

Angiotensin 변환 효소 억제제인 Captopril 유도체들의 구조와 활성관계 연구: 수용액상의 분자동력학적 연구의 중요성

지명환 · 윤창노* · 진창배 · 박종세
한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터

Structure-Activity Relationships Study of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Captopril Derivatives: Importance of Solution Molecular Dynamics Study

Myung Whan CHI, Chang No YOON*, Changbae JIN and Jongsei PARK
Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology,
P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

(Received January 28, 1994; accepted March 22, 1994)

Abstract--In order to investigate the structure-activity relationships of the stereoisomers of angiotensin converting enzyme inhibitors, captopril and its derivatives were selected as model compounds. *In vitro* enzymatic activities of them depend on the symmetry at the asymmetric carbons. Especially, the alanyl carbon should have the S configuration to be biologically active. But the demethylated captopril having the achiral carbon also shows the activity although it is less active than captopril. Seven stereoisomers of captopril and its derivatives were chosen and their acidic and ionic forms were used for molecular dynamics simulations. Four computer simulations were practiced for each model compound in order to obtain the good condition for simulation to explain the experimental structure-activity relationships. From the computer simulation results, relativistic movements of three well-known pharmacophoric sites, carboxylate carbon, carbonyl oxygen, and sulfur atoms, were analyzed. Good results were obtained from the aqueous solution molecular dynamics simulation with ionic forms of model compounds. Active model compounds have the pharmacophoric areas of 6.08 to 6.38 Å² and the similarity in the geometrical data. But inactive ones have the largely deviated values of 4.51 to 4.87 Å² from those of active ones.

Keywords □ angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril, stereoisomers, molecular dynamics, structure-activity relationships.

ACE 저해제들 중 가장 대표적인 Captopril의 경우 asymmetric 탄소위치에서의 symmetry에 따라 activity가 크게 다르다는 실험결과가 최근에 보고되었다(Pascard 등, 1991). 그 결과에 의하면 S configuration을 가진 Captopril의 경우 IC₅₀가 23 nM인 반면 R configuration의 유도체는 1.5×10⁶ nM로 inactive하며 그 탄소에서 methyl기가 떨어진 achiral configuration을 가진 유도체는 200 nM로 active한 것이 확인되었다. 이러한 symmetry와

activity의 변화관계를 잘 규명한다면 다른 ACE 저해제의 경우도 같은 이치로 activity를 나타낼 것으로 생각되어 Captopril 유도체를 model로 분자구조와 생리활성관계 연구를 행하였다. 일반적으로 분자 구조 연구를 위해서는 컴퓨터를 이용한 분자 동력학적인 계산을 행하는데 그 이유는 대상이 되는 분자의 입체 구조가 실험실 온도에서는 정지된 상태의 것이 아니고 끊임없이 구조간의 전이가 일어나거나 변형되고 있기 때문이다. Fig. 1에서 Captopril isomer들의 분자구조를 볼 수 있다. 위의 계산으로 얻어진 결과를 사용하여 Fig. 2에서 볼 수 있는 다른

* To whom correspondence should be addressed.

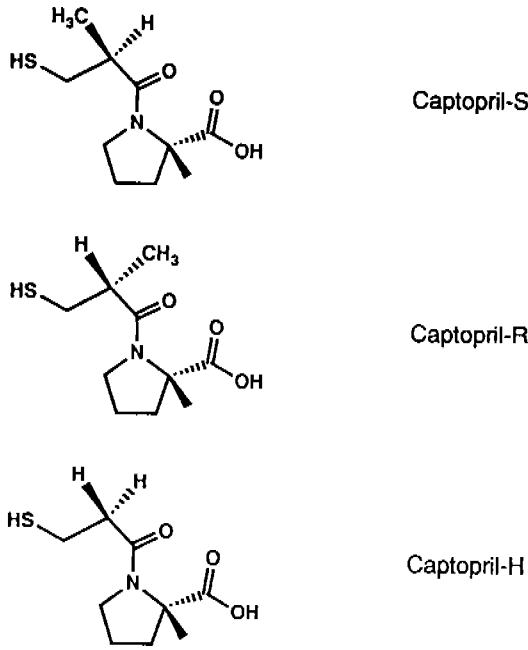


Fig. 1. Stereoisomers of Captopril.

Captopril 유도체들 (Mercaptopropanoyl)-indoline-2-carboxylic acid isomers인 WY-SS(IC₅₀, 3.7 nM)와 WY-RS (IC₅₀, 1.4×10⁴ nM)(Kim 등, 1983) 그리고 5-Oxocaptopril (IC₅₀, 9.0 nM)(Condon 등, 1982)과 Fentiapril(IC₅₀, 6.0 nM)(Horiuchi 등, 1984)의 생리활성 실험결과를 함께 설명할 수 있었다.

