

## 안지오텐신 변환효소 억제작용물질의 합성 (II)

윤혜숙 · 이종란 · 이희주\* · 윤성미\* · 이 선\*

서울대학교 생약연구소, \*덕성여자대학교 약학과

(Received December 10, 1986)

### Synthesis of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors (II)

Hye Sook Yun-Choi, Jong Ran Lee, Hee Joo Lee\*, Sung Mee Yun\* and Sun Lee\*

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110 and

\*Department of Pharmacy, Duksung Woman's College, Seoul 132, Korea.

**Abstract**—The preparation of substituted benzoylamino acids and mercaptoacylamino acids as inhibitors of angiotensin converting enzyme is described. The bulky phenyl ring directly attached to an amino acid as of benzoylamino acid seemed unsuitable for the inhibitory activities. Among the mercaptosuccinylamino acids, L-proline was more favorable than L-phenylalanine while S-acetylation was unfavorable.

레닌-안지오텐신(renin-angiotensin) system이 생체의 혈압조절에 매우 중요한 역할을 함은 주지의 사실이다. 특히 안지오텐신 변환효소(Angiotensin Converting Enzyme, ACE, EC 3.4.15.1)는 레닌에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I으로 부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해 시킴으로서 강력한 혈관수축작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이다. 생성된 angiotensin II는 강력한 혈관수축작용을 갖으며 adrenal cortex에서 aldosterone의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제한다. ACE는 또한 혈관이완작용을 가진 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화 시킴으로서 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다.<sup>1-5)</sup> ACE는 이외에 enkephalins, neurotensin, substance-P 등의 심혈관계에 작용하는 neuropeptide들의 분해에도 또한 관여한다.<sup>6-9)</sup>

1970년대 중반 ACE 저해작용을 갖는 nonapeptide인 tetrotide가 브라질산 뱀인 *Bothrops jaraca*의 독으로부터 분리되었으며 tetrotide는 고 renin증 고혈압 환자에서 뿐만아니라 정상인에

서도 현저한 혈압강하 작용을 갖음이 밝혀짐으로서<sup>10-12)</sup> ACE 억제제들의 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시된 후 많은 ACE 저해제들이 합성되었다.<sup>13,14)</sup>

ACE는 활성부위에 Zn<sup>++</sup>을 함유하는 metallopeptidase로서 다른 zinc metallopeptidase들 특히 carboxypeptidase A와의 유사점 등을 감안하여 Ondetti 등이 ACE 억제제들을 design하였으며 이들 중 mercaptoacylamino acid들이 강력한 억제작용을 나타냄으로서 이들이 ACE의 활성부위에서 1) 말단의 carboxyl 기가 cationic site와 ionic 결합을 하고, 2) sulfhydryl 기가 ACE의 Zn<sup>++</sup>과 강력히 결합하여, 이들 결합이 3) 말단의 peptidyl amide기에 의한 수소결합 및 4) side chain의 liphophilic pocket에서의 결합 등에 의해 보강됨으로서 강력한 억제작용을 갖음을 추정하였다.<sup>15-17)</sup> 이들 mercaptoacylamino acid계 억제제들중 특히 captopril(I, D-3-mercapto-2-methylpropanoyl-L-proline)은 입상에 적용되고 있으며, 그 결과 종래의 혈압강하제로는 치료되지 않던 심한 고혈압증에도 좋은 효과를 보이고 있으며, 중추신경 또는 교감신경계에 작



를 제거하고, 감압농축하여 3-acetoxybenzoic acid-NHS ester를 얻었으며 IR( $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1770, 1740, 1580 $\text{cm}^{-1}$ )로 확인한 후 다음 반응에 이용하였다.

**N-(3-Hydroxybenzoyl)-L-proline (1)의 합성**—L-Proline(0.63g, 5.5mmole)과  $\text{NaHCO}_3$ (0.7g)을 증류수(20ml)에 용해시킨 다음 빙욕상에서 교반하면서 3-acetoxybenzoic acid-NHS ester의 THF 용액을 소량씩 적가하였다. 상온에서 하룻밤 방치한 후 반응액을 ether로 세척하고 수용액을 citric acid로 pH 3으로 조절하였다. EtOAc로 수회추출하고 감압증류하여 용매를 제거한 뒤 잔액을 EtOH(20ml)에 용해시키고 1N-NaOH(10ml)를 가해 상온에서 하룻밤 가수분해시켰다. 반응액을 ether로 세척하고 수층을 citric acid로 pH 2~3로 조절한 다음 EtOAc로 수회 추출하였다. 추출액을 NaCl 포화수용액으로 1회 세척하고  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 가해 2시간 방치하여 탈수 건조시켰다. 감압증류하여 용매를 제거하고 농축액을 소량의 EtOAc로 녹인 다음  $\text{CHCl}_3$ -ether 용액으로 처리하여 N-(3-hydroxybenzoyl)-L-proline (1)을 결정으로 얻었다. m.p. 110°C; IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  1700(COOH), 1570(CONH)  $\text{cm}^{-1}$ ; NMR(DMSO- $d_6$ + $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.7~2.2(m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.4(t, J=5.6Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 4.15~4.45(m, 1H,  $\text{NCH}$ ), 6.75~7.3(m, 4H, aromatic).

