

과제번호 : 00-J-FC-01-B-11

기능성화학물질개발사업

신물질 분자설계법 연구

Study on Molecular Modeling for
New Functional Substances

한국화학연구원

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성화학물질개발사업” 세부과제로 수행한 (“신물질 분자설계법 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2001. 8. 15

주관연구기관명 : 한국화학연구원

주관연구책임자 : 이 규 양

연 구 원 : 유 성 은, 공 영 대
이 선 경, 서 지 희
김 낙 정, 김 수 경
황 순 희, 박 효 정
이 관 구, 서 진 수
박 영 숙, 윤 숙 경
황 선 경, 김 종 화
박 상 일, 김 병 구
홍 현 응, 정 세 일
라 종 규, 김 은 숙

위탁연구기관명 : Georgetown University

위탁연구책임자 : Kathryn Sandberg

요 약 문

I. 제 목

신물질 분자설계법 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

고전적 의미의 분자 설계 또는 분자 모델링이라 함은 축적된 분자들의 화학 및 물리적 성질을 토대로 연구자가 원하는 물성을 나타낼 수 있는 분자를 경험적으로 유추하는 모든 과정¹⁾을 말한다. 그러나 최근 컴퓨터를 이용한 분자 설계 (Computer Aided Molecular Design, CAMD)는 빠른 데이터 처리 및 연산능력과 형상화를 통한 삼차원적인 접근이라는 면에서 고전적 의미의 분자 설계와 구분된다.

CAMD의 분야는 화학, 생화학, 의학, 물리학에서 얻어진 분자에 관한 지식을 바탕으로 컴퓨터를 이용하여 논리적인 분석과정을 통하여 분자의 구조와 성질간의 관계를 설명하고 이를 이용하여 분자의 구조로부터 분자의 성질을 유추할 수 있는 논리적 구조를 구축하는 것이다. 따라서 CAMD는 자연과학과 컴퓨터 과학의 전 분야를 포함한다고 할 수 있으며, 산업 및 학문의 전 분야에서 중요하다.

과거의 일반적인 신약 개발 방법으로는 천연물이나 random screening으로부터 선도화합물 (lead compound)이 발견되었을 때, 의약화학자들은 그 물질의 화학 구조식 중에서 약리 작용에 필수 요건이 되는 구조 요소를 규정하고, 체계적인 분자 변형을 통하여 약리 작용의 최적화 작업을 추진하는 것이다. 그러나 분자 내에 여러 가지 치환기를 도입할 수 있는 경우 수많은 유도체가 합성 가능하며, 실제로 이와 같은 많은 수의 유도체를 합성한다는 것은 현실적으로 불가능하다. 통계적으로 하나의 신약 개발에 드는 시간과 경비는 약 10년 이상의 기간과 3,000 억원 이상의 경비가 소요된다. 따라서 시간과 경비를 줄이는 노력의 하나로 실험 분야에서

는 조합 화학 합성 (combinatorial chemical synthesis)¹²⁾기술인 새로운 개념의 고효율 합성 기술이나 이를 대량 검색할 수 있는 초고속 활성 검색법 (high through-put screening)¹³⁾기술이 1990년대 초에 본격적으로 각광 받게 되었고, 이와 더불어 정보관리 시스템을 통한 라이브러리 구축, 컴퓨터를 이용한 구조-활성 관계 및 분자 설계 기법이 급속히 발전하게 되었다. 또한 최근 생화학과 분자생물학의 발전에 따라 인체의 중요 생리 기작에 대한 연구가 많이 진전되어 왔고, X-선 결정분광법과 핵자기 공명분광기법을 이용한 단백질의 3차 구조의 규명속도가 증가함에 따라 신속하고 효율적인 신약 개발 방법이 강력히 요구되어지고 있다. 따라서 기존의 random screening에 의한 신약개발 방법으로부터 탈피하여 새로운 차원의 신의약 개발 방법의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

본 연구에서는 계산화학을 이용하여 유기합성에서부터 복잡한 생리활성물질의 구조분석 및 ligand와의 상호작용에 대한 이해를 통해 보다 직접적이고 합리적인 분자설계시스템의 기술확립 및 신약개발의 논리적 접근을 통해 신물질 개발 연구의 효율성을 제고하는데 목적이 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서 연구 대상물질로 고혈압 치료제인 비펩티드계 AII 길항제¹³⁾, 심장 선택적인 칼륨 통로 활성화제 (K^+ channel activator)¹⁴⁾와 약제 내성을 보이는 항암제의 보조적 치료제로써의 MDR (Multi Drug Resistance) reversal agent¹⁵⁾를 선택하였다. 위의 모든 경우 약물과 결합하는 대상 단백질의 구조가 생체막에 존재하는 단백질이므로 결정화하기 어렵고, 지질막을 제거하면 단백질의 folding에 문제가 있기 때문에 X-선 결정분광법이나 핵자기 공명분광법으로 실험 구조를 얻기가 어려우므로, 분자 모델링을 이용한 ligand-based approach가 가장 적절한 방법이다. 따라서 본 연구에서는 ligand-based approach 방법을 각각의 경우에 적용하여 약물 구조의 최적화 작업과 약물의 구조-활성간의 연구를 수행하였다.

계산에 사용된 연구 방법으로는 분자의 안정한 구조를 찾기 위해 분자 역학 방법¹⁶⁾과 양자 역학 방법¹⁷⁾으로 구조를 최적화 시켰으며, 계산 구조의 정확성을 확인하기 위해 NMR 실험 방법을 통해 얻은 거리 정보나 X-ray 구조 분석으로 나온 구조와 비

교하였다. 일련의 동계 화합물의 안정한 구조는 CoMFA 방법¹⁸⁾으로 정량적 구조-활성 상관관계 분석을 하였으며, CoMFA map으로부터 더 우세한 약리 활성을 갖는 분자를 예측하여 약리 작용의 최적화 작업을 수행했다. 또한 DISCO 분석을 통하여 일련의 활성 있는 화합물의 공통된 구조로부터 활성에 중요한 pharmacophore를 분석 또는 생리 활성 구조를 찾았으며, pharmacophore 분석을 통해 나온 활성에 중요한 작용기들과의 거리 정보를 만족시키면서 기존의 화합물과는 골격이 다른 새로운 화합물을 다양한 유기 화합물의 구조가 축적된 DB로부터 3D-search를 통해서 얻었다. 또한 homology modeling 기술을 이용하여 조절 분비 경로를 거치는 prohormone의 구조 분석으로부터 분류 신호 잔기의 구조적인 특성을 규명하였다.

따라서 본 논문은 계산화학을 다양한 생리활성 물질의 설계에 적용함으로써 직접적이고 합리적인 분자 설계 시스템의 기술 확립 및 신약 개발의 효율성을 증대시키는데 목적이 있으며, AII 길항제, 칼륨 통로 활성화제, MDR reversal agent, Photochromism 성질을 갖는 신기능성 화합물 등의 다양한 생리 활성 물질의 분자 설계를 통하여 합리적인 분자 설계 시스템의 기술과 생리 활성 분자의 구조와 활성간의 연구 결과를 설명하고자 한다.

IV. 연구개발결과

AII 수용체 type I 길항제의 NMR, x-ray, 계산 구조 분석으로 tetrazole group이 imidazole ring과 같은 배향을 가진 type I과 반대 배향을 가진 type II의 구조가 생체 내에서 우세할 것으로 보이며, 활성에 대한 36개의 pyridylimidazole 유도체의 구조 변형을 통해 imidazole ring의 5번, 6번 치환체는 수용체와의 결합에 필수적인 부위는 아니다. 특히 5번 치환체는 결합에 부가적인 부위로 크기가 작고 수소 결합에 유리한 그룹이 AII 길항제로서의 활성을 증가시키며, 6번 위치는 크기가 크고 전자를 잡아당기는 그룹이 para 위치에 치환된 pyridine N-oxide가 활성을 증가시킨다. 따라서 일련의 구조적으로 다양한 화합물의 구조와 활성간의 관계를 3-D QSAR (CoMFA)로 분석하였으며 CoMFA 분석의 한계에도 불구하고 CoMFA는 구조적으로 다양한 치환체의 pharmacophore를 분석하는데 효과적인 방법이다.

다음으로 benzofuran 유도체의 구조 변형은 benzofuran ring을 중심으로

imidazole과 phenyltetrazole ring의 치환 위치에 따른 여러 가지 이성질체를 합성한 결과 둘 다 meta 위치에 치환된 치환체가 가장 활성이 높았다.

DISCO 분석을 통해 얻은 AII 길항제의 활성 구조로부터 pharmacophore를 거리 제한으로 사용하여 기존의 pyridylimidazole과 benzofuran 유도체와는 다른 화합물을 얻었으며, 3D-search 방법은 새로운 선도물질의 설계에 유용한 도구로 사용될 것으로 기대된다.

칼륨 통로 활성화제의 QSAR 분석을 위해 사용된 화합물은 BMS 화합물 총 56개의 화합물을 선정하여 항-허혈 활성과 혈관 확장 활성, 심장 선택성에 대한 QSAR을 하였다. QSAR 결과는 각각 cross-validated r^2 값이 0.706, 0.714를 얻었으며 항-허혈 활성과 혈관 확장 활성에 대한 CoMFA map은 서로 공통된 부분과 다른 부분이 있다. 또한 심장 선택성과 혈관 확장 활성에 대한 CoMFA map에서는 같은 위치에서 서로 성질이 상반되는 map을 보이므로, CoMFA 분석을 통해 기존의 칼륨 통로 활성화제보다 더 심장 선택적인 칼륨 통로 활성화제의 약물 설계에 중요한 정보를 제공해준다.

MDR reversal agent의 활성을 보이는 phenylalkylamine 유도체의 구조 분석을 통해서 계산된 구조와 NMR 실험 구조의 공통된 특성은 질소 원자를 중심으로 양쪽으로 꺾인 형태를 보이며, 질소 원자를 메틸화시킴으로써 분자의 유동성을 감소시켰다.

Photochromism 성질을 나타내는 벤조피란 유도체들의 치환체에 변화에 따른 효과와 ring의 구조변화에 의한 효과를 조사하였다. 벤조피란 구조에 benzocondensation이 될 수록 색을 나타내는 colored form의 안정도가 증가되었다. 특히 phenanthrene 유도체가 좋은 photochromism 성격을 나타내었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

도출된 개발 후보물질은 전임상, 임상의 개발단계를 수행하여 세계시장에 진출할 수 있는 신의약으로 개발시켜 나가고 이를 통해 국내 의약산업의 발전, 기술력 향상에 기여토록 할 계획으로 개발연구를 수행한다.

연구과정에서 확립, 확보된 연구경험은 질환의 병태생리와 발병과정을 이해하

는데 활용되도록 관련 연구자에게 개방하고 기술이전을 통해 지속적인 신약창출이 가능하도록 활용할 예정이며, 이미 다수의 학술논문이 발표되었으며 향후 다수의 논문이 발표될 예정이다.

생리활성물질의 구조 연구에 따른 생명 현상의 이해 등 기초과학 분야에 활용되며 계산화학의 분자설계 시스템 체계 및 화학구조에 대한 알고리즘 등 타 정보분야의 기술 개발에 적용할 계획이다.

SUMMARY

Molecular designing or molecular modeling is an integrated methodology or technology for the evaluation of chemical, physical and biological properties of a set of molecules theoretically and for the establishment of qualitative and quantitative relationships between the structures and activities of related molecules, thus serves as a very useful tool for designing molecules for various properties.

The recent development of computer hardwares and softwares make theoretical calculations in high accuracy and speed to get numerous molecular properties such as 3D-structure of molecule, the relative stability of molecular conformation, the reactivity with various substituents, the electronic structure, dipole moments, the distribution of charge/electron density, the prediction of ultraviolet (UV), infrared (IR), nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum, molecular polarizability, and provide the information about molecular recognition and selectivity through protein-drug complex.

Therefore, the purpose of this thesis work is to explore various molecular modeling techniques aiming at designing biological active molecules more logically and efficiently.

The specific subjects selected for the study are nonpeptidic angiotensin II receptor antagonist as the treatment of high blood pressure, cardioselective K^+ channel activators, multi-drug resistance reversal agents as a combined chemotherapy with anti-cancer drugs, etc.

First, the theoretical conformation of oligo-peptide was studied using molecular mechanics (MM) and molecular orbital (MO) method. As an example, the conformation of angiotensin II, a key hormone in the renin-angiotensin system (RAS), was obtained theoretically. The stable structures of a series of

congeners, designed based on the conformation of angiotensin II, were generated and used subsequently for the 3D-QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) studies using CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) methods. The 3D-QSAR results provide various informations useful for optimizing the lead compounds.

To determine the structural features (pharmacophore) of the angiotensin II receptor antagonists, the DISCO (DIStance COrrrelation) analysis was performed using the conformations of a series of congeners with various biological activities.

These series of procedures used for establishing pharmacophores make it possible not only to understand the ligand-receptor interactions but also to provide a way of finding new structurally diverse lead structures from the database containing 2D or 3D structures of organic molecules.

By using the sequence homology modeling technique, it is possible to study theoretically the structural features of proteins of which experimental structures are not available. The study with regulated secretory pathway proteins was done to find that these proteins have a sorting signal motif which consists of two acidic and two hydrophobic residues exposed on the surface and, in contrast, constitutively secreted proteins does not have sorting signal motifs.

In summary, it was demonstrated that by employing various molecular modeling techniques, it is possible to understand the conformational and electrostatic features of biologically active molecules and thus their pharmacophore. More importantly it is possible to figure out the relationship between the properties and structures of molecules which makes it possible to design compounds with better biological activity.

This rapidly emerging technique will overcome the limitation of conventional drug designing method such as a classical QSAR analysis and will play a major role in designing molecules in the future.

CONTENTS

Chapter 1.	Introduction	1
Chapter 2.	States of Technical Developments	8
Chapter 3.	Contents and Results of the Studies	15
1.	Theory	15
2.	Contents of the Studies	34
3.	Results and Discussion	54
4.	Conclusion	130
Chapter 4.	Achievement and Contribution	134
Chapter 5.	Plan for the Utilization of the Results	137
Chapter 6.	References	138
Subproject	148

목 차

제 1 장 서론	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	8
제 1 절 선진국의 기술개발 동향	8
제 2 절 국내 기술개발 동향	12
제 3 절 기술환경/수준 비교분석 평가	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	15
제 1 절 이 론	15
제 2 절 연구대상 및 내용	34
제 3 절 연구결과 및 고찰	54
제 4 절 결 론	130
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	134
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	137
제 6 장 참고문헌	138
위탁과제	148

제 1 장 서 론

고전적 의미의 분자 설계 또는 분자 모델링이라 함은 축적된 분자들의 화학 및 물리적 성질을 토대로 연구자가 원하는 물성을 나타낼 수 있는 분자를 경험적으로 유추하는 모든 과정¹⁾을 말한다. 그러나 최근 컴퓨터를 이용한 분자 설계 (Computer Aided Molecular Design, CAMD)는 빠른 데이터 처리 및 연산능력과 형상화를 통한 삼차원적인 접근이라는 면에서 고전적 의미의 분자 설계와 구분된다.

CAMD의 분야는 화학, 생화학, 의학, 물리학에서 얻어진 분자에 관한 지식을 바탕으로 컴퓨터를 이용하여 논리적인 분석과정을 통하여 분자의 구조와 성질간의 관계를 설명하고 이를 이용하여 분자의 구조로부터 분자의 성질을 유추할 수 있는 논리적 구조를 구축하는 것이다. 따라서 CAMD는 자연과학과 컴퓨터 과학의 전 분야를 포함한다고 할 수 있으며, 산업 및 학문의 전 분야에서 중요하다. 특히, 활성화된 분야로는 신소재 개발 연구, 환경 과학, 신약 및 생물 사업, 물질 정보화 사업, 소프트웨어 개발 산업에서 물질 개발 및 설계, 물질의 성질 예측, database (DB) 구축, 계산용 소프트웨어 개발 등의 역할을 감당하고 있다 (Figure 1). 또한 방대한 실험데이터의 축적과 컴퓨터 하드웨어와 계산용 소프트웨어의 개발, 3D-graphics의 향상 등으로 그 방법의 정확성과 신속성이 날로 증가하고 있다.

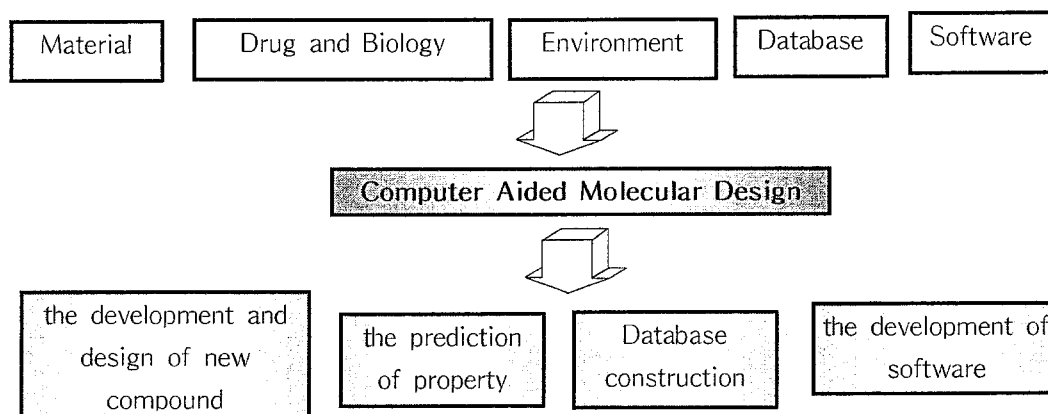


Figure 1. The field and role of computer aided molecular design.

선진국에서는 이미 1970년대부터 본격적으로 모델링을 여러 분야에 적용했으며

²⁾, 현재 새로운 기능성 물질의 설계 및 이미 개발된 물질의 성질 규명 등의 연구 분야에 중요 도구로 사용하여 기업의 연구 투자는 물론 국가 차원에서 조직적으로 지원하고 있다. 또한 여러 기업체와 연구소에서 CAMD를 이용하여 연구에 좋은 성과를 내고 있는 성공 사례도 점차 증가하고 있다. 반면 국내에서는 연구 전문 인력의 부족, 분자 모델링의 기술 및 설비의 부족, 고액의 소프트웨어, 공동 연구의 어려움 등의 문제점으로 인해 CAMD의 활성화와 실용화에 어려움을 겪고 있다. 그러나 이런 여러 가지 문제점에도 불구하고 CAMD는 연구 인력 및 시간과 경비를 절약할 수 있는 분야이므로 필수적으로 도입되어야 할 미래형 핵심 기술이다.

과거의 일반적인 신약 개발 방법으로는 천연물이나 random screening으로부터 선도화합물 (lead compound)이 발견되었을 때, 의약화학자들은 그 물질의 화학구조식 중에서 약리 작용에 필수 요건이 되는 구조 요소를 규정하고, 체계적인 분자 변형을 통하여 약리 작용의 최적화 작업을 추진하는 것이다. 그러나 분자 내에 여러 가지 치환기를 도입할 수 있는 경우 수많은 유도체가 합성 가능하며, 실제로 이와 같은 많은 수의 유도체를 합성한다는 것은 현실적으로 불가능하다. 통계적으로 하나의 신약 개발에 드는 시간과 경비는 약 10년 이상의 기간과 3,000 억원 이상의 경비가 소요된다. 따라서 시간과 경비를 줄이는 노력의 하나로 실험 분야에서는 조합 화학 합성 (combinatorial chemical synthesis)¹²⁾기술인 새로운 개념의 고효율 합성 기술이나 이를 대량 검색할 수 있는 초고속 활성 검색법 (high through-put screening)¹³⁾기술이 1990년대 초에 본격적으로 각광 받게 되었고, 이와 더불어 정보관리 시스템을 통한 라이브러리 구축, 컴퓨터를 이용한 구조-활성 관계 및 분자 설계 기법이 급속히 발전하게 되었다. 또한 최근 생화학과 분자생물학의 발전에 따라 인체의 중요 생리 기작에 대한 연구가 많이 진전되어 왔고, X-선 결정분광법과 핵자기 공명분광기법을 이용한 단백질의 3차 구조의 규명속도가 증가함에 따라 신속하고 효율적인 신약 개발 방법이 강력히 요구되어지고 있다. 따라서 기존의 random screening에 의한 신약개발 방법으로부터 탈피하여 새로운 차원의 신의약 개발 방법의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

신약 개발은 수용체의 결합 부위에서 상호 작용할 약물의 구조를 최적화 시키는 과정을 통하여 기존의 약물보다 활성이 더 큰 약물을 개발하는 것이며, 수용체와 약물의 상호 작용에 중요한 요인은 소수성, 정전기성, 수소 결합이며 용매화 에너지도 중요하게 작용한다. 신약개발의 방법은 연구자가 가지고 있는 약물과 수용

체에 대한 정보의 양에 의존한다. 따라서 각각의 정보에 따라 크게 ligand-based approach나 receptor-based approach로 구분된다 (Figure 2).

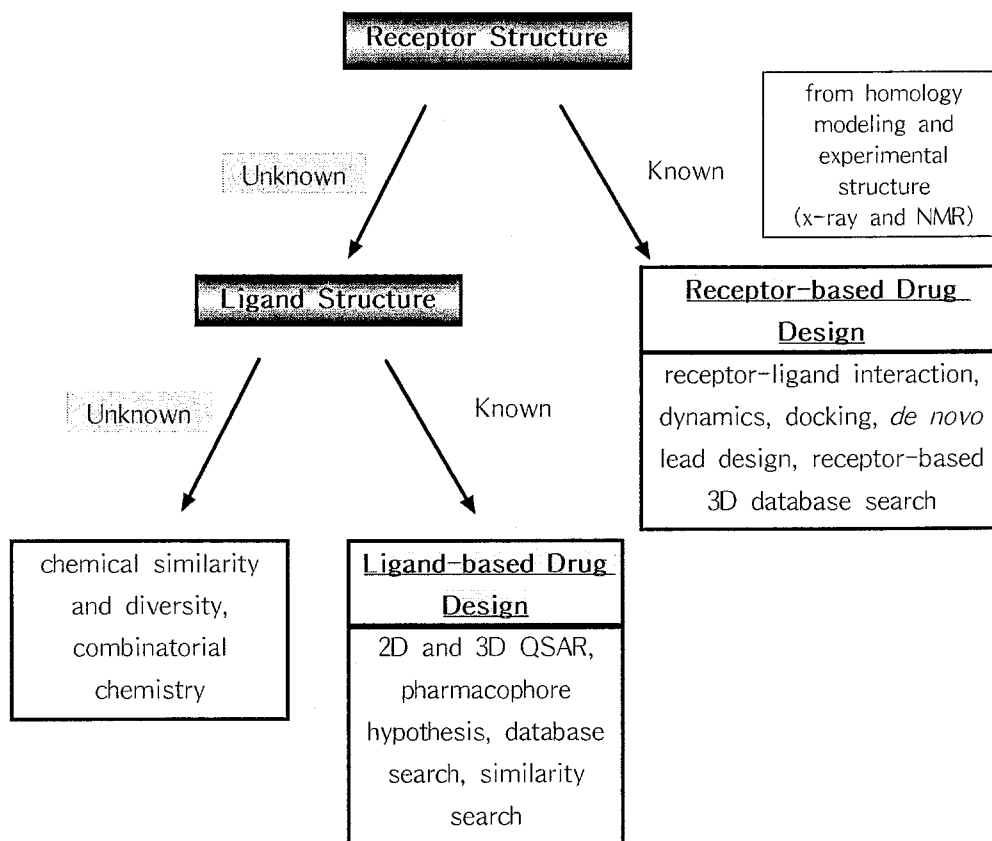


Figure 2. The strategy for rational drug design.

Receptor-based approach는 homology modeling technique⁵⁾ 혹은 X-선 결정분광법이나 핵자기공명 분광법에 의해 수용체의 구조가 있는 경우이며, 더 강하게 결합하는 약물을 설계하는 것이 그 목표이다. 그 중 첫 번째 방법인 homology modeling은 X-선 결정분광법이나 핵자기 공명분광법으로 구조를 얻을 수 없거나 충분한 양의 단백질을 얻을 수 없는 경우에 적용될 수 있는 대체 방법으로 DB를 이용하여 분자구조를 예측하는 방법이다. 연구 방법은 아미노산 서열만이 알려진 단백질의 3차원적인 구조를 알려고 할 때 이미 실험적으로 3차 구조가 알려진 단백질의 DB (Protein Data Bank, PDB⁶⁾)를 검색하여 대상 단백질의 아미노산 서열과 비교하여 유사성 (homology)이 높은 단백질을 선택하고 이로부터 대상 단백질의 부분적인 구

조를 결정한다. 그리고 유사성이 없는 부분은 이미 결정된 두 구조 사이의 거리에 가장 적당한 구조를 갖고 있는 구조를 DB에서 선택하거나 이론 계산을 통하여 결정한다. 최근 분자 생물학의 급속한 발전에 따른 단백질 유전자 정보의 양의 증가와 컴퓨터의 발전으로 구조 DB 구축 및 탐색이 가능해졌으며, 현재 아미노산 서열에서 30% 이상의 유사성이 있는 경우, 평균적으로 구조 예측에서 90% 이상의 정확성을 보여 주고 있다. 그러나 이 방법으로 얻어진 단백질의 3차 구조에서 비교 단백질과 유사성이 낮은 부분의 구조는 실제 구조와 다른 결과를 낼 수 있다는 단점을 가지고 있다. 두 번째 방법은 실험적으로 단백질과 약물의 결합 구조를 규명함으로써 결합 부위에 대한 정보를 통하여 새로운 약물을 개발하는 방법으로 가장 강력하고 효율적인 방법으로 성공 가능성이 가장 높다고 할 수 있다. 이 과정을 수행하기 위해서는 먼저 DNA cloning에 의해 단백질을 발현하고 분리 정제 과정을 거쳐서 수 밀리그램 (mg) 양의 단백질을 얻은 다음, X-선이나 핵자기 공명분광법에 의해 단백질의 3차 구조를 얻는다. 이미 밝혀진 수용체와 수용체-약물 복합체의 3차 구조로부터 에너지 최소화 및 분자 동역학 (Molecular Dynamics, MD)⁷⁾ 계산방법을 사용하여 구조를 최적화 시킨 후, docking⁸⁾ 과정을 통해 수용체와 약물의 상호작용을 관찰하고 더 우세하게 결합할 가능성이 있는 가상 약물을 설계한다. 따라서 이 분야는 의약화학, 이론화학, 분자 생물학, 생화학, 구조생물학 등의 여러 분야에서의 공동 연구가 요구되며, 효율적으로 분자 모델링 연구를 수행할 수 있으나, X-선과 핵자기 공명분광법의 각각의 실험적인 한계 때문에 실험 구조를 얻을 수 없는 경우와 충분한 양의 단백질을 얻을 수 없는 경우에 적용할 수 없는 방법이다.

Ligand-based approach는 수용체의 구조를 모르나 활성을 가진 일련의 화합물에 대한 정보를 가지고 있을 경우 적용 될 수 있다. 효과적인 경우는 활성이 높은 것과 낮은 것 혹은 그 중간 단계의 활성을 지닌 구조적으로 유사한 화합물을 가지고 있을 때이다. 이런 일련의 화합물을 통하여 수용체 결합 부위의 기하학적 특성 (geometry)에 대응하는 3차원 공간에서의 기능기의 위치로 특징을 나타내는 pharmacophore를 결정해야한다. 따라서 이런 정보를 바탕으로 활성이 높은 새로운 화합물을 설계하는 것이다. 연구 방법으로는 어떠한 선도 물질이 발견되었을 때 그 물질의 화학 구조식 중에서 약리 작용의 최적화 작업을 추진하는 과정을 분자 구조의 생리활성간의 상관관계, 즉 QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship)⁹⁻¹⁰⁾을 통하여 효과적으로 수행한다. QSAR은 일련의 동계 화합물 중에

서 치환기 변형에 따른 약리 작용의 변화를 정량적으로 분석하여 구조와 약리 작용을 화합물의 물리 화학적 성질 (hydrophobicity, electronic properties, topology, and steric effect)의 선형 함수로서 표현한 상관관계식을 유도하고 약효가 가장 큰 물질을 예측함으로써 유기합성과 검색실험에 요하는 시간, 노력, 경비 등을 최소한으로 줄이는 합리적이고 효율적인 작업이다¹¹⁾. 고전적인 QSAR에서는 물질의 물리 화학적 성질을 표현하는 제한된 설명인자 (descriptor)와 생리적 반응 간의 관계를 유도하였으나, computer hardware의 발전에 따른 계산 속도 향상과 graphic workstation의 발전으로 분자의 3차원적 구조를 토대로 한 3D-QSAR 방법이 크게 발전할 수 있었다. 그 중 CoMFA는 QSAR과 약물 설계에 가장 강력한 도구로써 입체장 (steric field)과 정전기장 (electrostatic field)에 대한 mapping을 통하여 분자의 물리 화학적 성질과 생리활성 간의 상관성을 연구하는 방법이다. CoMFA는 3차원 공간에 일정한 간격으로 놓여있는 격자 원자 (probe atom)와의 입체장과 정전기장으로 표현되므로 CoMFA 설명인자의 행은 Cartesian 공간에 놓여있는 격자 원자와 약물과의 입체장과 정전기장의 크기를 나타낸다. CoMFA는 분자의 공통된 특성을 입체장과 정전기장의 mapping을 통하여 가시적으로 보여줌으로써 pharmacophore를 규명하는데 도움을 줄 뿐 아니라, field의 특성을 앎으로써 새로운 물질을 예측하는 데에도 큰 도움을 줄 수 있다. 또한 DISCO (DIStance COrrrelation)¹²⁾ 분석을 통하여 일련의 활성 있는 화합물의 공통된 구조로부터 생리활성 구조 (bioactive conformation)를 찾고, 활성에 중요한 pharmacophore를 분석하는 방법과, pharmacophore 분석을 통하여 특정 작용기의 거리 제한 정보로부터 기존의 유기화합물의 DB로부터 그 조건을 만족하는 새로운 구조의 선도물질을 설계하는 3D-search 방법을 이용하여 약물을 최적화 시킨다 (Figure 3). 따라서 이 방법은 receptor-based approach 방법에 비해 성공 가능성이 낮으나, 많은 경우 수용체의 구조를 모르기 때문에 활성 있는 일련의 화합물로부터 신속하고 효율적이며 경제적으로 약물을 최적화 시킬 수 있는 일반적인 방법이다.

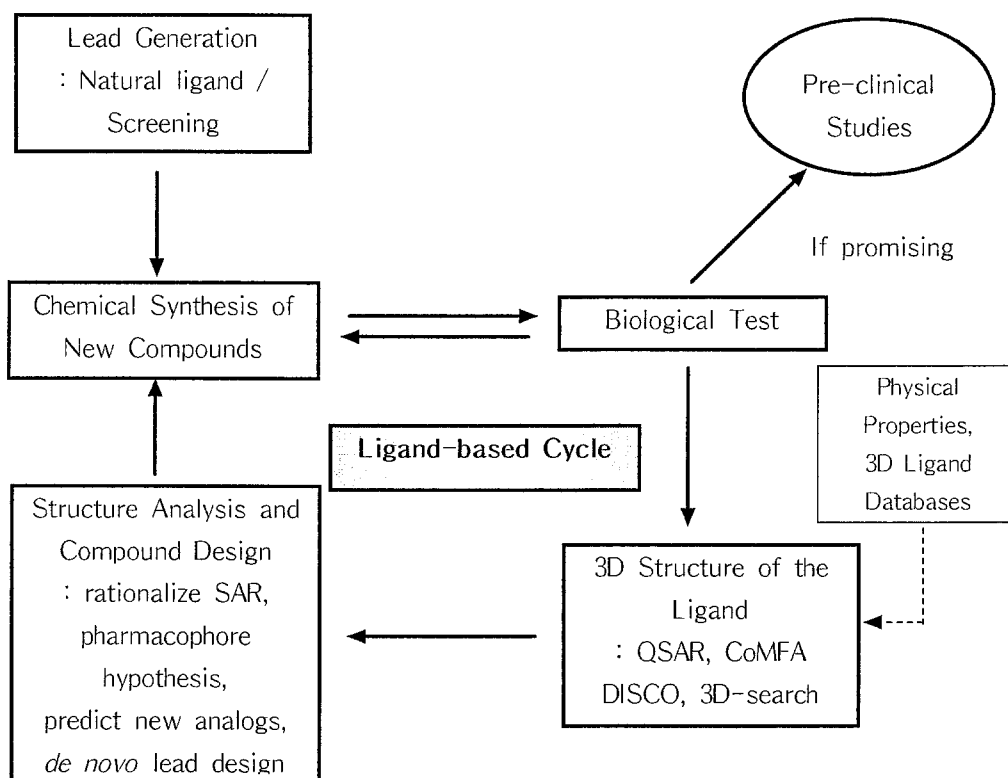


Figure 3. Ligand-based drug design.

본 연구에서 연구 대상물질로 고혈압 치료제인 비펩티드계 AII 길항제¹³⁾, 심장 선택적인 칼륨 통로 활성화제 (K^+ channel activator)¹⁴⁾와 약제 내성을 보이는 항암제의 보조적 치료제로써의 MDR (Multi Drug Resistance) reversal agent¹⁵⁾를 선택하였다. 위의 모든 경우 약물과 결합하는 대상 단백질의 구조가 생체막에 존재하는 단백질이므로 결정화하기 어렵고, 지질막을 제거하면 단백질의 folding에 문제가 있기 때문에 X-선 결정분광법이나 핵자기 공명분광법으로 실험 구조를 얻기가 어려우므로, 분자 모델링을 이용한 ligand-based approach가 가장 적절한 방법이다. 따라서 본 연구에서는 ligand-based approach 방법을 각각의 경우에 적용하여 약물 구조의 최적화 작업과 약물의 구조-활성간의 연구를 수행하였다.

계산에 사용된 연구 방법으로는 분자의 안정한 구조를 찾기 위해 분자 역학 방법¹⁶⁾과 양자 역학 방법¹⁷⁾으로 구조를 최적화 시켰으며, 계산 구조의 정확성을 확인하기 위해 NMR 실험 방법을 통해 얻은 거리 정보나 X-ray 구조 분석으로 나온 구조와 비교하였다. 일련의 동계 화합물의 안정한 구조는 CoMFA 방법¹⁸⁾으로 정량적 구조-활

성 상관관계 분석을 하였으며, CoMFA map으로부터 더 우세한 약리 활성을 갖는 분자를 예측하여 약리 작용의 최적화 작업을 수행했다. 또한 DISCO 분석을 통하여 일련의 활성 있는 화합물의 공통된 구조로부터 활성에 중요한 pharmacophore를 분석 또는 생리 활성 구조를 찾았으며, pharmacophore 분석을 통해 나온 활성에 중요한 작용기들과의 거리 정보를 만족시키면서 기존의 화합물과는 골격이 다른 새로운 화합물을 다양한 유기 화합물의 구조가 축적된 DB로부터 3D-search를 통해서 얻었다. 또한 homology modeling 기술을 이용하여 조절 분비 경로를 거치는 prohormone의 구조 분석으로부터 분류 신호 잔기의 구조적인 특성을 규명하였다.

따라서 본 연구에서는 계산화학을 다양한 생리활성 물질의 설계에 적용함으로써 직접적이고 합리적인 분자 설계 시스템의 기술 확립 및 신약 개발의 효율성을 증대시키는데 목적이 있으며, AII 길항제, 칼륨 통로 활성화제, MDR reversal agent 등의 다양한 생리 활성 물질의 분자 설계를 통하여 합리적인 분자 설계 시스템의 기술과 생리 활성 분자의 구조와 활성간의 연구 결과를 설명하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 선진국의 기술개발 동향

분자 설계를 integrated system으로 처음 상용화한 것은 1980년 초기로 이후 컴퓨터 기술의 발전으로 현재의 분자설계 software를 개발한 것은 1980년 중반이후이다. 이 후 Tripos, Molecular Simulation Inc.를 중심으로 현저한 발전을 실현하고 있다. 향후 보다 많은 기술들이 가미되어 보다 강력한 분자설계시스템으로 발전할 것으로 예상된다.

<외국의 경우>

1878년 John Langley와 1909년 Paul Ehrlich에 의하여 소위 말하는 "Receptor Fit Theory"라는 개념이 도입되었다. 이 가설에 의하면 어떠한 화학 물질이 특정의 생리 활성을 가지기 위해서 인체의 어떤 특정의 "receptor"와 결합하여야 하며 이러한 결합이 효과적으로 이루어지기 위해서는 열쇠와 자물쇠의 경우처럼 상호 특정의 모양을 가지고 있어야 한다는 이론이다. 이러한 가설에 의하여 실제 의약 개발에 이용되기 시작한 것은 최근의 일이다. 이 경우에는 열쇠의 모양이 알려져 있는 경우도 있을 것이고 다른 경우에는 자물쇠의 모양이 알려진 경우도 있을 것이다. 또한 두 개중에 어느 한쪽만을 아는 경우, 이것의 모양으로부터 다른 한 쪽의 모양을 추측해 낼 수가 있다는 것을 의미한다. 이 경우 열쇠는 의약 및 농약 등 화학 물질 (ligand)을 말하며 자물쇠는 이들과 결합하여 특정의 생리 활동을 나타내는 "receptor"라고 생각할 수가 있다. 물론 완전한 결합을 위해서 3차원적인 구조뿐만이 아니고 결합 부위의 물리적 특성, 즉 전자 밀도, hydrophilicity 및 steric factor 등이 중요하다. Receptor의 모양을 가지고 ligand를 추측하여 내는 방법을 "Receptor-based drug design", ligand의 모양으로부터 receptor의 모양을 추측해 내는 방법을 "Ligand-based drug design"이라고 하여 각각에 대해 좀 더 자세히 기술하고자 한다.

가. Receptor-based drug design

최근에 많은 효소들이 분리 정제되어 결정에 의하여 X-ray 구조가 알려지고 있다. 현재까지는 정확한 3차원적인 구조를 알려주는 방법으로 X-ray 결정 구조 방법이 아마도 유일한 것이다. 이 방법은 receptor의 정확한 3차 구조를 알려줄 뿐 아니라 ligand와 receptor가 결합한 상태 하에서의 3차원적인 구조를 제공하여 준다. 그러나 현실적으로 관심이 있는 receptor의 분리 정제 및 구조 결정에는 상당한 어려움이 있는 것이 사실이다. 어떤 경우에는 receptor 자체의 확인이 어려운 경우도 있고 비록 분리 정제는 되어도 구조 결정이 어려운 경우도 많다. 이런 경우 간접적으로 3차원적인 구조를 추측해내는 방법이 최근의 computer에서 "Artificial intelligence", "Pattern recognition" 및 "Image processing" 등의 기술을 이용하여 peptide의 일차 구조로부터 이것이가질 수 있는 가능한 3차원적인 구조를 어느 정도 신빙성 있게 추측해낼 수 있는 방법이 개발되었다. 물론 이 방법이 아직은 실험 단계이며 실용화되기까지는 시일이 필요하겠지만 장래에는 유용한 도구로 쓰일 가능성이 많이 있다. 또 다른 방법으로는 비록 원하는 효소의 구조가 알려지지 않았다 하더라도 이 효소와 유사한 다른 효소의 구조를 연구하므로써 원하는 효소의 3차원적인 모양을 추측해 내는 방법이다. 이 방법을 이용한 실제의 예는 Blundell에 의하여 쥐나 인간에 있는 renin이라는 효소의 3차 구조를 endothiapepsin이라는 유사한 효소의 3차 구조로부터 얻어낸 예이다. 또 다른 예는 현재 고혈압치료에 많이 쓰이는 captopril의 개발 경위로부터 찾을 수 있다. 아직도 Angiotensin Converting Enzyme (ACE)의 X-ray 구조는 밝혀지지 않았지만, Squibb에 있는 Ondetti와 Cushman은 혈압 상승 효과를 갖는 angiotensin II라는 생물질의 생성에 관여하는 이 ACE라는 효소가 아마도 이미 잘 알려진 pancreatic carboxypeptidase라는 효소와 유사한 구조를 가지고 있을 것이라는 가정으로부터 이 carboxypeptidase의 구조에서 ACE receptor의 3차 구조를 추측해 내고 이로부터 captopril이라는 새로운 혈압 강하제를 개발하여 낸 것이다. 또 다른 예는 현재 항암 및 항생제로 쓰이는 methotrexate 계의 개발에서도 볼 수 있다.

나. Ligand-based drug design

위의 경우가 허락지 않을 경우, 즉 receptor의 구조는 알려지지 않았지만 이 receptor와 결합한다고 알려진 여러 물질 (ligand)을 알고 있는 경우이다. 약효가 있는 일련의 물질의 구조를 연구하므로써 이들이 가지고 있는 3차원적인 구조의 공통성 및 화학 결합 상의 유사성 및 이에 따른 여러 물질적인 특성의 공통점을 발견할 수가 있을 것이다. 또한 약효가 없는 일련의 ligand의 구조를 연구하므로써 receptor가 어떠한 모양을 가지고 있으며 receptor와 ligand 사이에 효과적인 결합이 일어나기 위해서 어떠한 화학 결합 및 물리적 특성을 가지고 있어야 하는지를 추측하여 낼 수가 있을 것이다. 이론적으로는 상당히 매력적인 방법이나 실제적으로 응용하는데에는 이에 따른 여러 문제가 대두될 수가 있다. 이 방법을 통한 실제의 예를 보면, Horn과 Snyder는 dopamine과 chlorpromazine의 구조가 상당히 유사한 것을 발견하고 이로부터 dopamine receptor의 모양을 추측해 낸 것이다. 이로부터 dopamine이나 chlorpromazine과 입체 구조는 유사하나 2차원적인 화학 결합 구조가 전혀 다른 종류의 분자를 설계할 수가 있을 것이다. 또 다른 예로 현재 위궤양의 치료로 많이 사용되고 있는 cimetidine의 3차 구조로부터 전혀 화학 결합이 상이한 A라는 물질을 분자 설계에 의하여 얻은 예이다. 이 경우 아마도 cimetidine의 2차 구조만으로는 A라는 물질을 추측하여 내기에는 거의 불가능할 것이다.

컴퓨터가 보급되기 시작한 1970년대부터 미국 등 선진국에서는 국책 연구소 연구원, 대학교수, Consultant 등에 의하여, 컴퓨터 모사 계산의 재료 설계 응용이 개별적으로 시도되어 왔었으며, 컴퓨터의 계산 능력이 크게 향상된 90년도 이후부터는 이들을 결집하여, 재료 설계 및 공정 모사 센터를 설립하는 등 집중적인 연구 개발을 시작하였다.

1997년 2월에 열린 "Liquid Metal Processing and Casting" 국제학회의 proceeding에 실린 29개의 논문 중 50%이상인 15개의 논문이 컴퓨터 모델링에 관한 것이었으며, 또한 1997년 5월에 열린 미국 세라믹 학회에는 "Theory and Computational Modeling" 세션이 새로 생겨, Point Defect, Phase Transition, Green Processing, Grain Growth 등에 관한, 70 여 편의 논문이 발표되었다. 이는

재료분야 연구에서 컴퓨터가 차지하는 비중이 크게 늘어가는 것을 의미한다.

1. 미국의 경우

재료 설계와 공정과정에 컴퓨터 모사 방법을 이용하여 소재 개발의 효율성을 높이기 위한 체계적인 연구는 미국의 CalTech에서 1990년에 Materials and Process Simulation Center (MSC)를 세우면서 본격화되었다.

CalTech의 MSC의 연구는 소재 개발 및 공정 과정에 응용될 수 있는 모델링 방법에 대한 집중적인 연구 및 개발된 기술의 산업체로의 이전에 중점을 두고 있다.

CalTech의 MSC는 미국 정부의 Department of Energy (DOE)의 Advanced Industrial Concepts Design (AICD)의 seed funding으로 시작하였다. 이 DOE/AICD는 DOE에서 기초과학과 산업체간의 연구의 격차를 줄이고 테크놀로지 이전을 장려하기 위한 역할을 주도하는 곳이다. DOE/AICD 기금 이외에, 공동 연구를 위해 투자 중인 주요 산업체는 다음과 같다.

Allied-Signal, Asahi Cemical, Asahi Glass, BF Goodrich, BP Chemical, Chevron Petroleum Technology Company, General Electric, General Motors, Hughes Research Laboratories, Teijin Ltd., Vestar, Xerox Corporation

미국 등 선진국의 경우, 80년대까지는 아카데미 중심의 분자 모델링 소프트웨어의 개발이 주를 이루었으나, 90년대 들어서는 소프트웨어의 상용화가 급속히 진행되고 있고, 가격 또한 프로그램당 수 만 달러의 고가인 경우가 많다.

2. 일본의 경우

재료 공학에서의 양자 역학적인 분자 모델링의 적용은 일본 교토 대학의 재료 학과의 Adachi 교수를 중심으로 지난 20 여 년 동안 활발히 시도되어졌다. 특히 Adachi 그룹에서는 양자 역학적 전자 구조 계산 방법 중의 하나인 DVX-alpha 방법을 세라믹 소재 연구에 집중적으로 응용하여 X-ray emission spectra 분석, 결합 구조의 전자 구조 계산, 소결 과정에서의 본드의 성격 규정 등에 큰 성과를 거두었다.

Japanese Computer Program Exchange (JCPE) 등을 조직하여, 프로그램에 대한 정보를 공유하고, 그것의 발전과 응용에 노력하고 있다.

1970년대 후반부터 일본 과기청 산하 금속재료연구소 (NRIM)의 계산 재료부 (Division of Computational Materials Science and Engineering)에서는 상계산을 위한 비선형 방정식의 도입, 각종 특성 예측을 위한 지능적 시스템의 구축 등 연구하고 있다. 이들은 최근 합금설계프로그램을 활용하여 제2세대 상용합금을 성공적으로 대체할만한 단결정 초내열합금을 개발한바 있다.

제 2 절 국내 기술개발동향

분자설계의 국내도입은 1990년 초기로 화연을 중심으로 본격적인 신물질 개발 연구에 사용되기 시작하였으나 국내기업연구소로의 파급은 미비한 상황이다. 최근에 다수의 기업연구소가 분자설계시스템을 도입하였으며 향후 개발연구에 보다 활발하게 사용할 것으로 예상된다.

신약 개발의 경우 생리 활성 물질의 3차 구조와 반응 메커니즘의 해석으로부터 activity와 pharmacokinetics를 통한 합리적 신약 설계 방법에 의거하여 단시간에 신약 후보 물질을 찾아낸 예는 LG 화학 바이오텍 연구소에서 HIV protease와 inhibitor complex의 X-ray structure에 docking을 함으로써 활성 부위에 fitting을 시켜 drug design을 한 예이다. 그러나 분자 설계 시스템을 신약 개발이나 유기 합성에 적극적으로 적용한 예는 거의 없다.

1. 대학

국내 대학의 물리학과 (서울대, 과기대, 포항공대 등), 화학과 (과기대, 숭실대 등) 등의 그룹에서 계산 물리와 계산 화학을 이용하여 물성 해석을 시도하고 있다.

대학 내의 그룹은 주로 소 그룹으로 컴퓨터 계산 방법의 자체 개발 및 외국 대학과의 공동 연구로 컴퓨터 계산을 이용한 물성 해석을 시도하여 국내외에 연구를

발표하고 있다.

주로 대학에서 행해지는 연구는 연구의 우수성이 외국 대학에 떨어지지 않는 우수한 논문으로 인정되기도 하지만, 그 연구 형태가 case by case로 컴퓨터 계산 방법의 향상을 위해 주로 이용되어 지고 있어, 소재 개발과는 무관하게 진행되거나 일회성 연구에 그치는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하려는 움직임이 있으나, 응용 부분에 대한 연계 및 이해 부족으로 어려움이 있다.

국내 대학의 재료학과 (서울대, 과기대 등)의 연구 그룹에서 컴퓨터 모사를 이용하여 물성에 대한 연구가 시도되고 있지만, 실험 결과를 보강하기 위한 개별적인 시도에 그치는 경우가 많다.

컴퓨터 계산에 의한 합금 설계 분야는 서울대에서 이 방식의 중요성을 일찍이 인식하여 1970년대부터 연구를 시작하여 국내 여러 그룹에서 활발히 연구하고 있고, 현재 국제적으로도 leading group 에 속해 있으나, 컴퓨터를 이용한 합금 설계는 수십 만가지 합금의 특성을 조성별로 예측해내는 것이 최종 목표이며, 선진국에 비하여 우리의 기술수준은 아직 기반조성기 정도라고 할 수 있다.

승실대의 분자설계 센터가 97년 5월에 설립되었지만, 소재 개발분야의 프로그램의 지원은 전무한 상태이며, 현재는 상용 프로그램의 교육에 치중하고 있는 상황이다.

2. 출연 연구소

화학연구원에서는 상용 프로그램을 이용하여 신약 개발 분야에서 좋은 성과를 거두고 있어, 출연 연구소 내에서 컴퓨터 분자 모델링에 대한 관심이 고조되어 있는 상태이다.

최근 들어 화학연구원을 중심으로 세라믹과 촉매 분야에 컴퓨터 모델링을 이용한 연구가 시도되고 있으나, 소규모의 개별적인 과제에 적용을 시도하는 수준이다.

3. 기업 연구소

상용 프로그램을 구입하여 이용하려는 사례가 있었으나, 전문인력의 부족과 상

용 프로그램에 대한 이해 부족으로 실제의 연구에 도움을 주지 못하고 있다.

제 3 절 기술환경/수준 비교분석 평가

외국의 경우 분자 설계 시스템이 체계적으로 개발되어 실제적으로 신약 개발이나 유기 합성에 이용되고 있으나 국내에서는 고가의 장비와 프로그램 구입의 어려움과 전문 인력의 부족과 더불어 공동 연구가 활성화되지 않아서 적극적으로 사용되고 있는 예는 거의 없으며 개발 도중에 있다고 하겠다. 국내에서 분자 설계 시스템에 대한 연구는 아주 미약한 상태이므로 이 분야에서의 연구에 대한 인식도가 높아져야 하며 아직은 초기 단계에 있으므로 국내에서의 연구가 적극 추진된다면 국제적으로 동등한 위치에 도달한 가능성이 높다.

