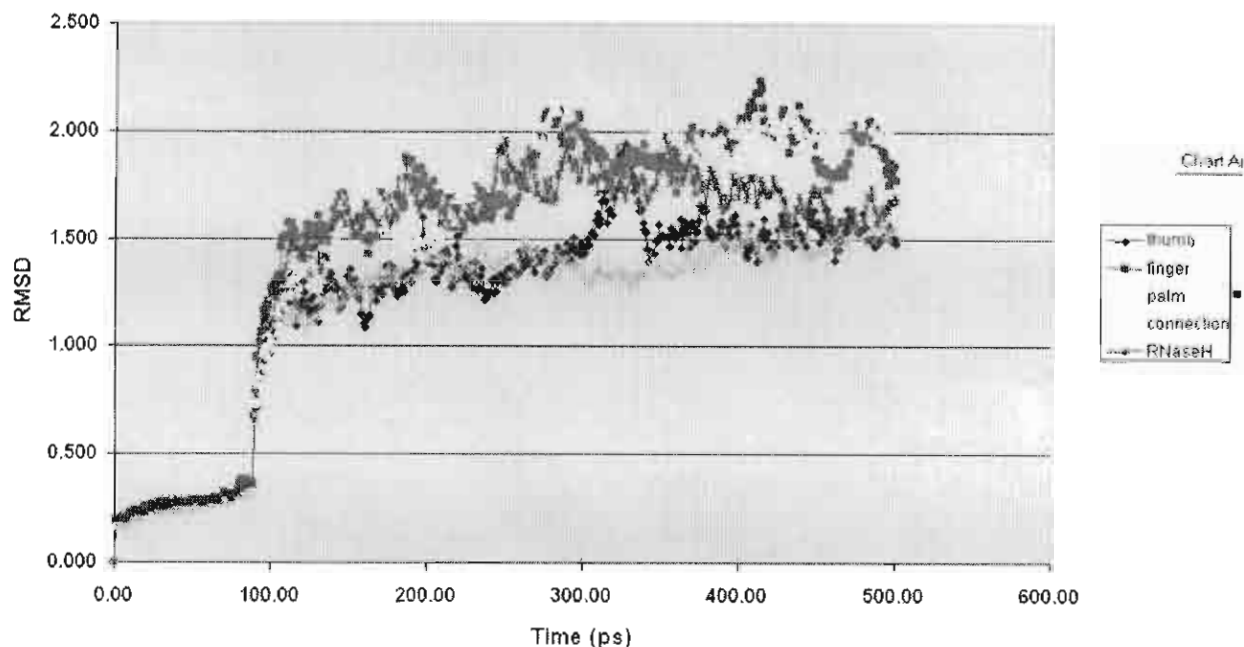
Cpd. No.	R1	R2	R3	R4	log WT (1/C)			
					exp.	calc. ^a	calc. ^b	calc. ^c
09nv	C1	CH ₃	H	H	8.00	7.62	7.69	7.55
07nv	F	CH ₃	H	H	7.70	7.73	7.64	7.59
WT-D2	Br	CH ₃	H	H		7.56	7.48	7.54
WT-D3	I	CH ₃	H	H		7.42	7.36	7.32
WT-D4	Cl	NH ₂	H	H		7.51	7.47	7.39
WT-D5	Cl	CH ₂ CH ₃	H	H		7.50	7.41	7.65
WT-D6	Cl	CH ₂ OH	H	H		7.61	7.54	7.49
WT-D7	F	CH ₂ OH	H	H		7.76	7.58	7.51
68nv	C1	H	CH ₃	CH ₂ SPh	7.70	7.75	7.70	7.66
WT-D8	F	H	CH ₃	CH ₂ SPh		7.81	7.76	7.72
WT-D9	I	H	CH ₃	CH ₂ SPh		7.57	7.51	7.44
WT-D10	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₂ SPH		8.04	7.97	7.91
WT-D11	Cl	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₂ SPH		8.05	7.99	7.93
WT-D12	Cl	NH ₂	CH ₃	CH ₂ SPH		7.71	7.65	7.61
WT-D13	F	CH ₃	CH ₃	CH ₂ SPH		8.11	8.05	7.97
WT-D14	F	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₂ SPH		8.14	8.09	8.04
WT-D15	F	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₂ S(Ph-m-OMe)		8.21	8.17	8.12
WT-D16	F	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₂ S(Ph-m-F)		8.19	8.11	8.06
WT-D17	F	CH ₃	CH ₃	CH ₂ S(Ph-m-OMe)		8.14	8.08	8.01
WT-D18	F	CH ₃	CH ₃	CH ₂ S(Ph-m-F)		8.15	8.10	8.04

^a คำนวณจากแบบจำลอง CoMFA, ^b คำนวณจากแบบจำลอง CoMSIA, ^c คำนวณจากแบบจำลอง HQSAR.

3.6.2 ผลการคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ ซิมูเลชัน

ตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ ระหว่างการคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ ซิมูเลชัน จะวัดจากค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (root mean square displacement, RMSD) โดยเทียบกับตำแหน่งเริ่มต้นก่อนการคำนวณ ผลที่ได้เทียบกับเวลา แสดงในภาพที่ 3.6.2 เพื่อให้เข้าใจการเคลื่อนไหวของแต่ละส่วนของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 จึงคำนวณค่า RMSD แยกตามส่วนของ thumb, finger, palm, connection และ RNaseH ในช่วง 100 ps แรก เอนไซม์จะเคลื่อนต่างออกไปจากโครงสร้างเริ่มต้นมาก โดยค่า RMSD ในช่วง 90-120 ps จะเพิ่มขึ้นมาก แต่จะเริ่มคงที่หลัง 120 ps กราฟนี้จะอธิบายได้ถึงการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างจากโครงสร้างเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของแข็ง เป็นโครงสร้างที่อยู่ในสารละลาย โดยส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงจากมากไปน้อยคือ palm, finger, RNase, thumb และ connection ตามลำดับ ผลที่ได้บ่งบอกว่าส่วน palm ของเอนไซม์ซึ่งเป็นส่วนที่ประกอบด้วยส่วนเร่งปฏิกิริยาและโพรงของการจับ เป็นส่วนที่มีความยืดหยุ่นมากสุดในโครงสร้าง

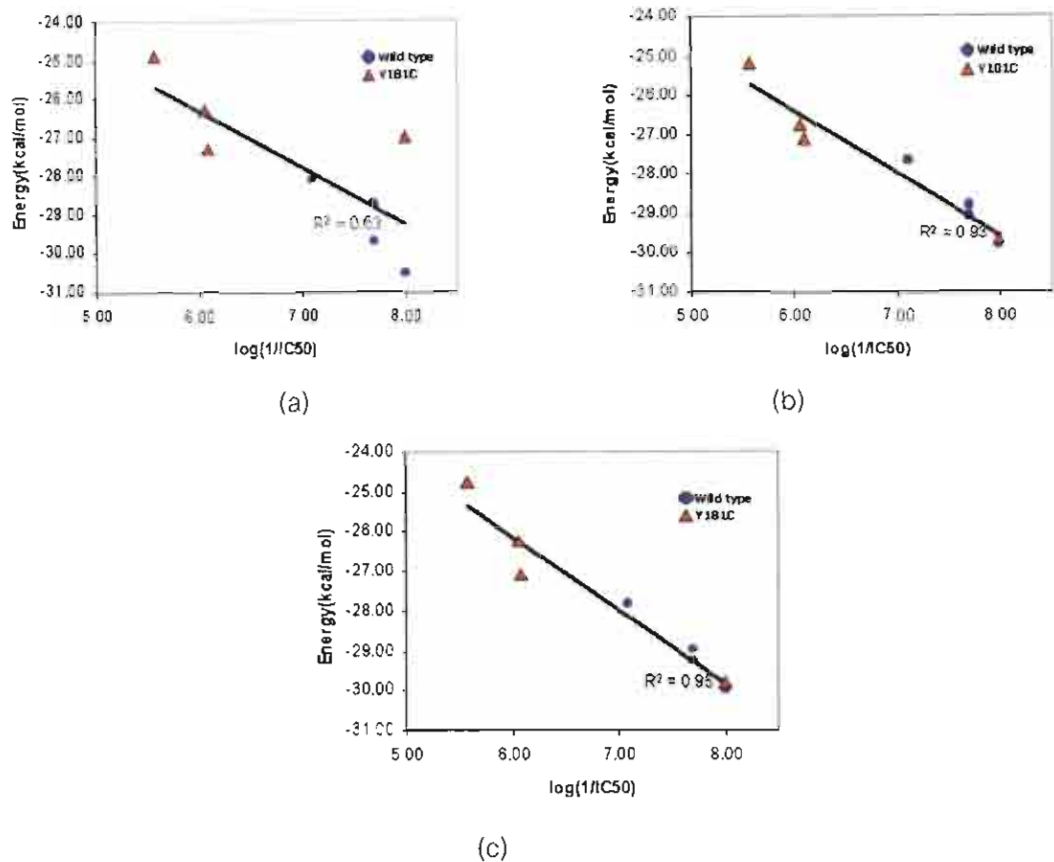
RMSD of Y181C RT



ภาพที่ 3.6.2 ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (RMSD) เทียบกับเวลา ของส่วนต่างๆ ของเอนไซม์ โดย thumb (สีน้ำเงิน), finger (สีชมพู), palm (สีเหลือง), connection (สีฟ้า) และ RNaseH (สีม่วงเข้ม) ระหว่างการคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลกูลาร์ไดนามิกส์ ซิมูเลชัน เป็นเวลา 500 ps

3.6.3 กระบวนการ dock อนุพันธ์ของ เนวिरาพิน

ทำการ dock ตัวยับยั้งซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของ เนวिरาพิน ที่คัดเลือกไว้ 4 โมเลกุล ให้เข้าไปจับกับเอนไซม์การถ่ายแบบเฮชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และที่มีการกลายพันธุ์ (Y181C) ซึ่งอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์และตัวยับยั้ง ทำนายได้จากการคำนวณโดยใช้ force field scoring function ของโปรแกรม DOCK4.0 ผลการทดลองที่ได้นี้แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอันตรกิริยาที่คำนวณได้กับค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งของ เนวिरาพิน และอนุพันธ์ของ เนวिरาพิน สามารถปรับปรุงค่าความสัมพันธ์นี้ให้ดีขึ้นโดยการเปลี่ยนประจุแบบต่างๆกันบนตัวยับยั้ง โดยใช้ประจุแบบ Mulliken, Gasteiger-Marsili และ Gasteiger-Hückel ซึ่งจะให้ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์เป็น 0.63, 0.93 และ 0.95 ตามลำดับ ดังกราฟความสัมพันธ์ในภาพที่ 3.6.3 ดังนั้นผลที่ได้นี้ สามารถนำไปใช้ทำนายค่าพลังงานในการจับ และทิศทางการวางตัวของตัวยับยั้งในเอนไซม์ได้ โดยตัวยับยั้งที่ใช้ จะเป็นอนุพันธ์ใหม่ของ เนวिरาพิน ทั้ง 18 ตัว



ภาพที่ 3.6.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าอันตรกิริยาที่คำนวณได้และค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งของ เนวिरาพีน และ อนุพันธ์ของ เนวिरาพีน โดยกำหนดประจุแบบต่างๆ ให้กับตัวยับยั้ง (a) ประจุแบบ Mulliken, (b) ประจุแบบ Gasteiger-Marsili, (c) ประจุแบบ Gasteiger-Hückel

3.6.4 การทำนายค่าพลังงานในการจับ และทิศทางการจับกับเอนไซม์ของอนุพันธ์ใหม่ของ เนวिरาพีน ทั้ง 18 โครงสร้าง

อนุพันธ์ใหม่ของ เนวिरาพีน ออกแบบมาด้วยกระบวนการของ QSAR และ 3D-QSAR ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมี 6 สาร โดยออกแบบมาจากโครงสร้างของสารหมายเลข 09nv และ 07nv กลุ่มที่ 2 มี 11 สาร โดยออกแบบมาจากโครงสร้างของสารหมายเลข 68nv สารทั้งหมดนี้ได้นำมาใช้ในกระบวนการ dock เพื่อทำนายอันตรกิริยา หรือพลังงานในการจับของตัวยับยั้งกับ

เอนไซม์ เปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซีสเทอีน

อันตรกิริยาที่ทำนายได้ระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ด้วยประจุแบบต่างๆ ได้นำมาใช้เปรียบเทียบกับค่าการคำนวณ $\log (1/C)$ ดังแสดงในตารางที่ 3.6.2 ลำดับในการจับจะเรียงจากสารที่มีค่าอันตรกิริยาน้อยสุดไปมากที่สุด ซึ่งสารหมายเลข WT-D6 และ WT-D15 มีค่าอันตรกิริยาดำสุดของกลุ่มแรก และกลุ่มที่ 2 ตามลำดับ ลำดับของอันตรกิริยาของสารในกลุ่มที่ 2 สอดคล้องเป็นอย่างดีกับค่าการคำนวณ $\log (1/C)$ โดยที่ประจุแบบต่างๆ จะไม่มีผลต่ออันดับของอันตรกิริยาของสาร นอกจากนี้ยังทำนายอันตรกิริยาระหว่างอนุพันธ์ใหม่ของ เนวिरาพีน กับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซีสเทอีน ซึ่งผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.6.3 ผลที่ได้นี้สามารถบ่งบอกได้ว่ามีอนุพันธ์ใหม่บางตัวที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ทั้งที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซีสเทอีน ลักษณะการวางตัวของอนุพันธ์ของ เนวिरาพีน ที่จับอยู่กับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และที่มีการกลายพันธุ์ ในโพรงการจับ แสดงในภาพที่ 3.6.4 เพื่อเปรียบเทียบกัน

ตารางที่ 3.6.2 การเปรียบเทียบระหว่างค่าอันตรกิริยาที่ทำนายได้และค่าจากการคำนวณ log (1/C) ของอนุพันธ์ใหม่ของ เนวิราพิน ทั้ง 18 โครงสร้าง เมื่อกำหนดประจุในแบบต่างๆ

Cpd No.	Exp.	Calc. ^a	log WT (1/c) Calc. ^b	Calc. ^c	Energy (kcal/mol) ^d	Energy (kcal/mol) ^e	Energy (kcal/mol) ^f
09nv	8.00	7.62 (3)	7.69 (1)	7.55 (3)	-30.50 (3)	-29.82 (2)	-29.97 (2)
07nv	7.70	7.73 (2)	7.64 (2)	7.59 (2)	-29.68 (6)	-29.06 (6)	-29.24 (5)
WT-D2		7.56 (5)	7.48 (5)	7.54 (4)	-31.38 (2)	-28.12 (8)	-28.23 (8)
WT-D3		7.42 (8)	7.36 (8)	7.32 (8)	-29.24 (8)	-28.22 (7)	-28.32 (7)
WT-D4		7.51 (6)	7.47 (6)	7.39 (7)	-29.30 (7)	-29.75 (3)	-29.38 (4)
WT-D5		7.50 (7)	7.41 (7)	7.65 (1)	-29.94 (5)	-29.40 (4)	-29.53 (3)
WT-D6		7.61 (4)	7.54 (4)	7.49 (6)	-31.68 (1)	-30.34 (1)	-30.50 (1)
WT-D7		7.76 (1)	7.58 (3)	7.51 (5)	-29.82 (4)	-29.08 (5)	-29.24 (5)
68nv	7.70	7.75 (10)	7.70 (10)	7.66 (10)	-28.71 (4)	-28.76 (7)	-28.99 (6)
WT-D8		7.81 (9)	7.76 (9)	7.72 (9)	-28.14 (8)	-28.67 (8)	-28.62 (8)
WT-D9		7.57 (12)	7.51 (12)	7.44 (12)	-23.47 (9)	-20.47 (10)	-20.18 (11)
WT-D10		8.04 (8)	7.97 (8)	7.91 (8)	-19.69 (11)	-20.46 (11)	-20.63 (10)
WT-D11		8.05 (7)	7.99 (7)	7.93 (7)	-19.67 (12)	-21.87 (9)	-22.03 (9)
WT-D12		7.71 (11)	7.65 (11)	7.61 (11)	-19.75 (10)	-19.81 (12)	-20.08 (12)
WT-D13		8.11 (6)	8.05 (6)	7.97 (6)	-28.25 (5)	-29.09 (4)	-29.01 (4)
WT-D14		8.14 (4)	8.09 (4)	8.04 (3)	-29.35 (3)	-29.95 (3)	-29.86 (3)
WT-D15		8.21 (1)	8.17 (1)	8.12 (1)	-32.48 (1)	-32.25 (1)	-32.60 (1)
WT-D16		8.19 (2)	8.11 (2)	8.06 (2)	-30.63 (2)	-31.37 (2)	-31.62 (2)
WT-D17		8.14 (4)	8.08 (5)	8.01 (5)	-28.21 (7)	-29.08 (5)	-29.00 (5)
WT-D18		8.15 (3)	8.10 (3)	8.04 (3)	-28.22 (6)	-29.06 (6)	-28.98 (7)

^a คำนวณจากแบบจำลอง COMFA (เอกสารอ้างอิง 3). ^b คำนวณจากแบบจำลอง COMSIA

^c คำนวณจากแบบจำลอง COMSIA (เอกสารอ้างอิง 3). ^d ประจุแบบ Mulliken. ^e ประจุแบบ Gasteiger-

Marsili

^f ประจุแบบ Gasteiger-Hückel

ตารางที่ 3.6.3 การทำนายค่าอันตรกิริยาของอนุพันธ์ใหม่ของ เนวิราพิน ทั้ง 18 โครงสร้าง ที่จับกับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซีสเทโอน เมื่อกำหนดประจุในรูปแบบต่างๆ

Cpd No.	Energy (kcal/mol)					
	WT ^a	Y181C ^a	WT ^b	Y181C ^b	WT ^c	Y181C ^c
09nv	-30.50 (3)	-27.32	-29.82 (2)	-27.16	-29.97 (2)	-27.10
07nv	-29.68 (6)	-26.34	-29.06 (6)	-26.81	-29.24 (5)	-26.31
WT-D2	-31.38 (2)	-25.54	-28.12 (8)	-27.51	-28.23 (8)	-27.92
WT-D3	-29.24 (8)	-24.23	-28.22 (7)	-22.06	-28.32 (7)	-22.05
WT-D4	-29.30 (7)	-32.15	-29.75 (3)	-17.23	-29.38 (4)	-15.64
WT-D5	-29.94 (5)	-26.53	-29.40 (4)	-26.76	-29.53 (3)	-26.57
WT-D6	-31.68 (1)	-30.58	-30.34 (1)	-29.06	-30.50 (1)	-28.88
WT-D7	-29.82 (4)	-30.12	-29.08 (5)	-28.82	-29.24 (5)	-28.24
68nv	-28.71 (4)	-27.07	-28.76 (7)	-29.74	-28.99 (6)	-29.92
WT-D8	-28.14 (8)	-26.74	-28.67 (8)	-26.50	-28.62 (8)	-26.47
WT-D9	-23.47 (9)	-19.07	-20.47 (10)	-22.77	-20.18 (11)	-22.78
WT-D10	-19.69 (11)	-16.86	-20.46 (11)	-18.00	-20.63 (10)	-18.04
WT-D11	-19.67 (12)	-21.56	-21.87 (9)	-21.46	-22.03 (9)	-21.12
WT-D12	-19.75 (10)	-19.63	-19.81 (12)	-20.10	-20.08 (12)	-20.16
WT-D13	-28.25 (5)	-26.30	-29.09 (4)	-29.79	-29.01 (4)	-29.95
WT-D14	-29.35 (3)	-29.77	-29.95 (3)	-31.57	-29.86 (3)	-31.65
WT-D15	-32.48 (1)	-30.40	-32.25 (1)	-32.20	-32.60 (1)	-32.24
WT-D16	-30.63 (2)	-31.40	-31.37 (2)	-32.36	-31.62 (2)	-32.28
WT-D17	-28.21 (7)	-26.41	-29.08 (5)	-29.88	-29.00 (5)	-30.03
WT-D18	-28.22 (6)	-26.73	-29.06 (6)	-30.07	-28.98 (7)	-30.22

^a ประจุแบบ Mulliken. ^b ประจุแบบ Gasteiger-Marsili. ^c ประจุแบบ Gasteiger-Hückel