**N-(3-Hydroxybenzoyl)-L-phenylalanine (2)의 합성**—L-Phenylalanine(0.91g, 5.5mmole)과  $\text{NaHCO}_3$ (0.93g)을  $\text{H}_2\text{O}$ -dioxane(20ml-5ml)에 녹인 후, 빙욕상에서 냉각 교반시키면서, 3-acetoxybenzoic acid-NHS ester의 THF 용액을 서서히 가해주었다. 약 5시간 방치한 후 유기용매를 제거하고 반응액에 1N-NaOH액을 가해 pH 10으로 조절하여 상온에서 4시간 가수분해시켰다. 수용액을 ether로 세척하고 citric acid로 pH 2~3으로 한 후 EtOAc로 추출하였다. 추출액을 NaCl 포화수용액으로 세척·건조한 후 감압증류하여 용매를 제거하였다. 잔사를 silica gel column을 이용 10% MeOH- $\text{CHCl}_3$  용매로 elution 하여 얻은 물질을 ether-hexane 용매로 처리하여

화합물 2을 얻었다. m.p.; 82°C, IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  1710(COOH), 1640(CONH)  $\text{cm}^{-1}$ , NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2.9~3.4(m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.25~4.7(m, 1H, CH), 6.75~7.4(m, 9H, aromatic), 8.45(d, J=8Hz, 1H, NH).

**Ethyl NHS Isophthalate의 합성**—Isophthalic acid(10g, 0.06mole)를 EtOH(20 ml)와  $\text{c-H}_2\text{SO}_4$ (5ml)에 용해시키고 교반하면서 4시간 reflux시킨 다음 반응액에 냉 증류수(40ml)를 가해 다량의 백색 침전을 얻었다. (monoester와 diester의 혼합물) 이 침전을  $\text{CHCl}_3$ (100ml)에 용해시키고, d- $\text{NaHCO}_3$  용액으로 추출한 후 이를 d-HCl로 pH 3으로 조절하여 백색침전의 monoethyl ester를 얻었다. 한편  $\text{CHCl}_3$  층(isophthalic acid의 diester)은 감압증류하여 용매를 제거하고 EtOH(30ml)을 가해 용해시켰다. 냉각된 1N-NaOH(30ml)를 가해 상온에서 1시간 교반하고, 60°C 수욕상에서 하룻밤 방치하여 diester을 monoester로 전환시킨 후 반응액을  $\text{CHCl}_3$ 로 세척하고 d-HCl로 pH 3~4로 조절하여 백색 침전 isophthalic acid monoethylester를 얻었으며 이를 위에서 얻은 mono-ester의 침전과 합쳐 EtOH- $\text{H}_2\text{O}$ 로 재결정하였다. m.p. 124°C, IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1710, 1670.  $\text{cm}^{-1}$ . Isophthalic acid의 monoethylester(2.1g, 0.01 mole)와 NHS(1.15g, 0.01 mole)를  $\text{CHCl}_3$ (30ml)에 용해시킨 다음 DCC(2.1g, 0.01mole)의  $\text{CHCl}_3$ (15ml) 용액을 빙욕상에서 소량씩 적가한 후 하룻밤 동안 방치하였다. 반응액을 냉각시켜 침전(DCU)을 여과하고, 용매를 감압증류로 제거한 다음 잔액을 THF(15ml)로 처리하여 ethyl NHS isophthalate를 얻었으며 이를 다음 반응에 사용하였다.

**N-(Isophthalyl)-L-proline (3)의 합성**—L-Proline(0.58g, 5.04mmole)과  $\text{NaHCO}_3$ (0.84g)를 증류수(20ml)에 용해시키고 냉각하면서 ethyl NHS isophthalate(1.45g, 5mmole)의 THF용액을 서서히 가하였다. 상온에서 교반하면서 하룻밤 방치한 후 1N-NaOH를 가해 60°C에서 2시간 가수분해시켰다. 용매를 감압증류하여 제거하고 수용액을 ether로 세척한 다음 citric acid로 pH 2~3으로 조절한 후 EtOAc로 추출하였다. 이를

NaCl 포화수용액으로 세척, 건조한 다음 감압증류하여 용매를 제거하고 잔액을 진공건조하여 N-(isophthalyl)-L-proline(3)을 얻었다. m.p. 75~76°C; IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  1700(COOH), 1610(CONH)  $\text{cm}^{-1}$ ; NMR(CDCl<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O)  $\delta$  1.9~2.4(m, 4H, HC<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 3.57(t, J=6, 3Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.75(t, J=6.1Hz, 1H, CH), 7.25~8.25(m, 4H, aromatic).