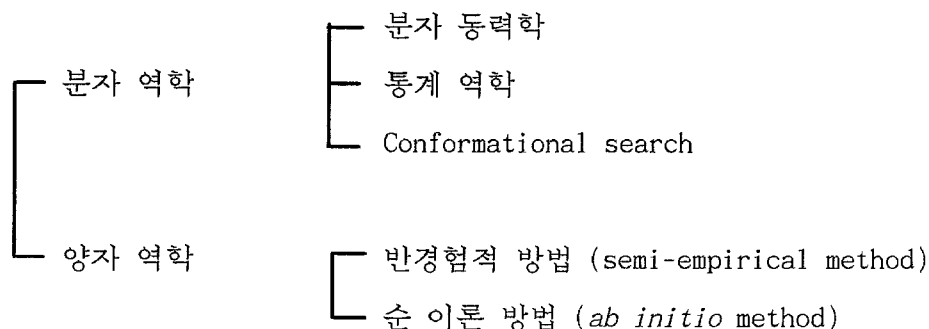
세부 내용	기술 수준 비교 (선진국 :100)
- 3D QSAR을 이용한 신물질 개발	20
- 양자 역학 원리를 이용한 전자 구조 계산	30
- 분자 동력학을 이용한 재료의 구조 특성 계산	30
- 컴퓨터를 이용한 합금설계	40
- 미세구조 모델링	20

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이 론

분자 모델링이 초기에는 분자 에너지 최소화 (molecular energy minimization) 또는 분자 동력학 (Molecular Dynamics : MD) 방법을 이용하여 에너지 적으로 안정한 구조로 얻는 단순한 연구였으나 최근에 분자 모델링을 통하여 알 수 있는 정보는 분자의 3차 구조, 분자 형태 (conformation)의 상대적 안정성, 치환체에 따른 반응성, 전자 구조, 쌍극자 모멘트 (dipole moment), 전하/전자 밀도 분포, 화합물의 자외선, 적외선, 핵자기 공명 스펙트럼 예측, 분자의 분극성 (polarizability) 과 같은 분자의 성질¹⁹⁾이나 단백질과 약물의 결합 구조를 통한 분자 인지 (molecular recognition) 또는 선택성과 같은 다양한 정보를 얻을 수 있다. 따라서 지금까지 개발된 다양한 방법들을 이용하여 분자의 3차원 구조를 예측하고, 이론적인 계산에 의한 물성 예측 및 신물질 설계까지 광범위하게 확장되었다.

분자 구조 및 성질 결정에 사용하는 분자 설계의 방법은 크게 다음의 두 분야로 나뉘어진다.



이런 방법들은 각각의 장·단점을 상호 보완적으로 사용되고 있으며, 분자의 크기와 계산의 정확성을 고려하여 이론화학자가 계산하고자하는 분자의 특성에 맞게 그 방법을 선택해야 한다. 예를 들면 분자 동력학이나 통계 역학적인 방법들은 계산 속도가 빠르므로, 단백질이나 펩티드같은 거대 분자의 연구가 가능하고 용매

효과를 포함하는 연구를 하기에 적합한 반면, 양자 역학 계산은 분자의 정확한 물리 및 화학적 성질을 얻고자 할 때 유용하다. 따라서 각각의 방법의 이론 및 장·단점을 살펴보고, 방대한 실험데이터의 축적과 컴퓨터 하드웨어의 용량증가로 인한 DB를 이용한 분자 설계 및 신약 설계에 주로 사용되는 여러 가지 방법의 이론을 소개하고자 한다.

1. 분자역학 방법

분자역학 방법에서의 힘장 (force field)²⁰⁾은 고전역학 이론을 사용하여 분자의 퍼텐셜 에너지 표면 (potential energy surface)이나 물리학적 성질을 나타낸다. 그리고 분자를 각각의 분석함수에 의해 서로 상호 작용하는 원자의 집합체로 표현한다. 이 과정에서 분자를 마치 스프링으로 연결된 공으로 간주하여 Hooke의 법칙에 의해 퍼텐셜 에너지 함수 (potential energy function)로 표현된다. 따라서 분자의 전체 에너지는 결합거리, 결합각, 이면각, 비결합성 상호작용 (정전기 인력, 수소 결합, 반데르발스 인력)등의 에너지항들의 합이다.

$$E_{\text{total}} = E_{\text{bond}} + E_{\text{bondangle}} + E_{\text{dihedrals}} + E_{\text{vanderWaals}} + E_{\text{Hbonds}} + E_{\text{electrostatic}}$$

분자역학 방법에서의 매개변수들은 주로 실험과 양자역학 계산으로부터 얻어진 결과를 사용하므로 분자의 바닥상태에서의 구조와 분자의 입체 형태에 대한 상대적인 안정성을 비교할 때 주로 사용이 된다. 그러므로 양자역학 방법에 비해 계산 속도가 빠르며, 생체분자와 같이 매우 큰 분자도 계산이 가능하다. 그러나 양자 역학과는 달리 분자 역학법은 전자들의 운동을 고려하지 않으므로 화학 결합의 형성 및 파괴나 들뜬 상태의 구조와 에너지, 전자의 비편재화, 분자 오비탈의 상호 작용이 중요한 전이상태나 분광학적 계산은 할 수 없다. 일반적으로 유기화합물과 같은 분자들의 구조계산에는 MM2²¹⁾, MM3²²⁾, MM4²³⁾, CVFF²⁴⁾, MMFF9²⁵⁾ 퍼텐셜 에너지 함수가 사용되고, 생체분자들의 구조계산에는 AMBER²⁶⁾, CHARMM²⁷⁾, ECEPP²⁸⁾ 등의 퍼텐셜 에너지 함수를 사용한다.

구조 최적화 (geometry optimization)는 총괄 최소점 (global minimum)에 해당하는 가장 낮은 에너지를 가진 구조를 찾는 과정이며, 특히 분자의 크기가 큰 경우

는 퍼텐셜 에너지 함수의 종류 및 초기 구조, 최적화 방법에 대한 의존성이 높다. 최적화 방법으로는 주어진 퍼텐셜 에너지 함수를 거리에 의해 일차 또는 이차 미분한 결과에 따라 진행 방향이 결정되고, 보통 steepest descent, conjugate gradient, Newton-Raphson, Quasi-Newton 방법이 많이 사용되고 있다²⁹⁾. 또한 에너지 최소점을 찾아가는 과정은 퍼텐셜 에너지 표면의 낮은 방향으로만 진행되며 초기 구조에 가장 근접된 최소점으로 이동되므로 대부분의 결과는 초기 구조에 의존하여 극소점 (local minimum)을 갖는 구조를 얻게 되는 것이고 원자의 수가 증가함에 따라 다중 극소점 (multiple local minimum) 문제가 발생한다. 따라서 분자 역학에서는 다중 극소점 문제를 해결하기 위하여 아래와 같은 방법들이 구조 결정에 사용된다.

- 분자 동력학
- Monte Carlo, MC³⁰⁾
- Conformational search
 - : GRID search³¹⁾, Systematic search³²⁾, Random search³³⁾,
Model Building approach (Build-up approach)³⁴⁾
- Distance Geometry, DG³⁵⁾

각각에 대해서 자세히 살펴보면 다음과 같다.

가. 분자 동력학

분자 동력학은 분자 및 원자 계의 운동 방정식을 풀어 동력학적, 열역학적 성질 및 기타 성질을 구하는 방법으로서 모든 거시적 성질은 시간에 대한 평균값으로 구한다. 현재 분자 동력학으로 계산 가능한 원자수는 컴퓨터 성능에 따라 다르지만, 대략 10^6 에서 10^7 개의 원자와 10^{-7} 초의 시뮬레이션 시간을 계산할 수 있다. 또한 계의 시간에 따른 변화와 동력학적 성질을 직접 구할 수 있는 장점이 있으나 컴퓨터 시간의 제한으로 장시간의 모델링은 어렵다.

일반적으로 분자 동력학 계산은 단백질이나 펩티드 같은 생체분자³⁶⁾나 대형 유기 분자의 구조 계산에 주로 사용이 되며, NMR 실험 결과에서 나온 구조의 정제

(refinement) 과정에 사용한다. 초기 구조는 에너지 최소화 과정에서 얻어진 구조를 사용하며, 퍼텐셜 에너지 함수를 선택하여 분자 내 및 분자간 상호작용을 계산하고 사용자에게 의해 정해진 기본 조건 (시간 간격, 총 실행 시간, cut off distance, 온도 및 압력 변수 등)에 따라 계산을 수행한다. 이 때 NMR 실험 결과에서 나온 거리 제한을 계산 조건으로 사용할 수 있다. 이 과정에서 각 원자들은 계산된 힘에 의한 가속도로부터 시간에 따른 새로운 공간상 위치와 속도를 갖게 되며 주어진 시간 간격으로 동일한 과정의 반복 수행이 이루어진다. 이 때 각 단계마다 물리화학적 양들이 저장되며 계산 과정이 모두 끝난 후 이 단계들을 원하는 양 또는 구조들의 궤적을 관찰할 수 있고 이를 분석하여 분자의 운동이나 평균에너지, 용매의 영향 등을 알 수 있다.

분자동력학법은 운동 에너지를 고려하기 때문에 에너지 장벽을 극복하여 극소점에서 벗어나 총괄 최소점에 접근할 확률을 높여 줄 수 있고, 용매 효과 및 실제 시간동안 분자의 운동과 열역학적 양들에 관한 정보를 얻을 수 있다. 그러나 설정된 총 수행 시간 및 분자의 크기에 따라 장시간의 계산 시간과 거대 저장 능력이 요구된다. 따라서 이 방법은 연구 대상에 따라 초기 온도 설정 및 각종 파라미터들의 선택에 신중을 기하고 용매를 사용할 경우 얻고자 하는 결과에 따라 적절한 기본 조건을 설정하여 계산에 사용될 용매의 양, 시뮬레이션에 사용될 알고리즘의 적용 등을 고려해야 한다.

나. Monte Carlo ; MC

분자동력학 방법이 시간에 따라 연구 대상 계가 변화하는 궤적을 연구하는 반면에 MC는 통계적인 방법을 도입하여 시간과 관계없이 에너지 적으로 가능한 상태들을 선택하는 방법이다. 이렇게 선택된 상태의 물리적 성질의 평균을 취하여 결과를 얻는다.

MC 방법은 먼저 무작위로 계의 위치 변수를 선택하여 위치를 이동시키고 퍼텐셜 에너지의 변화(dV)를 계산한다. 새로운 위치에서의 에너지가 이동 전 위치에서의 에너지와 비교하여 낮으면 $\exp(-dV/kT)$ 의 확률로 선택하고, 높으면 $1-\exp(-dV/kT)$ 의 확률로 거부된다. 이와 같이 Boltzmann 분포를 갖도록 표본 수집 (sampling) 과정을 무수히 반복하여 평균 양상분을 구할 수 있다. 또한 이로부터

압력, 열용량 등의 계의 열역학적 성질을 구한다.

이 방법을 사용할 때는 올바른 알고리즘을 선택해야 하고 적절한 수용률 (acceptance ratio)을 얻을 수 있도록 random step, size와 총 실행 크기를 계에 맞게 잘 설정해야 한다는 것이다. 또한 MC의 사용은 MD보다 방법적으로 다소 어려우므로 사용이 급격히 줄고 있다.

다. Conformational search

많은 분자들은 하나 이상의 분자 형태로 존재하며, 이들 형태들은 구조에너지에 따른 통계적 확률로 분포한다. 예를 들면 cyclohexane의 경우 chair, twist-boat 및 boat 형태가 존재하며, 이 중 가장 안정한 chair 형태가 확률적으로 많이 분포한다. 화학 결합의 신축운동, 굽힘 운동 및 단일 결합을 축으로 하는 회전 운동들은 분자의 여러 형태들을 결정하는 요소로서 분자의 자유도 ($3N-6$)에 해당하는 다차원 에너지 표면 (hyper energy surface)에서 수많은 극소점들을 형성한다. 따라서 분자 역학 방법으로 구조를 최적화 시키는 것만으로는 에너지 장벽을 극복할 수 없으므로 이러한 다중 극소점 문제를 해결하는 conformational search 방법으로는 GRID search, systematic search, random search, model building approach 등이 있다.

(1) GRID search

분자의 구조는 주로 단일 결합의 회전에 의해 여러 가지 형태를 가질 수 있다. 단일 결합을 일정한 간격(θ)으로 등분하여 회전시키면, 하나의 회전 가능한 결합에 대하여 $360/\theta$ 개의 이면각이 정의된다. n 개의 회전 가능한 결합을 가진 분자는 $(360/\theta)^n$ 개의 형태가 만들어진다. 또한 각각의 다양한 형태의 낮은 에너지 구조를 찾기 위해서는 이들 각각의 초기 구조에 대한 에너지 최소화 과정을 수행한다. 이러한 과정을 통해 낮은 에너지 구조를 찾아내는 방법이 grid search이다. 따라서 회전 가능한 결합의 수가 증가함에 따라 계산 시간은 증가하므로, 회전각이 적은 소형 유기 분자의 구조 계산에 주로 사용한다.

(2) Systematic search

이 방법은 GRID search와 동일하나, GRID search에 비해 이면각을 회전했을 때 불안정한 입체 형태를 지니는 구조를 제거하여 계산 양을 줄이는 방법이다. 또한 NOE (Nuclear Overhauser Effect) 실험 data로부터 거리에 대한 정보가 있는 경우는 distance constraint를 설정하여 거리 조건을 만족시키지 않는 구조는 계산에서 미리 배제시켜 계산 시간을 단축시킬 수 있다.

(3) Random search

Random search 방법은 일반적으로 구조 변수를 임의의 값으로 선택하여 얻어진 초기구조로부터 낮은 에너지 구조를 결정하고 이것을 '현행 구조'로 채택한 후, 또 다른 임의의 구조에서 출발하여 얻어진 낮은 에너지 구조를 '새로운 구조'라고 하고 현행 구조와 비교하여 에너지가 낮으면 현행 구조로 채택하고 에너지가 높더라도 Boltzmann factor, $\exp(E_{\text{new}} - E_{\text{old}})$ 값이 0과 1사이의 임의의 추출 값보다 크다면 현행구조로 채택된다. 대체된 기존의 구조는 하나의 낮은 에너지로 기록되며, random search는 이와 같은 순환을 반복하면서 낮은 에너지 구조를 찾아 나가는 방법이다. 이 방법은 초기 구조에 따라 결과가 영향을 받는 단점도 있지만, grid search 방법보다 계산 시간이 훨씬 단축되어 회전각의 수가 많은 유기분자의 계산에 사용된다.

(4) Model building approach (Build-up approach)

이 방법은 단백질이나 핵산과 같이 거대 분자의 구조 계산에 활용되는 방법으로 분자를 작은 조각들 또는 부분 구조로 나누어 각각에 대해 낮은 에너지 구조를 결정한 다음, 각각을 조합하여 초기구조를 만들고, 에너지 최소화 과정을 통하여 전체분자의 낮은 에너지 구조를 결정하는 방법이다. 이 방법은 분자를 구성하는 원자들 간에 근거리 상호작용이 전체구조를 결정하는데 중요한 역할을 한다는 가정이 전제되어 있으나, 조사의 대상이 되는 초기구조의 수가 적다는 점에서 효율적이지만 낮은 에너지 구조들 중 일부가 제외될 수 있다.

라. Distance geometry

이 방법은 분자를 형성하는 구성원자간에 이루어지는 결합 거리, 각, 이면각을 수학적으로 처리하여 가능한 모든 초기 구조를 얻는 방법으로, 원자간의 거리를 상한계와 하한계의 조건을 가진 거리 행렬로 초기 구조를 형성한다. 상한계와 하한계의 범위는 NMR의 NOE 실험에 의하여 얻어지는 비결합 원자간의 거리를 파라미터로 하여 사용한다. 따라서 조건을 만족시키지 않는 구조는 미리 배제시켜 계산량을 줄일 수 있으나, NOE의 수가 적은 경우는 적용하기 어렵다. 이 방법은 주로 MD를 수행하기 전에 생체분자의 초기 구조를 얻는데 사용이 된다.

2. 양자역학적 방법

1920년대 중반에 창안된 양자역학은 그 이후 지금까지 화학을 이해하는데 중요한 분야로 발전되어 왔다. 초기에는 계산 능력의 한계에 의해 극히 작은 분자의 구조 계산에 사용되었으나 슈퍼 컴퓨터의 등장으로 현재는 펩티드나 단백질의 계산에도 사용이 된다. 양자 역학 방법은 분자의 3차원 구조와 에너지외에도 쌍극자 모멘트, 다극자 모멘트, 전자분포, 전자 편극도, UV, IR, NMR 스펙트럼 등을 계산할 수 있다. 분자 연구에 가장 많이 사용되는 것이 분자 궤도 함수 법으로 실험 결과로부터 얻은 경험적 파라미터들을 도입했는가의 여부에 따라 순 이론 방법 및 반경험적 방법으로 구분한다.

가. 순 이론 방법

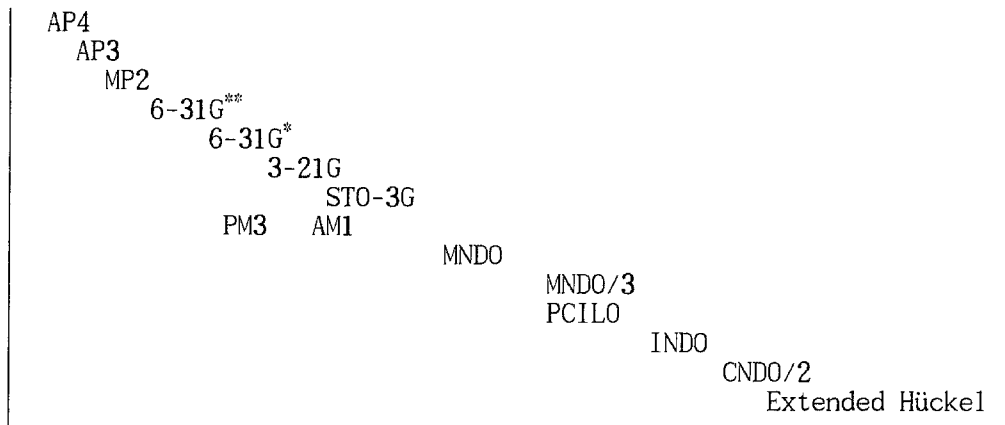
이 방법은 Schrödinger 파동방정식의 해를 얻기 위해 실험 값을 사용하지 않고 분자 내의 핵과 전자들간의 상호작용을 모두 고려하여 계산하는 방법이다. 그러나 계산 과정이 매우 복잡하고 많은 계산시간이 요구되며 특히 분자의 크기가 커질수록 소요되는 계산 시간은 기하급수적으로 늘어난다 (대략 원자수의 4제곱에 비례)³⁷⁾. 따라서 이 방법은 주로 소형 분자의 연구에 사용되며 고분자나 생체분자들을 대상으로 하는 연구에는 아직 한계가 있다.

순 이론 방법의 정확도는 베이스스 함수 (basis function, basis set)의 선택

에 달려 있다. 또한 계산하려는 물리적 성질에 따라 적합한 basis set을 선택하여야 한다. 그러나 basis set의 선택은 컴퓨터 계산 소요시간에 큰 영향을 끼치므로 사용하는 컴퓨터의 계산 능력을 고려하여 연구자는 신중히 검토되어야 한다 (Figure 4)³⁸⁾. 따라서 일반적으로 낮은 수준의 basis set으로 계산한 후, 점차 더 높은 수준의 basis set으로 계산한다.

순 이론 방법은 전자들의 상관성을 고려하느냐에 따라 두 가지로 분류된다. 그 중 Hartree-Fock 방법은 모든 전자들이 퍼져있다는 가정 아래 각각의 전자와 평균 장 (field)과의 상호 작용을 계산하며, 상관성 방법 (correlation method)은 실제 전자들 내의 일시적인 정전기적 반발력에 의하여 생긴 전자들의 상관된 운동 에너지 변화를 포함하므로 훨씬 더 정확한 결과를 얻는다. 상관성 방법으로는 perturbation theory (MP2, MP3, MP4)³⁹⁻⁴⁰⁾와 configuration interaction (CI)⁴¹⁾, density functional theory (DFT)⁴²⁾방법이 있다. DFT 방법은 전자 밀도에 대해 경험적인 함수를 적용하여 전자 상관 에너지를 계산하는 방법으로 다른 correlation 방법과 비교하여 계산시간이 짧으면서 계산의 정확성을 가지므로 사용 빈도가 증가하고 있다.

CPU time



Relative Error between Calculation and Experiment

Figure 4. The calculation time and relative error between calculation and experiment for different quantum mechanics methods.

나. 반경험적 방법

이 방법은 순 이론 방법의 계산과정에서 이온화 엔탈피, 결합 엔탈피, 쌍극자 모멘트 등을 실험 값으로부터 얻은 파라미터를 도입하여 계산을 단순화시키고 계산 시간을 단축시킨다. 따라서 이 방법은 거대분자의 계산에 사용될 수 있는 장점을 가지고 있으나 결과의 정확성은 실험 파라미터에 의존한다.

이 방법은 원자가 전자만을 고려하며 내부 전자 (core 또는 inner-shell electrons)들은 핵에 의해 차단되어 있다고 가정하여 적분계산을 생략한다. 또한 컴퓨터 계산에 시간이 많이 소요되는 일부 계산 (Fock matrix 원소의 적분계산)들은 분자구조, 쌍극자 모멘트, 생성 엔탈피 등의 계산 값이 실험 값과 일치하도록 매개 변수화한 값으로 대신 사용된다. 매개 변수화하는 방법에 따라서 Extended Hückel⁴³⁾, CNDO⁴⁴⁾, INDO⁴⁵⁾, MINDO⁴⁶⁾, MNDO⁴⁷⁾, ZINDO⁴⁸⁾ 등의 종류가 있으며, 최근에는 전자 반발력을 극대화한 MNDO를 보완한 AM1⁴⁹⁾과 PM3⁵⁰⁾ 방법이 유기 분자의 구조 계산에 많이 이용되고 있다. 이 방법은 원자수가 수백 개에 이르는 유기 분자의 구조 계산이 가능하나, 분자 역학 방법에 비해서 다소 많은 시간이 소요된다. 그러나 분자 역학 방법으로 계산을 못하는 분자의 들뜬 상태와 화학결합의 형성-파괴에 따른 전이 상태를 계산할 수 있다. 또한 경험적인 파라미터를 사용하므로 어떤 경우는 순 이론 방법보다도 더 실험 결과와 일치하는 경우도 많다.

3. DB를 이용한 분자모델링

현대는 정보의 시대라 일컬을 정도로 모든 분야에서 다양한 정보의 접근 방법과 정보의 검색이 점차 전문화되어 가고 있다. 또한 정보를 얼마나 신속히 이용할 수 있는가에 따라 결과의 승패가 좌우된다고 해도 과언이 아니다. 따라서 화학 분야에서 축적된 연구결과를 어떻게 활용하는가는 매우 중요한 일이다. 현재 컴퓨터 전산망의 발달로 화학물질명, 문헌 검색, 물질의 특허, 유기 반응, 독성, 유사 가능 물질, 분자의 구조 및 성질과 같은 정보를 DB로부터 쉽게 알아볼 수 있다. 또한 지난 수년간 정보의 축적으로 DB를 이용한 다양한 방법들의 연구가 진행 중이다. 이 방법은 실험적으로 얻어진 데이터를 분석하여 경험적인 규칙을 만들거나 실험을 미리 예측할 수 있는 인공지능 시스템을 설계하는 것이다. 따라서 이 방법에서는

최근 컴퓨터 과학에서 사용되는 대부분의 방법들을 도입하고 있다. 실험적으로 알려지지 않은 분자의 구조 및 성질을 예측하기 위해 다양한 DB가 상용화 또는 공개되어 있고 특히 생체분자 및 유기 화합물들에 관한 DB는 오랜 역사와 많은 연구자들의 노력으로 비교적 잘 구축되어 있으며 대표적인 DB의 예를 **table 1**에 간략히 소개하였다.

Table 1. Database for molecular modeling

	DB	Contents
Nucleic acids	GenBank (NCBI)	DNA and RNA sequence
	EMBL (EBI)	Nucleotide sequence
	NDB (Rutgers University)	Nucleic acid sequence
	GSDB (NCGR)	Nucleotide sequence
Proteins	PDB (RCSB)	3D macromolecular structure by X-ray, NMR and modeling
	SwissProt (SIB)	Protein sequence
	PIR (NBRF)	Protein sequence
Organic molecules	CSDS (CCDC)	X-ray crystal structure of organic, organometallic and metal compounds
	Chapman and Hall	Structure of organic, inorganic, organometallic compounds, natural products, pharmacological agents
	NCI	Structures tested by carcinogenic activity
	Derwent World Drug Index (WDI)	Structures and biomedical information for drug design
	Aldrich	Organics and inorganics for chemical synthesis
	ACD	3D/2D structure of organics

가. Homology modeling

Homology modeling은 3차 구조가 알려진 단백질로부터 단백질 서열의 유사성을

이용하여 대상 단백질의 3차 구조를 예측하는 기술로써⁵¹⁾, Browne에 의해 최초로 hen egg white lysozyme의 구조에 근거하여 α -lactalbumin의 구조를 모델링하였다. 그 후 유사한 방법을 사용하여 단백질의 3차 구조를 예측하려는 시도가 증가하기 시작했으며, 20년 전에는 단백질의 2차 구조에 대한 정확성이 50-55% 정도였으나, 그 후 단백질의 3차 구조가 점차 밝혀짐에 따라 1992년도에는 60-65% 정도로 증가하였다. 그리고 현재 30% 이상의 단백질 서열의 유사성이 있는 경우, 평균적으로 90%이상의 구조 예측의 정확성을 보여 주고 있다 (Figure 5)⁵²⁾.

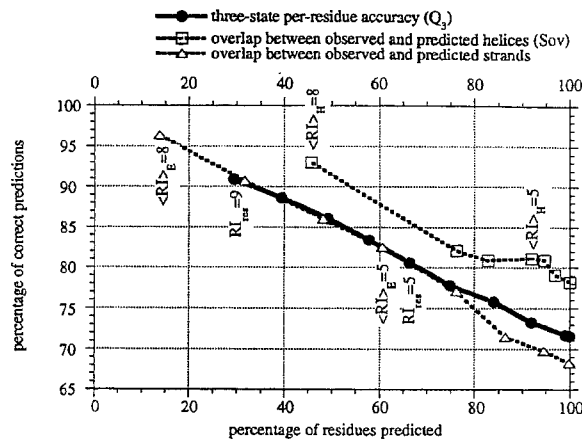


Figure 5. The predictability of protein structure prediction.

연구 방법은 Figure 6에 순서도로 제시하였다⁵³⁾. 먼저 단백질 서열의 분석에 의해 유사성이 있는 서열을 Protein Identification Resource (PIR)⁵⁴⁾, GENBANK⁵⁵⁾, SWISS-PROT, EMBL⁵⁶⁾과 같은 핵산 서열 DB나 Brookhaven Protein Data Bank (PDB)¹⁵⁾를 사용하여 검색한 후, 유사성이 있는 서열을 대상 단백질 서열의 유사성을 가진 서열과 연속적인 방법으로 비교하면서 점수가 가장 높은 서열을 찾는 multiple sequence alignment 과정을 수행한다. 이 과정에서 얻을 수 있는 정보는 구조적으로나 기능적으로 중요한 보존 잔기 (conserved motif)를 확인할 수 있으며, 변이가 심한 loop 영역이나 대략적인 2차 구조의 예측을 가능케 해준다. 다음으로 다양한 방법 (Chou-Fasman, GOR, neural network PHD)에 의해 서열의 특징적인 양식 (pattern)으로 2차 구조를 예측한 다음, 유사성이 있는 실험 구조가 있으면 대상 단백질의 예측되는 2차 구조와 겹침 (superimposition) 후, 예측되는 3차 구조는

loop 영역과 conserved 영역으로 나뉘어 모델링 한 후 에너지 최소화 과정과 MD 계산에 의해 단백질의 구조를 정제시킨다.

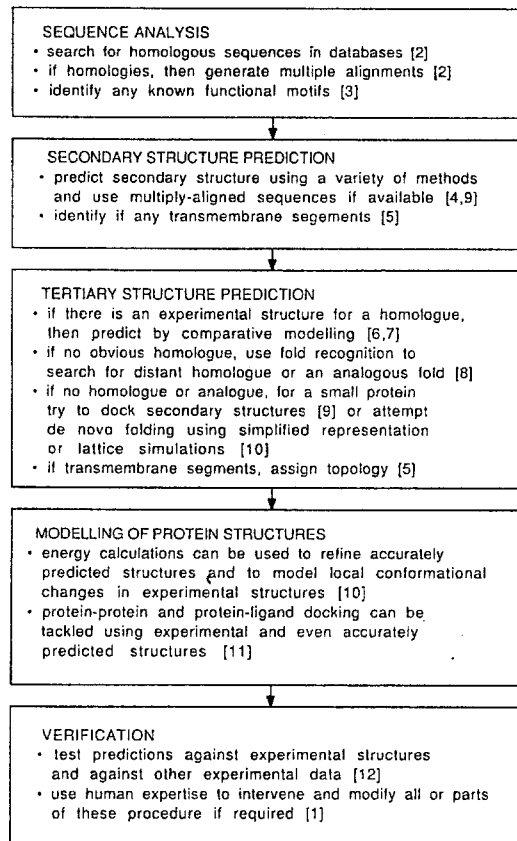


Figure 6. The flow chart of protein structure prediction.

단백질 서열 중 30% 이하의 유사성이 있는 경우, 정렬 (alignment) 방법에 따라 문제점이 발생할 수 있으나, 기존에 알려진 서열의 1/3이 최소한 하나의 알려진 구조와 관련이 있고, 대략 10,000 개의 알려진 단백질 서열 중에서 2,000 개만이 실험적으로 구조가 결정되어서 상대적으로 정확하게 구조를 예측할 수 있는 서열의 수는 실험적으로 결정된 단백질의 수보다 더 클 것으로 예상되기 때문에 homology modeling 기술은 앞으로 유용할 것으로 기대된다.

나. Searching database

신약개발에서의 분자 DB는 새로운 선도 후보 물질의 탐색이나 구조적으로 유사한 대체 물질 검색 및 조합화학 라이브러리를 구축하는데 사용이 된다. 그 중 새로운 선도 후보 물질 검색에 사용하는 방법으로는 DIStance COmparisons (DISCO) module이나 Catalyst 프로그램이 있으며, 활성을 가진 기존의 약물로부터 pharmacophore를 만족하는 새로운 분자를 DB 검색을 통하여 얻는다. 그 중 DISCO의 목적은 수용체와 결합할 때의 활성 구조 (bioactive conformation)를 찾는 것으로 먼저 동일한 방법으로 수용체에 결합할 가능성이 있는 활성이 있는 분자들을 선택한다. 약물이 수용체와 결합할 때 생체 내에서 구조의 변화가 예상되므로 이론적으로 가능한 내부 원소의 거리의 영역과 낮은 에너지를 가진 여러 개의 구조를 얻는다. 각각의 화합물로부터 수소 결합 주계 또는 받게라든지 양이온 원자나 음이온 원자, 소수성 중심 (고리의 중심)과 같이 공통된 분자의 특성으로 분류하고, 모든 모델 가운데 구조적으로 단순하고 rigid한 비교 화합물을 선정한다. 그런 다음 모델로부터 전체 포인트 수의 범위라든지 각각의 특성간의 거리와 같은 모델 형태를 자세히 명시한다. 위와 같이 설정한 모델로부터 조건을 만족하는 새로운 화합물을 분자 DB의 검색을 통하여 얻는다.

4. 신약 설계에서의 분자 모델링

Computer-assisted drug design (CADD)⁵⁸⁾ 또는 computer-assisted molecular design (CAMD)은 최근에 컴퓨터를 이용하여 약물을 설계하는 방법으로써 적용되는 분야이다. 최근에는 수용체와 상호 작용할 리간드, 즉 가상 약물을 찾는 노력이 진행중이다. 일반적으로 신약개발은 어떠한 선도 물질이 발견되었을 때 그 물질의 화학 구조식 중에서 약리 작용의 최적화 작업을 추진하는 과정을 분자 구조의 생리활성간의 상관관계, 즉 QSAR을 통하여 효과적으로 수행한다. QSAR은 화합물의 구조 또는 성질 설명인자 (descriptors)와 활성간의 관계를 분석하는 방법이며, 물리화학적 설명인자로는 소수성, 위상 (topology), 정전기성, 양자화학, 기하학적 설명인자 (geometric descriptor) 등으로 나타내어진다.

QSAR의 역사적인 배경을 살펴보면 1863년에 A.F.A. Cros가 포유동물의 알콜에

대한 독성은 알콜에 대한 물의 용해도가 감소할수록 증가한다는 것을 발견하였다⁵⁹⁾. 1890년대에 Hans Horst Meyer와 Charles Ernest Overton이 독립적으로 유기화합물의 독성은 물질의 친지질성 (lipophilicity)에 비례한다는 것을 발표하였다⁶⁰⁾. 그 후로 Louis Hammett는 벤조산 (benzoic acid)의 해리 반응에서 유기산과 염의 전자적 성질은 평형 상수와 반응성과 정량적 관계가 있다는 것을 밝혔다⁶¹⁾. 그러나 전자 효과만으로는 생리적 활성을 충분히 설명을 할 수 없었으므로 Hansch에 의하여 친지질성을 나타내는 pi항을 첨가시킴으로서 화합물의 생물학적 유용성 (bioavailability)를 설명할 수 있었다⁶²⁾.

QSAR의 성공 여부는 활성을 설명하기 위해 적당한 설명인자의 선택에 따라 결정이 된다. 즉 분자의 3차원 구조 특성에 따른 물리화학적 성질들을 수치적으로 잘 표현할 수 있는 설명인자가 요구된다. 따라서 실제 생체 내에서 약물과 수용체의 결합은 3차원 구조와 그에 따른 작용기와의 상호 작용에 의해 약물의 선택성이 결정되므로, 물질의 물리 화학적 성질을 표현하는 제한된 설명인자와 생리적 반응간의 관계를 유도한 고전적인 QSAR로 구조와 활성간의 관계를 설명하는데는 많은 한계가 있었다. 따라서 1970년대 이후 많은 연구자들의 노력에 의해 분자를 3차원적으로 접근하려는 시도가 계속되었고 이와 더불어 컴퓨터 하드웨어의 발전에 따른 계산 속도 향상과 graphic workstation의 발전으로 분자의 3차원적 구조를 토대로 한 3D-QSAR 방법이 크게 발전할 수 있었다. 따라서 3D-QSAR의 대표적인 예로 Cramer가 개발한 CoMFA의 원리와 방법에 대해서 알아보면 다음과 같다.

가. CoMFA

CoMFA는 QSAR과 신약개발의 강력한 도구로서 입체장과 정전기장에 대한 mapping을 통하여 분자의 물리 화학적 성질과 생리활성 간의 상관성을 연구하는 방법이다.

CoMFA 분석을 하기 위해서는 conformational search로 얻어진 분자의 구조를 포함하는 열과 화합물의 구조 설명인자를 나타내는 행으로 표시되는 QSAR 표를 작성한다 (Figure 7). 생물활성을 나타내는 Y-영역 (독립변수)과 분자의 구조 성질로 표현되는 X-영역 (비독립 변수)을 선형함수로서 표현한 상관관계식을 유도하고 이 식으로부터 더 우세한 성질을 갖는 분자를 예측하고 합성하여 테스트하는 순환

과정을 거쳐서 더 나은 화합물을 설계한다.

Compound	Bio	P1	P2	P3	P4		
SK&F 92222A	4.6	.26	.33	-20	1		
SK&F 94221	3.9	.61	.0	-2	1		
SK&F 56605	6.1	1.1	.6	100	0		
SK&F 5883	4.7	.49	.4	10	1		

Question: Which Pn "explain" BIO ?

Figure 7. A QSAR table.

CoMFA는 3차원 공간에 일정한 간격으로 놓여있는 격자 원자와의 입체장과 정전기장으로 표현되므로 CoMFA 설명인자의 행은 Cartesian 공간에 놓여있는 격자 원자 (probe atom)와 약물과의 입체장과 정전기장의 크기를 나타낸다. Figure 8은 CoMFA QSAR 데이터 표의 구성과 분석을 보여준다. Standard CoMFA fields는 Lennard Jones force인 입체장과 Coulombic force인 정전기장으로 구성되며 격자 원자는 일반적으로 sp^3 혼성 탄소 원자 (1.53 Å 반경, +1.0 전하)를 사용한다.

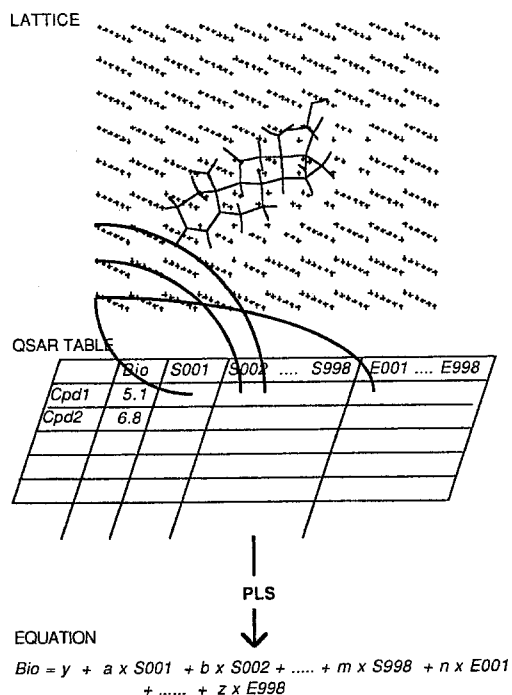


Figure 8. The CoMFA process.

그러나 standard CoMFA fields는 순전히 엔탈피만 고려한 것이므로 최근에는 엔트로피까지 고려한 분자의 소수성 특성을 첨가해서 사용하는 경우도 있다. 예를 들면 소수성 결합 성분을 고려한 Hydrophobic Interaction Technique⁶³⁾인 HINT field를 도입함으로써 분자의 친지질장 (lipophilic potential fields)인 소수장 (hydrophobic field)을 사용하여 분석하였다. 또한 Norinder⁶⁴⁾와 Altomare⁶⁵⁾는 원자의 소수성 파라미터를 도입하여 친지질성 정보를 첨가하는 Molecular Lipophilicity Potential (MLP) fields⁶⁶⁾를 개발하였으며, Kim⁶⁷⁾은 물 (1.7 Å 반경)을 격자 분자로 사용하여 그리드 포인트 (grid points) 내에서 회전 가능케 함으로써 치환체의 수소 결합에 대한 정보를 얻을 수 있는 수소 결합장 (H-bonding field)을 개발하였으며, Delphi program⁶⁸⁾에서는 규칙적으로 배열된 장 포인트에서 용매화에 기여하는 정전기성 기여도를 Poisson-Boltzmann 식을 통하여 계산하는 탈용매화 에너지 장 (desolvation energy field)을 개발하였다. 또한 이온이나 전하 이동 반응에서는 리간드와 수용체의 상호 작용이 단순히 Coulombic type field로 정전기적 특성을 나타내는 것이 적절하지 않으므로, HOMO와 LUMO로 표현되는 분자

오비탈장 (molecular orbital fields)⁶⁹⁾을 사용하는 것이 반응성을 설명하는데 적절한 설명인자가 된다. Kellogg 등은 위상 정보에 따른 자유 원자가의 축소로써 전자 위상 상태 장 (electrotopological state fields)⁷⁰⁾을 사용하였다. 따라서 재래의 QSAR은 data set의 모든 분자가 같은 원자를 보유하는 것으로 제한적이었지만 장을 사용함으로써 데이터 파라미터는 그리드 포인트에서의 값으로서 어떤 원자도 모델에 포함한다고 할 수 있겠다.

CoMFA의 과정은 다음과 같다.

- ① 먼저 conformation search를 통하여 계산된 낮은 에너지 형태를 가진 분자 DB를 만드는 것이다. 또한 분자 DB에 있는 모든 분자는 정전기장을 계산하기 위하여 전하를 포함하고 있어야 한다.
- ② X, Y, Z축으로 좌표 영역을 가진 상자를 설정하고 수용체 부위에 상응하는 분자와의 상호 작용을 계산하기 위해 일정한 간격을 두고 적절한 격자 원자를 설정한다.
- ③ 분자 DB에 있는 각각의 화합물을 정렬시킨다.
- ④ CoMFA field를 계산한다. 위에서 명시하였듯이 모델에 따라서 적절한 field를 설명인자로 선택한다.
- ⑤ PLS (Partial Least Square)⁷¹⁻⁷²⁾ 분석을 통하여 모델의 예측 능력을 알아본다. Cross-validation test는 signal과 noise를 구분할 수 있으며 어떤 화합물이 outlier로 작용하는지에 대한 정보를 얻는다. 따라서 outlier를 제거해서 다시 모델을 설정하고 cross-validated r^2 값으로 결과의 신빙성을 예측한다. Cross-validated r^2 값은 0과 1사이이며 1의 값은 완벽한 예측 능력을 가진 모델임을 나타내고 0은 모델이 없는 것과 마찬가지이다. Cross-validated r^2 값이 충분치 않을 때는 분자를 재정렬 시키거나 PLS 분석 그래프에서 독특한 구조나 문제가 되는 구조를 선택하여 모델을 재설정한다. 따라서 cross-validation test로 outlier를 선정하고 최적의 component 수를 결정한다.
- ⑥ 데이터가 어느 정도 정확하다고 판단되면, 최종 모델은 최적 값의 component 수로 설정하고 no validation test를 수행하여 설명인자와 구조

간의 적절한 관계식을 세운다.

- ⑦ CoMFA map을 통하여 새로운 화합물을 설계하고 대상 성질의 값을 예측한다.
- ⑧ 모델이 실험 결과와 일치하지 않은 경우는 모델을 수정하던가 새로운 모델을 설정하여 만족한 결과를 얻을 때까지 순환 과정을 반복한다.

CoMFA는 PLS라는 새로운 데이터 통계분석 방법과 컴퓨터 graphics의 발달로 빠른 속도로 발전하여 왔다. PLS 분석 방법은 cross-validation과 bootstrapping 분석이 있다. Bootstrapping 방법은 초기의 데이터 설정을 참 집단 (true population)으로 가정하고 그것으로부터 새로운 데이터 설정을 무작위로 N번 발생함으로써 각각의 표본을 통계분석 하여 모델의 안정성을 예측한다. Cross-validation 방법은 모델로부터 데이터를 하나씩 제거해서 새로운 모델을 재설정하고 대상 성질을 예측하는 재설정-예측 순환 (rederivation-and-prediction cycle) 과정을 모든 대상 성질 값이 정확하게 예측할 때까지 계속한다. 따라서 모든 대상의 예측 능력은 root mean square (rms) 오차인 press (predictive sum of squares)가 현재 모델의 평가 기준이 된다. Cross-validation test는 분석의 예측 타당성을 측정해줌으로써 R&D (Research and Development) 분야에서의 효율을 증가시킨다.

CoMFA는 수용체와 결합하는 생리 활성 구조를 찾아내는 과정이 쉽지 않고 모델 내에 구조적으로 다양한 분자를 구성하거나 유연성이 있는 구조를 포함하는 분자가 많을 수록 좋은 결과를 내기 어렵고, 분자의 3차 구조 및 배열에 따라 그 결과가 크게 좌우될 수 있다는 단점을 가지고 있으나 분자의 공통된 특성을 입체장과 정전기장의 mapping을 통하여 가시적으로 보여줌으로써 pharmacophore를 규명하는데 도움을 줄 뿐 아니라, 수용체의 구조를 모르는 경우 활성에 영향을 주는 장의 특성을 알으로써 새로운 물질을 예측하는 데에도 큰 도움을 줄 수 있다. 이러한 CoMFA 등과 같은 3D-QSAR은 향후 신약 개발 및 물질의 성질을 최적화 하고자 하는 여러 연구분야에서 중요한 도구로 사용될 것으로 기대된다.

나. 통계 분석 방법

회귀 (regression) 분석 방법은 활성과 설명인자간의 상관관계식을 유도하는 방법으로 QSAR에 주로 사용이 되는 회귀 분석 방법은 다음과 같다.

- ① 단순 선형 회귀 분석 (simple linear regression analysis)
 - : 활성에 대해 한 설명인자와의 선형관계식을 유도하는 방법으로 가장 중요한 설명인자를 찾는 데 유용하다.
- ② 다중 선형 회귀 분석 (multiple linear regression analysis)⁷³⁾
 - : 활성에 대해 여러 설명인자와의 조합으로 선형관계식을 유도하는 방법으로 비독립 변수의 양보다 독립 변수의 양이 일반적으로 5배인 경우가 효과적이며, 설명인자간의 상관성이 적어야 한다.
- ③ 주성분 회귀 분석 (Principal Component Regression analysis, PCR)⁷⁴⁾
 - : 비독립 변수를 주성분으로 전환한 후 활성과 각각의 성분과의 다중 선형 관계식을 유도하는 방법으로 예측 능력은 뛰어나지만, 설명 인자를 변형된 인자로 사용함으로써 해석하기가 어려운 단점이 있다.
- ④ 부분 최소 자승법 (Partial Least Square, PLS)
 - : 방법적인 면에서는 PCR과 유사하나, PLS의 경우 비독립 변수와 독립 변수를 모두 전환하여 선형관계식의 유도에 사용한다. 주로 CoMFA와 같이 설명인자간의 상관성이 많은 경우 효과적이다.
- ⑤ 유전자 기능 추정법 (genetic function approximation)⁷⁵⁾
 - : 이 방법은 생명체에서의 유전자 변이 과정에서 우세한 유전자가 다음 세대에서 유리하게 작용하여 살아남는다는 진화 원리에 근거하여 적용한 방법으로, 비독립 변수로부터 무작위로 변수를 선택하여 모델을 수집한다. 그 과정에서 열성인 변수는 제거되고 우성인 변수만 다음 세대에서 살아남아 최종적으로 활성과 관련이 큰 변수만 살아남는다. 유전자 기능 추정법은 모델의 수가 적은 경우 높은 예측 능력을 갖지만 각각의 세대에서 cross-validation을 수행하는데 시간이 너무 많이 드는 단점을 가지고 있다.

회귀 모델로서의 적합성을 판단하는 데는 여러 가지 통계적인 값을 이용하여 모델의 예측성을 평가한다. 상관 계수 (correlation coefficient, R)는 독립 변수와 비독립 변수와의 상관성을 평가하는 척도로써 회귀 모델의 적합성을 평가할 때 일반적으로 상관 계수의 제곱인 r^2 값으로 평가한다.

$$r^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{ACTUAL} - Y_{PRED})^2}{\sum(Y_{ACTUAL} - Y_{MEAN})^2}$$

- Y_{ACTUAL} : 측정치, Y_{PRED} : 계산치, Y_{MEAN} : 평균치

따라서 r^2 값이 1로 갈수록 모델은 정확한 예측 능력을 갖게 된다. 또한 r^2 값은 cross-validation 방법 (cross-validated r^2)을 사용하여 계산되어 질 수 있으며, 일반적으로 r^2 값은 0.9 이상, cross-validated r^2 값은 0.5 이상이 적합한 모델이라 할 수 있겠다.

제 2 절 연구대상 및 내용

통계청의 1998년도 사망 원인 통계 분석에 따르면, 심장순환기계 질환이 우리나라 사망 원인의 두 번째 요인으로 집계되었으며, 이러한 경향은 인구의 노령화와 각종 스트레스, 서구화된 식생활 등과 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다. 특히 고혈압은 여러 합병증을 수반하며 심장의 경우 협심증, 급성 심근 경색증, 좌심실비대, 급성폐부종, 울혈성 심부전 등을 일으키고, 신장과 관련된 합병증으로는 단백뇨, 신부전 등을 일으킨다. 또한 중추신경계의 합병증으로는 우리나라 사망 원인의 수위를 차지하고 있는 뇌졸중 (중풍)과 뇌허혈 등을 일으킬 수 있다. 미국의 한 연구에서는 45-7세의 고혈압 환자의 경우 정상 혈압인 경우에 비해 말초혈관질환의 발생 빈도가 2배, 관상동맥질환이 3배, 심부전 4배, 뇌졸중의 발생 빈도는 7배나 높았으며, 이들 합병증은 모두 치사율이 높다.

고혈압이란 동맥 혈압이 높은 것을 총칭하는 말로써, 1980년 세계 보건 기구는 수축기 혈압 140 mmHg, 확장기 혈압 90 mmHg 이하를 정상 혈압이라고 하고, 수축기 혈압 160 mmHg, 확장기 혈압 95 mmHg 이상인 경우를 고혈압으로 규정짓고 있다. 고혈압은 원인 질환이 알려진 이차성 또는 속발성 고혈압과 알려지지 않은 본태성 고혈압으로 크게 나누어진다. 이차성 고혈압인 경우는 특수한 질환에 의해 혈압이 상승되므로 원인이 되는 병을 치료하면 정상 혈압으로 내려간다. 그러나 전체 고혈압

환자의 90% 이상이 본태성 고혈압으로 특징적 증상이 없고 자각 증상을 느끼지 못하는 경우가 대부분이며 본태성 고혈압 환자들은 평생동안 혈압조절을 받아야 할 사람들이므로 효과적이고 안전한 고혈압 치료제의 개발이 필수적이다. 현재 약물요법에 사용되는 고혈압 치료제는 이노제, 베타차단제, ACE 억제제, 칼슘 길항제 (antagonist), 교감신경작용약 등이 있으며 각각의 장단점이 있으므로 환자의 특성에 따라 약물을 선택하여야 한다.

따라서 본 연구의 연구 대상으로는 Angiotensin II (AII) 수용체의 길항제, 칼륨 통로 활성화제 (potassium channel activator), 칼슘 길항제를 선택하여 각각의 구조적인 특성을 밝히려고 한다. 또한 세 약물 모두 결합하는 수용체가 지질막을 통과하는 단백질로써 실험적으로 약물과 결합하는 수용체의 구조를 얻기에는 한계가 있으므로, ligand-based approach 방법의 대표적인 예로 3D-QSAR을 적용하여 구조와 활성간의 관계를 분석하고, 생리 활성에 영향을 미치는 pharmacophore를 분석하여 효율적으로 약물을 개발하는 분자 모델링 시스템을 개발하고자 한다. 또한 homology modeling 기술을 이용하여 조절 분비 경로를 거치는 prohormone의 구조 분석으로부터 분류 신호 잔기의 구조적인 특성을 알아보았다. 각각의 연구 대상의 배경을 살펴보면 다음과 같다.

