



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของ
โมเลกุลตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ในกลุ่มของสารอนุพันธ์
อีฟาวิเรนซ์ บนพื้นฐานของการจำลองโครงสร้างโดยคอมพิวเตอร์

โดย

ดร. พรพรรณ พึ่งโพธิ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

30 มิถุนายน 2547

สัญญาเลขที่ TRF4580072

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของโมเลกุล
ตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ในกลุ่มของสารอนุพันธ์อูฟาวิเรนซ์บนพื้น
ฐานของการจำลองโครงสร้างโดยคอมพิวเตอร์

ดร. พรพรรณ พึ่งโพธิ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สามารถดำเนินการได้ด้วยดี ด้วยความเอื้อเฟื้อและช่วยเหลือจากหน่วยงานต่างๆ และผู้ร่วมงานทุกท่าน ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การ สนับสนุน ทุนวิจัยภายใต้โครงการส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ปี 2545 (TRG4580072) และขอขอบคุณ ผศ. ดร.สุภา หารหนองบัว ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ นักวิจัยพี่เลี้ยงที่ให้การสนับสนุนความร่วมมือทางวิชาการ การวิจัย คำปรึกษาและคำแนะนำ ภายใต้โครงการนี้ตลอดมาเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ Prof. Dr. Peter Wolschann มหาวิทยาลัยเวียนนา ประเทศออสเตรีย ที่ได้ให้คำปรึกษาและสนับสนุนด้านต่างๆสำหรับการวิจัยโครงการนี้ตลอดมา

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.อุบลราชธานี ที่ได้ให้การสนับสนุนในด้านอุปกรณ์ การคำนวณทางคอมพิวเตอร์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ ห้องคอมพิวเตอร์สมรรถภาพสูง สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (HPC-NECTEC) ศูนย์คอมพิวเตอร์ มหาวิทยาลัยเวียนนา ที่ได้เอื้อเฟื้อการคำนวณบนเครื่องคลัสเตอร์คอมพิวเตอร์และการใช้โปรแกรม SYBYL

Abstract

Project Code : TRG4580072

Project Title : An Analysis of Structure-activity Relationships of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor in the Class of Efavirenz Derivatives, Based on Computer Aided Molecular Design

Investigator : Dr.Pornpan Pungpo Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani

E-mail Address : pornpan@sci.ubu.ac.th, pornpan_ubu@yahoo.com

Project Period : 1 July 2002 – 30 June 2004

Quantitative Structure-activity Relationship (QSAR) approaches have been applied to investigate the structural requirements of HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibitory activity of efavirenz derivatives active against wild type (WT) and mutant type (K103N) by mean of hologram quantitative structure-activity relationships (HQSAR), comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative similarity index analysis (CoMSIA). All derived models produce satisfactory predictivity and the quality of QSAR models constructed using all techniques are comparable. CoMFA model reveals the importance of steric and electrostatic interactions through contour maps. The resulting CoMSIA models enhance the understanding of steric, electrostatic, hydrophobic, electron donor and acceptor requirements for ligands binding to HIV-1 RT. The graphical results of HQSAR analysis display the key features contributing to inhibitory activities of compounds. The information obtained from HQSAR, CoMFA and CoMSIA models apparently reveals differentiating structural requirements between WT and K103N HIV-1 RT inhibition of these inhibitors. The suggestions obtained from the models not only highlight different characteristics for different types of wild type and mutant type HIV-1 RT, but also show good accordance with inhibitor-receptor complex derived by experimental data. Consequently, the results provide a beneficial guideline to design and predict novel compounds with enhanced WT and mutant HIV-1 RT inhibitory activities.

Keywords: QSAR, HQSAR, CoMFA, CoMSIA, HIV-1 RT inhibitors, Efavirenz

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4580072

ชื่อโครงการ : การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของโมเลกุลตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ในกลุ่มของสารอนุพันธ์ อีฟาเวเรนซ์ บนพื้นฐานของการจำลองโครงสร้างโดยคอมพิวเตอร์

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ดร. พรพรรณ พึ่งโพธิ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ต.ศรีโค อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

E-mail Address : pornpan@sci.ubu.ac.th, pornpan_ubu@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2545 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2547

ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของกลุ่มสารอนุพันธ์อีฟา-เวเรนซ์ ที่แสดงกัมมันตภาพยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิม (WT) และชนิดกลายพันธุ์ (K103N) โดยใช้วิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพแบบไฮโลแกรม การวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามโมเลกุลและการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล ผลการศึกษาพบว่าแบบจำลองที่ได้จากการศึกษาทุกวิธีมีความสามารถในการทำนายเป็นที่น่าสนใจและคุณภาพของแบบจำลองที่ได้จากทุกวิธีมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากแบบจำลองวิธีวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามโมเลกุลชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของอันตรกิริยาสเตอริกของโมเลกุลที่มีต่อกัมมันตภาพ และผลจากแบบจำลองของการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุลให้ข้อมูลที่เพิ่มความเข้าใจในความต้องการทางสนามสเตอริก อีเล็กโตรสแตติกและไฮโดรโฟบิก รวมถึงอิทธิพลของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของโมเลกุลที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่ใช้ในการจับกับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ขณะที่ผลของการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพแบบไฮโลแกรมแสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบสำคัญของโมเลกุลที่มีผลต่อกัมมันตภาพในการยับยั้ง โดยข้อมูลที่ได้จากทุกแบบจำลองชี้ให้เห็นอย่างเด่นชัดถึงความแตกต่างของโครงสร้างที่สำคัญของตัวยับยั้งที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบที่แตกต่างกัน นอกจากนี้แล้วผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทุกวิธีสอดคล้องกันทั้งยังสอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลองด้านการจับกันระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ในการออกแบบสารยับยั้งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ทั้งชนิดดั้งเดิม (WT) และชนิดกลายพันธุ์ (K103N)

คำหลัก: QSAR, HQSAR, CoMFA, CoMSIA, HIV-1 RT inhibitors, Efavirenz

สารบัญ

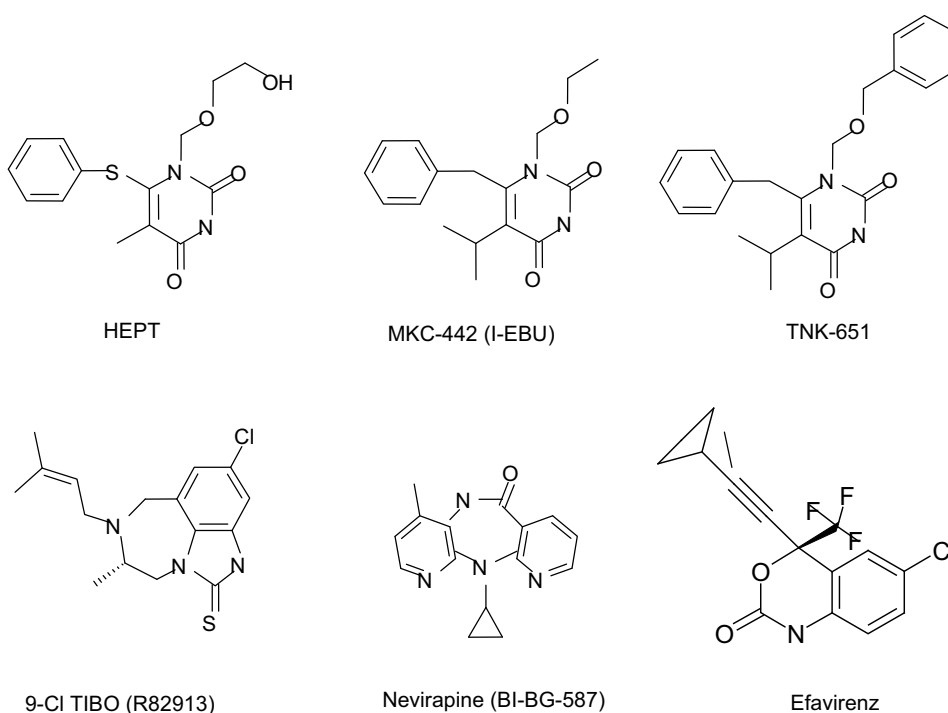
เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
ระเบียบและวิธีวิจัย	7
ผลการศึกษา	12
สรุปและวิจารณ์	41
เอกสารอ้างอิง	43
ผลงานวิจัย	46
ภาคผนวก	49

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของหัวข้อการวิจัย

ปัญหาโรคเอดส์ (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (Human immunodeficiency virus, HIV) ในวงจรชีวิตของไวรัส HIV มีเอนไซม์หลายชนิดที่สำคัญในการดำรงชีวิต เอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 (HIV-1 Reverse Transcriptase, HIV-1 RT) เป็นเอนไซม์สำคัญที่ช่วยในการจำลองแบบ (replication) ในขั้นตอนการรวม viral RNA genome เข้าไปใน proviral DNA ก่อนที่จะเข้าไปใน host genome จึงทำให้เอนไซม์ RT เป็นเป้าหมายสำคัญในการใช้ยารักษาเพื่อต้านโรคเอดส์ การรักษาในปัจจุบันสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้โดยใช้สารยับยั้งในกลุ่ม 2',3'dideoxy - nucleoside เช่น 3'-azido-2',3'-dideoxy thymidine (AZT) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเอดส์และผู้ที่ติดเชื้อเอดส์ อย่างไรก็ตามพบว่าตัวยานี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเอดส์ได้ในระดับหนึ่ง เนื่องจากในปัจจุบันพบว่าไวรัสเอชไอวี-1 เริ่มมีฤทธิ์ต้านทาน (resistance) ต่อยา AZT อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์ได้คิดค้นสังเคราะห์ยาจำนวนมากหลายชนิดที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจาก AZT ในจำนวนนี้พบว่าสารประกอบในกลุ่ม nonnucleoside reverse transcriptase (NNRTI) เช่น 1-[(2-Hydroxyethoxy)-methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT), tetrahydroimidazo [4,5,1-jk]benzodiazepine-2(1H)-thione (TIBO หรือ ทีโบ) และ dipyrindodiazepinone หรือ nevirapine ซึ่งเรียกว่า สารยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 กลุ่มแรก (the first generation NNRTIs) เป็นกลุ่มที่น่าสนใจมากเนื่องจากมีกัมมันตภาพ (activity) ที่ยับยั้งจำเพาะ (specific) ต่อ HIV-1 RT โดยไม่มีผลยับยั้งต่อ HIV-2 หรือ HIV ชนิดอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีกัมมันตภาพยับยั้งได้ที่มีความเข้มข้นต่ำจึงไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย มีกลไกในการจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่ง allosteric site อีกทั้งมี selectivity ค่อนข้างสูงโดยจะไม่มีผลต่อ DNA polymerase ของเซลล์ปกติจึงมีความเป็นพิษค่อนข้างต่ำ ดังนั้นสารในกลุ่ม NNRTI จึงเป็นสารที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยร่วมกับ AZT อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการใช้ยาในกลุ่มนี้กลับลดลงมากเนื่องจากปัญหาการต้านทานยาของไวรัส (resistance) ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากการได้รับการรักษาด้วยยาในกลุ่ม NNRTI ไประยะหนึ่ง ทำให้ไวรัสเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) เป็นผลเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่อยู่ล้อมรอบ binding pocket ซึ่งส่งผลอย่างมากต่อการแสดงกัมมันตภาพของยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการ กลายพันธุ์ของกรด อะมิโน Tyrosine 181, Tyrosine 188 และ Lysine 103 ทำให้ความว่องไวของยาที่มีต่อเอนไซม์ลดลงมากเมื่อมีการกลายพันธุ์ จึงได้มีความพยายามในการพัฒนาและสังเคราะห์ตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 กลุ่มที่สองขึ้นมาใหม่ (the second generation NNRTIs) โดยสารยับยั้งในกลุ่มนี้มีความยืดหยุ่น (resilience) ต่อเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดกลายพันธุ์ (Y181C, Y188C และ K103N) ได้มากกว่าสารยับยั้งในกลุ่ม first generation NNRTIs จึงทำให้แสดงกัมมันตภาพสูงต่อเอนไซม์การถ่ายแบบทั้ง

ชนิดดั้งเดิม และชนิดกลายพันธุ์ เช่น สารอนุพันธ์ในกลุ่มของ efavirenz กลุ่ม carboxanilides และ กลุ่ม quinoxaline โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบในกลุ่ม efavirenz เป็นสารยับยั้งที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเอดส์โดยสารยับยั้งในกลุ่มนี้แสดงกัมมันตภาพสูงทั้งเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม (WT) และชนิดกลายพันธุ์ (K103N) การรักษาในปัจจุบันได้พยายามแก้ปัญหาการต้านทานยาของไวรัสที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยใช้ยาที่มีประสิทธิภาพสูงหลายกลุ่มร่วมกันในการรักษา (The highly active anti-retroviral therapy, HAART) เพื่อที่จะหลีกเลี่ยงปัญหาการต้านทานยาของยากกลุ่มนี้เมื่อมีการใช้ยาชนิดเดียว (monotherapy) ในการรักษาโรคเอดส์



ภาพที่ 1 โครงสร้างตัวยับยั้งในกลุ่มของ first และ second generation NNRTIs บางโครงสร้าง

Efavirenz เป็นสารยับยั้งในกลุ่ม second generation NNRTI ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเอดส์ มีชื่อทางการค้าว่า SUSTIVA สารในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิม (WT) และมีความยืดหยุ่นในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดกลายพันธุ์ (Y181C, Y188C และ K103N) สูง จึงได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเอดส์ในปัจจุบัน จากข้อมูลทางโครงสร้างผลึกระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์โดยวิธี x-ray crystallography ทำให้เข้าใจมากขึ้นถึงผลที่ได้ซึ่งแนะนำกลไกการยับยั้งที่น่าจะเป็นไปได้และพบว่าโครงสร้างผลึกการจับกันระหว่างสารยับยั้ง Efavirenz และเอนไซม์คล้ายกับตัวยับยั้ง NNRTI ในกลุ่ม first generation NNRTIs เช่น HEPT TIBO และ nevirapine กล่าวคือโครงสร้างของตัวยับยั้งที่จับกับเอนไซม์ภายในโพรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic cavity) มีลักษณะที่มีความจำเพาะ และจะปรับตัวให้มีโครงสร้างที่สามารถเข้าไปอยู่ในโพรง (cavity) นั้นได้ อย่างไรก็ตามปัญหาการต้านทานยาของเอนไซม์การถ่ายแบบก็ยังคงอยู่ อีกทั้งกลไกในการยับยั้งของสารยับยั้งและกลไกในการต้านทานยาของเอนไซม์ HIV-1 RT ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและยังเป็นปัญหาที่ยังต้องการคำอธิบาย ดังนั้นขบวนการศึกษาและพัฒนาเพื่อหายาตัวใหม่ที่มีกัมมันตภาพในการต้านทานการดื้อยาของเอนไซม์จึงจำเป็นต้องมีการดำเนินต่อไป จากการสืบค้นข้อมูลของงานวิจัยที่ผ่านมา การศึกษาวิจัยสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุลตัวยับยั้งของสารกลุ่มนี้ในด้านโครงสร้างทางอิเล็กทรอนิกส์ยังมีไม่มากนัก จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาสมบัติทางโครงสร้างของตัวยับยั้ง HIV-1 RT ในกลุ่มสารอนุพันธ์ efavirenz โดยอาศัยระเบียบวิธี Computer-Aided Molecular Design บนพื้นฐานของเคมีควอนตัม (quantum chemistry) และการจำลองแบบ (Molecular Modelling) โดยคาดหวังว่าผลของการศึกษาสมบัติของโมเลกุลของตัวยับยั้งในระดับโครงสร้างของอิเล็กทรอนิกส์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของโมเลกุลตัวยับยั้งเอนไซม์น่าที่จะเป็นหนทางหนึ่งที่ให้ข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะให้เกิดความเข้าใจและสามารถอธิบายถึงกลไกของโครงสร้างที่มีผลต่อการยับยั้ง HIV-1 RT ดังกล่าว และอธิบายอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์ รวมทั้งเป็นข้อมูลทางโครงสร้างที่สำคัญในการออกแบบโมเลกุลตัวยับยั้งตัวใหม่ที่มีกัมมันตภาพสูงต่อไปได้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาสมบัติทางโครงสร้างทางอิเล็กทรอนิกส์ และสมบัติของโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์ต่อกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ของสารยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์ efavirenz
2. สร้างความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพในการยับยั้งของสารอนุพันธ์ในกลุ่ม efavirenz โดยใช้ระเบียบวิธี 2D- และ 3D-QSAR และหาโครงสร้างสำคัญของสารยับยั้งในการยับยั้ง เอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ทั้งชนิดดั้งเดิม (WT) และชนิดกลายพันธุ์ (K103N)
3. ออกแบบสารประกอบในกลุ่มอนุพันธ์ efavirenz ที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี-1 ชนิดกลายพันธุ์ (K103N)

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นงานด้านการออกแบบโครงสร้างโดยวิธีทางคอมพิวเตอร์ (computer-aided molecular design) บนพื้นฐานการคำนวณทางเคมีควอนตัมของสารยับยั้ง HIV-1 RT ในกลุ่มของสารอนุพันธ์ในกลุ่ม efavirenz โดยวิธีการศึกษาที่ใช้คือ วิธี ligand-based drug design โดยใช้วิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพในการยับยั้ง (Quantitative structure activity relationship, QSAR) โดยวิธี 2D-QSAR คือ conventional QSAR และ Hologram QSAR และวิธี 3D - QSAR คือ วิธีวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามโมเลกุล (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) และวิธี การวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (Comparative Similarity Index Analysis, CoMSIA)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบนับเป็นสารสำคัญที่ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัส HIV-1 โดยตัวยับยั้งนี้จะหยุดการสังเคราะห์ proviral DNA ระหว่างที่เกิดการจำลองแบบของ viral RNA ในระยะแรกนี้สารที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV-1 คือ ยา AZT ddi และ ddC ซึ่งเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม 2',3'-dideoxynucleoside [1,2] ในปัจจุบันพบว่าสารในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย และเอนไซม์ HIV-1 RT เริ่มมีการต้านทานต่อตัวยานชนิดนี้ จึงทำให้มีการพัฒนายาต้านเชื้อไวรัส HIV-1 โดยมุ่งไปที่การวิจัยสารยับยั้งในกลุ่ม NNRTI ทั้งนี้เพราะสารในกลุ่มนี้มีความจำเพาะในการยับยั้ง HIV-1 จึงไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยอีกทั้งยังใช้สารยับยั้งปริมาณน้อยมาก ในระดับไมโครโมลาร์

ในระยะแรกได้มีการคิดค้นและพัฒนาสารยับยั้งในกลุ่มของ TIBO HEPT และ dipyrindodiazepinone หรือ nevirapine [3-5] ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจำเพาะต่อเอนไซม์การถ่ายแบบและแสดงกัมมันตภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ สารในกลุ่มนี้เรียกว่าเป็นสารยับยั้งในกลุ่ม first generation NNRTI ซึ่งมีความหลากหลายทางโครงสร้าง นับถึงปัจจุบันได้มีการสังเคราะห์สาร NNRTI ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างกันอีกหลายกลุ่ม [6-7] ในปี 1992 Kohlstaedt และคณะ [8] ได้วิเคราะห์โครงสร้างของผลึกระหว่าง HIV-1 RT กับเนวีราพีน ได้เป็นครั้งแรกโดยวิธีผลึกเอกซเรย์ (X-ray Crystallography) (3.5 Å resolution) นับแต่นั้นมาได้มีผู้ศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ชนิดนี้กับตัวยับยั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเพิ่มความละเอียดของ resolution [9-10] ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลทางโครงสร้างที่มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ข้อมูลทางโครงสร้างผลึกระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ดังกล่าวทำให้ทราบถึงกรดอะมิโนภายในโครงสร้างของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโพรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic cavity) ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดการจับกับตัวยับยั้ง (binding site) กล่าวคือส่วนของกรดอะมิโน เรซิดิว 95 Pro, 100 Leu, 101 Lys, 103 Lys, 106 Val, 138 Glu, 179 Val, 181 Tyr, 188 Tyr, 190 Gly, 227 Phe, 229 Trp, 234 Leu, 235 His, 236 Pro และ 318 Tyr กรดอะมิโนเหล่านี้ เป็นส่วนที่เกิดอันตรกิริยากับตัวยับยั้ง และอาจเกิดการ mutation โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง, 181 Tyr, 188 Tyr และ 103 Lysine ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการนำไปสู่การต้านทานของ HIV-1 ต่อดัวยับยั้ง จากการสังเคราะห์และทดสอบ กัมมันต