**N-(Isophthalyl)-L-phenylalanine (4)의 합성**—L-Phenylalanine(1.65 g, 0.01 mole)과 NaHCO<sub>3</sub>(1.6g)을 H<sub>2</sub>O-THF 혼합용매(20-10ml)에 용해시킨 다음 상온에서 교반하여서 ethyl NHS isophthalate(2.9g, 0.01mole)의 THF 용액을 소량씩 가하고 하룻밤 방치한 후 1N-NaOH를 가해 pH 10으로 조절하여 3시간 가수분해시켰다. 감압하에서 용매를 제거한 다음 수용액을 ether로 세척하고 citric acid로 pH 3으로 조절하였다. EtOAc로 추출하여 추출액을 NaCl 포화용액으로 세척한 다음 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가해 2시간 방치하여 탈수 건조시켰다. 용매를 감압증류하여 제거하고, 잔액을 silicagel column에서 20% MeOH-CHCl<sub>3</sub>로 elution 시켜 분리, 정제하고 ether-hexane으로 처리하여 N-(isophthalyl)-L-phenylalanine (4)을 얻었다. m.p. 145°C; IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  1700(COOH), 1650(CONH)  $\text{cm}^{-1}$ ; NMR(DMSO+d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O)  $\delta$  2.95~3.2(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.45~4.75(m, 1H, CH), 7.2(s, 5H, aromatic) 7.4~8.25(m, 4H, aromatic).

**Homophthalic anhydride의 합성**—Homophthalic acid(5.4g, 0.03mole)를 THF(20ml)에 녹이고 냉각시키면서 DCC(6.2 g, 0.03 mole)의 THF 용액(15ml)을 서서히 가해 주었다. 냉수욕 상에서 3시간 교반한 후 상온에서 하룻밤 방치하고 침전(DCU)은 여과 제거하였다. 감압증류하여 용매를 제거하고 상온에서 오래 방치하니 결정화하였으며(m.p. 140~142°C) IR 확인 후( $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1750, 1600 $\text{cm}^{-1}$ ) 다음 반응에 그대로 이용하였다.

**N-(Homophthalyl)-L-proline (5)의 합성**—L-Proline(2.33g, 0.02mole)과 NaHCO<sub>3</sub>(2.5g)를 증류수(20ml)에 용해시키고, 빙욕 상에서

homophthalic anhydride(3.24g, 0.02mole)의 THF 용액(15ml)을 서서히 가하고 하룻밤 방치하였다. 감압증류로 용매를 제거한 후 수용액을 ether로 세척하고 citric acid로 pH 3으로 조절한 후 EtOAc로 추출하였다. EtOAc 용액을 NaCl 포화수용액으로 세척·건조하여 용매를 제거한 후 잔사를 ether로 처리하여 N-(homophthalyl)-L-proline (5)을 얻었다. m.p. 82°C; IR  $\nu_{\max}^{\text{CDCl}_3}$  1700(COOH), 1640(CONH)  $\text{cm}^{-1}$ ; NMR(DMSO-d<sub>6</sub>+CDCl<sub>3</sub>) $\delta$  1.8~2.3(m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.9~4.25(m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.0(s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4.4~4.65(m, 1H, NCH), 7.15~8.0(m, 4H, aromatic).

**N-(Homophthalyl)-L-phenylalanine (6)의 합성**—L-Phenylalanine(3.3g, 0.02mole)과 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(3.2g)를 THF-증류수 혼합용액(5ml~20ml)에 용해시킨 후, 빙욕상에서 교반하면서 homophthalic anhydride(3.24g, 0.02mole)의 THF(15ml) 용액을 서서히 가하고 하룻밤 방치하였다. 용매를 감압증류 제거한 후 수용액을 ether로 세척하고 citric acid를 가해 pH2~3으로 조절하고 EtOAc로 추출하였다. EtOAc 층을 NaCl 포화수용액으로 세척·건조시키고 감압증류하여 용매를 제거하였다. 잔사를 silica gel column에서 15% MeOH-CHCl<sub>3</sub>로 용출시켜 분리하고 EtOAc-ether로 처리하여 N-(homophthalyl)-L-phenylalanine (6)을 얻었다. m.p. 196°C; IR  $\nu_{\max}^{\text{CDCl}_3}$  1700(COOH), 1660(CONH)  $\text{cm}^{-1}$ ; NMR(DMSO-d<sub>6</sub>+CDCl<sub>3</sub>-D<sub>2</sub>O)  $\delta$  2.8~3.1(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.84(s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 4.45~4.75(m, 1H, CH), 6.75~8.0(m, 9H, aromatic).

**N-(2-Mecaptobenzoyl)-L-phenylalanine(7)의 합성**—Thiosalicylic acid(3g, 0.02mole)을 2.5 N NaOH alkali 용액에 완전히 녹인 후 빙욕 상에서 교반하면서 과량의 acetic anhydride를 서서히 가해주었다. pH는 8 정도를 유지하면서 3시간 반응시켰다. 반응액을 c-HCl로 pH 3으로 조절하여 백색침전 acetylthiosalicylic acid를 얻었다. m.p. 122~123°C(lit. m.p. 127~129°C).<sup>32)</sup> Acetylthiosalicylic acid(600mg, 3mmole)와 NHS(387mg, 3mmole)을 THF 20ml에 녹이