1. AII 수용체의 길항제

사람의 혈압을 조절하는 중요한 시스템 중의 하나가 RAS (Renin Angiotensin System)이다 (Figure 9)⁷⁶⁾. 일단 신장에서 12개의 아미노산으로 이루어진 Angiotensinogen이 생성되면 단백질 분해 효소인 renin의 작용에 의해 10개의 아미노산으로 구성된 Angiotensin I (AI)이 생성되고, Angiotensin 전환 효소 (ACE : Angiotensin Converting Enzyme)에 의하여 Phe과 His 사이의 결합이 절단되면 8개의 아미노산으로 구성된 Angiotensin II (AII)가 형성된다. AII는 체내에서 AII 수용체와 결합함으로써 혈압상승을 유도하며, angiotensinase에 의해 Angiotensin III (AIII)로 분해되어 혈액이나 조직 안에서 신속히 파괴되는 것으로 알려져 있다. AII 수용체는 두 가지 형태가 있으며, losartan (DuP-753)에 의해 저해되는 AT₁ 수용체와 PD-123,177과 CGP-42112A와 같은 spincine 유도체에 의해 저해되는 AT₂ 수용체가 있다.

본 연구에서 개발하고자하는 AII 길항제는 AT₁ 수용체에 작용하는 약물로써 AT₁ 수용체의 구조는 **Figure 10**에서 보듯이 7개의 α -helix가 지질막을 통과하며 양쪽 막의 바깥쪽으로 3개의 loop를 형성하고 있다⁷⁷⁾. 생화학 실험에 의하면 AII 수용체의 N-말단 부분의 Ile 14, His 24, Tyr 26, Ile 27 아미노산과 첫 번째 loop인 Tyr 32, 세 번째 loop인 Asp 278, Asp 281에서 변이 (mutation)를 일으키면 AII의 친화력 (affinity)에 영향을 주나, 비펩티드 소형분자의 AII 길항제 효과에는 영향이 없는 것으로 보아 agonist와 antagonist의 결합이 서로 독립적인 것을 시사한다⁷⁸⁾. 또한 AII의 C-말단은 다섯 번째 helix인 Leu 199와 결합하며, AII의 Arg side chain은 세 번째 extracellular loop인 Asp 281과 결합을 하고 있는 것으로 보인다. 그리고 7번째 helix에 있는 Asn 275의 변이에서 경쟁적으로 저해하는 소형 분자들의 결합에 영향을 주었으며, Leu 199와 His 256은 소형 분자의 tetrazole과 직접적인 결합을 보여주고 있다⁷⁹⁾. 이와 같은 실험 결과는 단백질과 약물의 작용 기작과 3차 구조의 정확성 평가에 매우 중요한 정보를 제공한다.

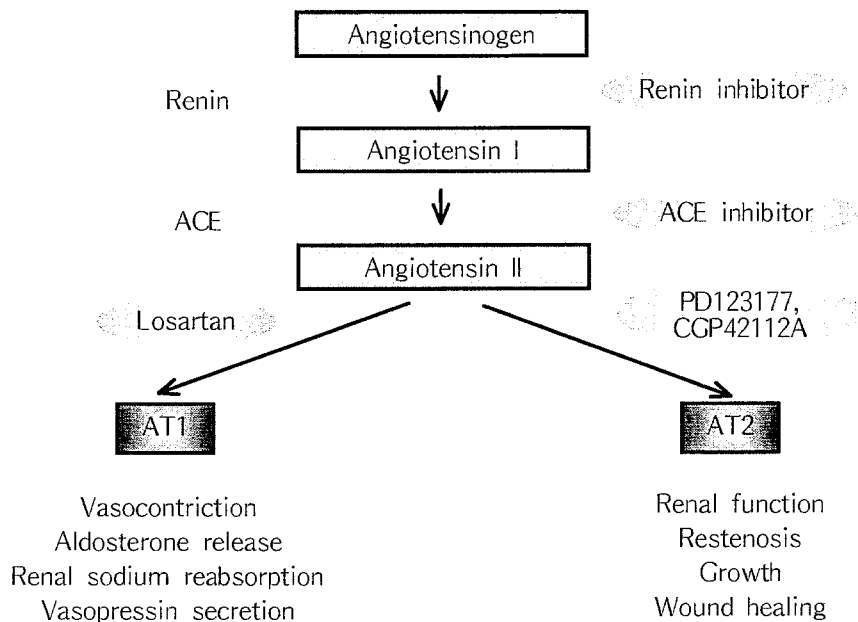


Figure 9. The renin-angiotensin system (RAS).

고혈압의 치료 방법으로써 AII의 생성을 억제시켜 혈압 상승을 억제할 수 있으며, AII의 활성을 억제하는 방법으로는 RAS의 어느 단계를 저해하면 되는데 이러한

방법으로는 세 가지를 고려할 수 있다. 첫 번째로 RAS의 첫 단계에 관여하는 중요 효소인 renin의 작용을 억제하는 renin 저해제⁸⁰⁾를 개발하는 것이다. Renin은 aspartic protease로써 angiotensinogen이 유일한 기질로 알려진 기질 특이성이 매우 높은 효소로써 renin 저해제를 개발하는 것이 보다 효과적으로 혈압 상승을 막을 수 있는 방법이다. 그러나 현재 renin 저해제의 문제점은 약물의 생체 내 이용률이 낮고 펩티드의 구조적인 복잡성 때문에 경구 투여 약물로 개발하기가 어려운 상황이다. 두 번째 방법은 ACE에 의해 AII가 형성되는 것을 저해하는 방법이다. ACE 저해제⁸¹⁾의 개발은 그 동안 활발히 연구가 진행되어 captopril이나 enalapril 등이 개발되어 이미 상품화되어 있으나, ACE 저해제는 AII의 생성을 막는 효과뿐만 아니라 기질 특이성이 결여되어 RAS에 대한 작용 외에도 bradykinin의 대사 과정을 저해하거나 생화학적으로 중요한 다른 펩티드를 분해함에 따라 발적, 마른 기침 등의 부작용을 나타낸다. 마지막으로 RAS를 저해하는 보다 직접적인 방법은 일단 형성된 AII가 AII 수용체와 결합하는 것을 저해하는 방법인 AII 수용체의 길항제 개발이다. 이 방법은 AII의 농도를 증가시키는 단점도 있으나, 실제 혈압 상승 효과를 나타내는 단계인 AII가 수용체와 결합하는 것을 저해하기 때문에 RAS의 초기 단계를 저해하는 다른 방법보다 여러 가지 부작용을 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다.

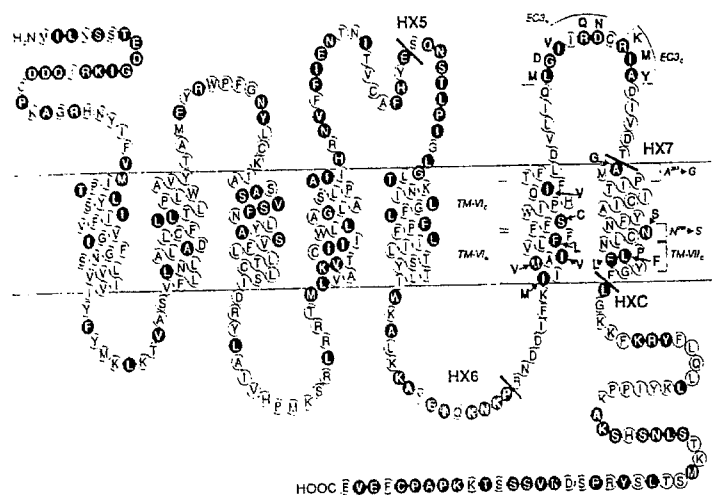
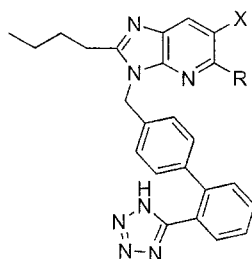


Figure 10. The first and secondary structure of AII receptor.

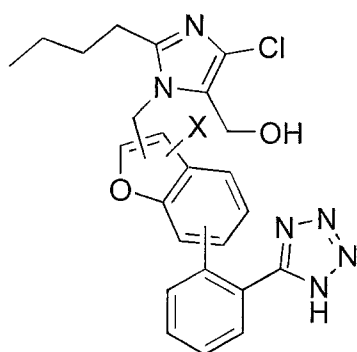
AII 수용체의 길항제 개발은 1971년 AII와 유사한 8개의 아미노산 구조로 이루어진 폴리 펩티드인 Saralasin이 개발되었으나, 고가인 펩티드는 경구적으로 효과가 없고 반감기가 짧아 약효의 지속성이 적으며 부분적으로 agonist 성질을 나타내기 때문에 치료 목적으로 부적합하였다. 이러한 펩티드성 AII 수용체 길항제의 문제점을 해결하기 위하여 1982년도에 Takeda 회사에서 개발한 비펩티드 (1-benzylimidazole-5-acetic acid 유도체)⁸²⁾ AII 길항제를 선도 물질로 하여 DuPont⁸³⁾이나 Glaxo⁸⁴⁾와 같은 여러 제약회사에서 비펩티드 AII 길항제의 개발이 본격화 되었으며, 현재 임상 실험 중에 있는 약물도 다수이다. 따라서 첫 번째 연구 대상으로 pyridylimidazole (Table 2)과 benzofuran 유도체 (Table 3 & 4)인 AII 길항제를 선택하여 구조의 특성을 연구하고, 활성간의 관계를 살펴보았다.

Table 2. The pyridylimidazole derivatives for Angiotensin II antagonists and their IC₅₀ values from human recombinant AT₁ receptor



KR#	R	X	IC ₅₀ (nM)
31064	CH ₂ OH	1-oxo-pyridine-2-yl	0.82
31022	CH ₂ OH	pyridine-2-yl	0.82
31080	CH ₃	1-oxo-pyridine-2-yl	1.40
31081	CH(OCH ₃) ₂	pyridine-2-yl	1.56
31103	COOCH ₃	1-oxo-pyridine-2-yl	1.78
31099	COOCH ₃	pyridine-2-yl	1.87
31122	CH(OCH ₃) ₂	1-oxo-pyridine-4-yl	1.46
31121	CH(OCH ₃) ₂	pyridine-4-yl	1.36
31124	CH ₂ OH	1-oxo-pyridine-4-yl	0.86
31160	CH ₂ OH	pyridine-4-yl	1.06
31145	CH ₃	1-oxo-pyridine-4-yl	0.92
31144	CH ₃	pyridine-4-yl	2.48
31147	CH ₃	1-oxo-pyridine-3-yl	1.04
31149	CH ₃	pyridine-3-yl	2.58
31151	CH ₃	1-oxo-5-methylpyridine-2-yl	1.47
31150	CH ₃	5-methylpyridine-2-yl	2.13
31153	CH ₃	1-oxo-4-methylpyridine-2-yl	1.61
31152	CH ₃	4-methylpyridine-2-yl	0.37
31155	H	1-oxo-pyridine-2-yl	1.32
31154	H	pyridine-2-yl	1.36
31157	CH ₃	1-oxo-6-methylpyridine-2-yl	2.09
31148	CH ₃	6-methylpyridine-2-yl	2.53
31166	CH ₂ SO ₂ CH ₃	1-oxo-pyridine-2-yl	1.91
31165	CH ₂ SO ₂ CH ₃	pyridine-2-yl	0.90
31170	CH=CH ₂	pyridine-2-yl	12.74
31171	CH ₂ CH ₃	1-oxo-pyridine-2-yl	5.06
31172	CH ₂ CH ₃	pyridine-2-yl	2.16
31173	CH ₂ OCH ₃	1-oxo-pyridine-2-yl	1.42
31178	COCH ₃	1-oxo-pyridine-2-yl	7.89
31176	COCH ₃	pyridine-2-yl	1.78
31183	CH(CH ₃) ₂	1-oxo-pyridine-2-yl	4.47
31182	CH(CH ₃) ₂	pyridine-2-yl	12.69

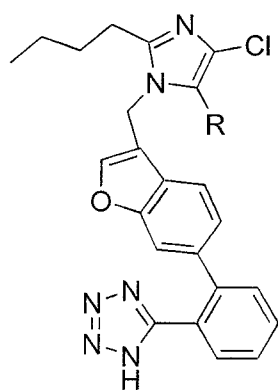
Table 3. The regioisomers of benzofuran derivatives and their IC₅₀ values



KR#	Substituent*	X	IC ₅₀ (nM)
31271	OP	H	428.54
31279	OP	Br	570.04
31272	MM	H	28.3
31273	MM	Br	32.34
31274	MP	H	1512.03
31277	MP	Br	16126.96
31275	OM	H	1224.99
31278	OM	Br	299.17
31276	OO	H	17719.84
31280	OO	Br	4067.11

* The two letters indicate the positions of the substitution at the benzofuran ring. The first and second letters indicate the position at the furanyl part and the phenyl part of the benzofuran ring, respectively.

Table 4. The angiotensin II antagonistic activities of benzofuran series with various R groups



KR#	R	IC ₅₀ (nM)
31272	CH ₂ OH	28.3
31371	CH ₂ CH ₂ OH	17.7
31364	CH=CHCO ₂ Et	50.6
31367	CH=CHCOOH	217.5
31368	CH=CHCH ₂ OH	27.7
31365	CH ₂ CH ₂ CO ₂ Me	32.7
31366	CH ₂ CH ₂ COOH	62.9
31369	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	49.7

2. 칼륨 통로 활성화제

심장에 영양분을 공급하는 혈관인 관상 동맥이 동맥 경화증 등으로 관상 동맥이 좁아지거나 막히게 되면 심장으로의 혈액 공급에 장애가 발생한다. 이러한 허혈성 심질환은 관상동맥의 죽상 경화 (atherosclerosis) 등에 의하여 심근에 대한 혈류가 감소하여 초래되는 심장 질환으로 임상적으로는 협심증, 심근 경색증, 심인성 급사 및 심부전 등으로 나타난다.

Ischemic preconditioning은 세포 내부의 심장 보호 작용으로, 심근 허혈 (myocardial ischemia) 상태에서 아데노신과 같은 세포 내의 뉴클레오티드에 의해 Protein Kinase C (PKC)가 활성화되어 ATP 농도에 민감한 칼륨 통로 (K_{ATP} channel)가 열림에 의해 일어난다⁸⁵⁾. 칼륨 통로가 열리면 세포 내의 칼륨이온이 감소되어 결과적으로 칼슘통로를 통한 세포 내 칼슘 유입을 감소시킴으로써 혈관을 이완시킨다. 따라서 칼륨통로 활성화제는 혈관 평활근 세포막에 있는 칼륨통로를 개방하여 혈압을 강하시키는 고혈압 치료약물로 사용했으며, 그 중 심장선택적인 칼륨 통로 활성화제는 허혈성 심장 질환 치료제로 개발 중이다.

심장에 존재하는 K_{ATP} channels은 두 개의 transmembrane domains (TM1, TM2)과 loop에 의해 세공 (pore)을 형성하여 이온 선택성을 나타내는 Kir channel과, 다수의 transmembrane domain과 뉴클레오티드 결합에 대한 보존 염기 서열 (consensus sequence)을 포함한 두 개의 큰 loop을 형성하는 sulphonyl urea 수용체 (SUR)가 4:4로 결합하여 팔량체 통로 복합체 (octameric channel complex)를 형성하고 있다 (Figure 11)⁸⁶⁾. 세포 하나 당 약 5,000개 정도를 가지고 있는 K_{ATP} channel은 SUR이 조직에 따라 이질성을 나타내며 심장에 존재하는 subtype은 SUR2A이다.

K_{ATP} channel은 glibenclamide나 tolbutamide같은 sulfonyleurea 약물에 의해 차단되며, diazoxide와 cromakalim에 의해 열린다. 또한 내부의 ATP에 의해 저해된다. 지금까지 알려진 K_{ATP} channel의 활성화제로는 cromakalim, pinacidil, aprikalim, diazoxide 등이 있으며⁸⁷⁾, Figure 12에 그 구조를 나타내었다. 이들은 혈관 확장제 (vasodilator)로서 허혈성 심장 질환 치료제로 개발하기 위해서는 혈관 확장제로서의 활성을 줄이면서 심장에 있는 K_{ATP} channel에만 선택적으로 작용하는 심장 선택적인 칼륨 통로 활성화제의 개발이 요구된다. Bristol-Myers Squibb 연구소에서는 수년간 phenylcyanoguanidine 유도체의 구조 변형을 통해 심장 선택

적인 칼륨 통로 활성화제를 개발해 왔다. 따라서 K_{ATP} channel 활성화자의 구조와 활성간의 관계를 알아보기 위하여 총 115개 화합물 중 활성 데이터가 사용 가능한 59개의 화합물을 선택하였다 (Table 5 - 13)⁸⁷⁻⁹¹⁾. 혈관 확장의 활성 정도를 측정하기 위해서는 methoxamine에 의해 수축된 쥐 대동맥의 이완에 대한 IC_{50} 값과⁹²⁾, 항허혈 활성을 측정하기 위해서 허혈 상태인 고립된 쥐의 심장에서 수축 시간의 증가에 대한 EC_{25} 값을 얻었으며⁹³⁾, EC_{25} 를 IC_{50} 값으로 나눈 값을 약물의 심장 선택성을 평가하는 기준으로 삼았다.

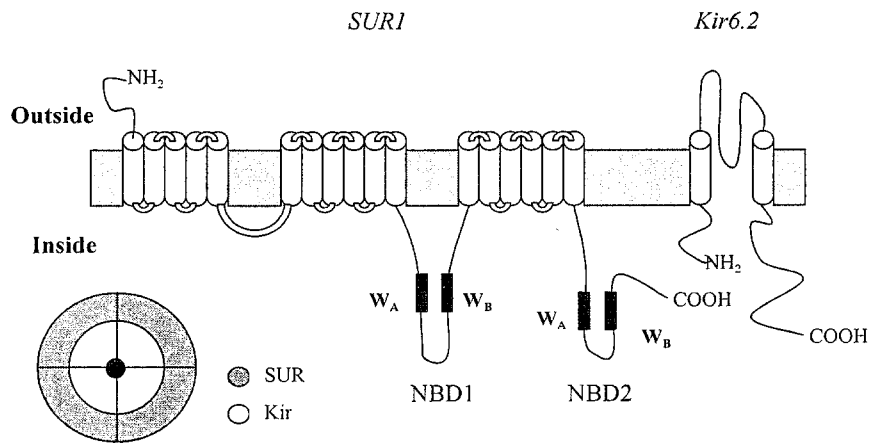


Figure 11. K_{ATP} channels are formed from two different types of subunits. The K_{ATP} channel is an octameric complex of 4 pore-forming Kir6.2 subunits and 4 regulatory sulphonylurea receptor subunits. SUR1 contains multiple transmembrane domains and two cytosolic nucleotide binding domains (NBDs), each of which contains a Walker (WA) and a Walker (WB) motif. These motifs are involved in the activation of the K_{ATP} channel by MgADP.

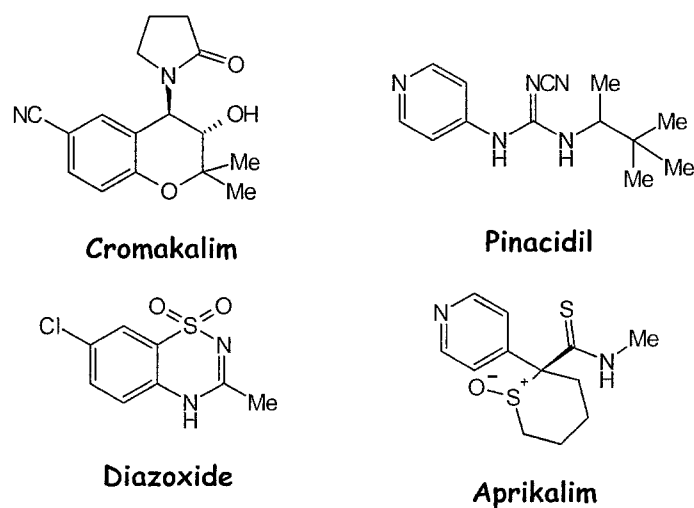


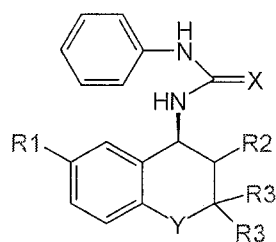
Figure 12. ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) openers.

Table 5. Vasorelaxant and anti-ischemic potencies of potassium channel openers

The general structure shows a benzofuran core with a methyl group (Me) and a hydroxyl group (OH) at the 2-position, and an R2 group at the 6-position. At the 3-position, there is a nitrogen atom bonded to an R1 group and a carbon atom double-bonded to an X group.

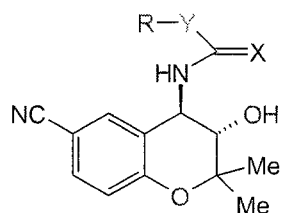
#	R1	R2	X	Antiischemic potency	Vasorelaxant potency	Ratio EC_{25}/IC_{50}	Note
				EC_{25} , μM	IC_{50} , μM (95% C. I.)		
				8.9	0.032	278.1	
①	Ph	CN	NCN	11.0	1.4	7.9	
②	Ph	CCH	NCN	>30	5.4		
③	Ph	H	NCN	-	72.7		
④	Ph	NO ₂	NCN	7.2	2.0	3.6	
⑤	(CH ₃ CH ₂)(CH ₃) ₂ C	CN	NCN	20.1	29.8	0.7	
⑥	Ph	CN	O	5.1	0.8	6.4	
⑦	Ph	CN	S	7.7	1.7	4.5	
⑧	Ph	CN	NCN	6.1	1.3	4.7	3S, 4R
⑨	Ph	CN	NCN	>30	4.2		3R, 4S
⑩	4-OHC ₆ H ₄	CN	NCN	33.4	2.2	15.2	
⑪	4-ClC ₆ H ₄	CN	NCN	2.5	1.8	1.4	BMS180448
⑫	4-FC ₆ H ₄	CN	NCN	3.5	1.4	2.5	
⑬	4-CF ₃ C ₆ H ₄	CN	NCN	13.4	8.1	1.7	

Table 6. Vasorelaxant and anti-ischemic potencies of potassium channel openers



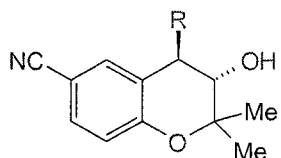
#	R1	R2	R3	X	Y	Antiischemic potency	Vasorelaxant potency	Ratio	Note
						EC ₂₅ , μM	IC ₅₀ , μM (95% C. I.)	EC ₂₅ /IC ₅₀	
14	CN	trans-OH	Me	O	O	5.1	0.8	6.4	= 6
15	CF3	trans-OH	Me	NCN	O	10.0	19.2	0.5	
16	CF3	trans-OH	Me	O	O	2.7	1.1	2.5	
17	COCH3	trans-OH	Me	NCN	O	8.5	4.0	2.1	
18	COCH3	trans-OH	Me	O	O	4.5	1.2	3.8	
19	NH2	trans-OH	Me	NCN	O	0%	59.6		
20	6,7-oxadiazole	trans-OH	Me	NCN	O	6%	8.8		
21	6,7-oxadiazole	trans-OH	Me	O	O	13.0	1.4	9.3	
22	CN	cis-OH	Me	NCN	O	9%	17.0		
23	CN	cis-OH	Me	O	O	102.6	6.2	16.5	
24	CN	3,4-olefin	Me	NCN	O	0%	6.9		
25	CN	3,4-olefin	Me	O	O	7%	17		
26	CN	trans-OAc	Me	NCN	O	6.0	2.6	2.3	
27	CN	trans-OAc	Me	O	O	3%	4.4		
28	CN	H	Me	NCN	O	0%	14.0		
29	CN	H	Me	O	O	5.3	1.8	2.9	
30	CN	trans-OH	H	NCN	O	0%	194		
31	CN	trans-OH	H	O	O	6%	98.1		
32	CN	trans-OH	Me	NCN	NH	0%	92.8		
33	NO2	trans-OH	Me	NCN	C	10.7	0.57	18.8	
34	NO2	trans-OH	Me	O	C	6.5	1.08	36.1	
35	CN	H	Me	NCN	C	22.0	2.6	8.5	
36	CN	H	Me	O	C	9.4	1.3	7.2	

Table 7. Vasorelaxant and anti-ischemic potencies of potassium channel openers



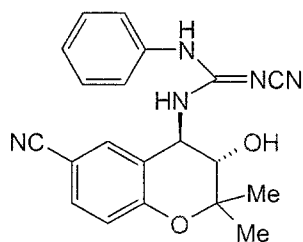
#	R	X	Y	Antiischemic potency	Vasorelaxant potency	Ratio	Note
				EC ₂₅ , μM	IC ₅₀ , μM (95% C. I.)		
37	Ph	O	NH	5.1	0.8	6.4	= 6
38	Ph	NCN	O	68.8	>100		
39	Ph	NCN	S	>30	4.9	12.3	
40	Ph	O	CH ₂	22.2	1.8		
41	PhCH ₂	NCN	NH	>30	2.4		
42	PhCH ₂	O	NH	>30	5.6		
43	PhNH ₂	NCN	NH	4%	3.5	393	
44	Ph	O		11.8	0.03		
45	Me	NCN	NH	13.3	0.2	66.5	= 5
46	1,1-Me ₂ Pr	NCN	NH	20.1	29.8	0.7	
47	3-pyridinyl	O	NH	4.2	0.5	8.4	
48	2-pyridinyl	O	NH	2.6	0.44	5.9	
49	4-pyridinyl	O	NH	1%	8.5		

Table 8. Vasorelaxant and anti-ischemic potencies of potassium channel openers



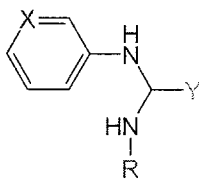
#	R	Antiischemic potency	Vasorelaxant potency	Ratio	Note
		EC ₂₅ , μM	IC ₅₀ , μM (95% C. I.)		
50		11.7	41.0	0.28	
51		10.0	23.7	0.42	
52		8.1	33.1	0.24	
53		3.2	0.5	6.4	
54		25.5	2.2	11.5	

Table 9. Vasorelaxant and anti-ischemic potencies of potassium channel openers



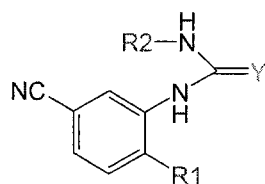
#	R	Antiischemic potency EC ₂₅ , μM	Vasorelaxant potency IC ₅₀ , μM (95% C. I.)	Ratio EC ₂₅ /IC ₅₀	Note
11	4-Cl	2.5	1.8	1.4	BMS180448 = 8 (3S,4R)
55	H	6.1	1.3	4.7	
56	3-Cl	1.4	0.6	2.3	
57	3-NO ₂	5.0	0.67	7.5	
58	4-NO ₂	6.2	0.30	20.6	
59	3-CF ₃	5.3	1.6	3.3	
60	4-CF ₃	13.4	8.1	1.4	
61	3-COCH ₃	17%	8.4		
62	4-COCH ₃	52.0	21.0	2.5	
63	3-COOCH ₃	13%	4.1		
64	4-COOCH ₃	8%	18.4		
65	3-COOH	13%	>100		
66	4-COOH	8%	>100		
67	4-OMe	5.3	32.5	0.16	
68	3-Me	2.7	1.0	2.7	
69	4-Me	1.6	2.7	0.6	
70	3-SMe	8.2	1.4	5.6	
71	4-SMe	6%	6.3		
72	3,4-Cl ₂	12.9	4.6	2.8	
73	3-F, 4-Cl	11%	1.66		
74	3,4-Me ₂	2.5	5.1	0.49	
75	3,4-CH ₂ CH ₂ CH ₂	3.5	41.3	0.08	

Table 10. Vasorelaxant and anti-ischemic potencies of potassium channel openers



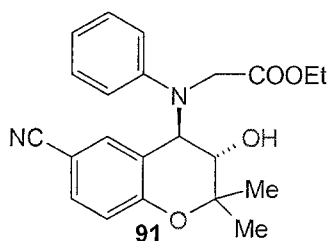
#	R	X	Y	Antiischemic potency EC ₂₅ , μM	Vasorelaxant potency IC ₅₀ , μM (95% C. I.)	Ratio EC ₂₅ /IC ₅₀	Note
1		CH	NCN	11.0	1.4	7.9	
(76)		CH	O	9.4	1.3	7.2	
(77)		CH	O	26.0	6.7	3.9	
(78)		N	O	28.3	1.5	18.8	
(79)		CH	O	33.8	1.7	19.9	

Table 11. Vasorelaxant and anti-ischemic potencies of potassium channel openers



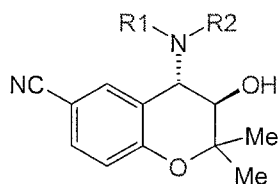
#	R1	R2	Y	Antiischemic potency EC_{25} , μM	Vasorelaxant potency IC_{50} , μM (95% C. I.)	Ratio EC_{25}/IC_{50}	Note
80			O	33.8	1.7	19.9	= 79
81			O	29.7	25.7	1.2	
82			NCN	16%	1.2		
83			O	25%	25.7		
84			O	14%	7.8		
85			O	2%	12.4		
86			O	11.9	15.3	0.77	
87			O	19.2	1.6	12.0	
88			O	12%	22.8		
89			O	0%	>100		
90			O	2.0	1.0	2.0	

Table 12. Vasorelaxant and anti-ischemic potencies of potassium channel openers



#	R1	R2	X	Antiischemic potency EC_{25} , μM	Vasorelaxant potency IC_{50} , μM (95% C. I.)	Ratio EC_{25}/IC_{50}	Note
Cromakalim				8.9	0.032	278.1	racemic
11 (BMS180448)				2.5	1.8	1.4	3S,4R
52				8.1	33	0.25	racemic
91				4.7	>30	<0.17	racemic
91				2.2	>30	<0.07	3R,4S
91				5%	>30		3S,4R

Table 13. Vasorelaxant and anti-ischemic potencies of potassium channel openers



#	R1	R2	Antiischemic potency	Vasorelaxant potency	Ratio EC ₂₅ /IC ₅₀	Note
			EC ₂₅ , μM	IC ₅₀ , μM (95% C. I.)		
92	Ph	H	3.9	1.2	3.9	racemic
93	Ph	CH ₂ COOH	0%	>100		racemic
94	Ph	CH ₂ CH ₂ COOEt	26%	54		
95	Ph	CH ₂ (CH ₂) ₂ COOEt	5.7	>30		
96	Ph	CH ₂ COO-nBu	8%	27		
97	4F-Ph	CH ₂ COOEt	3.8	>30	<0.017	
98	4Cl-Ph	CH ₂ COOEt	6.5	>30	<0.22	
99	Ph	CH ₂ COOEt	7.8	84	<0.09	
100		CH ₂ COOEt	0%	>30		
101	Ph	CH ₂ CONHEt	21%	>30		
102	Ph	CH ₂ CH ₂ OMe	15%	>30		
103	Ph	CH ₂ CN	8%	59		
104	4F-Ph	CH ₂ PO(OEt) ₂	4.9	47	0.104	
105	Ph	CH ₂ CH ₂ SO ₂ Me	0%	27		
106	Ph	CH ₂ CH ₂ NHAc	5%	>30		
107	4F-Ph	COCOOEt	0%	43		
108	Ph	NHCOOEt	4.3	2.2	1.95	
109	Ph		3.2	12	0.27	
110	Ph		10	>30	<0.33	
111	Ph		5.3	>30	<0.18	
112	Ph		4.3	>30	<0.14	
113	Ph		11%	>30		
114	4F-Ph		3.3	>30	0.11	
115	4Cl-Ph		1.4	>30	<0.05	BMS191095
115	4Cl-Ph		14%	>30		3S,4R

3. Multi Drug Resistance (MDR) reversal agent

항암제를 이용한 암의 치료에 있어 가장 문제가 되는 현상이 항암제에 대한 내성을 가진 세포의 출현이다. 이러한 획득내성에는 여러 항암제에 동시에 저항성을 보이는 다약제 저항성 (multidrug resistance)이 있다. 이런 다약제 저항성은 약물이 생체 내에 투입되면 혈장 막에 있는 p-glycoprotein의 과다 발현되며, 생체 막에 존재하는 p-glycoprotein은 ATP를 사용하여 항암제를 세포 밖으로 펌프 하는 역할을 한다⁹⁴⁾. 내성이 있는 세포는 약이 세포로부터 빠져 나와 세포 내 약 농도가 낮아지게 되어 항암제의 효과를 볼 수 없다. p-glycoprotein은 단일 폴리펩티드 사슬로 구성된 1,280개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, 분자량은 120 - 140 kDa이다. Hydropathy profile에 의해 가정된 p-glycoprotein의 2차 구조는 12개의 transmembrane domains과 세포 바깥쪽에 6개의 loop과 세포 내부에 12개의 ATP 결합 부위를 포함하는 것으로 예측된다 (Figure 13)⁹⁵⁾. 세포질 내의 C-말단에 두 개의 뉴클레오티드 결합 부위에 ATP가 결합하여 가수 분해된다. 따라서 효과 있는 항암제를 투여하기 위해서는 p-glycoprotein에 결합하여 약이 세포 밖으로 빠져나가는 것을 막는 MDR reversal agent의 개발이 필요하며, 최근에는 항암제와 여러 약물을 동시에 사용하는 다약제 복합 요법 (combined chemotherapy)으로 저항성 발현을 억제하기도 한다.

현재 MDR reversal agent로 알려진 약물로는 칼슘 통로 차단제 (calcium channel blocker), 칼모듈린 저해제 (calmodulin inhibitors), 항생제 (antibiotics), 항말라리아 약제 (antimalarial drugs), 면역 억제제 (immunosuppressants), 심장활성제 (cardioactive drugs), 호르몬제 (hormonal compounds) 등의 다양한 약리 활성을 가진 약물이 독립적으로 MDR reversal agent의 활성을 보여주었으며, phenylalkylamines, dihydropyridines, phenothiazines, cyclosporins, quinolines, cephalosporines, triparanol compound, steroids 등의 구조적으로 다양한 화합물의 유도체로 알려져 있다⁹⁶⁾. 따라서 칼슘 통로 차단제로서 잘 알려진 verapamil 유도체의 구조적인 변형 (Figure 14)을 통하여 MDR reversing 활성은 증가시키고, 칼슘 통로 차단제로서의 약물 활성은 감소키는 데 필요한 pharmacophore의 규명과 phenylalkylamine 계통의 MDR reversal agent의 구조적인 특성을 규명하고자 연구 대상으로 verapamil 유도체를 선정하였다.

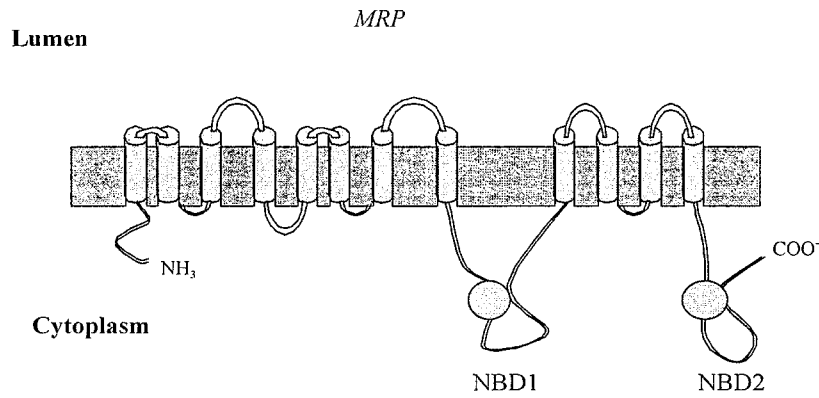


Figure 13. The proposed structure for the multidrug-associated protein, MRP. Solid bars represent transmembrane domains, while solid circles represent nucleotide-binding domains (NBD), ATP-binding regions.

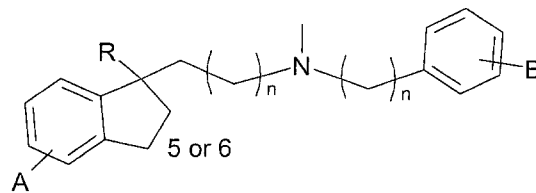


Figure 14. Verapamil derivatives varying the chain length, the substituent position, and the ring size (A, B = -OCH₃, R = CN or ester).

4. 분류 신호 도메인

Prohormone의 세포 간 전달 경로는 리보솜 (ribosome)에서 더 큰 전구체 (pre(pro)hormone)로 합성되어 있는 prohormone이 N-말단의 소수성 신호 펩티드 서열을 통하여 조면 소포체 (rough endoplasmic reticulum, ER)로 이동되어 신호 펩티드 가수분해 효소 (signal peptidase)에 의해 신호 펩티드 서열이 절단된 후 골지체로 이동된다. Trans Golgi network (TGN)에서 prohormone이 lysosomal 효소와 혈장 막 단백질 같은 다른 단백질로부터 분리된다 (Figure 15)⁹⁷⁾. 이러한 분리

기작은 두 가지로 가정된다. 첫 번째는 능동 분비 기작으로 prohormone에 있는 분류 신호가 TGN 막에 위치한 수용체와 결합하여 수용체에 의해서 분류되는 경우이다. 두 번째 가정은 응집 수동 분비 기작으로 농축된 응집체를 형성한 단백질이 포획되어 과립 내부로 들어간다.

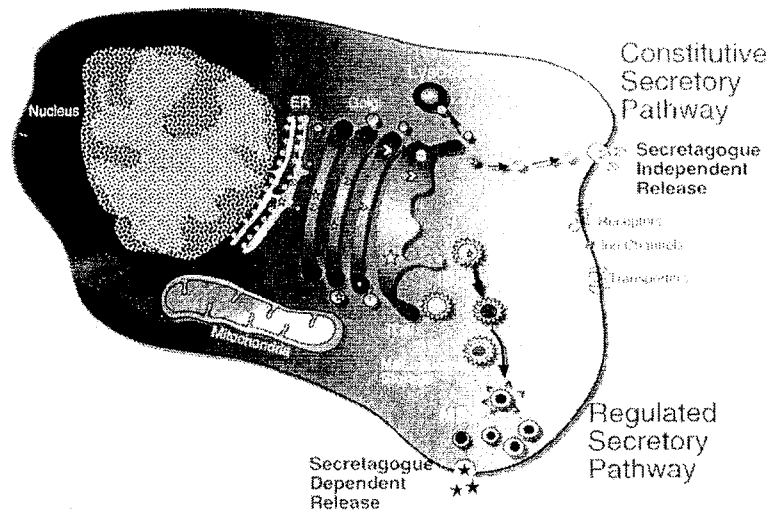


Figure 15. Schematic diagram illustrating the presence of the regulated and constitutive secretory pathway in endocrine cells. ISG is immature secretory granule, TGN is trans golgi network, and MSG is mature secretory granule.

두 가지 가설 모두 실험적으로 입증하기 어려웠으나, 1993년도에 여러 prohormone에서 분류 신호 도메인의 발견⁹⁸⁾으로 첫 번째 가설에 대한 신빙성이 증가하고 있다. 첫 번째 가설에 대한 실험적인 증거는 proopiomelanocortin (POMC)의 N말단에서 1번부터 26번까지의 아미노산을 절단하여 Neuro-2a 세포에 전위 감염 (transfection) 시켰을 경우 POMC가 조절 분비 경로를 거치지 않고 항상 분비되었으며, N-POMC₁₋₂₆와 박테리아 단백질은 chromphenicol acetyl transferase (CAT)와의 융합은 세포 내에서 조절 분비 경로를 거친다⁹⁹⁾. 또한 몇 가지 단백질 (POMC, proinsulin, proenkephalin, chromogranin A, chromogranin B)에서 분류 도메인이 확인되었으며, carboxypeptidase E (CPE)는 POMC의 수용체로 POMC의 N-말단과 결합한다. POMC의 분류 신호는 N-말단에 위치해 있으면서 8번 시스테인과 20번 시스테인과의 이황화 결합으로 loop를 형성한다. POMC의 이황화 결합을 파괴시키는

site-directed mutagenesis 실험으로부터 돌연변이체 POMC는 조절 분비 경로를 거치지 않고 항상 분비된다. 분류 신호 도메인의 구조적인 특징은 amphipathic loop 표면에 두 개의 음이온 잔기 (Asp 10, Glu 14)와 두 개의 소수성 잔기 (Leu 11, Leu 18)가 노출되어 있다 (Figure 16)¹⁰⁰. 또한 모델링 연구와 돌연변이 실험에 의하면 지금까지 알려진 분리 신호 도메인은 네 개의 아미노산이 일정 거리를 유지하면서 표면에 노출되어 있고, 두 개의 음이온 잔기가 CPE의 양이온 잔기 (Lys 260, Arg 255)와 정전기적 인력에 의해서 상호 결합하고 있다 (Figure 17)¹⁰¹. 따라서 본 연구에서는 조절 분비 경로를 거치는 단백질 (insulin, insulin-like growth factor (IGF) I, II, Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) 5, relaxin, growth hormone, neurophysin II, brain derived neurotropic factor (BDNF), prodynorphin, chromogranin A)의 분류 신호 도메인의 구조 분석으로 구조적인 특성을 규명하며, 항상 분비되는 단백질 (nerve growth factor (NGF), serum albumin)의 구조와의 차이점을 논하고자 한다.

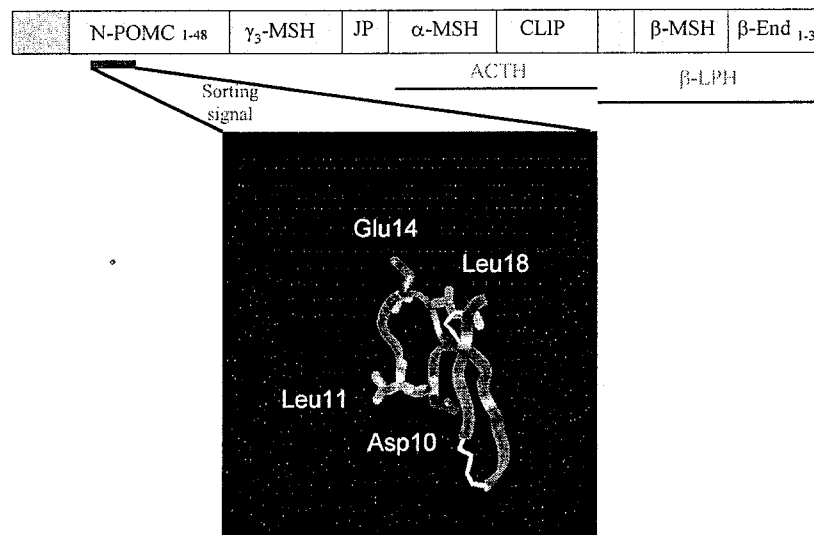


Figure 16. Schematic diagram illustrating the sorting signal of human pro-opiomelanocortin.

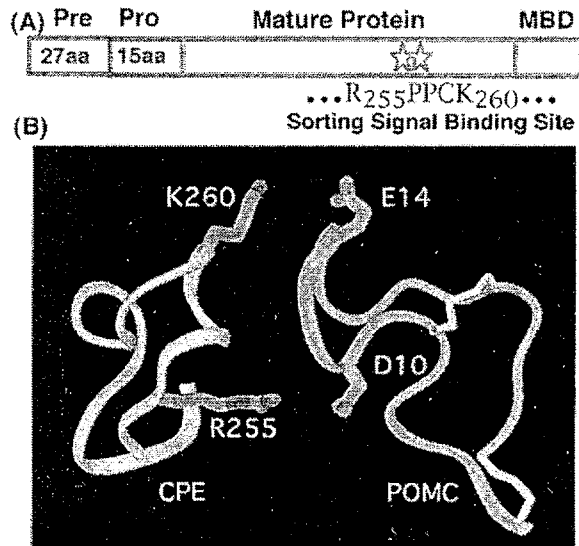


Figure 17. Diagrammatic representation of (A) the CPE gene and (B) docking study of N-POMC and CPE₂₅₄₋₂₇₃.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. AII 수용체 길항제

가. AII 수용체의 길항제의 구조

(1) Pyridylimidazole 유도체

AII 길항제 활성을 가지는 32 개의 다양한 구조를 가진 화합물¹⁰⁶⁾ (Table 2)의 구조와 활성간의 관계를 규명하기 위해서 grid search를 수행하여 낮은 에너지의 구조를 얻었다. 구조 분석의 대표적인 예로 KR31080을 선택하여 grid search와 random search를 수행하였으며, 두 계산 방법 모두 두 가지 형태의 낮은 에너지 구조를 얻었으며, type I이 type II에 비해 에너지에서 대략 0.5에서 0.7 kcal/mol 정도 유리하였다 (Table 14).

Table 14. The comparison of torsion angle involving the biphenyltetrazole moiety between the calculated structure and x-ray structure of KR30988 and KR31080

	φ 1	φ 2	φ 3	φ 4	φ 5	Energy (kcal/mol)
Grid search (I)	115.0	-55.6	-124.0	31.5	-117.4	37.6
	(II)	98.8	-70.0	107.5	-27.2	38.1
Random search (I)	115.1	-56.1	-124.8	31.8	-116.8	37.4
	(II)	-98.5	70.1	-107.7	27.3	38.1
X-ray KR30988	88.2	-67.2	133.5	-57.8	-132.9	-
KR31080	-93.8	6.6	133.2	130.3	-66.8	-

* φ 1 = C8-N1-C10-C11, φ 2 = N1-C10-C11-C12, φ 3 = C13-C14-C17-C22,
 φ 4 = C17-C22-C23-N27, φ 5 = C6-C5-C32-N37

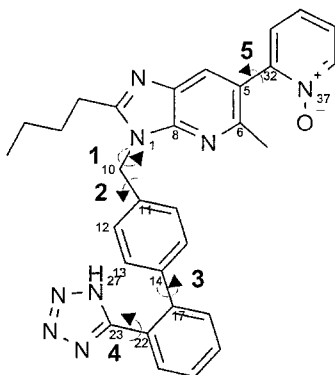


Figure 24. The atomic numbers and torsion angles from **Table 14**.

이면각 1과 2 (**Figure 24**)는 KR31080의 전체적인 구조에 가장 많이 영향을 주는 각으로 tetrazole과 imidazole ring의 상대적인 방향을 표시한다. **Figure 25**에서 보듯이 type I과 type II의 가장 큰 구조적인 차이는 biphenyl tetrazole 부분에서 보인다. Type I은 tetrazole group이 imidazole ring과 같은 방향을 향하는 syn 배향을 가지며, type II는 tetrazole group이 imidazole ring과 반대 방향을

향하는 anti 배향을 가진다. 이 결과는 losartan 화합물의 conformational search 결과와 일치하며, 이 경우도 tetrazole과 imidazole ring의 상대적인 방향에 따라 anti와 syn의 두 배향이 위치 에너지에서 국소점을 차지하고 있다¹⁰⁷⁾.

또한 KR30988과 KR31080은 x-ray로 구조¹⁰⁸⁾를 규명했으며, x-ray 구조에서도 KR30988의 경우는 anti 배향을 가지는 type II와 유사하며, KR31080의 경우는 syn 배향을 가지는 type I과 유사하다 (Figure 26). 이는 benzofuran 유도체인 GR117289의 결정 구조에서 tetrazole과 benzofuran ring의 산소 원자와 수소 결합을 함으로써 pseudo-cis의 배향을 가지는 경우 (type II)와 Br 원자와 pseudo-cis 배향 (type I)을 가지는 두 형태의 결정 구조를 얻은 결과와 일치한다¹⁰⁹⁾. 따라서 계산 결과에서도 두 형태의 에너지 차이가 크지 않으므로 생체 내에서 두 형태의 구조가 동시에 공존할 것으로 예상된다.

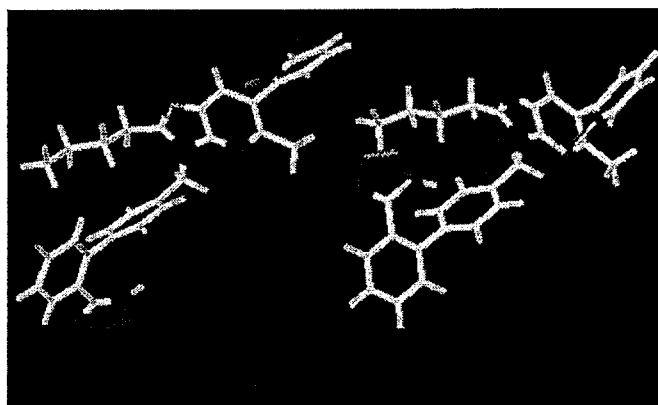


Figure 25. Low energy conformer of KR31080 from grid search and random search, Type I (left) and type II (right) from Table 14.

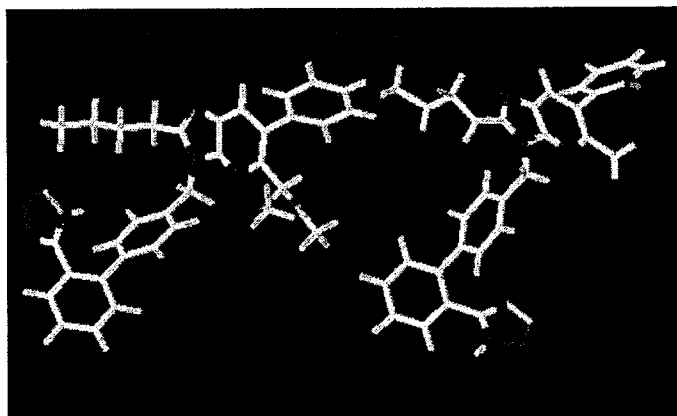


Figure 26. X-ray structure of KR30988 (right) and KR31080 (left).

NMR의 NOE 실험으로 용액 내에서의 KR31080의 anti와 syn의 배향을 결정하려 하였으나, NOE 결과 (**Figure 27**)에서는 두 형태 모두 3, 4번과 6번, 8번 proton의 NOE를 만족시켰으므로 NOE 실험만으로는 어떤 구조가 용액 내에서 유리할 지를 결정짓기가 어려웠다. 그러나 7번과 17번의 강한 NOE와 5번과 17번의 약한 NOE는 pyridine N-oxide ring과 imidazole ring의 상대적인 위치를 명시하며, 이면각 5가 x-ray 구조와 일치함을 보여주었다. 5번과 17번 proton의 NOE는 15 °C와 25 °C에서 보이다가 45 °C에서 나타나지 않았다.