ภาพของสารประกอบไดไฮโดรไดอะเซพิโนน หรือเนวิราพีน ซึ่งเป็นสารยับยั้งในกลุ่ม first generation NNRTIs พบว่ามีกัมมันตภาพในการยับยั้งสูงมากและได้นำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเอดส์ อย่างไรก็ตามปัญหาการกลายพันธุ์ของไวรัสโดยเฉพาะที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 181 จาก Tyrosine เป็น Cysteine (Y181C) และที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 103 จาก Lysine เป็น Asparagine (K103N) ทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ลดลงมาก จากการศึกษาพบว่ากัมมันตภาพของการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 แบบกลายพันธุ์ (K103N) ของสารเนวิราพีนลดลงถึง 40 เท่า [11] เมื่อเปรียบเทียบกับกัมมันตภาพของสารในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 แบบดั้งเดิม (WT) และกัมมันตภาพของการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 แบบกลายพันธุ์ (Y181C) ของสารเนวิราพีนลดลงถึง 100 เท่า [12] ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาและพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 กลุ่มใหม่ขึ้นมาคือ second generation NNRTIs เช่น สารอนุพันธ์ในกลุ่มของ efavirenz [13] กลุ่ม carboxanilides [14] และ กลุ่ม quinoxaline [15] โดยสารยับยั้งเหล่านี้แสดงกัมมันตภาพสูงต่อเอชไอวี-1 แบบกลายพันธุ์ (K103N) โดยเฉพาะ efavirenz มีกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์แบบกลายพันธุ์ลดลงเพียง 6 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม และได้นำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเอดส์ในปัจจุบัน มีชื่อทางการค้าคือ SUSTIVA ต่อมาในปี 1998-2001 ได้มีการสังเคราะห์สารยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์ efavirenz เป็นจำนวนมาก เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของยาในกลุ่มนี้ให้ดีขึ้นโดยได้ทำการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งต่างๆ และทดสอบกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ทั้งชนิดดั้งเดิม (WT) และกลายพันธุ์ (K103N) [16-23] อีกทั้งยังมีการศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ชนิดดั้งเดิม (WT) และชนิด กลายพันธุ์ (Y181C, Y188C และ K103N) กับตัวยับยั้ง efavirenz ทำให้ได้ข้อมูลทางโครงสร้างที่สำคัญในการอธิบายการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1และเพิ่มความเข้าใจในประสิทธิภาพในยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ชนิดกลายพันธุ์ (K103N) ของสารยับยั้งในกลุ่มนี้ [12]

ได้มีการศึกษาทางด้านการจำลองโครงสร้างโดยคอมพิวเตอร์ (Computer aided molecular design) ของสารยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 โดยกลุ่มวิจัยของสุภา หารหนองบัว และคณะ [24-31] โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพ (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR) ของสารในกลุ่ม first generation NNRTI คือ HEPT, TIBO และ nevirapine โดยอาศัยสมบัติโครงสร้างอิเล็กทรอนิกส์ (electronic structure) และสมบัติของโมเลกุล (molecular property) แสดงความสัมพันธ์ในรูปของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โดยวิธีถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple linear regression) และได้ตรวจสอบคุณภาพทางสถิติของแบบจำลองอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งคุณภาพในการทำนายกัมมันตภาพ (predictive ability, q^2) จากการศึกษาสามารถชี้ให้เห็นถึงตัวแปรทางโครงสร้างอิเล็กทรอนิกส์และสมบัติของโมเลกุลคือที่มีผลต่อค่ากัมมันตภาพในการยับยั้ง นอกจากนี้แล้วยังได้ทำการศึกษาโดยวิธี 3D-QSAR (Three-dimensional QSAR) โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบสนามพลังงานโมเลกุล

(Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) ซึ่งได้จากการคำนวณอันตรกิริยาประเภท steric และ electrostatic ของสารประกอบ ได้ชี้ศักยภาพในการแสดงอิทธิพล สเตอริกของ โมเลกุลโดยแผนภาพคอนทัวร์และเป็นตัวอธิบายส่วนหลักของความแปรปรวนในกลุ่มอนุพันธ์ HEPT และ TIBO สำหรับข้อมูลที่ได้จากการความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพใน เชิงสามมิติของสารในกลุ่ม nevirapine โดยวิธีวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามโมเลกุลและหา โครงสร้างที่สำคัญในการแสดงกัมมันตภาพยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ทั้งชนิดที่ไม่มี การกลายพันธุ์ (WT RT) และชนิดที่มีการกลายพันธุ์ (Y181C RT) ให้แผนภาพคอนทัวร์ที่ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของอันตรกิริยาสเตอริกในโครงสร้างของตัวยับยั้งกับโพรงการจับ โดยเฉพาะ ที่ตำแหน่ง Tryrosine 181 ได้เป็นอย่างดี และเมื่อมีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งดังกล่าวจาก Tryrosine 181 เป็น Cysteine ส่งผลให้การยับยั้งชาอันตรกิริยาสเตอริกในบริเวณนี้ โดยผล ของอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก ช่วยให้มีการจับโพรงที่แข็งแรงที่สำคัญคือแบบจำลองชี้ให้เห็น ถึงความแตกต่างของโครงสร้างที่สำคัญของตัวยับยั้งที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบที่ แตกต่างกัน นอกจากนี้แล้วผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทุกวิธีสอดคล้องกันกับข้อมูลจากการทดลอง ด้านการจับกันระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์

ระเบียบและวิธีวิจัย

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย

- 1.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ PCs (Pentium IV) 2.8 MHz
- 1.2 เครื่องคอมพิวเตอร์ High performance (SGI)
- 1.3 เครื่องพิมพ์ (Laser Printer)
- 1.4 เครื่องพิมพ์ (Color Printer)
- 1.5 โปรแกรมการคำนวณทางเคมีควอนตัม (Gaussian 98)
- 1.6 โปรแกรมการคำนวณทางโมเลคิวลาร์โมเดลลิง (Alchemy 2000, Hyperchem 6.0 และ Weblabviewer 3.0, ChemDraw)
- 1.7 โปรแกรมการคำนวณทางสถิติ (SPSS for Windows 10.0)
- 1.8 โปรแกรมส่งข้อมูล (WS-FTP)

2. ข้อมูลโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพของตัวยับยั้งในกลุ่ม Efavirenz ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1

2.1 การคำนวณโครงสร้างคอนฟอร์เมชันของตัวยับยั้ง

ในการวิเคราะห์คอนฟอร์เมชันบนพื้นฐานทางเคมีควอนตัมของตัวยับยั้ง efavirenz โครงสร้างเริ่มต้นนำมาจากข้อมูลทาง x-ray crystallography ของ WT HIV-1 RT/ efavirenz complex รหัส FK9 และนำมาคำนวณโดยวิธีทางโมเลคิวลาร์ออร์บิทัลสองระดับวิธีคือ เซมิอิมปริคัล (MNDO, AM1 และ PM3) แอป อินิซิโอ (HF/3-21G) โดยโปรแกรม GAUSSIAN 98 เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างที่เสถียรที่สุดของแต่ละวิธีและทำการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับข้อมูลการทดลองทาง x-ray crystallography ข้อมูลที่ได้จากการคำนวณดังกล่าวจะนำไปสู่การอธิบายโครงสร้างของสาร efavirenz ที่เหมาะสมที่สุดและใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพของสารยับยั้งต่อไป

2.2 ข้อมูลกัมมันตภาพของตัวยับยั้งในกลุ่ม Efavirenz ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1

รวบรวมข้อมูลทางโครงสร้างและค่ากัมมันตภาพของสารในกลุ่ม efavirenz จำนวน 105 สารประกอบ โดยมีการรายงานค่าแสดงกัมมันตภาพในการยับยั้งของเอนไซม์เอชไอวี-1 (inhibitory activity) แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ ชนิดดั้งเดิม (WT) และชนิดกลายพันธุ์(K103N) โดยสารทุกตัวนั้นมีการทดสอบค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม และสารประกอบจำนวน 60 ตัวเท่านั้นที่มีการทดสอบค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ จึงเลือกสารประกอบจำนวน 60 ตัวที่มีค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบทั้ง 2 ชนิดเป็นกลุ่มข้อมูลที่ใช้ในการศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของโครงสร้างสำคัญในการยับยั้งเอนไซม์ (ดังตารางที่ 1) ค่าตัวแปรตาม (dependent variable) คือค่า $\log(1/C)$ โดย C คือค่าความเข้มข้นยังผล (effective concentration) ในการป้องกันเซลล์ชนิด MT-4 ต่อ

cytopathic effect ของเอนไซม์ถ่ายแบบเอชไอวี1 ได้ 90% (90% inhibitory concentration, IC₉₀)

2.3 การสร้างและคำนวณโครงสร้างของโมเลกุลตัวยับยั้ง

โครงสร้างเริ่มต้นของ efavirenz ได้จากข้อมูลทาง x-ray crystallography ของ WT HIV-1 RT/ efavirenz complex (FK9) จากนั้นสารอนุพันธ์ของ efavirenz จำนวน 60 โมเลกุล ถูกสร้างโดยใช้โปรแกรมโมเลคิวลาร์โมเดลลิ่ง ALCHEMY2000 ซึ่งโครงสร้างทั้งหมดนี้จะทำการคำนวณปรับโครงสร้างที่เสถียรที่สุด (full geometrical optimization) ทั้งแบบเคมีเอ็มพีรีคัล (AM1) และแอบบินิซิโอ (HF/3-21G) เมื่อทำการคำนวณในขั้นตอนนี้เสร็จแล้วจะได้โครงสร้างที่เสถียรและข้อมูลการกระจายของอิเล็กตรอนของแต่ละโมเลกุลซึ่งจะนำไปใช้ในการคำนวณสมบัติทางโครงสร้างต่าง ๆ และนำไปสร้างความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบ 2D-QSAR และแบบ 3D-QSAR

2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพ

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งโดยวิธี Quantitative structure activity relationship (QSAR) ดังนี้

2.4.1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสองมิติ (Two Dimensional Quantitative structure activity relationship, 2D-QSAR)

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสองมิติได้ใช้วิธีการ 2 วิธีในการศึกษาคือ Conventional QSAR และ Hologram QSAR

2.4.1.1 วิธี Conventional QSAR ตัวอธิบายของโมเลกุล (molecular descriptor) จะใช้เป็นตัวแทนของสมบัติทางโครงสร้างของโมเลกุลโดยแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ

2.4.1.1.1 Physicochemical properties ได้แก่ สมบัติ lipophilicity (log P), molar refractivity (MR) และ polarizability (POL)

2.4.1.1.2 Electronic properties ได้แก่ ค่าความหนาแน่นของอิเล็กตรอน (electron density) ซึ่งจะใช้ค่าของประจุอิเล็กตรอน (atomic charges) สมบัติดังกล่าวนี้ได้มาจากการคำนวณโดยวิธีทฤษฎีโมเลคิวลาร์ออร์บิทัล สองระเบียบวิธีคือ เคมีเอ็มพีรีคัล (AM1) และแอบบินิซิโอ (HF/3-21G)

จากนั้นจะนำตัวอธิบายของโมเลกุลและค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 สร้างความสัมพันธ์ในเชิงแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ดังสมการ

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

โดยในที่นี้ค่า p_i และ P_j หมายถึงค่าสัมประสิทธิ์ (coefficients) ที่ได้จากการคำนวณโดยวิธีการถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple linear regression, MLR) ค่า q_i หมายถึงประจุอิเล็กตรอนของอะตอมในแต่ละโมเลกุลที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี MLR เมื่อ M_j หมายถึงตัวอธิบาย physicochemical properties correlation coefficient (r), F-value (F), standard coefficient (sd), maximum outliers และความสามารถในการทำนาย (predictive ability)

หรือ q^2) เพื่อวิเคราะห์สมการที่ดีที่สุด ซึ่งจะเป็นตัวอธิบายความสัมพันธ์ของโครงสร้างที่มีต่อ กัมมันตภาพในการยับยั้งและนับได้ว่าสมการที่ได้จากการศึกษาเป็นสมการที่มีความเชื่อถือได้ อย่างมีนัยสำคัญ (statistical significance)

2.4.1.2 วิธี Hologram quantitative structure activity relationship (HQSAR) ตัวอธิบายของโมเลกุล คือ molecular hologram ซึ่งได้จากการนับทุกๆ fragment ที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลแล้วแปลงเป็นตัวเลขจำนวนเต็มใส่ลงในแถวข้อมูล ดังนั้นแต่ละโมเลกุลจะมี molecular hologram เฉพาะตัว จากนั้นทำการหาความสัมพันธ์ระหว่าง molecular hologram และ กัมมันตภาพในการยับยั้งโดยใช้ระเบียบวิธีการถดถอยพหุคูณแบบพาร์เชียล (Partial Least Squares) การแปรผลของแบบจำลอง HQSAR ทำให้เห็นถึงองค์ประกอบที่สำคัญของโมเลกุลในการแสดงกัมมันตภาพในการยับยั้ง โดยแผนภาพคอนทัวร์สีเขียว-เหลืองชี้ให้เห็นว่า fragment นั้นส่งผลทำให้กัมมันตภาพในการยับยั้งสูงขึ้น ในขณะที่แผนภาพคอนทัวร์สีแดง-ส้มชี้ให้เห็นว่า fragment นั้นส่งผลทำให้ กัมมันตภาพในการยับยั้งต่ำลง

2.4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบสามมิติ (Three Dimensional Quantitative structure activity relationship, 3D-QSAR)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งแบบ 3D-QSAR ในโครงสร้างนี้จะใช้วิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามของโมเลกุล (Comparative Molecular Fields Analysis, CoMFA) และวิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (Comparative Similarity Index Analysis, CoMSIA) ซึ่งเป็นวิธีด้าน Computer-Aided Molecular Design ขั้นตอนสำคัญในการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีนั้นอาจแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนคือ

1. การวางโมเลกุล (Alignment rule)

ในวิธีการวิเคราะห์นั้นจะวางโมเลกุลทุก ๆ โครงสร้างภายในกล่องซึ่งมีขนาดที่กำหนด ทั้งนี้ขั้นตอนนี้จัดว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เนื่องจากผลการวิเคราะห์ของวิธี CoMFA จะได้จากการเปรียบเทียบสนามของโมเลกุลสองแบบคือ อันตรกิริยาสเตอริก (steric interaction) และอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic interaction) ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ของวิธี CoMSIA จะได้จากการเปรียบเทียบสนามของโมเลกุลห้าแบบคือ อันตรกิริยาสเตอริก (steric interaction) อันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic interaction) อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) การให้โปรตอน (H donor) และการรับโปรตอน (H acceptor) โดยในการศึกษานี้จะใช้วิธีการวางโมเลกุลแบบวางทับ (Superimposition Alignment)

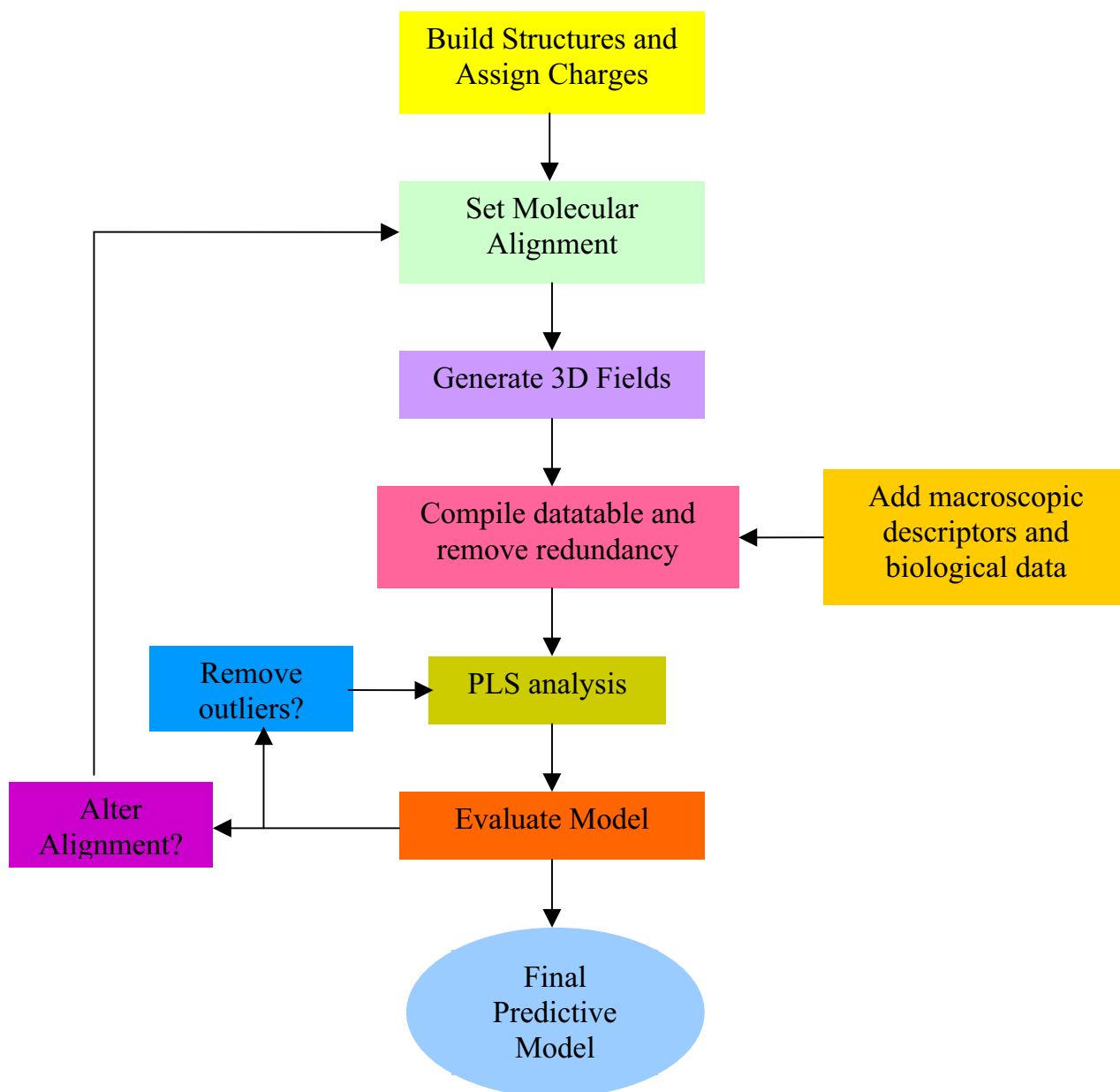
2. การวิเคราะห์โดยวิธีคอมฟาและคอมเซีย (CoMFA and CoMSIA Analysis)

โมเลกุลที่ได้วางทับไปในขั้นตอนที่ 1 และจะถูกสร้างบริเวณใน 3 มิติ รอบ ๆ โมเลกุลเป็นโครงข่ายลูกบาศก์ซึ่งจะทำให้ได้จุดตัด (grid point) รอบโมเลกุลจำนวนมาก ซึ่งจุดตัดดังกล่าวนี้จะเป็นโพรบอะตอม (probe atom) ซึ่งการวิเคราะห์จะคำนวณอันตรกิริยาระหว่าง

โพรบจะต่อมกับโมเลกุลของตัวยับยั้งสองแบบคือ อันตรกิริยาสเตอริก อันตรกิริยาอิเล็กทรอนิกส์ การให้โปรตอน (H donor) และการรับโปรตอน (H acceptor) จากนั้นค่าอันตรกิริยาดังกล่าวจะถูกบันทึกไว้ในตาราง เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยระเบียบวิธี cross-validation และการถดถอยพหุคูณแบบพาร์เชียล (Partial Least Squares)