3.6.5 สรุปผลการศึกษา

การคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ ชิมูเลชัน ของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซิสเตอีน เป็นเวลา 600 ps พบว่าส่วน palm ของเอนไซม์เป็นส่วนที่มีความยืดหยุ่นมากที่สุด ซึ่งโครงสร้างนี้ได้นำมาใช้ศึกษาต่อในกระบวนการ dock อนุพันธ์ของ เนวिरาพีน กับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่มีการกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังทำการ dock อนุพันธ์ของ เนวिरาพีน กับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ด้วย ผลของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (RMSD) จากกระบวนการ dock ทั้ง 4 สาร มีค่าต่ำกว่า 1 Å ดังนั้น จึงสามารถใช้กระบวนการ dock นี้ทำนายการจับกันระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ระบบนี้ได้ ผลที่ได้จากกระบวนการ dock พบว่า การวางตัวของ เนวिरาพีน ในเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่มีการกลายพันธุ์มีความสอดคล้องเป็นอย่างดีกับโครงสร้างทางผลึก ซึ่งมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเพียง 0.78 Å ผลที่ได้ยังแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง ค่าอันตรกิริยาที่คำนวณได้ และค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งของ เนวिरาพีน และอนุพันธ์ของ เนวिरาพีน สามารถปรับปรุงค่าความสัมพันธ์นี้ให้ดีขึ้น โดยเปลี่ยนประจุแบบต่างๆ บนตัวยับยั้ง โดยใช้ประจุแบบ Mulliken, Gasteiger-Marsili และ Gasteiger-Hückel ซึ่งจะให้ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์เป็น 0.63, 0.93 และ 0.95 ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงทำนายค่าพลังงานในการจับและทิศทางในการจับของอนุพันธ์ใหม่ของ เนวिरาพีน ทั้ง 18 โครงสร้าง จากการทำนายค่าอันตรกิริยาของบางสาร พบว่าเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของทั้งเอนไซม์การ

ถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็น
ซิสเตอีน

4. สรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้ดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษาสมบัติทางโครงสร้างของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ในกลุ่ม non-nucleoside reverse transcriptase ซึ่งประกอบด้วย nevirapine TIBO และ HEPT อย่างไรก็ตาม การศึกษาสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุลนั้น ได้มุ่งที่จะทำความเข้าใจวิธีคำนวณทางเคมีควอนตัม และการอธิบายผลที่ได้ทางเคมีทฤษฎีเพื่อสร้างความเข้าใจสมบัติทางเคมีกายภาพของโมเลกุล ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการนำไปออกแบบโมเลกุลใหม่ ดังนั้น ผลการวิจัยจึงอาจสรุปได้เป็นสามส่วน คือ ส่วนที่ทำการคำนวณสมบัติโครงสร้างคอนฟอร์เมชันของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ส่วนที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์และการออกแบบโมเลกุล และส่วนที่ศึกษาอันตรกิริยาของตัวยับยั้งกับโพรงการจับของโมเลกุลโดยวิธีเคมีควอนตัม วิธีโมเลคิวลาร์ ไดนามิกส์ซิมูเลชัน และวิธีโมเลคิวลาร์ดอกกิง

4.1 การศึกษาสมบัติทางโครงสร้างคอนฟอร์เมชันของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1

ผลจากการทำศึกษาโครงสร้างคอนฟอร์เมชันของโมเลกุล 9-CI TIBO โดยละเอียด สามารถพบคอนฟอร์เมอร์ที่มีพลังงานต่ำสุดบน potential energy surface ต่าง ๆ ถึงแปดโครงสร้าง โดยโครงสร้างที่ local minimum ถูกแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มตามทิศทางของ side chain และอิทธิพลของสเตอริโอเคมีบนอะตอมไนโตรเจน ผลที่ได้จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสมบัติทางโครงสร้างที่ lowest energetic conformation มีความสอดคล้องกับคอนฟอร์เมชันที่อยู่ภายใน complex structure กับเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 นอกจากนี้ การคำนวณ ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR chemical shifts สามารถแสดงผลที่สอดคล้องกับสมบัติทางสเปกโตรสโคปีที่พบในสารละลาย ข้อมูลทางโครงสร้างของตัวยับยั้งเอนไซม์ เอช ไอ วี-1 ในกลุ่มของโมเลกุล 8-CI และ 9-CI TIBO โดยวิธีคำนวณทางเคมีควอนตัม และพื้นผิวพลังงานศักย์ของโมเลกุล แสดงให้เห็นว่าการจัดโครงสร้างของโมเลกุลตัวยับยั้งถูกกำหนดโดยวงอะโรมาติกของโมเลกุลและสายโซ่ เนื่องจากวงเจ็ดเหลี่ยมและสายโซ่ของโมเลกุลค่อนข้างที่จะมีการยืดหยุ่นสูง ทำให้สามารถเกิดความเข้าใจอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับโพรงการจับของเอนไซม์ได้ว่า ค่าพลังงานการจับระหว่างคอนฟอร์เมชันหนึ่งเปลี่ยนไปยังคอนฟอร์เมชันที่สองนั้นมีค่าต่ำมากจึงทำให้โมเลกุลของตัวยับยั้งสามารถที่จะเกิดอันตรกิริยาภายในโพรงการจับได้ง่าย และมีผลกระทบต่อนโครงสร้างของเอนไซม์โดยรวม และทำให้เอนไซม์สูญเสียสถานะที่เหมาะสมไป

4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์และการออกแบบโมเลกุล

ได้ทำการศึกษาสารอนุพันธ์ในกลุ่ม TIBO HEPT และ dipyrindodiazepinone ที่มีผลยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ด้วยระเบียบวิธี HQSAR ผลการศึกษาสามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง molecular holograms ที่สร้างมาจากการนับแบ่งโมเลกุลเป็น molecular fragment และกัมมันตภาพของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 โดยโมเดลที่ได้นั้นเป็นโมเดลที่ให้ค่าทางสถิติที่มีนัยสำคัญและให้ค่าความสามารถในการทำนายที่ยอมรับได้ และสามารถสรุปได้ว่าการใช้ความยาวในช่วง large fragment จะให้ค่าความสามารถในการทำนายดีที่สุดเมื่อเทียบกับทั้ง 3 ช่วงความยาวเป็นที่น่าสนใจที่แผนภาพของ HQSAR นั้นสามารถบอกความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดที่มีการกลายพันธุ์ ยิ่งไปกว่านั้นผลของ HQSAR นั้นยังสามารถบอกถึงการเกิดอันตรกิริยาที่เหมือนกันของสารอนุพันธ์ทั้ง 3 ชนิดที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ในการศึกษาครั้งนี้คุณภาพทางสถิติของโมเดล QSAR ที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี CoMFA และ HQSAR นั้นสามารถเปรียบเทียบกันได้และให้ผลที่ดีกว่า QSAR วิธีอื่นๆ ข้อดีของวิธี HQSAR คือใช้โครงสร้าง 3 มิติการพิจารณา เหมาะสมที่จะใช้ศึกษา molecular conformation และ การวางตัวของโมเลกุลไม่จำเป็นสำหรับวิธีนี้ สิ่งก็ตามมาก็คือ computational time จะน้อยลงและค่าความสามารถในการทำนายที่ได้นั้นอยู่ในระดับสูง จุดที่น่าสนใจอีกอย่างก็คือ การแปรผลของวิธี HQSAR นั้นจะออกมาเป็นรหัส ซึ่งแทนด้วยสีกระจายไปตามแต่ละอะตอม ทำให้เป็นแนวทางในการออกแบบสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีมากยิ่งขึ้นได้ โดยทั่วไปแล้วผลที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี HQSAR เป็นเครื่องมือในการหาความสำคัญของลักษณะทางโครงสร้างของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 และยังสามารถนำไปสู่ความเข้าใจในเรื่องของกลไกการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1

4.3 การศึกษาอันตรกิริยาของตัวยับยั้งกับโพรงการจับของโมเลกุลโดยวิธีเคมีควอนตัม วิธีโมเลคิวลาร์ ไดนามิกส์ซิมูเลชัน และวิธีโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง

ผลการอันตรกิริยาของตัวยับยั้งเนวิราพิน กับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 โดยวิธีทางเคมีควอนตัมแบบผสม นับเป็นวิธีใหม่ที่ได้ศึกษาในระบบของเอนไซม์ โดยการคำนวณทางเคมีควอนตัมแบบผสม โดยใช้วิธี HF/6-31G(d), B3LYP/6-31G(d), และ MP2/6-31G(d) ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับอันตรกิริยา และบริเวณโครงสร้างที่เหลืออาศัยวิธีคำนวณที่ต่ำกว่า สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับตัวยับยั้งภายในบริเวณโพรงการจับได้ และเมื่ออาศัยการศึกษากับโมเดลของ pyridine-methyl phenol complex ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเนวิราพินกับไรโรซีน 181 แสดงให้เห็นว่ามีอันตรกิริยาแบบ off-centered parallel stacking และมีลักษณะของ π - π interaction อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษากับระบบที่มีขนาดใหญ่ขึ้น นั่นคือ pyridine-phenol โดยระเบียบวิธี ONIOM3(MP2/6-

31G(d):HF/3-21G:PM3) พบว่ามีความแตกต่างไป และสามารถนำไปสู่ข้อสรุปได้ว่า เนวिरาพีนกับโรโรซีน 181 มีอันตรกิริยาที่เป็น repulsive interaction อย่างอ่อน โดยอันตรกิริยาจากบริเวณโพรงการจับมีอิทธิพลต่ออันตรกิริยาดังกล่าว ส่วนที่มีความสำคัญอีกประการหนึ่งคือ การศึกษาในเรื่องนี้ทำให้เกิดแนวทางในการวิจัยเกี่ยวกับอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์โดยวิธีออนเนียม และจะได้นำไปประยุกต์กับตัวยับยั้งอื่น ๆ หรือโมเลกุลเป้าหมายอื่น ๆ ต่อไป

ในส่วนของการคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ ชิมูเลชัน ของเอนไซม์การถ่ายแบบเฮไล-1 ที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซีสเทอีน เป็นเวลา 600 ps มุ่งศึกษาความยืดหยุ่นของเอนไซม์การถ่ายแบบเฮไล-1 ที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซีสเทอีน และนำเสนอตัวยับยั้งใหม่ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ เนวिरาพีน ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น ซึ่งออกแบบด้วยระเบียบวิธี 3D-QSAR หรือ CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) ผลการศึกษาพบว่าส่วน palm ของเอนไซม์เป็นส่วนที่มีความยืดหยุ่นมากที่สุด ซึ่งโครงสร้างนี้ได้นำมาใช้ศึกษาต่อในกระบวนการ dock อนุพันธ์ของ เนวिरาพีน กับเอนไซม์การถ่ายแบบเฮไล-1 ที่มีการกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังทำการ dock อนุพันธ์ของ เนวिरาพีน กับเอนไซม์การถ่ายแบบเฮไล-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ด้วย ผลที่ได้จากกระบวนการ dock พบว่า การวางตัวของ เนวिरาพีน ในเอนไซม์การถ่ายแบบเฮไล-1 ที่มีการกลายพันธุ์มีความสอดคล้องเป็นอย่างดีกับโครงสร้างทางผลึก ซึ่งมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเพียง 0.78 Å ผลที่ได้ยังแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง ค่าอันตรกิริยาที่คำนวณได้ และค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งของ เนวिरาพีน และอนุพันธ์ของ เนวिरาพีน สามารถปรับปรุงค่าความสัมพันธ์นี้ให้ดีขึ้น และได้ทำนายค่าพลังงานในการจับ และทิศทางในการจับของอนุพันธ์ใหม่ของ เนวिरาพีน ทั้ง 18 โครงสร้าง จากการทำนายค่าอันตรกิริยาของบางสาร พบว่าเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของทั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเฮไล-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และที่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 181 จากไทโรซีนเป็นซีสเทอีน ผลที่ได้จะทำให้เข้าใจธรรมชาติของตัวยับยั้งมากขึ้นและสามารถนำไปสู่การตัดสินใจที่จะสังเคราะห์ตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. ALCHEMY2000, Tripos Associates Inc., St. Louis, MO, 1996.
2. Balaban, A.T. *Chem.Phys.Letter.*, **1982**, 89, 399.
3. Balzarini, J.; Karlsson, A.; Sardana, V.V.; Emini, E.A.; Camarasa, M.J.; De Clercq, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1994**, 91, 6599.
4. Barreca, M.L.; Carotti, A.; Rao, A. *Bioor.Med.Chem.*, **1999**, 7, 2283.
5. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235-242.
(<http://pdb.bnl.gov/>)
6. Beyer, A.; Lawtrakul, L.; Hannongbua, S.; Wolschann, P., *Monatsh. Chemie.*, **2004**, 135, 1047-1059.
7. Caldwell, G.W.; Guathier, A.D.; Leo, G.C.; Kukla, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 2063-2066.
8. Cramer, C. J. and Truhlar, D. G. Continuum Solvation Models: Classical and QuantumMechanical Implementations. *Reviews in Computational Chemistry*, in: K. B. Kipkowitz and D. B. Boyd (Eds.), Vol. 6, VCH, New York, **1995**, pp.1-72.
9. Cramer, R. D.; Bunce, J.D.; Patterson, D.E. *Quant.Struct.-Act. Relat.* **1988**, 7, 18.
10. Cywin, C. L.; Klunder, J. M.; and Hattox, S. E.; *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 2972-2984.
11. Dapprich, S.; Komaromi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. *J. Mol. Struct.(Theochem)* **1999**, 461-462, 1.
12. Das, K.; Ding, J.; Hsiou, Y.; Clark, A.D.; Moereels, H.; Koymans, L.; Andries, K.; Pauwels, R.; Janssen, P.A.J.; Boyer, P.L; Clark, P.; Smith, R.H.; Kroeger-Smith, M.B.; Michejda, C.J.; Hughes, S.H.; Arnold, E. **1996**, 264, 1085.
13. De Clercq, E. *Med. Res. Rev.* **1996**, 16, 125.
14. Ding, J.; Das, K.; Moereels, H.; Koymans, L.; Andries, K.; Janssen, A.J.; Hughes, S.H.; Arnold, E. *Nat. Struct. Biol.*, **1995**, 2, 407.
15. DOCK Version 4.0, University of California, San Francisco, **1997**.
16. GAUSSIAN98. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Keith, T.; Petersson, G. A.; Montgomery, J. A.; Raghavachari, K.; Al-Laham, M. A.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V.; Foresman, J. B.; Peng, C. Y.; Ayala, P. Y.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Replogle, E. S.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Binkley, J. S.; Defrees, D. J.; Baker, J.; Stewart, J. P.; Head-Gordon, M.; Gonzales, C.; Pople, J. A. **1998** Gaussian 98 (Version B 3); Gaussian Inc., Pittsburgh, PA.
17. Gupta, S.P.; Garg, R. *J. Enz. Inh.* **1996**, 11, 23.
18. Gussio, R.; Pattabiraman, N.; Zaharevitz, D.W.; Kellogg, G.E.; Toplo, I.A.; Rice, W.G.; Schaeffer, C.A.; Erickson, J.W.; Burt, S. K. *J.Med.Chem.* **1996**, 39, 1645.
19. Hall, L.H., Kier, L.B. *Reviews in Comput. Chem.*, **1992**, 2, 367.
20. Hannongbua, S.; Lawtrakul, L. *Quant.Struct.-Act.Relat.*, **1996**, 15, 389.
21. Hannongbua, S.; Lawtrakul, L.; Limtrakul, J. *J.Comp. Aided Mol. Des.*, **1996**, 10, 145.
22. Hannongbua, S.; Nivasanond, K.; Lawtrakul, L.; Pungpo, P.; Wolschann, P., *J.Chem. Inf. and Comp. Sci.*, **2001**, 41(3), 848-855.
23. Hannongbua, S.; Prasithichokekul, S.; Pungpo, P.; *J.Comp.-Aided Mol. Des.*, **2001**, 15, 997-1004.
24. Hannongbua, S.; Pungpo, P.; Limtrakul, J.; Wolschann P. *J.Comp. Aided Mol. Des.*, **1999**, 13, 563.
25. Hannongbua, S.; Saen-oon, S.; Pungpo, P.; Wolschann, P., *Monatsch.Chemie.*, **2001**, 132, 1157-1169.

26. Helgaker, T.; Jaszunski, M.; Ruud, K. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 293-352.
27. Hopfinger, A.J.; Duraiswami, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10509.
28. Hopkins, A.L.; Ren, J.; Esnouf, R.M.; Willcox, B.E.; Jones, Y.; Ross, C.; Miyasaka, T.; Walker, R.T.; Tanaka, H.; Stammers, D.K.; Stuart, D.I. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 1589.
29. HQSAR is the product of Tripos, Inc., St. Louis, MO, 1997.
30. <http://www.viramune.com/ProductInfo/>
31. Jalali-Heravi, M.; Parastar, F. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, **2000**, 40, 147.
32. Kelly, T.A.; McNeil, D.W.; Rose, J.M.; David, E.; Shih, C.K.; Grob, P.M.J. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 2430.
33. Kelly, T.A.; Proudfoot, J. R.; McNeil, D.W.; Patel, U.R.; David, E.; Hargrave, K.D.; Grob, P.; Cardozo, M.; Agarwal, A.; Adams, J. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4839.
34. Klein, C.Th.; Lawtrakul, L.; Hannongbua, S.; Wolschann, P. *Sci. Pharm.* **2000**, 68, 25.
35. Klunder, J.M.; Hoermann, M.; Cywin, C.L.; David, E.; Brickwood, J.R.; Schwartz, R.; Barringer, K.J.; Pauletti, D.; Shih, C.K.; Erickson, D.A.; Sorge, C.L.; Joseph, D.P.; Hattox, S.E.; Adams, J.; Grob, P.M.J. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 2960.
36. Kuno, M.; Hannongbua, S.; Morokuma, K. *Chem. Phys. Letts*, **2003**, 380, 456-463.
37. Kuno, M.; Palangsuntikul, R.; Hannongbua, S. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, **2003**, 43, 1584-1590.
38. Larder, B. A.; Purifoy, D. J. M.; Powell, K. L.; Darby, G. *Nature* **1987**, 327, 716.
39. Lawtrakul, L.; Beyer, A.; Hannongbua, S.; Wolschann, P., *Monatsh. Chemie.*, **2004**, 135, 1033-1046.
40. Luco, J.M.; Ferritti, F.H. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, **1997**, 37, 392.
41. Mager, P. P. *Med. Res. Rev.* **1997**, 17, 235.
42. Merluzzi, V.J.; Hargrave, K.D.; Labadia, M.; Grozinger, K.; Skoog, M.; Wu, J.C.; Shih, C.; Eckner, K.; Hattox, S.; Adams, J.; Rosenthal, A.S.; Faanes, R.; Eckner, R.J.; Koup, R.A.; Sullivan, J.L. *Science*, **1990**, 250, 1411.
43. Parreira, R. L.; Abrahao, O. Jr.; Galembeck, S. E. *Tetrahedron*. **2001**, 57, 3243-3253.
44. Pauwels, R.; Andries, K.; Desmyter, J.; Schols, D.; Kukla, M.J.; Breslin, H.J.; Raeymaeckers, A.; Van Gelder, J.; Woestenborghs, R.; Heykants, J.; Schellekens, K.; Janessen, M.A.C.; De Clercq, E.; Janssen, P.A.J. *Nature*, **1990**, 343, 470.
45. Prasithichokekul, S.; Pungpo, P.; Hannongbua, S.; Ecker, G.; Wolschann, P. Prediction of Dipyrindodiazepinone Derivative Series of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors, Using Multiple Linear Regression and Artificial Neural Networks. In the Proceedings of the 5th Annual National Symposium on Computational Science and Engineering, June 12-20, **2001**, Bangkok, pp. 351-360.
46. Proudfoot, J. R.; Hargrave, K. D.; Adams, J., *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 4830-4838.
47. Pungpo, P.; Hannongbua, S. *J. Mol. Graph. Mod.*, **2000**, 18, 581.
48. Pungpo, P.; Hannongbua, S.; Wolschann, P., *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 1661-1677.
49. Pungpo, P.; Wolschann, P.; Hannongbua, S. Molecular Modelling and Inhibitor-Enzyme Interaction study Reverse Transcriptase Inhibitors. In the Proceedings of the International Conference on Bioinformatics 2002: North-South Networking, Feb 6-8, **2002**, Le Royal Meridien, Bangkok, Thailand, 26.
50. Randic, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 6609.
51. Ren, J.; Esnouf, R.; Garman, E.; Somers, D.; Ross, C.; Kirby, I.; Keeling, J.; Darby, G.; Jones, Y.; Stuart, D.; Stammers, D. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 293.
52. Richman, D.; Havlir, D.; Corbeil, J.; Looney, D.; Ignacio, C.; Spector, S.A.; Sullivan, J.; Cheeseman, S.; Barringer, K.; Pauletti, D.; Shih, C.; Myers, M.; Griffen, J. *J. Virol.* **1994**, 68, 1660.