고, 냉각시키면서 DCC(694mg, 3mmole)의 THF 용액을 소량씩 적가하였다. 하룻밤 방치한 후 반응액을 냉각시켜 침전 DCU를 제거하고 감압 농축하여 acetylthiosalicylic acid-NHS ester를 얻었으며, 이를 반응에 그대로 이용하였다. L-Phenylalanine(495mg, 3mmole)과 NaHCO<sub>3</sub> 1g 을 증류수와 THF 혼합용액(15ml-5ml)에 용해시킨 다음, 냉수욕 상에서 교반하면서 위에서 얻은 acetylthiosalicylic acid-NHS ester의 THF 용액을 소량씩 적가하고 하룻밤 교반하였다. 반응액을 물로 희석한 후 침전물을 여과 제거하고 citric acid로 pH 2~3으로 조절한 후 ether로 추출하였다. 추출액을 감압농축하여 용매를 제거하고 잔사를 silicagel column을 이용(colume 제조시 5% MeOH-CHCl<sub>3</sub>-1% AcOH)하여 5% MeOH-CHCl<sub>3</sub>으로 용출시켜 얻은 용액을 CHCl<sub>3</sub>-hexane으로 처리하여 N-(2-mercaptobenzoyl)-L-phenylalanine(7)를 얻었다. m.p. 121~123°C; IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1710, 1630cm<sup>-1</sup>; NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.95~3.25(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.2(s, 1H, SH), 4.4~4.7(m, 1H, CH), 7.1~7.45(m, 9H, aromatic), 8.7 (d, J=8Hz, 1H, NH).

**N-[ $\beta$ -(S-Acetylmercapto)succinyl]-L-proline (8)의 합성**—L-Proline(2g, 0.017 mole)을 H<sub>2</sub>O(15ml)에 용해시키고 냉수욕상에서 교반하면서, S-acetylmercaptosuccinic anhydride(2g, 0.012mole)을 서서히 가하였다. 이때 반응액의 pH가 8~9를 유지하게끔 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 첨가하였다. 반응액을 빙욕에서 3시간 교반시킨 후 ether로 세척하고 수층을 c-HCl로 pH 2로 조절한 후 EtOAc로 추출하였다. EtOAc 추출액은 NaCl 포화수용액으로 세척, 탈수시킨 후 감압증류하여 용매를 제거하였다. 잔사를 silica gel column을 이용 15% MeOH-CHCl<sub>3</sub>-0.5% AcOH 용매로 용출시켜 정제한 후 ether로 처리하여 N-[ $\beta$ -(S-acetylmercapto)succinyl]-L-proline (8)를 백색침전으로 얻었다. m.p. 36~38°C; IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  1720, 1710, 1640 cm<sup>-1</sup>; NMR(DMRO-d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O)  $\delta$  1.65~2.1(m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.35(s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.65~2.9(m, 2H, CH<sub>2</sub>) 3.2~3.6(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.0~4.65(m, 2H, 2×CH).

**N-( $\beta$ -Mercaptosuccinyl)-L-proline (9)의 합성**—N-[ $\beta$ -(S-Acetylmercapto)succinyl]-L-proline (8)을 빙욕 상에서 NaOH 수용액을 가해 pH11 이상으로 조절한 후 상온에서 하룻밤 동안 가수분해 시켰다. 반응액을 ether로 세척후 c-HCl로 pH 2로 조절하고 EtOAc로 추출하였다. 추출액을 NaCl 포화수용액으로 세척, 탈수시킨 후 감압증류하여 용매를 제거하고 잔액을 EtOAc로 처리하여 N-( $\beta$ -mercaptosuccinyl)-L-proline (9)의 백색침전을 얻었다. m.p. 60~62°C; IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  1710, 1630cm<sup>-1</sup>; NMR(DMSO-d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O)  $\delta$  1.7~2.2(m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.55~2.9(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.2~3.7(m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.0~4.25(m, 1H, CH), 4.3~4.65(m, 2H, 2×CH).

**N-[ $\beta$ -(S-Acetylmercapto)succinyl]-L-phenylalanine (10)의 합성**—L-Phenylalanine(1.98 g, 0.012mole)을 증류수 20ml에 용해시킨 다음 빙욕 상에서 교반하면서, S-acetylmercaptosuccinic anhydride(2g, 0.012mole)을 소량씩 적가하였다. 이때 반응액의 pH가 8~9를 유지되게끔 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 첨가하였다. 빙욕 상에서 4시간 교반한 후 ether로 세척하고 수층을 c-HCl로 pH 2로 조절하였다. EtOAc로 추출하고 추출액을 감압증류하여 용매를 제거한 뒤, silica gel column을 이용, 10% MeOH-CHCl<sub>3</sub> 용매로 elution 하여 정제하였다. 얻어진 물질은 N-[ $\beta$ -(S-acetylmercapto)succinyl]-L-phenylalanine (10)에 소량의 N-[ $\alpha$ -(S-acetylmercapto)succinyl]-L-phenylalanine (12)이 함유된 혼합물로서 판명되었다. IR  $\nu_{\max}^{\text{neat}}$  1710, 1620cm<sup>-1</sup>; NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.28, 2.30(two s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.55~2.7(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.8~3.0(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.15~4.5(m, 2H, 2×CH), 7.19(s, 5H, aromatic), 8.22 (d, J=8Hz, 1H, NH).