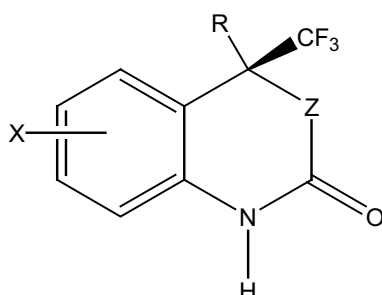
3. การแปลผล (Interpretation)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากวิธีวิเคราะห์ทั้งสองแบบนี้ จะไม่สามารถแสดงได้เป็นสมการทั่วไป แต่การประเมินผลว่าแบบจำลองใดที่ให้ผลการทำนายค่ากัมมันตภาพดีที่สุดนั้นจะอาศัยค่าความสามารถในการทำนาย (Predictive ability, q^2) เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาโดยค่า q^2 ควรมีค่าสูงกว่า 0.6 และการแปลผลจะแสดงในรูปของภาพคอนทัวร์ของสัมประสิทธิ์ (coefficient contour map) ทั้งนี้ คอนทัวร์แบบสเตอริกจะแสดงโดยสีเขียว (positive) และสีเหลือง (negative) ซึ่งหมายความว่าควรเพิ่มหมู่เกาะในโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบสเตอริกบริเวณที่แสดงโดยสีเขียว คอนทัวร์แบบอิเล็กทรอนิกส์จะแสดงโดยสีแดง (positive) และสีน้ำเงิน (negative) โดยความหมายคือควรเพิ่มหมู่แทนที่ในโครงสร้างโมเลกุลที่มีประจุอิเล็กตรอนสูงขึ้นเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบอิเล็กทรอนิกส์บริเวณที่แสดงโดยสีแดง สำหรับคอนทัวร์แบบไฮโดรโฟบิกจะแสดงโดยสีชมพู (positive) และสีขาว (negative) หมายความว่าควรเพิ่มหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการละลายในชั้นไขมันเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิกในบริเวณที่แสดงสีชมพู ในการพิจารณาอิทธิพลของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของตัวยับยั้งและเอนไซม์โดยพิจารณาจากคอนทัวร์ของการให้โปรตอน (H donor) โดยจะแสดงสีฟ้า (positive) และสีม่วง (negative) หมายถึงควรเพิ่มหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการให้โปรตอนในบริเวณที่แสดงสีฟ้า และคอนทัวร์ของการรับโปรตอน (H acceptor) โดยจะแสดงเป็นสีส้ม (positive) และสีขาว (negative) หมายถึงควรเพิ่มหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการรับโปรตอนเพื่อเพิ่มอันตรกิริยาระหว่างบริเวณที่แสดงสีขาวนั้น



ภาพที่ 2 แผนภาพการศึกษา CoMFA และ CoMSIA

ตารางที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบในกลุ่ม Efavirenz ที่เป็นกลุ่มของ Training set และกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ (K103N)



Cpds. No.	X	R	Z	Experimental log(1/C)	
				WT RT	K103N RT
1	6-Cl	CC-cyclopropyl	O	8.77	7.19
2	6-Cl	CC-2-pyridyl	O	8.27	5.96
3	6-Cl	CC-2-furanyl	O	8.42	6.82
4	6-Cl	CC-3-furanyl	O	8.42	6.49
5	6-Cl	CC-3-thienyl	O	8.35	6.97
6	6-F	CC-3-pyridyl	O	8.59	6.48
7	6-F	CC-3-furanyl	O	8.60	6.43
8	5,6-diF	CC-3-furanyl	O	8.49	6.55
9	5,6-diF	CC-2-thienyl	O	8.65	6.81
10	5,6-diF	CC-3-thienyl	O	8.63	6.86
11	6-Cl	OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	O	7.99	6.00
12	6-Cl	OCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	O	8.00	6.54
13	6-Cl	OCH ₂ CHCHCH ₃ (cis)	O	8.36	6.63
14	6-Cl	OCH ₂ CHCHCH ₃ (trans)	O	8.25	6.39
15	6-Cl	OCH ₂ CCCH ₃	O	8.50	6.51
16	6-Cl	OCH ₂ CHCCl ₂	O	8.02	6.62
17	6-F	OCH ₂ CHCHCH ₃ (trans)	O	8.05	5.94
18	5,6-diF	OCH ₂ CHC(CH ₃) ₂	O	8.81	7.19
19	5,6-diF	OCH ₂ CHCCl ₂	O	8.20	6.74
20	5,6-diF	CC-ethyl	NH	8.82	7.85
21	5-F	CC-cyclopropyl	NH	8.85	7.05

Cpds. No.	X	R	Z	Experimental log(1/C)	
				WT RT	K103N RT
22	5-Cl,6-F	CC-isopropyl	NH	8.52	7.82
23	5-Cl	CC-cyclopropyl	NH	8.60	7.20
24	5,6-diF	CC-cyclopropyl	NH	8.68	7.89
25	5,6-diF	CC-isopropyl	NH	8.68	7.85
26	6-F	CC-cyclopropyl	NH	8.70	7.32
27	5,6-diF	CC-2-pyridyl	NH	8.70	6.96
28	6-F	CC-ethyl	NH	8.60	7.15
29	5-Cl,6-F	CC-cyclopropyl	NH	8.57	7.74
30	6-MeO	CC-cyclopropyl	NH	8.54	7.40
31	6-F	CC-2-pyridyl	NH	8.30	6.32
32	5-F,6-Cl	CC-cyclopropyl	NH	8.32	7.74
33	5-Cl,6-F	CC-2-pyridyl	NH	8.64	7.14
34	6-Cl	CC-cyclopropyl	NH	8.57	7.66
35	6-MeO	CC-isopropyl	NH	8.42	7.25
36	6-MeO	CC-phenyl	NH	8.49	6.55
37	5,6-diF	CC-phenyl	NH	8.21	6.72
38	6-F	CC-phenyl	NH	8.18	6.49
39	6-Cl	CC-2-pyridyl	NH	8.47	6.80
40	6-Cl	CC-ethyl	NH	8.48	7.59
41	6-Cl	CC-phenyl	NH	8.15	6.60
42	6-F	CC-isopropyl	NH	8.59	7.57
43	5,6-diCl	CC-cyclopropyl	NH	8.10	7.74
44	6-Cl	CC-isopropyl	NH	8.52	7.66
45	6-MeO	CC-2-pyridyl	NH	8.09	6.47
46	5-MeO,6-Cl	CC-cyclopropyl	NH	8.46	8.12
47	5-MeO,6-Cl	CC-phenyl	NH	8.10	6.95
48	5-MeO,6-Cl	CC-3-pyridyl	NH	8.15	6.86
49	5-OH,6-Cl	CC-cyclopropyl	NH	8.44	7.55

Cpds. No.	X	R	Z	Experimental log(1/C)	
				WT RT	K103N RT
50	6-Cl	CHCO- cyclopropyl	NH	8.44	7.12
51	6-Cl	CHCO-phenyl	NH	8.09	7.34
52	6-Cl	CHCO-3-pyridyl	NH	8.34	7.12

ตารางที่ 2 โครงสร้างของสารประกอบในกลุ่ม Efavirenz ที่ใช้เป็นกลุ่ม Test set และ กัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์

Compds. no.	X	R	Z	Experimental log(1/C)	
				WT RT	K103N RT
T1	6-Cl	CC-3-pyridyl	O	8.40	6.94
T2	6-Cl	CC-3-thienyl	O	8.59	6.71
T3	5,6-diF	CC-3-pyridyl	O	8.65	7.23
T4	6-Cl	OCH ₂ CHC(CH ₃) ₃	O	8.57	7.08
T5	6-F	OCH ₂ CHC(CH ₃) ₂	O	8.53	6.97
T6	5,6-diF	OCH ₂ CHCH ₂	O	8.19	5.79
T7	6-Cl	CHCO-phenyl	NH	8.09	7.34
T8	6-Cl	C=C- cyclopropyl	NH	8.20	7.11

ผลการศึกษา

1. การคำนวณเชิงโมเลกุลของคอนฟอร์เมชันของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอช ไอ วี-1 ของ สาร Efavirenz

จากการคำนวณโครงสร้างที่เสถียรที่สุดของตัวยับยั้งการถ่ายแบบ HIV-1 ในกลุ่มของ efavirenz โดยวิธีทางเคมีควอนตัมโดยระเบียบวิธีเซมิอิมพีริคัล (semiempirical molecular orbital calculations) และ แอบ อินิซิโอ (ab-initio molecular orbital calculations) เพื่อเปรียบเทียบผลที่ได้กับโครงสร้างของ efavirenz ที่ได้จากการทดลอง โดยมุ่งหวังที่จะหาวิธีการคำนวณที่ได้ผลการปรับโครงสร้างที่ดีที่สุดและใช้การคำนวณที่เหมาะสมที่สุด เพื่อที่จะนำเอาโครงสร้างที่เสถียรที่สุดนั้นไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารอนุพันธ์ในกลุ่ม efavirenz กับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 และการออกแบบโมเลกุลตัวยับยั้งใหม่

การคำนวณโครงสร้างของ efavirenz นั้น ได้ทำการคำนวณโดยระเบียบวิธีเซมิอิมพีริคัล สามวิธีคือ 1) MNDO 2) AM1 3) PM3 และการคำนวณโดยระเบียบวิธีแอบ อินิซิโอ คือ HF/3-21G การคำนวณโดยวิธีเซมิอิมพีริคัลจะอาศัยการประมาณค่าในการคำนวณในส่วนของอันตรกิริยาระหว่างสองอนุภาค (two-electron integral) จึงทำให้การคำนวณสั้นกว่าแบบแอบ อินิซิโอ หลายเท่า ผลการคำนวณจากวิธี แอบ อินิซิโอ แม้จะมีความถูกต้องมากกว่าแต่ใช้เวลาในการคำนวณสูงกว่ามาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการเปรียบเทียบในทุกระเบียบวิธีที่กล่าวมาเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในทั้งด้านผลการคำนวณที่ถูกต้องและเวลาที่ใช้ในการคำนวณ ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 พารามิเตอร์ทางโครงสร้างของ Efavirenz ชนิดดั้งเดิมที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธีต่าง ๆ เปรียบเทียบกับข้อมูลทาง X-ray crystallography

Bond Length (Å)	HF/321G	AM1	PM3	MNDO	X-ray
C1-C11	1.736	1.697	1.684	1.749	1.72
F2-C20	1.338	1.366	1.348	1.352	1.33
F3-C20	1.342	1.369	1.349	1.354	1.33
F4-C20	1.341	1.369	1.349	1.355	1.33
O5-C21	1.194	1.235	1.213	1.223	1.19
O6-C14	1.455	1.441	1.437	1.413	1.47
O6-C21	1.372	1.377	1.361	1.359	1.38
N7-C8	1.428	1.393	1.429	1.402	1.43
N7-C21	1.372	1.388	1.429	1.408	1.38
C8-C9	1.415	1.413	1.402	1.42	1.41
C8-C13	1.406	1.414	1.403	1.425	1.4
C9-C10	1.405	1.387	1.386	1.4	1.4
C10-C11	1.376	1.4	1.395	1.409	1.38
C11-C12	1.37	1.395	1.391	1.405	1.38
C12-C13	1.397	1.4	1.395	1.415	1.4
C13-C14	1.559	1.502	1.51	1.534	1.55
C14-C15	1.472	1.444	1.452	1.464	1.48
C14-C20	1.529	1.607	1.612	1.663	1.57
C15-C16	1.185	1.197	1.193	1.199	1.17
C16-C17	1.454	1.414	1.426	1.431	1.71
C17-C18	1.452	1.513	1.509	1.541	1.23
C17-C19	1.423	1.514	1.509	1.541	1.24
C18-C19	1.465	1.496	1.496	1.518	1.28
SD	0.092	0.118	0.115	0.124	

Bond angle (degree)	HF/321G	AM1	PM3	MNDO	X-ray
C14-O6-C21	125	121.6	120.2	126.2	123.6
C8-N7-C21	123.1	121.6	116.9	123.2	122.9
N7-C8-C9	119.8	120.9	120.2	120.6	112.8
N7-C8-C13	119.6	119.5	119	118.3	119
C9-C8-C13	119.4	119.5	120.7	121.1	119.1
C8-C9-C10	119.3	120.1	119.5	119.7	119.1
C9-C10-C11	120	120.1	119.7	119.3	120.7
Cl1-C11-C10	119.3	119.8	119.5	119.2	119.6
Cl1-C11-C12	119.3	119.8	119.5	119.4	119.5
C10-C11-C12	121	120.4	121.1	121.4	120.9
C11-C12-C13	119.4	120.1	119.7	120.2	119.1
C8-C13-C12	119.8	119.7	119.3	118.2	121
C8-C13-C14	119.3	120.1	120.3	119.5	117.5
C12-C13-C14	121.5	120.1	120.4	122.4	121.5
O6-C14-C13	113.3	115.4	115.6	113.6	111
O6-C14-C15	108.2	108	106.3	106.5	108.3
O6-C14-C20	105.5	101.7	105.1	104	106.9
C13-C14-C15	112.2	111.1	111.2	111.5	112.9
C13-C14-C20	110	110.8	109.7	111.4	110.2
C15-C14-C20	109.1	109.4	108.4	109.5	107.2
C16-C17-C18	117.5	120	119.3	122.2	105.5
C16-C17-C19	117.8	120.2	119.2	122.2	105.6
F2-C20-F3	106.1	105.1	105	106.2	106.7
F2-C20-F4	106.3	105.1	105	106.4	106.8
F2-C20-C14	112.3	113.3	113.7	112.5	111.8
F3-C20-F4	106.2	105.2	105	106.3	106.9
F3-C20-C14	111.3	114.2	113.8	112.9	112.0
F4-C20-C14	112.5	113.2	113.4	112	112.3

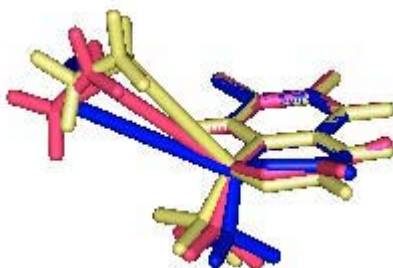
Bond angle (degree)	HF/321G	AM1	PM3	MNDO	X-ray
O5-C21-O6	120.8	113.4	112.1	119.1	119.8
O5-C21-N7	124.5	125.3	125.2	123.4	124.4
O6-C21-N7	118.0	121.3	122.7	117.5	115.8
SD	3.51	4.66	4.67	4.75	

Dihedral angle (degree)	HF/321G	AM1	PM3	MNDO	X-ray
C21-C6-C14-C13	0.5	8.6	347.7	348.8	325.7
C21-O6-C14-C15	220.3	243.6	223.7	225.7	201.2
C14-O6-C21-O5	185.1	174.1	177.5	181.8	196.4
C14-O6-C21-N7	19.3	353.2	354.1	1.2	16.2
C21-N7-C8-C9	172.1	181.5	161.6	169.6	161.7
C21-N7-C8-C13	345.9	2.0	338.6	349.5	337.6
C8-N7-C21-O5	196.2	180.2	199.6	190.1	193.9
C8-N7-C21-O6	9.8	1.1	23.5	10.7	14.1
N7-C8-C9-C10	179.4	181.2	176.8	180.8	179
C13-C8-C9-C10	0.0	0.6	359.9	0.9	3.1
N7-C8-C13-C12	178.5	178.2	182.6	178.2	179.1
N7-C8-C1-C14	0.6	0.3	3.5	359.3	1.1
C9-C8-C13-C12	0.0	358.8	359.6	358.1	355.1
C8-C9-C10-C11	0.2	0.2	0.4	0.4	359.1
C9-C10-C11-C11	179.9	179.6	179.8	179.1	180.2
C9-C10-C11-C12	0.1	359.7	359.9	359.2	0.4
C11-C11-C12-C13	179.9	179.8	179.7	179.9	178
C10-C11-C12-C13	0.1	359.7	359.6	359.8	357.9
C11-C12-C13-C8	2.1	1.1	0.7	1.5	4.4
C11-C12-C13-C14	184	179	179.8	180.4	182.3
C8-C13-C14-O6	15.8	354.7	13.5	10.6	24

Dihedral angle (degree)	HF/321G	AM1	PM3	MNDO	X-ray
C8-C13-C14-C15	138	118	134.9	131	145.9
C12-C13-C14-O6	201.8	176.8	194.4	191.8	206.1
O6-C14-C17-C18	52.5	10	276.8	275.1	46.2
O6-C14-C17-C19	121	80.2	346.1	346.9	111.1
C13-C14-C17-C18	290.7	242.6	150.5	151.1	283.2
O6-C14-C20-F2	50.9	50.1	55.2	53.1	47.8
O6-C14-C20-F3	170.3	170.4	175.4	173.3	167.4
C13-C14-C20-F2	178.5	173.3	180.1	175.8	168.5

การเปรียบเทียบ Geometry ของ efavirenz ที่ได้จากการคำนวณกับ Geometry ที่ได้จากการทดลอง เมื่อพิจารณาค่า Standard deviation (SD) ของความยาวพันธะที่ได้จากการคำนวณทั้งสามระเบียบวิธีคำนวณกับค่าที่ได้จากการทดลอง พบว่าระเบียบวิธีคำนวณผลการคำนวณโดยวิธีแอบอิงิซิโอมีค่าน้อยกว่าผลที่ได้จากวิธีเซมิอิมพีริคัล คือ 0.092 แต่เป็นวิธีที่ใช้เวลาการคำนวณมากที่สุด สำหรับผลการคำนวณโดยวิธีเซมิอิมพีริคัลพบว่าระเบียบวิธีคำนวณ PM3 และ AM1 ให้ค่า SD ใกล้เคียงกันคือ 0.115 และ 0.118 ตามลำดับ ส่วนระเบียบวิธีคำนวณ MNDO ให้ค่า SD มากที่สุดเท่ากับ 0.124

เมื่อนำคอนฟอร์เมชันที่มีพลังงานต่ำที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี AM1 และ PM3 มาซ้อนทับกับคอนฟอร์เมชันที่ได้จาก X-ray crystallography (รูปที่ 1) พบว่าคอนฟอร์เมชันที่ได้จากระเบียบวิธี PM3 จะเบี่ยงเบนไปจาก ผลของ X-ray crystallography มากกว่าระเบียบวิธี AM1



ภาพที่ 3 การซ้อนทับกันของคอนฟอร์เมชันของ Efavirenz ชนิดดั้งเดิมที่ได้จากการคำนวณด้วย

ระเบียบวิธี PM3 (สี่เหลี่ยม), AM1 (สี่เหลี่ยม) และคอนฟอร์เมชันที่ได้จาก x-ray crystallography (สี่เหลี่ยม)

จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงเลือกระเบียบวิธีการคำนวณวิธีแฮบอินชิโอ (HF/3-21G) และวิธีเคมีอิมพริคัลแบบ AM1 เพื่อใช้ในการคำนวณปรับโครงสร้างของสารอนุพันธ์ในกลุ่ม efavirenz เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพของสารต่อไป

2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพ

_(Quantitative structure activity relationship)

2.1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพแบบสองมิติ

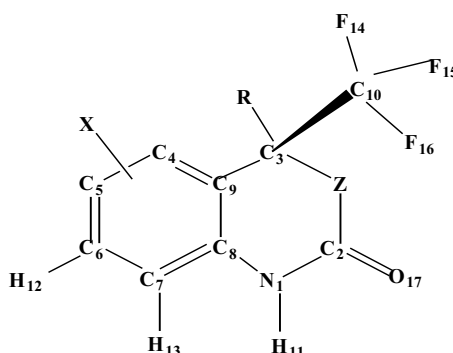
(Two-dimensional quantitative structure activity relationship, 2D-QSAR)

2.1.1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพแบบ conventional-QSAR

การการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพแบบสองมิติ (2D-QSAR) ของสารประกอบในกลุ่ม efavirenz โดยทำการเปรียบเทียบผลการคำนวณที่ได้จากระเบียบวิธีเคมีอิมพริคัล คือ AM1 และ ระเบียบวิธี แฮบ อินชิโอ คือ HF/3-21G ซึ่ง แต่ละวิธีจะให้สมบัติเชิงอิเล็กทรอนิกส์และสมบัติเชิงโมเลกุลที่แตกต่างกัน

2.1.1.1 สมบัติเชิงอิเล็กทรอนิกส์และสมบัติเชิงโมเลกุลของสารประกอบในกลุ่ม Efavirenz

สมบัติเชิงอิเล็กทรอนิกส์ของสารประกอบในกลุ่ม Efavirenz สามารถอธิบายโดยใช้ประจุสุทธิ (Atomic net charge) ของอะตอม C₁, C₂, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, F₁₅, F₁₆ และ O₁₇ ที่เป็นโครงสร้างหลักของสารประกอบดังแสดงภาพที่ 4



ภาพที่ 4 โครงสร้างหลักของสารประกอบ Efavirenz

สมบัติเชิงโมเลกุลของสารประกอบในกลุ่ม efavirenz ที่ศึกษา และนำมาอธิบายสมบัติเชิงโครงสร้างของโมเลกุลในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิม ได้แก่ Lipophilicity, Molecular refractivity, Molecular mass, Molecular polarizability,

Molecular volume, Surface area โดยสมบัติเชิงอิเล็กทรอนิกส์และสมบัติเชิงโมเลกุลได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี AM1 และ HF/3-21G

2.1.1.2 การหาแบบจำลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 แบบสองมิติ (2D-QSAR)

การหาแบบจำลองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติเชิงโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ (K103N) แบบสองมิติ (2D-QSAR) เป็นการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติเชิงโครงสร้างกับกัมมันตภาพทางชีวภาพ ของสารประกอบในกลุ่ม Efavirenz ในรูปของแบบจำลองสมการเชิงเส้นพหุคูณ (Multiple linear regression model) ในการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารประกอบในกลุ่ม Efavirenz กับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 นั้นแบบจำลองสมการเชิงเส้นพหุคูณทุกแบบที่เป็นไปได้ถูกสร้างขึ้น และทำให้ได้แบบจำลองที่แสดงความสัมพันธ์จำนวนมาก จึงทำการพิจารณาคุณภาพของแบบจำลองจากค่าทางสถิติ ได้แก่ ค่า Correlation coefficient (r), R-square (r^2) และ Standard error of the estimate (s)

ผลการศึกษาการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารประกอบในกลุ่ม Efavirenz กับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิม (WT) พบว่าแบบจำลองสมการที่ดีที่สุดที่แสดงความสัมพันธ์สมบัติเชิงโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี AM1 กับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิม คือแบบจำลองสมการที่ 1

$$\log(1/IC_{90}) = -0.008(\pm 0.001)MS + 26.405(\pm 5.160)H_{12} + 0.553(\pm 0.149)C_5 + 1.970(\pm 1.705) \quad (1)$$

$$r = 0.766, \quad r^2 = 0.588, \quad s = 0.1503$$

แบบจำลองสมการที่ดีที่สุดที่แสดงความสัมพันธ์สมบัติเชิงโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี HF/3-21G กับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิม คือแบบจำลองสมการที่ 2

$$\log(1/IC_{90}) = -0.0538(\pm 0.008)Pol - 0.139(\pm 0.027)LogP + 3.247(\pm 1.282)C_9 - 1.156(\pm 0.512)C_7 + 8.843(\pm 0.752) \quad (2)$$

$$r = 0.848, \quad r^2 = 0.720, \quad s = 0.1228$$

จากการเปรียบเทียบพบว่าแบบจำลองสมการที่ดีที่สุดในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติเชิงโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิม โดยพิจารณาจากค่าทางสถิติ คือค่า r และ r^2 คือแบบจำลองสมการที่ 2 ซึ่งได้จากการคำนวณตัวอธิบายที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี HF/3-21G

ตัวอธิบายที่ปรากฏในแบบจำลอง QSAR สำหรับสารประกอบในกลุ่ม efavirenz นี้ชี้ให้เห็นว่าตัวอธิบายสมบัติเชิงอิเล็กทรอนิกส์ คือ C_7 และ C_9 และตัวอธิบายสมบัติเชิงโมเลกุล คือ Lipophilicity และ Molecular polarizability จัดเป็นตัวอธิบายที่สำคัญต่อกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิม จากสัมประสิทธิ์ของตัวอธิบาย C_9 และ C_7 ซึ่งพิจารณาเป็น Active center ของโมเลกุล แสดงให้เห็นว่ากัมมันตภาพในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้น ถ้าหากลดความหนาแน่นการกระจายอิเล็กตรอนบริเวณ C_9 เนื่องจากสัมประสิทธิ์หน้าของตัวอธิบาย C_9 มีค่าเป็นบวก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าหมู่แทนที่ X บริเวณตัวอธิบาย C_9 ควรจะเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน (Electron withdrawing group) แต่ทั้งนี้พบว่าที่ตำแหน่ง C_9 ไม่มีหมู่แทนที่ X ใดๆ แต่ตัวอธิบาย C_9 มีความสัมพันธ์สูง (High correlation) กับตัวอธิบาย C_5 , C_8 และ F_{16} แต่ที่ตำแหน่ง F_{16} ไม่มีหมู่แทนที่ X ใดๆ ส่วนที่ตำแหน่ง C_8 มีหมู่แทนที่ X เป็น H ดังนั้นจึงต้องพิจารณาที่ตำแหน่ง C_5 ซึ่งหมู่แทนที่ X ควรเป็นหมู่ที่ดึงอิเล็กตรอนได้ดี โดยดูได้จากค่าการกระจายประจุของ C_5 ซึ่งควรเป็นบวกมากเพราะสามารถดึงอิเล็กตรอน จึงจะส่งผลให้สารประกอบกลุ่มนี้แสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งได้สูงขึ้น ในขณะที่ตำแหน่ง C_7 มีความหนาแน่นในการกระจายอิเล็กตรอนมาก เนื่องจากสัมประสิทธิ์หน้าตัวอธิบาย C_7 มีค่าเป็นลบ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าหมู่แทนที่ X ควรจะเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอน (Electron donating group) แต่ปรากฏว่าที่ตำแหน่ง C_7 มีหมู่แทนที่ X เป็น H แต่ C_7 มีความสัมพันธ์สูง (High correlation) กับตัวอธิบาย C_6 โดยมีค่า Correlation เท่ากับ -0.9794 จึงพิจารณาดำเนินการที่ตำแหน่ง C_6 ซึ่งหมู่แทนที่ X ควรเป็นหมู่ที่ให้อิเล็กตรอนได้ดี โดยดูได้จากค่าการกระจายประจุของ C_6 ซึ่งควรเป็นลบมากเพราะสามารถให้อิเล็กตรอนจึงจะส่งผลให้สารประกอบกลุ่มนี้แสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งได้สูงขึ้น สำหรับตัวอธิบายสมบัติเชิงโมเลกุลที่สำคัญในแบบจำลอง คือ Molecular polarizability และ Lipophilicity จากค่าสัมประสิทธิ์ของตัวอธิบายสมบัติเชิงโมเลกุลเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่า กัมมันตภาพในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นหากมีการลดความเป็นขั้วของโมเลกุลลงเนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของตัวอธิบาย Molecular polarizability เป็นลบ และลด Lipophilicity ของโมเลกุลให้ลดลง เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของตัวอธิบาย Lipophilicity เป็นลบ

นอกจากนี้แล้วเมื่อพิจารณาแบบจำลองที่ได้จากการคำนวณสมบัติเชิงโครงสร้างด้วยระเบียบวิธี HF/3-21G กับผลทางโครงสร้างที่ได้จากการทดลองของสารประกอบในกลุ่ม efavirenz ที่แสดงค่ากัมมันตภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิม พบว่าข้อมูลที่ได้จากแบบจำลองที่สามารถนำมาอธิบายการแสดงกัมมันตภาพของโมเลกุลของสารประกอบในกลุ่ม Efavirenz ได้เป็นอย่างดี

ผลการศึกษาการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารประกอบในกลุ่ม efavirenz กับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 กลายพันธุ์ (K103N) พบว่าแบบจำลองสมการที่ดีที่สุดที่แสดงความสัมพันธ์สมบัติเชิงโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี AM1 กับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิม คือแบบจำลองสมการที่ 3

$$\log(1/IC_{90}) = -6.439(\pm 1.535)O_{18} + 0.044(\pm 0.008)MR - 0.005(\pm 0.001)VOL + 7.050(\pm 0.879) \quad (3)$$

$$r = 0.842, \quad r^2 = 0.709, \quad s = 0.280$$

แบบจำลองสมการที่ดีที่สุดที่แสดงความสัมพันธ์สมบัติเชิงโครงสร้างที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี HF/3-21G กับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดกลายพันธุ์ คือแบบจำลองสมการที่ 4

$$\log(1/IC_{90}) = +0.062(\pm 0.006)MR + 14.245(\pm 2.551)C_9 - 9.006(\pm 1.789)H_{14} + 0.071(\pm 1.333) \quad (4)$$

$$r = 0.890, \quad r^2 = 0.792, \quad s = 0.250$$

จากการเปรียบเทียบพบว่าแบบจำลองสมการ 4 เป็นแบบจำลองที่ดีที่สุดในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติเชิงโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดกลายพันธุ์ (K103N) เมื่อพิจารณาจากค่าทางสถิติ คือค่า r และ r^2 คือ ซึ่งได้จากการคำนวณด้วยวิธีที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธี HF/3-21G

ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดกลายพันธุ์ของสารประกอบในกลุ่มอีฟาเวียร์เนซ ตัวอธิบายสมบัติของอิเล็กทรอนิกส์จัดเป็นตัวอธิบายที่สำคัญต่อกัมมันตภาพในการยับยั้งได้แก่ C_9 และ H_{14} โดย C_9 มีความสัมพันธ์สูงกับ C_5 ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากตำแหน่งของหมู่แทนที่พบว่า X ที่เกาะอยู่ที่ C_5 ควรจะเป็นหมู่ electron withdrawing จึงจะส่งผลให้ค่ากัมมันตภาพมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้แล้วสมบัติเชิงโมเลกุลที่มีต่อความสำคัญต่อการยับยั้งเอนไซม์คือ molar refractivity (MR) ของโมเลกุล ดังนั้นโมเลกุลที่มีหมู่แทนที่ที่มีความเกะกะมากจะส่งผลให้ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งสูงขึ้น

2.1.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกัมมันตภาพแบบ โฮโลแกรม (Hologram quantitative structure activity relationship, HQSAR)

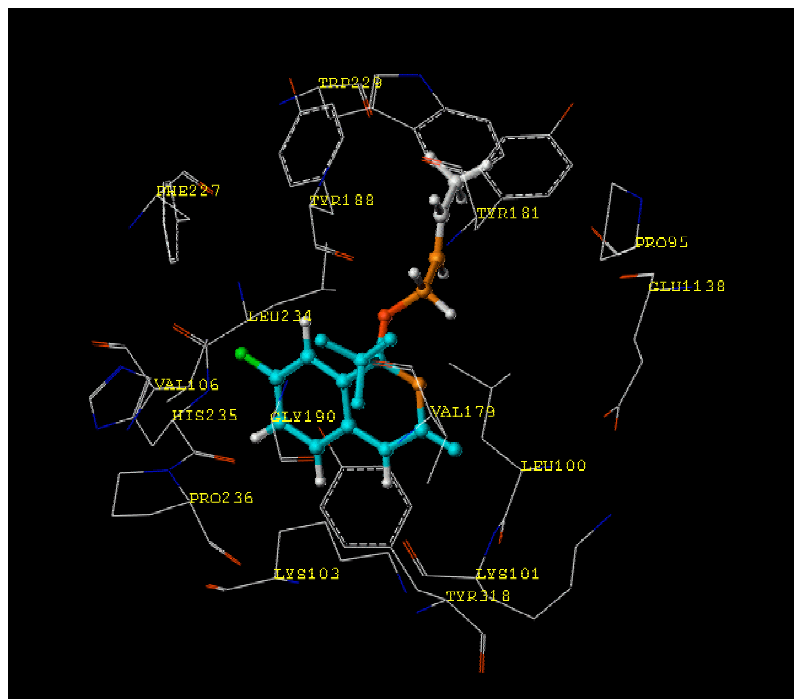
ผลจากการศึกษาพบว่าแบบจำลองโฮโลแกรมที่สร้างจากการศึกษาความสัมพันธ์ ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ทั้ง ชนิดดั้งเดิม และชนิดกลายพันธุ์ (K103N) มีความน่าเชื่อถือในทางสถิติและมีประสิทธิภาพในการทำนายสูง ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยมีค่า $r^2_{cv} = 0.655$ และ $s\text{-press} = 0.141$ สำหรับแบบจำลองที่สร้างจากกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิม และ $r^2_{cv} = 0.783$ และ $s\text{-press} = 0.256$ สำหรับ แบบจำลองที่สร้างจากกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดกลายพันธุ์ (K103N)

ตารางที่ 4 แสดงแบบจำลองของ HQSAR ของอนุพันธ์ของตัวยับยั้งอีฟาเวียร์จำนวน 52 โครงสร้าง

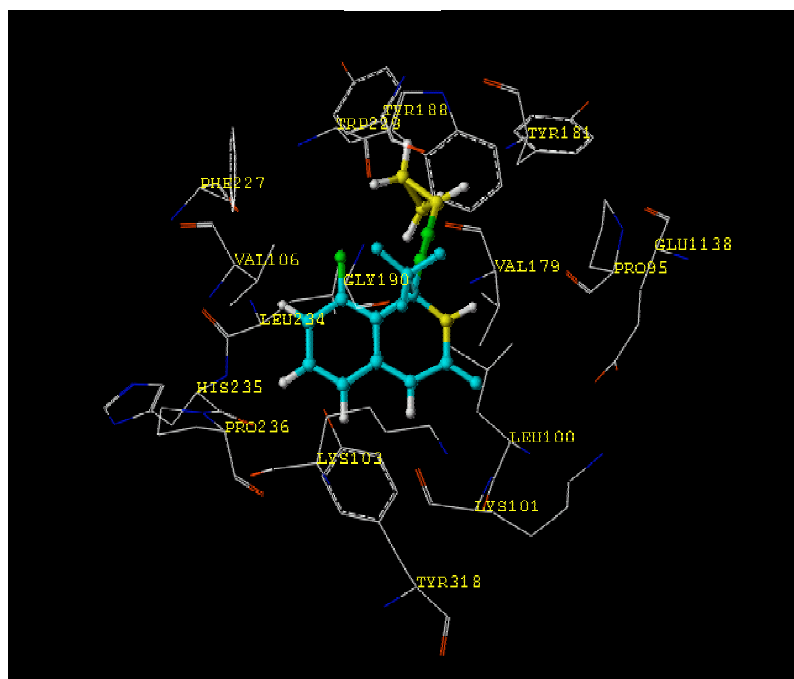
แบบจำลอง	กัมมันตภาพการยับยั้ง	noc	r^2_{cv}	SE_{cv}	r^2	SE
1	WT HIV-1 RT	4	0.655	0.141	0.871	0.118
2	K103N HIV-1 RT	3	0.783	0.256	0.854	0.132

แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากแบบจำลองได้แสดงถึงองค์ประกอบสำคัญของโมเลกุล (molecular fragment) ที่มีผลต่อกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 (รูปที่ 4-5) โดยจะแสดงผลออกมาด้วยรหัสของสีของแต่ละอะตอมที่มีผลต่อการแสดงกัมมันตภาพมีรายละเอียดดังนี้ กลุ่มสีแดง (แดง แดงส้ม ส้ม) แสดงว่ากลุ่มอะตอมหรือองค์ประกอบเหล่านี้ลดความสามารถในการยับยั้ง ในขณะที่กลุ่มสีเขียว (เหลือง เขียวน้ำเงิน เขียว) แสดงว่ากลุ่มอะตอมหรือองค์ประกอบเหล่านี้เพิ่มความสามารถในการยับยั้ง

จากแผนภาพ HQSAR ที่ศึกษาระหว่างอีฟาเวียร์และเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 (รูปที่ 4-5) ได้นำเอาอะมิโน แอซิดเรซิดิว ที่บริเวณรอบโพรงการจับ (binding pocket) มาพิจารณาร่วมด้วย ผลการศึกษาพบว่าหมู่แทนที่ X ที่ตำแหน่ง C₅ หรือ C₆ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการแสดงกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์ดังแสดงด้วยสีเขียวในรูปที่ 4 หมู่ OCH₃ เกาะที่ตำแหน่ง C₅ หมู่แทนที่ Z คือ อะตอมไนโตรเจน และ หมู่ CC-Cyclopropyl แทนที่ที่ตำแหน่ง R ดังแสดงสีเหลือง ในขณะที่ Z เมื่อแทนที่ด้วยอะตอมออกซิเจนและหมู่ OCH₂CHCHCH₃(trans) เกาะที่ตำแหน่ง R ทำให้กัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบลดลงดังแสดงด้วยสีส้ม ข้อมูลที่ได้จากแบบจำลองชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างของโครงสร้างที่สำคัญของตัวยับยั้งที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ (K103N) เมื่อพิจารณาแผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาทาง QSAR ร่วมกับโพรงการจับไฮโดรโฟบิก ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์พบว่าสอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลองด้านการจับกันระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์



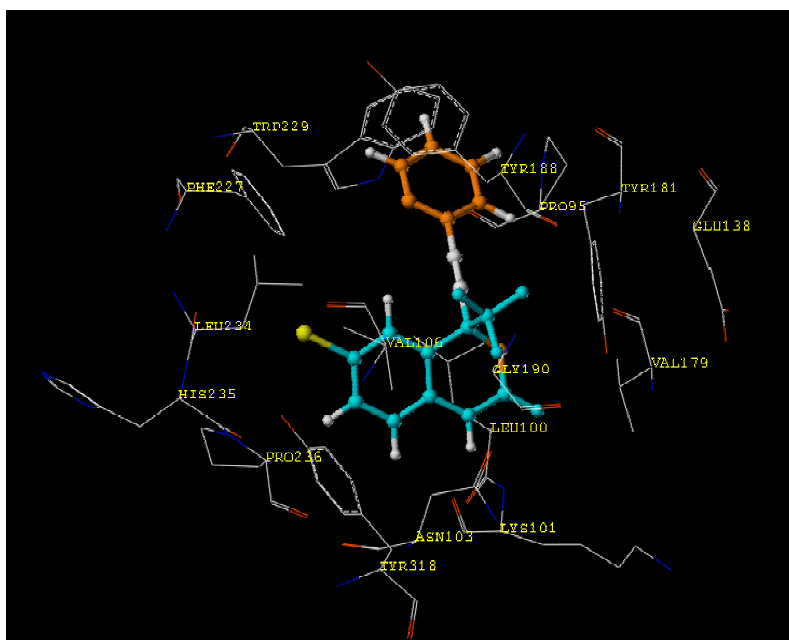
(ก)



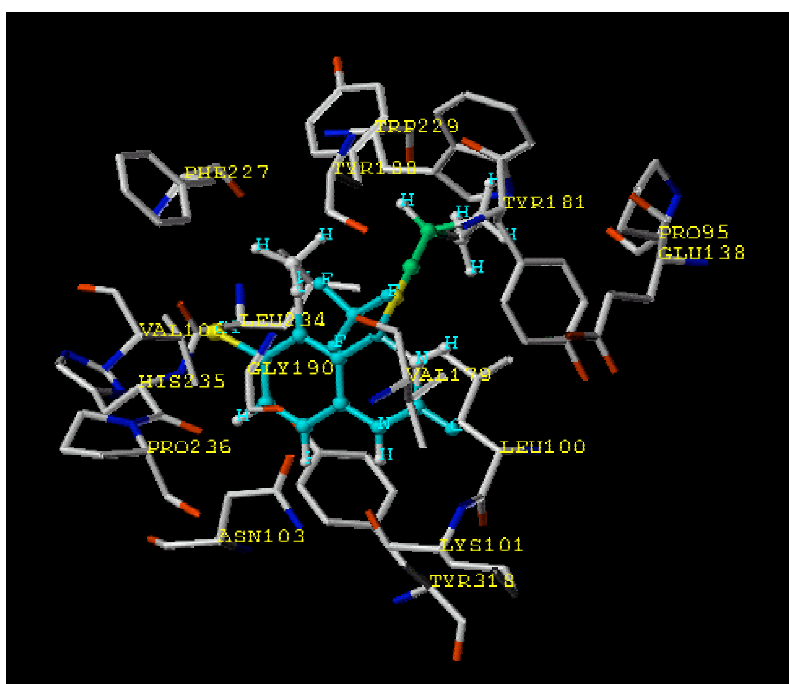
(ข)

ภาพที่ 5 (ก) แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาโดยระเบียบวิธี HQSAR ระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz 17 (ตารางที่ 1) กับเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดดั้งเดิม

(ข) แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาโดยระเบียบวิธี HQSAR ระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz 21 (ตารางที่ 1) กับเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดดั้งเดิม



(ก)



(ข)

ภาพที่ 6 (ก) แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาโดยระเบียบวิธี HQSAR ระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz 2 (ตารางที่ 1) กับเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดกลายพันธุ์ (K103N)

(ข) แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาโดยระเบียบวิธี HQSAR ระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz 46 (ตารางที่ 1) กับเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดกลายพันธุ์ (K103N)

2.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในเชิงสามมิติ

(Three- dimensional quantitative structure activity relationship, 3D-QSAR)

2.2.1 วิธีการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามของโมเลกุล (Comparative Molecular Fields Analysis, CoMFA)

2.2.1.1 แบบจำลองคอมพิวเตอร์สำหรับการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี-1 ของสารในกลุ่มอนุพันธ์อีฟาเวียร์