53. Ren, J.; Esnouf, R.; Garman, E.; Somers, D.; Ross, C.; Kirby, I.; Keeling, J.; Darby, G.; Jones, Y.; Stuart, D.; Stammers, D. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 293.
54. Richman, D.; Havlir, D.; Corbeil, J.; Looney, D.; Ignacio, C.; Spector, S.A.; Sullivan, J.; Cheeseman, S.; Barringer, K.; Pauletti, D.; Shih, C.; Myers, M.; Griffen, J. *J. Virol.* **1994**, *68*, 1660.
55. Richman, D.; Shih, C.K.; Lowy, I.; Rose, J.; Prodanovich, P.; Goff, S.; Griffin, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1991**, *88*, 11241.
56. Saen-oon, S.; Wolschann, P.; Hannongbua, S.; *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, **2003**, *43*, 1412-1422.
57. Seel, M.; Turner, D. B.; Willett, P. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1999**, *18*, 245.
58. Silverman, B.D.; Platt D.E. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 2129.
59. So, S.S.; Karplus, M. A. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **1999**, *13*, 243.
60. Tachedjian, G.; Orlova, M.; Sarafianos, S. G.; Arnold, E.; Goff, S. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 7188-7193.
61. Tanaka, H.; Baba, M.; Hayakawa, H.; Sakamaki, T.; Miyasaka, T.; Ubasawa, M.; Takashima, H.; Sekiya, K.; Nitta, I.; Shigeta, S.; Walker, R.T.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 349.
62. Tanaka, H.; Takashima, H.; Ubasawa, M.; Sekiya, K.; Nitta, I.; Baba, M.; Shigeta, S.; Walker, R.T.; De Clercq, E.; Miyasaka, T. Synthesis and Antiviral Activity of Deoxy analogs of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT) as Potent and Selective Anti-HIV-1 Agents *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4713.
63. Tomasi, J; Mennucci, B; Cancas, E. *J. Mol. Struct. (Theochem)*. **1999**, *464*, 211-226.
64. Tong, W.; Lowis, D.R.; Perkins, R.; Chen, Y.; Welsh, W.J.; Goddette, D.W.; Heritage, T.W.; Sheehan, D.M. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1998**, *38*, 669.
65. Tronchet, J.M.J.; Grigorov, M.; Dolatshahi, N.; Moriaud, F.; Weber, J. A. *Eur. J. Med. Chem.*, **1997**, *32*, 279.
66. Wasikowski, K.; Hilton, J. F.; Pulay, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8251-8262.
67. Winkler, D.A.; Burden, F.R. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1998**, *17*, 224.

6. ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์ เผยแพร่

6. ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

6.1 Publications :

1. Hannongbua, S.*, Nivasanond, K., Lawtrakul, L., Pungpo, P., and Wolschann, P., 3D-Quantitative Structure-Activity Relationships of HEPT Derivatives as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors, Based on Ab Initio Calculations, *J.Chem. Inf. and Comp. Sci.*, 41(3), 848-855 (2001). impact factor 3.078 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2003)
2. Hannongbua, S.*, Prasithchokekul, S., and Pungpo, P., Conformational Analysis of Nevirapine, a Non-nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor, Based on Quantum Mechanical Calculations, *J.Comp.-Aided Mol. Des.*, 15, 997-1004 (2001). impact factor 2.366 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2003)
3. Hannongbua, S.*, Saen-oon, S., Pungpo, P., and Wolschann, P., Molecular Calculations on the Conformational Analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors 4,5,6,7-tetrahydroimidazo-8-chloro-5-methyl-(3-methyl-2-buthenyl)imidazo[4,5,1-jk][1,4]-benzo diazepine-2-(1H)-thione(8-chloro-TIBO), *Monatsch.Chemie.*, 132, 1157-1169 (2001). impact factor 0.886 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2003)
4. Pungpo, P., Hannongbua, S.* and Wolschann, P., Hologram Quantitative Structure-Activity Relationships Investigations of Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, *Curr.Med.Chem.* 2003, 10, 1661-1677. impact factor 4.409 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2003)
5. Saen-oon, S., Wolschann, P., Hannongbua, S.*, Structural Flexibility of Non-nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor: 9-Cl TIBO as Explained by Potential Energy Surface and ¹³C and ¹H-NMR Calculations, based on Ab-initio and Density Functiona Study. *J.Chem.Inf.Comp.Sci.*, 43, 1412-1422 (2003). impact factor 3.078 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2003)
6. Kuno, M., Palangsuntikul, R. and Hannongbua, S.*, Interaction Energy of the Water Molecule with Amino Acids in the Active Site of HIV-1 Reverse Transcriptase, Based on Quantum Chemical Calculations, *J.Chem.Inf.Comp.Sci.*, 43, 1584-1590 (2003). impact factor 3.078 (ที่มา : Journal Citation Reports, 2003)
7. Kuno, M., Hannongbua, S.*, and Morokuma, K., Theoretical Investigation on Nevirapine and HIV-1 Reverse Transcriptase Binding Site Interaction, Based on ONIOM Method,

6.5 Proceedings ที่นำเสนอในการประชุมหรือสัมมนาทางวิชาการในประเทศ ปี 2544-2546

1. ชื่อผู้แต่ง: Hannongbua, S., Saparpakorn, P., and Treesuwan, W.
 ชื่อเรื่อง: Molecular modeling and protein-based inhibitor design of HIV-1 reverse transcriptase inhibitor
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 2nd InCoMM & InCoBB,
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 2/2003/123-130
 สถานที่: Pattaya, Chonburi, Thailand
2. ชื่อผู้แต่ง: Sriwichitkamol, K., Kerdcharoen, T., Osotchan, T., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Quantum chemical calculations of electronic structures and electronic properties of polyfluorene and its derivatives
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/166-174
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
3. ชื่อผู้แต่ง: Udommaneethanakit, T., Kerdcharoen, T., Srihirin, T., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Photoisomerization of 4-(4'-Hydroxyphenylazo) nitrobenzene
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/175-184
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
4. ชื่อผู้แต่ง: Chai-ngam, C., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Ab initio study of thermodynamic properties of magnesium complexes modeled from its binding site in HIV-1 reverse transcriptase active site
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/206-211
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
5. ชื่อผู้แต่ง: Kuno, M. and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: The H- π and N- π complexes in drug system: Model calculation for benzene and pyridine interaction
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/212-216
 สถานที่: CU, BKK, Thailand

6. ชื่อผู้แต่ง: Treesuwan, W., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Molecular dynamics simulations of Mutant HIV-1 reverse transcriptase and inhibitor bound complexation
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/253-259
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
7. ชื่อผู้แต่ง: Saparpakorn, P., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Interaction energy and bound conformational prediction of HIV-1 reverse transcriptase inhibitor: Nevirapine derivatives by using molecular docking
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/270-277
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
8. ชื่อผู้แต่ง: Rungrotmongkol, T., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Ab initio and ONIOM2 calculations on the active site of HIV-1 reverse transcriptase
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/285-290
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
9. ชื่อผู้แต่ง: Saen-oon, S., Hannongbua, S., and Morokuma, K.
 ชื่อเรื่อง: Theoretical investigation on binding energy calculations for wild type and mutant type HIV-1 RT/TIBO complex structures by ONIOM method
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/291-299
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
10. ชื่อผู้แต่ง: Suramitr, S., Kerdcharoen, T., Sriksirin, T., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Theoretical investigations of structures and electronic properties of poly(para-phenylene) and related polymers
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: 2003 International Conference on Advances in Petrochemicals and Polymers in the New Millennium
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: 2003/79
 สถานที่: Bangkok, Thailand

6. ชื่อผู้แต่ง: Treesuwan, W., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Molecular dynamics simulations of Mutant HIV-1 reverse transcriptase and inhibitor bound complexation
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปี/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/253-259
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
7. ชื่อผู้แต่ง: Saparpakorn, P., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Interaction energy and bound conformational prediction of HIV-1 reverse transcriptase inhibitor: Nevirapine derivatives by using molecular docking
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปี/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/270-277
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
8. ชื่อผู้แต่ง: Rungrotmongkol, T., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Ab initio and ONIOM2 calculations on the active site of HIV-1 reverse transcriptase
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปี/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/285-290
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
9. ชื่อผู้แต่ง: Saen-oon, S., Hannongbua, S., and Morokuma, K.
 ชื่อเรื่อง: Theoretical investigation on binding energy calculations for wild type and mutant type HIV-1 RT/TIBO complex structures by ONIOM method
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 7th ANSCSE
 ครั้งที่/ปี/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 7/2003/291-299
 สถานที่: CU, BKK, Thailand
10. ชื่อผู้แต่ง: Suramitr, S., Kerdcharoen, T., Srihirin, T., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Theoretical investigations of structures and electronic properties of poly(para-phenylene) and related polymers
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: 2003 International Conference on Advances in Petrochemicals and Polymers in the New Millennium
 ครั้งที่/ปี/เลขที่หน้า: 2003/79
 สถานที่: Bangkok, Thailand

11. ชื่อผู้แต่ง: Maitarad, P., Hannongbua, S., Kamchonwongpaisan, S., Vanichtanakul, J., Vilaivan, T., and Yuthavong, W.
 ชื่อเรื่อง: QSAR study of cycloguanil derivatives against dihydrofolate reductase of *Plasmodium falciparum* Malaria
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 2nd InCoMM & InCoBB
 ครั้งที่/ปี/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 2/2003/223
 สถานที่: Pattaya, Thailand
12. ชื่อผู้แต่ง: Pungpo, P., Wolschann, P., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Molecular modeling and inhibitor-enzyme interaction study of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The InCOB 2002
 ครั้งที่/ปี/เลขที่หน้า: 2002
 สถานที่: Bangkok, Thailand
13. ชื่อผู้แต่ง: Kuno, M., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Effect of neutral and ionic form of amino acid residues at binding pocket of HIV-1 reverse transcriptase on binding energy calculation, based on ONIOM method
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The InCOB 2002
 ครั้งที่/ปี/เลขที่หน้า: 2002
 สถานที่: Bangkok, Thailand
14. ชื่อผู้แต่ง: Palangsuntikul, R., and Hannongbua, S.
 ชื่อเรื่อง: Investigation on movement, orientation, interaction energy and IR spectroscopy study of the water molecule in the HIV-1 reverse transcriptase active site by quantum chemical calculations
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The InCOB 2002
 ครั้งที่/ปี/เลขที่หน้า: 2002
 สถานที่: Bangkok, Thailand
15. ชื่อผู้แต่ง: Saen-oon, S., Hannongbua, S., and Wolschann, P.
 ชื่อเรื่อง: Conformational analysis of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors: 8-Cl and 9-Cl *TIBO* derivatives
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The InCOB 2002

ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: 2002

สถานที่: Bangkok, Thailand

16. ชื่อผู้แต่ง: Rungrotmongkol, T., and Hannongbua, S.

ชื่อเรื่อง: Structural calculations of dihydrofolate reductase inhibitor 1-(P-CHLORO) phenyl-4,6-diamino-2,2-dimethyl-1,3,5-triazine (cycloguanil)

ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The InCOB 2002

ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: 2002

สถานที่: Bangkok, Thailand

17. ชื่อผู้แต่ง: Saparpakorn, P., and Hannongbua, S.

ชื่อเรื่อง: Three-dimensional quantitative structure-activity relationship study of GABA receptor inhibitor of 3α -hydroxy- 3β -(phenylethynyl)- 5β -pregnan-20-one derivative

ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: ANSCSE 6

ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 6/2002/B92-B99

สถานที่: Bangkok, Thailand

18. ชื่อผู้แต่ง: Treesuwan, W., Pungpo, P., Hannongbua, S., Vanichtanakul, J., and Kamchonwongpaisan, S.

ชื่อเรื่อง: Comparative molecular fields analysis of DHFR inhibitors in the class of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine derivatives

ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The InCOB 2002

ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 40/2002

สถานที่: Bangkok, Thailand

19. ชื่อผู้แต่ง: S. Hannongbua, M. Kuno and S. Saen-oon

ชื่อเรื่อง: Binding energy Calculations of the HIV-1 Reverse Transcriptase Binding site and Inhibitor Complex Structure, Based on ONIOM: a Multi-layered Integration Method

ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 5th ANSCSE

ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 5/2001/308-314

สถานที่: Thailand

20. ชื่อผู้แต่ง: R. Palangsuntikul and S. Hannongbua
 ชื่อเรื่อง: The Interaction Energy of the Water Molecule with Amino Acids in the Active Site of HIV-1 Reverse Transcriptase, Based on Quantum Chemical Calculations
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 5th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 5/2001/324-329
 สถานที่: Thailand

21. ชื่อผู้แต่ง: P. Pungpo and S. Hannongbua
 ชื่อเรื่อง: 3D-QSAR Study on HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors in Large Set of Dipyridodiazepinone Analogues by Using Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) and Comparative Similarity Index Analysis (CoMSIA)
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 5th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 5/2001/340-350
 สถานที่: Thailand

22. ชื่อผู้แต่ง: S. Prasithchokekul, P. Pungpo, S. Hannongbua* and P. Wolschann
 ชื่อเรื่อง: Prediction of Dipyridodiazepinone Derivative Series of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors, Using Multiple Linear Regression and Artificial Neural Networks
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 5th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 5/2001/340-350
 สถานที่: Thailand

23. ชื่อผู้แต่ง: N. Kitiripanya, S. Saen-oon and S. Hannongbua
 ชื่อเรื่อง: Comparative Molecular Field Analysis of HIV Protease Non-peptidic Inhibitors (5,6-dihydropyran-2-ones)
 ชื่อการประชุมวิชาการหรือสัมมนา: The 5th ANSCSE
 ครั้งที่/ปีที่/เลขที่หน้า: ครั้งที่ 5/2001/340-350
 สถานที่: Thailand

ภาคผนวก

ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1. Hannongbua, S.*, Nivasanond, K., Lawtrakul, L., Pungpo, P., and Wolschann, P., 3D-Quantitative Structure-Activity Relationships of HEPT Derivatives as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors, Based on Ab Initio Calculations, *J.Chem. Inf. and Comp. Sci.*, 41(3), 848-855 (2001).

3D-Quantitative Structure–Activity Relationships of HEPT Derivatives as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors, Based on Ab Initio Calculations

Supa Hannongbua,*[†] Kanda Nivesanond,[†] Luckhana Lawtrakul,[‡] Pornpan Pungpo,[†] and Peter Wolschann[‡]

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand, and
Institut für Theoretische Chemie und Molekulare Strukturbiologie der Universität Wien,
Währinger Strasse 17, A-1090, Wien, Austria

Received August 29, 2000

Comparative molecular field analysis (CoMFA) has been applied to a large set of 1-[(2-hydroxyethoxy)-methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT) analogues. The starting geometry of HEPT was obtained from crystallographic data of HEPT/HIV-1 reverse transcriptase (RT) complexes. The structures of 101 HEPT derivatives were considered and fully optimized by ab initio molecular orbital calculations at the HF/3-21G level. The best CoMFA model is satisfactory in both statistical significance and predictive ability. It shows excellent, high predictive ability as $r^2_{cv} = 0.858$. The derived model indicates the importance of steric contributions (64.4%) as well as electrostatic interactions for the HIV-1 RT inhibition. In addition, steric and electrostatic contour maps from this analysis agree well with the experimentally observed trend that there are steric interactions between the side chain of HEPT and an aromatic ring of Tyr181. It is concluded that a moderately sized group at C5 enhances contact with Tyr181 enough to push it into a position which renders the protein nonfunctional, but a smaller group has insufficient steric requirements to do this and a larger group renders the ligand too large for the cavity. The mutation-induced resistance of reverse transcriptase is explained by this analysis. The obtained results not only lead to a better understanding of structural requirements of this set of compounds for the inhibition but also enable the suggestions for new and more potent drugs.

INTRODUCTION

HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) is an attractive target for the drug therapy of AIDS because it is essential for HIV replication and it is not required for normal host cell replication. This enzyme is a multifunctional enzyme that copies the RNA genome of HIV-1 into DNA, which is subsequently integrated into the host cell's genome. The non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), for example, HEPT, Nevirapine, TIBO, and α -APA,^{1–4} are specific against HIV-1 and do not inhibit host cell polymerases. These NNRTIs have low cytotoxicity and produce few side effects. The NNRTIs binding site is located in the p66 palm subdomain of RT and constitutes mainly aromatic hydrophobic residues. Recently, the study of complex structures of HIV-1 RT with different NNRTIs^{5,6} reveals that there is a significant rearrangement of a three-stranded β -sheet in the p66 subunit with respect to the rest of the polymerase, and NNRTIs inhibit HIV-1 RT by locking the polymerase active site into an inactive conformation. However, a serious problem with the NNRTIs is the emergence of viral strains that have point mutations in the region encoding HIV-1 RT which prevent these drugs from inhibiting RT.

Among the representatives of the NNRTIs, 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-phenylthiothymine (HEPT) constitutes an important inhibitor and has been extensively studied for many years.^{7–21} There is considerable interest in the set up of quantitative structure–activity relationships (QSAR) of HEPT derivatives.^{8–15} These methods are widely accepted to be useful for the explanation of structural requirements of biologically active compounds.²² In particular, 3D-QSAR provides a possibility to gain more insight into drug/receptor interactions with respect to steric and electrostatic interactions.²³ However, the mechanisms of inhibition and the mutation of HIV-1 RT have not been clarified until now.

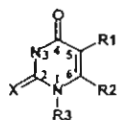
In our previous studies, QSAR and 3D-QSAR, based on comparative molecular field analysis (CoMFA), were applied to various classes of NNRTIs.^{8,9,13,15,24,25} As X-ray crystal structure of RT and the structures of the inhibition complexes are available, this information can be applied in various molecular modeling studies to develop new and more potent compounds. Moreover, the combination of X-ray investigations on the complexes with CoMFA studies allows a much more accurate interpretation of the CoMFA contour maps, it leads also to a better knowledge of the enzyme–ligand interaction. Also the decrease or the increase of inhibitor activity against a mutant enzyme contributes to the understanding of the inhibition mechanism.^{24,25}

In the present work, a CoMFA study has been performed to determine quantitative structure–activity relationships, in particular to investigate steric and electrostatic interactions

* Corresponding author phone: +66-(2)-9428900; fax: +66-(2)-5793955; e-mail: fscisph@ku.ac.th.

[†] Kasetsart University.

[‡] Institut für Theoretische Chemie und Molekulare Strukturbiologie der Universität Wien.