**N-( $\beta$ -Mercaptosuccinyl)-L-phenylalanine (11)의 합성**—위에서 합성된 N-[ $\beta$ -(S-Acetylmercapto)succinyl]-L-phenylalanine (10)을 빙욕 상에서 교반하면서, NaOH 수용액을 가해 pH 11 이상으로 조절한 후, 상온에서 하룻밤동안 가수분해 시켰다. 반응액을 ether로 세척후 수층을 c-HCl로 pH 2로 조절하고 EtOAc로 추출하

였다. 추출액을 NaCl 포화수용액으로 세척, 탈수한 후, 감압증류하여 용매를 제거하고 농축액을 ether로 처리하여 N-( $\beta$ -mercaptosuccinyl)-L-phenylalanine (11)을 얻었다. 그러나 반응 출발 물질이 10과 12의 혼합물이므로 얻어진 물질 또한 11과 N-( $\alpha$ -mercaptosuccinyl)-L-phenylalanine (13)의 혼합물로 추정된다. m.p. 204~206°C; IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1700, 1630cm<sup>-1</sup>; NMR(DMSO-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O)  $\delta$  2.6~2.7(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.7~3.0(m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.4~3.75(m, 1H, CH), 4.2~4.5(m, 1H, CH), 7.20(s, 5H, aromatic).

안지오텐신 변환효소 작용 검색—Cushman과 Cheung의 방법을 수정한 방법으로 검색하였다.<sup>31)</sup> Rabbit lung acetone powder로부터 조효소용액을 조제하였으며 효소의 unit(U)는 Cushman과 Cheung의 방법에 의하여 결정하였다. 효소반응은 100mM potassium phosphate 완충액 pH 8.3에서 행하였으며 최종 0.25ml의 반응액은 300mM NaCl, 4.83mM HHL 및 6~9mU의 조효소를 함유하였다. 반응은 37°C에서 30분간 Dubnoff metabolic shaking incubator를 사용하여 행하였으며 1N HCl(0.25ml)을 가하여 반응을 중지시키고 3ml EtOAc로 추출한 후, EtOAc 총 2ml로부터 용매를 증류시키고 남은 잔사를 1ml의 증류수에 녹여 생성되어 추출된 hippuric acid의 농도를 228nm에서 측정하였다. 합성된 시료를 넣었을 때와 control에서의 생성 추출된 hippuric acid의 양의 차이로 부터 효소 억제도를 계산하였다.

### 실험 결과 및 고찰

3-Hydroxybenzoic acid와 amino acid와의 축합물질인 1 및 2는 2-hydroxybenzoic acid 유도체의 합성과 유사하게 hydroxyl기를 acetylation 시킨후 carboxyl기를 N-hydroxysuccinimide(NHS) ester로서 활성화시켜 amino acid들과 축합시켜 얻었다. 3-Carboxybenzoic acid 유도체들인 3 및 4의 합성을 위하여는 우선 isophthalic acid의 monoethyl ester를 합성하였다. 이때 같이 얻어지는 diester은 부분 가수분해하여 monoester

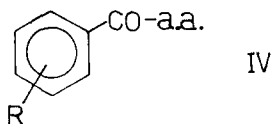
로 전환시켰으며 free의 carboxyl기를 NHS-ester로서 활성화 시킨후 amino acid들과 축합시켰다. Homophthalic acid는 DCC로 탈수시켜 homophthalic anhydride로 전환시키고 이를 직접 L-proline 또는 L-phenylalanine과 반응시켜 5와 6을 합성하였다. Acetylthiosalicylic acid의 NHS-ester과 L-phenylalanine을 축합시켜 얻은 7은 용액중에서 불안정하여 EtOH 용액을 하루밤 방치할 때 m.p. 224~226°C를 갖는 물질로 변화하였으며 NMR spectrum상에 7과 차이점이 없는 점으로 보아 7의 dimer로 추정되었다.<sup>33)</sup>