Table 15는 KR31080의 각각의 온도에서의 chemical shift와 서로 다른 온도에서의 chemical shift 차이를 나타냈으며, **Figure 28**은 각각의 proton의 서로 다른 온도에서의 chemical shift 차이를 그래프로 명시하였다. Chemical shift의 변화는 온도가 증가함에 따라 up-field shift를 보여주며, 2, 3, 9번 proton만 down-field shift를 하였다. 15 °C와 45 °C에서 가장 큰 chemical shift의 변이 (0.025 이상)를 보이는 proton은 14 - 16번 proton이며 모두 pyridine N-oxide ring에 있는 proton이다. 다음은 0.015 - 0.025 사이의 chemical shift 차이를 보이는 proton은 7, 10 - 13번 proton이며, 10 - 13번 proton은 tetrazole과 연결된 말단의 벤젠 ring에 해당되는 proton이다. 7번 proton은 imidazole ring에 있는 proton으로 imidazole ring 자체의 구조 변화라기보다는 pyridine N-oxide ring의 유동성으로 인한 chemical shift의 차이로 사료된다.

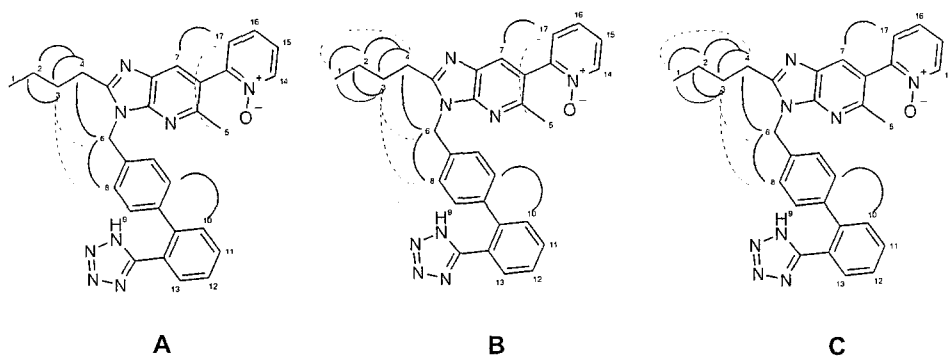


Figure 27. The atomic number and NOEs of KR31080. Dot line shows weak NOEs from 2D-NOESY experiment. (A) 15 °C, (B) 25 °C, (C) 45 °C.

Table 15. The chemical shift (ppm), multiplicity and difference of chemical shift according to three temperatures

Temp. Proton number	15 °C		25 °C		45 °C		Difference of Chemical shift			
	Chemical shift	Multiplicity	Chemical shift	Multiplicity	Chemical shift	Multiplicity	15°C - 25°C	15°C - 45°C	25°C - 45°C	25°C - 15°C
1	0.91	3	0.91	3	0.91	3	0.0016	0.0049	0.0033	-0.0016
2	1.39	6	1.39	6	1.39	6	-0.0005	-0.0017	-0.0012	0.0005
3	1.70	5	1.70	5	1.71	5	-0.003	-0.0095	-0.0065	0.003
4	2.87	3	2.87	3	2.86	3	0.0036	0.0108	0.0072	-0.0036
5	2.48	1	2.48	1	2.47	1	0.0025	0.0079	0.0054	-0.0025
6	5.62	1	5.62	1	5.61	1	0.0023	0.0137	0.0114	-0.0023
7	7.90	1	7.89	1	7.88	1	0.0071	0.0206	0.0135	-0.0071
8	7.16	2	7.16	2	7.15	2	0.0022	0.0063	0.0041	-0.0022
9	7.10	2	7.10	2	7.10	2	-0.0014	-0.0041	-0.0027	0.0014
10	7.54	2	7.53	2	7.52	2	0.0056	0.017	0.0114	-0.0056
11	7.67	Overlap	7.66	Overlap	7.64	Overlap	0.0055	0.0243	0.0188	-0.0055
12	7.56	3	7.57	3	7.55	3	-0.0048	0.0156	0.0204	0.0048
13	7.67	Overlap	7.66	Overlap	7.64	Overlap	0.0055	0.0243	0.0188	-0.0055
14	8.48	2	8.47	2	8.46	2	0.0087	0.026	0.0173	-0.0087
15	7.64	Overlap	7.63	Overlap	7.61	3	0.0107	0.0329	0.0222	-0.0107
16	7.72	3	7.71	3	7.69	3	0.0119	0.0364	0.0245	-0.0119
17	7.67	Overlap	7.66	Overlap	7.64	Overlap	0.0126	0.0314	0.0188	-0.0126

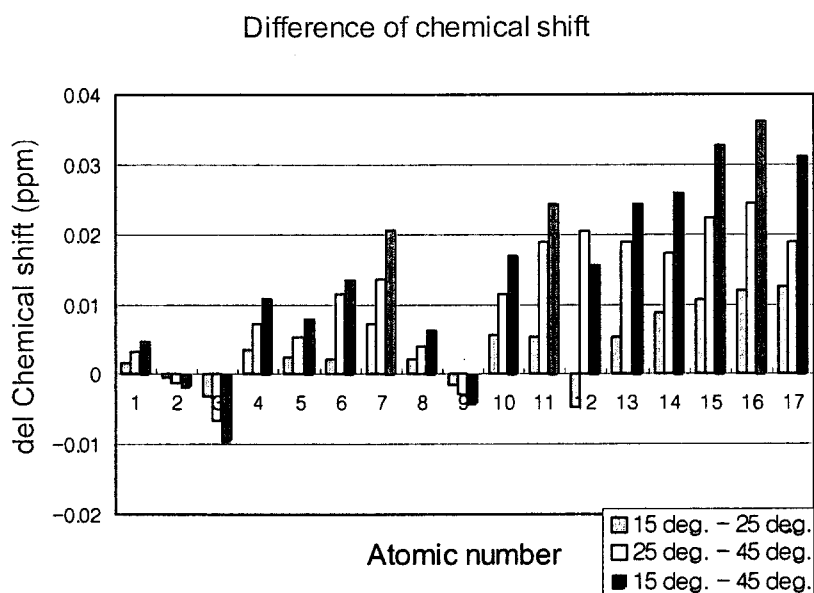


Figure 28. The difference of chemical shift according to three different temperatures.

KR31080 구조에서의 유동성을 알아보기 위해 x-ray 구조를 초기 구조로 시작하여 메탄을 용매 하에서 25 °C에서 분자 동력학 계산을 수행한 결과, 제일 먼저 유동성을 나타낸 부분은 pyridine N-oxide ring에서 회전이 일어났으며, 그 다음으로 말단의 벤젠 ring과 tetrazole ring 사이의 회전이 일어났다 (Figure 29). 그러나 최종 구조는 유동성의 결과와 반대로 부틸 잔기의 구조 변형이 가장 컸으며, 말단의 벤젠 ring과 pyridine N-oxide ring의 구조는 초기 구조와 크게 변하지 않았다. 따라서 분자 동력학 실험과 온도 증가에 따른 chemical shift의 차이 결과로 KR31080의 구조에서 pyridine N-oxide ring의 유동성이 가장 큰 것으로 보인다.

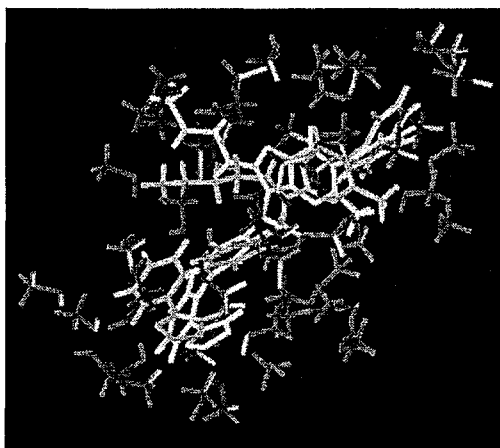


Figure 29. The result of Molecular Dynamics for KR31080 x-ray structure with methanol as solvent (MD option : 298 K, 100 fs, 500 iteration). The total energy was -51.94 kcal/mol.

(2) Benzofuran 유도체

DuP-753이 AII type I 수용체 길항제에 활성을 갖는 원형 화합물로서 개발된 이후¹¹⁰⁾, 다양한 구조의 AII 길항제 활성을 가지는 화합물이 여러 회사에서 개발되었다¹¹¹⁾. Glaxo 회사에서 개발한 benzofuran 유도체가 그 중 하나이다¹¹²⁾. 특히 Glaxo의 benzofuran 유도체와는 달리 KR 화합물의 benzofuran 유도체는 imidazole ring과 benzofuran의 furan ring에 연결되어 있고, tetrazole ring이 benzofuran의 벤젠 ring에 연결되어 있어서 pharmacophore의 상대적인 위치를 달리 할 수 있다 (Figure 30). 따라서 DuP-753과 Glaxo 화합물에 비해 치환된 위치에 따라 좀 더 다양한 구조를 합성할 수 있으므로 치환체 위치를 달리하고, 브롬 치환 효과를 알아보기 위해 10 개의 regioisomer를 합성하여 생리 활성을 측정하였다 (Table 3)¹¹³⁾. 그 결과 imidazole ring이 benzofuran의 furan ring의 meta 위치에, tetrazole ring이 벤젠 ring의 meta 위치에 치환된 KR31272가 가장 높은 활성 ($IC_{50} = 28.3 \text{ nM}$)을 보였으며, 둘 다 ortho 위치에 치환된 KR31276이 KR31272에 비해 대략 600배 이상 낮은 활성 ($IC_{50} = 17719.84 \text{ nM}$)을 보였다.

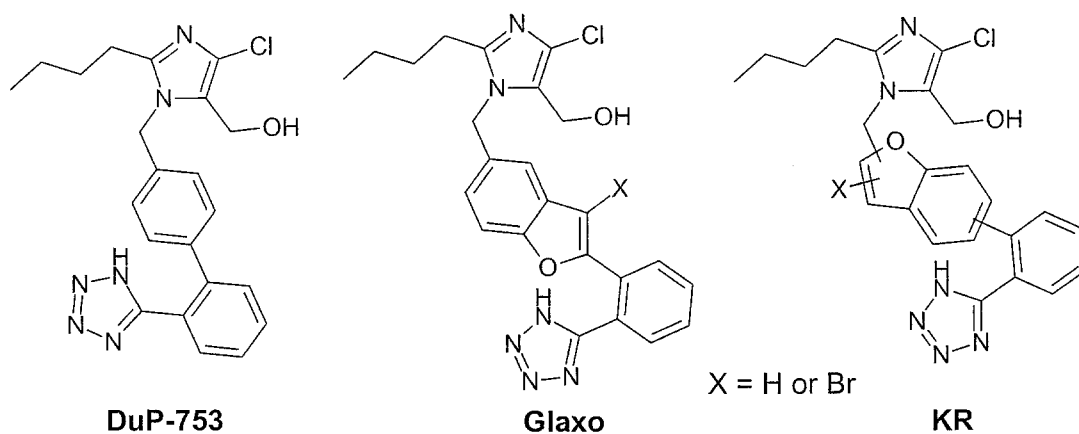


Figure 30. Various nonpeptidic AII antagonists

따라서 KR31272의 구조적인 정보를 얻기 위해 분자 역학 방법을 사용하여 초기 구조를 얻은 후 conformational search를 수행하였다. NMR 실험으로부터 얻은 NOE 정보에서는 6번 proton의 부틸 잔기와 알코올의 메틸 잔기와의 NOE를 보여 주며, 말단의 벤젠 고리와 benzofuran 고리의 벤젠 고리와의 NOE를 보이고 있다 (Table 16, Figure 31, 32). 따라서 계산 소요 시간을 줄이기 위해 NOE에서 얻은 거리 정보를 사용하여 거리 제한을 설정하여 systematic search를 한 경우와 거리 제한을 사용하지 않고 이면각을 회전하여 낮은 에너지 구조를 찾는 grid search와 random search를 각각 수행하였다.

Table 16. The resonance assignment of KR31272 from 2D-COSY and 2D-NOESY (600 MHz, 25 °C, CDCl₃)

Proton number	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	The number of protons
1	0.84	3	3
2	1.30	6	2
3	1.56	5	2
4	2.69	3	2
5	4.56	1	2
6	5.42	1	2
7	7.52	1	1
8	7.34	2	1
9	6.98	2	1
10	7.59	2	1
11	7.67	3	1
12	7.57	3	1
13	7.68	2	1
14	7.34	1	1
15	7.77	1	1

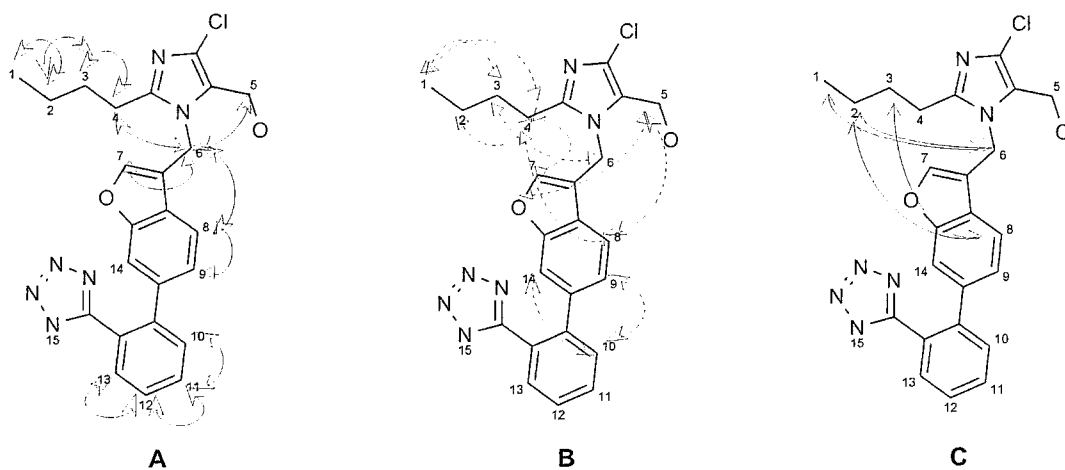


Figure 31. The NOEs from 2D-NOESY (mixing time : 250 and 400 ms). (A) strong NOEs at 250 ms mixing time (B) weak NOEs at 250 ms mixing time (C) very weak NOEs at 400 ms mixing time.

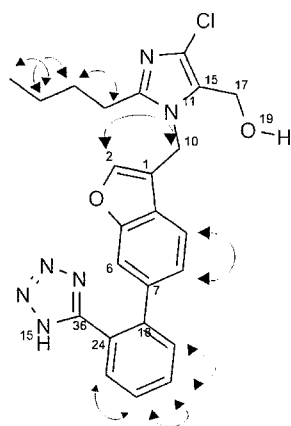


Figure 32. The atomic number of KR31272 and 2D-COSY cross peaks.

각각의 conformational search 결과는 **Table 17**에 표시되었으며, random search에서 나온 결과가 가장 낮은 에너지 ($E : 54.47 \text{ kcal/mol}$)를 가졌으며, 계산 시간도 세 방법 중에서 가장 짧았다. NMR 실험으로부터 거리 제한 조건을 설정하여 계산한 systematic search에서는 pyridylimidazole 유도체에서 보이는 두 가지 형태의 구조를 얻었으며, tetrazole이 imidazole ring과 같은 배향을 가지는 type I과 tetrazole이 imidazole ring과 반대 배향을 가지는 type II이다 (**Figure 33**). 한편 Grid search와 random search에서 얻은 가장 낮은 에너지의 구조는 type II이다. Pyridylimidazole 유도체와는 달리 benzofuran의 경우 type II가 type I에 비해 에너지가 대략 0.4 kcal/mol 정도 낮았다. **Figure 34**에서는 각각의 conformational search에서 나온 가장 낮은 에너지를 가진 구조의 거리와 NMR 실험에서 나온 거리와 비교한 것이다. 밑줄 친 거리는 NOE 정보와 일치하지 않은 거리를 표시했으며, 4개의 구조에서 정확히 NOE 정보를 만족시키는 구조는 없었으며, NOE 정보만으로 benzofuran 유도체의 생체 내에서의 구조가 type I인지 type II인지 결정할 수 없었다. 따라서 계산의 효율성을 고려하여 random search를 사용하여 10개의 regioisomer의 구조를 계산하였다.

Table 17. The torsion angle and energy of KR31272 calculated by Grid, random, and systematic search

	φ 1	φ 2	φ 3	φ 4	φ 5	φ 6	Energy (kcal/mol)
Grid search (II)	-117.9	52.7	-117.7	-150.3	62.0	62.4	55.5
Random search (II)	122.9	133.9	-113.6	-152.1	58.3	59.37	54.5
Systematic search (I)	-116.7	-139.4	-122.4	35.1	-61.4	-59.8	55.0
(II)	-115.4	-145.9	60.7	-151.4	-62.2	-59.9	54.6

* φ 1 = C15-N11-C10-C1, φ 2 = N11-C10-C1-C2, φ 3 = C6-C7-C18-C24,
 φ 4 = C18-C24-C29-N36, φ 5 = N11-C15-C17-O19, φ 6 = C15-C17-O19-H
 (Atomic numbers show in **Figure 32.**)

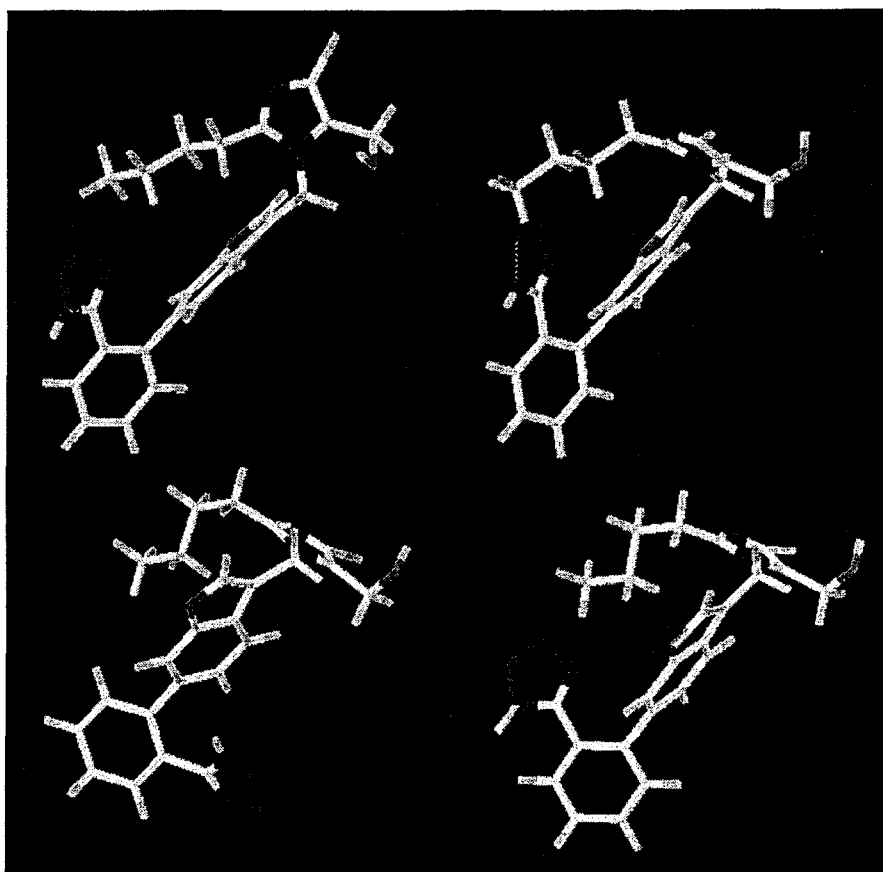


Figure 33. Low energy conformer of KR31272 from grid search (top left) , random search (top right), systematic search type I (bottom left) and type II (bottom right) in **Table 17.**

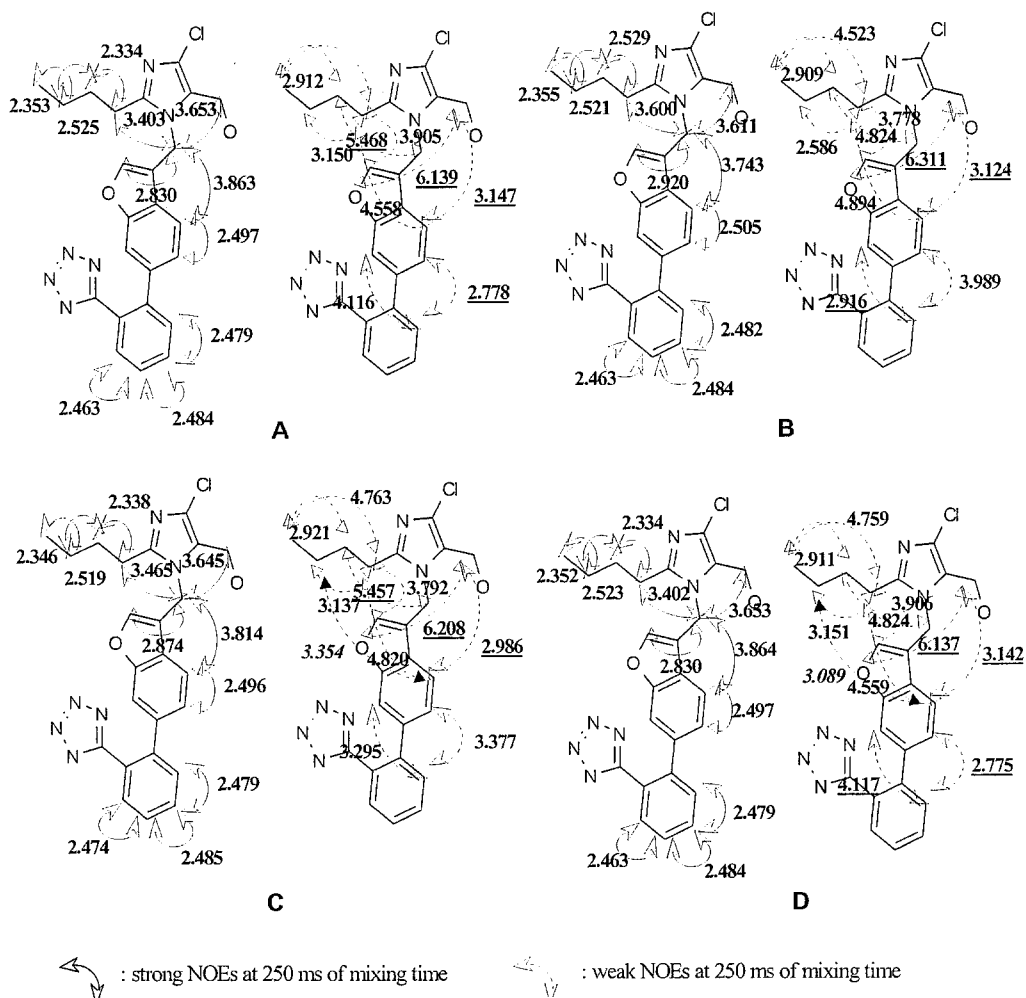


Figure 34. NOEs from 2D-NOESY experiments and distances from calculated structure. The lowest energy conformer of KR31272 from (A) grid search, (B) random search, (C) systematic search type I and (D) type II. The dot lines are weak NOEs at 250 or 400 ms mixing time. The distances underlined are too long or short comparing to their NOEs.

알려진 AII 길항제의 분자 내에서 생리 활성에 중요한 요소는 imidazole ring의 질소 원자, 알킬 잔기, 음이온 잔기이며, regioisomer의 구조 활성간의 관계를 알아보기 위하여 random search에서 계산된 가장 낮은 에너지의 구조에서 imidazole ring과 부틸 잔기의 메틸과의 거리, 부틸 잔기의 메틸과 tetrazole ring과의 거리, tetrazole ring과 imidazole ring과의 거리, tetrazole ring과 질소 원자와의 거리, tetrazole ring과 히드록시기와의 거리를 각각 D1, D2, D3, D4, D5로 명시하여 pharmacophore 간의 중요 거리를 측정하였다. Figure 35에서는 각각의 거

리와 활성간의 그래프를 통하여 D3, D4, D5의 거리가 생리활성과 parabolic한 관계를 갖는 다는 것을 알 수 있었으며, 이는 D3, D4, D5가 생리활성을 나타내는데 최적의 거리가 있다는 것을 보여주고 있는 증거이다. 따라서 AII 수용체와 리간드가 결합할 때, tetrazole ring과 imidazole ring, 히드록시기의 상대적인 위치가 결합할 때 중요하게 작용하는 것으로 보인다.

또한 가장 활성이 높은 화합물인 KR31272와 가장 활성이 낮은 KR31276을 기존에 알려진 AII 길항제 활성 화합물인 DuP-753과 Glaxo 화합물의 가장 낮은 에너지 구조에서 imidazole ring의 질소 원자와 tetrazole ring의 중심, 히드록시기와 겹쳤을 경우 활성이 높은 KR31272의 구조는 DuP-753과 Glaxo 화합물과 전체적으로 유사한 구조를 가지는 반면, 활성이 낮은 KR31276의 경우는 잘 일치하지 않았다 (Figure 36).

그리고 Glaxo 화합물과 KR 화합물의 benzofuran 유도체의 중요한 차이점 중의 하나는 브롬 치환체의 활성이다. Glaxo의 경우는 브롬이 치환된 경우가 그렇지 않은 경우보다 훨씬 활성이 증가했으며, 그 이유는 구조의 차이에서 오는 것으로 보았다. 그러나 KR 화합물의 경우는 브롬이 치환됨으로써 어떤 경우 (KR31275 vs 31278, KR31276 vs 31280)는 활성이 증가한 반면, 감소하는 경우가 더 많았다 (KR31271 vs 31279, KR31272 vs 31273, KR31274 vs 31277). 또한 브롬이 치환됨으로써 구조 변형을 가져오지 않았으므로 브롬의 전자적인 특성을 알아보기 위해 쌍극자 모멘트를 계산하였다 (Figure 37). 그 결과 브롬이 치환되었을 경우는 치환되지 않은 경우보다 쌍극자 모멘트의 크기가 증가했으며, 활성 있는 경우 그 방향이 benzofuran ring에서 부틸 잔기 쪽으로 향하고 있다.

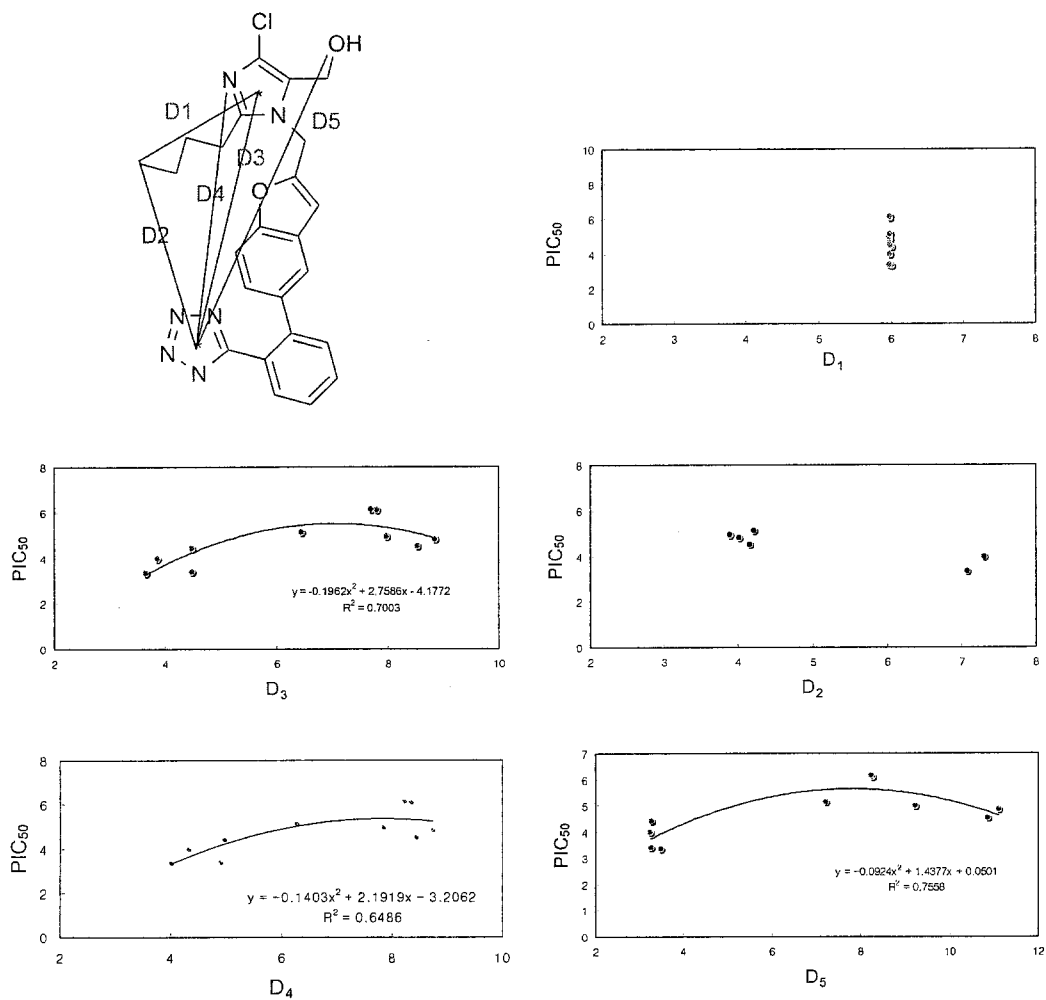


Figure 35. The distances between pharmacophoric elements in benzofuran derivatives and the relationships of distance vs activity. The fitting lines were from polynomial regression ($PIC_{50} = A + B_1 \cdot X + B_2 \cdot X^2$).

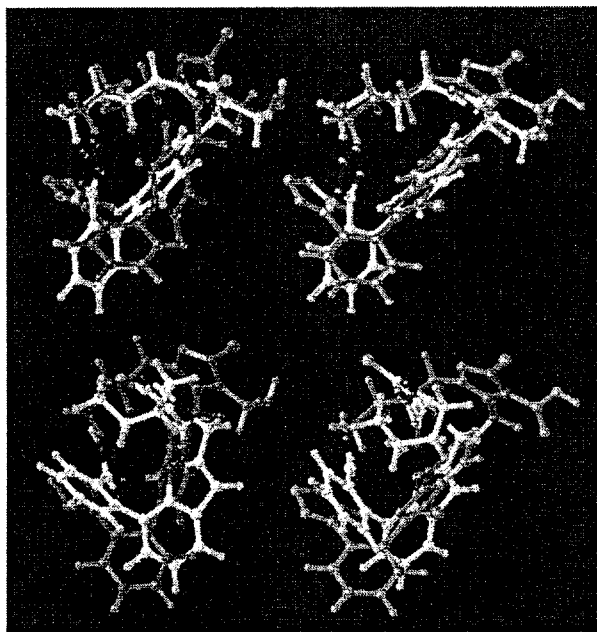


Figure 36. The conformations of the biologically most active and least active compounds of benzofuran series. (Top left) The superimposition of the most active compound, KR31271 and the DuP-753 compound (purple, rms value: 1.378 Å), (Top right) The Glaxo compound (magenta, rms value : 1.164 Å), (Bottom left) The superimposition of the most least compound, KR31276 and the DuP-753 compound (purple, rms value : 1.829 Å), (Bottom right) the Glaxo compound (magenta, rms value : 2.644 Å). The IC_{50} for DuP-753 is 11.25 μM in our experiments.

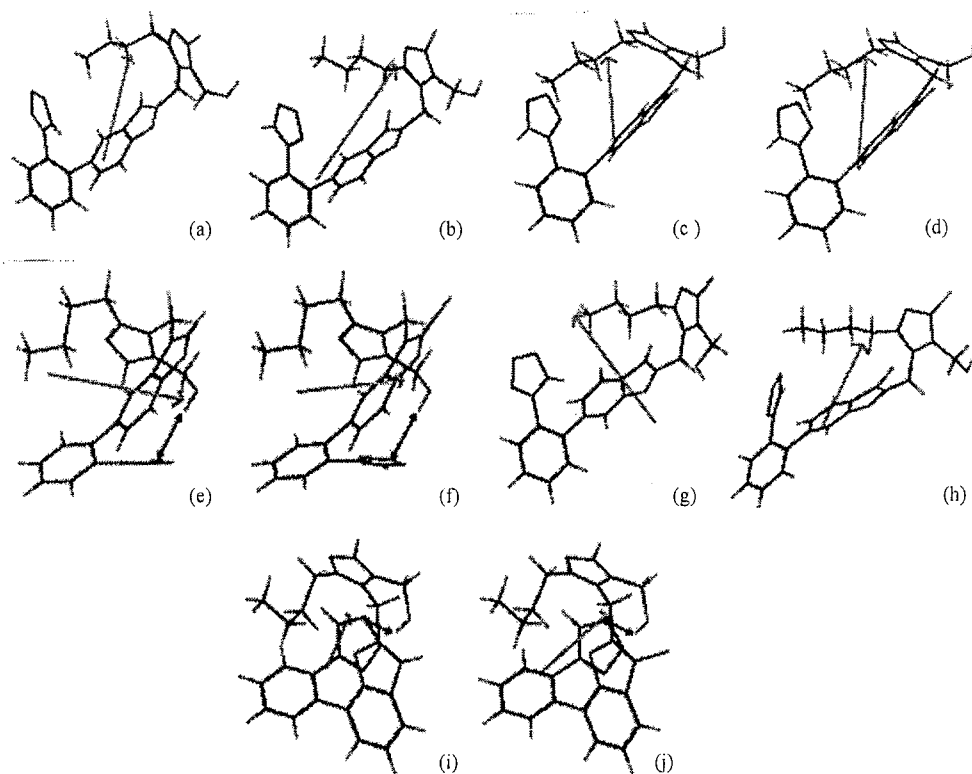


Figure 37. The direction and size of dipole moments for isomers. (a) KR31271 (DP : 2.91 debye), (b) KR31279 (DP : 4.22), (c) KR31272 (DP : 2.94), (d) KR31273 (DP : 3.62), (e) KR31276 (DP : 2.25), (f) KR31280 (DP : 2.35), (g) KR31274 (DP : 3.28), (h) KR31277 (DP : 2.47), (i) KR31275 (DP : 3.38), (j) KR31278 (DP : 4.04). The unit of dipole moment is debye.

Pharmacophore 요소 중 imidazole ring과 히드록시기의 거리를 최적화 시키기 위해 KR31272 화합물에서 carbon 사슬의 길이를 달리하고, 알코올 대신 ester나 acid로 치환하여 새로운 계열의 benzofuran 유도체를 합성하여 그 활성을 측정하였다 (Table 4). Carbon 사슬이 3개 이상 증가했을 경우, 분자 내의 유동성이 증가하여 tatrazole ring의 질소 원자와 수소 결합을 이루는 것이 가장 안정한 구조로 계산되었다. 그러나 QSAR의 효과를 증대시키기 위해서 KR31272와 전체적으로 유사한 내부의 수소 결합이 없는 구조를 분석에 사용하였다. 알코올의 경우 carbon 사슬이 두 개인 경우 ($IC_{50} = 17.7 \text{ nM}$)가 한 개인 경우 ($IC_{50} = 28.3 \text{ nM}$) 보다 활성이 증가했으며, 세 개인 경우 ($IC_{50} = 49.7 \text{ nM}$)는 감소했다. 그 이유는 carbon 사슬의

증가로 분자 내의 유동성의 증가와 입체 장애를 생각할 수 있다. Figure 38에서 보듯이 에너지 면에서 안정한 구조가 알코올 그룹이 펼쳐진 경우보다 구부러진 형태가 더 안정하며, KR31369 (R : CH₂CH₂CH₂OH, IC₅₀ = 49.7 nM)에 비해 이중 결합을 첨가하여 유동성을 감소시킨 KR31368 (R : CH=CHCH₂OH, IC₅₀ = 27.7 nM)의 활성이 증가된 것으로 보아 carbon 사슬이 증가됨으로써 입체 장애의 원인보다 분자 내의 유동성의 증가로 tetrazole ring이나 imidazole ring과의 수소 결합을 하는 구조가 열역학적으로 유리하여 생리 활성에 중요한 구조의 수를 감소시킴으로써 AII 수용체의 길항제로서의 활성을 감소시키는 주원인으로 보인다. 또한 알코올이 활성이 가장 크며 ester, 산의 순으로 활성이 감소하였다.

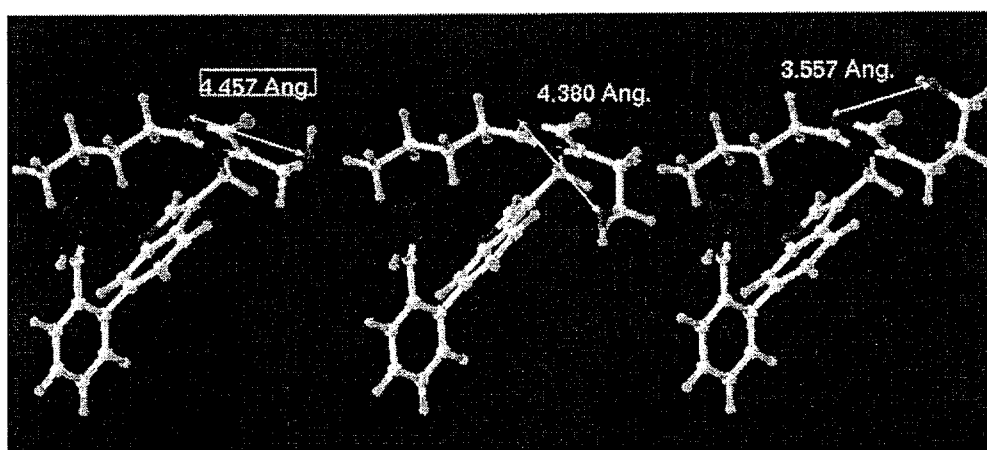


Figure 38. The distances between the nitrogen atom of the imidazole ring and the oxygen of the hydroxyl group. (KR31272 : R = CH₂OH, IC₅₀ : 28.3 nM, KR31371 : R = CH₂CH₂OH, IC₅₀ : 17.7 nM, KR31369 : R = CH₂CH₂CH₂OH, IC₅₀ : 49.7 nM).

(3) Agonist 구조

최근에 소형 분자로써 AII agonist 활성을 띠는 화합물 (Figure 39)이 발견되었다¹¹⁴⁾. L-162,313 화합물은 AII와 동일한 정도로 혈압을 상승시키며 AT₂ 수용체에도 높은 친화력을 보인다 (AT₁ IC₅₀ = 1.1 nM, AT₂ IC₅₀ = 2.0 nM). L-162,313의 구조는 AII 길항제와 유사하나, tetrazole 부분의 구조적인 변형으로 AII agonist의

역할을 하는 것으로 보인다. 또한 AT₁ 수용체에 좀 더 선택적인 AII agonist, L-163,491도 이어서 발견되었다 (AT₁ IC₅₀ = 1.4 nM, AT₂ IC₅₀ = 101 nM)¹¹⁵). Point mutation 실험 결과에서는 AII 길항제인 L-158,809가 L-162,313과 구조적으로 매우 유사하지만 AII type I 수용체의 Ala 111, Ala 294, Asp 295를 다른 아미노산으로 치환했을 때, L-162,313이 수용체와 결합하는데 영향을 받지 않는다는 실험 결과로 agonist의 결합은 antagonist와 다르며, N말단의 Ile 14, His 24, Tyr 26, Ile 27 과 첫 번째 loop인 Tyr 32와 세 번째 loop인 Asp 278, Asp 281의 변이에서도 AII의 친화력에는 영향이 있으나 agonist의 결합에는 영향이 없는 것으로 보아 AII와 L-152,313의 결합은 서로 독립적인 것으로 보인다¹¹⁶).

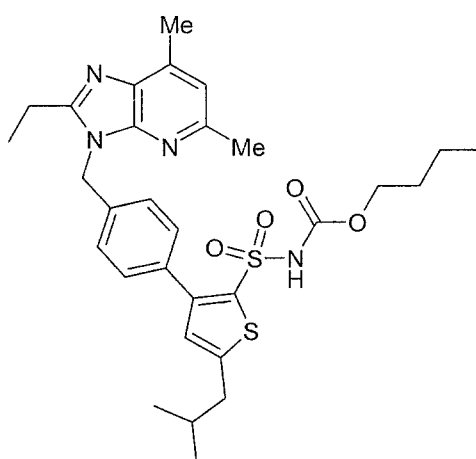


Figure 39. AII AT₁ agonist, L162,313 (AT₁ IC₅₀ = 1.1 nM, AT₂ IC₅₀ = 2.0 nM).

따라서 AII agonist의 구조적인 특징을 알아보기 위해서 L-162,313의 구조적인 변형으로 pyridylimidazole 유도체의 말단에 phenyltetrazole을 L-162,313의 구조와 같게 변형시킨 KR31314를 합성하여 NMR 실험으로 거리 정보를 얻었다. Table 18은 2D-COSY와 NOESY 실험 데이터로부터 각각의 proton의 chemical shift를 지정하였다.

Table 18. The resonance assignment of KR31314 from 2D-COSY and 2D-NOESY (600 MHz, 25 °C, CDCl₃)

Proton number	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	The number of protons
1, 3	7.13	2	2
2, 4	7.43	2	2
5	6.69	1	1
6	2.68	2	2
7	1.91	multiplet	1
8	0.97	2	6
9	> 14	1	1
10	2.76	3	2
11	1.73	multiplet	2
12	1.37	multiplet	2
13	0.88	3	3
14	5.49	1	2
15	7.84	1	1
16	3.96	3	2
17	1.48	multiplet	2
18	1.19	multiplet	2
19	0.82	3	3
20	2.50	1	3
21	8.36	2	1
22	7.33	4	1
23, 24	7.39	overlap	2

Figure 40에서는 5 Å 이내에서의 거리 정보를 보여주며, NOE 분석 결과 pyridine N-oxide와 imidazole ring의 구조는 KR31080의 NOE와 동일한 결과를 보이며 (KR31314의 15번과 24번의 NOE vs KR31080의 7번과 17번의 NOE), 10번과 14번 proton의 NOE가 구조 결정하는데 중요한 결정 요인으로 고려되었다. Random search와 Grid search로부터 계산된 가장 낮은 에너지의 구조는 에너지에서 random search에서 계산된 구조가 0.08 kcal/mol 정도 낮으나 4개의 수소 결합을 이루고 있는 구조는 동일하며, sulfonamide의 NH와 NO-pyridine ring의 산소 원자와 수소 결합 (1.64 Å, 123.2 °)을 이룸으로써 pyridylimidazole이나 benzofuran 유도체에서 계산된 가장 낮은 에너지의 구조와 차이를 보인다 (Figure 41). NOE와 계산된

구조의 거리를 비교해보았을 때는 몇몇 거리를 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았다 (Figure 42).

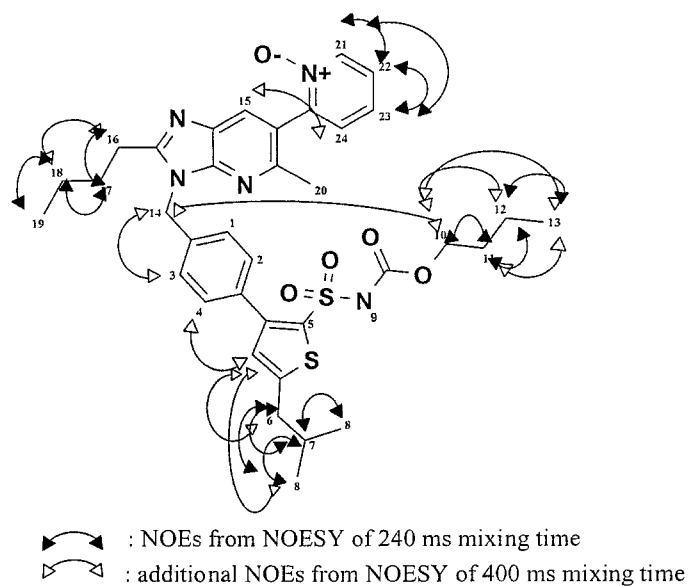


Figure 40. The atomic number of KR31314 and NOEs from 2D-NOESY experiments (mixing time : 240 and 400 ms).

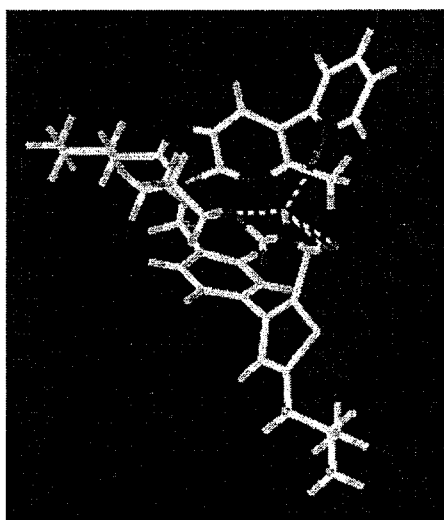


Figure 41. The calculated structure of KR31314 from random search (E : -99.88 kcal/mol).

Table 19. The comparison of torsion angle between the calculated structures from build-up approach, random search and grid search

Torsion angle	Northern	Middle	Southern	Random search	Grid search
8-9-14-15	-70.8	-132.6	-	83.8	78.0
9-14-15-16	131.0	86.2	-	-107.2	-123.0
17-18-21-22	-	-117.2	123.8	69.9	61.0
21-22-30-31	-	51.5	-44.0	55.5	34.9
25-24-26-37	-	114.3	113.7	94.9	114.3
24-26-27-28	-	177.9	179.7	-61.6	-59.6
2-1-44-49	58.3	-	-	-58.6	55.7
7-8-10-11	-55.6	-	-	79.0	33.9
8-10-11-12	-63.5	-	-	-179.8	176.4
10-11-12-41	-179.2	-	-	-179.0	-177.4
22-30-31-32		-	-60.6	-177.8	58.1
30-31-32-33	-	-	177.9	-178.5	-173.7
31-32-33-34	-	-	-173.8	-175.9	176.9
32-33-34-35	-	-	72.3	-179.9	-176.2
33-34-35-36	-	-	179.5	-66.5	178.5
34-35-36-37	-	-	-179.9	60.7	-176.1

imidazole ring과 phenyl ring 사이에서의 이면각이 두 가지 배향을 가지므로 최종적으로 얻은 구조는 두 유형의 구조를 얻었다. **Figure 44**는 방법에서 계산된 가장 낮은 에너지의 구조를 비교한 것이며, random search에서 계산된 구조의 에너지가 가장 낮으며 ($E : -75.25$ kcal/mol), 전체 이면각을 동시에 고려한 grid search에서 계산된 구조가 다음으로 낮다 ($E : -66.47$ kcal/mol). Random search와 grid search에서 계산된 KR31312의 구조는 KR31080 구조의 type II와 유사하며, build-up approach에서 계산된 두 구조 중 두 번째로 낮은 에너지의 구조는 유사하나 에너지에서 대략 46 kcal/mol 정도 낮은 구조이다. 또한 build-up approach에서 계산된 가장 낮은 에너지의 구조는 random search와 grid search에서 계산된 구조와 전혀 다른 구조이며, 에너지에서도 41 kcal/mol 정도 높다. 따라서 build-up approach 방법은 계산 시간을 줄이는 방법 중의 하나로 생체 분자나 크기가 큰 유기분자의 계산에 적용하고 있으나, 부분 구조의 낮은 에너지를 찾아서 전체 구조의 낮은 에너지를 찾는 방법은 이면각의 조합에 의해 생기는 나머지 구조를 고려할 수 없는 오류를 범하므로 위험한 방법이라 할 수 있겠다. 또한 전체 이면각을 동시에

고려한 grid search는 이면각이 4개 이상 되는 구조의 에너지를 계산할 때 시간이 너무 많이 소요되므로, 무작위로 회전시켜 얻는 random search 방법이 낮은 에너지 구조를 찾는 방법으로 가장 효과적이며 효율적인 방법이라 하겠다.

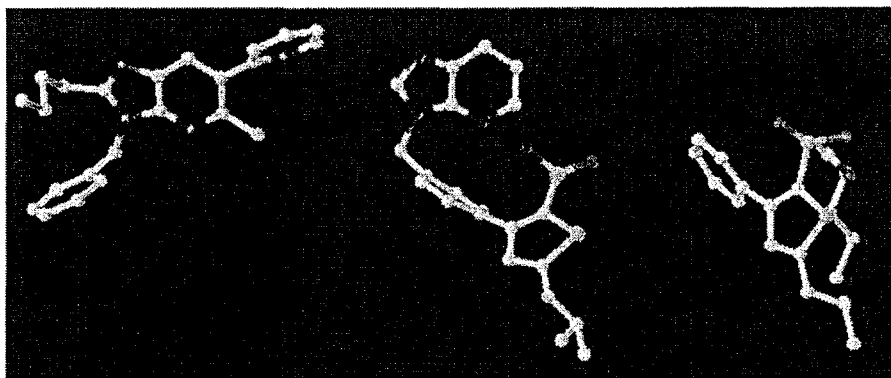


Figure 43. Northern, middle, southern part of build-up approach.

Random search로부터 계산된 KR31312의 구조와 KR31080의 구조의 겹침 구조 (Figure 45)는 전체적으로 유사하며 KR31080의 tetrazole 부분이 KR31312의 sulfonamide group과 겹치며, 차이점은 KR31312의 경우 벤젠 ring에 isobutyl 잔기가 부가적으로 연결되어 있고 sulfonamide에 긴 부틸 잔기가 연결되어 있다. 따라서 이 부분 구조의 차이가 agonist로서의 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

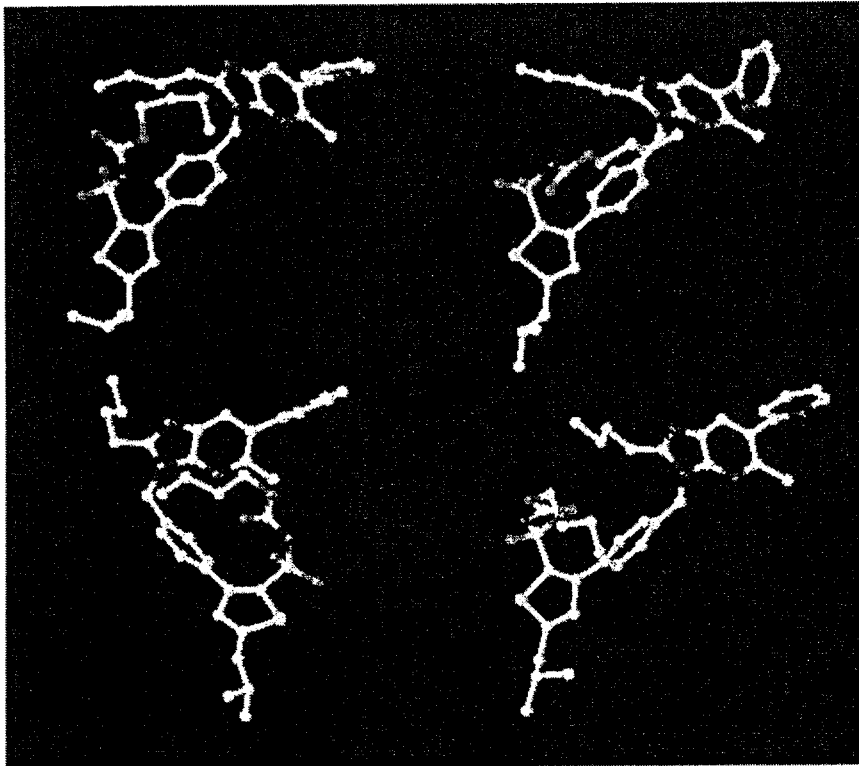


Figure 44. The calculated structure of KR31312 from random search (top left, E : -75.25 kcals), grid search (top right, E : -66.47 kcals), build-up approach 1 (bottom left, E : -34.27 kcals) and 2 (bottom right, E : -28.79 kcals).