Table 1. Structure of HEPT Derivatives and Experimental and Calculated log(1/C) HIV-1 RT Inhibitory Affinities of the Training Set, Based on CoMFA Analysis Model 1

no.	X	substituent			log(1/C)		residual
		R1	R2	R3	exptl	calcd	
1	O	Me	SC ₆ H ₁₁	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.085	5.569	-0.484
2	O	Me	CH ₂ Ph	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.637	5.580	-0.943
3	O	Me	C≡CPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.853	5.277	-0.424
4	O	I	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.443	5.272	0.171
5	O	SPh	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.677	4.507	0.170
6	O	COCHMe ₂	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.920	5.704	-0.784
7	O	COPh	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.885	5.407	-0.522
8	O	CH ₂ Ph	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.637	4.808	-0.171
9	O	CH=CHPh ₂	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	6.075	5.647	0.428
10	O	C≡CMe	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.720	5.592	-0.872
11	O	C≡CPh	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.468	4.752	0.716
12	O	CH=CHPh (cis)	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.221	5.545	-0.324
13	O	CH=CH ₂	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.958	4.799	1.159
14	O	Me	SPh(2-Me)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.148	4.864	-0.716
15	O	Me	SPh(2-OMe)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.720	5.265	-0.545
16	O	Me	SPh(3-Me)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.584	5.482	0.102
17	O	Me	SPh(3-Et)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.568	5.384	0.184
18	O	Me	SPh(3- <i>n</i> -Bu)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.920	5.376	-0.456
19	O	Me	SPh(3-CF ₃)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	3.460	4.667	-1.207
20	O	Me	SPh(3-Cl)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.885	5.086	-0.201
21	O	Me	SPh(3-Br)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.243	5.367	-0.124
22	O	Me	SPh(3-I)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.999	5.552	-0.553
23	O	Me	SPh(3-NO ₂)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.468	5.207	-0.739
24	O	Me	SPh(3-OH)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.085	4.790	-0.705
25	O	Me	SPh(3-OMe)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.657	4.830	-0.173
26	O	Me	SPh(3,5-Me ₂)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	6.584	6.031	0.553
27	O	Me	SPh(3,5-Cl ₂)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.885	5.507	0.378
28	S	Me	SPh(3,5-Me ₂)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	6.656	6.334	0.322
29	O	Me	SPh(3-COOMe)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.102	5.389	-0.287
30	O	Me	SPh(3-COMe)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.136	5.595	-0.459
31	O	Me	SPh(3-CN)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.999	5.420	-0.421
32	O	CH ₂ CH=CH ₂	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.601	6.057	-0.456
33	O	COOMe	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.180	5.126	0.054
34	O	CONHPh	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.744	5.063	-0.319
35	S	Et	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	6.957	6.157	0.800
36	S	Pr	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.999	6.430	-1.431
37	S	Et	SPh(3,5-Me ₂)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	8.106	7.864	0.242
38	S	<i>i</i> -Pr	SPh(3,5-Me ₂)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	8.300	8.636	-0.336
39	S	Et	SPh(3,5-Cl ₂)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	7.365	7.503	-0.138
40	O	Et	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	6.920	6.113	0.807
41	O	Pr	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.468	6.090	-0.622
42	O	<i>i</i> -Pr	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	7.199	7.133	0.066
43	O	Et	SPh(3,5-Me ₂)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	7.884	7.696	0.188
44	O	<i>i</i> -Pr	SPh(3,5-Me ₂)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	8.567	8.615	-0.048
45	O	Et	SPh(3,5-Cl ₂)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	7.852	7.485	0.367
46	O	Me	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ Ph	4.698	5.314	-0.616
47	O	Me	SPh	CH ₂ OMe	5.677	4.928	0.749
48	O	Me	SPh	CH ₂ OPr	5.443	5.293	0.150
49	O	Me	SPh	CH ₂ OBu	5.327	5.395	-0.068
50	O	Me	SPh	CH ₂ OCH ₂ Ph	7.054	6.145	0.909
51	S	Et	SPh(3,5-Me ₂)	CH ₂ OEt	8.355	7.995	0.360
52	S	Et	SPh(3,5-Cl ₂)	CH ₂ OEt	7.885	7.506	0.379
53	S	Et	SPh	CH ₂ - <i>i</i> -Pr	6.656	6.396	0.260
54	S	Et	SPh	CH ₂ OCH ₂ - <i>c</i> -Hex	6.455	7.498	-1.043
55	S	Et	SPh	CH ₂ OCH ₂ Ph	8.106	7.643	0.463
56	S	Et	SPh(3,5-Me ₂)	CH ₂ OCH ₂ Ph	8.160	9.419	-1.259
57	S	Et	SPh	CH ₂ OCH ₂ C ₆ H ₄ (4-Me)	7.107	7.771	-0.664
58	S	Et	SPh	CH ₂ OCH ₂ (4-Cl)	7.919	7.593	0.326
59	S	Et	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ Ph	7.040	6.755	0.285
60	S	<i>i</i> -Pr	SPh	CH ₂ OEt	7.852	7.790	0.062
61	S	<i>i</i> -Pr	SPh	CH ₂ OCH ₂ Ph	8.179	8.695	-0.516
62	S	<i>c</i> -Pr	SPh	CH ₂ OEt	7.021	7.086	-0.065
63	O	Et	SPh(3,5-Cl ₂)	CH ₂ OEt	8.129	7.369	0.760
64	O	Et	SPh	CH ₂ O- <i>i</i> -Pr	6.467	6.134	0.333
65	O	Et	SPh	CH ₂ O- <i>c</i> -Hex	5.397	6.477	-1.080
66	O	Et	SPh	CH ₂ OCH ₂ - <i>c</i> -Hex	6.346	6.814	-0.468
67	O	Et	SPh	CH ₂ OCH ₂ Ph	8.228	7.423	0.805
68	O	Et	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ Ph	7.016	6.766	0.250
69	O	<i>i</i> -Pr	SPh	CH ₂ OCH ₂ Ph	8.567	8.864	-0.297
70	O	Me	SPh	Et	5.657	6.063	-0.406
71	O	Me	SPh	Bu	5.920	5.234	0.686
72	O	Et	CH ₂ Ph	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	6.455	6.362	0.093
73	O	Et	CH ₂ Ph(3,5-Me)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	7.885	6.921	0.964
74	O	Et	CH ₂ Ph	CH ₂ OEt	7.386	7.267	0.119
75	O	<i>i</i> -Pr	CH ₂ Ph	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	7.199	7.305	-0.106
76	O	<i>i</i> -Pr	CH ₂ Ph(3,5-Me)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	8.567	7.969	0.598
77	O	<i>i</i> -Pr	CH ₂ Ph	CH ₂ OEt	8.375	8.128	0.247
78	O	<i>i</i> -Pr	CH ₂ Ph(3,5-di-Me)	CH ₂ OEt	9.220	8.726	0.494
79	O	<i>i</i> -Pr	CH ₂ Ph	Bu	7.374	7.819	-0.445
80	O	Et	CH ₂ Ph	CH ₂ CH ₂ OMe	6.601	6.945	-0.344
81	O	<i>i</i> -Pr	CH ₂ Ph	CH ₂ CH ₂ OMe	7.282	7.145	0.137
82	O	Me	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.154	4.816	0.338

Table 2. Structure and Predicted log(1/C) HIV-1 RT Inhibitory Affinities of the Test Set

no.	substituents				log(1/C)		residual
	X	R1	R2	R3	exptl	calcd ^a	
83	O	Me	OPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.070	5.807	-1.737
84	O	Me	C≡CH	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.259	4.387	0.872
85	O	C≡CH	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	4.744	4.698	0.046
86	O	Me	SPh(3-F)	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	5.481	4.140	1.341
87	S	<i>i</i> -Pr	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	7.228	7.514	-0.286
88	O	Me	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OMe	5.060	5.221	-0.161
89	O	Me	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ O-C ₆ H ₁₁ - <i>n</i>	4.259	5.052	-0.793
90	O	Me	SPh	CH ₂ OEt	6.480	5.098	1.382
91	O	Me	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ SiMe ₃	4.494	5.062	-0.568
92	S	Et	SPh	CH ₂ OEt	7.584	6.979	0.605
93	S	Et	SPh	CH ₂ O- <i>c</i> -Hex	5.795	6.245	-0.450
94	O	Et	SPh	CH ₂ OEt	7.720	6.653	1.067
95	O	Et	SPh(3,5-Me ₂)	CH ₂ OEt	8.266	8.002	0.264
96	O	Et	SPh(3,5-Me ₂)	CH ₂ OCH ₂ Ph	8.493	8.935	-0.442
97	O	<i>i</i> -Pr	SPh	CH ₂ OEt	7.919	7.648	0.271
98	O	<i>c</i> -Pr	SPh	CH ₂ OEt	6.999	6.952	0.047
99	O	Et	CH ₂ Ph(3,5-Me ₂)	EtOCH ₂	7.199	7.906	-0.707
100	O	Et	CH ₂ Ph	Bu	6.677	6.963	-0.286
101	S	Me	SPh	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	6.008	5.153	0.855

^a Calculated by CoMFA model 13.

Table 3. Summary of CoMFA Models with 82 HEPT Derivatives with the Different Probe Atoms

model	probe atom	field type	noc	r^2_c	S_{press}	r^2_s ^a	s	F	outliers (residual)	steric contb ^b
1	sp ³ C(+1)	both	4	0.837	0.567	0.930	0.371	255.352	compd 36(-1.431)	63.9
2		steric	3	0.771	0.667	0.849	0.542	145.838		
3		electrostatic	2	0.726	0.724	0.830	0.571	192.327		
4	sp ³ O(-1)	both	4	0.830	0.578	0.926	0.382	239.639	compd 36(-1.427)	61.5
5		steric	5	0.782	0.658	0.914	0.414	161.394		
6		electrostatic	2	0.726	0.724	0.830	0.571	192.327		
7	H(+1)	both	4	0.820	0.594	0.922	0.392	226.828	compd 36(-1.577)	59.8
8		steric	3	0.749	0.697	0.833	0.569	130.006		
9		electrostatic	2	0.726	0.724	0.830	0.571	192.327		
10	sp ³ C(+1)	both	4	0.849	0.545	0.936	0.356	275.922	compd 50(1.255) ^c	63.4
11		steric	2	0.774	0.660	0.838	0.560	201.628		
12		electrostatic	2	0.781	0.651	0.861	0.519	242.022		
13	sp ³ C(+1)	both	4	0.858	0.531	0.941	0.342	300.134	compd. 67(1.106) ^d	64.4
14		steric	4	0.848	0.544	0.937	0.351	277.997		
15		electrostatic	4	0.860	0.529	0.942	0.340	303.570		

^a Conventional r^2 . ^b Steric contribution in %. ^c Elimination of compound 36 (remaining 81 compounds in the training set). ^d Elimination of compounds 36 and 50 (remaining 80 compounds in the training set).

0.941) and the standard error of estimation (0.342). F is 300.134 and the probability (P) of obtaining this value of F if r^2 is actually zero (probability of $r^2 = 0$) is lower than 0.001. The plot between predicted and experimental inhibitory affinities of the non-cross-validated analysis of model 13 is presented in Figure 2.

Prediction of the Inhibitory Activity for the Compounds in the Test Set. Consequently, the best CoMFA model (model 13) was used to predict the inhibitory activity of the compounds in the test set. The observed and fitted inhibitory activities of 19 compounds (compounds 83–101) are listed in Table 2. Based on the residual value, it is indicated that model 13 is able to predict the activities of HEPT derivatives which are not included in the training set. In particular, this model predicts well the activities for compounds 85, 87, 88, 93, 95, 97, 98, and 100. These structures are substituted at C5 position by ethyl or propyl groups. Compound 85 is substituted by ethynyl group and compound 98 is substituted by cyclopropyl group. Further, the model can be useful to predict the activities of compounds 84, 89, 91, 92, 96, 99, and 101. The prediction for compounds 83, 86, 90, and 94 shows larger residuals. A compar-

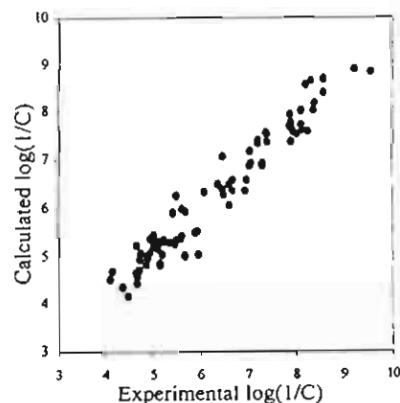


Figure 2. Plot of calculated versus experimental HIV-1 RT inhibitory affinities (log(1/C)), obtained from non-cross-validation of CoMFA model 13 for training set.

ison of the fitted and experimental activities of the test set is plotted in Figure 3. The numbering of the compounds is used as labeling.

Steric and Electrostatic Contributions. The CoMFA steric and electrostatic fields for all HEPT derivatives are

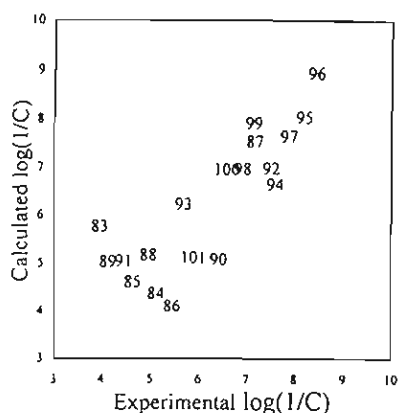


Figure 3. Plot of calculated versus experimental HIV-1 RT inhibitory affinities ($\log(1/C)$), obtained from non-cross-validation of CoMFA model 13 for test set.

presented as contour maps in Figures 4 and 5. X-ray crystal structures of HIV-1 RT complexes with various inhibitors are available, the amino acid residues surrounding HEPT in the structure of the interaction complex were merged into both figures. In Figure 4, the green and yellow contour maps represent regions whose occupancy by parts of the ligands increases or decreases the receptor binding affinity. It is interesting to note that there is only one favorable steric region corresponding to the location around the C5-side chain (R1 substitution) at the thymine ring. This leads to the idea that an additional bulky group at this position would increase the activity, but the size of this group should not be too large because of the limited volume of the binding pocket. This suggestion is based on the experimental trend that an isopropyl group is the best group for C5-substitution.²⁰ Furthermore, the positive steric contour region is close to the position of the amino acids Tyr181 and Tyr188. Both amino acids are considered to be very important for the inhibition of the enzymes' activity, due to their changed positions at the inhibition site as a consequence of the association of the inhibitor molecule. This evidence can be

supported by the fact that there are substantial steric interactions between the side chains of the Tyr181 and R1 substituent of the thymine ring of the HEPT molecules. A less favorable interaction between the amino acid Tyr181 and C5-substituent, therefore, decreases the affinity of this inhibitor. Several crystal structures of the RT complex with inhibitors, such as HEPT (compound 82), MKC-442 (compound 77), and TNK-651 (R1 = *i*-Pr, R2 = CH₂Ph, R3 = CH₂OCH₂Ph),²⁶ again indicate that the substituent at position 5 of the thymine ring is essential for HEPT analogues to bind to RT. The 5-methyl group of the lead compound, HEPT, interacts only slightly with Tyr181, whereas the larger substituents of MKC-442 and TNK-651, the 5-isopropyl group, appears to force Tyr181 to change its conformation. Tyr181 is then able to form strong interactions with the 6-phenyl ring of the inhibitor and other aromatic residues (Figure 6). According to the experimental result,³² the mutation of Tyr181 to Cys apparently eliminates favorable contacts of the aromatic ring of the tyrosine and the bound inhibitor, reducing the NNRTI binding affinity. It should also be mentioned that the contribution of the C5 parameter is considered in our previous QSAR analysis.⁹ The obtained results can be concluded that a moderately sized group at C5 enhances contact with Tyr181 enough to push it into a position which renders the protein nonfunctional, but a smaller group has insufficient steric requirements to do this and a larger group renders the ligand too large for the cavity.

The yellow contours, which are located between the R2 and R3 substituents, suggest that the substituents should not have branches because they may have steric interaction which could inhibit the association between the N1 side-chain and the 6-phenyl ring of the inhibitor with the amino acid residues in these area (Val106, Phe227, Trp229, Leu234, His235, and Pro236). These results strongly reveal the importance of the steric feature of the inhibitors contributing to affinity through contour maps. The architecture of the binding pocket undergoes conformational changes to accept each of inhibi-

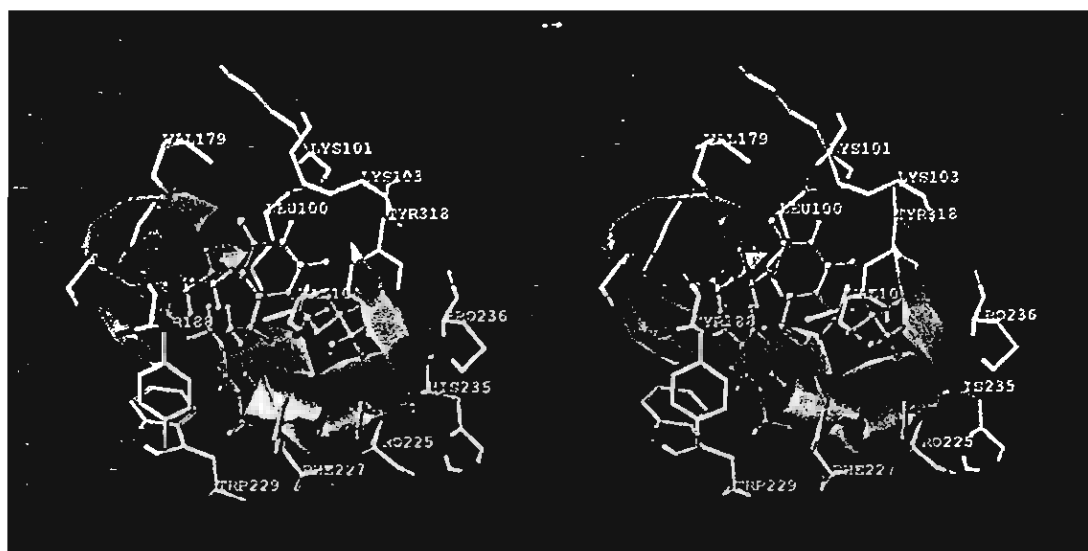


Figure 4. Steric $\text{std} \times \text{coeff}$ contour map, obtained from CoMFA model 13 for HIV-1 inhibition, is shown together with amino acid residues within 6 Å around HIV-1 RT active site. HEPT compound is presented inside the field as light-blue stick structure, with undisplayed hydrogens. Sterically CoMFA favored areas are represented by green region. Sterically CoMFA unfavored areas are represented by yellow region (level of steric contour contribution = 80%).

residues in the binding pocket of RT. Numerous studies have indicated that Tyr181Cys HIV-1 RT mutation is frequently found in the presence of NNRTIs.^{33–37} This mutation leads to a resistance against the NNRTIs due to the loss of the hydrophobic interactions of the inhibitors with the surrounding amino acids for steric reasons. In the case of nevirapine analogues this resistance is proven experimentally,³² and moreover, it is also possible to explain the difference of the inhibitor interactions between wild type and mutant type enzymes from the CoMFA analysis.²⁵

In HEPT derivatives the substituents on the phenylthio side chain at C6 of the thymine ring increase the hydrophobicity of the molecules which results in a favorable inhibition by the improvement of the interaction to the hydrophobic binding pocket of HIV-1 RT, which is rather similar (i.e. steric and electrostatic contour maps show good consistency with inhibitor-enzyme complex structure derived by experimental data) to nevirapine and to another important NNRTI.^{24,25} Therefore, to suggest a substance to be a high potent inhibitor of RT against either wild-type or mutant HIV-1 RT, it must bind tightly to the specific amino acid residues that yield the structural changes at the active site of the enzyme and result in low reverse transcriptase activity.

CONCLUSIONS

A 3D-QSAR investigation on HIV-1 RT inhibitors was performed, using structures calculated by ab initio methods. For a large set of HEPT derivatives, these CoMFA studies successfully explain steric and electrostatic interactions of the molecules with the amino acids of the inhibition pocket of the HIV-1 RT. The CoMFA model is of satisfactory quality, having $r^2_{cv} = 0.858$. Steric fields are the primary contributor (64.4%) to the CoMFA model of RT inhibition. The steric contours correspond well with the geometrical position and charge requirements of amino acid residues of the active site and are consistent with the experimentally observed trend that there are steric interactions between the side chain of HEPT and an aromatic ring of Tyr181. The obtained results can be concluded that a moderately sized group at C5 enhances contact with Tyr181 enough to push it into a position which renders the protein nonfunctional, but a smaller group has insufficient steric requirements to do this and a larger group renders the ligand too large for the cavity. It also indicates clearly that losing favorable interactions between aromatic ring of Tyr181 and HEPT may decrease the affinity of this inhibitor. Furthermore, this study provides the common basic information and structural requirements in the class of NNRTIs that are useful for the design of new and high potent compounds.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grants from the National Research Council of Thailand and Fonds zur Foerderung der Wissenschaftlichen Forschung (P12257-CHE) under the Austria-Thailand Cooperative Science Program (NRCT-FWF) and partially supported by a Grant-in-Aid for thesis from the Graduate School, Kasetsart University. S. Hannongbua is grateful to the Thailand Research Fund and KURDI for a research fellowship (RSA4480001). L. Lawtrakul is grateful to the DSPT project for scholarships. P. Pungpo is grateful to the RGJPhD project for the scholarships

(3.C.KU/41/B.1). The generous supply of computing time and Sybyl 6.5 installation by the high performance-computing center of the National Electronics and Computer Technology (NECTEC) and Cluster computer of Universität Wien are also gratefully acknowledged. We thank A. Karpfen and G. Ecker for helpful comments.