S-Acetylmercaptosuccinic anhydride는 L-proline과 직접 반응시켜 축합물 N-[ $\beta$ -(S-acetylmercapto)succinyl]-L-proline (8)을 얻었으며 가수분해하여 유리의 thiol기를 갖는 화합물 9을 얻었다. 그러나 같은 방법으로 anhydride에 L-phenylalanine을 반응시켰을 때 얻어진 물질은 NMR spectrum에서 S-acetyl group에 의한 2개의 singlet( $\delta$  2.28 및 2.30)이 관찰되었다. Anhydride와 secondary amino acid인 proline을 반응시킬 때는 구조적으로 hindrance가 적은 carbonyl기와 반응하여 단일물질이 형성되나( $\delta$  2.42에서 acetyl기의 singlet), primary amino acid인 phenylalanine과 반응할 때는 두 개의 carbonyl기에 반응함으로써 혼합물이 형성될 것으로 추정되었으며 이 결과는 N-carbobenzoxyglutamic anhydride와 primary 또는 secondary amino acid들간의 반응 결과에 대한 보고와 유사하여<sup>25)</sup> 얻어진 물질은 N-[ $\beta$ -(S-acetylmercapto)succinyl]-L-phenylalanine (10)과 N-[ $\alpha$ -(S-acetylmercapto)succinyl]-L-phenylalanine (12)의 혼합물로서 이때 10이 우세할 것으로 추정하였다. 그러나 화합물 10과 12는 쉽게 분리되지 않아 이를 그대로 deacetylation시켜 11을 얻었으며 11 또한 N-( $\alpha$ -mercaptosuccinyl)-L-phenylalanine (13)과의 2개의 이성체의 혼합물일 것으로 추정하였으며 이들 물질들은 혼합물 상태로서 ACE에 대한 작용을 검색하였다. 이상의 화합물들은 구조적으로 chelating성이 크며, 흡습 및 용매 회합이 잘 일어나고, 대체적으로 결정화가 어려워 정제 후 감압건조하여 목적하는 물질을 얻었으며, IR

및 NMR spectra를 이용하여 구조를 확인하였고, 대체로 수율은 낮았다(30~70%).

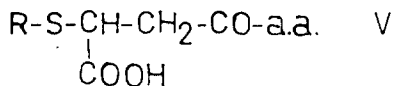
합성된 화합물들의 ACE에 대한 억제 작용 검색 결과는 Table I과 Table II에 종합하였다. Phenolic hydroxyl기 또는 benzoyl carboxyl기들은 생체내의 pH 조건에서 쉽게 ion화 되어 ACE 효소활성 부위에서 thiol기와 유사하게 Zn<sup>++</sup>과 결합하리라 예상되었다. 그러나 phenyl 환에 amino acid가 결합된 amide function과 유리의 hydroxyl 또는 carboxyl기가 ortho 위치에 존재할 경우 ACE 효소활성 부위에 결합이 요구되는 2개의 기능기 사이의 거리가 짧아 견고한 결합을 하지 못함으로써 억제 작용이 낮은 것으로 보고된 바 있다.<sup>31)</sup> Table I의 물질 1~4는 meta 위치에 hydroxyl 또는 carboxyl기를 도입함으로써 이미 보고된 ortho 유도체들 보다 2개의 기능기 사이의 거리를 넓혀주었다. 또한 화합물 5 및 6은 2개의 기능기 사이에 각각 3 및 4에서와 같은 수의 탄소가 존재하나 구조적으로 상이한 화합물로서 이들 화합물들의 ACE에 대한 억제 작용을 비교해보면 제이의 기능기를 meta 위치에 도입하였을 때 이미 보고된 ortho 위치에 기능기를 갖인 물질들 보다 억제 작용이 약간 상승하였으며, 같은 meta 위치일 경우 hydroxyl기 보다는 carboxyl 기를 갖인 화합물이(3 vs 1 and 4 vs 2)

**Table I**—Angiotensin converting enzyme inhibitory activities of benzoylamino acids.



Comp. no.	R	Amino acid	% Inhibition at 5×10 <sup>4</sup> M
1	<i>m</i> -OH	L-proline	8±5
2	<i>m</i> -OH	L-phenylalanine	43±3
3	<i>m</i> -COOH	L-proline	18±6
4	<i>m</i> -COOH	L-phenylalanine	58±4
5	<i>o</i> -CH <sub>2</sub> COOH	L-proline	16±5
6	<i>o</i> -CH <sub>2</sub> COOH	L-phenylalanine	16±3
7	<i>o</i> -SH	L-phenylalanine	74±5

**Table II**—Angiotensin converting enzyme inhibitory activities of carboxymercaptoacyl amino acids.



Comp no.	R	Amino acid	I <sub>50</sub> (M) <sup>a</sup>
8	COCH <sub>3</sub>	L-proline	1.1×10 <sup>-5</sup>
9	H	L-proline	3.5×10 <sup>-6</sup>
10 <sup>b</sup>	COCH <sub>3</sub>	L-phenylalanine	5.4×10 <sup>-5</sup>
11 <sup>c</sup>	H	L-phenylalanine	4.5×10 <sup>-5</sup>

- a: molar concentration at which 50% inhibition was observed,
- b: mixture with the minor quantity of α-(S-acylmercapto)succinyl isomer(12),
- c: mixture with the minor quantity of α-mercapto-succinyl isomer (13),

좀더 ACE 억제 작용이 컸다. 화합물 5와 6은 화합물 3 및 4에 비하여 억제 작용이 낮았다. 그러나 3 및 4의 억제 작용도 두 개의 기능기 사이가 aliphatic chain으로 연결된 화합물보다 매우 낮은 것으로 보아 두 기능기 사이의 rigid하며, 입체적으로 부피가 큰 phenyl ring이 ACE의 효소활성 부위에 결합하는데 적합하지 않은 것으로 사료되었다.