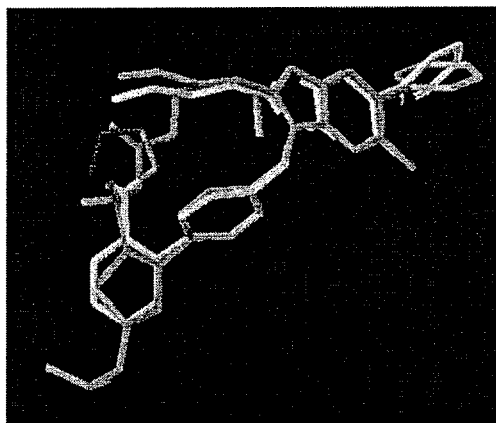


Figure 45. The superimposition of KR31312 (E : -75.25 kcals/mol) and KR31080 (E : 38.10 kcals/mol) as AII antagonist.

(4) AII 길항제 활성을 갖는 거대 고리 분자의 구조

활성 있는 거대 고리 분자의 구조 분석은 유동성이 큰 유기화합물의 구조 분석에 여러 가지 정보를 제공한다. 구조적으로 고리에 의해 제한되어 있으므로, 가질 수 있는 3차 구조가 한정되어 있다. Merck 회사에서 AT₁과 AT₂ 수용체에 높은 친화력으로 결합 (AT₁ IC₅₀ = 4 nM; AT₂ IC₅₀ = 24 nM)하는 거대 고리분자가 개발되었으며 (Figure 46), 그 구조는 acylsulfonamide group이 6개의 carbon 사슬에 의해 quinazolinone ring에 연결되어 있다.

구조 분석에 사용된 방법은 random search이며, 계산된 가장 낮은 에너지는 -62.64 kcal/mol이며, 그 구조는 음이온 그룹이 quinazolinone ring의 반대 방향에 놓인 type II에 해당되는 구조이다. 그러나 음이온 그룹이 quinazolinone ring의 같은 방향에 놓인 type I과 유사한 구조도 발견되며, biphenyl 그룹에서 KR31080의 type I의 구조와 차이가 있으며, 가장 낮은 에너지의 구조와 에너지의 차가 0.12 kcal/mol 정도이다. Figure 47은 거대 고리 분자의 가장 낮은 에너지의 구조와 KR31080의 type II의 구조와의 겹침 구조이며, KR31080의 imidazole ring과 거대 고리분자의 quinazolinone ring과 biphenyl 부분, tetrazole ring과 acyl sulfonamide group이 유사한 구조를 이루고 있다.

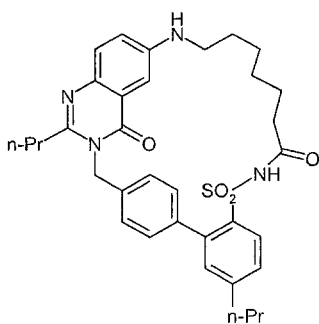


Figure 46. Macrocyclic AII antagonist from Merck company.

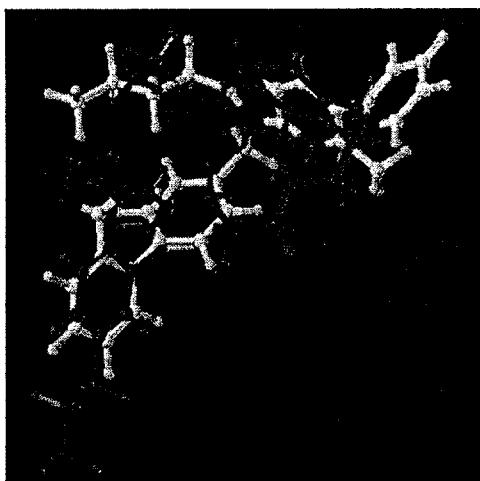


Figure 47. The superimposition of KR31080 (white) and macrocyclic AII antagonist (rms value : 0.531 Å).

(5) AII peptide 구조

AII peptide는 Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe의 서열로 구성된 8개의 펩티드이며, RAS에서 강력한 혈압상승 호르몬으로 알려져 있다¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾. 따라서 여러 연구자에 의해서 NMR¹²⁰⁻¹²⁴⁾, CD¹²⁵⁻¹²⁸⁾, IR¹²⁹⁻¹³¹⁾, 이론 계산¹³²⁻¹³⁷⁾, 물리 화학¹³⁸⁻¹⁴¹⁾ 연구를 통해서 AII의 구조를 밝히기 위한 노력이 진행되어져 왔다. AII의 구조는 α -helix, β -turn, γ -turn 등의 다양한 구조로 분석되어져 왔으나, 구조를 결정하는데 있어서 가장 큰 어려움은 AII 펩티드의 유동성이 큰 데 있다. 그 중 유일한 x-ray 구조는 Garcia 등¹⁴²⁾에 의해서 AII-Fab 복합체의 구조로부터 얻었다. AII의 구조에는 Ile 5, His 6, Pro 7과 N말단의 Asp 1과 Arg 2에 의해서 생기는 두 개의 turn 구조와 Asp 1 잔기와 His 6의 카르보닐과 수소 결합의 형성으로 N말단과 C말단이 공간적으로 가까이 있다. 특히 AII 펩티드의 실험에 따르면 C말단이 수용체와의 결합에 필수적이다.

따라서 AII antagonist의 펩티드 모방체로써 KR31080의 x-ray 구조와 비교해보면, KR31080의 부틸 잔기, imidazole ring, tetrazole ring이 AII 펩티드의 Ile 5, His 6의 잔기와 C-말단과 구조적으로 유사하다 (Figure 48).

또한 AII 펩티드의 이론적인 구조 계산을 위하여 MD 과정과 펩티드 결합을 제외한 회전 가능한 이면각을 고려한 random search를 수행하였으며, 그 결과를

build-up 과정과 x-ray 실험 구조와 비교하였다 (Figure 49). 에너지면에서는 random search (E : 56.67 kcal/mol), MD (E : 61.22 kcal/mol), build-up 과정 (E : 75.45 kcal/mol), x-ray 구조 (E : 77.33 kcal/mol) 순으로 높았다. 모든 구조는 Pro를 중심으로 turn을 형성하고 있었으며, C-말단의 Phe의 벤젠 고리에서 가장 큰 차이를 보였다. 또한 random search와 build-up 과정에서 나온 구조가 비슷하였다. AII 펩티드의 실험 구조로부터 C-말단의 음이온 기는 His의 imidazole ring과 같은 방향에 놓여있으므로 AII 길항제의 활성 구조가 type II일 가능성을 보인다.

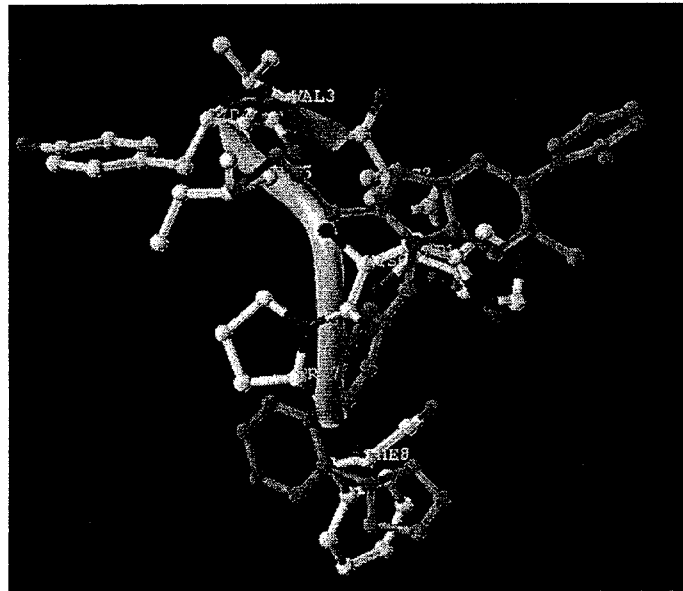


Figure 48. The superimposition of AII peptide and KR31080 x-ray structure. The butyl chain, imidazole ring and tetrazole ring of KR31080 aligned with Ile 5 side chain, His 6 and c-terminus of AII, respectively.

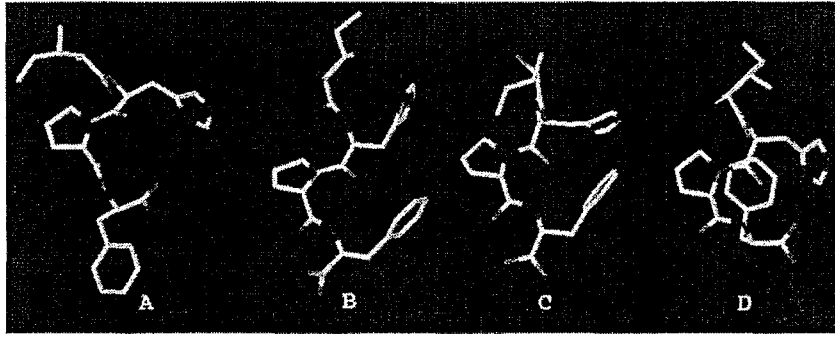


Figure 49. The structures of AII tetrapeptide (Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸). A) x-ray of AII-Fab complex (E : 77.33 kcal/mol), B) Build-up procedure (E : 75.45 kcal/mol), C) Random search (E : 56.67 kcal/mol), D) MD (E : 61.22 kcal/mol).

나. AII 수용체 길항제의 QSAR

(1) Pyridylimidazole 유도체

본 연구에서는 Losartan (DuP-753)보다 더 활성이 있는 AII 길항제 개발을 위하여 imidazole ring의 6번 위치에 pyridine N-oxide나 pyridine ring을 도입하였고 5번 위치에는 다양한 기능기를 도입하여 구조적인 변형을 통해 총 32개의 화합물을 합성하였다. 약효 검색을 통하여 얻은 IC₅₀ 값은 세 자리수의 활성 데이터 변이를 갖는다 (Table 2).

32개 화합물의 계산된 구조는 공통된 구조를 가진 주형 분자를 중심 분자로 설정하여 정렬시켰으며, 부틸 잔기와 imidazole과 biphenyltetrazole ring의 구조에서 일치점을 보였으며, 변형된 잔기의 3-D 공간상에서의 변화를 볼 수 있었다 (Figure 50). 격자 원자를 carbon atom (C₃⁺)으로 선정하여 삼차원 공간에 일정한 간격으로 놓여 있는 격자 원자와의 정전기장과 입체장과의 CoMFA field를 계산한 후, PLS 통계 분석을 통하여 outlier를 제거하여 r² 값이 가장 높은 모델을 선정하였다. QSAR 분석에 사용된 세 모델은 16개의 pyridine N-oxide series (A 모델), 16개의 pyridine series (B 모델), 총 32개의 모델 (C 모델)로 구분하여 각각 PLS 통계 분석하였다. Pyridine N-oxide 유도체로만 구성된 A 모델인 경우 두 개의 화

합물 (KR1178, 1064)을 제거하였을 때 cross-validated r^2 값이 0.699로 향상되었으며, optimum component의 수는 3개였다. 최종 통계 분석 후에는 r^2 value가 0.918이었으며, region focusing으로 brown noise를 제거하였을 경우 0.931로 증가하였다. Pyridine 유도체로만 구성된 B 모델의 경우는 5개의 outlier를 제거하고자 cross-validated r^2 값이 0.603이 되었으며 r^2 값은 region focusing 후 0.987을 얻었다. 두 모델을 합한 C 모델인 경우, B 모델에서 6개, A 모델에서 2개, 총 8개의 화합물을 제거한 cross-validated r^2 값이 0.702, optimum component의 수는 5개의 모델로 최종 통계 분석 하여 r^2 값이 0.991인 결과를 얻었다. C 모델인 경우는 region focusing에 의해 r^2 값이 향상되지 않았으며, 세 모델 중 가장 높은 cross-validated r^2 값과 가장 많은 optimum component를 가졌다. 활성에 영향을 미치는 입체장과 정전기장은 63.1 : 36.9%로 입체 요인이 상대적으로 활성에 더 크게 작용하였다 (Table 20).

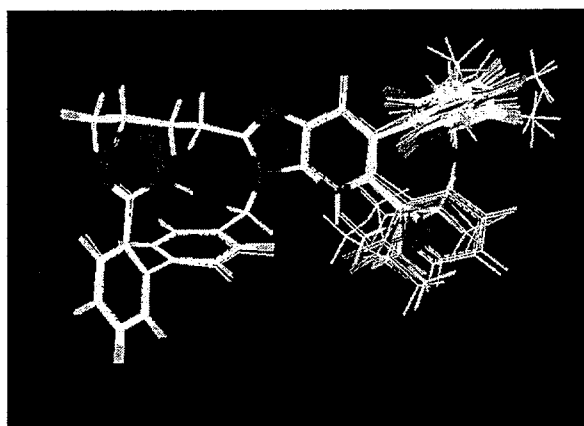


Figure 50. Database alignment.

Table 20. The summary of CoMFA-PLS results

	Model A	Model B	Model C	Model D
Total number of compounds used	16	16	32	38
The number of omitting compounds	2	5	8	4
Cross-validated r^2	0.69	0.60	0.70	0.79
Number of components	3	3	5	4
Conventional r^2	0.93	0.99	0.99	0.96
Relative Contribution (%)				
Steric	54.50	41.90	63.10	50.80
Electrostatic	45.50	58.10	36.90	49.10

Figure 51은 종 통계 분석 후 보이는 CoMFA map이다. B 모델인 경우가 나머지 두 모델과 상당히 다른 형태의 map을 보이고 있고 A 모델과 C 모델의 경우는 유사하며, 공통된 결과는 N-oxide가 pyridine ring에 ortho나 para 위치에 치환되면 활성이 증가하며, imidazole ring의 5번 위치에 치환된 R 그룹이 음이온 전하를 띤 경우와 크기가 큰 그룹이 도입될 경우 활성이 증가됨을 보이고 있다. 반면에 B 모델에서의 CoMFA map은 imidazole ring의 6번 위치에 양이온 전하를 띤 경우와 pyridine에 치환된 그룹이 크기가 작은 치환체가 활성이 증가되는 것으로 보인다.

따라서 C 모델의 최종 CoMFA map의 결과를 바탕으로 para 위치에 N-oxide가 치환된 pyridine ring에 X 그룹으로 임의의 기능기를 변형시킨 후 이론 값의 IC_{50} 값을 예측하였다. **Table 21**은 다양한 물성과 구조를 가지는 221 개의 치환체 그룹을 도입한 후 C 모델을 사용하여 예측한 결과 28개의 치환체 그룹이 기존의 KR31080보다 활성이 증가한 경우였으며 주로 음이온 전하를 가진 크기가 작은 치환체였다. 또한 가장 활성이 높은 KR31064 ($-\log IC_{50}$: 9.09) 화합물보다 활성이 더 높게 예측되는 화합물이 24개가 있었다. 따라서 24개의 치환체를 가진 화합물을 conformational search를 통하여 구조 분석한 후 다시 예측하였을 때 크기가 작고 단순한 치환체 일수록 초기에 구조 계산을 하지 않고 예측한 경우와 유사한 값을 가졌고, 크기가 큰 치환체 일수록 분자 구조에 따라 예측 값이 영향을 받았다. 특히 황, 질소, 인을 포함하는 치환체인 경우에는 원자 전하의 계산 방법도 예측 값

에 영향을 주었다.

모델의 예측 능력을 시험하기 위하여 합성이 용이하고 높은 예측 능력을 갖는 (낮은 extrapolation 값) CN 그룹을 선택하여 imidazole ring의 6번 위치에 N-oxide 그룹, 질소가 ortho나 para 위치에 치환된 pyridine ring, 5번 위치에 CN 그룹이 도입된 화합물과 각각의 regioisomer를 합성하여 (Figure 52, 이론적으로 계산한 CoMFA 모델에서의 $-\log IC_{50}$ 값을 비교하였다 (Table 22, Figure 53).

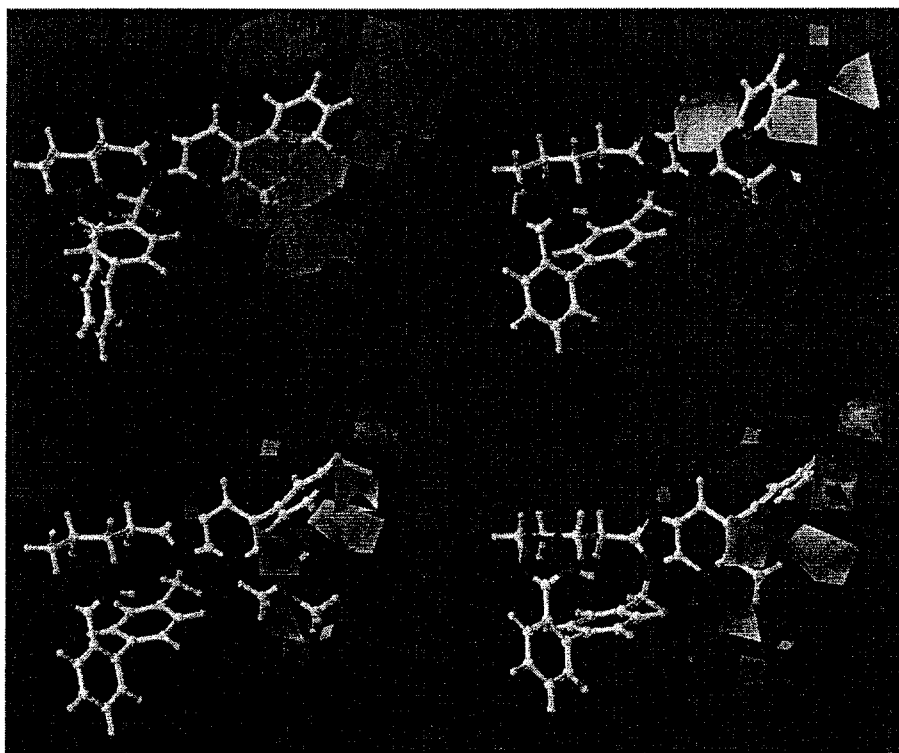


Figure 51. CoMFA map of pyridylimidazole derivatives for angiotensin II antagonist [Model A : Pyridine N-oxide series (upper left), Model B : Pyridine series (upper right), Model C : A and B mixed series (lower left), Model D : all series (lower right)]. The red and blue polyhedra indicate electrostatic contour plot. The regions where increased positive charge is favorable for activity are shown in blue, while regions where increased negative charge is favorable for activity are shown in red. The green and yellow polyhedra indicate steric contour plot. The regions where increased steric bulk is associated with enhanced activity are indicated in green, while regions where increased steric bulk is associated with diminished activity are indicated in yellow.

Table 21. The predicted IC₅₀'s of various substituents calculated by "Optimizing QSAR" option of Sybyl program. Because of high activity of para-substituted N-oxide series, only para- substituted N-oxides were used for the calculations. Only R groups that have high predicted activities are displayed.

R	Predicted(-logIC ₅₀)	Extrapolation	Energy (kcal/mol)
PO ₃ H ₂	9.41	0.18	45.89
O ⁻	9.39	0.47	27.45
CH ₂ COMe	9.35	0.02	18.55
PO ₂ H	9.35	0.29	9.59
SCONH ₂	9.32	0.05	21.92
CHO	9.23	0.08	24.17
NO ₂	9.22	0.15	14.05
NO	9.22	0.09	22.71
CH ₂ CCH	9.22	0.39	53.21
CF ₂ H	9.19	0.10	23.37
Br	9.18	0.05	25.00
Cl	9.18	0.06	25.44
CH ₂ F	9.18	0.08	25.20
CHMeOH	9.18	0.31	56.16
SCONHMe	9.17	0.12	26.57
SCN	9.16	0.05	23.13
I	9.14	0.07	24.74
CN	9.13	0.08	27.06
SOCF ₂ H	9.13	0.31	24.88
CF ₃	9.12	0.09	21.51
F	9.11	0.08	27.99
<i>c</i> -Propyl	9.11	0.26	52.79
Methyl	9.10	0.06	25.73
CH ₂ CN	9.08	0.10	24.87
POPh ₂	9.08	0.12	33.46
H	9.07	0.07	26.76
OH	9.06	0.05	26.18

예측된 값이 실제 실험 값보다 높음에도 불구하고, 6개의 새로운 화합물의 계산 값은 상대적으로 잘 일치한다. 특히 C 모델인 경우는 실제 값과 계산 값의 r^2 값이 0.8이며 세 모델 중 가장 잘 예측하였으며, B 모델인 경우는 A 모델에 비해 r^2 값이 높음에도 불구하고 예측 능력이 떨어졌다. 또한 regioisomer의 $-\log IC_{50}$ 값은 모델에서 구조적인 유사성이 적은 경우이므로 상대적인 경향을 예측할 수 있었으나 실제 실험 값과는 상당히 차이가 있었다. 따라서 모델의 예측 능력은 non-cross-validated r^2 값보다 cross-validated r^2 값에 의존함을 보인다.

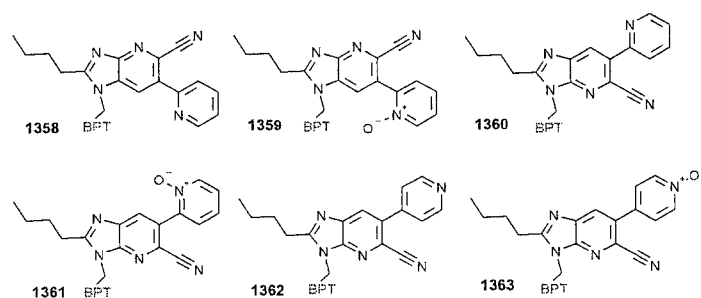


Figure 52. The structure of new additional six compounds used in the test set. BPT is biphenyltetrazole.

Table 22. The predicted and experimentally determined $-\log(IC_{50})$'s of six new compounds in the test set.

KR#	Experimental $-\log(IC_{50})$	Predicted $-\log(IC_{50})$ in Model A	Predicted $-\log(IC_{50})$ in Model B	Predicted $-\log(IC_{50})$ in Model C	Predicted $-\log(IC_{50})$ in Model D
KR31358	6.25	8.75	8.70	8.54	5.62
KR31359	6.42	8.68	8.83	8.52	6.16
KR31360	8.60	8.98	8.85	9.02	8.81
KR31361	8.96	8.92	8.82	9.00	9.17
KR31362	8.28	9.02	8.80	9.26	8.67
KR31363	8.96	9.10	8.78	9.30	9.26

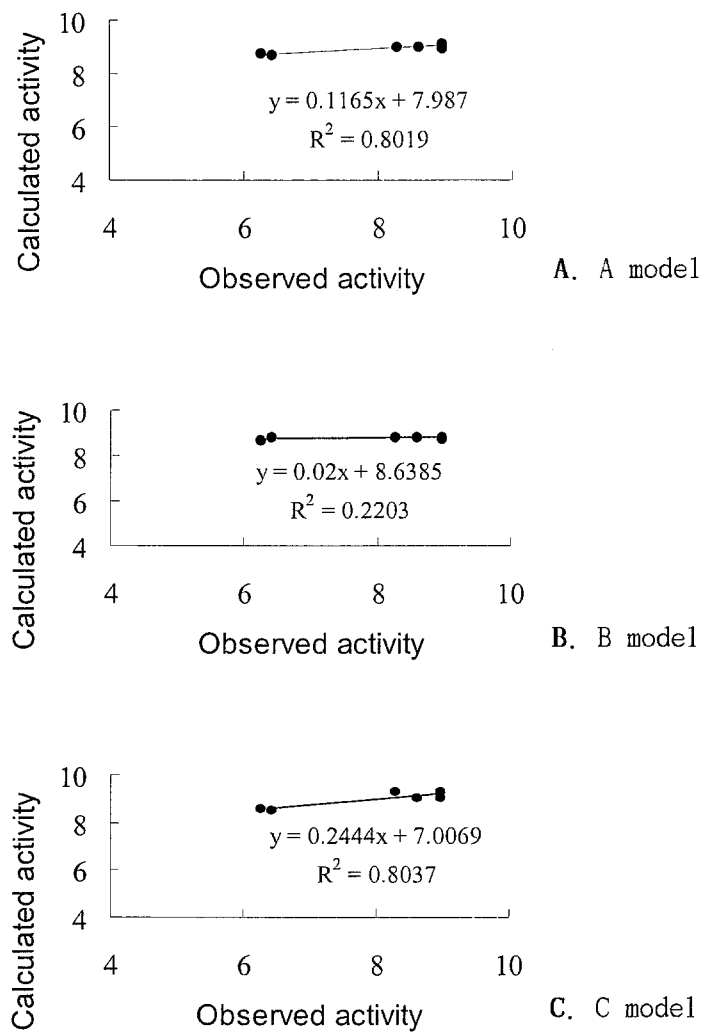


Figure 53. The predicting ability of three models (X axis : the experimental $-\log IC_{50}$ vs Y axis : the predicted $-\log IC_{50}$).

부가적으로 합성한 6개의 화합물을 포함해 38개의 화합물의 CoMFA 분석 결과 2개의 화합물을 제거한 후 cross-validated r^2 값이 0.788로 전에 세 모델에 비해 상당히 향상되었다. 최종 모델은 region focusing을 한 후 2개의 outlier를 제거한 모델로 4개의 component를 사용하여 통계분석 한 결과 r^2 값이 0.964, F 값이 201.66, 표준 편차가 0.127, 상대적인 입체장과 정전기장의 기여도가 50.8대 49.1로 정전기장의 기여도가 증가하였다 (Table 22 모델 D). 최종 CoMFA map은 C 모델과 유사하나 regioisomer의 첨가로 imidazole ring의 5번 치환체 위치에 크기가 작은 그룹이 치환될수록 활성이 증가한다는 것을 보여 준다 (Figure 51 bottom right).

실제로 DuP-753의 경우 imidazole ring의 4, 5번 위치 (KR 화합물의 5, 6번 위치에 해당)는 수용체의 결합에 필수적인 부위는 아니며, 5번 위치에 hydroxymethyl, carboxaldehyde, carboxamide 그룹 같은 수소 결합 받게 치환체나 carboxylic 그룹이 활성에 중요하다는 실험 결과를 얻었다¹⁴⁶⁾. 또한 AII 수용체와 DuP-753의 docking 모델에서는 imidazole ring의 5번 위치가 AII 수용체의 3번째 α -helix의 Ser 107의 위치와 근접하고 있어서 subtype의 선택성을 보인다¹⁴⁷⁻¹⁴⁸⁾. 수소 결합 장을 사용하여 CoMFA 분석을 한 결과 cross-validated r^2 값이 0.454 (r^2 값이 0.924)로 낮은 예측 능력을 보였으나, imidazole ring의 5번 위치에 수소 결합 받게 그룹이 있으면 활성이 증가한다는 map 결과는 DuP-753의 SAR과 docking 모델의 결과와 일치한다.

따라서 pyridylimidazole 유도체의 CoMFA 분석은 AII 수용체의 길항제 활성에 imidazole ring의 5, 6번 위치의 치환체에 대한 구조 정보를 제공함으로써, 구조와 활성간의 관계를 이해하는데 효과적으로 분석할 수 있었다.

(2) Benzofuran series

Benzofuran 유도체는 benzofuran ring을 중심으로 imidazole과 phenyltetrazole ring의 여러 종류의 치환체 이성질체 합성이 가능하므로, 다양한 3차 구조를 발생할 수 있다. 따라서 구조와 활성간의 분석에 유용한 정보를 제공할 것으로 예상된다. QSAR에 사용된 구조는 치환체 이성질체인 경우 (Table 3) random search에서 얻은 가장 낮은 에너지 구조를 사용했으며, imidazole ring의 4

번 위치에 구조 변형을 시킨 유도체인 경우 (Table 4) 치환체의 크기가 증가할수록 tetrazole과의 수소 결합을 형성하는 형태가 열역학 적으로 유리했으므로 가장 낮은 에너지의 구조를 사용하지 않고 가장 활성 있는 KR31371과 4번 치환체를 제외한 공통된 구조를 선택하여 사용하였다.

QSAR 분석은 30개 이상의 표현 인자와 활성간의 다중 회귀 분석 방법을 사용하여 어떤 설명 인자가 활성에 중요한지를 분석한 2D-QSAR과 3차원 공간에서 격자 원자와의 정전기장과 입체장 크기를 설명 인자로 사용한 CoMFA 방법인 3D-QSAR을 분석 방법으로 사용하였다.

먼저 2D-QSAR에 사용된 설명 인자는 정전기적 설명 인자인 원자 분극성의 합 (sum of atomic polarizabilities, Apol), 쌍극자 모멘트 (dipole moment, DP), 공간 설명 인자로 선회 반경 (radius of gyration, Rad. of Gyration), 분자 표면적 (molecular surface area, Area), 밀도 (density), 관성 모멘트 (principle moment of inertia, PMI), 분자의 부피 (molecular volume), 구조 설명 인자로 분자량 (molecular weight, MW), 회전각의 수 (number of rotatable bonds, Rotl. bond), 수소 결합 받개의 수 (number of H-bond acceptor, H-bond acceptor), 수소 결합 주개의 수 (number of H-bond donor, H-bond donor), 열역학적인 설명인자로 logP (AlogP), 분자의 굴절도 (molecular refractivity, MolRef)를 계산하였다 (Table 23).

분자 모양 설명인자로써 분자의 에너지 (energy), conformational search에서 계산된 가장 낮은 에너지 (the lowest energy conformer), 에너지 페널티 (conformational energy penalty), 분자간의 서로 다른 부피 (difference volume, DIFFV), 공통된 겹침 입체 부피 (common overlap steric volume, COSV), 공통된 겹침 부피 (공통된 겹침 입체 부피를 각각의 분자의 부피로 나눈 값, F₀), 비공통된 겹침 입체 부피 (non-common overlap steric volume, NCOSV), 비교물질인 GR117289와의 형태 rms 차이 (rms to shape reference of GR117289, ShapeRMS), 비교물질인 GR117289의 부피 (shape reference volume), tetrazole과 imidazole ring의 질소 원자와의 거리 (Tet_N), tetrazole과 imidazole ring의 4번 치환체에서 산소와의 거리 (Tet₀)를 계산하였다 (Table 24).

Table 25은 2D-QSAR의 최종 결과를 정리했으며, 단순 선형 회귀 분석으로 30개의 설명인자를 순차적으로 분석하여 활성에 영향이 큰 설명인자를 순서대로 분석

하였다. Benzofuran 유도체의 AII 길항제로써 활성에 영향을 미치는 설명 인자는 주로 분자 모양에 대한 설명 인자로 COSV, ShapeRMS, F_0 , NCOSV의 r^2 값이 0.72, 0.72, 0.71, 0.68로 중요한 설명 인자로 분석된다. 그러나 $\log P$ (r^2 : 0.00045)와 분자량 (r^2 : 0.0006)은 활성과 낮은 상관 관계를 가진다. 단계적인 다중 회귀 분석에서는 COSV와 ShapeRMS가 중요한 설명인자로 분석되며, r^2 값이 0.86이다. 특히 ShapeRMS는 활성 있는 Glaxo 화합물인 GR117289와의 3차 구조에서의 rms의 차이를 나타낸 것으로 계수가 -0.704663으로 rms 차이가 클수록 활성이 감소된다. 유전자 기능 추정법은 우성인 변수만 다음 세대에 살아 남아 최종적으로 활성과 관련이 큰 변수만 살아남는데, **Figure 54**은 초기에 30개의 설명 인자로 시작하여 변이 과정에서 활성에 영향이 큰 변수의 증가를 보여주며, COSV, F_0 , RadOfGyration, ShapeRMS, Tet_N이 우성인 설명인자로 사용 빈도가 증가한다. 유전자 기능 추정법으로 얻은 최종 선형 회귀 분석식의 r^2 값은 0.86이며, 단계적인 다중 선형 회귀 분석법에서 나온 식과 유사하다. 활성에 영향을 미치는 설명 인자는 COSV와 ShapeRMS로 ShapeRMS의 계수는 -0.704663으로 rms 차이와 활성은 반비례한다. 즉 활성 있는 GR117289와의 3차 구조의 차이는 활성을 감소시킨다는 것을 알 수 있다. 따라서 2D-QSAR의 분석으로 AII 길항제의 활성에 분자의 3차 구조가 중요한 역할을 한다는 것을 보여주고 있다.

Table 23. The calculated descriptors of benzofuran derivatives for classical QSAR

KR #	Activity -log(I _{C50})	Apol	DP mag.	DP-X	DP-Y	DP-Z	Rad. of Gyration	Area	Mw	Vm
31271	6.37	18701.06	9.06	1.80	-2.08	8.64	4.49	504.79	462.94	399.51
31272	7.55	18701.06	9.32	2.46	0.68	8.97	4.28	499.30	462.94	399.24
31273	7.49	18678.84	10.36	-2.62	-4.02	9.18	4.28	520.42	541.84	417.34
31274	5.82	18701.06	8.68	8.51	0.25	-1.68	3.83	499.92	462.94	399.49
31275	5.91	18701.06	10.03	-3.09	2.62	9.18	4.60	492.12	462.94	398.67
31276	4.75	18701.07	11.46	-7.22	8.05	3.79	3.83	508.01	462.94	399.40
31277	4.79	18678.84	10.42	8.13	-6.49	-0.59	3.87	522.19	541.84	417.43
31278	6.52	18678.84	12.52	-3.72	-5.45	10.63	4.64	523.75	541.84	418.11
31279	6.24	18678.84	12.10	1.66	-1.90	11.84	4.64	519.31	541.84	417.41
31280	5.39	18678.84	10.80	-9.95	3.82	1.71	3.81	526.39	541.84	417.41
31364	7.30	21522.88	8.16	2.97	1.64	7.42	4.26	588.40	531.01	462.46
31365	7.49	20694.98	9.78	3.14	3.94	8.39	4.67	568.90	519.00	452.59
31366	7.20	20181.72	8.86	3.56	1.57	7.96	4.39	543.45	504.97	435.42
31367	6.66	20496.36	8.79	3.01	3.81	7.33	4.35	541.57	502.96	429.30
31368	7.56	20042.22	7.53	2.13	1.62	7.04	4.47	543.39	488.97	427.49
31369	7.30	19727.58	8.84	0.19	5.13	7.19	4.60	553.07	490.99	433.16
31371	7.75	19214.32	9.39	1.82	4.85	7.83	4.30	521.12	476.96	415.90

KR #	Density	PMI-Mag.	PMI-X	PMI-Y	PMI-Z	Rotl. bond	Hbond acceptor	Hbond donor	AlogP	MolRef
31271	1.16	1859.97	439.20	1224.51	1329.35	9	3	2	6.11	126.80
31272	1.16	1539.09	478.45	1008.91	1059.23	9	3	2	5.98	127.32
31273	1.30	1893.48	702.13	1105.28	1367.72	9	4	2	7.16	135.79
31274	1.16	1130.45	607.90	640.96	705.38	9	3	2	5.98	127.32
31275	1.16	2150.84	318.02	1429.51	1575.27	9	3	2	6.13	126.82
31276	1.16	1138.59	487.95	674.19	777.01	9	3	2	6.13	126.80
31277	1.30	1661.57	635.18	1066.08	1104.91	9	4	2	7.16	135.79
31278	1.29	2365.89	397.91	1549.08	1743.40	9	4	2	6.92	134.42
31279	1.30	2136.19	425.55	1429.57	1529.26	9	4	2	6.92	134.42
31280	1.30	1470.90	666.85	854.95	993.95	9	4	2	6.92	134.42
31364	1.15	1720.67	633.05	1056.01	1202.01	11	4	1	7.36	147.25
31365	1.15	1985.78	695.81	1235.75	1389.99	11	4	1	6.35	141.28
31366	1.16	1842.97	557.65	1135.59	1340.14	11	4	2	6.32	136.51
31367	1.17	1786.58	585.39	1076.50	1300.13	10	4	2	6.99	137.74
31368	1.14	1700.80	593.78	1093.72	1159.28	10	3	2	6.76	137.79
31369	1.13	1832.37	485.84	1229.83	1268.49	11	3	2	6.41	136.78
31371	1.15	1564.35	519.69	1033.72	1052.87	10	3	2	6.16	132.02

l (sum of atomic polarizabilities), DP (dipole moment), Rad. of Gyration (radius of gyration), Area (Molecular surface area), MW (molecular weight), V (molecular volume), PMI (principal moment of inertia), Rotl. bond (number of rotatable bonds), H-bond acceptor (number of H-bond acceptor), H-bond donor, AlogP (log of partition coefficients), MolRef (molecular refractivity).

Table 24. The molecular shape descriptors for benzofuran derivatives

KR #	Activity -log(IC ₅₀)	Energy	LowE	EPenalty	DIFFV	COSV	F ₀	NCOSV	ShapeRMS	SRVol	Tet_N	Tet_O
31271	6.37	161.79	161.79	1.53E-06	10.78	210.07	0.53	189.05	1.56	388.34	8.01	9.94
31272	7.55	160.40	160.40	-6.07E-06	10.74	350.29	0.88	48.78	0.11	388.34	6.31	9.08
31273	7.49	158.63	158.63	-4.86E-07	28.61	291.74	0.70	125.21	0.65	388.34	6.30	9.06
31274	5.82	160.66	160.66	4.88E-06	10.84	239.95	0.60	159.24	1.26	388.34	4.59	4.12
31275	5.91	160.67	160.67	-5.31E-06	10.61	205.92	0.52	193.03	1.43	388.34	9.45	8.98
31276	4.75	164.79	164.79	-1.43E-06	10.69	137.71	0.34	261.31	1.40	388.34	4.54	3.84
31277	4.79	158.26	158.26	5.84E-06	29.44	218.02	0.52	199.76	1.48	388.34	4.65	4.13
31278	6.52	164.55	164.55	-3.82E-06	29.41	238.23	0.57	179.52	1.68	388.34	8.86	10.54
31279	6.24	164.83	164.83	8.69E-07	28.57	188.43	0.45	228.48	1.60	388.34	8.05	10.36
31280	5.39	168.59	168.59	5.61E-06	29.26	136.51	0.33	281.09	1.40	388.34	4.54	3.82
31364	7.30	159.07	159.07	4.58E-07	74.57	347.94	0.75	114.96	0.15	388.34	6.45	7.22
31365	7.49	151.83	151.83	5.18E-07	64.14	379.53	0.84	72.94	0.02	388.34	6.28	9.15
31366	7.20	143.48	143.48	2.72E-06	47.45	266.47	0.61	169.32	1.19	388.34	6.83	6.99
31367	6.66	154.25	154.25	7.48E-06	41.38	272.25	0.63	157.47	1.01	388.34	7.15	5.40
31368	7.56	161.62	161.62	-2.74E-06	38.43	349.78	0.82	76.99	0.13	388.34	6.28	9.60
31369	7.30	157.67	157.67	-2.74E-06	45.00	350.26	0.81	83.08	0.41	388.34	6.30	9.56
31371	7.75	156.34	156.34	3.59E-06	26.80	388.34	0.94	26.80	0.00	388.34	6.32	6.77

* Abbreviations : LowE (lowest energy conformer), EPenalty (conformational energy penalty), DIFFV (difference volume), COSV (common overlap steric volume), F₀ (common overlap volume), NCOSV (non-common overlap steric volume), ShapeRMS (rms to shape reference, GR117289), SRVol (shape reference volume).

Table 25. The results of 2D-QSAR

Simple linear regression			
Equation	r ²	F-test	
1. 3.8141 + 0.010387 * COSV	0.72	39.54	
2. 7.42564 - 0.865716 * ShapeRMS	0.72	33.86	
3. 3.67939 + 4.5946 * Fo	0.71	36.07	
4. 8.30982 - 0.011275 * NCOSV	0.68	32.23	
5. -2.23584 + 2.0381 * RadOfGyration	0.38	9.36	
6. 5.94964 + 0.45609 * Dipole-Z	0.37	8.93	
7. 4.76075 + 0.242425 * Tet_O	0.37	8.68	
8. 0.081287 + 0.67505 * Rotlbonds	0.35	8.05	
9. -4.08169 + 0.00055197 * Apol	0.27	5.43	
10. 6.29416 - 0.26356 * Dipole-X	0.24	4.67	
11. 5.79084 + 0.024909 * DIFFV	0.23	4.51	
12. -3.8638 + 0.024909 * Vm	0.23	4.51	
13. 4.50045 + 0.624581 * Dipole-mag	0.22	4.18	
14. -2.12195 + 0.016469 * Area	0.18	3.25	
15. -2.89964 + 0.070805 * MolRef	0.17	3.07	
16. 13.4626 - 5.73927 * Density	0.16	2.81	
17. 5.08447 + 0.0013501 * PMI-Y	0.12	2.00	
18. 4.79974 + 0.001008 * PMI-mag	0.11	1.89	
19. 5.1079 + 0.0011763 * PMI-Z	0.09	1.56	
20. 8.30333 - 0.908333 * Hbond donor	0.09	1.55	
21. 5.30914 + 0.196869 * Tet_N	0.09	1.42	
22. 6.49361 + 0.122114 * Dipole-Y	0.05	0.78	
23. 5.97335 + 0.0011513 * PMI-X	0.02	0.26	
24. 6.81167 - 0.061806 * Hbond acceptor	0.001	0.02	
25. 6.9498 - 0.0007093 * MW	0.0006	0.01	
26. 6.88951 - 0.045018 * AlogP	0.00045	0.01	
Stepwise multiple linear regression			
1. Activity = 4.61592 + 0.0099212 * COSV - 0.704663 * ShapeRMS			
"r ² "	"F-test"	"XV r ² "	"BS r ² " "BS r ² Error" "Outliers"
0.86	42.73	0.77	0.86 0.004 2
Genetic Function Approximation			
Equation	LOF	r ²	F-test
1. 4.61592 + 0.009921 * COSV - 0.704663 * ShapeRMS	0.22	0.86	42.73
2. 2.14014 + 0.010729 * COSV + 0.242552 * Tet_N	0.23	0.85	41.32
3. -1.60105 + 1.3168 * RadOfGyration + 3.92588 * Fo	0.23	0.85	40.20
4. -1.1037 + 0.00884 * COSV + 1.23073 * RadOfGyration	0.23	0.85	39.35
5. 4.4931 - 0.712719 * ShapeRMS + 4.39175 * Fo	0.24	0.84	37.81
6. 3.11243 + 0.008916 * COSV + 0.144871 * Tet_O	0.25	0.84	37.11
7. 2.15819 + 1.3621 * RadOfGyration - 0.009627 * NCOSV	0.25	0.84	36.59
8. 1.99896 + 4.74962 * Fo + 0.242505 * Tet_N	0.25	0.84	35.78
9. 1.92779 + 0.001339 * PMI-Z + 4.68928 * Fo	0.27	0.83	33.70
10. 8.93639 - 0.727129 * ShapeRMS - 0.0108 * NCOSV	0.27	0.83	33.17

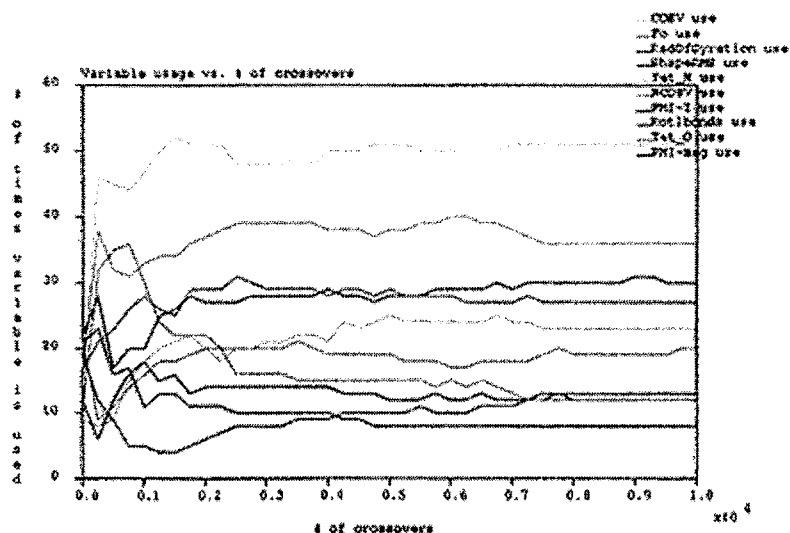


Figure 54. The plot of variables usage versus number of crossovers. The order of variables in top right shows the frequency of descriptor when evolving random initial models using a genetic algorithms.

세 자리 활성 데이터 변수를 보이는 17개 화합물 (Table 3, 4)의 3D-QSAR을 하기 위하여 원자-원자 맞추기 (atom-by-atom fitting) 방법으로 일련의 통계 화합물의 전체 구조를 정렬 시켰다. 가장 활성 있는 화합물인 KR31371을 비교 분자로 선정하여 imidazole ring의 질소 원자와 중간 벤젠 고리의 중심, tetrazole ring의 중심을 대상 분자와 fitting 시켰다. 격자 원자를 carbon atom (C_3^+)으로 선정하여 삼차원 공간에 일정한 간격으로 놓여 있는 격자 원자와의 정전기장과 입체장과의 CoMFA field를 계산한 후, PLS 통계 분석을 통하여 outlier를 제거하여 r^2 값이 가장 높은 모델을 선정하였다.

Table 26에 17개 화합물의 CoMFA 분석 결과를 정리했으며, 최종 cross-validated r^2 값이 0.869, 최적의 component 수가 2, r^2 값이 0.974로 나타났으며 (모델 A), region focusing한 후 (모델 B) cross-validated r^2 값이 0.881로 향상되었다. 활성에 기여하는 입체장과 정전기장의 기여도는 51.2 : 48.8로 나타났다. CoMFA map은 benzofuran ring을 중심으로 다양한 치환체 이성질체 구조로 입체적으로 장애가 되는 영역이 map으로 나타났으며, 부틸 잔기 주변에는 친지질성 성질을 갖는 구조가 활성에 요구된다. 정전기장에 대한 map에서는 tetrazole 부분

에 음이온 전하를 요구하는 map과 말단 벤젠 고리에 양이온 전하를 요구하는 map을 보인다 (Figure 55). 이런 CoMFA 결과는 기존에 알려진 AII antagonist의 pharmacophore의 결과와 일치하며¹⁴⁹⁾, 수용체와 결합하는 부위에 대한 유용한 정보를 제공해 준다.

Table 26. Summary of CoMFA-PLS results

	Model A	Model B
Cross-validated r^2	0.87	0.88
The number of component	2	2
Conventional r^2	0.97	0.97
Standard error of estimate	0.16	0.16
F values	221.91	214.60
Region focusing	O	X
Relative contributions		
Steric	49.7	51.2
Electrostatic	50.3	48.8

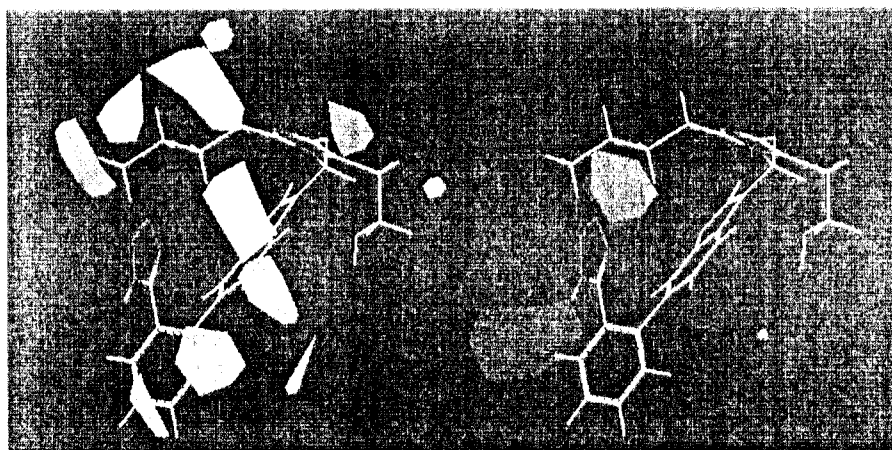


Figure 55. The CoMFA contour maps of benzofuran series. (Left) steric contour : For steric contours increased binding results from placing bulkier group near green and less bulkier group near yellow. (Right) electrostatic contour: For electrostatic contours increased binding results from placing more positive (+) charge near blue and negative (-) charge near red. The most active compounds KR31371 in benzofuran series is shown.

다. AII 수용체의 길항제의 3D-search

AII 길항제 개발에 DuP-753 (Losartan)이 가장 앞선 화합물이긴 하나 약효가 다소 떨어지는 점과 대사물에 의해 약효가 얻어지는 결점을 가지고 있다. DuP-753이 개발됨에 따라 이것을 lead compound로 하여 세계 여러 회사에서 수많은 후보 물질을 발표하였으며 그 중 대표적인 것들이 제 2세대로 불릴 수 있는 L-158,809 (Merk), CV-11194 (Takeda) 등이며 이밖에도 Exp 3174 (DuPont), GR117289 (Glaxo), SKF108566 (Beecharm) 등이 보고되어 있으며, 아직까지도 Losartan 같은 이미다졸 유도체로써 AII 길항제 개발은 초기 단계이며 활발한 연구가 진행되고 있다. KR31080 화합물의 imidazole 부분은 angiotensin II의 His의 imidazole part, 테트라졸 음이온 부분은 angiotensin II의 카르복실 말단 잔기인 Phe의 카르복실기, 친지질성 부틸 잔기는 Ile 결사슬의 구조와 유사한 겹침을 가지므로 AII 수용체에 우수한 결합력을 보인다.