REFERENCES AND NOTES

- (1) De Clercq, E. Antiviral Therapy of Human Immunodeficiency Virus Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995, 8, 200–239.
- (2) Young, S. D. Non-Nucleoside Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Perspect. Drug Discov. Des.* 1993, 1, 181–192.
- (3) De Clercq, E. Toward Improved Anti-HIV Chemotherapy: Therapeutic Strategies for Intervention With HIV-1 Infections. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 2491–2517.
- (4) Arnold, E.; Das, K.; Ding, J.; Yadav, P. N. S.; Hsiou, Y.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H. Targeting HIV Reverse Transcriptase For Anti-AIDS Drug Design. *Drug Des. Discov.* 1996, 13, 29–47.
- (5) Esnouf, R.; Re, J.; Ross, C.; Jones, Y.; Stammers, D.; Stuart, D. Mechanism of Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase by Non-Nucleoside Inhibitors. *Struct. Biol.* 1995, 2, 303–308.
- (6) Sarafianos, S. G.; Das, K.; Ding, J.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H.; Arnold, E. Touching the Heart of HIV-1 Drug Resistance: The Fingers Close Down on the dNTP at the Polymerase Active Site. *Chem. Biol.* 1999, 6, R137–R146.
- (7) Miyasaka, T.; Tanaka, H.; Baba, M.; Hayakawa, H.; Walker, R. T.; Balzarini, J.; De Clercq, E. A Novel Lead for Specific Anti-HIV-1 Agents: 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio) thymine. *J. Med. Chem.* 1989, 32, 2507–2509.
- (8) Hannongbua, S.; Lawtrakul, L.; Limtrakul, J. Structure–Activity Correlation Study of HIV-1 Inhibitors: Electronic and Molecular Parameters. *J. Comput.-Aided Mol. Design.* 1996, 10, 145–152.
- (9) Hannongbua, S.; Lawtrakul, L.; Sotriffer, C. A.; Rode, B. M. Comparative Molecular Field Analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors in the Class of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 1996, 15, 389–394.
- (10) Kireev, D. B.; Chretien, J. R.; Grierson, D. S.; Monneret, C. A 3D QSAR Study of a Series of HEPT Analogues: The Influence of Conformational Mobility on HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibition. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 4257–4264.
- (11) Lucio, J. M.; Ferretti, F. H. QSAR Based on Multiple Linear Regression and PLS Methods for the Anti-HIV Activity of a Large Group of HEPT Derivatives. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1997, 37, 392–401.
- (12) Tronchet, J. M. J.; Grigorov, M.; Dolashahi, N.; Moriaud, F.; Weber, J. A QSAR Study Confirming the Heterogeneity of the HEPT Derivative Series Regarding Their Interaction with HIV Reverse Transcriptase. *Eur. J. Med. Chem.* 1997, 32, 279–299.
- (13) 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.
- (14) Jalali-Heravi, M.; Parastar, F. Use of Artificial Neural Networks in a QSAR Study of Anti-HIV Activity for a Large Group of HEPT Derivatives. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2000, 40, 147–154.
- (15) Klein, C. T.; Lawtrakul, L.; Hannongbua, S.; Wolschann, P. Accessible Charges in Structure–Activity Relationships. A Study on HEPT-based HIV-1 RT Inhibitors. *Sci. Pharm.* 2000, 68, 25–40.
- (16) 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). *Biol. Chem.* 1999, 380, 265–267.
- (17) 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). *Monatsh. Chem.* 1999, 130, 1347–1363.
- (18) Tanaka, H.; Baba, M.; Kayakawa, H.; Sakamaki, T.; Miyasaka, T.; Ubasawa, M.; Takashima, H.; Sekiya, K.; Nitta, I.; Shigeta, S.; Walker, R. T.; Balzarini, J.; De Clercq, E. A New Class of HIV-1-Specific 6-substituted Acyclouridine Derivatives: Synthesis and Anti-HIV-1 Activity of 5- or 6-substituted Analogues of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT). *J. Med. Chem.* 1991, 34, 349–357.
- (19) Tanaka, H.; Takashima, H.; Ubasawa, M.; Sekiya, K.; Nitta, I.; Baba, M.; Shigeta, S.; Walker, R. T.; De Clercq, E.; Miyasaka, T. Structure–Activity Relationships of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine Analogues: Effect of Substitutions at the C-6 Phenyl Ring and at the C-5 Position on Anti-HIV-1 Activity. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 337–345.
- (20) Tanaka, H.; Takashima, H.; Ubasawa, M.; Sekiya, K.; Nitta, I.; Baba, M.; Shigeta, S.; Walker, R. T.; De Clercq, E.; Miyasaka, T. Synthesis

- and Antiviral Activity of Deoxy Analogues of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT) as Potent and Selective Anti-HIV-1 Agents. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 4713–4719.
- (21) Tanaka, H.; Takashima, H.; Ubasawa, M.; Sekiya, K.; Inouye, N.; Baba, Masanori; Shigeta, S.; Walker, R. T.; De Clercq, E.; Miyasaka, T. Synthesis and Antiviral Activity of 6-Benzyl Analogues of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT) as Potent and Selective Anti-HIV-1 Agents. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 2860–2865.
- (22) Kubinyi, H. *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*; VCH: Weinheim, 1993.
- (23) Kubinyi, H. *3D-QSAR in Drug Design, Theory, Methods and Applications*; ESCOM: Leiden, 1993.
- (24) Hannongbua, S.; Pungpo, P.; Limtrakul, J.; Wolschann, P. Quantitative Structure–Activity Relationships and Comparative Molecular Field Analysis of TIBO derivatized HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. *J. Comput.-Aided Mol. Design.* 1999, 13, 563–577.
- (25) Pungpo, P.; Hannongbua, S. Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationships Study on HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors in the Class of Dipyridodiazepinone Derivatives, Using Comparative Molecular Field Analysis. *J. Mol. Graph. Mod.* 2000, 18, 581–590.
- (26) Hopkins, A. L.; Ren, J.; Esnouf, R. M.; Willcox, B. E.; Jones, Y.; Ross, C.; Miyasaka, T.; Walker, R. T.; Tanaka, H.; Stammers, D. K.; Stuart, D. I. Complexes of HIV-1 Reverse Transcriptase with Inhibitors of the HEPT Series Reveal Conformational Changes Relevant to the Design of Potent Non-Nucleoside Inhibitors. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 1589–1600.
- (27) *ALCHEMY2000*; Tripos Associates Inc.: St. Louis, MO, 1996.
- (28) *GAUSSIAN94*; Carnegie Office Park, Building 6, Pittsburgh, PA, 1995.
- (29) *SYBYL Molecular Modelling Softwares, Version 6.5*; Tripos Associates, Inc.: St. Louis, MO, 1998.
- (30) Wold, S.; Johansson, E.; Cochi, M.; In *3D QSAR in Drug Design, Theory, Methods and Applications*; Kubinyi, H., Ed.; ESCOM: Leiden, 1993; pp 523–549.
- (31) *SYBYL Molecular Modelling Softwares, Version 6.3*; Tripos Associates, Inc.: St. Louis, MO, 1996; p 229.
- (32) 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.; Rose, J.; David, E.; Mauldin, S. C.; Fuchs, V. U.; Vitous, J.; Hoermann, M.; Klunder, J. M.; Raghavan, P.; Skiles, J. W.; Mui, P.; Richman, D. D.; Sullivan, J. L.; Shih, C.; Grob, P. M.; Adams, J. Novel Non-Nucleoside Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Reverse Transcriptase. 4. 2-Substituted Dipyridodiazepinones as Potent Inhibitors of Both Wild-Type and Cysteine-181 HIV-1 Reverse Transcriptase Enzyme. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 4830–4838.
- (33) Pauwels, R.; Andries, K.; Debyser, Z.; Daele, P. V.; Schols, D.; Stoffels, P.; De Vreese, K.; Woestenborghs, R.; Vandamme, A.; Janssen, C. G. M.; Anne, J.; Cauwenbergh, G.; Desmyter, J.; Heykants, J.; Janssen, M. A. C.; De Clercq, E.; Janssen, P. A. J. Potent and Highly Selective Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Inhibition by a Series of Alpha-Anilinophenylacetamide Derivatives Targeted at HIV-1 Reverse Transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, 90, 1711–1715.
- (34) Buckheit, R. W., Jr.; Fliakas-Boltz, V.; Yeagy-Bargo, S.; Weislow, O.; Mayers, D. L.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H.; Pan, B.; Chu, S.; Bader, J. P. Resistance to 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine Derivatives is Generated by Mutations at Multiple Sites in the HIV-1 Reverse Transcriptase. *Virology* 1995, 210, 186–193.
- (35) Balyarini, J.; Perez-Perez, M.-J.; Velazquez, S.; San-Felix, A.; Camarasa, M.-J.; De Clercq, E.; Karlsson, A. Suppression of the Breakthrough of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) in Cell Culture by Thiocarboxanilide Derivatives when Used Individually or in Combination with Other HIV-1-specific Inhibitors (i.e., TSAO Derivatives). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, 92, 5470–5474.
- (36) Das, K.; Ding, J.; Hsiou, Y.; Clark, A. D., Jr.; Moereels, H.; Koymans, L.; Andries, K.; Pauwels, R.; Janssen, P. A. J.; Boyer, P. L.; Clark, P.; Smith, R. H., Jr.; Smith, M. B. K.; Michejda, C. J.; Hughes, S. H.; 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.
- (37) Yu, H.; Das, K.; Ding, J.; Clark, A. D., Jr.; Rösner, M.; Winkler, J.; Riess, G.; Hughes, S. H.; Arnold, E. Structures 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.

CI0001278



Conformational analysis of nevirapine, a non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, based on quantum mechanical calculations

Supa Hannongbua*, Sirikanok Prasithichokekul & Pornpan Pungpo

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

Received 20 October 2000; accepted 4 October 2001

Key words: conformational analysis, density functional theory, nevirapine, NMR spectra, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, quantum chemical calculations

Summary

The structure and the conformational behavior of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one (nevirapine), is investigated by semiempirical (MNDO, AM1 and PM3) method, *ab initio* at the HF/3-21G and HF/6-31G** levels and density functional theory at the B3LYP/6-31G** level. The fully optimized structure and rotational potential of the nitrogen and carbon bond in the cyclopropyl ring were examined in detail. A similar geometrical minimum is obtained from all methods which shows an almost identical structure to the geometry of the molecule in the complex structure with HIV-1 reverse transcriptase. To get some information on the structure in solution, NMR chemical shift calculations were also performed by a density functional theory at the B3LYP/6-31G** level, using GIAO approximation. The calculated ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra for the energy minimum geometry agree well with the experimental results, which indicated that the geometry of nevirapine in solution is very similar to that of the molecule in the inhibition complex. Furthermore, the obtained results are compared to the conformational studies of other non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and reveal a common agreement of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. The specific butterfly-like shape and conformational flexibility within the side chain of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors play an important role inducing conformational change of HIV-1 reverse transcriptase structure and are essential for the association at the inhibition pocket.

Introduction

Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) are highly potent, relatively low in toxicity, and can specifically inhibit HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT). A number of pharmacologically active NNRTIs have been identified such as nevirapine [1], HEPT [2], TIBO [3] and alpha-APA [4]. Recently, crystal structures of HIV-1 RT and complexes with some different NNRTIs have been published [5–25]. These structures have provided a great deal of insight into the conformational flexibility of RT induced by the binding of NNRTIs. Furthermore, these crystallographic studies show that the chemically diverse class

of NNRTIs have common features of binding to RT, and the similar butterfly shape of the considered inhibitors is essential for the association at the inhibition pocket [24–27]. The majority of HIV-1 RT inhibitors that act on the binding site show a pronounced dependence for their action on seemingly major changes in molecular conformation [28]. Accordingly, conformational investigations have been an important part of structure-activity relationship studies. This kind of investigation is necessary to derive meaningful information relevant to drug action because, in the case of flexible molecules, the receptor is likely to alter the solution conformation upon binding. Therefore, the relevance of information about a single preferred conformation of a drug molecule in solution to the conformational requirements of the receptor site may not be clear.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: fscisph@ku.ac.th

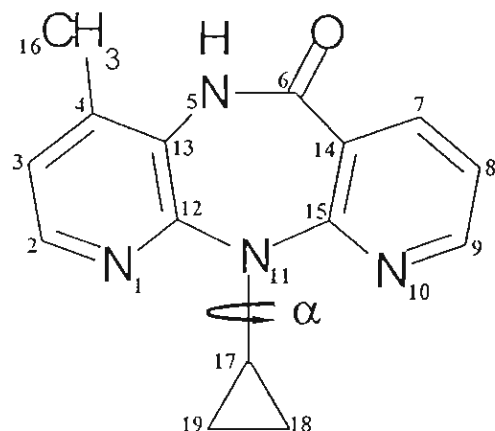


Figure 1. The chemical structure of nevirapine or 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido [3,2-b',3'-e][1,4] diazepin-6-one and atomic numbering used in this study.

To investigate the role of molecular structure of NNRTIs on HIV-1 RT inhibition, conformational analyses of the potent NNRTIs have been previously studied [29–32], based on quantum chemical calculations. The obtained results indicated that the NNRTIs such as HEPT and TIBO show flexibility in their structures with two pronounced energetic local minima. The energy barrier between both minima are not high, estimated to be 2–3 kJ/mol, which can be easily changed from one local minima to another. With this flexibility, the conformational change of reverse transcriptase is induced. In the present study, an attempt has been made on nevirapine or 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido[3,2-b',3'-e][1,4]diazepin-6-one (Figure 1). This inhibitor has already passed pre-clinical and clinical tests and is available on the market [33]. The structure of nevirapine together with the numbering of the atoms used in this investigation is given in Figures 1 and 2a. Particularly, the rotation of the cyclopropyl ring around the carbon nitrogen single bond (N11-C17) determine the conformational space of nevirapine and must be analyzed with respect to all energetically accessible conformations. It is found that alpha angle of cyclopropyl ring plays an important role to determine the structure of nevirapine, which has no other flexibility, and the butterfly inversion (Figure 2b) of the structure leads to a symmetry-related structure with the energy dependence on alpha.

Therefore, the structural energy minimum, corresponding to the conformation of nevirapine as obtained from X-ray investigations of the association complex, was calculated by quantum chemical calcu-

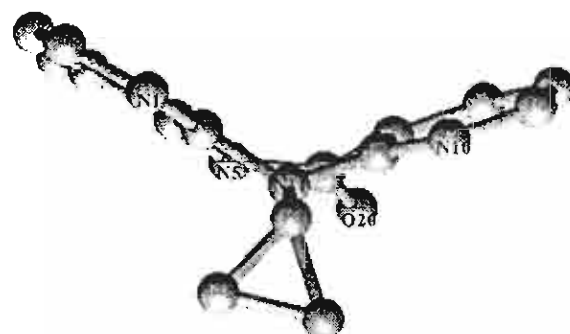
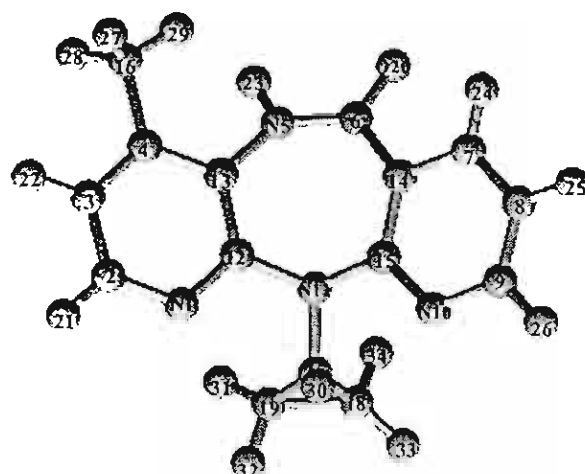


Figure 2. (a) 3-dimensional structure of nevirapine. (b) Butterfly-like shape of nevirapine.

lations: semiempirical, ab initio and density functional theory (DFT) methods. Furthermore, the DFT at the B3LYP/6-311++G** level was used for the prediction of ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of nevirapine in order to conceptualize the structure of the molecule in solution. The detailed information about the three-dimensional structures of the inhibitor, based on theoretical investigation will be useful in structure-activity relationship studies and the design of new potent NNRTI compounds.

Methods

The starting geometry of nevirapine was obtained from X-ray crystallographic data at 2.2 Å resolution of the enzyme-inhibitor complex structure (1vrt.pdb) [4, 34]. First, full geometrical optimization was performed, based on semiempirical (MNDO, AM1, PM3) method, *ab initio* at the HF/3-21G and HF/6-31G** level and DFT at the B3LYP/6-31G** level. These calculations were done by the GAUSSIAN98 program [35], running on an IBM/SP2 computer. The obtained geometric parameters of torsion angles was compared with the X-ray data. Second, as an examination of potential energy surface with respect to torsion angles is more informative in order to understand the conformations of nevirapine in the gas phase than just locating the global minimum, the rotational barrier bond between the nitrogen of the tricyclic system and the carbon atom of the cyclopropyl group (C15-N11-C17-C19, α) with a stepsize of 30 deg was considered and used in this study. Keeping the α angle constant, the automated geometry optimization was performed for the rest of the molecule by the individual methods. Theoretical calculations were compared to the experimental geometry, in particular to X-ray diffraction data of the reverse transcriptase and nevirapine complex, as available from the PDB (1vrt.pdb). The ^1H -NMR and ^{13}C -NMR chemical shifts of nevirapine were calculated by the Gauge Invariant Atomic Orbitals (GIAO) [36] method using B3LYP/6-311++G** level of theory on the structure, optimized at B3LYP/6-31G** level. Tetramethylsilane (TMS) was used as reference compound to get the chemical shifts in NMR experiment, therefore, the ^1H and ^{13}C NMR spectra of this compound was also calculated by the same method, described above for nevirapine. The ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts of nevirapine were subtracted by those of TMS to obtain the predicted NMR spectra and compared to the experimental values.

Results and discussion

Geometrical calculations and conformational analysis of nevirapine

The conformation of nevirapine was fully optimized, based on different methods. The obtained structural parameters with the lowest energy conformation calculated by semiempirical methods and at the HF/3-

21G and HF/6-31G** levels and at the B3LYP/6-31G** level were compared with X-ray diffraction data of nevirapine in the complex with RT. The CHARMM force field was used to refine the structure with resolution of 2.2 Å. The compared structural parameters obtained by each methods are presented in Table 1. The indications are that all considered methods provide sufficiently good results for the torsion angles. As expected, the standard deviations are significantly smaller for results obtained by *ab initio* and density functional theory calculations than for those obtained by the semiempirical methods (Table 1). There is only PM3 method that provides standard deviation comparable to those of *ab initio* and DFT. It is generally known that the HF/3-21G and HF/6-31G** levels lead to a good geometry close to the results of the accurate B3LYP/6-31G** level of theory.

The dihedral angles which determine the position of the cyclopropyl ring (C15-N11-C17-C19, α) are similar for all calculations and differ slightly from that obtained by the X-ray investigation. Superimposition of the lowest energy conformation calculated at the B3LYP/6-31G** level on the crystal structure of nevirapine in the complex provides an agreement (root mean squares deviation of 0.07) for the side chain, but only relatively small deviations of the positions of the cyclopropyl ring.

For the determination of the other conformational minima of nevirapine, the rotational potentials of the dihedral angles α were analyzed by semiempirical methods (MNDO, AM1 and PM3), *ab initio* at the HF/3-21G and HF/6-31G** levels and additionally by DFT at the B3LYP/6-31G** level. The dependence of the energy on the dihedral angle α , calculated by different semiempirical methods, is depicted in Figure 3. From this figure, it can be seen that all semiempirical methods (MNDO, AM1 and PM3) lead to almost the same conformational minimum when the dihedral angle α is equal to 218.47°. Moreover, considering the analogous diagram for the results of the *ab initio* calculations at the HF/3-21G and HF/6-31G** levels and DFT at the B3LYP/6-31G** level, it shows the same energy minima at $\alpha = 218.47^\circ$. From these results, it can be concluded that the dihedral angle α is restricted to one minima at this torsion angle. Considering the position of the energy minima in more details and by comparing to the experimental values obtained by X-ray investigation ($\alpha_{\text{exp}} = 208.48^\circ$), it can be seen that the calculated values are nearly the same as the experimental one. This is an indication for the fact that the

Table 1. Selected torsion angles of nevirapine, obtained by different methods and compared to experimental X-ray crystallographic data

	X-ray ^a	Semiempirical			Ab initio (HF)		B3LYP
		MNDO	AM1	PM3	3-21G	6-31G**	6-31G**
Torsion angle (deg)							
O20-C6-C14-C7	30.0	46.2	34.8	26.4	21.1	24.1	21.2
C12-N11-C17-C19	68.7	74.7	78.2	76.9	69.6	73.2	71.2
C12-N11-C17-C18	136.8	143.3	147.4	144.9	137.7	142.0	139.9
C14-C15-N11-C17	168.3	147.3	154.1	159.2	154.8	157.0	159.9
C13-C12-N11-C17	200.1	210.6	206.6	205.9	208.3	206.9	205.4
C15-N11-C17-C19	208.5	216.4	211.3	213.2	220.6	216.4	217.4
C15-N11-C17-C18	276.6	248.9	280.5	281.2	288.7	285.1	286.1
C6-N5-C13-C4	144.4	149.2	144.6	130.5	135.8	131.1	134.8
N5-C6-C14-C7	212.9	228.7	217.5	204.0	202.2	204.1	201.1
C15-N11-C12-N1	238.8	246.4	249.9	246.2	237.6	243.4	237.9
C12-N11-C15-N10	126.7	112.3	111.7	119.3	127.4	122.1	127.9
SD ^b		12.5	8.47	8.3	9.0	8.3	7.7

^aData obtained from refs. [4] and [34] with resolution of 2.2 Å.

^bStandard deviation (SD) = $[\sum(x_{Cal.} - x_{Exp.})^2 / n - 1]^{1/2}$.

conformation of nevirapine in the inhibition complex is rather close to its energy minimum conformation.

All possible alpha conformations were calculated*, including the inverted butterfly-like shape. The energy barrier of all conformations indicated that there is only one minimum at the alpha torsion angle equals to 218.47 deg which is possible to have two different conformations by the flipped conformation of one another. However, the conformation of nevirapine in the complex structure is found to be equivalent with the one energy minimum investigated in this study. The conformation that the two pyridine rings pointed down is very high energy and not possible to exist.