ได้ทำการสร้างแบบจำลองคอมพิวเตอร์โดยเปรียบเทียบค่าความน่าเชื่อถือของแบบจำลองที่คำนวณสมบัติทางโครงสร้างของตัวยับยั้งด้วยวิธีเคมีเอ็มพีรีคัล AM1 และ แอบอินิซิโอ HF/3-21G ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปแบบจำลองคอมพิวเตอร์ของสารอนุพันธ์อีฟาเวียร์ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี 1 แบบดั้งเดิมและกลายพันธุ์ (K103N) ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าแบบจำลองคอมพิวเตอร์ที่ได้จากการคำนวณสมบัติทางโครงสร้างด้วยวิธี AM1 และ HF/3-21G ได้แบบจำลองที่ดีทั้งในด้านคุณภาพทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญและคุณภาพในการทำนายกัมมันตภาพสำหรับการยับยั้งเอนไซม์ที่แตกต่างกันทั้งสองชนิด โดยแบบจำลองที่สร้างจากกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิมมีค่า $r^2_{cv} = 0.687$ และ s-press = 0.155 และค่า $r^2_{cv} = 0.656$ และ s-press = 0.059 เมื่อนำข้อมูลมาจากการคำนวณด้วยวิธี AM1 และ HF/3-21G ตามลำดับสำหรับแบบจำลองที่สร้างจากกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดกลายพันธุ์ (K103N) มีค่า $r^2_{cv} = 0.804$ และ s-press = 0.224 และค่า $r^2_{cv} = 0.762$ และ s-press = 0.094 เมื่อนำข้อมูลมาจากการคำนวณด้วยวิธี AM1 และ HF/3-21G ตามลำดับ

สำหรับผลการศึกษาคอมพิวเตอร์นั้นจะแสดงอันตรกิริยาของตัวยับยั้งที่มีผลต่อเอนไซม์การถ่ายแบบ 2 แบบคือ อันตรกิริยาสเตอริก และอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก โดยจากแบบจำลองคอมพิวเตอร์ที่ดีที่สุดจะนำเอาค่าสัมประสิทธิ์ของตัวอธิบายในสมการแสดงเป็นภาพคอนทัวร์ positive coefficient contour map หมายถึงควรเพิ่มอันตรกิริยาในโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง และ negative coefficient contour map หมายถึง ควรลดอันตรกิริยาในโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง ในการศึกษาการเสนออันตรกิริยาของโครงสร้างโมเลกุล โครงสร้างในโมเลกุลนั้นจะแสดงดังรายละเอียดต่อไปนี้ Green coefficient contour map แสดงถึงการเพิ่มอันตรกิริยาแบบสเตอริกในโมเลกุลจะช่วยให้เพิ่มความสามารถในการยับยั้ง Yellow coefficient contour map แสดงถึงการลดอันตรกิริยาแบบสเตอริกในโมเลกุลจะช่วยให้เพิ่มความสามารถในการยับยั้ง Red coefficient contour map แสดงถึงการเพิ่มการกระจายอิเล็กตรอนในโมเลกุลจะช่วยให้เพิ่มความสามารถในการยับยั้ง Blue coefficient contour map แสดงถึงการลดการกระจายอิเล็กตรอนโมเลกุลจะช่วยให้เพิ่มความสามารถในการยับยั้ง

อย่างไรก็ตามเนื่องจากแบบจำลองที่ได้จากการคำนวณสมบัติทางโครงสร้างของตัวยับยั้งด้วยวิธี AM1 และ HF/3-21G มีความสามารถในการทำนายและนัยสำคัญ

ของค่าทางสถิติสูงและค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของตัวยับยั้งที่ได้จากการคำนวณทั้ง 2 แบบ พบว่าวิธี HF/3-21G ให้โครงสร้างที่ใกล้เคียงกับผลการทดลองทางผลึกเอกซเรย์มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกแบบจำลองที่ได้จากการคำนวณสมบัติทางโครงสร้างด้วยวิธี HF/3-21G เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป นั่นคือพิจารณาเลือกแบบจำลองที่ 5 และ 6 สำหรับการอธิบายการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ (K103N) ตามลำดับ

ตารางที่ 5. แสดงแบบจำลองคอมพลาของสารอนุพันธ์ efaviarens ที่ได้จากการคำนวณปรับโครงสร้างโดยวิธี AM1 (52 โครงสร้าง)

Model	Inhibitory Activity	Field Type	noc	r_{cv}^2	s-press	Steric contribution
3	WT HIV-1 RT	Both	6	0.687	0.155	54.2
4	K103N HIV-1 RT	Both	6	0.804	0.224	52.4

ตารางที่ 6. แสดงแบบจำลองคอมพลาของสารอนุพันธ์ efaviarens ที่ได้จากการคำนวณปรับโครงสร้างโดยวิธี HF/3-21G. (52 โครงสร้าง)

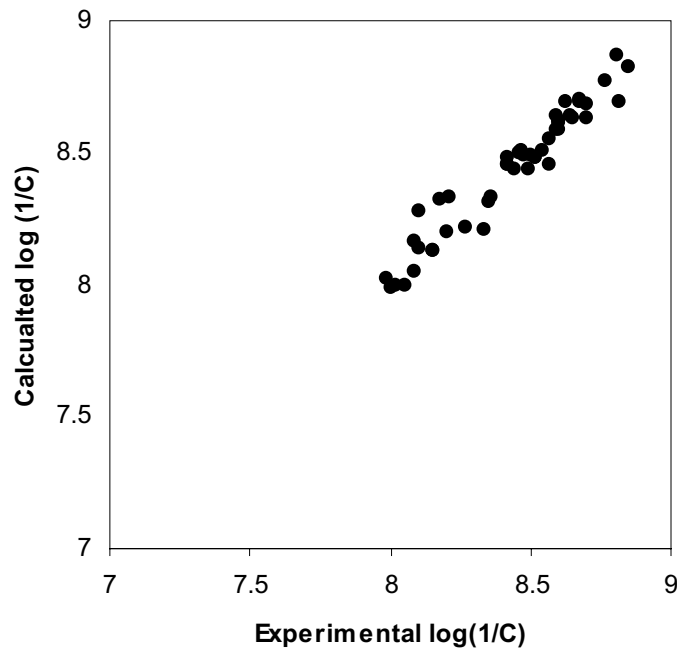
Model	Inhibitory Activity	Field Type	noc	r_{cv}^2	s-press	S t e r i c contribution
5	WT HIV-1 RT	Both	6	0.656	0.059	58.8
6	K103N HIV-1 RT	Both	6	0.762	0.094	54.4

ตารางที่ 7. ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวีที่ได้จากการทดลองและทำนายโดยแบบจำลองคอมพลาที่อยู่ในรูปของ $\log (1/C)$ ของตัวยับยั้งในกลุ่ม efaviarens ที่เป็นกลุ่มของ Test set (8 โครงสร้าง)

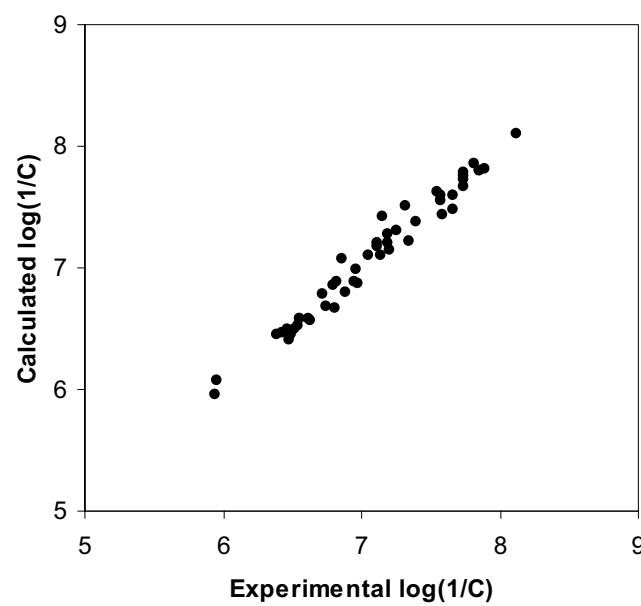
Copds. No.	WT RT		K103N	
	Expt.log(1/C)	Calc. log (1/C) ^a	Expt.log (1/C)	Calc. log (1/C) ^b
T1	8.40	8.37	6.84	6.20
T2	8.59	8.45	6.71	6.91
T3	8.65	8.48	7.23	6.41
T4	8.57	8.14	7.08	6.37
T5	8.53	8.21	6.97	6.29
T6	8.19	8.85	5.79	6.96
T7	8.17	8.07	7.52	6.84
T8	8.10	8.48	7.11	7.52

^a คำนวณค่ากัมมันตภาพจากแบบจำลองคอมพลาที่ 5

^b คำนวณค่ากัมมันตภาพจากแบบจำลองคอมพลาที่ 6



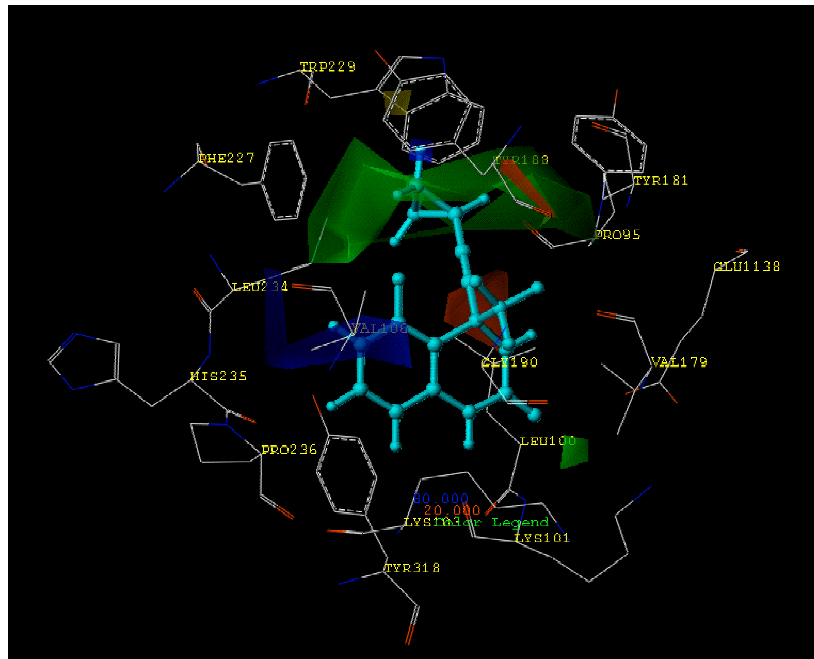
ภาพที่ 7 กราฟแสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี 1 ของกลุ่ม training set ที่ได้จากการทดลองและการทำนายโดยแบบจำลองคอมพิวเตอร์ (แบบจำลองที่ 5)



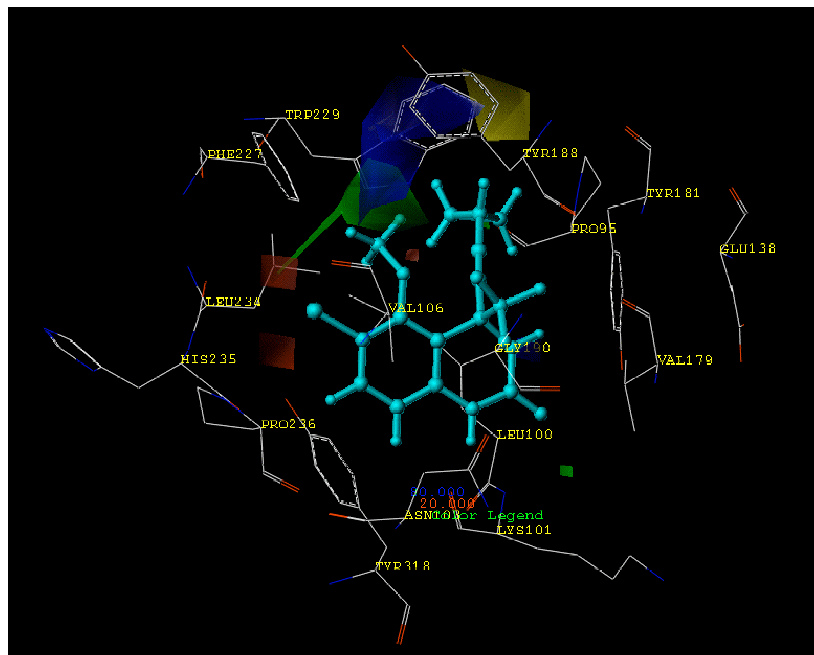
ภาพที่ 8 กราฟแสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี 1 ของกลุ่ม training set ที่ได้จากการทดลองและการทำนายโดยแบบจำลองคอมพิวเตอร์ (แบบจำลองที่ 6)

2.2.1.2 อันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์ของอีฟาเวียร์และเอนไซม์เอชไอวี

ในการพิจารณาแผนภาพคอนทอร์คอมฟา (รูปที่ 9) ได้นำเอาโครงสร้างของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 บริเวณโพรงการจับที่เกิดการยับยั้งมาพิจารณาเพื่อเป็นส่วนช่วยเพิ่มความเข้าใจในการเกิดอันตรกิริยาและการออกแบบโมเลกุลของตัวยับยั้งเอนไซม์ของตัวยับยั้ง เอชไอวี-1 ที่มีกัมมันตภาพสูงต่อไป ผลการศึกษาพบว่าในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิม สารยับยั้งอีฟาเวียร์บริเวณหมู่แทนที่ R ตำแหน่ง C₄ มีอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติกเนื่องจากพบคอนทอร์สแดง (รูปที่ 9(ก)) ดังนั้นในการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่บริเวณนี้ควรเป็นหมู่ที่มีความหนาแน่นของประจุอิเล็กตรอนจำนวนมากเพื่อเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้ง นอกจากนี้ขนาดของหมู่แทนที่ควรมีขนาดใหญ่มีความกะทัดรัดมากขึ้นเนื่องจากมีคอนทอร์สเขียวขนาดใหญ่ที่บริเวณใกล้เคียง ในขณะที่บริเวณ C₆ ควรมีหมู่แทนที่ที่ทำให้มีการกระจายประจุของอิเล็กตรอนบริเวณนั้นลดน้อยลงเพื่อเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้ง เนื่องจากมีคอนทอร์สน้ำเงินอยู่ใกล้บริเวณนี้ สำหรับการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดกลายพันธุ์ (K103N) พิจารณาได้จากแผนภาพคอนทอร์คอมฟา(รูปที่ 9(ข)) พบว่ามีความแตกต่างของความต้องการทางโครงสร้างที่สำคัญในการยับยั้งเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดดั้งเดิมอย่างเด่นชัด โดยสารยับยั้งบริเวณหมู่แทนที่ X ที่เกาะอยู่ที่ตำแหน่ง C₆ มีอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติกเนื่องจากพบคอนทอร์สแดงล้อมรอบอยู่บริเวณนี้ ดังนั้นในการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ควรเป็นหมู่ที่ทำให้การกระจายอิเล็กตรอนบริเวณนี้สูงขึ้น เช่น electron withdrawing group เพื่อเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้ง ในขณะที่ตำแหน่ง C₅ ควรมีหมู่แทนที่มีความกะทัดรัดเพื่อเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้งเนื่องจากมีคอนทอร์สเขียวในบริเวณนี้ นอกจากนี้แล้วหมู่แทนที่ R เกาะอยู่ที่ C₄ พบคอนทอร์สน้ำเงินและสีเหลืองในบริเวณใกล้เคียงกัน แสดงว่ามีอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตรสแตติกและสเตอริก ดังนั้นหมู่แทนที่นี้ควรมีความกะทัดรัดไม่มากและให้การกระจายของอิเล็กตรอนน้อยจะส่งผลต่อการเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้ง โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์แผนภาพคอนทอร์สนาม สเตอริก และ อิเล็กโตรสแตติก สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อชี้แนะการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารตัวใหม่ในกลุ่ม efavirenz ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ (K103N) ได้ต่อไป



(ก)



(ข)

ภาพที่ 9 (ก) แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาโดยระเบียบวิธี CoMFA ระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz ที่คำนวณโครงสร้างด้วยวิธี HF/3-21G กับเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดดั้งเดิม (WT)

(ข) แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาโดยระเบียบวิธี CoMFA ระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz ที่คำนวณโครงสร้างด้วยวิธี HF/3-21G กับเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดกลายพันธุ์ (K103N)

2.2.2 วิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (Comparative Similarity Index Analysis, CoMSIA)

2.2.2.1 แบบจำลองคอมเชิงสำหรับการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี-1 ของสารในกลุ่มอนุพันธ์อีฟาเวียร์

ได้ทำการสร้างแบบจำลองคอมเชิงโดยเปรียบเทียบค่าความน่าเชื่อถือของแบบจำลองที่คำนวณสมบัติทางโครงสร้างของตัวยับยั้งด้วยวิธีเคมีอมพิริคัล AM1 และ แอบอินฮิบิเตอร์ HF/3-21G ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปแบบจำลองคอมเชิงของสารอนุพันธ์อีฟาเวียร์ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี 1 แบบดั้งเดิมและกลายพันธุ์ (K103N) ดังแสดงในตารางที่ 12 และ 13 ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าแบบจำลองคอมเชิงที่ได้จากการคำนวณสมบัติทางโครงสร้างด้วยวิธี AM1 และ HF/3-21G ให้ผลที่ดีทั้งในด้านคุณภาพทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญและประสิทธิภาพในการทำนายกัมมันตภาพสำหรับการยับยั้งเอนไซม์ที่แตกต่างกันทั้งสองชนิด โดยแบบจำลองที่สร้างจากกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดดั้งเดิมมีค่า $r^2_{cv} = 0.670$ และ s-press = 0.251 และค่า $r^2_{cv} = 0.740$ และ s-press = 0.140 เมื่อนำข้อมูลมาจากการคำนวณด้วยวิธี AM1 และ HF/3-21G ตามลำดับสำหรับแบบจำลองที่สร้างจากกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ชนิดกลายพันธุ์ (K103N) มีค่า $r^2_{cv} = 0.789$ และ s-press = 0.241 และค่า $r^2_{cv} = 0.794$ และ s-press = 0.258 เมื่อนำข้อมูลมาจากการคำนวณด้วยวิธี AM1 และ HF/3-21G ตามลำดับ

สำหรับผลการศึกษาคอมเชิงนั้นจะแสดงอันตรกิริยาของตัวยับยั้งที่มีผลต่อเอนไซม์การถ่ายแบบ 5 แบบคือ อันตรกิริยาสเตอริก อันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก อันตรกิริยาการให้โปรตอนและอันตรกิริยาการรับโปรตอน ในทำนองเดียวกับการศึกษาคอมฟา สามารถที่จะนำเอาค่าสัมประสิทธิ์ของตัวอธิบายในสมการแสดงเป็นภาพคอนทัวร์ positive coefficient contour map หมายถึงควรเพิ่มอันตรกิริยาในโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง และ negative coefficient contour map หมายถึง ควรลดอันตรกิริยาในโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง ในการศึกษาการเสนออันตรกิริยาของโครงสร้างโมเลกุล โครงสร้างในโมเลกุลนั้นจะแสดงดังรายละเอียดต่อไปนี้ Green coefficient contour map แสดงถึงการเพิ่มอันตรกิริยาแบบสเตอริกในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง Yellow coefficient contour map แสดงถึงการลดอันตรกิริยาแบบสเตอริกในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง Red coefficient contour map แสดงถึงการเพิ่มการกระจายอิเล็กตรอนในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง Blue coefficient contour map แสดงถึงการลดการกระจายอิเล็กตรอนโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง Magenta coefficient contour map แสดงถึงการเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิกในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง White coefficient contour map แสดงถึงการลดความเป็นไฮโดรโฟบิกในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง Cyan coefficient contour map แสดงถึงการเพิ่มความสามารถในการให้โปรตอนในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง

สามารถในการยับยั้ง Purple coefficient contour map แสดงถึงการลดความสามารถในการให้โปรตอนในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง Orange coefficient contour map แสดงถึงการเพิ่มความสามารถในการรับโปรตอนในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง White coefficient contour map แสดงถึงการลดความสามารถในการรับโปรตอนในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง

อย่างไรก็ตามเนื่องจากแบบจำลองที่ได้จากการคำนวณสมบัติทางโครงสร้างของตัวยับยั้งด้วยวิธี AM1 และ HF/3-21G มีค่าความสามารถในการทำนายและนัยสำคัญของค่าทางสถิติสูงและค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของตัวยับยั้งที่ได้จากการคำนวณทั้ง 2 แบบ พบว่าวิธี HF/3-21G ให้โครงสร้างที่ใกล้เคียงกับผลการทดลองทางฟลักเอ็กซ์เรย์มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกแบบจำลองที่ได้จากการคำนวณสมบัติทางโครงสร้างด้วยวิธี HF/3-21G เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป นั่นคือพิจารณาเลือกแบบจำลองที่ 9 และ 10 สำหรับการอธิบายการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ (K103N) ตามลำดับ

ตารางที่ 12. แสดงแบบจำลองคอมพิวเตอร์ของสารอนุพันธ์ efaviarensz ที่ได้จากการคำนวณปรับโครงสร้างโดยวิธี AM1 (52 โครงสร้าง)