AII 수용체 길항제의 pharmacophore 분석을 위해 기존에 알려진 화합물 중에서 활성이 뛰어난 화합물을 선택하였으며, 공통된 구조를 분석하는데 효율을 증가시키기 위해 구조적으로 제한된 거대 원형 화합물의 구조를 포함하여 에너지가 3 kcal 내에서 공통된 구조를 선택하였다 (Figure 56). DISCO 분석으로 나온 공통된 구조는 구조 분석 결과와 마찬가지로 tetrazole이 imidazole ring과 같은 배향인 type I과 반대 방향인 type II의 두 가지 그룹으로 분석되며, 활성에 영향을 주는 pharmacophore는 imidazole ring의 질소 원자, 말단의 벤젠 ring, tetrazole ring이 각각 소수성 그룹을 포함한 수소 결합 주거나 받게, 소수성 기, 음이온 기로 0.5 Å 허용 범위 내에서 거리 제한을 만족시키는 구조를 찾았다 (Figure 57). 그러나 기존에 알려진 pharmacophore 중 친지질성인 부틸 잔기는 부틸 잔기의 유동성으로 찾지 못했다.

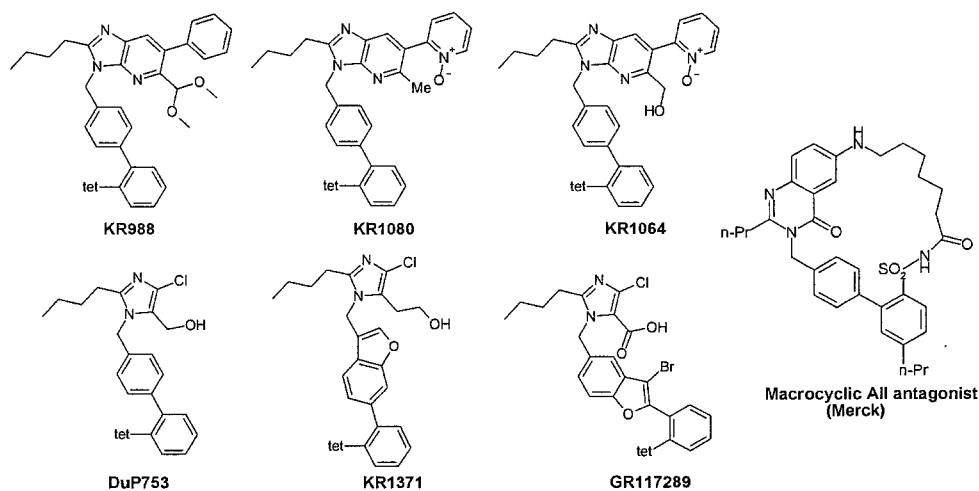


Figure 56. The structures of biologically active nonpeptidic AII antagonists used for DISCO analysis. Tet is tetrazole group.

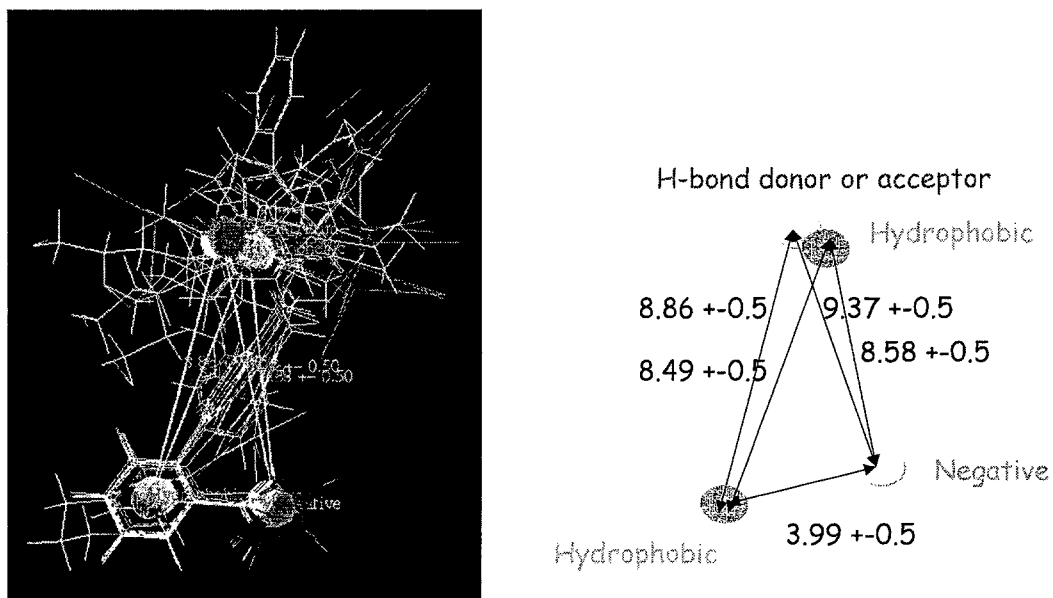


Figure 57. Pharmacophoric features of AII antagonist through DISCO analysis.

DISCO 분석을 통해 얻은 pharmacophore의 거리 제한을 search 조건으로 설정하여 소형 유기 분자의 DB로 구성된 NCI와 Maybridge DB를 사용하여 3D-search를 수행한 결과, 기존의 biphenyltetrazole과 benzofuran과 다른 구조가 각각 125개, 174개의 새로운 화합물을 얻었다 (Figure 58). 따라서 3D-search는 AII 길항제의 새로운 선도 물질을 설계하는데 유용한 도구로 사용될 것으로 예상된다.

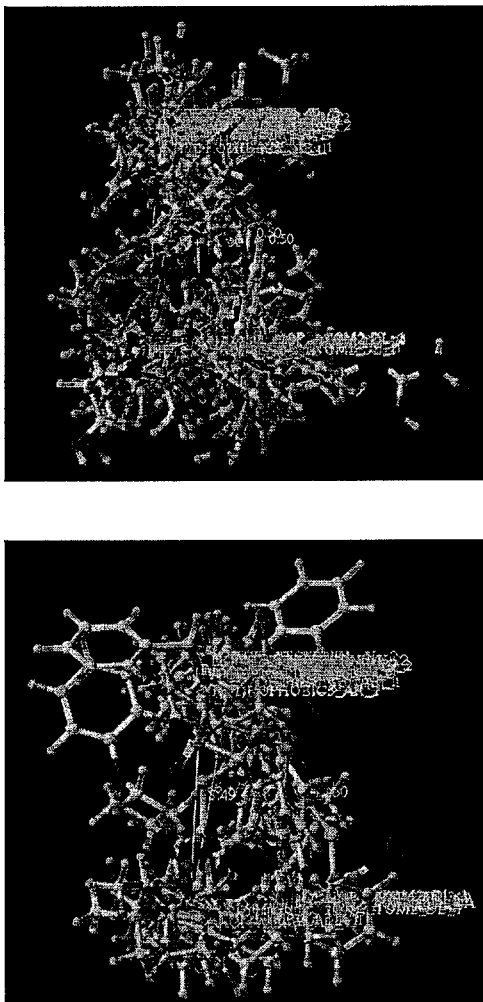


Figure 58. The result of 3D-flexible search of nonpeptidic AII antagonists with distance constraints from DISCO analysis. The number of compounds from NCI DB (top) and Maybridge DB (bottom) is 125 and 141, respectively.

2. 칼륨통로 활성화제

가. 칼륨 통로 활성화제의 구조

BMS 회사에서 수년간 연구된 칼륨 통로 활성화제의 SAR 결과는 Figure 59에 정리하였다. Benzopyran ring은 항-허혈 활성화와 심장 선택성에 필수적인 구조는 아니며, benzopyran 유도체의 구조에서 benzopyran ring의 6번째 치환체에 전자를 잡아당기는 그룹이 있으면 활성이 증가하며, benzopyran ring의 산소 원자나 3번 치환체에 히드록시기는 활성화에 꼭 필요한 것은 아니다. 또한 benzopyran ring의 2번 치환체에 친지질성 성질을 갖는 기능이 오면 활성이 증가된다. Cyanoquanidine 그룹은 urea나 thiourea같은 유사 성질을 갖는 다른 그룹으로 대체해도 활성이 유지되며, benzene ring은 심장 선택적인 화합물을 만드는데 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 또한 혈관 확장제에서는 입체 선택성이 영향이 없으나, 항-허혈 활성화에는 3S, 4R의 광학 이성질체가 활성이 더 크다.

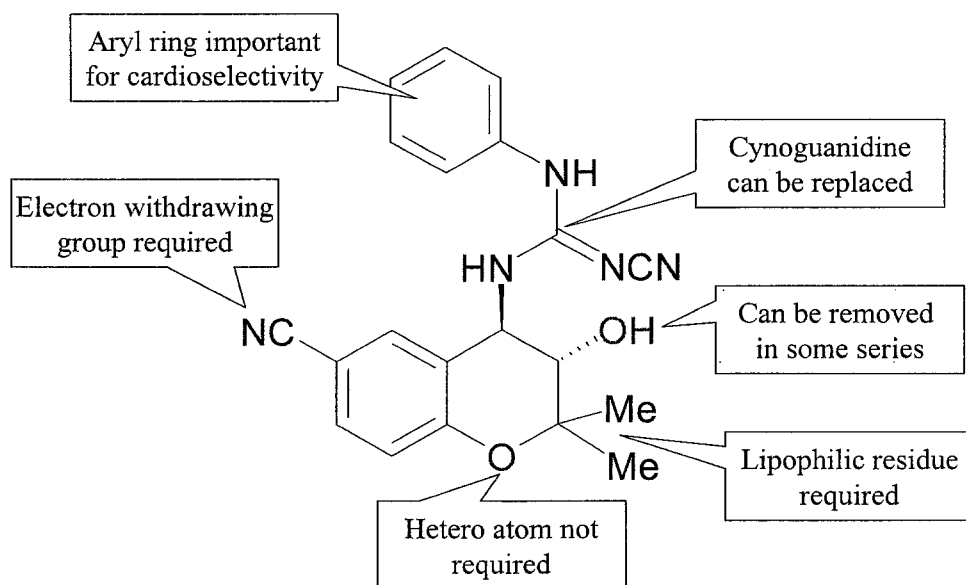


Figure 59. The structure-activity relationships for anti-ischemic potency of the lead benzopyranyl cyanoguanidine.

칼륨 통로 활성화제의 구조 분석에 사용된 방법은 회전 가능한 이면각이 10개

이상이므로 120 ° 간격으로 회전시킨 grid search와 무작위로 회전시킨 random search 방법을 사용하였다. 먼저 grid search는 총 26,244개의 구조를 얻어서 constraint를 제거하고 다시 최적화 하여 최종적으로 얻은 가장 낮은 에너지는 -3.71 kcal/mol을 얻었다. Random search는 10,000번 무작위로 구조를 변형시켜 661개의 구조를 1차적으로 얻었으며, 가장 낮은 에너지의 구조를 초기 구조로 선정하여 다시 10,000번 무작위 변형시켜 얻은 703개의 구조에서 얻은 가장 낮은 에너지는 grid search 결과에 비해 1 kcal/mol 낮은 -4.72 kcal/mol이다. **Figure 60**은 각각의 결과로부터의 낮은 에너지의 구조이며, cyano 기의 배향에서만 차이를 보이고 있다. 또한 random search로 계산하는 것이 grid search에 비해 계산 시간이 10 배 감소되었으면서도 더 낮은 에너지의 구조를 얻었으므로 일련의 동계의 칼륨 통로 활성화제의 구조 분석에는 random search를 사용하여 구조를 얻었다. 분자 역학으로 계산한 구조는 두 벤젠 고리가 π - π stacking으로 안정화되며, 3번 치환체의 히드록시기와 2번 치환체의 아세탈기가 수소 결합을 이룬다.

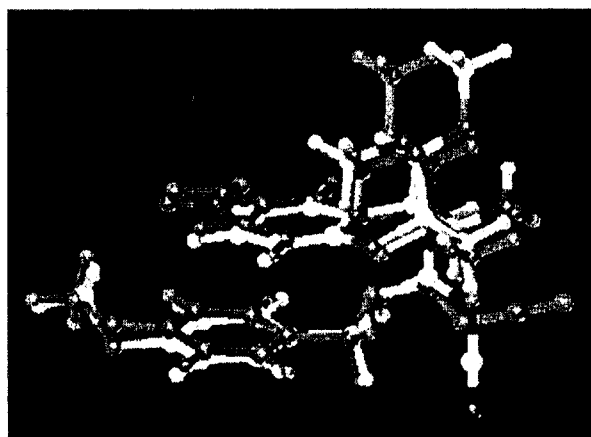


Figure 60. The superimposition of calculated structure of KR31343 from grid and random search. Grid search (white, 10 torsion angles, $3^8 \times 2^2 = 26,244$ conformations, the lowest E : -3.71 kcal/mol), Random search (11 torsion angles, 661 conformations, the lowest E : -4.72 kcal/mol).

다양한 구조를 가지는 ATP 농도에 의존하는 칼륨 통로 활성화제의 구조적인 특성을 알아보기 위해서, benzopyran ring을 포함한 phenylcyanoguanidine (KR31373), 비선형 phenylcyanoguanidine (KR31438), 4-fluorophenylester

(KR31496), phenylimidazole (KR315106) 유도체를 합성하여, NMR 분석으로 거리 정보를 얻었다. Table 27 - 30은 2D-COSY와 NOESY의 cross peak 분석으로 각각의 proton을 지정하였다.

Table 27. The resonance assignment of KR31373 from 2D-COSY and 2D-NOESY (600 MHz, mixing time:400ms, solvent:CDCl₃, 25 °C)

Proton number	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	The number of protons
1	1.33	1	3
2	3.50	1	3
3	3.55	1	3
4	4.13	2	2
5	4.38	4	1
5'	4.37	1	1
6	4.49	4	1
7	4.80	1	1
8	6.20	1	1
9	6.69	1	1
10	6.79	2	1
11	7.27	3	1
12	7.31	peak overlap	2
13	7.33	peak overlap	2
14	8.06	2	1
15	8.25	1	1

Table 28. The resonance assignment of KR31438 from 2D-COSY and 2D-NOESY (600 MHz, mixing time:400ms, solvent:CDCl₃, 25 °C)

Proton number	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	The number of protons
1	1.24	3	3
2	1.55	2	2
3	3.81	1	3
4	4.14	multiplet	3
5	4.52, 4.60	4, 4	2
6	4.86	4	1
7	5.52	1	1
8	6.74	2	1
9	6.93	2	2
10	7.11	1	1
11	7.19	2	2
12	8.14	peak overlap	1
13	8.17	1	1

Table 29. The resonance assignment of KR31496 from 2D-COSY and 2D-NOESY (600 MHz, mixing time:400ms, solvent:CDCl₃, 25 °C)

Proton number	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	The number of protons
1	1.29	3	3
2	1.43	1	3
3	3.60	1	3
4	3.64	1	3
5	4.07	1	1
6	4.08	2	1
7	4.25	4	2
8	4.57	1	1
9	4.64	1	1
10	4.96	1	1
11	6.80	1	2
12	6.97	3	2
13	7.05	2	1
14	8.02	1	1
15	8.07	2	1
16	3.75	4	1

Table 30. The resonance assignment of KR31506 from 2D-COSY and 2D-NOESY (600 MHz, mixing time:400ms, solvent:CDCl₃, 25 °C)

Proton number	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	The number of protons
1	1.63	1	3
2	3.51	1	3
3	3.55	1	3
4	3.98	1	1
5	4.31	1	3
5'	4.31	1	1
6	4.76	1	1
7	4.88	2	1
8	5.51	1	1
9	5.67	1	1
10	6.79	3	1
11	6.90	1	2
12	6.94	2	1
13	7.21	3	2
14	8.02	1	1
15	8.04	2	1

Figure 61는 2D-COSY와 NOESY의 실험으로부터 나온 cross-peaks이다. KR31373의 1번과 4번 proton의 NOE, KR31496의 2번과 10번의 NOE, 5번과 8번의 NOE, KR31506의 1번과 4번의 NOE, 6번과 9번, 3번과 9번의 NOE로 benzopyran ring의 키랄성을 확인하였다. 따라서 KR31373은 2S3S4R, KR31496은 2R3R4S, KR31506은 2S3R4S이다. 분자 역학으로부터 계산된 구조는 benzopyran에 연결된 벤젠과 cyanoguanidine 기에 연결된 벤젠 고리 사이의 거리가 5 Å이내이므로 NOE가 관찰이 되어야하나, NOE 분석에서는 보이지 않으므로 용액에서의 구조와 계산된 구조와는 다를 것으로 사료된다. KR31496과 KR31506의 ester와 imidazole ring에 연결된 methylene proton과 benzopyran ring의 proton과 약한 NOE를 보이므로 KR31496의 ester와 KR31506의 imidazole이 benzopyran ring의 nitro와 같은 배향을 하고 있을 가능성을 시사한다. 또한 KR31496과 KR31506은 2번 탄소의 키랄성이 다르므로 아세탈 그룹이 가지는 NOE를 제외하고는 동일한 NOE pattern을 보이므로 3차 구조에서 유사할 것으로 보인다. **Figure 62**은 KR31496의 결정 구조와 MOPAC으로 계산

된 구조와 NMR로부터의 NOE를 비교한 것이다. 세 구조는 각각 다르며, 결정 구조에서는 ester의 산소 원자와 3번 치환체의 히드록시기와 수소 결합을 이루고 있으며 ester와 nitro가 반대 방향이나, 계산된 구조에서는 benzopyran ring의 아세탈 그룹과 히드록시기가 수소 결합을 이루고 있고 ester와 nitro가 같은 방향이다 (Figure 63). 그러나 결정 구조를 초기 구조로 MOPAC 계산을 하였을 때, 생성열이 3 kcal 정도 높은 구조였다.

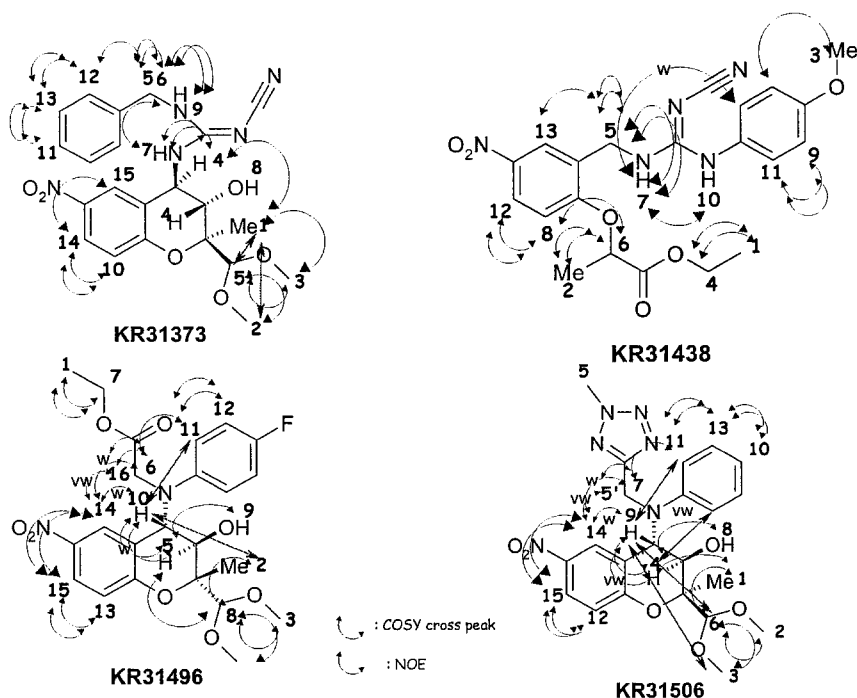


Figure 61. The atomic numbers and cross peaks from 2D-COSY and 2D-NOESY experiments. "w" means weak NOEs and "vw" means very weak NOEs.

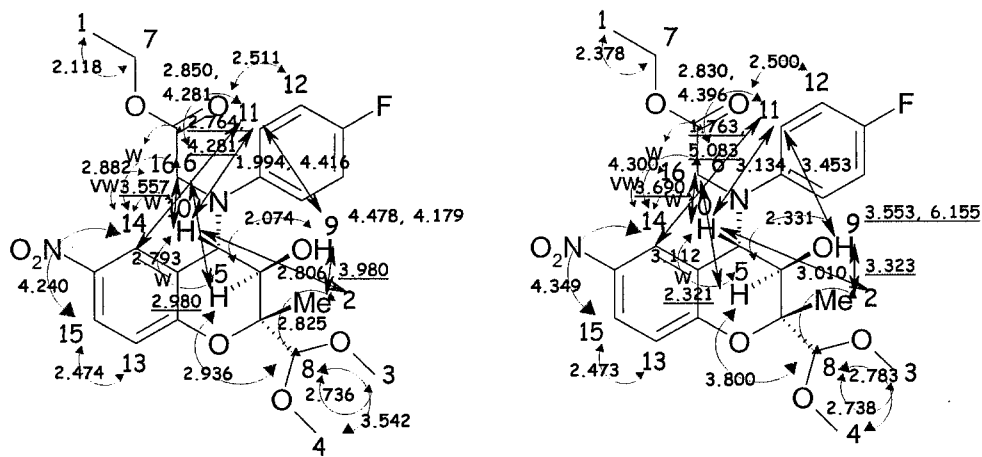


Figure 62. The comparison of distances between NMR pseudo atoms with their NOEs from 2D-NOESY experiments. (Left) X-ray structure, (Right) optimized structure by MOPAC calculation of KR31496. The distances underlined show the difference from the result of NOEs.

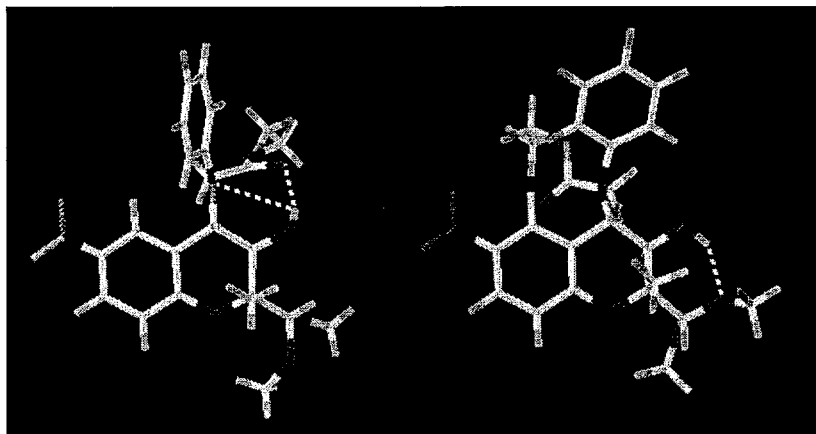


Figure 63. X-ray structure (Left, HF : -242.37 kcal, H-bonding between OH and O : 2.17 Å, 157.76 °) and MO optimized structure (Right, HF : -245.53 kcal, H-bonding between OH and O : 1.85 Å, 144.12 °) of KR31496.

나. 칼륨 통로 활성화제의 QSAR

칼륨 통로 활성화제의 QSAR 분석을 위해 사용된 화합물은 BMS 화합물의 총 115

개 화합물 중 생리 활성 데이터가 사용 가능한 56개의 화합물 (Table 5 - 13)을 선정하여 사용하였다. 항-허혈 활성의 데이터인 EC₂₅와 혈관 확장제의 활성을 나타내는 IC₅₀ 값을 각각 QSAR에 사용했으며, IC₅₀ 값을 EC₂₅로 나눈 값을 심장 선택성에 대한 정도로 QSAR에 사용하였다. 항-허혈 활성과 혈관 확장제와의 상관 관계를 그래프로 그렸을 때 (Figure 64), 서로 상관 관계가 전혀 없으므로 ($r^2 : 0.0495$) 각각의 활성에 미치는 구조와 활성간의 관계는 다를 것으로 예상된다.

Random search로 계산된 56개 화합물의 겹침 구조 (Figure 65)는 공통된 benzopyran ring을 중심으로 cyanoguanidine에 연결된 벤젠 ring의 배열이 잘 일치하며 benzopyran ring을 포함하지 않은 비선형 phenylcyanoguanidine 유도체의 구조에서도 공통된 형태를 갖는다. 일련의 동계 화합물의 겹침은 benzopyran ring의 6번 탄소와 4번 위치에 연결된 질소 원자, cyanoguanidine에 연결된 벤젠 ring의 중심을 fitting 시켰다.

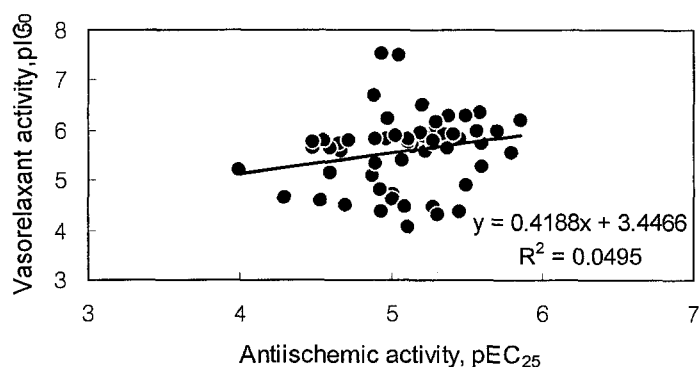


Figure 64. Vasorelaxant activity vs anti-ischemic activity.

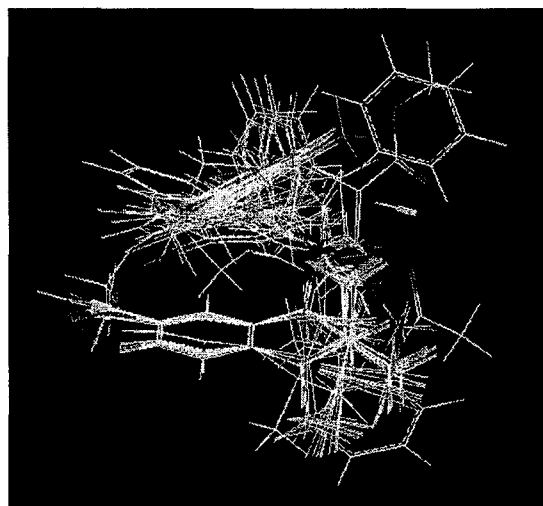


Figure 65. The superimposition of all K⁺ channel activator (56 BMS compounds).

격자 원자를 탄소 원자 (C₃⁺)로 선정하여 삼차원 공간에 일정한 간격으로 놓여 있는 격자 원자와의 정전기장과 입체장과의 CoMFA field를 계산한 후, PLS 통계 분석을 통하여 outlier를 제거하여 r² 값이 가장 높은 모델을 선정하였다. **Table 31**에 QSAR 결과를 정리하였다. 항-허혈 활성과 혈관 확장제 활성을 같이 비교하고자 56개 화합물을 모델 A와 모델 B로 나뉘어 각각 EC₂₅와 IC₅₀ 값에 대한 QSAR 분석을 하였다. 모델 A는 항-허혈 활성에 대한 QSAR 결과로 23개의 많은 화합물을 제거하고 나서야 cross-validated r² 값이 0.706인 모델을 얻었다. 모델 B는 혈관 확장제 활성에 대한 QSAR 결과로 18개 화합물을 제거해서 cross-validated r² 값이 0.714로 향상되었다. 모델 C는 심장 선택성에 대한 QSAR 결과로 14개의 화합물을 제거하고 나서 cross-validated r² 값이 0.628이며, 모델 B에 5개의 화합물을 추가하여 다시 혈관 확장제의 QSAR을 보았을 때 cross-validated r² 값이 0.660을 얻었다. AII 길항제의 QSAR 분석보다 비교적 많은 수의 화합물을 제거해야 r² 값이 증가되었고, outlier에 해당하는 구조는 benzopyran ring을 기본 골격으로 하는 구조와는 다른 구조이며, 이 경우는 서로 다른 기작이나 다른 결합 부위로 인해서 제거되는 것으로 보인다. 또한 단순히 활성 증가에 구조적인 요인 외에 다른 요인에 의해 활성에 영향을 줄 것으로 보아 좀 더 복잡한 양상을 보일 것으로 예상된다.

항-허혈 활성화와 혈관 확장 활성화에 대한 CoMFA map은 예상대로 서로 다르며, 항-허혈 활성화에 중요한 map은 benzopyran ring의 벤젠 고리와 2번 치환체에 소수성 그룹, 3번 치환체에 음이온 전하를 가진 그룹, 4번 치환체에 양이온 전하를 가진 질소 원자, cyanoguanidine에 연결된 양이온 전하를 가진 벤젠 고리가 활성화에 중요하며, 혈관 활성화에 중요한 map은 2번 치환체에 소수성 그룹, 3번 치환체에 음이온 전하를 가진 그룹이 항-허혈 활성화의 map과 일치하며, cyanoguanidine 위치에 음이온 전하를 가진 그룹이 활성화에 중요하다 (Figure 66).

심장 선택성과 혈관 활성화에 대한 CoMFA map은 활성화 증가에 서로 성질이 상반되는 map을 보인다 (Figure 67). 먼저 benzopyran ring의 6번 치환체에 해당하는 1번 map은 심장 선택성에는 양이온 전하를 가진 그룹이 혈관 확장 활성화에는 음이온 전하를 가진 그룹이 활성화 증가를 가져오며, 2번 map은 심장 선택성과 혈관 확장 활성화에 벤젠 ring의 배향이 각각 다름을 시사해준다. 3번 map은 벤젠 치환체 부분의 활성화에 대한 정보를 보이며 심장 선택성에는 소수성 그룹이 치환될수록 심장 선택성이 증가한다는 것을 보인다. Benzopyran ring의 2번 치환체에 해당하는 4번 map은 혈관 확장 활성화에 소수성 그룹이 활성을 증가시키는 반면 심장 선택성에는 감소를 가져온다.

이와 같은 CoMFA map은 항-허혈 활성화와 혈관 확장 활성화 증가에 공통된 부분과 다른 부분의 map을 가시적으로 보여줌으로써, 심장 선택적인 칼륨 통로 활성화화제의 구조에 중요한 정보를 제공해주며 효율적으로 약물을 설계하는데 도움을 준다.

Table 31. The summary of COMFA-PLS results

	Model A	Model B	Model C	Model D
Total number of compounds used	56	56	53	61
The number of omitting compounds	23	18	14	22
Cross-validated r^2	0.71	0.71	0.63	0.66
Number of components	5	4	5	5
Bootstrap r^2	0.95	0.95	0.95	0.96
standard error of estimate	0.09	0.15	0.15	0.18
Conventional r^2	0.94	0.95	0.93	0.95
standard error of estimate	0.10	0.16	0.20	0.19
F values	81.11	148.80	93.35	125.08
Relative Contribution (%)				
Steric	54.10	57.50	54.40	53.00
Electrostatic	45.90	42.50	45.60	47.00

* Each model is the result of QSAR for anti-ischemic activity (Model A), vasorelaxant activity (Model B), cardioselectivity (Model C) and vasorelaxant activity (Model D).

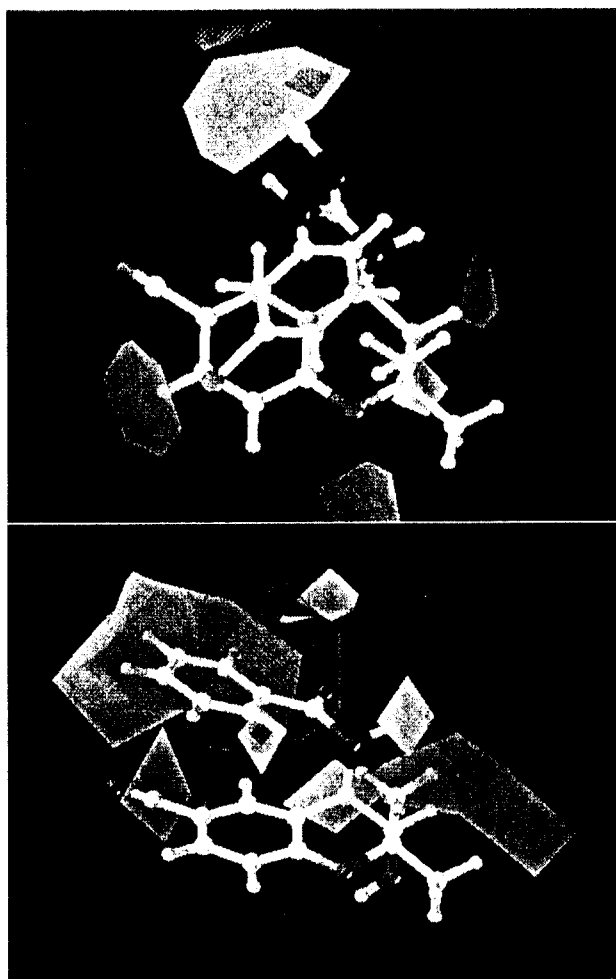


Figure 66. CoMFA map of anti-ischemic activity (top) vs vasorelaxant activity (bottom). The red and blue polyhedra indicate electrostatic contour plot. The regions where increased positive charge is favorable for activity are shown in blue, while regions where increased negative charge is favorable for activity are shown in red. The green and yellow polyhedra indicate steric contour plot. The regions where increased steric bulk is associated with enhanced activity are indicated in green, while regions where increased steric bulk is associated with diminished activity are indicated in yellow.

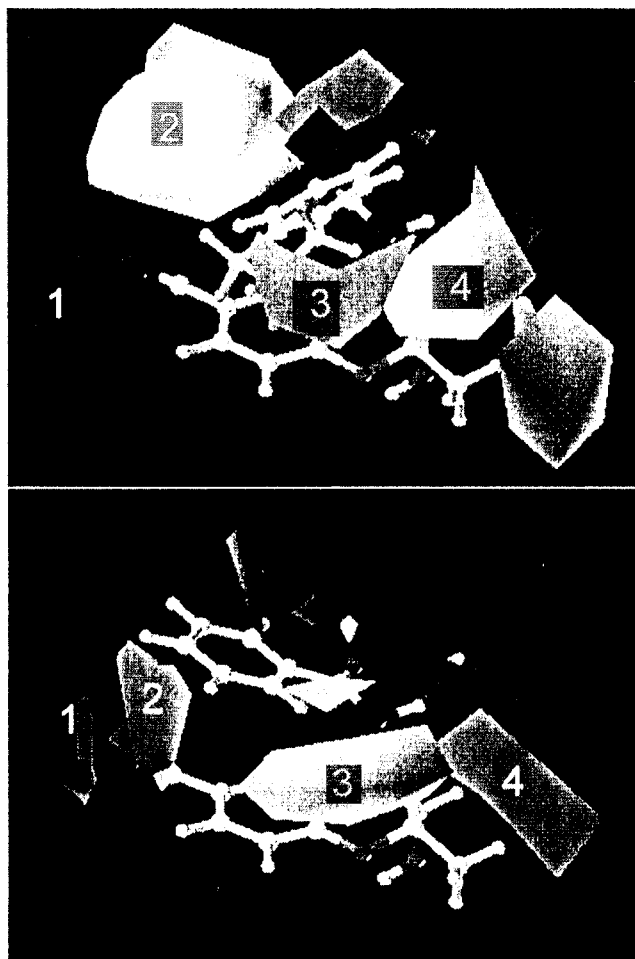


Figure 67. CoMFA map of cardio-selectivity (top) vs vasorelaxant activity (bottom). The red and blue polyhedra indicate electrostatic contour plot. The regions where increased positive charge is favorable for activity are shown in blue, while regions where increased negative charge is favorable for activity are shown in red. The green and yellow polyhedra indicate steric contour plot. The regions where increased steric bulk is associated with enhanced activity are indicated in green, while regions where increased steric bulk is associated with diminished activity are indicated in yellow.

다. 칼륨 통로 활성화제의 3D-search

다양한 구조의 칼륨 통로 활성화제의 기존에 알려진 pharmacophore (Figure 68)는 benzopyran ring의 6번째 위치에 전자를 잡아당기는 그룹과 2번 위치에 메틸과 같은 소수성 그룹, 4번 치환체에 수소 결합 받게 그룹이 활성화에 중요한 잔기로 예상되어 왔다.

따라서 칼륨 통로 활성화제로 알려진 cromakalim, pinacidil, diazoxide, aprikalim (Figure 12)을 선택하여 구조 계산 후 얻은 가장 낮은 에너지의 구조로부터 DISCO 분석을 한 결과, 수소 결합 받게와 benzopyran ring의 벤젠 ring에 해당하는 소수성 그룹과 benzopyran ring의 소수성 그룹이 0.5 Å 허용 범위 내에서 공통된 거리 제한을 가지고 있다 (Figure 69). 그러나 benzopyran ring의 6번 치환체인 전자를 잡아당기는 그룹은 공통된 구조의 겹침을 갖지 못했으므로 pharmacophore로 찾지 못했다.

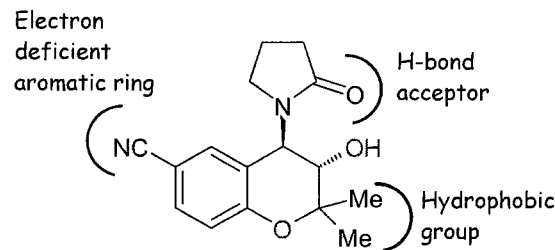


Figure 68. The structure-activity relationships for K⁺ channel activator.

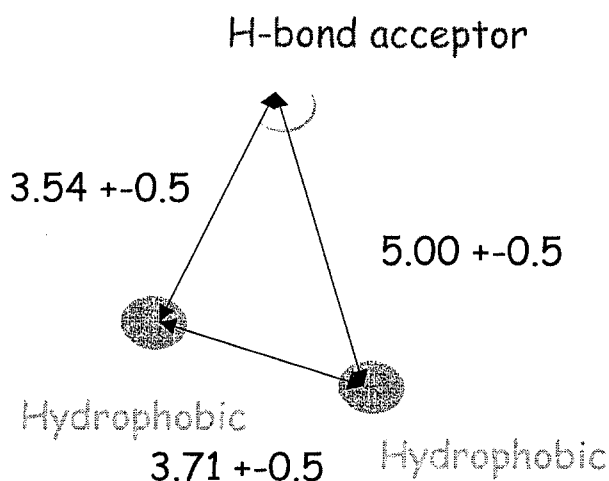


Figure 69. The pharmacophore of K^+ channel activator through DISCO analysis.

그러나 기존에 알려진 칼륨 통로 활성화제는 심장 선택적인 칼륨 통로 활성화제가 아니므로 심장 선택적인 칼륨 통로 활성화제의 pharmacophore로는 적절하지 않았다. 한편 BMS 사에서는 수년간의 연구를 통해 phenylcyanoguanidine 유도체 중 가장 활성이 있는 BMS-180448은 항-허혈 활성이 높은 반면, 혈관 확장제로의 활성도 가지고 있어서 허혈성 환자의 치료제로 문제점을 가지고 있었으므로 인돌 유도체의 변형으로부터 BMS-180448보다 20배 더 심장 선택적인 BMS-191095를 개발하였다 (Figure 70). 따라서 심장 선택적인 칼륨 통로 활성화제로 개발된 BMS-191095의 가장 낮은 에너지의 구조로부터 활성에 영향을 주는 중요 거리를 제한 조건으로 선정하여 2 Å의 허용 범위 내에서 거리 조건을 만족하는 가능성 있는 선도 물질을 DB로부터 찾았다. Figure 71에서는 benzopyran ring 대신 naphthalene이나 dihydro-xanthene, quinazoline으로 변형이 가능하며 cyanoguanidine 대신에 수소 결합 받게로 nitro 그룹이나 amide 그룹으로 대체할 수 있는 가능성을 보인다. 따라서 이런 새로운 화합물을 선도 물질로 구조적인 변형을 통해서 기존에 benzopyran ring을 기본 골격으로 하는 칼륨 통로 활성화제보다 활성이 큰 화합물의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

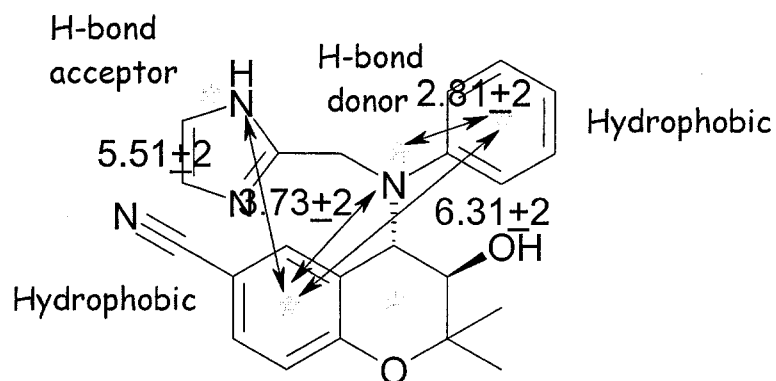


Figure 70. The structure of BMS191095 and distance constraints used for 3D-search.

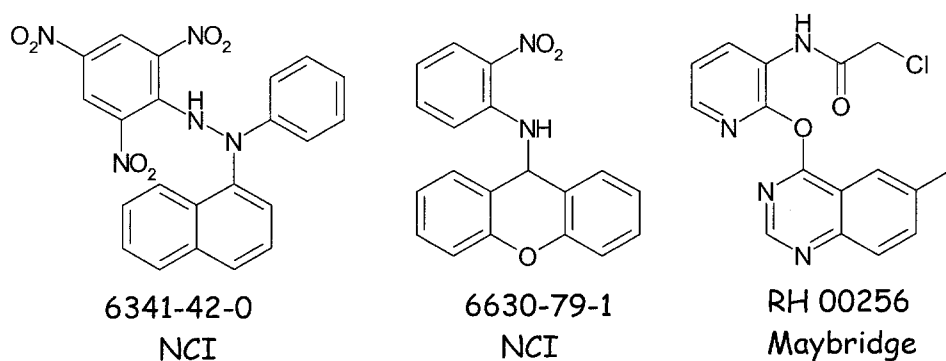


Figure 71. New lead compounds of K⁺ channel activator from 3D-search.

3. MDR Reversal Agent

가. MDR reversal agent의 구조

기존에 알려진 MDR reversal agent는 구조적으로 상당히 상이한 구조를 가진 화합물들이며, 지금까지 알려진 구조적인 공통성은 분자 내에 벤젠 ring을 포함하여 친지질성을 가지고 있고, 중성 pH에서 양이온 전하를 띠고 있는 질소 원자를 가지고 있어야 한다¹⁴³⁾. Phenylalkylamine 구조의 KR-30026은 비교물질인 (R)-verapamil 보다 MDR 활성이 60배 증가하였으며¹⁴⁴⁾, KR-30035는 15배 높은 활성

을 보인다¹⁴⁵⁾. 또한 KR30026과 KR30031은 verapamil보다 심장 혈관 독성이 감소하였다. Verapamil인 경우 S와 R이 MDR 활성화에서 큰 차이가 없지만 S보다 R이 약 200 배 칼륨 통로로의 활성이 감소하였으나, KR30026과 KR30035는 활성화에서 입체 선택성을 보이지 않았다.

Conformational search 방법을 찾기 위해 random search, grid search constrained systematic search 방법을 수행한 결과, 가장 낮은 에너지는 각각 17.78, 18.57, 21.95 kcal/mol이었다. 따라서 계산 시간과 효율성을 고려하여 MDR reversal agent의 구조 계산에 random search를 사용하였다. Random search를 통하여 46개 화합물의 낮은 에너지 구조를 계산한 결과, 합성으로 구조 변형 (알킬 사슬 고정, 알킬 사슬 길이의 변화, 5각 또는 6각 고리, methoxy의 위치 등)을 시킨 일련의 동계 화합물의 낮은 에너지 구조는 공통의 유사한 구조를 가지고 있으며, 질소 원자를 중심으로 양쪽으로 꺾인 형태를 보인다 (Figure 72). 또한 쌍극자 모멘트를 계산하였을 때, 질소 원자에서 CN 그룹으로 향하는 공통된 방향을 가진다. (R)-Verapamil과 KR30026, KR30035의 열역학적으로 안정한 3차 구조를 superimposition 시켰을 때 (Figure 73), 각각의 질소 원자, 알킬 사슬, 벤젠 고리, CN group의 삼차원 공간적인 위치가 일치하며, verapamil의 isopropyl group과 KR30026의 6-membered ring이 일치한다. 반면 KR30026의 왼쪽 phenyl group의 위치가 verapamil과 좀 다른 차이점을 보인다. 더 자세한 구조-활성간의 분석은 차후 생리활성 data가 나오면 명확한 차이점을 밝힐 것으로 보인다.

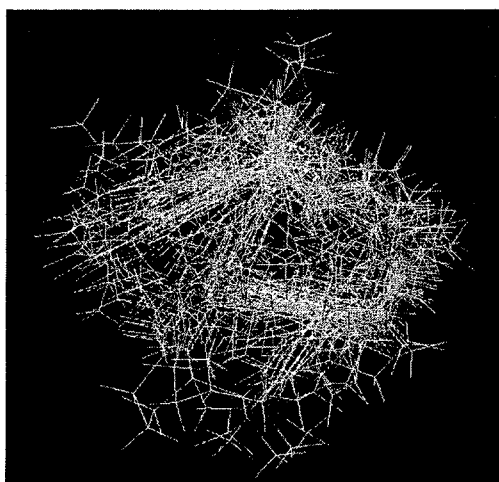


Figure 72. The superimposition of MDR reversal agents.

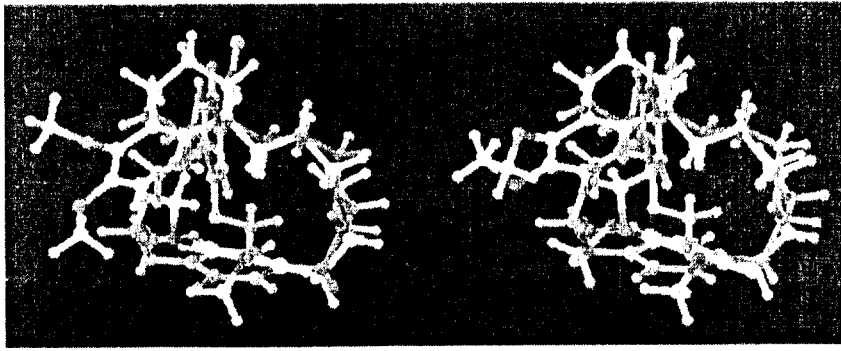


Figure 73. The superposition between (R)-verapamil (grey) vs KR30026 (left) and KR30035 (right).

총 46개 MDR reversal agent는 질소 원자를 메틸화시켰는데, 메틸화 시킴으로써 3차 구조에서 유동성을 감소 시켰다. **Figure 74**은 메틸화 시키지 않은 경우와 메틸화 시킨 경우에 질소 원자를 중심으로 양쪽 이면각에 의해 가질 수 있는 구조에 대한 에너지를 그래프로 그린 것이다. 메틸화 시키지 않은 경우는 메틸화 시킨 경우에 비해 높은 에너지 영역이 적지만, 메틸화 시킨 경우는 높은 에너지 영역이 증가하고 있다. 따라서 메틸화 시킴으로써 MDR reversal agent의 구조의 유동성을 감소시켰다.

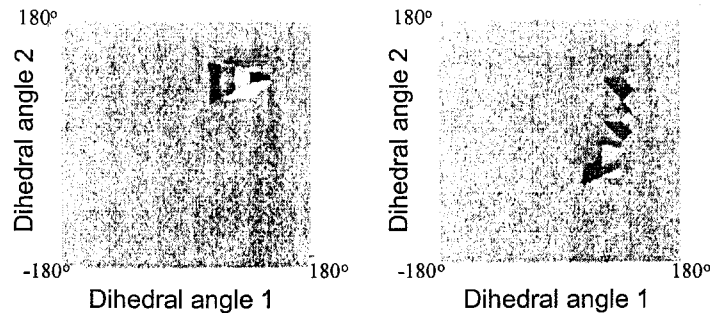


Figure 74. Potential energy map of demethylation (left, E : 40.47 to 263.20 kcal/mol) and methylation (right, E : 46.08 to 410.44 kcal/mol) of nitrogen.

MDR reversal agent의 구조적인 특징을 살펴보기 위해 2D-NMR COSY, NOESY 실험을 통하여 각각의 proton의 chemical shift를 지정하였으며 (**Table 32**),

Figure 75에 NOESY cross peak으로부터 분석한 NOE를 표시하였다. NOE 데이터에서는 질소 원자를 중심으로 양쪽의 알킬 사슬간의 NOE pattern으로 계산 구조처럼 꺾인 구조가 예상이 되나, 계산한 구조의 낮은 에너지 구조에서는 두 벤젠 고리간의 NOE가 예상되나, NOE 실험 데이터에서는 두 벤젠 고리간의 상호 작용을 보이지 않았다. 따라서 이런 실험 결과와 계산 결과의 차이점으로 전자를 고려하지 않은 분자 역학 방법은 큰 분자의 실제 구조를 예측하기에 한계가 있다는 것을 보여주며, 전자를 고려한 MOPAC 방법으로 계산된 구조는 NMR 결과와 일치한다.

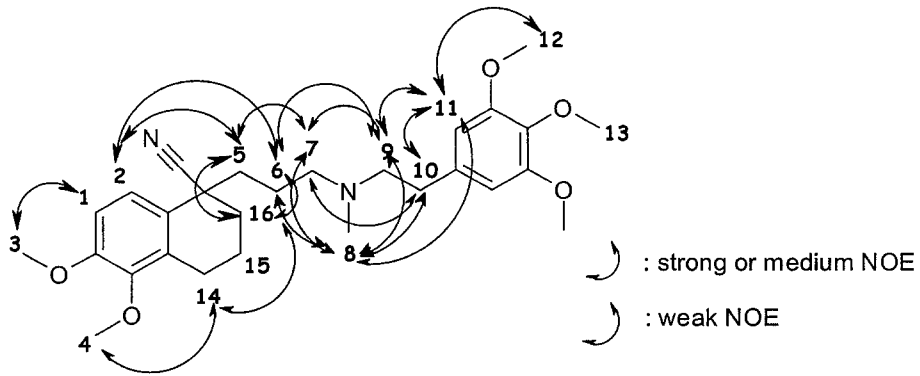


Figure 75. The atomic numbers and NOEs of KR30035.

이러한 목적으로 photochromism 성질을 갖는 화합물의 바람직한 특징은 1) high efficiency for coloring in the near-ultraviolet region, 2) low quantum yield for bleaching with visible light, 3) fast thermal fading at ambient temperatures 등이다. 이러한 성질을 만족할 수 있도록 벤조피란 화합물의 여러 가지 구조적 변화가 연구되고 있다.