Calculated ¹H-NMR and ¹³C-NMR chemical shifts of nevirapine

In order to get more information on the geometry in solution, the NMR spectra of nevirapine were calculated for the structural minimum and compared to the experimental ¹H-NMR and ¹³C-NMR chemical shifts [37, 38] which reported that the error on chemical shifts is about 0.05. For the calculations, the recent tests of NMR computational methods [36, 39, 40] are limited to ¹³C and other heavy atoms. The errors for ¹H-NMR chemical shifts calculated at the HF/3-21G level was reported to be one order of magnitude lower than ¹³C errors at the same level of theory

[36]. The NMR calculations typically benefit from and accurate geometry and a large basis set such as at the B3LYP/6-311++G(2d,p) level of theory [39]. Moreover, for larger basis sets, errors for ¹H chemical shifts consistently could be less than 1 ppm and sometimes less than 0.10 ppm [40]. Therefore, in this study, the chemical shifts were calculated at the B3LYP/6-311++G** level and used the corresponding B3LYP/6-31G** level for optimized structure. The comparison of chemical shifts between experimental and calculated ¹H-NMR and ¹³C-NMR are presented in Tables 2 and 3 and also plotted in Figures 4 and 5, respectively. The correlation coefficients of the plot, $r^2 = 0.9974$ for ¹H-NMR and $r^2 = 0.9988$ for ¹³C-NMR, show an excellent agreement between experimental and predicted chemical shifts. The comparison of the experimental and calculated chemical shifts favors the presence of a conformation in solution which is consistent with the optimized geometry at a dihedral angle α of about 218.47 deg. As expected, it is found in this study that there is well agreement between chemical shifts obtained by B3LYP/6-311++G** level, except the ¹H chemical shift of H23 (Figure 2a) atom attached to nitrogen atom of 7-membered ring. As this proton is an acidic proton, thus, hydrogen bonding can strongly influence on the electronic environment of this proton with oxygen of dimethyl sulfoxide solvent [37], and hence, it is not possible to predict the chemical shift of this proton.

*unpublished data.

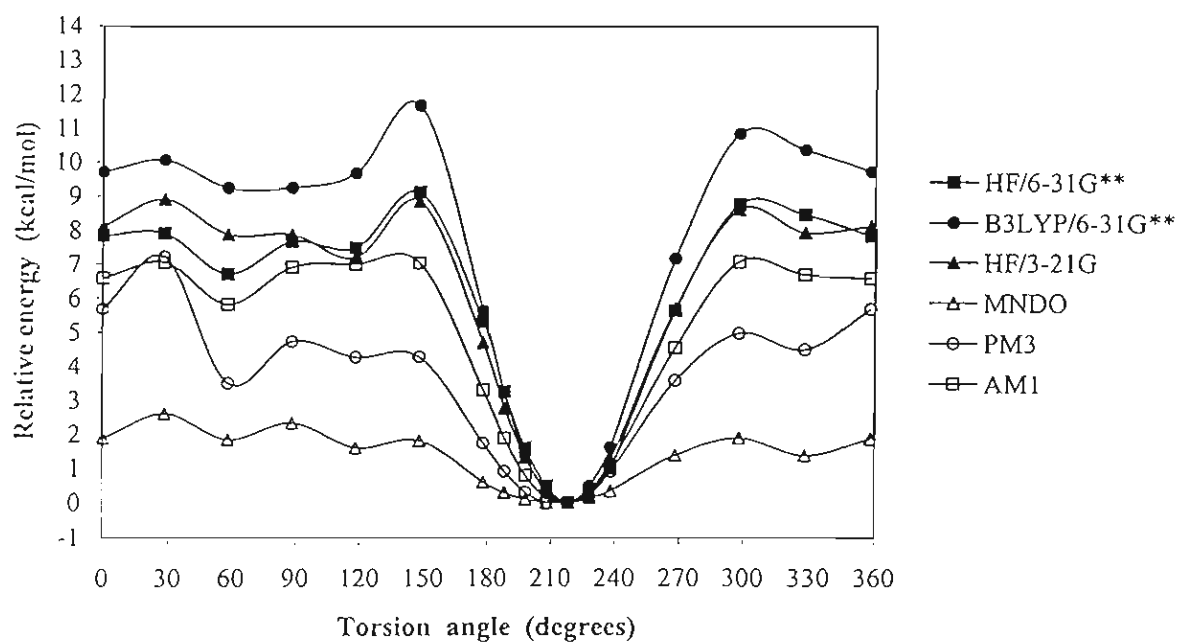


Figure 3. The τ rotational potential (kcal/mol) of dihedral angle, α , obtained from semiempirical (MNDO, AM1 and PM3), ab initio at the HF/3-21G and HF/6-31G** levels and density functional theory at the B3LYP/6-31G** level.

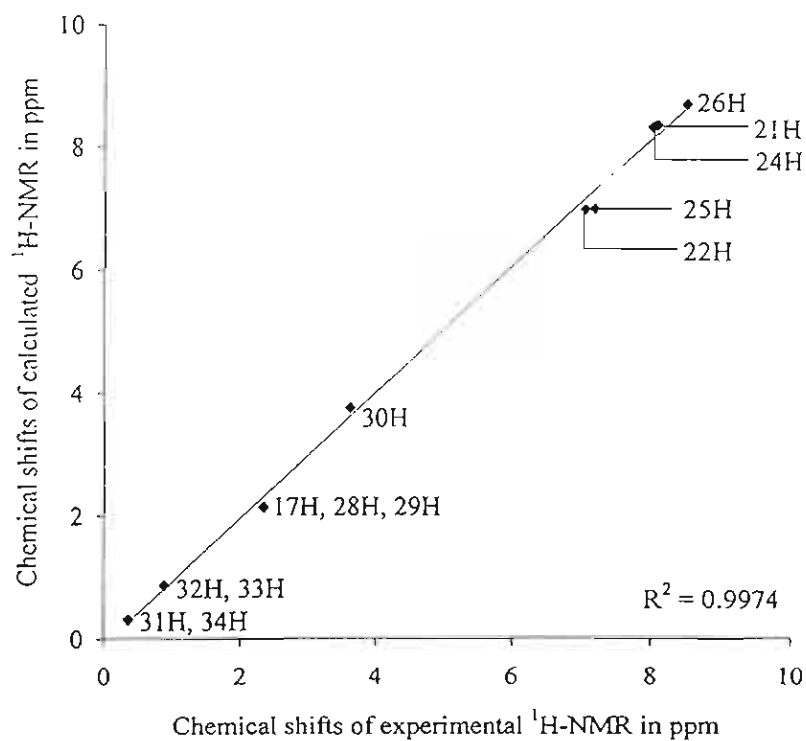


Figure 4. Plot of calculated and experimental chemical shifts of ^1H -NMR.

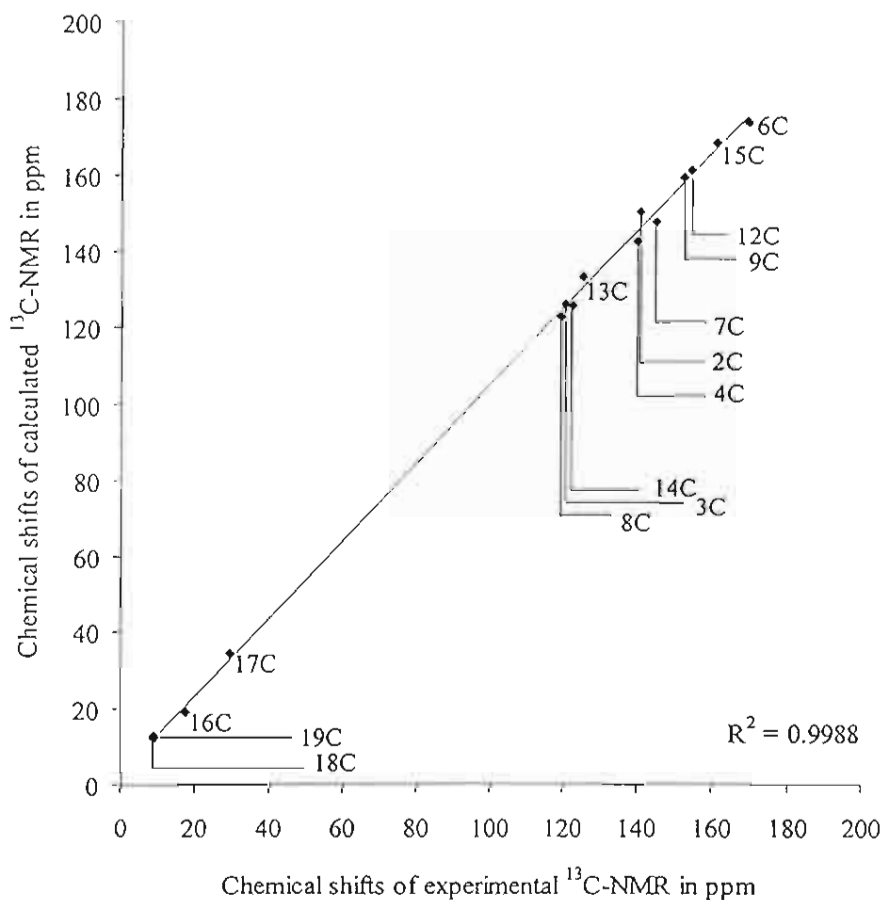


Figure 5. Plot of calculated and experimental of chemical shifts of ^{13}C -NMR.

Table 2. The comparison of experimental and calculated ^1H -NMR chemical shifts, δ (ppm)

Position of proton	Expt. δ	Cal. δ^a	Residual
21H	8.08	8.35	-0.27
22H	7.07	6.98	0.09
24H	8.02	8.32	-0.30
25H	7.20	6.99	0.03
26H	8.51	8.69	0.18
27H, 28H, 29H	2.34	2.14	0.20
30H	3.62	3.76	0.14
31H, 34H	0.35	0.32	0.03
32H, 33H	0.88	0.88	0.00
SD ^b		0.20	

^aAt the B3LYP/6-311++G** level, using the B3LYP/6-31G** optimized structure.

^bStandard deviation

$$(\text{SD}) = \left[\sum (x_{\text{Cal.}} - x_{\text{Expt.}})^2 / n - 1 \right]^{1/2}$$

Based on our previous investigation on the conformational analysis of HEPT and TIBO [29–31], it was found that there are two energy minima of each structure. The main reason is due to the number of rotatable single bonds and the flexibility of the inhibitor structures. In both compounds, the comparison of calculated ^1H -NMR spectra with experiment indicates that the preferable minimum of each compound corresponds to the geometry of the molecules in the association complex. However, it was found that, for TIBO, the nitrogen inversion effect plays an important role on conformational change and gives the butterfly-like shape of TIBO similar to the complex structure with HIV-1 RT. Taken into account, it can be concluded that, in solution, nevirapine and some other NNRTIs exist in one conformation which corresponds to the similar structure of molecule existing in the complex.

16. Das, K., Ding, J., Hsiou, Y., Clark Jr., D.A., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Pauwels, R., Janssen, J.A.P., Boyer, L.P., Clark, Patrick, Smith Jr., H.R., Kroeger Smith B.M., Michejda, J.C., Hughes, S.H. and Arnold, E., *J. Mol. Biol.*, 264 (1996) 1085.
17. Stammers, D.K., Somers, D.O., Ross, C.K., Kirby, J., Ray, P.H., Wilson, J.E., Norman, M., Ren, J.S., Esnouf, R.M. and Garman, E.F., *J. Mol. Biol.*, 242 (1994) 586.
18. Berstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J.B., Meyer, E.F., Brice, M. D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanoushi, T. and Tasumi, M., *J. Mol. Biol.*, 112 (1977) 535-542.
19. Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R., Clark, A.D., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S.H. and Arnold, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993) 6320.
20. Hopkins A.L., Ren, J., Esnouf, R.M., Willcox, B.E., Jones, E.Y., Ross, C., Miyasaka, T., Walker, R.T., Tanaka, H., Stammers, D.K. and Stuart, D.I., *J. Med. Chem.*, 39 (1996) 1589.
21. Hsiou, Y., Ding, J., Das, K., Clark, A.D., Hughes, S.H. and Arnold, E., *Structure*, 4 (1996) 853.
22. Jaeger, J., Smerdon, J. S., Wang, J., Boisvert, C.D. and Steitz, A.T., *Structure*, 2 (1994) 869.
23. Najmudin, S., Cote, L.M., Montano, P.S., Gu, J. and Georgiadis, M., *J. Mol. Biol.*, 296 (2000) 613.
24. Ding, J., Das, K., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Janssen, P.A.J., Hughes, S.H. and Arnold, E., *Nat. Struct. Biol.*, 2 (1995) 407-415.
25. Ding, J., Das, K., Tantillo, C., Zhang, W., Clark, A.D., Jessen, S., Lu, X., Hsiou, Y., Jacobo-Molina, A., Andries, K., Pauwels, R., Moereels, H., Koymans, L., Janssen, P.A.J., Smith, R.H., Koepke, M.K., Michejda, C.J., Hughes, S.H. and Arnold, E., *Structure*, 3 (1995) 365-379.
26. Merluzzi, V.J., Hargrave, K.D., Labadia, K.J., Grozinger, K., Shih, C. and Sullivan, L., *Science*, 250 (1990) 1411.
27. Kelly, A.K., Proudfoot, J.J., McNeil, W.d., Patel, R.u., David, E., Hargrave, D.k., Cardozo, M., agarwal, A. and Adams, J., *J. Med. Chem.*, 38 (1995) 4839.
28. De Clercq, E., *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8 (1992) 119.
29. Lawtrakul, L., Hannongbua, S., Beyer, A. and Wolschann, P., *Biol. Chem.*, 380 (1999) 265.
30. Lawtrakul, L., Hannongbua, S., Beyer, A. and Wolschann, P., *Monatsh. Chem.*, 130 (1999) 1347.
31. Hannongbua, S., Saen-oon, S., Pungpo, P. and Wolschann, P., *Molecular Calculations on the Conformation of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors 4,5,6,7-tetrahydroimidazo-8-chloro-5-methyl-(3-methyl-2-butenyl)imidazo [4,5,1-jk][1,4]-benzodiazepine-2-(1H)-thione (8-chloro-TIBO)*, *Monatsh. Chem.*, (in press).
32. Ren, J., Esnouf, R., Hopkins, A., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D. and Stuart, D., *Structure*, 3 (1995) 915.
33. Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., Ridgefield, CT06877 (www.Nevirapine.Com).
34. <http://alpha.bmc.uu.se/~gerard/hetero/NEV.html>
35. Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Building Six, Pittsburgh, PA 15106.
36. Ditchfield, R., *Mol. Phys.*, 27 (1974) 789.
37. Hargrave, K.D., Proudfoot, J.R., Grozinger, K.G., Cullen, E., Kapadia, S.R., Petal, U.R., Fuchs, V.U., Mauldin, S.C., Vitous, J., Behnke, M.L., Klunder, J.M., Pal, K., Skiles, J.W., McNeil, D.W., Rose, J.M., Chow, G.C., Skoog, M.T., Wu, J.C., Schmidt, G., Engel, W.W., Eberlein, W.G., Saboe, T.D., Campbell, S.J., Rosenthal, A.S. and Adams, J., *J. Med. Chem.*, 34 (1991) 2231.
38. Norman, M.H., Minick, D.J. and Martin, G.E., *J. Heterocyclic Chem.*, 30 (1993) 771.
39. Cheeseman, J.R., Trucks, G.W., Keith, T.A. and Frisch, M.J., *J. Chem. Phys.*, 104 (1996) 5497.
40. Vaara, J., Ruud, K., Vahtras, O., Ågren, H. and Jokisaari, J., *J. Chem. Phys.*, 109 (1998) 1212.

3. Hannongbua, S.*, Saen-oon, S., Pungpo, P., and Wolschann, P., Molecular Calculations on the Conformational Analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors 4,5,6,7-tetrahydroimidazo-8-chloro-5-methyl-(3-methyl-2-buthenyl)imidazo[4,5,1-jk][1,4]-benzo diazepine-2-(1H)-thione(8-chloro-TIBO), *Monatsch.Chemie.*, 132, 1157-1169 (2001).

Molecular Calculations on the Conformation of the HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor (+)-(S)-4,5,6,7-Tetrahydro-8-chloro-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl)-imidazo[4,5,1-*jk*][1,4]benzodiazepine-2(1*H*)-thione (8-Chloro-*TIBO*)

Supa Hannongbua^{1,*}, Suwipa Saen-oon¹, Pornpan Pungpo¹,
and Peter Wolschann²

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

² Institute of Theoretical Chemistry and Structural Biology, University of Vienna,
A-1090 Vienna, Austria

Summary. The conformational analysis of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor (+)-(S)-4,5,6,7-tetrahydro-8-chloro-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl)-imidazo[4,5,1-*jk*][1,4]benzodiazepine-2(1*H*)-thione (8-chloro-*TIBO*) was performed based on *ab initio* (HF/3-21G, HF/6-31G(d,p)) as well as on DFT (B3LYP/6-31G(d,p)) calculations. The potential energy surface of the molecule obtained by variation of the two rotatable dihedral angles of the side chain was investigated in detail, taking also into account the conformation of the seven-membered heterocyclic ring system. Several energy minima of comparable energy were found; they were compared to the conformation of the compound in the crystal structure of the inhibition complex with HIV-1 RT. The comparison of the calculated energy minimum conformations with the crystal structure and the determination of the distances between the molecule and the surrounding amino acids of the inhibition pocket shows that the conformation in the pocket is close to an energy minimum conformation and the deviations are caused by the interaction with the complementary protein surface.

Keywords. Conformational analysis; HIV-1 Reverse transcriptase inhibitors; 8-Chloro-*TIBO*; NNRTIs.

Introduction

The reverse transcriptase (RT) of the human immunodeficiency virus (HIV) [1–4] is a viral enzyme necessary for the catalytic formation of proviral DNA from viral RNA. This enzyme has been an active target for drug development for a number of years. Many inhibitors of HIV RT have been discovered, which can be divided into two categories [5]. The first group consists of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) [6] such as AZT, *ddl*, and *ddC*. These are competitive inhibitors

* Corresponding author. E-mail: fscisph@ku.ac.th

[7] which act as *DNA* chain terminators. The others are the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) [8–10], such as tetrahydroimidazo[4,5,1-*jk*] [1,4]benzodiazepin-2-(1*H*)-one (*TIBO*) [11–13], 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6*H*-dipyrido[3,2-*b*2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-one (nevirapine) [14], and 1-((2-hydroxyethoxy)-methyl)-6-(phenylthio)-thymine (*HEPT*) [15–16]. These are noncompetitive inhibitors and bind noncovalently at a site proximal to (~ 15 Å) but different from the site of the polymerase activity. Inhibitors of the latter class are particularly attractive drug candidates because their binding is highly specific to the reverse transcriptase of HIV-1; therefore, they lead to less adverse side effects. [17].

Although the various NNRTIs possess different chemical structures, it was found that they bind at the same binding site of the enzyme. Moreover, these compounds show a surprising shape similarity [18] as shown in Fig. 1.

Generally, the NNRTIs share a common butterfly-like shape consisting of at least two wings (more specifically: two π -electron containing moieties). In most cases, these π -systems are aromatic rings, but for *TIBO* derivatives one wing is a dimethylallyl side chain (Fig. 1). However, the analyses of resistance mutations and the corresponding biochemical data suggest that these inhibitors bind at the same position as other NNRTIs [19–21]. This fact is also strongly supported by the X-ray crystal structure analyses of NNRTIs-enzyme complexes. The structural flexibility of the *TIBO* analogues seems to be important for the association of the molecule into the binding pocket of the RT. Moreover, there exist several investigations concerning the binding mode of the inhibitors to the non-nucleoside inhibitor binding pocket (NNIBP), which determine the free energies of the association reaction for both wild-type and mutant-type of HIV-1 RT [22].

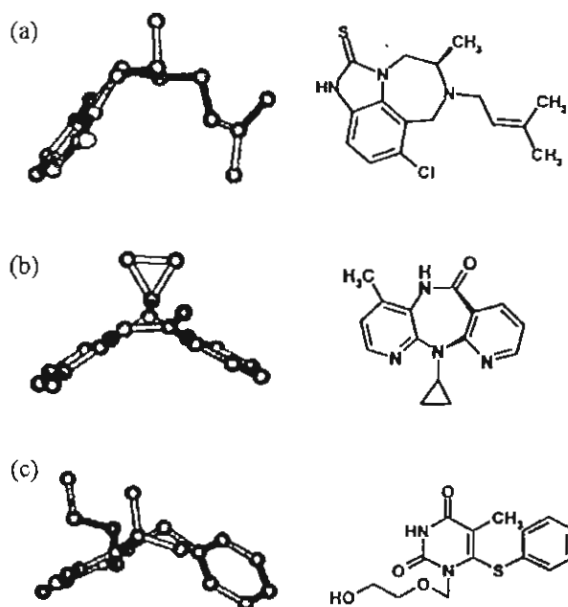


Fig. 1. Structures of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors *TIBO* (a), nevirapine (b), and *HEPT* (c)

Molecular Dynamics and Monte Carlo methods have been applied to provide some information for a better understanding of the biological activity of *TIBO* derivatives [22–23].