Model	Inhibitory Activity	Field type	noc	r_{cv}^2	s	r^{2a}	SEE	F
7	WT HIV-1 RT	All fields	6	0.670	0.251	0.905	0.092	68.45
8	K103N HIV-1 RT	All fields	4	0.789	0.241	0.897	0.198	115.6

^a conventional r^2

ตารางที่ 13. แสดงแบบจำลองคอมพิวเตอร์ของสารอนุพันธ์ efaviarensz ที่ได้จากการคำนวณปรับโครงสร้างโดยวิธี HF/3-21G. (52 โครงสร้าง)

Model	Inhibitory Activity	Field type	noc	r_{cv}^2	s	r^{2a}	SEE	F
9	WT HIV-1 RT	All fields	6	0.704	0.140	0.917	0.074	73.256
10	K103N HIV-1 RT	All fields	3	0.794	0.258	0.887	0.191	122.688

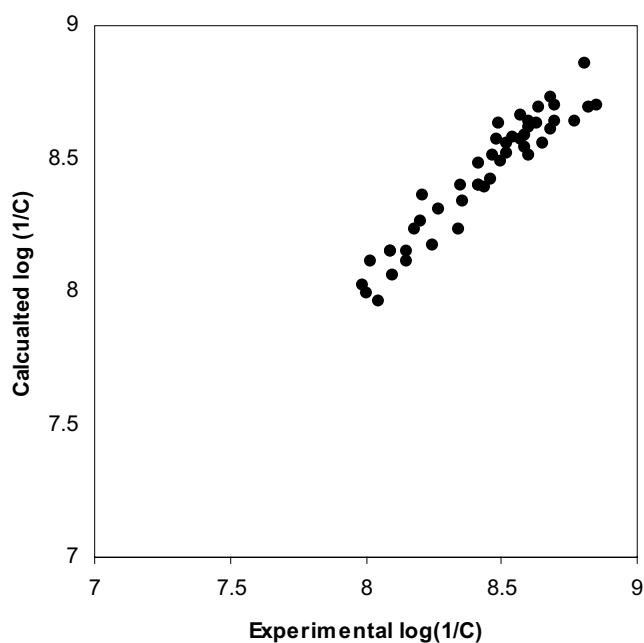
^a conventional r^2

ตารางที่ 14. ค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวีที่ได้จากการทดลองและทำนายโดยแบบจำลองคอมเชิงที่อยู่ในรูปของ $\log(1/C)$ ของตัวยับยั้งในกลุ่ม efaviarensz ที่เป็นกลุ่มของ Test set (8 โครงสร้าง)

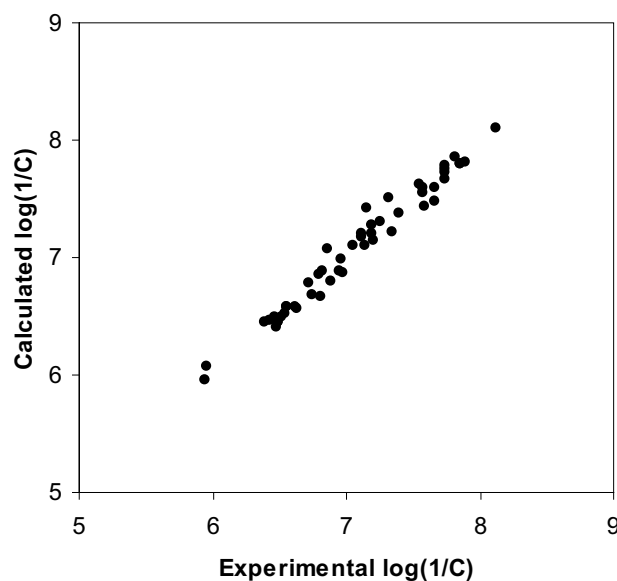
Cpds. No.	WT RT		K103N	
	Expt.log (1/C)	Calc. Log (1/C) ^a	Expt.log (1/C)	Calc. log (1/C) ^b
T1	8.40	8.27	6.94	6.15
T2	8.59	8.47	6.71	6.49
T3	8.65	8.35	7.23	6.08
T4	8.57	8.00	7.08	6.61
T5	8.53	8.13	6.97	6.64
T6	8.19	8.76	5.79	7.08
T7	8.17	8.04	7.52	6.34
T8	8.10	8.23	7.11	7.27

^a คำนวณค่ากัมมันตภาพจากแบบจำลองคอมเชิงที่ 9

^b คำนวณค่ากัมมันตภาพจากแบบจำลองคอมเชิงที่ 10



ภาพที่ 10 กราฟแสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี 1 ของกลุ่ม training set ที่ได้จากการทดลองและการทำนายโดยแบบจำลองคอมเชิง (แบบจำลองที่ 9)

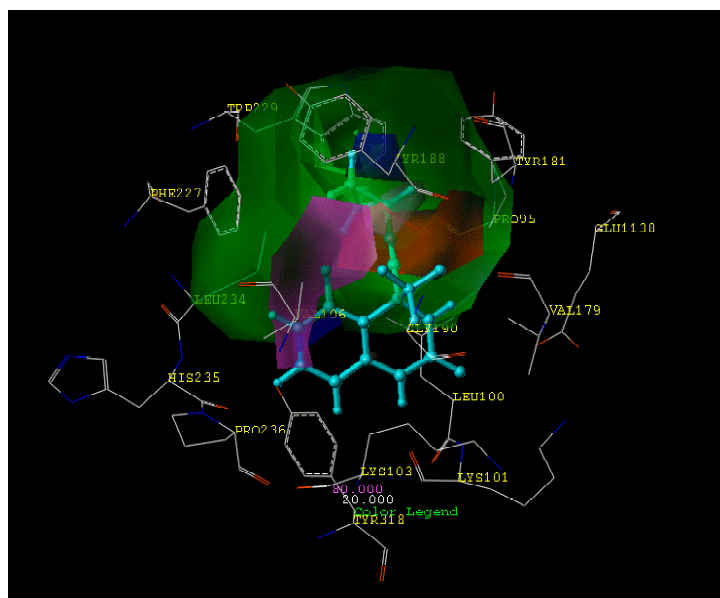


ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่ากัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี-1 ของกลุ่ม training set ที่ได้จากการทดลองและการทำนายโดยแบบจำลองคอมเซีย (แบบจำลองที่ 10)

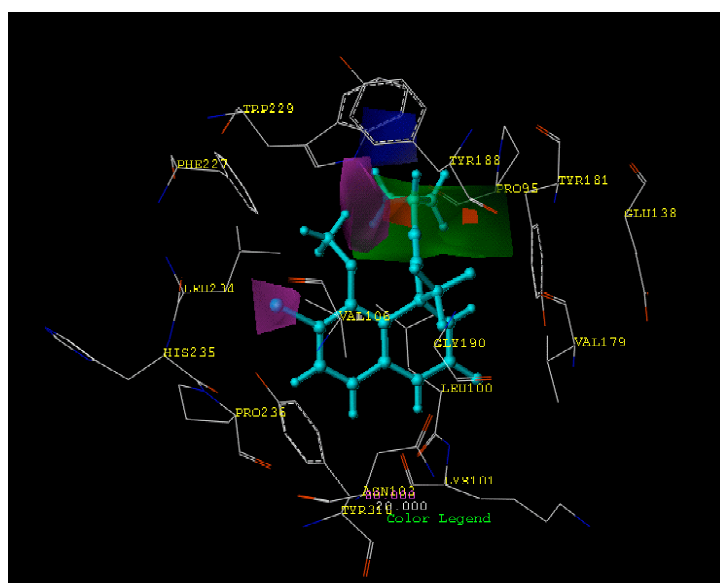
2.2.2.2 อันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์ของอีฟาเวียร์และเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี

ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดดั้งเดิม แผนภาพคอนทัวร์คอมเซีย ของสนามสเตอริก อิเล็กโตรสแตติก ไฮโดรโฟบิก (แสดงดังรูป 12 (ก)) การให้โปรตอน และการรับโปรตอน (แสดงดังรูป 13 (ก)) ได้นำเอาโครงสร้างของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 บริเวณโพรงการจับที่เกิดการยับยั้งมาพิจารณาเพื่อเป็นส่วนช่วยเพิ่มความเข้าใจในการเกิดอันตรกิริยาและการออกแบบโมเลกุลของตัวยับยั้งเอนไซม์ของตัวยับยั้ง เอชไอวี-1 ที่มีกัมมันตภาพสูงต่อไป ผลการศึกษาพบว่าสำหรับอันตรกิริยาสเตอริก อิเล็กโตรสแตติก ให้ข้อมูลชี้แนะการออกแบบโมเลกุลเพื่อให้ได้กัมมันตภาพสูงขึ้นที่สอดคล้องกับแบบจำลองคอมฟา ข้อมูลสำคัญที่เพิ่มขึ้นมาคืออันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกพบว่าสารยับยั้งบริเวณหมู่แทนที่ X ตำแหน่ง C₅ หรือ C₆ มีคอนทัวร์สีชมพูแสดงถึงการชี้แนะการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ที่ให้ค่าไฮโดรโฟบิกของโมเลกุลสูงขึ้น เพื่อส่งผลให้มีกัมมันตภาพในการยับยั้งสูงขึ้น นอกจากนี้แล้วยังมีอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกบริเวณหมู่ R ซ้อนทับกับคอนทัวร์สีแดงและสีเขียว ซึ่งเห็นว่าหมู่แทนที่ R ที่ตำแหน่ง C₄ ควรมีความกะทัดรัดสูง และมีการกระจายของอิเล็กตรอนสูงแต่ทำให้โมเลกุลมีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูง จะเป็นผลดีต่อการเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวีชนิดดั้งเดิม ในทำนองเดียวกับการยับยั้งกัมมันตภาพของเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวีชนิดดั้งเดิม สำหรับการแสดงกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวีชนิดกลายพันธุ์ (K103N) ของตัวยับยั้งในกลุ่มอีฟาเวียร์ แผนภาพคอนทัวร์คอมเซียของสนามสเตอริก อิเล็ก

ไตรสแตติก ไฮโดรโฟบิก (แสดงดังรูป 12 (ข)) การให้โปรตอน และการรับโปรตอน (แสดงดังรูป 13 (ข)) พบว่าในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวีชนิดกลายพันธุ์ (K103N) ของตัวยับยั้งในกลุ่มอีฟาเวียร์มีอันตรกิริยาสเตอริกและอิเล็กทรอนิกส์สอดคล้องกับแบบจำลองคอมพิวเตอร์ ข้อมูลสำคัญที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นคือมีอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกแสดงดังคอนทราสต์ที่บริเวณหมู่แทนที่ X ที่ตำแหน่ง C₆ แสดงว่าหมู่แทนที่ตำแหน่งนี้ควรทำให้ความเป็นไฮโดรโฟบิกของโมเลกุลสูงขึ้น และยังมีคอนทราสต์ที่สัมพันธ์กับสีเขียวบริเวณหมู่แทนที่ R เกาะที่ตำแหน่ง C₄ แสดงว่าหมู่แทนที่นี้ควรมีความเกะกะสูงและทำให้มีค่าไฮโดรโฟบิกของโมเลกุลสูงขึ้น อาจจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มกัมมันตภาพในการยับยั้ง นอกจากนี้แล้วคอนทราสต์ที่บริเวณหมู่แทนที่ R ซึ่งให้เห็นว่าหมู่แทนที่ที่ทำให้โมเลกุลมีความสามารถในการรับโปรตอนได้ดีเกาะที่บริเวณนี้จะส่งผลทำให้กัมมันตภาพในการยับยั้งเพิ่มขึ้น ในขณะที่บริเวณหมู่แทนที่ Z มีคอนทราสต์สีม่วงแสดงว่าบริเวณนี้ควรมีหมู่แทนที่ที่มีสมบัติในการรับโปรตอนได้ดี จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งได้สูงขึ้น



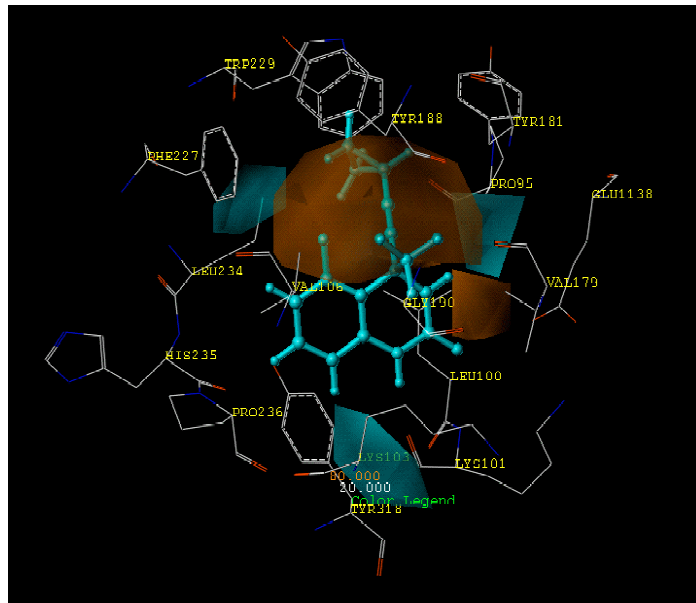
(ก)



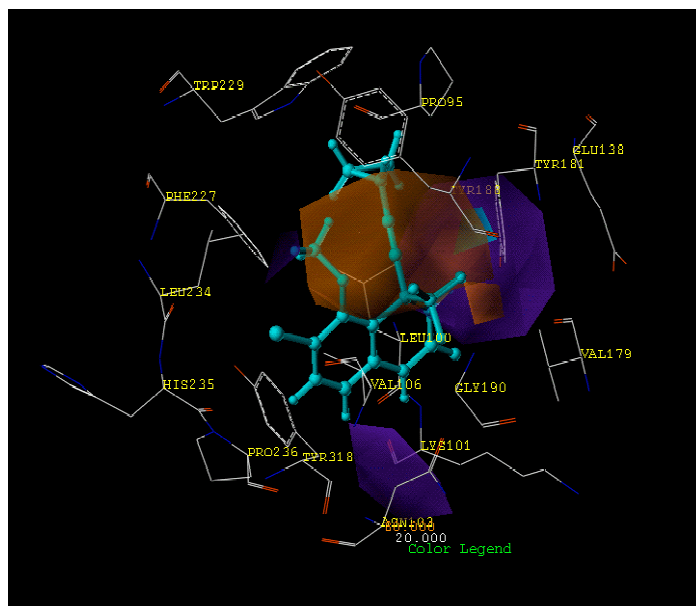
(ข)

ภาพที่ 12 (ก) แผนภาพคอนทัวร์สนาม Steric, electrostatic, hydrophobic ที่ได้จากการศึกษาโดยระเบียบวิธี CoMSIA ระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz ที่คำนวณโครงสร้างด้วยวิธี HF/3-21G กับเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดดั้งเดิม

(ข) แผนภาพคอนทัวร์สนาม Steric, electrostatic, hydrophobic ที่ได้จากการศึกษาโดยระเบียบวิธี CoMSIA ระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz ที่คำนวณโครงสร้างด้วยวิธี HF/3-21G กับเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดกลายพันธุ์ (K103N)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 13 (ก) แผนภาพคอนทัวร์สนาม Hydrogen donor และ hydrogen acceptor ที่ได้จาก การศึกษาโดยระเบียบวิธี CoMSIA ระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz ที่คำนวณโครงสร้างด้วยวิธี HF/3-21G กับเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดดั้งเดิม

(ข) แผนภาพคอนทัวร์สนาม Hydrogen donor และ hydrogen acceptor ที่ได้จาก การศึกษาโดยระเบียบวิธี CoMSIA ระหว่างตัวยับยั้ง efavirenz ที่คำนวณโครงสร้างด้วยวิธี HF/3-21G กับเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดกลายพันธุ์ (K103N)

เมื่อพิจารณาแผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาทาง QSAR ทุกวิธีร่วมกับโพรงไฮโดรโฟบิกซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์พบว่าข้อมูลที่ได้จากทุกแบบจำลองชี้ให้เห็นอย่างเด่นชัดถึงความแตกต่างของโครงสร้างที่สำคัญของตัวยับยั้งที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบที่แตกต่างกัน นอกจากนั้นแล้วผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทุกวิธีสอดคล้องกันทั้งยังสอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลองด้านการจับกันระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ ทำให้สามารถอธิบายความสำคัญของอันตรกิริยาแบบสเตอริกและไฮโดรโฟบิกในโครงสร้างตัวยับยั้งกับโพรงไฮโดรโฟบิก ของเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย amino acid residues โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ที่ตำแหน่ง Lysine 103 ได้เป็นอย่างดี และเมื่อ amino acid ในตำแหน่งดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์จาก Lysine เป็น Asparagine จึงทำให้อันตรกิริยาในส่วนของ steric electrostatic hydrophobic H-donor และ H-acceptor ระหว่าง ตัวยับยั้งกับเอนไซม์ในบริเวณนี้เปลี่ยนไป และอาจทำให้ตัวยับยั้งไม่สามารถแสดงกัมมันตภาพที่ดีได้ ซึ่งผลการศึกษานี้เป็นการพื้นฐานสำคัญที่สามารถอธิบายอันตรกิริยาที่แตกต่างกันของตัวยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (WT) และมีการกลายพันธุ์ (K103N) ได้โดยการศึกษาทางโมเลคิวลาร์โมเดลลิ่ง ซึ่งเป็นประโยชน์ในการออกแบบสารยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์ efavirenz ที่คาดว่าจะมีกัมมันตภาพสูงขึ้นในการยับยั้งต่อเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ที่มีการกลายพันธุ์ (K103N) ต่อไป

3. การออกแบบโมเลกุลของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ในกลุ่มสารอนุพันธ์อีฟาเวียร์

แบบจำลองที่ได้จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพด้วยวิธี HQSAR, COMFA และ COMSIA มีความน่าเชื่อถือในทางสถิติ และมีประสิทธิภาพในการทำนายสูง และแต่ละแบบจำลองให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน จึงนับว่าเป็นแบบจำลองที่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวอธิบายโครงสร้างกับกัมมันตภาพได้เป็นอย่างดี แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากแบบจำลองจากวิธี COMFA ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของอันตรกิริยาสเตอริก และอิเล็กทรอนิกส์ของโมเลกุลที่มีต่อกัมมันตภาพ และผลจากแบบจำลองวิธี COMSIA ให้ข้อมูลที่เพิ่มความเข้าใจในความต้องการทางสนามสเตอริก สนามอิเล็กทรอนิกส์ สนามไฮโดรโฟบิก รวมทั้งความสามารถในการให้และรับโปรตอนของสารประกอบที่ใช้ในการจับกับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1

เมื่อพิจารณาแผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาทุกวิธีร่วมกับ Hydrophobic pocket ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดอันตรกิริยาระหว่างการยับยั้งเอนไซม์พบว่าเป็นข้อมูลทางโครงสร้างที่สำคัญที่ช่วยในการชี้แนะในการออกแบบโมเลกุลตัวยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์อีฟาเวียร์ตัวใหม่ที่มีกัมมันตภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 โดยเฉพาะชนิดกลายพันธุ์ (K103N)

ในการออกแบบโมเลกุลชนิดใหม่นั้น เริ่มจากการทำการพิจารณาปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ตำแหน่ง X R และ Z ของสารประกอบอีฟาเวียร์ที่ 46 จากตารางที่ 1 (สารที่มีค่ากัมมันต-

ภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบชนิดดั้งเดิมสูงที่สุด) โดยอาศัยหลักการโครงสร้างคล้ายคลึง (Bioisosterism) ทำให้สามารถออกแบบโครงสร้างได้หลายแบบ แต่เมื่อพิจารณาค่าการทำนายกัมมันตภาพของโมเลกุลที่ได้ออกแบบใหม่จากแบบจำลองที่ดีที่สุดแล้วพบว่าโมเลกุลโครงสร้างที่ให้ค่าการทำนายกัมมันตภาพที่ใกล้เคียงและดีกว่าสารประกอบอีฟาเวียร์ที่ 46 จำนวน 5 โครงสร้าง (P1-P5) ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 โครงสร้างของโมเลกุลที่ถูกออกแบบโดยแบบจำลองของคอมพิวเตอร์และทำนายค่า กัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์เอชไอวีชนิดกลายพันธุ์ (K103N)