Ortho 위치에 sulfhydryl기를 도입한 화합물 7은 이미 보고된 ortho 위치에 hydroxyl 또는 carboxyl기를 도입한 화합물 보다 ACE에 대한 억제 작용이 약간 컸으며 이는 관련되는 다른 acylamino acid들과서와 유사한 결과로서 sulfhydryl기가 활성부위의 Zn<sup>++</sup>과 강한 결합을 함을 재확인할 수 있었다.

Table II에 종합한 화합물 8~11은 captopril (I)의 중요한 기능기인 thiol 또는 acylthiol 기와 enalaprilat (II)의 중요 기능기인 carboxyl 기를 동시에 갖는 acylamino acid들로서 화합물 8~11은 구조상에 rigid한 phenyl환을 갖인 1~7보다 강력한 ACE 억제 작용을 보였다. 구조적으로 유사한 mercaptoacylamino acid series와 유사하게 amino acid로서 L-proline을 도입하였을 때가 L-

phenylalanine을 도입하였을 때 (8 and 9 vs 10 and 11)보다 5~10배의 억제작용을 보였으며, SH기를 acetylation 하였을 때 유리의 SH기를 갖는 물질보다(8 vs 9 and 10 vs 11) 억제작용이 저하되었다. 화합물 8~11은 기존의 강력한 ACE 억제제인 I 이나 II 보다는 작용이 약하나, sulfhydryl 기와 carboxyl 기 사이에 intramolecular hydrogen bonding이 가능하여 생체내에서 thiol 기에 기인하는 여러가지 부작용을 극소화하거나 또는 생체내에서의 분배 등에 기여할 것으로 기대된다. 따라서 화합물 8~11의 R- 및 S-isomer를 분리함으로써 각 이성체의 ACE에 대한 억제작용의 확인 또는 좀더 강력한 ACE 억제작용을 갖는 관련 유도체들의 합성 등 앞으로의 연구가 기대된다.

#### 감사의 말씀

이 논문은 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 이루어졌음을 밝히며 이에 감사드린다.

#### 문헌

- 1) Soffer, R.L.: Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 73 (1976).
- 2) Ondetti, M.A. and Cushman, D.W.: Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 283 (1982).
- 3) Douglas, W.W.: Polypeptides-angiotensin, plasma kinins, and others. Chapter 27, The pharmacological basis of therapeutics. 6th ed A.G. Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman, MacMillian Publishing Co., Inc. New York, (1980).
- 4) Hollenberg, N.K.: Pharmacologic interruption of the renin-angiotensin system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **19**, 559 (1979).
- 5) Cushman, D.W. and Ondetti, M.A.: Inhibitors of angiotensin-converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1871 (1980).
- 6) Yokosawa, H., Ogura, Y. and Ishii, S. -i.: Purification and inhibition by neuropeptides of angiotensin-converting enzyme from rat brain. *J. Neurochem.* **41**, 403 (1983).
- 7) Geary, L.E., Wiley, K.S., Scott, W.L. and Cohen, M.L.: Degradation of exogenous enkephalin in the guinea-pig ileum: Relative importance of aminopeptidase, enkephalinase and angiotensin converting enzyme activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **221**, 104 (1982).
- 8) Checler, F., Vincent, J.-P. and Kitabgi, P.: Degradation of neurotensin by rat brain synaptic membranes: Involvement of a thermolysin-like metalloendopeptidase(enkephalinase), angiotensin converting enzyme, and other unidentified peptidases. *J. Neurochem.* **41**, 375 (1983).
- 9) Yokosawa, H., Endo, S., Ogura, Y. and Ishii, S. -i.: A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: Hydrolysis of substance-P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 735(1983).
- 10) Stewart, J.M., Ferreira, S.H. and Greene, L.J.: Bradykinin potentiating peptide Pca-Lys-Trp-Ala-Pro. An inhibitor of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1557 (1971).
- 11) Gavras, H., Brunner, H.R., Laragh, J.H., Sealey, J.E., Gavras, I. and Vukovich, R.A.: An angiotensin converting enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstriction and volume factors in hypertensive patients. *New England J. Med.* **291**, 817 (1974).
- 12) Case, D.B., Wallace, J.M., Keim, H.J., Weber, M. A., Drayer, J.I.M., White, R.P., Sealey, J. E. and Laragh, J.H.: Estimating renin participation in hypertension: Superiority of converting enzyme inhibitor over saralasin. *Am. J. Med.* **61**, 790 (1976).
- 13) Petrillo, E.W. and Ondetti, M.A.: Angiotensin-converting enzyme inhibitors: Medicinal chemistry and biological actions. *Medicinal Res. Rev.* **2**, 1 (1982).
- 14) Wyvratt, M.J. and Patchett, A.A.: Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Medicinal Res. Rev.* **5**, 483 (1985).
- 15) Ondetti, M.A., Rubin, B. and Cushman, D.W.: Design of specific inhibitors of angiotensin-conve-