본 연구에서는 photochromism 성질을 갖는 화합물의 분자설계와 분자적 특성을 연구하여 보다 바람직한 성질을 갖는 화합물을 개발하려고 한다. Photochromism을 나타내려면 위의 Figure 76과 같이 벤조피란 화합물이 electrocyclization에 의해서 색을 나타내는 open form으로 변환되었다가 다시 cyclization 되게 된다. 이때 벤조피란의 여러 치환체가 반응속도에 영향을 미치게 된다.

벤조피란 치환체 특히 2번 탄소에 치환체가 다른 여러 가지 chiral 벤조피란 화합물을 합성하고 thermal racemization 속도를 측정하였다. 반응속도는 각 시간에 racemization 정도를 HPLC 분석을 통하여 측정하였다. 따라서 2,2-disubstituted benzopyran 유도체의 치환체에 따른 racemization 효과를 알아보기 위하여, benzopyran 화합물의 2번 탄소 위치에 alkyl, vinyl, ester, alcohol, ethyl propenoate, methoxy methyl, α, β -unsaturated ester, ketone 등이 치환된 광학 활성 화합물을 합성하였으며, benzopyran ring의 6번 위치에 H, nitro, methoxy가 치환된 화합물을 합성하였다.

각각의 치환체의 반응 속도에 영향을 미치는 electronic effect를 알아보기 위하여 반응물과 중간체, 전이 상태의 구조와 에너지를 계산하여 열역학적인 안정도를 알아보았다. 연구 방법으로는 화합물의 회전 가능한 결합각을 random search를 통하여 최소의 에너지 값을 가진 구조를 얻은 후, semi-empirical PM3 방법으로 optimization 시켰다. Optimization 된 구조는 다시 6-31G(d,p) basis set을 이용하여 Hartree Fock 방법으로 optimization 시켜서 열역학적으로 가장 안정한 구조와 에너지를 얻었다. 전이 상태의 구조는 half-chair conformation으로 가정하여 molecular mechanics로 minimization 시킨 후, 반응물과 중간체의 계산에 사용했던 동일한 방법으로 single calculation 했다.

나. 연구 결과

Benzopyran 유도체의 electrocyclization을 통한 racemization에서 반응물의 생성 대 시간의 r^2 값은 모든 실험에서 0.95이상의 높은 r^2 값으로 실험의 정확성을 보여주었으며, 그 속도는 C-6 치환체보다 C-2의 치환체의 변화에 더 민감하며, vinyl과 ethyl propenoate는 반응 중간체의 π -conjugation 효과를 더 증가시킴으로써 중간체를 안정화시키는 것으로 보인다 (Figure 77 & Table 33). Table 34는 반응물과 반응 중간체 또는 전이 상태의 del H와 HOMO-LUMO energy gap의 ab initio 계산 결과를 보여주었다. 반응물과 반응 중간체의 del H와 실험으로부터 얻은 활성화 자유에너지는 ester와 ketone 치환체를 제외하고 r^2 값이 0.863으로 통계적으로 좋은 상관 관계를 보인다 (Figure 78). 그러나 계산 결과에서는 C-6 치환체가 nitro같은 electron-withdrawing group보다는 methoxy같은 electron-donating group이 반응 중간체의 π -conjugation 효과를 증가시키는 것으로 보이나, 실험 결과에서는 C-2 치환체가 vinyl이나 alcohol인 경우 C-6 치환체가 methoxy인 경우보다 nitro인 경우가 반응 속도를 증가시켰다. 따라서 반응 속도는 반응 중간체의 열역학적인 안정도 외에 다른 요인에 의해 조절될 것으로 추정하여 전이 상태 구조를 half-chair conformation (Figure 79)으로 고정시키고 반응물과 전이상태와의 활성화 에너지를 비교한 결과, C-6 치환체가 동일한 경우 C-2 치환체의 반응 속도는 활성화 에너지에 반비례하여 반응 속도에 영향을 미치는 것으로 보인다. C-6 치환체가 nitro인 경우, ethylpropenoate와 ketone을 제외하면 활성화 자유에너지와 del H와 r^2 값이 0.899인 상관관계를 가지며, C-6 치환체가 methoxy인 경우는 r^2 값이 0.909의 값을 가진다 (Figure 80). 또한 일반적으로 C-6 치환체가 methoxy인 경우가 nitro보다 전이 상태의 에너지를 더 안정화시킨다. 따라서 half-chair conformation과는 다른 전이 상태의 구조를 가지거나 각각의 치환체에 따라서 서로 다른 경로를 가질 것으로 추정된다. 앞으로의 연구 계획은 Hartree Fock 방법은 electron correlation을 고려한 방법이 아니므로, electron correlation을 고려한 DFT (Density Functional Theory) 방법을 사용하여 반응물과 중간체, 전이 상태의 구조와 에너지를 계산할 계획이며, 반응물과 중간체의 구조로부터 전이 상태 구조를 예측하는 saddle point search 방법을 통하여 half chair conformation과는 다른 전이 상태 구조를 계산할 것이다.

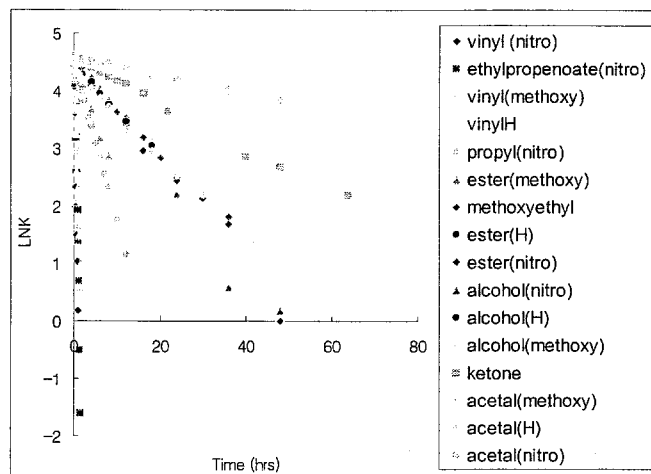


Figure 77. The plot of the logarithm of the % ee as a function of time

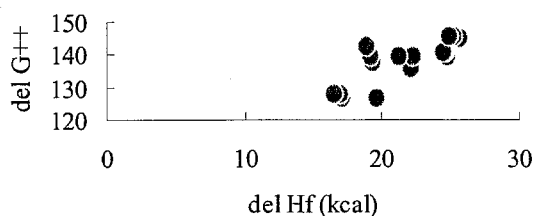
Table 33. The reaction constants and their activation free energy from the racemization of 2,2-disubstituted benzopyran derivatives

X	Y	$k(\times 10^{-5} \text{sec}^{-1})$	ΔG^\ddagger (kJ/mol)
Vinyl	Nitro	116.233	126.741
Ethylpropenoate	Nitro	107.125	127.024
Vinyl	Methoxy	78.008	128.123
Vinyl	H	3.431	127.697
Propyl	Nitro	7.800	136.108
Ester	Methoxy	5.019	137.637
Methoxyethyl	Nitro	2.783	139.682
Ester	H	2.733	139.744
Ester	Nitro	2.775	139.692
Alcohol	Nitro	2.894	139.545
Alcohol	H	2.167	140.549
Alcohol	Methoxy	2.069	140.709
Ketone	Nitro	1.086	142.945
Acetal	Methoxy	0.603	144.985
Acetal	H	0.475	145.812
Acetal	Nitro	0.461	145.912

Table 34. The heat of formation (A. U.) of starting, transition state and reaction intermediate with 6-31G(d, p) basis set

	Starting (HF)	HOMO	LUMO	E _{gap}	TS (HF)	HOMO	LUMO	E _{gap}	del H (TS-S)	ZE (HF)	HOMO	LUMO	E _{gap}	del H(ZE-S)
Vinyl (nitro)	-739.7249708	-0.3157	0.06921	0.38492	-739.62655	-0.3011	0.28344	0.58449	61.759029	-739.69759	-0.3057	0.00172	0.30745	17.18003
ethylpropenoate	-1005.421863	-0.3227	-0.0658	0.25683	-1005.3133	-0.314	-0.0031	0.31088	58.141624	-1005.3905	-0.3153	-0.0093	0.30596	19.65151
Vinyl(methoxy)	-650.1323972	-0.2784	0.10923	0.38761	-650.04954	-0.2683	0.04427	0.3126	61.983948	-650.10526	-0.2748	0.00331	0.27807	17.03141
Vinyl (H)	-536.2519025	-0.2876	0.11028	0.39792	-536.17316	-0.2779	0.0443	0.32218	49.412956	-536.22557	-0.2794	0.0323	0.3117	16.52427
Propyl	-779.960089	-0.3139	0.07121	0.38508	-779.85419	-0.3113	0.01057	0.32189	66.461663	-779.9247	-0.3092	0.01257	3.11177	22.20648
Ester(methoxy)	-799.8944653	-0.2796	0.10555	0.38512	-799.80397	-0.2868	0.03408	0.32088	66.789476	-799.86366	-0.2947	0.02386	0.31858	19.33083
Methoxyethyl	-815.7615579	-0.3178	0.06741	0.38525	-815.65034	-0.315	0.00647	0.32143	69.769332	-815.72604	-0.3176	0.00718	0.32475	22.29072
Ester (H)	-686.0142276	-0.2927	0.10638	0.39911	-685.92424	-0.3033	0.03296	0.33626	66.465453	-685.96363	-0.3002	0.02276	0.323	19.19985
Ester (nitro)	-889.4867452	-0.3218	0.06609	0.38765	-889.37834	-0.3315	-0.0041	0.32736	66.022877	-889.45294	-0.3289	-0.0074	0.32149	21.21075
Alcohol (nitro)	-776.7397993	-0.3209	0.06513	0.39602	-776.62979	-0.3211	0.00502	0.32613	66.031739	-776.70027	-0.3155	0.00924	0.32489	24.80753
Alcohol (H)	-573.2677216	-0.2933	0.10788	0.40115	-573.17919	-0.2928	0.04358	0.33634	66.564285	-573.22834	-0.2873	0.04103	0.32835	24.71281
Alcohol(methoxy)	-687.1470208	-0.291	0.10431	0.39527	-687.05326	-0.2784	0.04339	0.32174	66.837208	-687.10803	-0.2824	0.04141	0.32381	24.46883
Ketone	-814.6110368	-0.3212	0.06889	0.39009	-814.50626	-0.3319	-0.0046	0.32725	66.748428	-814.5808	-0.3309	-0.0106	0.3203	16.97573
Acetal(methoxy)	-840.0624065	-0.2766	0.11817	0.39479	-839.95821	-0.2747	0.04481	0.31948	66.386734	-840.02137	-0.2821	0.04065	0.32277	25.75342
Acetal (H)	-726.1818121	-0.2844	0.12002	0.40442	-726.0849	-0.2889	0.04539	0.3343	60.812614	-726.14165	-0.2869	0.04019	0.32709	25.20517
Acetal	-929.650234	-0.3114	0.0721	0.3835	-929.53261	-0.318	0.00621	0.32425	76.816872	-929.61532	-0.3141	0.01018	0.32429	24.91689

starting - ZE



starting - ZE except ester and ketone

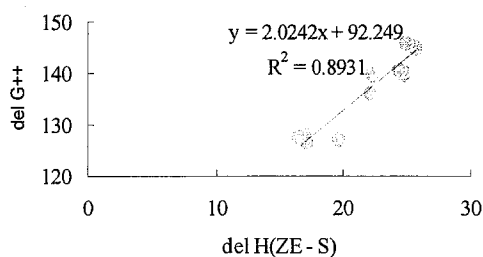


Figure 78. The plot of activation free energy from experiment vs del H between startings & reaction intermediates from *ab initio* calculation

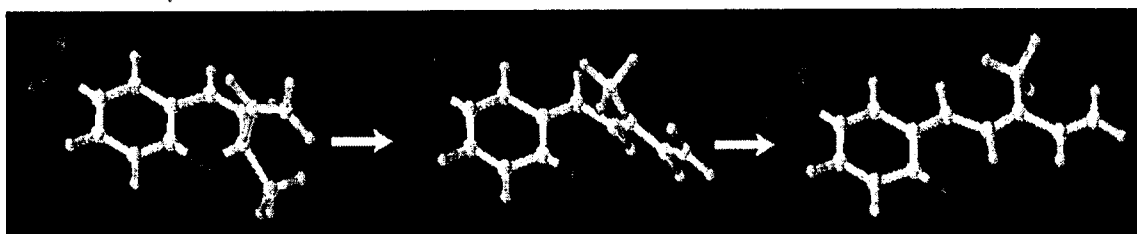


Figure 79. The possible mechanism of the ring opening and its transition state.

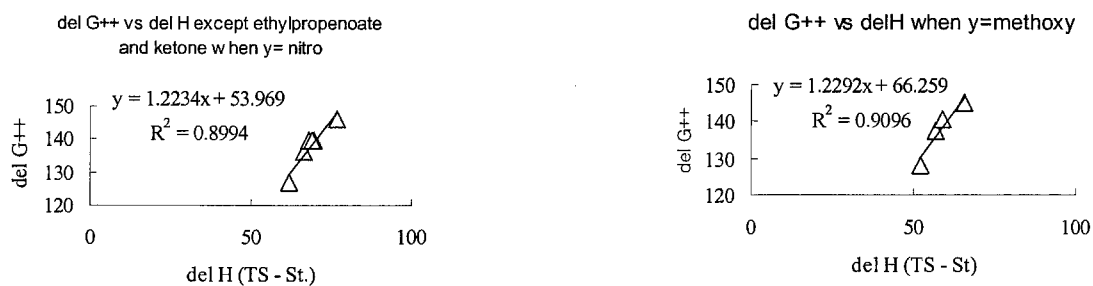
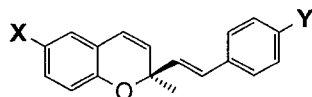


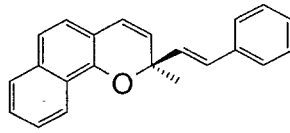
Figure 80. The plot of activation free energy from experiment vs activation energy between starting and transition state from *ab initio* calculation

Table 35. Benzpyran 유도체



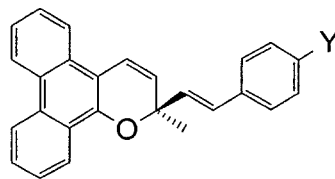
	Delta H (kcal/mole)	Activation E (kcal/mole)	Lambda max (closed form)		Lambda max (open form) Predicted
			Predicted	Detected	
	13.82	41.62	257nm		423nm
	14.81	X	279nm		452nm
	12.67	X	258nm		432nm
	13.89	X	326nm		417nm
	13.55	X	281nm		429nm

Table 36. Naphtopyran 유도체



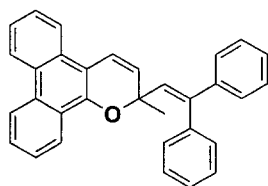
	Delta H (kcal/mole)	Activation E (kcal/mole)	Lambda max (closed form)		Lambda max (open form)
			Predicted	Detected	Predicted
	5.44	35.93			416nm
	2.94	X			419nm
	3.58	X			X
	6.15	X			X

Table 37. Phenanthrene 유도체

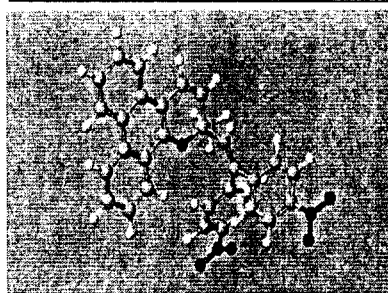


	Delta H (kcal/mole)	Activation E (kcal/mole)	Lambda max (closed form)		Lambda max (open form)
			Predicted	Detected	Predicted
	1.97	35.34	259nm	258.7nm	421nm
	1.90	31.28	257nm	258.7nm	423nm
	1.99	31.34	295nm		425nm
	1.91	30.63	301nm		437nm
	2.27	32.35	258nm	259.0nm	394nm

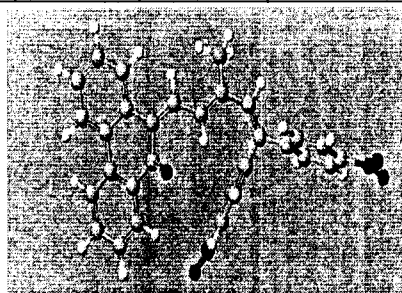
Table 38. Phenanthrene 유도체



	Delta H (kcal/mole)	Activation E (kcal/mole)	Lambda max (closed form)		Lambda max (open form)
			Predicted	Detected	Predicted
	0.96	Not found	250nm		366nm
	1.25	Not found	249nm		378nm



Closed form



Open form

Table 39. Pyridine 유도체

	Delta H (kcal/mole)	Activation E (kcal/mole)	Lambda max (closed form)		Lambda max (open form)
			Predicted	Detected	
	5.44	35.93	X		416nm
	6.93	39.95	X		X
	6.11	37.93	X		X

Table 40.

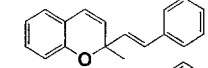
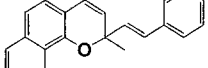
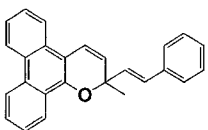
	Delta H (kcal/mole)	Activation E (kcal/mole)	Lambda max (closed form)		Lambda max (open form)
			Predicted	Detected	Predicted
	13.82	41.62	257nm	X	423nm
	5.44	35.93	X	X	416nm
	1.97	35.34	259nm	258.7nm	421nm

Figure 81. Transition state molecular structure of Benzopyran, naphtopyran, phenanthrene derivatives

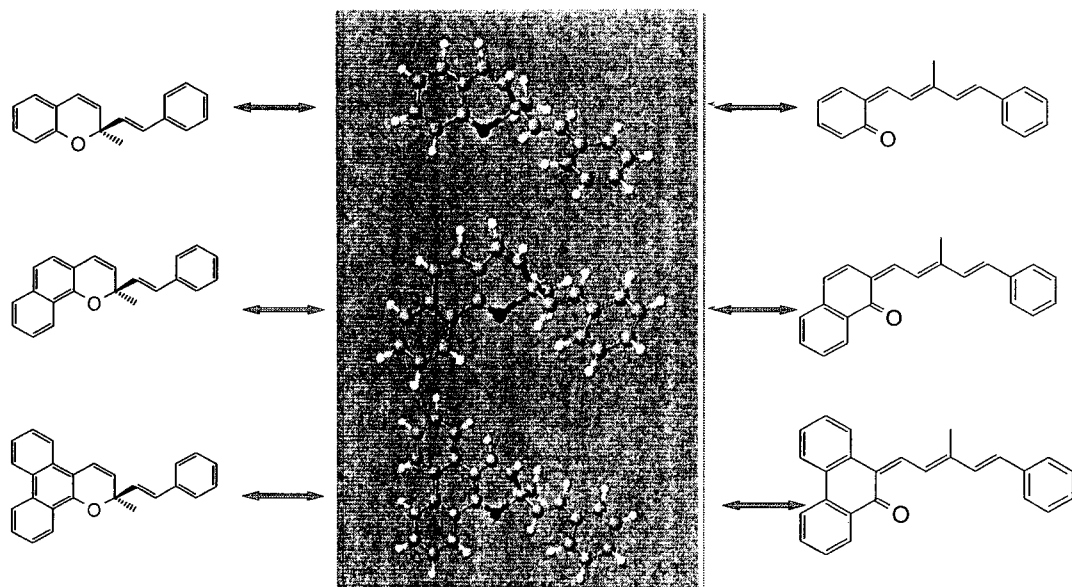


Table 41.

absorbed wavelength (nm)	absorbed color	visible color
400 ~ 424	violet	yellow
424 ~ 491	blue	orange
491 ~ 575	green	red
575 ~ 585	yellow	violet
585 ~ 647	orange	blue
647 ~ 700	red	green

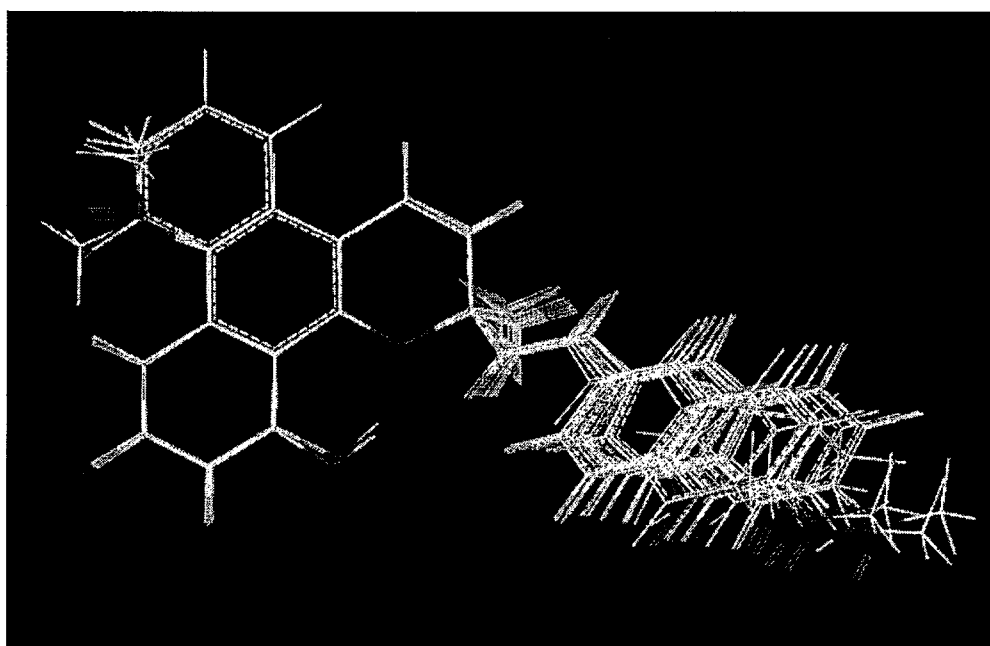


Figure 82. superimposition of closed form

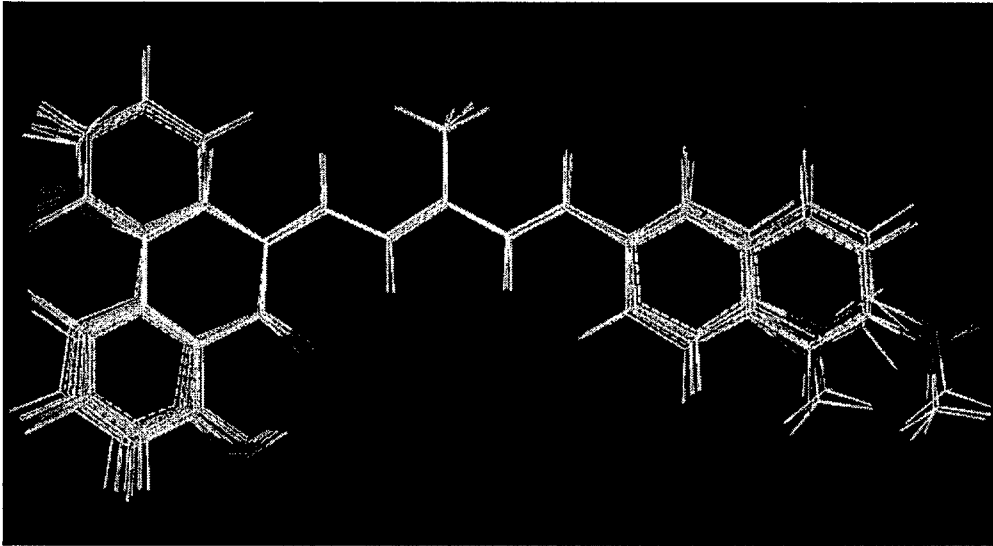


Figure 83. superimposition of opened form

제 4 절 결 론

본 연구는 계산 화학을 이용하여 생리 활성 물질의 설계에 적용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. AII 수용체 type I 길항제의 NMR, x-ray, 계산 구조 분석으로 tetrazole group 이 imidazole ring과 같은 배향을 가진 type I과 반대 배향을 가진 type II의 구조가 생체 내에서 우세할 것으로 보이며, 활성에 대한 36개의 pyridylimidazole 유도체의 구조 변형을 통해 imidazole ring의 5번, 6번 치환체는 수용체와의 결합에 필수적인 부위는 아니다. 특히 5번 치환체는 결합에 부가적인 부위로 크기가 작고 수소 결합에 유리한 그룹이 AII 길항제로서의 활성을 증가시키며, 6번 위치는 크기가 크고 전자를 잡아당기는 그룹이 para 위치에 치환된 pyridine N-oxide가 활성을 증가시킨다. QSAR 모델에서 제외된 실제 6개의 화합물을 합성하여 각 모델의 예측 능력을 보았을 때

cross-validated r^2 값에 비례해서 모델의 예측 능력이 높았다. 추가적으로 합성한 화합물을 첨가하여 최종 CoMFA 분석결과, 세 모델보다 높은 cross-validated r^2 값 (0.788, $r^2 = 0.964$)을 얻었으며, model의 구조에서 유사성이 적을수록 예측 능력이 감소함을 보였다. 따라서 일련의 구조적으로 다양한 화합물의 구조와 활성간의 관계를 3-D QSAR (CoMFA)로 분석하였으며 CoMFA 분석의 한계에도 불구하고 CoMFA는 구조적으로 다양한 치환체의 pharmacophore를 분석하는데 효과적인 방법이다.

다음으로 benzofuran 유도체의 구조 변형은 benzofuran ring을 중심으로 imidazole과 phenyltetrazole ring의 치환 위치에 따른 여러 가지 이성질체를 합성한 결과 둘 다 meta 위치에 치환된 치환체가 가장 활성이 높았다. 30개의 설명 인자로 2D-QSAR을 수행하였을 때는 활성 있는 Glaxo 화합물 (GR117289)과 3차 구조의 차이가 클수록 활성을 감소시킴을 알 수 있었다. 17개 화합물의 CoMFA 분석으로 cross-validated r^2 값이 0.88과 r^2 값이 0.97인 모델을 얻었다. 또한 CoMFA map은 기존에 알려진 AII 길항제의 pharmacophore 결과 (부틸 잔기, imidazole ring의 질소 원자, tetrazole 그룹에 해당하는 음이온 기)와 일치한다.

DISCO 분석을 통해 얻은 AII 길항제의 활성 구조로부터 pharmacophore를 거리 제한으로 사용하여 기존의 pyridylimidazole과 benzofuran 유도체와는 다른 화합물을 얻었으며, 3D-search 방법은 새로운 선도물질의 설계에 유용한 도구로 사용될 것으로 기대된다.

2. 칼륨 통로 활성화제의 구조 분석에 사용된 방법은 grid search, random search, constrained systematic search에서 계산의 신속성과 효율성을 비교해서 random search를 사용하였다.

칼륨 통로 활성화제의 QSAR 분석을 위해 사용된 화합물은 BMS 화합물 총 56개의 화합물을 선정하여 항-허혈 활성과 혈관 확장 활성, 심장 선택성에 대한 QSAR을 하였다. QSAR 결과는 각각 cross-validated r^2 값이 0.706, 0.714를 얻었으며 항-허혈 활성과 혈관 확장 활성에 대한 CoMFA map은 서로 공통된 부분과 다른 부분이 있다. 또한 심장 선택성과 혈관 확장 활성에 대한 CoMFA map에서는 같은 위치에서 서로 성질이 상반되는 map을 보이므로, CoMFA 분석을 통해

기존의 칼륨 통로 활성화제보다 더 심장 선택적인 칼륨 통로 활성화제의 약물 설계에 중요한 정보를 제공해준다.

심장 선택적인 칼륨 통로 활성화제인 BMS-191095의 가장 낮은 에너지의 구조부터 pharmacophore간의 거리를 3D-search의 조건으로 선택하여 기존의 benzopyran 유도체와는 다른 화합물을 얻었으며 새로운 심장 선택적인 칼륨 통로 활성화제로 기대된다.

3. MDR reversal agent의 활성을 보이는 phenylalkylamine 유도체의 구조 분석을 통해서 계산된 구조와 NMR 실험 구조의 공통된 특성은 질소 원자를 중심으로 양쪽으로 꺾인 형태를 보이며, 질소 원자를 메틸화시킴으로써 분자의 유동성을 감소시켰다.
4. 조절 분비 경로를 거치는 단백질로 insulin, insulin-like growth factor (IGF) I, II, Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) 5, relaxin, growth hormone, neurophysin II, brain derived neurotropic factor (BDNF)를 PDB DB로부터 각각의 실험 구조를 얻었으며, prodynorphin, chromogranin A의 homology modeling 기술을 사용하여 3차 구조를 얻었다. 모델링 연구를 통하여 분류 신호의 구조적인 특징은 amphipatic loop 표면에 두 개의 음이온 잔기와 두 개의 소수성 잔기가 일정 거리를 유지하면서 노출되어 있다는 것을 알 수 있었으며, 항상 분비되는 단백질 (nerve growth factor (NGF), serum albumin)에서는 이와 같은 분류 신호 도메인을 찾을 수 없었다. 따라서 조절 분비 경로를 거치는 prohormone은 분자 내에 분류 신호 도메인을 가지고 있어서 항상 분비되지 않고 CPE 수용체에 의해 분비가 조절이 된다.

따라서 위와 같은 연구 결과를 통해서 컴퓨터를 이용한 효과적인 생리 활성 물질의 분자 설계 시스템 확립 및 종합적 분자 설계 체계를 구축했으며, 분자 설계 시스템의 단계별 과정 및 목표는 다음과 같다.

1. 구조 계산 및 비교 -> 구조 특성 및 pharmacophore 도출.

2. 3D-QSAR, CoMFA 분석 -> 구조와 활성간의 상관관계 규명, 새로운 화합물의 활성 예측, 선도물질의 최적화.
3. DISCO 분석 및 3D search -> pharmacophore 특성, 활성 구조 규명 및 새로운 선도물질 제시.

창의적 신약 개발 연구를 위해서는 독창적인 선도 물질을 도출하기 위하여 다양한 구조의 화합물을 합성하여 컴퓨터를 이용한 분자 설계 기법을 확립하여야 하며, 이 기술은 기존의 시행착오가 많은 방법에 비해 보다 논리적이고 효율적인 신약 개발 방법이다. 또한 이러한 방법은 기존의 방법을 탈피할 수 있는 새로운 개념의 신약 개발 기술을 개발, 적용시킴으로써 신물질 개발의 효율성 및 생산성을 향상시킬 것으로 기대한다.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

1. 연차별 연구목표 및 내용

구분	연구목표	연구내용
1차년도 ('96)	<ul style="list-style-type: none"> 콜레스테롤의 생합성에 중요한 단계인 14a-reductase를 저해하는 선도물질을 중심으로 유도체화 연구를 수행하여 구조-효소저해활성간의 상관관계 확립 CVD를 위한 Barium의 유기화합물 리간드를 설계, 합성하고 이들 물질의 화학적, 물리적 특성을 확인하는 실험을 통하여 분자설계법의 활용 가능성 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 콜레스테롤 생합성 저해의 효과를 가진 최소 조건의 화합물의 분자설계와 이러한 효과를 가진 것으로 검증된 벤조피란계 화합물 확인 분자설계기술을 이용하여 CVD에 효과적으로 사용할 수 있는 다양한 화합물군의 유기 리간드 15종 합성완료
2차년도 ('97)	<ul style="list-style-type: none"> 비교화합물과 동등 이상의 MDR 저해효과 및 부작용 20배 이상 감소한 선도물질 도출 분자설계 기법을 이용하여 콜레스테롤 생합성 저해효과를 가진 약리 활성을 가진 선도물질의 확보 및 CVD를 위한 poly-ether형 급속 유기 리간드의 창출 및 AII receptor antagonist에 대한 분자설계 기법을 이용하여 QSAR 규명 	<ul style="list-style-type: none"> 콜레스테롤의 생합성에 저해효과를 가진 벤조피란계 유도체 합성 유도체들의 구조-효소저해 활성 간의 상관관계를 분자설계 기법을 이용하여 규명 연구 CVD를 위한 barium의 poly-ether계 유기 화합물의 리간드의 설계, 합성
3차년도 ('98)	<ul style="list-style-type: none"> MDR 단백질에 저해효과를 가지는 화합물의 분자설계 및 합성 Photochromism 성질을 갖는 신기능성 화합물의 분자설계 및 특성연구 	<ul style="list-style-type: none"> 3차 아민 화합물 46개 합성 NMR 실험결과와 분자역학 방법으로 열역학적으로 안정한 구조계산하고 3차원 구조-활성간의 상관관계 연구 치환체가 다른 벤조피란 화합물 합성 실험을 통한 반응속도 측정, 반응 중간체 에너지 계산, 치환체가 반응속도에 미치는 영향 연구.
4차년도 ('99)	<ul style="list-style-type: none"> MDR 단백질에 저해효과를 가지는 화합물의 분자설계 및 합성 비교 화합물과 동등 이상의 MDR 저해효과 및 부작용 20배 이상 감소한 선도물질 도출 Photochromism 성질을 갖는 신기능성 화합물의 분자설계 및 특성연구 	<ul style="list-style-type: none"> 3차 아민 화합물 20여종 합성 chiral 합성법 개발, 에너지 구조계산 구조비교를 통한 pharmacophore 도출 MDR 저해효과를 갖는 개발후보 화합물 도출 <ul style="list-style-type: none"> 국내기업과 라이선싱 체결 Photochromism 특성을 나타내는 벤조피란 유도체 30여종 합성 분자의 3차 구조계산 구조-물성 상관관계 연구 물성이 향상된 화합물의 예측모델 구축
5차년도 ('00)	<ul style="list-style-type: none"> MDR 단백질에 저해효과를 가지는 화합물의 분자설계 및 합성 Photochromism 및 thermochromism 성질을 갖는 신기능성 화합물의 분자설계 및 특성연구 	<ul style="list-style-type: none"> 45개의 MDR 저해 특성과 칼슘채널 저해효과의 특성의 구조적 차이 연구 구조-활성 상관관계 연구 전임상 연구 (약동력학, 안전성) 벤조피란 유도체 30 여종 합성 벤조피란 유도체의 치환체 변환에 따른 λ_{max} 및 ΔH 계산으로 photochromism 특성연구 350-600nm의 visible 영역에서 다양한 흡수파장을 가지는 화합물 5개 이상 선정 ΔH가 2 kcal 이내의 열역학적으로 안정한 화합물 5개 이상 제시

2. 계획대비 달성도

번호	세부연구개발목표 (선정시 계획서상의 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	Nonpeptide AII antagonist 의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 구조계산 및 비교를 통한 pharmacophore 도출 ▶ 구조-활성간의 상관관계 규명 및 새로운 화합물의 활성 예측모델 확립 ▶ 지속성 및 안전성이 우수한 새로운 AII antagonist 개발 	100
2	CVD를 위한 poly-ether계 금속 유기 리간드의 설계 및 합성	<ul style="list-style-type: none"> ▶ barium의 유기화합물 리간드 설계 ▶ poly-ether계 화합물 합성방법론 확보 및 수십종의 화합물 합성 ▶ 물리적 특성연구 	100
3	콜레스테롤 생합성에 저해 효과를 가지는 벤조피란계 화합물의 정량적 구조-효소 저해관계 연구	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 광학이성질체의 효율적 합성 ▶ 구조-활성 상관관계 연구 ▶ pharmacophore 연구 	100
4	MDR 단백질에 저해효과를 가지는 화합물의 분자설계 및 합성	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 46개 3차 아민 화합물 합성 ▶ conformational search 방법을 통하여 열역학적으로 가장 낮은 에너지 구조계산 ▶ 2D-NMR 분석을 통한 거리정보와 계산구조 비교 ▶ 비교화합물과 합성화합물의 구조비교를 통한 pharmacophore 도출 ▶ MDR 저해효과를 갖는 개발후보 화합물 도출 ▶ 국내기업과 라이선싱 체결 	100
5	Photochromism 성질을 갖 는 신기능성 화합물의 분자 설계 및 특성연구	<ul style="list-style-type: none"> ▶ photochromism 및 thermochromism 특성을 나타내는 벤조피란 유도체 합성 및 반응속도 측정 ▶ ab initio 방법과 PM3 방법을 이용한 에너지 계산 ▶ 구조-물성 상관관계 연구 ▶ 물성이 향상된 화합물의 예측모델 구축 ▶ photochromis 특성을 나타내는 선도화합물 확보 	100

3. 대표적 성공사례

* 다약제간 내성(MDR) 단백질에 저해효과를 나타내는 화합물의 개발

- ▶ 소화기에서 외부의 이물질이 들어오지 못하도록 보호하는 작용을 하는 P-GP (p-glycoprotein)가 생성되어 체내에 약물이 흡수되지 못하게 방해한다. 또한 항암제를 반복투여할 경우 암세포에도 P-GP가 증가되어 항암제의 내성이 생기는 등 부작용이 있다.
- ▶ 이러한 항암제의 치료의 문제를 해결하기 위해 체내에서 약물 흡수를 방해하는 P-GPP 저해제가 필요하여 분자설계법 연구와 합성을 통하여 P-GP형성을 억제하는 특성을 지닌 신물질 인단유도체를 개발.
- ▶ 신물질 P-GP 저해효과가 있는 인단유도체를 함유한 경구용 파클리탁셀은 주사용제 투여시에 사용해야 하는 부형제, 부신피질호르몬 등에 의한 부작용이 없을 뿐만 아니라 P-GP가 생성되어 약효가 떨어지는 다약제간 내성의 문제도 해결할 수 있다..
- ▶ 한국화학연구원은 관련 특허권을 한미약품(주)에 특허권 양도계약을 체결하였습.
- ▶ 항암 주사제 파클리탁셀을 경구용 제제 상품화를 목표로 상품화연구를 진행 중이다.

4. 기타 계획하지 않은 연구성과

연구의 과정에서 합성된 다양한 유도체들은 약효 스크리닝을 통해서 생리활성이 측정되었으며 향후 신물질 개발연구의 기초자료로 활용할 계획임.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

- 도출된 개발 후보물질은 전임상, 임상의 개발단계를 수행하여 세계시장에 진출할 수 있는 신의약으로 개발시켜 나가고 이를 통해 국내 의약산업의 발전, 기술력 향상에 기여토록 할 계획으로 개발연구를 수행함.
- 연구과정에서 확립, 확보된 연구경험은 질환의 병태생리와 발병과정을 이해하는데 활용되도록 관련 연구자에게 개방하고 기술이전을 통해 지속적인 신약창출이 가능하도록 활용할 예정임. 이미 다수의 학술논문이 발표되었으며 향후 다수의 논문이 발표될 예정임.
- 생리활성물질의 구조 연구에 따른 생명 현상의 이해 등 기초과학 분야에 활용되며 계산화학의 분자설계 시스템 체계 및 화학구조에 대한 알고리즘 등 타 정보분야의 기술 개발에 적용

제 6 장 참고문헌

1. 권오령; 노경태 *화학세계*, **1996**, 36권 10호 20.
2. Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B. Eds. *Reviews in Computational Chemistry*, vol. 5, VCH Publishers, New York, **1994**, pp. 1-63.
3. Thompson, L. A.; Ellman, J. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 555.
4. Krstulovic, A. M. *J. Chrom. B* **1999**, 725, 1
5. Blundell, T.; Carney, D.; Gardner, S.; Hayes, F.; Howlin, B.; Hubbard, T.; Overington, J.; Singh, D. A.; Sibanda, B. L.; Sutcliffe, M. *Eur. J. Biochem.* **1988**, 172, 513.
6. Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J. B.; Meyer, E. F.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. *J. J. Mol. Biol.* **1977**, 112, 535.
7. McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. *Nature* **1977**, 267, 585.
8. DesJarlais, R. L.; Sheridan, R. P.; Seibel, G. L.; Dixon, J. S.; Kuntz, I. D.; Venkataraghavan, R. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 722.
9. Hansh, C.; Muir, R. M.; Fujita, T.; Maloney, P. P.; Gerger, F.; Streich, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2817.
10. Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansh, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2817.
11. Kubinyi, H. *3D QSAR in Drug Design Theory, Methods, and Applications* **1993**, ESCOM.
12. Diaz-Arauzo, H.; Kohler, K.; Hagen, T.; Cook, J. *Life Sciences* **1991**, 49, 207.
13. Wexler, R. R.; Greenlee, W. J.; Irvin, J. D.; Goldberg, M. R.; Prendergast, K.; Smith, R. D.; Timmermans, P. B. M. W. M. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 625.
14. Aguilar-Bryan, L.; Clement, J. P. IV; Gonzalez, G.; Kunjilwar, K.; Babenko, A.; Bryan, J. *Physio. Rev.* **1998**, 78, 227.
15. Robert, J. *Drugs of Future* **1997**, 22, 149

16. Burkert, U.; Allinger, N. L. *Molecular Mechanics*, ACS Monograph 177, **1983**, pp 4.
17. Fleming, I. *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions* John Wiley & Sons Ltd., **1976**, pp 5.
18. Cramer, R. D. III; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 110, 5959.
19. Foresman, J. B.; Frisch, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, Gaussian Inc. Pittsburgh, PA. **1996**, pp xxv.
20. Allinger, N. L. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1976**, 13, 1.
21. Allinger, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 8127.
22. Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8551.
23. Allinger, N. L.; Chen, K.; Lii, J.-H. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, 642.
24. Hagler, A. T.; Huler, E.; Lifson, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 5319.
25. Halgren, T. A.; Nachbar, R. B. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, 587.
26. Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Proteta, S.; Weiner, Jr. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 765.
27. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comput. Chem.* **1983**, 4, 187.
28. Nemethy, G.; Pottle, M. S.; Scheraga, H. A. *J. Phys. Chem.* **1983**, 87, 1883.
29. Howard, A.; McIver, J.; Collins, J. *HyperChem Computational Chemistry*, Hypercube Inc., **1994**, pp 53.
30. Metropolis, N.; Rosenbluth, A. W.; Rosenbluth, M. N., Teller, A. H.; Teller, E. *J. Chem. Phys.* **1953**, 32, 1087.
31. Bruccoleri, R. E.; Karplus, M. *Macromolecules*, **1985**, 18, 2767.
32. Beusen, D. D.; Berkley Shands, E. F. *Elsevier Trends Journals* **1996**, 429.
33. Li, Z.; Scheraga, H. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1983**, 80, 6611.
34. Vasquez, M.; Scheraga, H. A. *Biopolymers*, **1985**, 24, 1437.

35. Blaney, J. M.; Dixon, J. S.; Scheridan, R. P. *Distance geometry in molecular modeling In: Reviews in Computational Chemistry V*. Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B. (editors), **1994**, VCH Publishers, Inc., New York, p299.
36. Mccammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. *Nature (London)*, **1977**, 267, 585.
37. Sotomatsu, T.; Murata, Y.; Fujita, T. *J. Comput. Chem.* **1989**, 10, 94.
38. Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B. *Reviews in Computational Chemistry*, **1990**, VCH, New York, 337.
39. Moller, C.; Plesset, M. S. *Phys. Rev.* **1934**, 46, 618.
40. Gauss, J.; Cremer, D. *Adv. Quantum. Chem.* **1992**, 23, 205.
41. Pople, J. A.; Seeger, R.; Krishnan, R. *Int, J. Quant. Chem. Symp.* **1977**, 11, 149.
42. Hohenberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev.* **1964**, 136, B864.
43. Gruber, C.; Buss, V. *Chemosphere*, **1989**, 19, 1595.
44. Pople, J. A.; Santry, D. P.; Segal, G. A. *J. Chem. Phys.* **1965**, 43, S129.
45. Pople, J. A.; Beveridge, D. L.; Pobosh, P. A. *J. Chem. Phys.* **1967**, 47, 2026.
46. Bingham, R. C.; Dewar, M. J. S.; Lo, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1285.
47. Dewar, M. J. S.; Thiel, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 4899.
48. Anderson, W. P.; Edwards, W. D.; Zerner, M. C. *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 2728.
49. Dewar, M. J. S.; Zoenbis, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902.
50. Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **1989**, 10, 209.
51. Johnson, M. S.; Srinivasan, N.; Sowdhamini, R.; Blundell, T. L. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1994**, 29, 1.
52. Browne, W. J.; North, A. C. T.; Philips, D. C.; Brew, K.; Vanaman, T. C.; Hill, R. L. *J. Mol. Biol.* **1969**, 42, 65.

53. Sternberg, M. J. E. *Protein Structure Prediction A Practical Approach* Oxford University Press Inc., New York, **1996**, pp 15.
54. PIR (Protein Identification Resource); National Biomedical Research Foundation, Georgetown University Medical Center 3900, Reservoir Road NW Washington D. C., 20007 USA
55. GENBANK (genetic sequence data bank); Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM 87545, USA "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>"
56. EMBL (includes SWISSPROT and PROSITE); European Molecular Biology Laboratory Meyerhof Straße 1, D-6900, Heidelberg, Germany "<http://www.embl-heidelberg.de/>"
57. PDB (Protein Data Bank); Chemistry Department Building 555, Brookhaven National Laboratory Upton, New York, NY 11973, USA "<http://www.rscb.org.pdb/>"
58. Rohrer, D. C.; Fullerton, D. S.; Yoshioka, K. *Computer-Assisted Drug Design*, ACS Symposium Services, **1979**, 112, 259.
59. Borman, S. *Chem. Eng. News* **1990**, 68, 20.
60. Lipnick, R. L. *Trends Pharmacol. Sci.* **1986**, 7, 161.
61. Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. *Chem. Rev.* **1991**, 91, 165.
62. Hansch, C. *Acc. Chem. Res.* **1969**, 2, 232.
63. Kellogg, G. E.; Semus, S. F.; Abraham, D. J. *J. Comput.-Aided Molec. Design* **1991**, 5, 545.
64. Norinder, U. *J. Comput.-Aided Molec. Des.* **1991**, 5, 419.
65. Altomare, C.; Cellamare, S.; Carotti, A.; Casini, G.; Ferappi, M.; Gavuzzo, E.; Mazza, F.; Carrupt, P.-A.; Gaillard, P.; Testa, B. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 170.
66. Fauchere, J. L.; Quarendon, P.; Kaetterer, L. *J. Mol. Graph.* **1988**, 6, 202.
67. Kim, K. H., *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1993**, 12, 232.
68. Gilson, M.; Honig, B. *Nature*, **1987**, 330, 84.
69. Waller, C. L.; Marshall, G. R. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2390.

70. Kier, L. B.; Hall, L. H. *Advances in Drug Design* vol. 22, Testa, B. ed., Academic, Press, **1992**.
71. Glen, W. G.; Dunn III, W. J.; Scott, D. R. *Tetrahedron Computer Methodology* **1989**, 2, 349.
72. Stahle, L.; Wold, S. *Progr. Med. Chem.* **1988**, 25, 292.
73. Dillon, W. R.; Goldstein, M. *Multivariate Analysis: methods and applications*, John Wiley & Sons, New York, **1984**, pp 209.
74. Weisberg, S. *Applied Linear Regression*, John Wiley & Sons, New York, **1980**, pp 234.
75. Rogers, D.; Hopfinger, A. J. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1994**, 34, 1297.
76. Sealex, J. E.; Laragh, J. H. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* Laragh, J. H., Brenner, B. M., Eds., Raven Press, New York, **1990**, pp1287.
77. Schlambye, H. T.; Hjorth, S. A.; Bergsma, D. J.; Sathe, G.; Schwartz, T. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 7046.
78. Hjorth, S. A.; Schambye, H. T.; Greenlee, W. J.; Schwartz, T. W. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 30953.
79. Feng, Y-H.; Noda, K.; Saad, Y.; Liu, X-P.; Husain, A.; Karnik, S. S. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 12846.
80. Greenlee, W. J. *Med. Res. Rev.* **1990**, 10, 173.
81. McAreavey, D.; Robertson, J. I. S. *Drugs* **1990**, 40, 326.
82. Furukawa, Y.; Kishimoto, S.; Nishikawa, K. *US 4*, **1982**, 340, 598.
83. Wong, P. C.; Chiu, A. T.; Price, W. A.; Thoolen, M. J. M. C.; Carini, D. J.; Johnson, A. L.; Taber, R. I.; Timmermans, P. B. M. W. M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, 247.
84. Middlemiss, D.; Drew, G. M.; Ross, B. C.; Robertson, M. J.; Scopes, D. I. C.; Dowlee, M. D.; Akers, J.; Cardwell, K.; Clark, K. L.; Coote, S.; Eldred, C. D.; Hamblett, J.; Hilditch, A.; Hirst, G. C.; Jack, T.; Montana, J.; Panchal, T. A.; Patson, J. M. S.; Shah, P.; Stuart, G.; Travers, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, 1, 711.

85. Okubo, S.; Xi, L.; Bernardo, N. L.; Yoshida, K-i.; Kukreja, R. C. *Mol. Cell. Biochem.* **1999**, 196, 3.
86. Giblin, J. P.; Leaney, J. L.; Tinker, A. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 22652.
87. Atwal, K. S.; Grover, G. J.; Ahmed, S. Z.; Ferrara, F. N.; Harper, T. W.; Kim, K. S.; Sleph, P. G.; Dzwonczyk, S.; Russel, A. D.; Moveland, S.; McCullough, J. R.; Normandin, D. E. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 3971.
88. Atwal, K. S.; Grover, G. J.; Ferrara, F. N.; Ahmed, S. Z.; Sleph, P. G.; Dzwonczyk, S.; Normandin, D. E. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1966.
89. Atwal, K. S.; Grover, G. J.; Ahmed, S. Z.; Sleph, P. G.; Dzwonczyk, S.; Baird, A. J.; Normandin, D. E. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3236.
90. Atwal, K. S.; Ferrara, F. N.; Ding, C. Z.; Grover, G. J.; Sleph, P. G.; Dzwonczyk, S.; Baird, A. J.; Normandin, D. E. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 304.
91. Rovnyak, G. C.; Ahmed, S. Z.; Ding, C. Z.; Dzwonczyk, S.; Ferrara, F. N.; Humphreys, W. G.; Grover, G. J.; Santafianos, D.; Atwal, K. S.; Baird, A. J.; McLaughlin, L. G.; Normandin, D. E.; Sleph, P. G.; Traeger, S. C. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 24
92. Atwal, K. S.; Moreland, S.; McCullough, J. R.; O'Reilly, B. C.; Ahmed, S. Z.; Normandin, D. E. *Bioorg, Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 83.
93. Grover, G. J.; Newburger, J.; Sleph, P. G.; Dzwonczyk, S.; Taylor, S. C.; Ahmed, S. Z.; Atwal, K. S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, 257, 156.
94. Zaman, G. J. R.; Flens, M. J.; van Leusden, M. R.; de Haas, M.; Mulder, H. S.; Lankelma, J.; Pinedo, H. M.; Scheper, R. J.; Baas, F.; Broxterman, H. J.; Borst, P. *Proc, Natl, Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 8822.
95. Bellamy, W. T. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, 36, 161.
96. Robert, J. *Drugs of the Future* **1997**, 22, 149.
97. Sossin, W. S.; Fischer, J. M.; Scheller, R. H. *J. Cell. Biol.* **1990**, 110, 1.