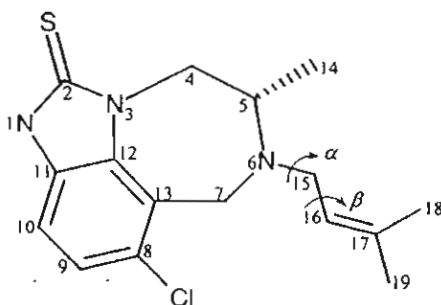
In this study the structure of 8-Cl-*TIBO*, one of the most potent HIV-1 RT inhibitors, was investigated based on quantum chemical calculations in order to obtain an accurate information about the conformational behaviour of this type of compounds. The side chain of 8-Cl-*TIBO* is rather flexible, and some degree of freedom exists also for the seven-membered heterocyclic ring system. The potential energy hypersurface of the molecule concerning the side chain was calculated by an *ab initio* method, taking also into account conformational changes of the ring system. Moreover, the local minima as well as the global one were determined using *ab initio* and DFT methods. The energy minimum conformations of 8-Cl-*TIBO* were compared with the geometry obtained from X-ray diffraction data of the molecule bound to the RT enzyme. An attempt was made to explain the conformation of 8-Cl-*TIBO* bound to the enzyme by comparison of its crystal structure in the complex with calculated low-energy structures and by consideration of the interaction of the inhibitor with the amino acids of the inhibition pocket.

Results and Discussion

The potential energy hypersurface

Due to the number of rotatable single bonds and the flexibility of *TIBO* structure with respect to the seven-membered heterocyclic ring, the complete energy hypersurface cannot be shown graphically. However, as the side chain is the most flexible part of the molecule, conformational changes of this substituent were investigated primarily.

In former calculations on the rotational barriers of the *TIBO* side chain [24], two energy minima along the rotation of the dihedral angle α (C5–N6–C15–C16; notation: see Scheme 1) were obtained together with a relatively high rotation potential barrier in between. This work was based on MNDO results, but the use of other semiempirical methods results in remarkably different energy minima, and also the potential energy barriers cannot be compared with each other. It seems that the conformations of *TIBO* depend on intramolecular interactions, which are difficult to estimate with sufficient accuracy by semiempirical methods. Therefore,



Scheme 1. Structure and notation of 8-Cl-*TIBO*

the energy hypersurface of the molecule was calculated using more accurate *ab initio* methods. As the molecule is quite large for the application of *ab initio* methods and the determination of an energy hypersurface requires a large number of geometry optimizations, the *Hartree-Fock* method was used at the 3-21G level.

The potential energy hypersurface of *TIBO* obtained for the side chain by varying the dihedral angles α and β is illustrated in Fig. 2.

As demonstrated in Fig. 2, there exist some regions of low energy and some pronounced potential barriers with relatively high energies due to steric interactions of the side chain with the ring system. This concerns mostly the dihedral angle β with values between $+90$ and -90° (270°). For β values between 90 and 270° the potential energy surface is more smooth within the complete range of the dihedral angle α . Two regions of lower energy can be observed for the dihedral angle α from 60 to 150° (β from 110 to 260°) and one between 190 and 340° for α and 90 and 260° for β . There is another low-energy region for α values between 180 and 220° corresponding to a range for β between 50 and 100° . The barriers between these regions of lower energy are not higher than 20 kJ/mol, which allows a sufficiently fast exchange between these conformations.

Influence of the side chain motion on the conformation of the heterocyclic ring

Evidently, there are more degrees of freedom for the conformation of 8-Cl-*TIBO*, determined by the structural diversity of the seven-membered ring system. As a complete conformational analysis of the heterocyclic ring system is rather difficult, only geometries of the calculated energy hypersurface were considered where the position of the methyl group is equatorial, which corresponds to the conformation of 8-Cl-*TIBO* in the association complex with the enzyme. In Fig. 3 the response of

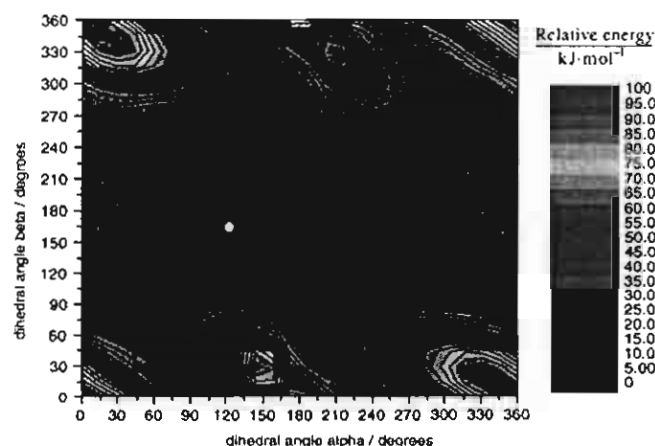


Fig. 2. Potential energy surface of 8-Cl-*TIBO* calculated at the *Hartree Fock* (3-21G basis set) level as a function of the variables α and β (C5-N6-C15-C16 and N6-C15-C16=C17 dihedral angles); energy values (kJ/mol) refer to differences with respect to the absolute minimum; the white spot represents the structure of 8-Cl-*TIBO* in the association complex with HIV-1 RT as determined by X-ray diffraction

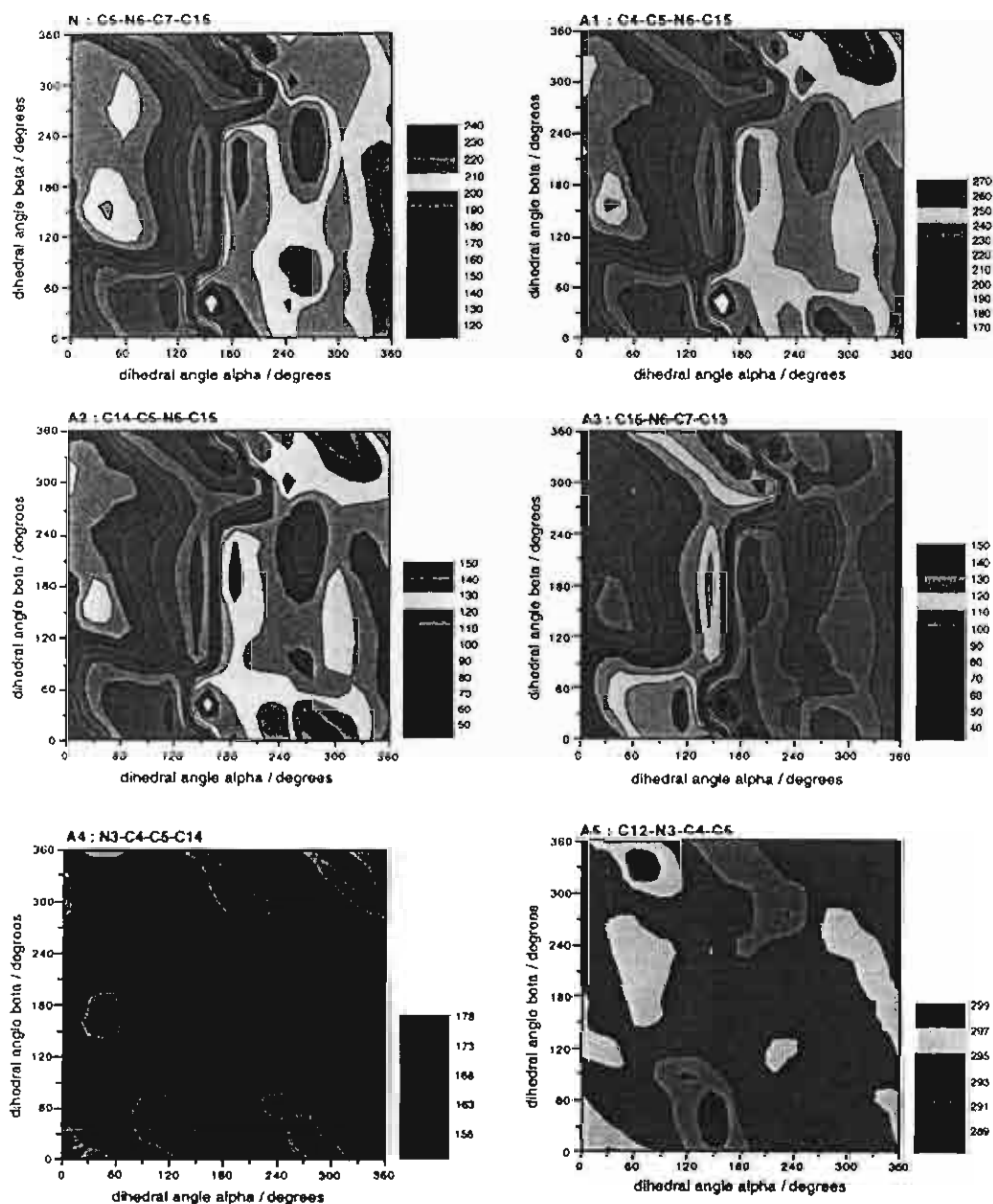


Fig. 3. Selected dihedral angle changes in the seven-membered ring as a function of α and β

the heterocyclic ring system on changes of the position of the side chain is shown, monitored by selected dihedral angles in the seven membered ring. In these diagrams, both axes correspond to rotation of the side chain (as in Fig. 2); however, instead of using the energy of the molecular conformations (Fig. 2), the isocontour lines indicate the monitor angle of the heterocyclic ring.

The dihedral angle A1 (C4-C5-N6-C15; see Scheme 1) monitors the motion inside the ring system, A2 (C14-C5-N6-C15) describes the relative position of the side chain and the methyl group. A3 (C15-N6-C7-C13) and A4 (N3-C4-C5-C14)

depict the position of the side chain and the methyl group relative to the aromatic ring system. $A5$ ($C12-N3-C4-C5$) tells about the conformation of the ring close to the methyl group. The dihedral angle N defined by $C5-N6-C7-C15$ does not describe a rotatable bond, but it is a measure for the conformation at the nitrogen atom. As can be seen from Fig. 3, there are significant differences concerning the conformation of the ring system for both low-energy regions of the potential energy hypersurface. The position of the methyl group remains the same as in the crystal structure, there is no inversion of the heterocyclic ring (the dihedral angle $A4$ varies only for about 20°). Since three atoms ($N3$, $C12$, $C13$) of the diazepine moiety (seven membered ring) are part of the planar benzoimidazole system, the conformational flexibility of the ring is determined by the remaining four saturated atoms ($C4$, $C5$, $N6$, $C7$). As there is no change of the equatorial methyl group position, the nitrogen inversion of atom $N6$ leads to the predominant conformational change of the *TIBO* structure with respect to the orientation of the dimethylallyl side chain. This nitrogen inversion is confirmed by considering the structure along the conformational change of the dihedral angles N , $A1$, $A2$, and $A3$ in Fig. 3 (these dihedral angles vary for more than 100°).

The geometries of two characteristic grid points of the hypersurface are superimposed in Fig. 4. The first geometry, which is drawn in light gray, depicts a geometry with $\alpha = 150^\circ$ ($\beta = 180^\circ$); the other structure results from the angle $\alpha = 210^\circ$ ($\beta = 180^\circ$) and is drawn in black. The superposition of both geometries clearly shows the importance of the nitrogen inversion on the conformational changes of 8-Cl-*TIBO*. To avoid steric interactions of the side chain with the aromatic ring systems, this inversion keeps the side chain in almost the same distance during the rotation of both dihedral angles.

For the low-energy regions, the exact positions of the energy minima have been determined by energy minimization starting from the nearest grid points. This procedure was also performed with an *ab initio* method with higher basis set (HF/6-31G(d,p)) and a density functional theory method (B3LYP/6-31G(d,p)). The results are given in Table 1.

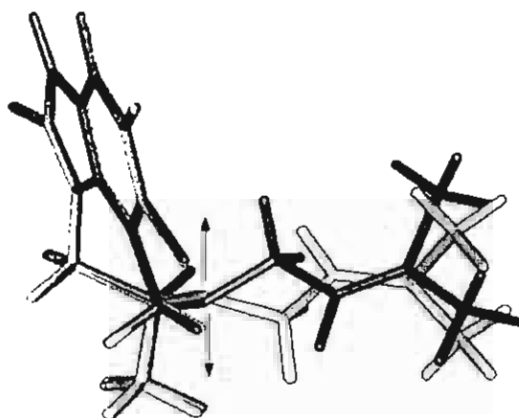


Fig. 4. Influence of the nitrogen inversion on the conformational change of 8-Cl-*TIBO*; both structures are at the same grid point of $\beta = 180^\circ$ and different values of α (150° and 210°) as drawn in light gray and black color, respectively

Table 1. Comparison of some selected dihedral angles of structures at local minima obtained by various methods of calculation

Dihedral angle/°								Relative energy
α^a	β^b	N^c	$A1^d$	$A2^e$	$A3^f$	$A4^g$	$A5^h$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
HF/3-21G								
68.4	235.8	198.8	219.6	97.2	81.5	178.9	296.5	4.72
84.0	133.1	198.3	221.7	99.3	81.4	177.7	296.1	7.59
147.6	129.9	152.6	193.1	70.6	116.0	170.2	293.8	7.51
194.9	69.4	214.9	246.5	124.0	61.2	172.3	294.3	5.54
220.4	229.5	207.0	238.9	116.3	69.0	173.3	294.3	0.00
297.7	129.7	213.4	246.6	124.1	61.7	171.2	294.6	0.54
307.2	292.7	214.6	246.5	124.1	61.3	172.2	194.7	5.45
HF/6-31G(d,p)								
70.6	242.9	203.6	223.6	99.7	79.7	180.4	294.6	8.04
80.6	130.6	202.6	225.0	101.1	80.3	179.2	293.2	9.32
151.3	129.1	141.3	186.1	61.9	127.6	169.4	291.5	4.06
193.3	79.8	217.8	249.5	125.3	60.5	173.0	292.2	7.79
208.1	228.6	215.0	247.1	122.8	63.5	173.5	291.8	1.95
293.1	127.3	217.0	249.6	125.5	60.9	172.9	292.4	0.00
302.2	286.7	217.3	248.6	124.5	61.2	173.8	292.7	7.28
B3LYP/6-31G(d,p)								
68.7	242.5	210.1	218.3	94.6	78.9	185.8	299.1	5.94
79.4	129.7	208.7	220.4	96.6	79.4	184.3	297.0	8.53
155.2	129.1	139.3	184.9	60.8	129.9	168.4	292.1	4.36
193.5	77.7	219.7	252.5	128.4	58.8	171.5	293.4	7.00
207.8	230.5	216.6	249.8	125.6	61.9	172.2	292.9	1.21
295.5	128.2	218.8	252.0	128.1	59.2	171.5	293.7	0.00
304.6	289.1	219.3	252.2	128.3	59.1	171.8	293.6	6.87
X-Ray structure of 8-Cl-TIBO/HIV-1 RT								
121.8	164.4	152.1	191.4	81.5	116.8	144.9	307.0	

^a α : C5-N6-C15-C16; ^b β : N6-C15-C16=C17; ^c N : C5-N6-C7-C15; ^d $A1$: C4-C5-N6-C15; ^e $A2$: C14-C5-N6-C15; ^f $A3$: C15-N6-C7-C13; ^g $A4$: N3-C4-C5-C14; ^h $A5$: C12-N3-C4-C5

All obtained optimized structures were confirmed as local minimum structures by vibrational frequency calculations. The number of minima is equal for all methods used, and also their positions are comparable throughout. With HF/3-21G another global minimum was calculated than for the other methods, but the energy differences between them are not significant. Generally, the energy differences between the minima are rather small, as a consequence of the high flexibility of the molecule.

The HF/6-31G(d,p) and B3LYP/6-31G(d,p) calculations give the same global energy minimum conformation with dihedral angles α and β between 293–295 and 127–128°. In addition, there exist other significant minimum structures (Table 1, Fig. 2).

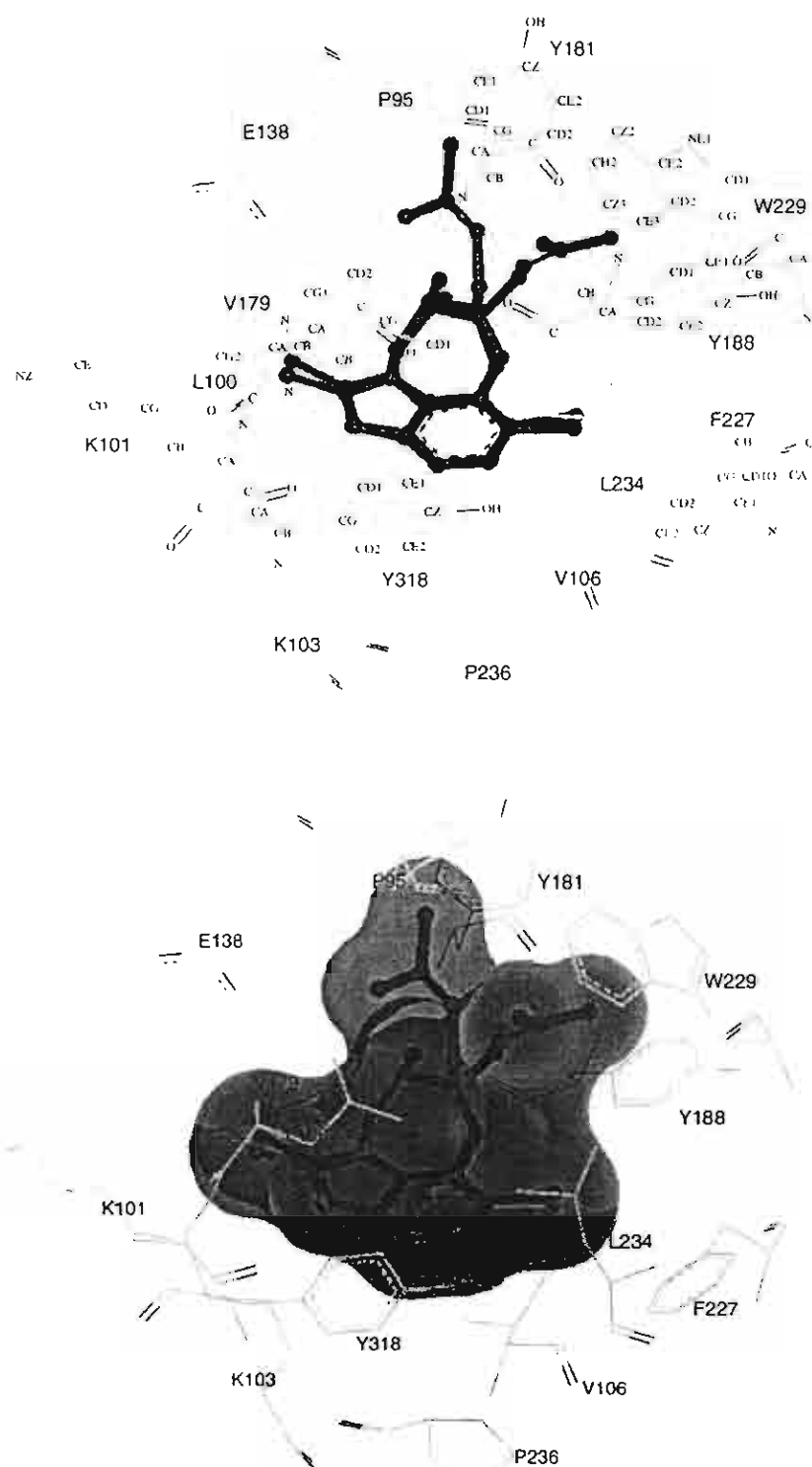


Fig. 5. Superposition between the calculated and the experimental structure in the association complex of HIV-1 RT (shown in red and green)

Comparison between calculated and experimental geometries of 8-Cl-TIBO

The geometry of 8-Cl-TIBO in the association complex with HIV-1 RT appears to be similar to that of the third minimum given in Table 1; it is marked by a white circle in Fig. 2. This conformation is located at a low conformational energy region, but there are deviations of the molecular parameters compared to the calculated energy minimum structures. A comparison between the closest local energy minimum conformation calculated by various methods and the geometry obtained by X-ray diffraction is given in Table 2.

The differences in the calculated bond distances for the various methods are smaller than 0.025 Å except for the hetero atoms sulfur and chlorine where differences around 0.06 Å are observed. The deviations of the crystal structure with regard to the bond distances are not larger than 0.055 Å; the carbon–chlorine bond length appears to be shorter than calculated (0.08 Å). The differences for the valence angles are not larger than 1.5° within the various methods of calculation (except for two angles in the seven-membered ring). The experimentally determined angles differ to a higher extent from the calculated ones, particularly for the angles at the aliphatic nitrogen atom (N6). For the dihedral angles the differences of the values obtained from the calculations are somewhat larger (below 4.7°, except for α (7.5°) and C14–C5–N6–C15 (9.4°)). The differences to the experimental structure are mostly smaller than 11.6°, except for two different effects. The first concerns the rotation of the side chain, where differences of 33.3° and 35.3° are observed for α and β , and the second the dihedral angles describing the position of the methyl substituent (20.5° and 25.3°). These deviations from the calculated values are a consequence of the interaction of the compound with the surrounding amino acids of the inhibition pocket. A superposition of the X-ray structure and the calculated geometry (B3LYP/6-31G(d,p)) is given in Fig. 5.