- rtng enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science*, **196**, 441 (1977).
- 16) Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. and Ondetti, M.A.: Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochem.* **16**, 5484 (1977).
  - 17) Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F., Rubin, B. and Ondetti, M.A.: Development of specific inhibitors of angiotensin I converting enzyme(kininase II). *Fed. Proceed.* **38**, 2778 (1979).
  - 18) Atkinson, A.B. and Robertson, J.I.S.: Captopril: Benefits and risks in severe hypertension. *Lancet* **129** (1980).
  - 19) Patchett, A.A., Harris, E., Tristram, E.W., Wyvratt, M.J., Wu, M.T., Taub, D., Peterson, E.R., Ikeler, T.J., Broeke, J., Payne, L.G., Ondeyka, D.L., Thorsett, E.D., Greenlee, W.J., Lohr, N.S., Hoffsommer, R.D., Joshua, H., Ruyle, W.V., Rothrock, J.W., Aster, S.D., Maycock, A.L., Robinson, F.M. and Hirschmann, R.: A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature*, **288**, 280 (1980).
  - 20) Klutchko, S. and Hoefle M.L.: Synthesis and angiotensin-converting inhibitory activity of 3-(mercaptomethyl)-2-oxo-1-pyrrolidineacetic acids and 3-(mercaptomethyl)-2-oxo-1-piperidineacetic acids. *J. Med. Chem.* **24**, 104 (1981).
  - 21) Galardy, R.E., Kontoyiannidou-Ostrem, V. and Kortylewicz, Z.P.: Inhibition of angiotensin converting enzyme by phosphonic amides and phosphonic acids. *Biochem.* **22**, 1990 (1983).
  - 22) Kim, D.H., Guinosso, C.J., Buzby, G.C., Herbst, D.R., McCaully, R.J., Wicks, T.C. and Wendt, R.L.: (Mercaptopropanoyl) indoline-2-carboxylic acids and related compounds as potent angiotensin converting enzyme inhibitors and antihypertensive agents. *J. Med. Chem.* **26**, 394 (1983).
  - 23) Gruenfeld, N., Stanton, J.L., Yuan, A.M., Ebetino, F.H., Browne, L.J., Gude, C. and Huebner, C.F.: Angiotensin converting enzyme inhibitors: 1-Glutarylindoline-2-carboxylic acid derivatives. *J. Med. Chem.* **26**, 1277 (1983).
  - 24) Stanton, J.L., Gruenfeld, N., Babiarz, J.E., Ackerman, M.H., Friedmann, R.C., Yuan, A.M. and Macchia, W.: Angiotensin converting enzyme inhibitors: N-Substituted monocyclic and bicyclic amino acid derivatives. *J. Med. Chem.* **26**, 1267 (1983).
  - 25) Ksander, G.M., Yuan, A.M., Diefenbacher, C.G. and Stanton, J.L.: Angiotensin converting enzyme inhibitors: N-Substituted D-glutamic acid dipeptides. *J. Med. Chem.* **28**, 1606 (1985).
  - 26) Stanton, J.L., Watthey, J.W.H., Desai, M.N., Finn, B.M., Babiarz, J.E. and Tomaselli, H.C.: Antiotensin converting enzyme inhibitors: Structure-activity profile of 1-benzazepin-2-one derivatives. *J. Med. Chem.* **28**, 1603 (1985).
  - 27) Johnson, A.L., Price, W.A., Wong, P.C., Vavala, R.F. and Stump, J.M.: Synthesis and pharmacology of the potent angiotensin-converting enzyme inhibitor N-[1(S)-(ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-(S)-alanyl-(S)-pyroglutamic acid. *J. Med. Chem.* **28**, 1596 (1985).
  - 28) Greenlee, W.J., Allibone, P.L., Perlow, D.S., Patchett, A.A., Ulm, E.H. and Vassil, T.C.: Angiotensin-converting enzyme inhibitors: Synthesis and biological activity of acyltripeptide analogues of enalapril. *J. Med. Chem.* **28**, 434 (1985).
  - 29) Watthey, J.W.H., Stanton, J.L., Desai, M., Babiarz, J.E. and Finn, B.M.: Synthesis and biological properties of (carboxyalkyl)amino-substituted bicyclic lactam inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J. Med. Chem.* **28**, 1511 (1985).
  - 30) Elliott, R.L., Marks, N., Berg, M.J. and Portoghesi, P.S.: Synthesis and biological evaluation of phosphoramidate peptide inhibitors of enkephalinase and angiotensin-converting enzyme. *J. Med. Chem.* **28**, 1208 (1985).
  - 31) Lee, H., Kim, Y.S., Chang, Y., Lee, J.R. and Yun-Choi, H.S.: Synthesis of angiotensin converting enzyme inhibitors. *J. Pharm. Soc. Korea*, **28**, 313 (1984).
  - 32) Menard, P.R., Suh, J.T., Jones, H., Loev, B., Neiss, E.S., Wilde, J., Schwab, A. and Mann, W.S.: Angiotensin converting enzyme inhibitors. (Mercaptoaroyl)amino acids. *J. Med. Chem.* **28**, 328 (1985).
  - 33) Martin, T.A. and Comer, W.T.: N-[[[(Mercaptoacetyl)amino]benzoyl]glycines as mucolytic agents. *J. Med. Chem.* **28**, 910 (1985).