98. Chanat, E.; Weiss, U.; Huttner, W. B.; Tooze, S. A. *EMBO J.* **1993**, *12*, 2159.
99. Loh, Y. P.; Snell, C. R.; Cool, D. R. *TEM* **1997**, *8*, 130.
100. Cool, D. R.; Normant, E.; Shen, F-s.; Chen, H-C.; Pannell, L.; Zhang, Y.; Loh, Y. P. *Cell* **1997**, *88*, 73.
101. Zhang, C-F.; Snell, C. R.; Loh, Y. P. *Mol. Endo.* **1999**, *13*, 527
102. Tripos Associates, Inc., 1699 S. Hanley Road, Suite 303, St. Louis, MO 63144-2913 USA, "<http://www.tripos.com/>"
103. Molecular Simulations Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA, "<http://www.msi.com/>"
104. Computer-Aided Chemistry, Oxford Molecular Group Inc., 11350 McLormick Road, Executive Plaza III, Suite 1100, Hunt Valley, MD 21030 USA, "<http://www.oxmol.com/>"
105. *Cerius² 3.0 QSAR manual*, MSI, **1997**, pp 47.
106. Yoo, S-e.; Kim, S-K.; Lee, S-H.; Yi, K. Y.; Lee, D-W. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2971.
107. Mavromoustakos, T.; Kolocouris, A.; Zervou, M.; Roumelioti, P.; Matsoukas, J.; Weisemann, R. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1714.
108. Shin, W.; Yoon, T-S.; Yoo, S-e. *Acta Cryst.* **1996**, c52, 1019.
109. Middlemiss, D.; Watson, S. P. *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 13049.
110. Carini, D. J.; Duncia, J. V.; Aldrich, P. E.; Chin, A. T.; Johnson, A. C.; Pierce, M. W.; Price, W. A.; Santella, J. B. III; Wells, G. J.; Wexler, R. R.; Wong, P. C.; Yoo, S-e.; Timmermans, P. B. M. W. M. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2525.
111. Duncia, J. V.; Chiu, A. T.; Carini, D. J.; Gregory, G. B.; Johnson, A. L.; Price, W. A.; Wells, G. J.; Wong, P. C.; Calabrese, J. C.; Timmermans, P. B. M. W. M. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1312.
112. Kubo, K.; Konara, Y.; Imamivi, E.; Sigiura, Y.; Inada, Y.; Furukawa, Y.; Nishikawa, K.; Naka, T. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2182.
113. Yoo, S. E.; Lee, S. H.; Kim, S. K.; Lee, S. H. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**,

- 5, 445.
114. Perlman, S.; Schambye, H. T.; Rivero, R. A.; Greenlee, W. J.; Hjorth, S. A.; Schwartz, T. W. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1493.
115. Huckle, W. R.; Kivlighn, S. D.; Zingaro, G. J.; Kevin, N.; Rivero, R. A.; Chang, R. S.; Greenlee, W. J.; Siegl, P. K. S.; Johnson, R. G. *Can J. Physiol. Pharmacol.* **1994**, *72*, 543.
116. Hjorth, S. A.; Schambye, H. T.; Greenlee, W. J.; Schwartz, T. W. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 30953.
117. Moore, G. J. *In Comprehensive Medicinal Chemistry*, Pergamon, New York, **1990**, Vol. 3., pp 961-980.
118. Urata, H.; Kinoshita, A.; Misono, K. S.; Bumpus, F. M.; Husain, A. J. *Biol. Chem.* **1990**, *265*, 22348.
119. Timmermans, P. B. M. W. M.; Benifield, P.; Chiu, A. T.; Herblin, W. F.; Wong, P. C.; Smith, R. D. *Am. J. Hypertension*, **1992**, *5*, 221S.
120. Weinkam, R. J.; Jorgensen, E. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 7038.
121. Bleich, H. E.; Galardy, R. E.; Printz, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2041.
122. Glickson, J. D.; Cunningham, W. D.; Marshall, G. R. *Biochemistry*, **1973**, *12*, 3684.
123. Deslauriers, R.; Paiva, A. C. M.; Schaumburg, K.; Smith, I. C. P. *Biochemistry*, **1975**, *14*, 878.
124. Lenkinski, R. E.; Stephens, R. L.; Krishna, N. R. *Biochemistry*, **1981**, *20*, 3122.
125. Femandjian, S., Morgat, J.-L.; Fromageot, P. *Eur. J. Biochem.* **1971**, *24*, 252.
126. Greff, D.; Femandjian, S.; Fromageot, P.; Khosla, M. C.; Smeby, R. R.; Bumpus, F. M. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *61*, 297.
127. Lintner, K.; Femandjian, S.; Fromageot, P.; Khosla, M. C.; Smeby, R. R.; Bumpus, F. M. *Biochemistry*, **1977**, *16*, 806.
128. Piriou, F.; Lintner, K.; Femandjian, S.; Fromageot, P.; Khosla, M. C.;

- Smeby, R. R.; Bumpus, F. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1980**, *77*, 82.
129. Femandjian, S.; Fromageot, P.; Titschenko, A.-M.; Leicknam, J.-P.; Lutz, M. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *28*, 174.
130. Sakarellos, C.; Lintner, K.; Piriou, F.; Femandjian, S. *Biopolymers*, **1983**, *22*, 663.
131. Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4412.
132. Marshall, G. R.; Bosshard, H. E. *Circ. Res.*, **1972**, 30-31 (suppl. II), 143.
133. De Coen, J.-L.; Ralston, E. *Biopolymers*, **1977**, *16*, 1929.
134. Marchionini, C.; Maignet, B.; Premilat, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *112*, 339.
135. Nikiforovich, G. V.; Kao, J. L.-F.; Plucincka, K.; Zhang, W. J.; Marshall, G. R. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 3591.
136. Nikiforovich, G. V.; Marshall, G. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *1*, 222.
137. Shin, Y. A.; Yoo, S-e. *Biopolymers*, **1996**, *38*, 183.
138. Printz, M. P.; Williams, H. P.; Craig, L. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1972**, *69*, 378.
139. Printz, M. P.; Nemethy, G.; Bleich, H. *Nature (London) New Biol.* **1972**, *237*, 135.
140. Schiller, P. W. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1980**, *16*, 259.
141. Smeby, R. R.; Arakawa, K.; Bumpus, F. M.; Marsh, M. M. *Biochim. Biophys. Acta*, **1962**, *28*, 550.
142. Garcia, K. C.; Ronco, P. M.; Verroust, P. J.; Brünger, A. T.; Amzel, L. *M. Science*, **1992**, *257*, 502.
143. Zamora, J. M.; Pearce, H. L.; Beck, W. T. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *33*, 454.
144. Choi, S. U.; Lee, B. H.; Kim, K. H.; Choi, E. J.; Park, S. H.; Shin, H. S.; Yoo, S. E.; Jung, N. P.; Lee, J. O. *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 4577.
145. Choi, S. U.; Lee, C. O.; Kim, K. H.; Choi, E. J.; Park, S. H.; Shin, H. S.; Yoo, S. E.; Jung, N. P.; Lee, B. H. *Anticancer Drugs* **1998**, *9*, 157.

146. Wexler, R. R.; Greenlee, W. J.; Irvin, J. D.; Goldberg, M. R.; Prendergast, K.; Smith, R. D.; Timmermans, P. B. M. W. M. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 625.
147. Prendergast, K.; Adams, K.; Greenlee, W. J.; Nachbar, R. B.; Patchett, A. A.; Underwood, J. *J. Comput.-Aided. Mol. Des.* **1994**, *8*, 491.
148. Ji, H.; Leung, M.; Zhang, Y.; Catt, K. J.; Sandberg, K. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16533.
149. Duncia, J. V.; Chin, A. T.; Carini, D. J.; Gregory, G. B.; Johnson, A. L.; Price, W. A.; Wells, G. J.; Wong, P. C.; Calabrese, J. C.; Timmermans, P. B. M. W. M. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1312.

PROGRESS REPORT

A. Subproject 1: Structural determinants of nonpeptide ligand recognition

The renin-angiotensin system (RAS) plays a critical role in the control of blood pressure and water-electrolyte homeostasis. Elevated blood levels of the peptide hormone, Ang II, is implicated in the pathophysiology of hypertension, congestive heart failure, coronary ischemia and renal insufficiency. Consequently, a major target site for drug intervention in treating many of these pathological conditions has focused on blockade of the RAS^{1,2}. Endothelins are another class of potent endogenous vasoconstrictor and pressor agents which play a key role in regulation of vascular function and have also been implicated in the pathophysiology of cardiovascular disease^{3,4}. Ang II and endothelin mediate their physiological effects by binding to receptors in the plasma membrane which belong to the peptide ligand subfamily of G protein-coupled receptors. Thus, the discovery of a dual Ang II and endothelin receptor antagonist, L-746,072, provides the intriguing possibility of developing a novel therapeutic agent for pathophysiological conditions involving Ang II and endothelin action⁵.

The development of nonpeptide ligands for peptide binding receptors has led to the interesting observation that structural determinants of peptide and nonpeptide ligand recognition are distinct⁶⁻⁹. We have investigated the structural determinants of nonpeptide ligand recognition on the Ang II receptor (AT receptor) by taking advantage of the pharmacological differences between mammalian and amphibian AT receptors. While receptors from both species recognize Ang II peptides with equivalent high affinities, amphibian AT receptors generally bind nonpeptide ligands with significantly lower affinity than mammalian AT receptors. Thus, site-directed mutagenesis in which amino acids are exchanged between mammalian and amphibian receptors, permits analysis of the role nonconserved amino acids play in nonpeptide ligand recognition in the AT receptor.

Interspecies amino acid exchange previously revealed thirteen nonconserved residues in the transmembrane (TM) domains that were crucial to the formation of the biphenylimidazole, Losartan, binding site on the rat type 1b AT (rAT_{1b}) receptor as evidenced by construction of a combinatorial amphibian mutant receptor, xCM46, which gained > 25,000-fold affinity for Losartan¹⁰. This variant frog receptor also gained significant affinity towards other biphenylimidazoles as well as members of the imidazoleacrylic acid class of AT₁-selective nonpeptides¹¹. These studies suggested that a common binding site for AT₁-selective nonpeptides is conserved within the TM domains of the AT₁ receptor.

In this study, we further explored this hypothesis by examining the binding determinants of a novel dual antagonist of the Ang II and endothelin receptor and compare these determinants with KR-31,016, a member of the biphenylimidazole class of AT₁-selective nonpeptides. Site-directed interspecies amino acid exchange was used to compare the binding determinants of a novel dual endothelial-angiotensin receptor ligand, L-746,072, with type-1 angiotensin receptor (AT₁) selective antagonists on AT receptors expressed in COS cells. These studies suggest that residues on AT receptors which are nonconserved between amphibian and mammalian species play a greater role in subtype selective ligand recognition than for dual receptor ligands. These data also support the hypothesis that a common nonpeptide binding site exists within transmembrane domains on peptidergic receptors.

Papers resulting from this project period (see Appendix #1)

Dascal, D., Nirula, V., Yoo, S.-e., Walsh, T.F. and K. Sandberg, "Shared determinants of receptor binding for subtype selective, and dual endothelin-angiotensin antagonists on the AT₁ angiotensin II receptor," FEBS Lett., 423: 15-18, 1998.

B. Subproject 2: Role of angiotensin AT₂ receptors in left ventricular remodeling

The octapeptide hormone angiotensin II (Ang II) plays a major role in the pathogenesis of hypertension^{12,13} and in the structural alterations of the heart and kidney such as left ventricular (LV) hypertrophy, remodeling after myocardial infarction (MI) and nephrosclerosis¹⁴⁻¹⁶. Two main AT receptor subtypes (AT₁ and AT₂) have been characterized, which can be distinguished on the basis of their different affinities for synthetic nonpeptide ligands.

The expression of these AT receptor subtypes is tissue-specific; some tissues express only one subtype while others express both¹⁷. However, the AT₁ receptor is the predominant receptor subtype found in the mammalian adult. Furthermore, most of the classic Ang II-mediated vasoconstrictive actions are mediated by AT₁ receptors, whereas less information is available regarding the physiological role of the AT₂ receptor and its signal-transduction pathway^{18,19}. In addition to tissue specificity, there is species variability as well. While AT receptor binding sites have been identified in the heart of many species²⁰, the ratio of the two receptor populations (AT₁/AT₂) varies enormously between species. In the rat ventricle membrane preparation, the AT₁ receptor is the major subtype expressed²¹. In contrast, the expression pattern of AT receptors in the human heart is quite different from that in the rat, and human adult hearts express substantial amounts of the AT₂ receptor¹⁸. The densities of AT₁ and AT₂ expression in normal human atria were 5 - 10 fmol/mg protein and in the LV were 3.8 - 17.3 fmol/mg protein, representing AT₂ as²² the dominant receptor subtype, amounting to about 70%^{23,24}.

Accumulating evidence suggests that AT₂ receptors play a role in tissue injury in the cardiovascular system²⁵. In the hypertrophied rat heart, the ratio of AT₂ to AT₁ receptor densities is increased compared to noninfarcted normal controls²⁶. Furthermore, the density of myocardial AT₂ receptors is increased in infarcted regions one day after MI. AT₂ receptor expression is further increased seven days after infarction in both the infarcted and noninfarcted regions²⁷. In humans, AT₂ receptor expression is increased in the right atrial biopsies from patients with coronary artery disease²² and in the right and left ventricles from patients with end-stage heart failure^{28,29}. In failing human heart, the relative ratio of AT₂ receptor expression to AT₁ receptors is also reported to be higher than in ventricular myocardium from normal heart^{29,30}. These results suggest that the AT₂ receptor plays a role in cardiovascular remodeling and the pathogenesis of myocardial hypertrophy and fibrosis.

We have previously used an ovine model of reproducible transmural anteroapical MI³¹ to study post-MI LV remodeling and have demonstrated regional differences in function³², sympathetic innervation³³, and cellular hypertrophy³⁴ within noninfarcted myocardium. We have shown that the combination of ACE inhibition and AT₁ receptor blockade is more effective at limiting LV remodeling than either therapy alone^{35,36}, although the mechanisms of the combined effect remain poorly understood. We hypothesized that alterations in AT₁ and AT₂ receptor numbers may relate to the beneficial effects of combined therapy.

In this study, we describe a method for measuring AT receptor expression in sheep heart as well as characterize the AT receptor subtype population in the heart after MI in tissue at the site of infarct and in areas adjacent and remote to the site of infarct using a LV membrane fraction. We also examine the regulation of AT receptor expression in this model during ACE inhibition and AT₁ receptor blockade alone and in combination. Two days after transmural anteroapical MI by coronary ligation, 16 sheep were randomized to losartan (50 mg/day), ramipril (10 mg/day), ramipril + losartan (combined therapy), or no therapy. At 8 weeks after MI, radioligand receptor assay were deployed with homogenates from regional LV tissues. We found that AT receptors in normal sheep myocardium are predominantly of the AT₂ receptor subtype. Binding studies of

remodeled myocardium 8 weeks later showed that the apparent maximum binding (B_{max}) was increased from 23 to 48 fmol/mg protein only in animals with combined therapy. The AT_2/AT_1 proportion was increased significantly in animals with combined therapy compared to infarcted controls (18.0 vs. 5.17). These results indicate that AT_2 receptor expression increased significantly during LV remodeling with combined therapy but not with either therapy alone. In combination with prior work demonstrating the effectiveness of combined therapy in limiting LV remodeling, this study is consistent with the hypothesis that AT_2 receptors play a cardioprotective role in LV remodeling after MI.

Papers resulting from this project period (see Appendix #2)

Lee, S., Kramer, C.M., Mankad, S., Yoo, S-e. and K. Sandberg, "Combined angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin AT_1 receptor blockade up-regulates myocardial AT_2 receptors in remodeled myocardium post-infarction," *Cardiovascular Res.*, *in press*.

C. Proposal 1: Investigate the effect of a nonpeptide AT receptor balanced affinity ligand in left ventricular remodeling

Rationale: Our previous work in an ovine model of nonreperfused myocardial infarction (MI) using magnetic resonance imaging (MRI) and myocardial tagging demonstrates that adjacent noninfarcted region dysfunction³² due to increased wall stress, local myocyte hypertrophy³⁴, and myocyte dysfunction³⁷, contributes significantly to LV remodeling. Therapies that limit adjacent region dysfunction also limit remodeling³⁸ the most potent of which we have studied to date is the combination of angiotensin converting enzyme inhibition (ACEI) and angiotensin II type 1 receptor (AT₁-R) blockade³⁹. This therapy is more potent at limiting remodeling than either ACEI or AT₁-R blockade alone. We have demonstrated that combination therapy is associated with an increase in angiotensin II type 2 receptor (AT₂-R) relative to AT₁-R, a phenomenon not seen with either therapy given alone⁴⁰. It is thought that the role of the AT₂-R is to negate the effects of angiotensin II-mediated growth signaling that occurs through the AT₁-R, thereby inhibiting remodeling.

Hypothesis: A balanced affinity ligand for the AT₁-R and AT₂-R would be more potent at limiting remodeling post-infarction than either ACE inhibition or AT₁-R blockade alone.

Proposal: To further elucidate the relative role of the AT₂-R relative to AT₁-R in attenuating LV remodeling, we propose to study a balanced affinity ligand for the AT₁-R and AT₂-R, such as a compound similar to L-163017. We would propose to study 4 groups of animals:

1. ACE inhibition alone (Ramipril 10 mg qd)
2. Balanced affinity ligand alone (dose to be determined)
3. Balanced affinity ligand plus ACE inhibition (doses as per 1 and 2 above)
4. ACE inhibition plus AT₁ blockade (Losartan 25 mg bid + Ramipril 10 mg qd)

Typically, in this model, statistically significant differences between groups can be demonstrated consistently with n=10. The dose of L-163017 or its equivalent would require a dose finding study - in a normal sheep, we would look for the dose that blunts by > 50% the pressor response to a 10 minute intravenous infusion of Ang II (at a dose which consistently increases mean arterial pressure by 30%). Typical doses might be in the range of 30-100 mg qd in a 30-35 kg sheep. The protocol would be as follows:

Day 0 -	Baseline MRI for measurement of LV size and function Surgery for coronary artery ligation and myocardial infarction
Day 2-	Pharmacologic therapy begun
Day 56 -	Final MRI Terminal study with tissue studies of angiotensin II, bradykinin, regional maximum receptor numbers and ligand affinity, receptor protein expression, and rates of AT ₁ -R and AT ₂ -R receptor transcription

Therefore, the animals receive 54 days of therapy x 30-100 mg per day = between 1.6 and 5.4 g of drug per animal to treat for the course of the study. As per the protocol above, a total of 20 animals would be treated with balanced affinity ligand.

Data Interpretation and Significance: If we find that L-163017 or another AT₁/AT₂ balanced affinity nonpeptide ligand abolishes the beneficial effects of combination therapy (with AT₁ receptor antagonists and ACE inhibitors) on left ventricular remodeling, then these data would strongly suggest that activation of the AT₂ receptor plays an important role in limiting LV remodeling. Thus, this study has the potential to provide rationale for developing AT₂ receptor specific nonpeptide agonists as an exciting new treatment strategy for patients after myocardial infarction.

D. Subproject 3: Effect of dietary sodium on canine AT₁ receptors

The angiotensin type 1 (AT₁) receptor is involved in the regulation of arterial blood pressure and mediates most physiological effects of angiotensin II (Ang II) such as stimulation of aldosterone secretion, vasoconstriction, regulation of water intake, renal blood flow, glomerular filtration, sodium and water reabsorption. AT₁ receptors have also been implicated in the pathogenesis of various types of arterial hypertension^{41,42} although their exact role and mechanism of involvement are largely unknown. Factors that influence AT₁ receptor regulation include dietary sodium, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, renal hypoperfusion, reduced renal mass, thyroid dysfunction, renal glomerular disease, acute unilateral ureteral obstruction, and aortic coarctation. Ang II helps maintain renal excretory function under extreme conditions such as hemorrhagic hypotension, dehydration, and renal artery stenosis⁴³. The AT₁ receptor is found in most tissues including the vessel wall, brain, lung, adrenal, liver and kidney.

A powerful determinant of rat AT₁ (rAT₁) receptor regulation is dietary sodium. Rat glomerular AT receptors down-regulate during sodium depletion and during administration of high doses of an Ang II infusion, and up-regulate during sodium loading^{44,45}. These actions are analogous to those in extrarenal smooth muscle. Administration of the ACE inhibitor, captopril, prevents glomerular rAT receptor down-regulation, indicating that this effect is mediated by Ang II. The ability of Ang II to modulate glomerular hemodynamics is reduced during sodium depletion and enhanced during sodium loading⁴⁵. These directional changes in rAT receptor expression correlate with the physiological changes in glomerular hemodynamics. In contrast, sodium depletion in rats up-regulates rAT₁ receptor expression in adrenal glomerulosa cells⁴⁶. Thus, a reciprocal mechanism of glomerular and adrenal receptor regulation exists in the rat kidney during changes in Ang II concentration. These observations in rats have been attributed to two cloned rAT₁ receptor subtypes (rAT_{1a}, rAT_{1b})^{47,48}, which are differentially regulated by dietary sodium⁴⁹.

The dog is an excellent animal model for investigating the physiology and pathophysiology of the human RAS. As found in humans, the dog has only one isoform of the AT₁ receptor. In fact, only one AT₁ receptor isoform has been identified in all other mammalian species cloned to date⁵⁰. Thus, mechanisms of AT₁ receptor regulation are not complicated by the differential regulation of AT₁ isoforms that are observed in rats and mice. There is also a wealth of information on the dog RAS because of extensive investigations into canine renal physiology and cardiovascular regulation⁵¹. Furthermore, dogs are well suited for *in vivo* studies with positron emission tomography (PET) because of the size and geometry of their organs. We are currently using the dog to image canine AT₁ (cAT₁) receptors in the kidney by PET and have found a strong correlation between PET and biochemical measurements of renal cAT₁ receptor regulation under a variety of conditions⁵². Thus, studying cAT₁ receptor regulation in the dog is likely to lead to human studies investigating the role of the RAS in various types of arterial hypertension since PET imaging is a very promising tool that can be used to elucidate normal and abnormal responses of the human AT₁ receptor under physiological and pathophysiological conditions. Since studies examining AT receptor regulation have been mainly characterized in rats and mice; it is not well known how the AT₁ receptor is regulated by the RAS in species possessing a single AT₁ receptor subtype.

In this study, we examined the effect of dietary sodium manipulation on cAT₁ receptor expression in order to gain a greater understanding of the role cAT₁ receptors play in renal responsiveness to changes in the RAS in a species that may be more pertinent to humans than rodents. Isolated glomeruli and membranes from renal medulla and the adrenal gland were used in radioligand binding assays from two groups of dogs: dogs maintained on low sodium diet for 2

weeks followed by high sodium diet for 2 weeks (H) and dogs maintained on the reverse schedule (L). Analysis of the binding data showed that dietary sodium manipulation had no significant effects on cAT₁ and cAT₂ receptor binding affinities in glomeruli, renal medulla and adrenal tissues. In contrast, dietary sodium loading induced a marked increase in cAT₁ receptor expression in both the glomeruli and adrenal compared to receptor expression in salt restricted animals [H/L Ratio: glomeruli (1.5); renal medulla (1.1); adrenal (1.6)] that inversely correlated with the activity of the plasma renin angiotensin system. Conversely, adrenal cAT₂ receptor expression was regulated in an inverse manner in the H and L animal groups [H/L Ratio: 0.7]. This study demonstrates that renal glomerular and adrenal AT₁ receptors in the dog are coordinately down regulated by dietary sodium restriction compared to sodium loading, which is distinctly different from the reciprocal regulation observed for rat AT₁ receptors in these tissues. Collectively, these data suggest that postreceptor events in dogs are determinants of the aldosterone response observed during sodium restriction. These findings have important implications for the regulation of the RAS in humans and suggest that coordinate regulation of AT₁ receptors in the adrenal and glomeruli represent a negative feed-back mechanism that, when functioning normally, prevents fluctuations of arterial blood pressure and development of arterial hypertension in response to changes in dietary sodium.

Papers resulting from this project period (see Appendix #3)

Zheng W, Ji H, Szabo Z, Brown PR, Yoo, S-e., Sandberg K: Coordinate Regulation of Canine Glomeruli and Adrenal Angiotensin Receptors by Dietary Sodium Manipulation. *Kidney Int.*, *in press*.

E. Subproject 4: Determination of AT₁ receptor regulation *in vivo* by PET

The renin angiotensin system (RAS), particularly the angiotensin II type 1 receptor (AT₁ receptor), plays an important role in regulating water and sodium reabsorption in the kidney. Investigations into *in vivo* dietary sodium regulation of renal AT₁ receptors have been hampered by the lack of an appropriate technique. Receptor-ligand binding assays, receptor autoradiography, quantitative polymerase chain reaction (PCR), and *in situ* hybridization are some of the biochemical and molecular techniques employed to examine AT₁ receptor regulation, but these methods require sacrifice of the animal. Thus, repeated measurements of receptor binding in the kidneys have not been possible in the same animal nor have these techniques been used for human studies.

To address this problem, we radiolabeled a series of nonpeptide AT₁ antagonists for positron emission tomography (PET) imaging of AT₁ receptors *in vivo*⁵³. We found that L-159,884, had particularly high selectivity and potency for the AT₁ receptor⁵⁴ and that radiolabeling L-159,884 with carbon 11⁵⁵ yielded excellent PET images of the AT₁ receptor in dog kidneys with high radioligand accumulation in the renal cortex⁵⁶.

We thus used the [¹¹C]L-159,994 ligand, to investigate the *in vivo* effects of dietary sodium on the renal cortical AT₁ receptor in the dog (dAT₁) and correlated the results with *ex vivo* assays of the dAT₁ receptor. A dog model was chosen for these studies for two reasons: 1) Dogs have been extensively used for investigations of renal physiology and cardiovascular regulation^{56,57} including physiological consequences of sodium depletion and loading⁵⁸⁻⁶⁰; 2) Dogs are a more appropriate model for humans than rodents because of the appropriate size, shape and position of their organs.

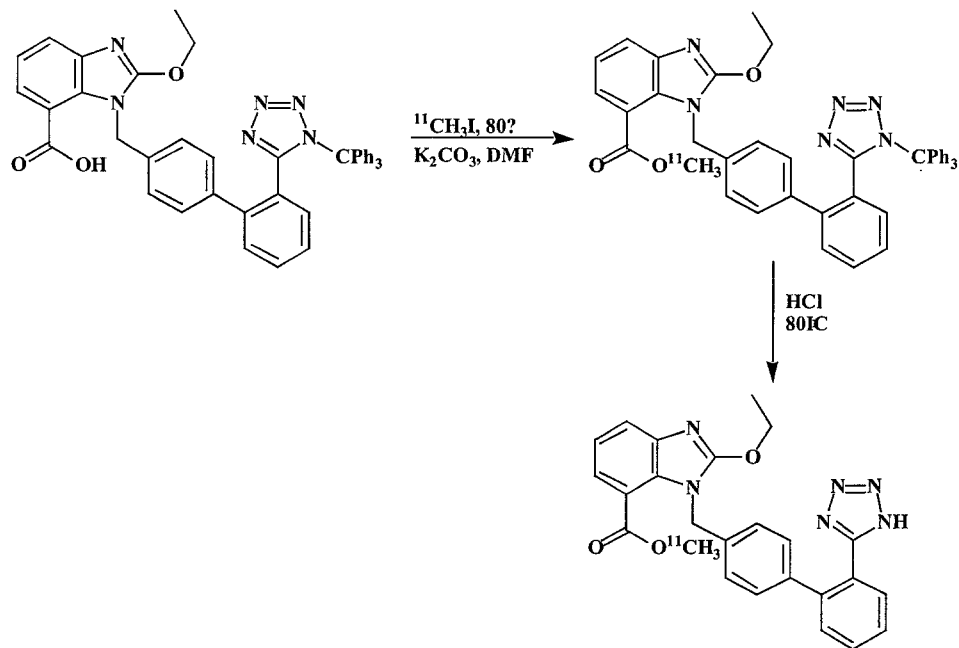
In this study, PET revealed that renal cortical AT₁ receptor binding was increased in sodium-loaded compared to sodium-deprived dogs, which correlated with *ex vivo* estimations of AT₁ receptor numbers. Plasma renin activity, angiotensin II and aldosterone were inversely related to changes in AT₁ receptor expression. These results demonstrate, for the first time *in vivo*, that AT₁ receptor expression is inversely related to the activity of the renin angiotensin system, which may provide a compensatory mechanism to prevent inappropriate fluctuations in arterial blood pressure. The ability to measure AT₁ receptor regulation *in vivo* has potential significance for clinical studies of AT₁ receptors, since PET is a noninvasive imaging technique readily applicable in humans.

Papers resulting from this project period (see Appendix #4)

Szabo Z, Speth RC, Brown PR, Kerenyi L, Mathews WB, Ravert HT, Hilton J, Finley P, Dannals RF, Zheng W, Lee S, Sandberg K: Use of Positron Emission Tomography to Study AT₁ Receptor Regulation *in vivo*. J Amer Soc Neph, *in press*.

F. Proposal 2: Develop an effective nonpeptide ligand suitable for investigating human AT₁ receptor regulation *in vivo*.

Rationale: In previous studies, Carbon-11 labeled Candesartan methyl ester (CME) was successfully prepared by reacting [¹¹C] methyl iodide with trityl protected Candesartan. The procedure used was as follows:



One-half mg (0.73 μmol) of trityl protected Candesartan was dissolved in 200 μL of DMF and added to a vial containing 0.7 mg (5.0 μmol) of potassium carbonate. The precursor solution was cooled to -78°C , and [¹¹C] methyl iodide was bubbled in until the radioactivity reached a plateau. The vial was removed from the dry ice bath and heated to 80°C for 2 minutes. The reaction mixture was then treated with 40 μL of 1N HCl and heated at 80°C for 2 minutes.

The solution was diluted with 200 μL of an acetonitrile:water mixture containing 0.1 M ammonium formate and injected onto a semi-preparative HPLC system. The column was eluted with an acetonitrile:water mixture containing 0.1 M ammonium formate. The radioactive peak corresponding to [¹¹C]-CME was collected in a rotary evaporator modified for remote addition and removal of solutions. The HPLC solvent was evaporated at 80°C under reduced pressure. After evaporation, the residue was dissolved in 5 mL of sterile saline and remotely transferred to a sterile, pyrogen-free bottle.

The average ($n=2$) time of synthesis, purification, and formulation was 26 minutes from end-of bombardment. [¹¹C]-CME was prepared with >99% radiochemical purity at an average specific activity of 13,100 mCi/ μmol at end-of-synthesis. The average non-decay corrected radiochemical yield was 5.4%.

Mouse Biodistribution Results for [¹¹C] Candesartan Methyl Ester

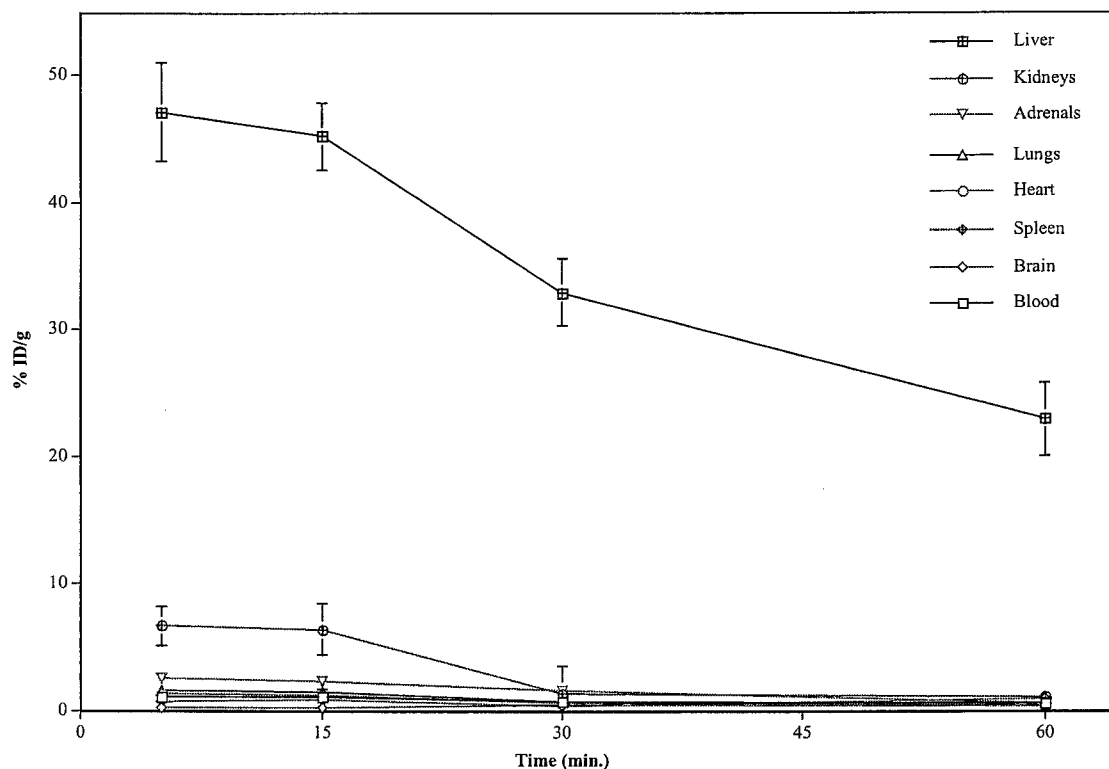
The regional kinetic biodistribution of [¹¹C] CME was determined in normal, non-fasted, male CD1 mice. The following method was used:

Three mice (25 g) were used per time point. Each mouse was injected with 300 μCi of [^{11}C] CME via the tail vein. Each mouse received 0.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of CME. The mice were sacrificed by cervical dislocation at 5, 15, 30, and 60 minutes post-injection. The organs were harvested, placed on ice, and weighed. Tissue radioactivity was measured and expressed as percent injected dose per gram of tissue.

As shown in Figure 1, there was very high uptake of [^{11}C] CME in the liver. There was significant binding in both the kidneys and adrenal glands at 5 and 15 minutes. However, the uptake of [^{11}C] CME in these target organs was completely washed out by 30 minutes post-injection. We interpret these results as evidence that [^{11}C] CME is rapidly metabolized to non-radioactive Candesartan in the liver.

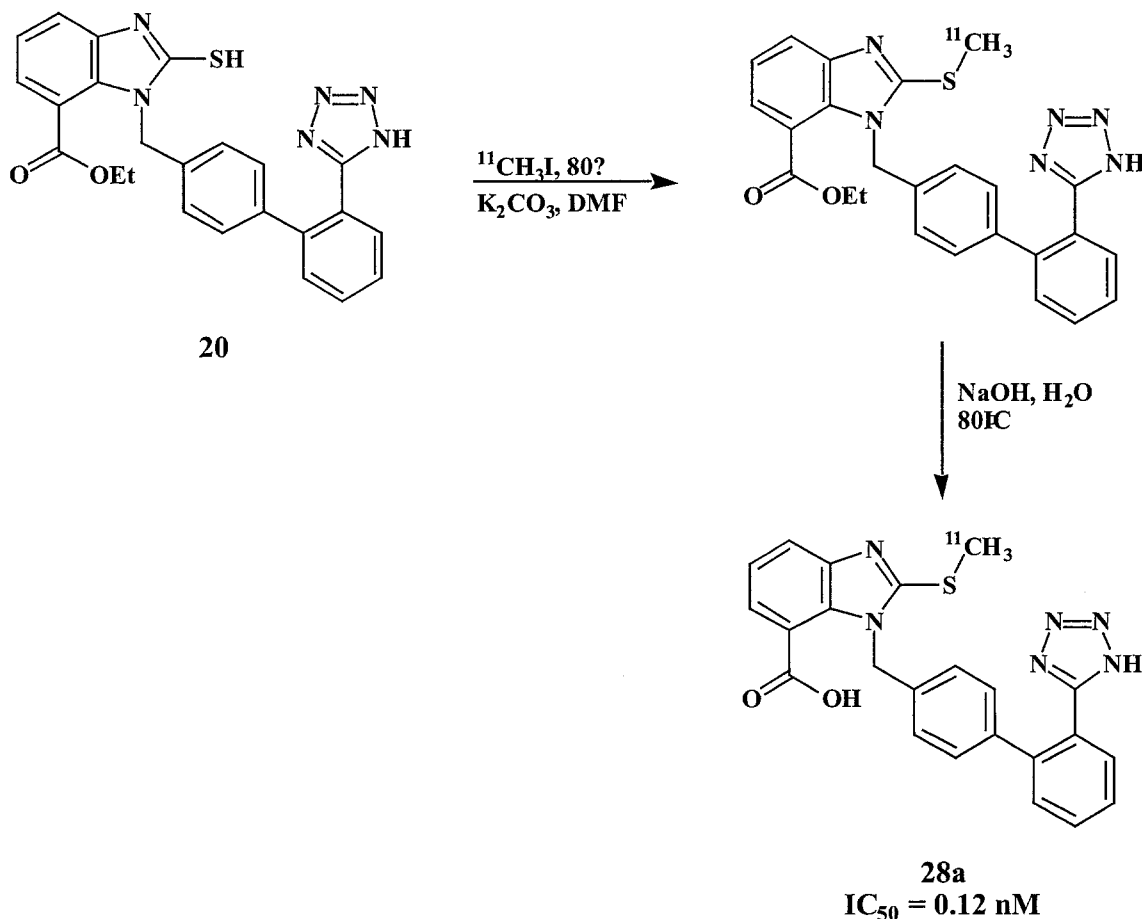
A blocking study was performed in mice as follows:

Three mice were injected intravenously with a 1 mg/kg dose of MK-996 thirty minutes before injection of the radiotracer. The mice were then injected with 300 μCi of [^{11}C] CME via the tail vein. Each mouse received 0.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of CME. The mice were sacrificed by cervical dislocation 30 minutes after injection of the radiotracer. As before, the organs were harvested, placed on ice, and weighed. Tissue radioactivity was measured and expressed as percent injected dose per gram of tissue. Since there was no significant uptake of [^{11}C] CME at 30 minutes post-injection, the results of the blocking study were inconclusive.



Proposal: Due to its rapid metabolism and high liver uptake, [^{11}C] CME is not a suitable radiotracer for *in vivo* imaging. Another analog of Candesartan with the radioactive label attached to a less labile position on the molecule is therefore required. Dr. Kubo's publication (*J. Med.*

Chem. **1993**, *36*, 2182-2195) indicates that minor substitutions at the 2-position of the benzimidazole ring do not adversely affect the binding of the ligand. After reviewing the compounds listed in this paper, we have determined that a better *in vivo* radiotracer would be the [^{11}C] S-methyl thioether **28a**. This ligand could be radiolabeled by reacting the partially protected free thiol **20** with [^{11}C] methyl iodide. Although we may obtain a mixture of products, they should be easily separated by semi-preparative HPLC.



Data Interpretation and Significance: If we are successful in synthesizing a PET nonpeptide ligand that is more suitable for measuring AT_1 angiotensin receptor expression *in vivo*, then we would proceed initially to animal studies and then as soon as possible move on to human studies after appropriate approvals. The value of PET is that it is a noninvasive imaging technique. Therefore, we could use PET for screening subpopulations of patients to determine if renal AT_1 receptors respond appropriately to conditions which alter the renin angiotensin system. Thus PET could be used as a diagnostic technique for diseases such as hypertension and renal artery stenosis. These studies will also provide never before attained mechanistic information regarding how AT_1 receptors are regulated *in vivo* in humans.

G. Literature Cited

1. Corvol, P., Jeunemaitre, X., Charru, A., Kotelevtsev, Y. & Soubrier, F. Role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation and in human hypertension: new insights from molecular genetics. *Recent Prog Horm Res* **50**, 287-308 (1995).
2. Teerlink, J.R. Neurohumoral mechanisms in heart failure: a central role for the renin-angiotensin system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **27**, S1-S8 (1996).
3. Ferro, C.J. & Webb, D.J. The clinical potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular medicine. *Drugs* **51**, 12-27 (1996).
4. Gray, G.A. & Webb, D.J. The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* **72**, 109-148 (1996).
5. Walsh, T. et al. Potent dual antagonists of endothelin and angiotensin II receptors derived from α -phenoxyphenylacetic acids. *Bioorganic Med. Chem. Letters.* **5**, 1155-1158 (1995).
6. Schwartz, T.W. Locating ligand binding sites in 7TM receptors by protein engineering. *Curr. Opin. Biotech.* **5**, 434-444 (1994).
7. Beinborn, M., Lee, Y.-M., McBride, E.W., Quinn, S.M. and A.S. Kopin. A single amino acid of the cholecystokinin-B/gastrin receptor determines specificity for non-peptide antagonists. *Nature* **362**, 348-350 (1993).
8. Fong, T.M., Cascieri, M.A., Yu, H., Bansal, A., Swain, C. and C.D. Strader. Amino-aromatic interaction between histidine 197 of the neurokinin-1 receptor and CP 96345. *Nature* **362**, 350-353 (1993).
9. Zoffmann, S., Gether, U. and T.W. Schwartz. Conserved His^{VI-17} of the NK-1 receptor is involved in binding of non-peptide antagonists but not substance P. *FEBS Lett.* **336**, 506-510 (1993).
10. Ji, H., Zheng, W., Zhang, Y., Catt, K.J. & Sandberg, K. Genetic transfer of a nonpeptide binding site to a previously unresponsive angiotensin II receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9240-9244 (1995).
11. Nirula, V., Zheng, W., Krishnamurthi, K. & Sandberg, K. Identification of amino acids in the AT₁ receptor which comprise a general binding site for biphenylimidazole antagonists. *FEBS Lett.* **394**, 361-364 (1996).
12. Willenheimer, R., Dahlof, B., Rydberg, E. & Erhardt, L. AT₁-receptor blockers in hypertension and heart failure: clinical experience and future directions. *Eur Heart J* **20**, 997-1008. (1999).
13. Birkenhager, W.H. & de Leeuw, P.W. Non-peptide angiotensin type 1 receptor antagonists in the treatment of hypertension. *J Hypertens* **17**, 873-81. (1999).
14. Chung, O., Kuhl, H., Stoll, M. & Unger, T. Physiological and pharmacological implications of AT₁ versus AT₂ receptors. *Kidney Int Suppl* **67**, S95-9 (1998).
15. Sander, G.E., McKinnie, J.J., Greenberg, S.S. & Giles, T.D. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in the treatment of heart failure caused by left ventricular systolic dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis* **41**, 265-300. (1999).
16. Brunner-La Rocca, H.P., Vaddadi, G. & Esler, M.D. Recent insight into therapy of congestive heart failure: focus on ACE inhibition and angiotensin-II antagonism. *J Am Coll Cardiol* **33**, 1163-73. (1999).
17. Timmermans, P.B.M.W.M. et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* **45**, 205-251 (1993).
18. Matsubara, H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* **83**, 1182-91 (1998).

19. de Gasparo, M. & Siragy, H.M. The AT₂ receptor: fact, fancy and fantasy. *Regulatory Peptides* **81**, 11-24 (1999).
20. Baker, K.M., Booz, G.W. & Dostal, D.E. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* **54**, 227-41 (1992).
21. Chang, R.S. & Lotti, V.J. Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: relative distribution and species dependency. *Life Sci* **49**, 1485-90 (1991).
22. Brink, M. et al. Localization of the angiotensin II receptor subtypes in the human atrium. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 1789-99. (1996).
23. Regitz-Zagrosek, V. et al. Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation* **91**, 1461-71 (1995).
24. Tsutsumi, Y. et al. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res* **83**, 1035-46. (1998).
25. Xoriuchi, M., Hamai, M., Cui, T.X., Iwai, M. & Minokoshi, Y. Cross talk between angiotensin II type 1 and type 2 receptors: cellular mechanism of angiotensin type 2 receptor-mediated cell growth inhibition. *Hypertens Res* **22**, 67-74. (1999).
26. Lopez, J.J. et al. Distribution and function of cardiac angiotensin AT₁- and AT₂-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol* **267**, H844-52. (1994).
27. Nio, Y., Matsubara, H., Murasawa, S., Kanasaki, M. & Inada, M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* **95**, 46-54 (1995).
28. Regitz-Zagrosek, V. et al. Subtype 2 and atypical angiotensin receptors in the human heart. *Basic Res Cardiol* **91**, 73-7. (1996).
29. Wharton, J. et al. Differential distribution of angiotensin AT₂ receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther* **284**, 323-36 (1998).
30. Haywood, G.A. et al. AT₁ and AT₂ angiotensin receptor gene expression in human heart failure. *Circulation* **95**, 1201-6. (1997).
31. Markovitz, L.J. et al. Large animal model of left ventricular aneurysm. *Ann Thorac Surg* **48**, 838-45. (1989).
32. Kramer, C.M. et al. Regional differences in function within noninfarcted myocardium during left ventricular remodeling. *Circulation* **88**, 1279-88. (1993).
33. Kramer, C.M. et al. Reduced sympathetic innervation underlies adjacent noninfarcted region dysfunction during left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol* **30**, 1079-85. (1997).
34. Kramer, C.M. et al. Regional myocyte hypertrophy parallels regional myocardial dysfunction during post-infarct remodeling. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 1773-8. (1998).
35. Mankad, S. et al. Angiotensin II receptor blockade adds to attenuation of post-infarction remodeling. *Circulation* **98**, I552a (1998).
36. Mankad, S. et al. Angiotensin II receptor antagonism alone does not limit post-infarction LV remodeling. *J Am Coll Cardiol* **35**, abstract (2000).
37. Kim, Y.-K., Kramer, C.M. & Tagaki, G. Alteration of excitation-contraction coupling in myocytes from the peri-infarct region after chronic myocardial infarction in sheep. *Circulation* **100**, I-273a (1999).
38. Kramer, C.M. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition limits dysfunction in adjacent noninfarcted regions during left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol* **27**, 211-7. (1996).
39. Mankad, S., d'Amato, T. & Reichel, N. Combining angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin AT₁ receptor blockade up-regulates myocardial AT₂ receptors in remodeled myocardium post-infarction. *Circulation*, (in press).

40. Lee, S., Kramer, C.M., Mankad, S., Yoo, S.-E. & Sandberg, K. Combined angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin AT1 receptor blockade up-regulates myocardial AT2 receptors in remodeled myocardium post-infarction. *Cardiovasc. Res.*,(in press).
41. Bernstein, K.E. & Alexander, R.W. Counterpoint: Molecular analysis of the angiotensin II receptor. *Endocr Rev* **13**, 381-386 (1992).
42. Griendling, K.K., Murphy, T.J. & Alexander, R.W. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* **87**, 1816-1828 (1993).
43. Grone, H.J., Simon, M. & Fuchs, E. Autoradiographic characterization of angiotensin receptor subtypes in fetal and adult human kidney. *Am J Physiol* **262**, F326-F331 (1992).
44. Skorecki, K.L., Ballermann, B.J., Rennke, H.J. & Brenner, B.M. Angiotensin receptor regulation in isolated renal glomeruli. *Fed. Proc.* **42**, 3064-3070 (1983).
45. Ballermann, B.J., Skorecki, K.L. & Brenner, B.M. Reduced glomerular angiotensin II receptor density in early and untreated diabetes mellitus in the rat. *Am J Physiol* **247**, F110-F116 (1984).
46. Douglas, J. & Catt, K.J. Regulation of angiotensin II receptors in the rat adrenal cortex by dietary electrolytes. *J Clin Invest* **58**, 834-43 (1976).
47. Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griendling, K.K., Runge, M.S. and K.E. Bernstein. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351**, 233-236 (1991).
48. Sandberg, K., Ji, H., Clark, A.J., Shapira, H. & Catt, K. Cloning and expression of a novel rat angiotensin II receptor subtype. *J. Biol. Chem.* **267**, 9455-9458 (1992).
49. Sandberg, K., Ji, H. & Catt, K.J. Regulation of angiotensin II receptors in the rat brain during dietary sodium changes. *Hypertension* **23**, 1137-141 (1994).
50. Burns, L., Clark, K.L., Bradley, J., Robertson, M.J. and A.J.L. Clark. Molecular cloning of the canine angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* **343**, 146-150 (1994).
51. Hanstein, B., Liu, H., Yancisin, M.C. & Brown, M. Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol* **13**, 129-37 (1999).
52. Szabo, Z. et al. Use of position emission tomography to study AT1 receptor regulation in vivo. *J Amver Soc Neph, in press* (2001).
53. Mathews, W. et al. Carbon-11 labeling of nonpeptide angiotensin-II antagonists: MK-996 and analogs. *J Nucl med* **35**, 6Pa (1994).
54. Kim, S.E. et al. In vivo labeling of angiotensin II receptors with a carbon-11-labeled selective nonpeptide antagonist. *J Nucl Med* **37**, 307-11. (1996).
55. Hamill, T.G. et al. Development of [¹¹C]L-159,884: a radiolabelled, nonpeptide angiotensin II antagonist that is useful for angiotensin II, AT1 receptor imaging. *Appl Radiat Isot* **47**, 211-8. (1996).
56. Szabo, Z. et al. Investigation of angiotensin II/AT1 receptors with carbon-11-L-159,884: a selective AT1 antagonist. *J Nucl Med* **39**, 1209-13. (1998).
57. Cohn, J.N., Velasquez, M.T., Notargiacomo, A. & Khatri, I.M. Cortical blood flow, cortical fraction, and cortical blood volume in the dog kidney. *Am J Physiol* **221**, 877-82. (1971).
58. Bunag, R.D., Page, I.H. & McCubbin, J.W. Influence of dietary sodium on stimuli causing renin release. *Am J Physiol* **211**, 1383-6 (1966).
59. McCaa, R.E. Role of the renin-angiotensin system in the regulation of aldosterone biosynthesis and arterial pressure during sodium deficiency. *Circ. Res. Suppl. I*, **40**, I-157-I-162 (1977).

60. Fray, J.C., Johnson, M.D. & Barger, A.C. Renin release and pressor response to renal arterial hypotension: effect of dietary sodium. *Am J Physiol* **233**, H191-5. (1977).