Cpds. No.	X	R	Z	Experimental log(1/C)	Predicted log(1/C)
46	5-MeO,6-Cl	CC-cyclopropyl	N	8.12	7.73
P1	5-NHCH ₃ ,6-Cl	CC-cyclopropyl	N	-	8.15
P2	5-NHNH ₂ ,6-Cl	CC-cyclopropyl	N	-	8.14
P3	5-MeO,6-Cl	CC-C ₃ H ₅ NH ₂	N	-	8.10
P4	5-MeO,6-Cl	CC-C ₃ H ₅ NHOH	N	-	8.13
P5	5-MeO,6-Cl	CC-C ₃ H ₅ NHNH ₂	N	-	8.10

สรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพของสารประกอบในกลุ่มอีฟาเวียร์และกัมมันตภาพในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ (K103N) พบว่าแบบจำลองที่ได้จากวิธี conventional QSAR เป็นแบบจำลองที่แสดงความสัมพันธ์มีความน่าเชื่อถือทางสถิติสูง โดยแบบจำลองที่ได้ชี้ให้เห็นความแตกต่างของ active center ของสารประกอบในกลุ่มอีฟาเวียร์ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ (K103N) โดยตัวอธิบายสมบัติเชิงอิเล็กทรอนิกส์คือการกระจายประจุที่ตำแหน่ง C₆ และ C₈ ของโมเลกุล และตัวอธิบายสมบัติเชิงโมเลกุลคือ molecular polarizability และ lipophilicity เป็นสมบัติเชิงโครงสร้างที่มีความสำคัญต่อการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิม ขณะที่การกระจายประจุที่ตำแหน่ง N1 H13 และ F14 และ molar refractivity เป็นสมบัติเชิงโครงสร้างที่มีความสำคัญต่อการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดกลายพันธุ์ (K103N) สำหรับแบบจำลองที่ได้จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพด้วยวิธี HQSAR COMFA และ COMSIA มีความน่าเชื่อถือในทางสถิติ และมีประสิทธิภาพในการทำนายสูง และแต่ละแบบจำลองให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน จึงนับว่าเป็นแบบจำลองที่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวอธิบายโครงสร้างกับกัมมันตภาพได้เป็นอย่างดี แผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากแบบจำลองจากวิธี COMFA ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของอันตรกิริยาสเตอริก และอิเล็กโตรสแตติกของโมเลกุลที่มีต่อกัมมันตภาพ และผลจากแบบจำลองวิธี COMSIA ให้ข้อมูลที่เพิ่มความเข้าใจในความต้องการทางสนามสเตอริก สนามอิเล็กโตรสแตติก สนามไฮโดรโฟบิก รวมทั้งความสามารถในการให้และรับโปรตอนของสารประกอบที่ใช้ในการจับกับเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 เมื่อพิจารณาแผนภาพคอนทัวร์ที่ได้จากการศึกษาทุกวิธีร่วมกับ Hydrophobic pocket ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดอันตรกิริยาระหว่างการยับยั้งเอนไซม์พบว่า ข้อมูลที่ได้จากแบบจำลองชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนถึงความแตกต่างของโครงสร้างที่สำคัญของการยับยั้งที่ใช้ในการถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ (K103N) นอกจากนั้นแล้วผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทุกวิธีสอดคล้องกัน และสอดคล้องกับข้อมูลจากการทดลองด้านการจับกันระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ ข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐานสำคัญที่ได้จากการศึกษาโดยระเบียบวิธี ligand-based drug design ทำให้เกิดความเข้าใจและสามารถอธิบายอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์ รวมทั้งเป็นข้อมูลทางโครงสร้างที่สำคัญในการออกแบบโมเลกุลตัวยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์อีฟาเวียร์ตัวใหม่ที่มี กัมมันตภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดกลายพันธุ์ (K103N) ต่อไป

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ผลการวิจัยนับเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ ที่ช่วยในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 และอธิบายกลไกที่เกิดการต้านทานของเอนไซม์ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบของสารยับยั้ง ทั้งนี้เพราะการศึกษาและการทดลองในห้องปฏิบัติการในระดับโมเลกุลเป็นไปได้ยาก
2. ผลการวิจัยจะเป็นแนวทางที่สำคัญในการออกแบบโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ ซึ่งนับว่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสารยับยั้งเพื่อใช้เป็นยาต่อไป
3. เป็นการนำความรู้ทางเคมีคอมพิวเตอร์ไปประยุกต์ใช้ในทางเภสัชเคมี
4. เป็นการพัฒนางานวิจัยขั้นพื้นฐานและนำไปสู่การวิจัยประยุกต์ได้ในอนาคต
5. มีผลงานวิจัยตีพิมพ์และเผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

งานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยที่จะดำเนินการต่อเนื่องในอนาคตจะเป็นการศึกษาทางด้าน Structure-based drug design โดยมีเป้าหมายหลักในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารยับยั้งในกลุ่มอนุพันธ์ efavirenz และเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี -1 ด้วยวิธี molecular docking โดยคาดหวังว่าเมื่อนำเอาผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยระเบียบวิธีดังกล่าวนี้ และผลที่ได้จากการศึกษาทางด้าน Ligand based drug design ที่ได้ดำเนินการศึกษามาแล้วมาพิจารณาร่วมกันจะเป็นข้อมูลสำคัญที่เป็นพื้นฐานช่วยเพิ่มความเข้าใจในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งและเอนไซม์ (inhibitor-enzyme interaction) ตลอดจนอธิบายกลไกที่เกิดการต้านทานของเอนไซม์ที่เป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบของตัวยับยั้ง และจะเป็นแนวทางในการออกแบบโครงสร้าง (molecular design) ของสารยับยั้งชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี-1 ทั้งชนิดดั้งเดิม (WT) และชนิดกลายพันธุ์ (K103N)

ศักยภาพในการพัฒนาไปสู่ภาคอุตสาหกรรม

เนื่องจากกระบวนการพัฒนายาในภาคอุตสาหกรรมต้องใช้เวลาและเงินทุนสูง ดังนั้นงานวิจัยด้านการจำลองแบบโมเลกุลโดยวิธีเคมีคอมพิวเตอร์นับเป็นส่วนสำคัญที่จะช่วยลดขั้นตอนประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายได้เป็นอย่างมาก ในการสังเคราะห์สาร ผลจากการศึกษาวิจัยนี้จะนำไปสู่การสังเคราะห์สารโมเลกุลใหม่ที่ได้ออกแบบโครงสร้างไว้แล้ว และจากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 และพัฒนาเป็นตัวยาในลำดับต่อไป การร่วมมือกันทางภาครัฐบาลจากกลุ่มนักวิจัยศักยภาพสูงที่มีในประเทศไทยจากหลายสาขาที่เกี่ยวข้องทั้งทางด้าน เคมี ฟิสิกส์ ชีวเคมี เภสัชเคมี การแพทย์ และวิทยาการคอมพิวเตอร์ เป็นต้น โดยเน้นทำวิจัยในกลุ่มเป้าหมายเดียวกัน รวมถึงการได้รับการสนับสนุนจากภาคอุตสาหกรรม จะทำให้ความเป็นไปได้ในการพัฒนารักษาโรคเอดส์เกิดขึ้นในประเทศไทยได้

เอกสารอ้างอิง

1. Larder, B.A., and Kemp, S.D., *Science*. **246**, 1155-1158 (1989).
2. Huang, P., Farquhar, D., Plunkett, W., *J.Biol.Chem.* **265**, 11914 (1990).
3. Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Schols, D., Kukla, M.J., Breslin, H.J., Raeymaechers, A., Gelder, J.V., Woestenborghs, R., Heykants, J., Schellekens, K., Janessen, M.A.C., De Clercq, E., and Janssen, P.A.J., *Nature*. **343**, 470-474 (1990).
4. 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., and De Clercq, E., *J.Med.Chem.* **34**, 349-357 (1991).
5. Merluzzi, V.J., Hargrave, K.D., Labadia, M., Grozinger, K., Skoog, M., Wu, J.C., Shin, C.K., Eckner, K., Hattox, S., and Adams, J., *Science*. **250**, 1411-1413 (1990).
6. De Clercq, E., *Med.Res.Rev.* **13**, 229 (1993).
7. De Clercq, E., *Exp.Opin.Invest.Drugs.* **3**, 253 (1994).
8. Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., and Steitz, T.A., *Science*. **256**, 1783 (1992).
9. Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L., Clark, R., Hizi, A., Hughes, S.H., and Arnold, E., *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **90**, 6320 (1993).
10. Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., Somers, D., Roos, C., Kirby, I., Keelling, J., Darby, G., Jones, Y., and Studart, D., *Nat.Struct.Biol.* **2**, 293-302 (1995).
11. Ren, J., Milton, J., Weaver, K.L., Short, S.A., Stuart, D.I. and Stammer, D.K., *Structure*, **8**, 1089-1094 (2000).
12. Ren, J., Nichols, C., Bird, L., Chamberlain, P., Weaver, K., Short, S., Stuart, D. I., and Stammers D. K. , *J Mol. Biol* **312**, 795-805 (2001).
13. Young, S.D., Britcher, S.F., Tran, L.O., Payne, L.S., Lumma, W.C., Lyle, T.A., Huff, J.R., Anderson, P.S., Olsen, D.B. and Carroll, S.S., *Antimicrob Agents Chemother.* **12**, 2602-5 (1995).
14. Balzarini, J. and Emmini, E.A., *Mol. Pharmacol.* **50**, 394-401 (1996).
15. Kleim, J.P. and Paessens, A., *Antimicrob Agents Chemother.* **37**, 1659-1664 (1995).

16. Corbett, J.W., Ko,S.S., Anderson, P.S. and Ericson-Viitanen, S.K., *J. Med. Chem.* **43**, 2019-2030 (2000).
17. Mona Patel, Soo, S., Ko, Robert , J., McHugh, Jay, A., Markwalder, Anurag , S., Srivadtava, Beverly, C., Cordova, Ronald, M., Klabe, Susan Ericson-Viitanen, George, L., Trainor, and Steven, P., Seitz., *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* **9**, 2805-2810 (1999).
18. Mona Patel, Soo, S., Ko, Robert, J., McHugh, Jr., Beverly, C., Cordova, Ronald, M., Klabe, Susan, Ericson-Viitanen, George, L., Trainor, and Soo,S., Ko., *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* **9**, 3221-3224 (1999).
19. Jeffrey ,W., Corbett, Senliang Pan, Jay, A., Markwalder, Beverly, C., Cordova, Ronald, M., Klabe,Sena Garber, James, D., Rodger and Susan, K., Erickson-Viitanen., *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* **11**, 211-214 (2001).
20. Jay, A., Markwalder, David, D.,Christ, Abdul Mutlip, Beverly, C., Cordova, Ronald, M., Klabe and Steven, P., Seitz., *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* **11**, 619-622 (2001).
21. Anthony, J., Cocuzza, Dennis, R., Chidester, Beverly, C., Cordova, Ronald, M., Klabe, Susan, Ericson-Viitanen, George, L., Trainor and Soo, S., Ko., *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* **11** 1177-1179 (2001).
22. Mona Patel, Soo, S., Ko, Robert, J., McHugh, Jr., Beverly ,C., Cordova, Ronald, M., Klabe, Lee, T., Bacheler, Susan, Erickson-Viitanen and James, D., Rodgers., *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* **11**, 1943-1945 (2001).
23. De-Ping Wang, Robert, C., Rizzo, Julian, Tirado-Rives and William, L., Jorgensen., *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* **11**, 2799-2802 (2001).
24. Hannongbua, S., Lawtrakul, L., and Limtrakul, J., *J.Comp-Aided.Mol.Des.* **10**, 145-152 (1996).
25. Hannongbua, S., Lawtrakul, L., Sottriffer, C.A., and Rode, B.M., *Quant.Struct.-Act.Relatsh.*, **15**, 1-6 (1996).
26. Hannongbua, S., Pungpo, P., Limtrakul, J., and Wolschann, P., *J.Comp-Aided.Mol.Des.* **13**, 563-577 (1999).
27. Pungpo, P. and Hannongbua, S. *J. Mol. Graph. Mod.* 2000, **18**, 581.
28. Hannongbua S., Nivesanond K., Lawtrakul L., Pungpo P. and Wolschann P. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, 2001, **41**, 848.

29. Hannongbua, S., San-oon, S., Pungpo, P. and Wolschann, P., *Monatsh. Chem.*, 2001, **13**, 1157.
30. Hannongbua, S., Prasithichokekul, S. and Pungpo, P., *J. Comp. Aided Mol. Des.*, 2001, **15**, 997
31. Pungpo, P., Wolschann, P. and Hannongbua, S., *Curr.Med.Chem.*, 2003,**10**,1661.

ผลงานวิจัย

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Pungpo, P., and Hannongbua, S. Structural requirements of efavirenz derivatives as potent HIV-1 reverse transcriptase Inhibitors active against wild type and mutant enzymes (K103N) by using Comparative Molecular Field Analysis and Comparative Similarity Indices Analysis, submitted for publication

Pungpo, P., Saparpakorn, P. and Hannongbua, S. Elucidating inhibitory models of efavirenz analogues as potent HIV-1 RT inhibitors by 3D QSAR and docking studies, in preparation

2. ผลงานวิชาการอื่นๆ (เช่น Proceeding ตำรา ฯลฯ)

Pornpan Pungpo, Peter Wolschann and Supa Hannongbua. Comparative quantitative structure-activity relationship study of HIV-1 RT inhibitor in the class of efavirenz compound, *The proceeding of the 14th european symposium on quantitative structure-activity relationship (Euro QSAR 2002)*, 8-13 September 2002, Bournemouth, England

พรพรรณ พึ่งโพธิ์, สมชาย จันทะเกษ และ โฉมสอางค์ วาจาดี, การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในเชิงสองมิติของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ใน กลุ่มของสารอนุพันธ์อีฟาเวียร์ (TWO DIMENSIONAL QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS IN THE CLASS OF EFAVIRENZ DERIVATIVES), การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 29, ขอนแก่น, 2546, 140

พรพรรณ พึ่งโพธิ์, ปณิดา วจิกรมล และ ปิยะพร จีงสถิตย์กุล, การวิเคราะห์คอนฟอร์เมชันของตัวยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบของเอชไอวี-1 (S)-6-chloro-4-(cyclopropylethynyl)-1,4 - dihydro-4-(trifluoromethyl)-2H-3,1-benzoxazin-2-one(Efavirenz) โดยการคำนวณเคมีควอนตัม (AN CONFORMATIONAL ANALYSIS OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITOR (S)-6-CHLORO-4-(CYCLOPROPYLETHYNYL)-1,4-DIHYDRO-4-(TRIFLUOROMETHYL)-2H-3,1-BENZOXAZIN-2-ONE (EFAVIRENZ), BASED ON

QUANTUM CHEMICAL CALCULATIONS), การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 29, ขอนแก่น, 2546, 141

พรพรรณ พึ่งโพธิ์ และ สุภา หารหนองบัว, การศึกษาโครงสร้างสำคัญในการยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบ เอชไอวี-1 ของสารยับยั้งนอวนิวคลีโอไซด์ในกลุ่มสารประกอบอีฟาเวียร์เร็นซ์ โดยวิธีวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (AN ANALYSIS OF STRUCTURAL REQUIREMENT FOR HIV-1 RT INHIBITION OF NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITOR IN THE CLASS OF EFAVIRENZ COMPOUNDS, USING COMPARATIVE MOLECULAR SIMILARITY INDICES ANALYSIS) การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 29, ขอนแก่น, 2546, 141

Pornpan Pungpo and Supa Hannongbua, An Analysis of Structure-activity Relationships of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor in the Class of Efavirenz Derivatives, using Comparative Molecular Field Analysis and Comparative Similarity Index Analysis, *The proceeding of The 8th Annual National Symposium on Computational Science and Engineering*, 21-23 July 2004, Suranaree University of Technology, Nakornratchasima, Thailand.

Pornpan Pungpo and Supa Hannongbua, Investigation of Structural Requirements for Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors in the Class of Efavirenz Derivatives, using Comparative Molecular Field Analysis and Comparative Similarity Indices Analysis, *The proceeding of the 15th European Symposium on Quantitative Structure-activity Relationship (Euro QSAR 2004)*, 5-10 September 2004, Istanbul, Turkey

พรพรรณ พึ่งโพธิ์ วรางคณา สุขสม อาลักษณ์ สุวรรณวิสุทธิ ปทุมทิพย์ เสมอภาค พัชรินทร์ โมคติพิย การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพในเชิงสองมิติของสารในกลุ่มอีฟาเวียเรนซ์ที่แสดงกัมมันตภาพยับยั้งเอนไซม์การถ่ายแบบเอชไอวี-1 ชนิดดั้งเดิม และ ชนิดกลายพันธุ์ (K103N) โดยใช้วิธีศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกัมมันตภาพแบบดั้งเดิมและแบบโฮโลแกรม (Two dimensional quantitative structure activity relationship studies of efavirenze analogous active against WT and K103 N HIV-1 RT, using conventional QSAR and hologram QSAR) การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 30, กรุงเทพฯ, 2547

Pornpan Pungpo and Supa Hannongbua, Structural requirements of efavirenz derivatives as potent HIV-1 reverse transcriptase Inhibitors active against wild type and mutant enzyme (K103N) by QSAR studies, *The proceeding of the 17th FAOBMB Symposium “ Genomics and health in the 21st Century , 22-26 November 2004, Bangkok, Thailand*

Pornpan Pungpo, Patchareenart Saparpakorn and Supa Hannongbua, Elucidating inhibitory models of efavirenz analogues as potent HIV-1 RT inhibitors by 3D QSAR and docking studies, the 2nd Asia Pacific Conference on Theoretical and Computational Chemistry, 2-6 May 2005, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

ภาคผนวก

Investigation of Structural Requirements for Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors in the Class of Efavirenz Derivatives, using Comparative Molecular Field Analysis and Comparative Similarity Indices Analysis

Pornpan Pungpo¹ and Supa Hannongbua²

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

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

Introduction

Efavirenz, a potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), has been approved by FDA for the treatment of infections (SustivaTM) [1]. Although HIV infection is generally well controlled by efavirenz-containing regimens, a number of patients develop resistance to the drug through a mutation in the viral reverse. In these patients, the K103N mutation is present in over 90% of the RT sequences examined, leading to a significant impact on the sensitivity of the virus to the inhibitor. Since the current available drug cannot cover enough to completely eradicate HIV within the AIDS patient, there is a continuing need to identify improved agents within each class in order to provide the optimum clinical benefit. In the present study, three dimensional quantitative structure-activity relationships (3D-QSAR) based on Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) and comparative similarity indices analysis (CoMSIA) to determine the structural requirements of efavirenz derivatives active against wild type (WT) and mutant type (K103N).

Methods

The starting geometry of efavirenz was taken from x-ray crystallographic data. Two different biological activities were reported active against WT and mutant type (K103N) HIV-1 RT. A set of 60 efavirenz compounds were considered [2-5] and fully optimized by *ab-initio* molecular orbital method at HF/3-21G level. To determine relationships between structural properties and HIV-1 inhibitions, comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative similarity index analysis (CoMSIA) have been applied.

Results

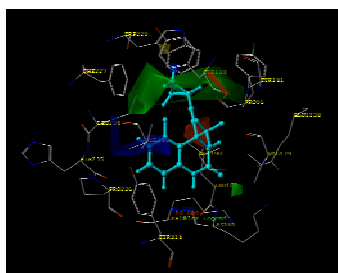
All obtained models are satisfying based on both statistical significance and predictive ability which yield cross-validated r^2_{cv} value ranging from 0.656 to 0.794. The CoMFA contour maps reveal that steric interaction play more significant role of the variance in the data corresponding to WT inhibition, while steric and electrostatic interactions have approximately equal contributions to K103N inhibitory activity. The resulting CoMSIA models enhance the understanding of steric, electrostatic, hydrophobic, electron donor and acceptor requirements for ligands binding to HIV-1 RT. The analysis derived by all methods highlight different characteristics for different types of wild type and mutant type HIV-1 RT.