From Fig. 5 it can be clearly seen that the position of the side chain differs significantly for the experimental and the calculated structure. The amino acids of the inhibition pocket are also given to visualize the interaction of the inhibitor with the complementary surface of the protein. In Table 3, distances below 4 Å of atoms of 8-Cl-TIBO with atoms of the amino acids are taken from the X-ray investigation.

The deviation of the side chain from the energetically favourable position obtained by the molecular calculation results from the much better *van der Waals*

Table 2. Structural parameters of 8-Cl-TIBO calculated by different methods together with those obtained by X-ray diffraction data (bond lengths in Å, bond angles and dihedral angles in degrees); for labels, see Scheme 1

Structural parameters	X-Ray	<i>Hartree-Fock</i>		DFT
		3-21G	6-31G(d,p)	B3LYP/6-31G(d,p)
Bond length				
N1–C2	1.429	1.356	1.351	1.379
C2–N3	1.396	1.354	1.353	1.383
N1–C11	1.434	1.391	1.383	1.388
C11–C12	1.338	1.383	1.381	1.402

(continued)

Table 3. Comparison of the interatomic distances between atoms of 8-Cl-*TIBO* and amino acid residues in the NNIBP of HIV-1 RT

Amino acid residues	Interatomic distance/Å		Amino acid residues	Interatomic distance/Å	
	X-Ray	Calc. minimum		X-Ray	Calc. minimum
<i>Tyr188</i>			<i>Trp229</i>		
C15-CB	3.4	5.0	C19-NE1	3.7	7.9
C15-CG	3.6	5.2	C19-CD1	3.8	8.6
C15-CD2	3.5	4.8	C19-CG	3.8	8.4
C19-CZ	3.7	9.1	C19-CE2	3.7	7.0
C19-CE2	3.4	8.3	C19-CD2	3.7	7.4
C19-CE1	4.0	9.3	C18-CE2	3.8	6.1
C19-CD2	3.5	7.7	C18-CD2	3.7	6.9
C19-CG	3.8	8.0	C18-CZ2	3.7	5.4
C14-CB	3.9	4.1	C18-CE3	3.4	7.0
C14-O	3.1	3.2	C18-CH2	3.3	5.6
C1-CD2	3.5	3.8	C18-CZ3	3.2	6.4
C1-CE2	3.8	4.0	<i>Leu100</i>		
<i>Tyr181</i>			N1-CB	3.4	3.4
C15-CG	3.8	4.5	N1-CD1	4.0	3.9
C15-CB	3.5	4.4	C11-CB	3.9	3.8
C15-CD2	3.9	4.8	C11-CD1	3.7	3.6
C14-CB	3.4	3.0	C10-CD1	3.7	3.7
C14-N	3.5	3.2	<i>Lys101</i>		
<i>Val179</i>			N1-N	3.6	3.7
C14-CG1	3.8	3.6	N1-O	2.6	2.7
C14-CB	4.1	4.5	N1-C	3.8	3.9
C14-O	3.8	4.0	C11-O	3.6	3.7
C4-CG1	3.5	3.5	C2-O	3.7	3.6
C4-CB	4.0	4.0	<i>Tyr318</i>		
S-CG1	3.8	4.0	C10-CZ	3.7	3.7
<i>Phe227</i>			C10-OH	3.6	3.6
C1-CD2	3.7	3.6	C9-OH	3.6	3.6

interaction with the amino acids *Tyr188* and *Trp229* in the complex, which overcompensates the energy necessary for the conformational change. For the other amino acids of the cavity the *van der Waals* contacts between the calculated structure and the real compound are more or less the same. A good agreement of the molecular surface and the complementary protein surface is also demonstrated in Table 3 and Fig. 5.

Conclusions

The conformational analysis of 8-Cl-*TIBO* based on quantum chemical calculations shows that the geometry of the compound is mainly determined by the rigid aromatic ring system and the position of the side chain. As this side chain is rather

flexible, the energy hypersurface gives some insight into the conformational possibilities, the range of flexibility, and the consequences thereof on the seven membered ring system to which the side chain is attached. The experimentally determined geometry of the inhibitor in the complex with HIV-1 RT compared with the calculated conformations shows that the interaction with the moiety in the cavity influences the conformation, but the energy barrier between the energy minima and the geometry in the complex is rather low and is compensated by the enhanced *van der Waals* interaction.

Methods

The starting geometry of 8-Cl-*TIBO* was obtained from X-ray crystallographic data of the HIV-1 RT/8-Cl-*TIBO* complex [18], available from the Brookhaven Protein Data Bank (1hny) [25]. The potential energy surface of the side chain of the molecule was calculated by the minimization of the geometries at fixed dihedral angles α (C5–N6–C15–C16; notation see Scheme 1) and β (N6–C15–C16=C17), which were varied with a step size of 30°, each from 0 to 360°.

Fully optimized structures of the global minimum and the local minima were obtained starting from grid points of similar geometry using *ab initio* methods (HF/3-21G, HF/6-31G(d,p)) as well as one DFT method (B3LYP/6-31G(d,p)).

The results of the calculations were compared to the experimental data, *i.e.* the X-ray crystal structure of 8-Cl-*TIBO* in the association complex with HIV-1 reverse transcriptase. All calculations were run by the GAUSSIAN 98 program package [26] on an IBM/SP2 machine and a cluster of Digital Alpha Servers (2100 4/275) at the University of Vienna.

For the consideration of the interaction of the inhibitor with the amino acids of the inhibition pocket, various low energy conformations were superimposed with the experimental structure, and the distances of all atoms of the molecule to the atoms of the amino acids of the pocket surface were estimated.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Golden Jubilee Ph.D. Program (3.C.KU/42/B.1 and 3.C.KU/41/B.1), the National Research Council of Thailand under the Austria-Thailand Cooperative Science Program (NRCT-FWF) and the Austrian *Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung* (Project 12257-CHE). S. Hannongbua is grateful to the Thailand Research Fund and KURDI for a research fellowship (RSA4480001). This research was partly sponsored by the Development Cooperation of the Republic of Austria within the Scholarship Program 894/00, *Nord-Süd-Dialog-Stipendienprogramm* 2000/01. The authors wish to thank Prof. Alfred Karpfen for helpful discussions and critical comments. The high performance computing centers of Kasetsart University, the National Electronics and Computer Technology (HPCC/NECTEC), and the computer center of the University of Vienna are also gratefully acknowledged for the generous allocation of computer resources.

References

- [1] Jacobo-Malina A, Arnold E (1991) *Biochemistry* 30: 6351
- [2] De Clercq E (1995) *Clin Microbiol Rev* 8: 200
- [3] De Clercq E (1995) *J Med Chem* 38: 2491
- [4] Arnold E, Das K, Yadav PNS, Hsiou Y, Boyer PL, Hughes SH (1996) *Drug Des Discov* 13: 29
- [5] Larder BA (1993) In: Skalka AM, Goff SF (eds) *Highlights in Reverse Transcriptase*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p 205

4. Pungpo, P., Hannongbua, S.* and Wolschann, P., Hologram Quantitative Structure-Activity Relationships Investigations of Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, *Curr.Med.Chem.* 2003, 10, 1661-1677.

SS-1061

ISSN 0929-8673

VOLUME 10
NUMBER 17

Impact Factor
5.8
Rated No.1 in
Medicinal
Chemistry

Current Medicinal Chemistry



*The
International
Journal for
Timely
In-Depth
Reviews in
Medicinal
Chemistry*

BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS

Hologram Quantitative Structure-Activity Relationships Investigations of Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

Pornpan Pungpo^{1,2}, Supa Hannongbua^{2*} and Peter Wolschann³

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

³Institute for Theoretical Chemistry and Structural Biology, University of Vienna, Waehringer Str. 17, A-1090, Vienna, Austria



Abstract: Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) such as TIBO, HEPT and dipyrindodiazepinone are effective against HIV-1 RT. These NNRTIs are chemically and structurally diverse, but they all bind to a common allosteric site of HIV-1 RT. These inhibitors exhibit high potency, low cytotoxicity and produce few side effects. However, the emergency of drug-resistance viral strain has limited the therapeutic efficiency of the NNRTIs. Several different QSAR studies were reported to identify important structural features responsible for the inhibitory activity of these NNRTIs. In this study, hologram quantitative structure-activity relationships (HQSAR) was applied to three different data sets, 70 TIBO, 101 HEPT and 125 dipyrindodiazepinone derivatives. Starting geometries of compounds were taken from available X-ray crystallographic data. Modification and full geometry optimization of all derivatives were performed, based on quantum chemical calculations at the HF/3-21G level of theory. All derived HQSAR models produce satisfying predictive ability and yield r^2_{cv} values ranging from 0.62-0.84. Moreover, it was also found that the quality of models enhances as the size of fragments increases. The obtained HQSAR results indicate the similarity of the interactions of these three different NNRTIs with the inhibition pocket of the enzyme. Comparisons of different QSAR methods on these NNRTIs data sets were also considered and it could be shown that HQSAR results yield superior predictive models than other 2D-QSAR approaches. In particular, the predictive ability of the models derived from dipyrindodiazepinone analogues was significantly improved and apparently revealed differentiating structural requirements between WT and Y181C HIV RT inhibition. Additionally, the quality of QSAR models constructed by CoMFA and HQSAR methods are comparable and the interpretations of the models reinforce each other. It suggests an advantage of HQSAR as a useful tool in designing new potent inhibitors with enhanced HIV-1 RT inhibition activity, especially against mutant enzyme.

Key words : HQSAR, HIV-1 reverse transcriptase inhibitors, TIBO, HEPT, dipyrindodiazepinone, quantum chemical calculations, mutant enzyme, PLS.

INTRODUCTION

Hologram QSAR (HQSAR) is a novel QSAR method, which relates biological activities with structural molecular compositions, described in terms of substructural fragments [1]. This method removes problems associated with 3D-QSAR approaches, that is the need for determination of 3D-structure, putative binding conformation and molecular alignment. In addition, the selection and determination of the physicochemical descriptors needed by classical QSAR are also disregarded. Only 2D-structures and biological activities are required as input information. In this method, a chemical structure is converted to a characteristic molecular fingerprint, which is then transferred in binary form to an integer array of fixed length to build up a molecular hologram. The bin occupancies of the molecular holograms are structural descriptors encoding compositional and topological molecular information. The corresponding

HQSAR models can be obtained more rapidly than other techniques and has been successfully applied to different classes of compounds [2-5].

Reverse transcriptase (RT) is the essential enzyme of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) for the replication of the single-stranded viral RNA genome into double-stranded DNA. The enzyme has thus been a crucial target for AIDS treatment. Tetrahydroimidazo [4,5,1-jk][1,4, benzodiazepinone or TIBO [6], 1-[(2-Hydroxyethoxy methyl)-6-(phenylthio)thymine or HEPT [7] and 11-Cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one or nevirapine [8] are effective non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). Their general structures are depicted in Figs. (1)-(3), respectively. These NNRTIs are chemically and structurally diverse, but they all bind at a common site in HIV-1 RT. They exhibit high potency, low cytotoxicity and produce few side effects. In particular, nevirapine is now currently on the market as AIDS drug (Viramune®) [9]. However, the emergency of drug-resistance viral strain has limited the therapeutic efficiency of non-nucleoside inhibitors [10-11]. The mutation of residue 181 from tyrosine to cysteine (Y181C

*Address correspondence to this author at the Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand; E-mail: fscisph@ku.ac.th

is associated with resistance to nevirapine [12] and to some other nonnucleoside inhibitors [13].

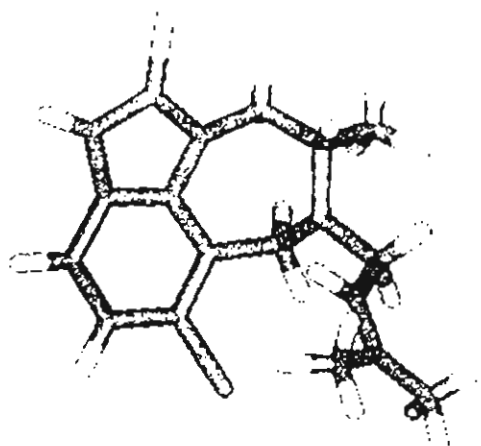


Fig. (1). Structure of tetrahydroimidazo [4,5,1-jk][1,4] benzodiazepinone (TIBO).

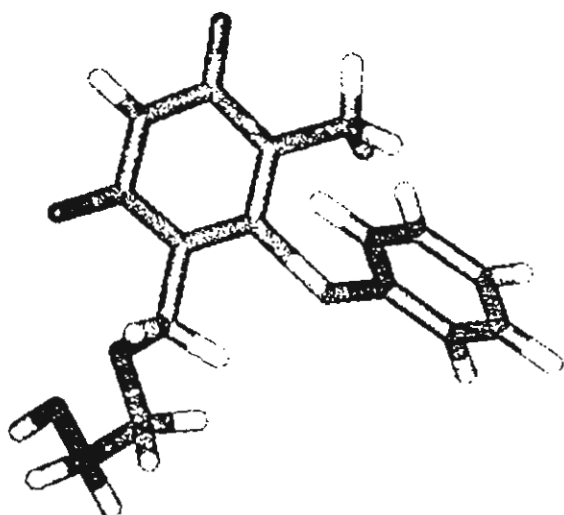


Fig. (2). Structure of 1-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT).

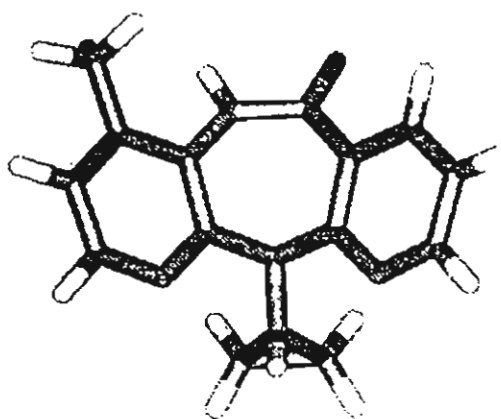


Fig. (3). Structure of 11-Cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-c][1,4]diazepin-6-one or nevirapine.

A number of QSAR studies were reported to identify important structural features responsible for the inhibition of these classes of compounds [14-21]. Recently, we have performed 2D-QSAR of the three mentioned classes of NNRTI, using various molecular properties of the inhibitors obtained from quantum chemical calculations by means of linear regression analysis [22-23]. With TIBO and HEPT derivatives, the obtained QSAR models are satisfying in both statistical significance and predictive ability, and they provide helpful information for the explanation of structural requirements of particular compounds to deal with biological activities. In contrary for dipyriddiazepinone analogues the use of similar structural descriptors seems to be not sufficient to set up a proper QSAR model, as indicated by unsatisfied predictive ability value (unpublished results). For this class of compounds, an attempt to create a prediction model has been made using steric descriptors such as connectivity [24] and topological indices [25-26]. Actually, the obtained models show improved predictive ability [28]. Moreover, an artificial neural network (ANN) was applied to develop non-linear QSAR models of dipyriddiazepinone analogues [29]. The results reveal satisfying models for the activity against both WT and Y181C HIV-1 RT. An additional 3D-QSAR study, based on comparative molecular field analysis (CoMFA), was also performed on these data sets [23, 29-32]. The results are successful in establishing the relationships between steric and electrostatic fields encoding detailed information about intermolecular interactions between the inhibitors and the binding site of the protein.

In the present study, the HQSAR approach has been applied to determine the applicability of this method and to obtain additional information about common structural requirements of three different classes of HIV-1 RT inhibitors: TIBO, HEPT and dipyriddiazepinone compounds. The comparison with results obtained from other QSAR methods for these NNRTIs indicates the advantage and applicability of HQSAR as a novel useful tool in drug design.

METHODS OF CALCULATIONS

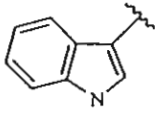
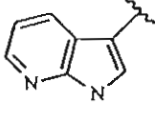
Biological Data

Three different data sets of HIV-1 RT inhibitors: TIBO, HEPT and dipyriddiazepinone derivatives, were employed to develop QSAR models. The chemical structures and their inhibitory activities against WT HIV-1 RT of 46 TIBO and 82 HEPT compounds were obtained from references 23 and 30, respectively. Unlike the other two data sets, 91 dipyriddiazepinone derivatives were reported for two different biological activities against WT HIV-1 RT and Y181C HIV-1 RT as listed in Table 1, taken from references [33-37]. The compounds mentioned above were used as training sets for the HQSAR studies of the three classes of NNRTIs. To evaluate the predictive ability of the resulting models, 24 TIBO, 19 HEPT and 34 dipyriddiazepinone compounds were used as test set. They are listed in Tables 2-4, respectively. The potency of the compounds is defined as $\log(1/C)$, where C is the effective inhibitory concentration required to achieve 50% protection of MT-4 cell against the cytopathic effect of HIV-1.

Table I. Structure of 91 Dipyrrodiadiazepinone Derivatives and Experimental Biological Activities Against Both WT RT and Y181C RT

Compd. no.	R1	R2	R3	R4	R5	Expt. log (1/C)	
						WT RT	Y181C RT
1	H	CH ₃	H	H	C ₃ H ₅	7.10	5.58
2	H	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	7.40	5.74
3	H	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.89	5.66
4	CH ₃	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	7.70	6.00
5	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	6.92	5.92
6	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	6.00	6.00
7	C(CH ₃) ₃	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	6.00	6.00
8	C=CHCOOCH ₃	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.74	6.17
9	C=CHCONH ₂	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.60	5.62
10	F	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	7.70	6.07
11	Cl	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	7.70	6.11
12	Cl	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	8.00	6.10
13	Cl	H	CH ₃	H	C ₃ H ₅	7.04	6.04
14	NH ₂	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.00	6.00
15	NHCH ₃	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.72	6.15
16	NH C ₂ H ₅	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.64	5.89
17	NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	7.04	6.00
18	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.15	6.11
19	N(CH ₃)CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	8.00	6.00
20	N-3,4-didehydropyrrolidinyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.52	6.19
21	N-piperidinyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.52	6.00
22	N-morpholinyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.40	6.00
23	N-thiomorpholinyl	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	6.82	6.00
24	N-pyrrolyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.04	6.68
25	OH	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.33	6.00
26	OCH ₃	H	CH ₃	H	C ₃ H ₅	6.92	5.96
27	SCH ₃	CH ₃	H	H	C ₂ H ₅	7.70	6.00
28	2-furanyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.96	6.80
29	3-furanyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.40	6.96
30	3-pyrrolyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.52	7.40
31	3-pyrrolyl	H	CH ₃	H	C ₃ H ₅	7.30	7.22
32	5-imidazolyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.89	6.72
33	4-pyrazolyl	H	CH ₃	H	C ₃ H ₅	7.22	7.30
34	phenyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.64	5.85

(Table I). contd.....

Compd. no.	R1	R2	R3	R4	R5	Expt. log (I/C)	
						WT RT	Y181C RT
35	3-OCH ₃ -phenyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.82	6.68
36	4-OCH ₃ -phenyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	5.85	5.49
37	2-pyridyl	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.74	5.80
38	3-pyridyl	H	CH ₃	H	C ₃ H ₅	6.74	6.36
39	3-(6-OCH ₃ -pyridyl)	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	5.92	5.52
40	3-(6-OH-pyridyl)	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	5.96	6.00
41	H	CH ₂ NHPh	H	H	C ₃ H ₅	7.22	5.86
42	H	CH ₂ O(Ph-p-NH ₂)	H	H	C ₃ H ₅	7.00	6.00
43	H	CH ₂ O(Ph-p-NHEt)	H	H	C ₃ H ₅	7.10	6.37
44	OH	CH ₂ OCH ₂ Ph	H	H	C ₂ H ₅	6.96	5.97
45		H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	7.55	7.55
46		H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	6.68	6.70
47	H	H	CH ₃	CH ₂ OH	C ₂ H ₅	7.30	6.13
48	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ OH	C ₂ H ₅	6.37	5.60
49	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ CN	C ₂ H ₅	6.68	5.67
50	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ CONH ₂	C ₂ H ₅	6.21	5.21
51	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ Ph	C ₂ H ₅	7.30	6.89
52	H	H	CH ₃	CH ₂ Ph	C ₂ H ₅	6.92	5.92
53	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₃ Ph	C ₂ H ₅	6.92	5.93
54	H	H	CH ₃	cis-CH=CHPh	C ₂ H ₅	6.60	6.24
55	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ (4-pyridyl)	C ₂ H ₅	7.52	6.96
56	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ (3-pyridyl)	C ₂ H ₅	6.89	6.49
57	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ (2-pyridyl)	C ₂ H ₅	6.72	6.00
58	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ (5-pyrimidyl)	C ₂ H ₅	6.27	6.00
59	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ (4-tolyl)	C ₂ H ₅	7.00	6.60
60	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ (3-tolyl)	C ₂ H ₅	6.96	6.55
61	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ (4-(2-picolyl))	C ₂ H ₅	7.52	7.04
62	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ (4-aniliny)	C ₂ H ₅	7.22	6.70
63	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ (2-aniliny)	C ₂ H ₅	7.10	5.77
64	H	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ (3-fluorophenyl)	C ₂ H ₅	6.92	6.43