Table 1. Summary of QSAR models

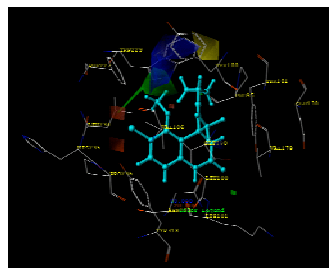
Biological Activities	Method	r^2_{cv}	s-press	% contribution
WT HIV-1 RT	CoMFA	0.656	0.059	St=58.8%, El=41.2%
	CoMSIA	0.704	0.094	St=14.8%, El=41.1%, Hyd=21.0% H-donor=13.5%, H-acceptor=9.6 %
K103N HIV-1 RT	CoMFA	0.762	0.094	St=54.4%, El=45.6%
	CoMSIA	0.794	0.256	St=13.7%, El=34.0%, Hyd=20.7% H-donor=16.5 %, H-acceptor=15.1 %

St = Steric contribution, El = Electrostatic contribution, Hyd = Hydrophobic contribution

H-donor = Hydrogen donor contribution, H-acceptor = Hydrogen acceptor contribution

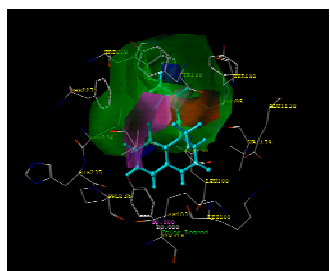


1(a)

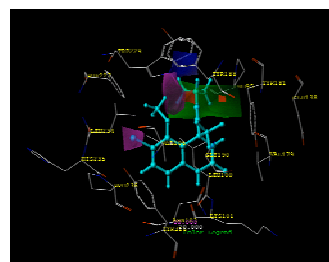


1(b)

Figure 1(a) and 1(b) The CoMFA steric and electrostatic contour maps of efavirenz compounds derived from the WT and K103N HIV-1 RT inhibition, respectively.

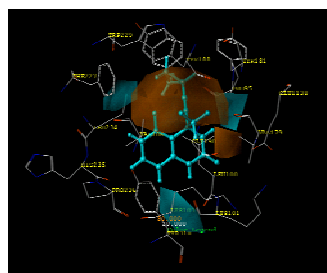


2(a)

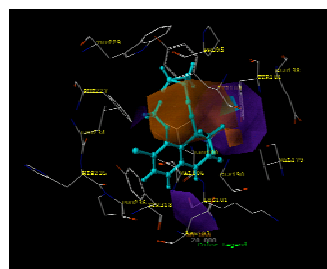


2(b)

Figure 2(a) and 2(b) The CoMSIA steric, electrostatic and hydrophobic contour maps of efavirenz compounds derived from the WT and K103N HIV-1 RT inhibition, respectively.



3(a)



3(b)

Figure 3(a) and 3(b) The CoMSIA hydrogen donor and acceptor contour maps of efavirenz compounds derived from the WT and K103N HIV-1 RT inhibition.

Conclusions

The derived models of efavirenz compounds successfully explain the relationships between structural properties and HIV-1 inhibition. The information obtained from all models apparently reveal differentiating structural requirements between WT and K103N HIV-1 RT inhibitory activities of these inhibitors. In addition, the interpretation of the models reinforces each other and also shows good accordance with inhibitor-receptor complex derived by experimental data. Consequently, the obtained results can be integrated to provide a fundamental guideline to design and predict the new compounds with enhancing HIV-1 RT inhibitory activities active against WT and K103N HIV-1 RT.

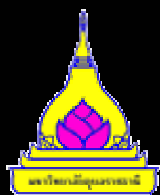
Acknowledgements

The Thailand Research Funds (TRG4580072) is gratefully acknowledged for financial support.

References

1. Young SD. *et al.* Antimicrob Agents Chemother. 1995, 12; 2602-5.
2. Anthony J.C. *et al.* Bioorg.Med.Chem. Lett. 2001, 11;1389.
3. Corbett J.W. *et al.* J. Med. Chem. 2002, 43; 2019-2030.
4. Jeffrey W.C. *et al.* Bioorg.Med.Chem. Lett. 2001. 11; 211-4.
5. Jay A. *et al.* Bioorg.Med.Chem.Lett. 2001, 11; 619-622.

Elucidating inhibitory models of efavirenz analogues as potent HIV-1 RT inhibitors by 3D QSAR and docking studies



Pornpan Pungpo¹, Patchareenart Saparpakorn² and Supa Hannongbua²

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

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



INTRODUCTION:

Acquired Immune Deficiency Syndromes (AIDS), caused by the human immunodeficiency virus (HIV), is the global health problem. One therapeutic target in the treatment of AIDS is the inhibition of HIV reverse transcriptase (HIV-1 RT), an essential enzyme responsible for the formation of proviral DNA from viral RNA. Efavirenz, an NNRTI with nanomolar potency, has been recently approved for the treatment of HIV infection. Unfortunately, the efficacy of the inhibitor is limited by the appearance of drug-resistant mutant viruses of HIV-1 RT, in particular the Lys103-Asp mutation (K103N). Therefore, the development of the new therapeutics capable of suppressing the viral replication of the mutant HIV-1 RT is still required.

METHODS OF CALCULATIONS:

The starting geometry of efavirenz compound was obtained from X-ray crystallographic data. 58 efavirenz derivatives were constructed and fully geometrical optimized, *ab-initio* molecular orbital method at HF/3-21G level. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D QSAR) methods, using comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative similarity index analysis (CoMSIA) have been applied to a set of efavirenz derivatives active against wild-type (WT) and mutant type (K103N) HIV-1 reverse transcriptase. Computational docking of selected efavirenz compounds was carried out by using GOLD program.

RESULTS AND DISCUSSION:

3D QSAR Models

The obtained CoMFA and CoMSIA models are satisfying based on both statistical significance and predictive ability (Table 1). CoMFA model reveals the importance of steric and electrostatic interactions through contour maps. Regarding WT inhibition, the CoMFA model shows that steric interactions play more significant role of the variance in the data corresponding to, while steric and electrostatic effects have approximately equal contributions for the explanation of inhibitory activity against K103N. The resulting CoMSIA models enhance the understanding of steric, electrostatic, hydrophobic, electron donor and acceptor requirements for ligands binding to HIV-1 RT. The information obtained from CoMFA and CoMSIA models clearly show different structural requirements for inhibition of WT and K103N HIV-1 RT.

Table 1. Summary of QSAR models derived from CoMFA and CoMSIA approaches

Biological activity	Methods	R ² _{cv}	s-press	% Contribution
WT HIV-1RT	CoMFA	0.656	0.059	St=58.8 %, Et=41.2 %
	CoMSIA	0.704	0.140	St=14.8 %, Et=41.1 %, Hyd=21.0 % HD=13.5 %, HA=9.6 %
Mutant type K103N HIV-1 RT	CoMFA	0.762	0.094	St=54.4%, Et=45.6%
	CoMSIA	0.794	0.258	St=13.7%, Et=34.0%, Hyd=20.7% HD=16.5 %, HA=15.1 %

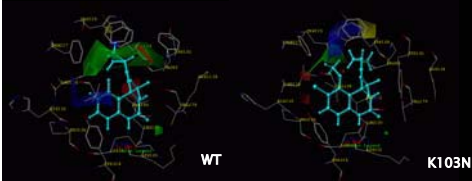


Figure 1. CoMFA steric and electrostatic contour maps for efavirenz compounds together with the HIV-1 RT binding pocket.



Figure 2. CoMSIA steric electrostatic and hydrophobic contour maps for efavirenz compounds together with the HIV-1 RT binding pocket.



Figure 3. CoMSIA hydrogen donor and acceptor contour maps for efavirenz compounds together with the HIV-1 RT binding pocket.

Docking Models

To elucidate potential binding modes of the inhibitors, some efavirenz compounds were docked to WT and K103 HIV-1 RT. The most active compounds and less active compounds for the WT and K103N inhibition were selected and the docked conformations are shown in Figures 4 and 5. Docking analysis reveal that the binding modes of the ligands show common characteristics. Functional groups of similar chemical characters are positioned in similar ways. Electrostatic and Van der Waal interactions between ligands and the side chain of Val106, Val 179 and Tyr181 play an important role for WT inhibition. Moreover, for K103N inhibition, the hydrogen- π interaction and Van der Waal interactions between ligands and the side chain of Tyr181, Phe227, Trp229, Trp229 reveal dominant interaction for higher activity.

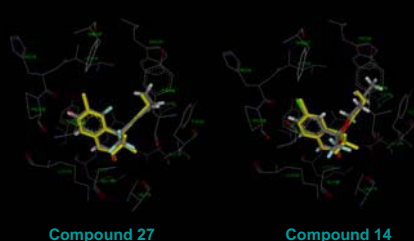


Figure 4. Docked conformations of compounds 27 and 14 in the binding pocket of WT HIV-1 RT.

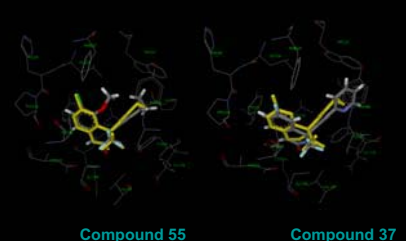


Figure 5. Docked conformations of compounds 55 and 37 in the binding pocket of K103N HIV-1 RT.

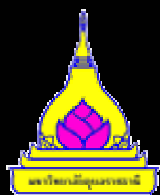
CONCLUSIONS:

The QSAR and docking models of efavirenz compounds successfully explain the relationships between structural properties and HIV-1 inhibition. The information obtained from 3D QSAR models apparently reveal differentiating structural requirements between WT and K103N HIV-1 RT inhibitory activities of these inhibitors. The interpretation of the models reinforces each other and also shows good accordance with inhibitor-receptor complex derived by experimental data. In addition, docking results provides additional information and further probes the interaction between inhibitors and the enzymes. Consequently, the obtained results can be integrated to identify the structural requirements of HIV-1 RT inhibitors in the class of efavirenz compounds and are helpful for better understanding of anti HIV-1 RT mechanism of these inhibitors. The principle derived from the present study can be beneficial to design new and more potent compounds active against HIV-1 RT. Finally, the results derived from the ligand-based design by using 3D QSAR methods and the structure-based design by using molecular docking study can support each other and improve the applicability of structure-activity relationships in drug design.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The grants providing by the Thailand Research Fund (TRG4580072) and the Golden Jubilee Ph.D. program (3.C.KU/45/B.1) are gratefully acknowledged for research supports.

Structural Requirements of Efavirenz Derivatives as Potent HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors Active Against Wild Type and Mutant Enzymes (K103N) by QSAR Studies



Pornpan Pungpo¹ and Supa Hannongbua²

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

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



INTRODUCTION:

Acquired Immune Deficiency Syndromes (AIDS), a disease of epidemic proportions, is caused by the human immunodeficiency virus (HIV). HIV reverse transcriptase (HIV-1 RT) is an essential enzyme responsible for the formation of proviral DNA from viral RNA. Currently, efavirenz, a highly potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), is the standard of care of antiretroviral naïve patients. However, the efficacy of the inhibitor is limited by drug resistant variants of HIV-1 RT, in particular the Lys103-Asp mutation (K103N). Therefore, there is a continuing effort to develop the inhibitors with improved activities against K103N HIV-1 RT.

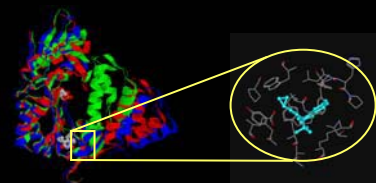


Figure 1. The crystal structure of efavirenz complexed with WT HIV-1 RT and the binding pocket of the inhibitor.

METHODS OF CALCULATIONS:

The starting geometry of efavirenz compound was taken from X-ray crystallographic data. 60 efavirenz derivatives were built and fully geometrical optimized, *ab-initio* molecular orbital method at HF/3-21G level. A two-dimensional quantitative structure-activity relationship (2D QSAR) method, using Hologram QSAR (HQSAR) and three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D QSAR) methods, using comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative similarity index analysis (CoMSIA) have been applied to a set of efavirenz derivatives active against wild-type (WT) and mutant type (K103N) HIV-1 reverse transcriptase.

RESULTS AND DISCUSSION:

All obtained models are satisfying based on both statistical significance and predictive ability which yield cross-validated r^2_{cv} value ranging from 0.655 to 0.794. The CoMFA contour maps reveal that steric interaction plays a more significant role of the variance in the data corresponding to WT inhibition, while steric and electrostatic interactions have approximately equal contributions to K103N inhibitory activity. The resulting CoMSIA models enhance the understanding of steric, electrostatic, hydrophobic, electron donor and acceptor requirements for ligands binding to HIV-1 RT. The obtained HQSAR results show different molecular fragments playing important role to different inhibitory activities of compounds. The analysis derived by all QSAR methods clearly highlight different characteristics for different types of wild type and mutant type HIV-1 RT.

Table 1. Summary of QSAR results obtained from different QSAR approaches.

Biological activity	Methods	r^2_{cv}	s-press	% Contribution
WT HIV-1RT	CoMFA	0.656	0.059	St=58.8 %, El=41.2 %
	CoMSIA	0.704	0.140	St=14.8 %, El=41.1 %, Hyd=21.0 % HD=13.5 %, HA=9.6 %
	HQSAR	0.655	0.141	-
	CoMFA	0.762	0.094	St=54.4 %, El=45.6 %
Mutant type K103N HIV-1 RT	CoMSIA	0.794	0.258	St=13.7 %, El=34.0 %, Hyd=20.7 % HD=16.5 %, HA=15.1 %
	HQSAR	0.722	0.256	-

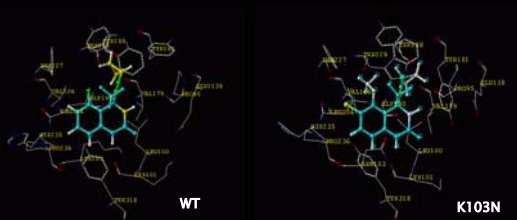


Figure 2. HQSAR presentations for efavirenz compounds together with the binding pocket HIV-1 RT.

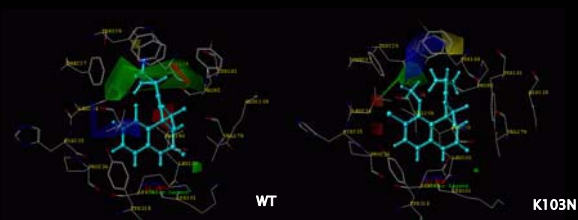


Figure 3. CoMFA steric and electrostatic contour maps for efavirenz compounds together with the binding pocket HIV-1 RT.

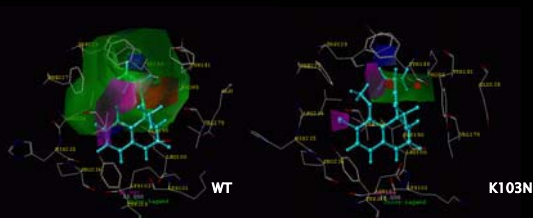


Figure 4. CoMSIA steric, electrostatic and hydrophobic contour maps for efavirenz compounds together with the binding pocket HIV-1 RT.

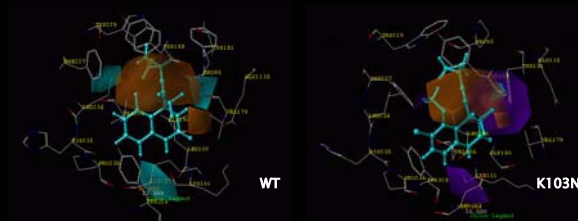


Figure 5. CoMSIA hydrogen donor and acceptor contour maps for efavirenz compounds together with the binding pocket HIV-1 RT.

CONCLUSIONS:

In summary, the derived QSAR models of efavirenz compounds successfully explain the relationships between structural properties and HIV-1 inhibition. The information obtained from all models apparently reveal differentiating structural requirements between WT and K103N HIV-1 RT inhibitory activities of these inhibitors. In addition, the interpretation of the models reinforces each other and also shows good accordance with inhibitor-receptor complex derived by experimental data. Consequently, the obtained results can be integrated to provide a fundamental guideline to design and predict the new compounds with enhancing HIV-1 RT inhibitory activities active against WT and K103N HIV-1 RT.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The Thailand Research Fund (TRG4580072), THAILAND and the North-South Dialogue scholarship program, AUSTRIA are gratefully acknowledged for research supports.

Investigation of Structural Requirements for Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors in the Class of Efavirenz Derivatives, using Comparative Molecular Field Analysis and Comparative Similarity Indices Analysis



Pornpan Pungpo¹ and Supa Hannongbua²

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubonratchathani University, Ubonratchathani, 34190, THAILAND
²Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900, THAILAND



Introduction

Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is the causative agent of the transmission and the development of Acquired Immune Deficiency Syndromes (AIDS). One of therapy target in the AIDS treatment is the inhibition of HIV reverse transcriptase (RT), the key enzyme responsible for the formation of proviral DNA from viral RNA. Efavirenz, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), has been approved by the FDA for the anti-AIDS drug (SUSTIVAth). However, the clinical benefit of the inhibitor is limited by the rapid selection of inhibitor-resistant virals, in particular the K103N mutation. Therefore, the necessity of the continuing effort to develop NNRTIs possessing improved resistant profiles is still required.

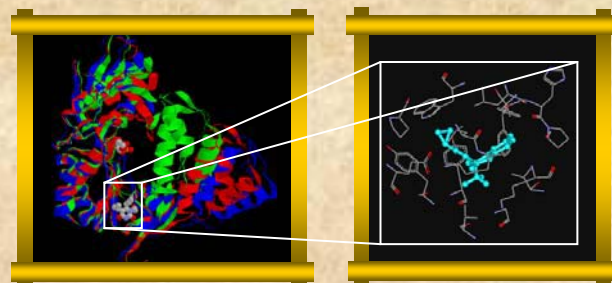


Figure 1. The crystal structure of the inhibitor complexed with HIV-1 RT. Figure 2. The binding pocket of efavirenz complexed with HIV-1 RT.

Computational methods

The starting geometry of efavirenz was taken from x-ray crystallographic data. Two different biological activities were reported active against WT and mutant type (K103N) HIV-1 RT. A set of 60 efavirenz compounds were then constructed and fully optimized by *ab-initio* molecular orbital method at HF/3-21G. To determine relationships between structural properties and HIV-1 inhibitions, three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D QSAR) method, using comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative similarity index analysis (CoMSIA) has been applied.

Table 1. Summary of CoMFA and COMSIA models

Biological activity	Methods	r^2_{cv}	s-press	%contribution
WT HIV-1 RT	CoMFA	0.656	0.059	St=54.2%,EI=45.8%
	CoMSIA	0.704	0.140	St=35.6%,EI=46.7%,Hyd=17.7%
Mutant type K103N HIV-1 RT	CoMFA	0.762	0.094	St=52.4%,EI=47.6%
	CoMSIA	0.794	0.258	St=32.8%,EI=43.1%,Hyd=24.1%

Results

The obtained CoMSIA models are satisfying based on both statistical significance and predictivity for WT and K103N inhibitions with $r^2_{cv} = 0.656$ and 0.762 , respectively). The models reveal the importance of steric, electrostatic, hydrophobic interactions through contour maps. The combination of steric and hydrophobic contributions is comparable to the combination of electrostatic effect on both WT and K103N inhibitions. In addition, the difference of the hydrogen donor and acceptor requirement on WT and K103N inhibition is helpful for explanation of ligands binding to both WT and Y181C HIV-1 RT. The results are informative to discriminate structural requirement between WT and K103N inhibitory activities in the class of efavirenz derivatives. The suggestions obtained from QSAR models show good accordance with inhibitor-receptor complex derived by experimental data. The results not only lead to get better understanding of structural requirements of the set of compounds for the inhibition, but also enable the suggestions for new and more potent inhibitors.

Conclusion

QSAR study by using 3D QSAR based on Comparative Similarity Index Analysis can be successfully applied to discriminate structural requirement between WT and K103N inhibitory activities in the class of efavirenz derivatives. The CoMSIA contour maps highlight different characteristics for different type of WT and mutant type HIV-1 RT and agree well with experimental data for the binding topology. The information derived from QSAR models lead to better understanding the importance of steric, electrostatic hydrophobic fields and the influence of hydrogen bonding contributing to the inhibitory activities. Accordingly, the principle derived from the QSAR study can be a beneficial guideline to design new potential compounds with enhanced WT and K103N HIV-1 RT inhibitory activities.

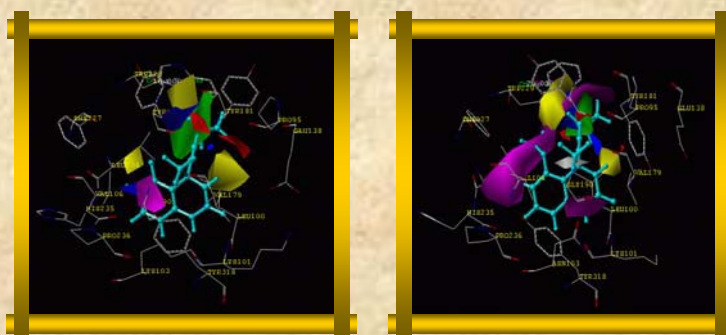


Figure 3. The CoMSIA contour map of efavirenz compound derived from the WT HIV-1 RT inhibition.

Figure 4. The CoMSIA contour map of efavirenz compound derived from the K103N HIV-1 RT inhibition.

Acknowledgements

The Thailand Research Funds (TRG4580072) and the north-south dialogue scholarship, Austrian exchange service, Department of development cooperation, AUSTRIA are gratefully acknowledged for financial support.