실험방법

어떤 drug도 몸속에 들어가면 물분자들로 둘러싸이게 되어 많은 수소결합과 drug 분자자체의 구조적인 fluctuation으로 독립적인 drug 분자만을 다룰 때와는 다른 상황이 벌어지게 되며 예상치 못하는 분자구조를 가질 수도 있게된다. 따라서 분자동력학적인 연구를 통하여 그 drug 분자가 실험적인 온도조건에서 취할 수 있는 가능한 많은 구조를 알아내어 그 분자내의 pharmacophoric sites의 동태를 살펴보는 것이 중요하다. 분자동력학적인 연구는 분자내의 각 원자를 한 입자로 보고 그 입자들의 시간에 따른 좌표 변화를 Newton의 운동방정식 F=ma를 풀어 얻어내는 것이다. 그리하여 각 원자들의 궤적을 추적하여 분자구조의 fluctuation을 살펴볼 수 있게된다. 다음의 식은 시간 t일 때의 위치에서 Δt만큼 지난 후의 위치 변화를 구하는 방정식이다.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \frac{\delta r}{\delta t} \Delta t + \frac{\delta^2 r}{\delta t^2} \frac{\Delta t^2}{2} + \dots \quad (1)$$

이 방정식의 해를 구하는 과정에서 적분과정이 들어가는데 Verlet algorithm이 많이 쓰인다. 한 입자의 속도

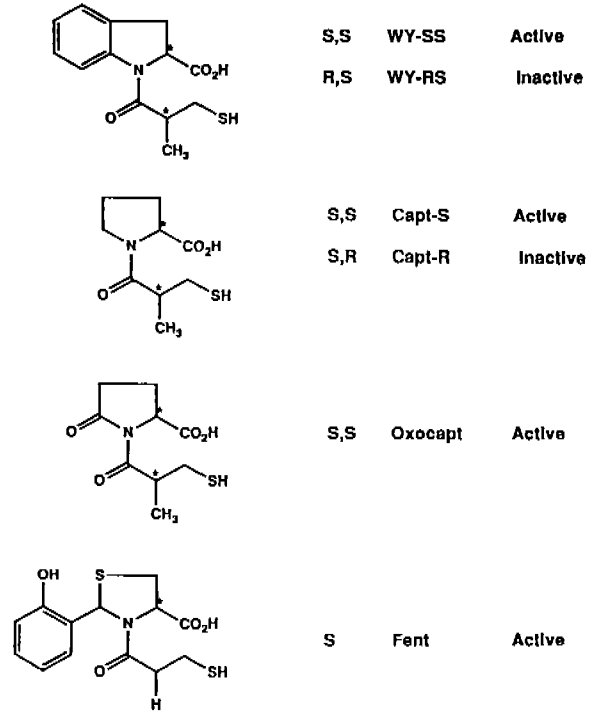


Fig. 2. Stereoisomers of Captopril derivatives and their activities.

v(t)와 위치 r(t)를 다음과 같이 간단히 표시 할 수 있다.

$$v(t + \Delta t/2) = v(t - \Delta t/2) + a(t)\Delta t \quad (2)$$

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t + \Delta t/2)\Delta t \quad (3)$$

계산의 과정은 먼저 어떤 시간 t에서의 한 입자, 즉 한 원자의 가속도 ((1/m)(dV/dr))를 구하고 식 2를 사용해 시간(t - Δt/2)에서의 속도로부터 시간(t + Δt/2)의 속도를 구해내고 다시 식 3를 사용해 시간 t에서의 입자의 좌표로부터 시간 (t + Δt)의 좌표를 구한다. 이러한 과정을 반복한다.

Captopril 유도체들의 분자동력학적인 연구에서는 time step, Δt를 1 femtosec(10⁻¹⁵ sec)로 두고 온도는 300 K로 하였으며 model system의 평형을 위해 5 pico-sec(10⁻¹² sec), 그리고 85 picosec의 simulation을 행하였다. 수용액상의 분자동력학적인 계산을 위해서는 20 Å × 20 Å × 20 Å의 크기를 가지는 상자의 주기적인 경계 조건을 사용했다. 정전기적 field와 potential을 구하기 위해 Poisson-Boltzmann 방정식을 수치적으로 풀게된다. 이때 Honig의 finite difference method (Gilson과 Honig, 1987)를 사용하여 정전기적 potential을 구해내고 이로부터 정전기적 field와 에너지를 계산 할 수 있다.

실험결과 및 고찰

이미 ACE저해제들의 분자구조와 활성관계를 얻기 위

Table I. Molecular Dynamics Results of Captopril-S, Captopril-R, and Captopril-H Ions in Vacuum

	Captopril-S	Captopril-R	Captopril-H
Angle ^a			
θ_1	126.20 (6.88) ^b	130.65 (10.22)	76.20 (10.56)
θ_2	31.80 (4.20)	24.58 (5.63)	56.07 (6.80)
θ_3	22.72 (2.93)	24.77 (4.86)	47.73 (5.19)
Distance ^c			
l_1	4.77 (0.14)	3.50 (0.24)	3.98 (0.26)
l_2	3.58 (0.20)	3.54 (0.17)	3.56 (0.17)
l_3	7.45 (0.17)	6.37 (0.24)	4.64 (0.47)
Area ^d			
A	6.87 (0.89)	4.66 (0.95)	6.76 (0.57)

a. Units in degrees.

b. Standard deviation in parenthesis.

c. Units in Å.

d. Units in Å².**Table II.** Molecular Dynamics Results of Captopril-S, Captopril-R, and Captopril-H Ions in Aqueous Solution

	Captopril-S	Captopril-R	Captopril-H
Angle ^a			
θ_1	131.85 (6.56) ^b	127.93 (9.41)	121.80 (7.82)
θ_2	28.44 (4.00)	27.71 (5.56)	36.15 (4.97)
θ_3	19.71 (2.71)	24.36 (4.11)	22.05 (2.96)
Distance ^c			
l_1	4.86 (0.14)	3.59 (0.22)	4.87 (0.14)
l_2	3.44 (0.17)	3.21 (0.17)	3.10 (0.10)
l_3	7.59 (0.14)	6.09 (0.26)	7.00 (0.20)
Area ^d			
A	6.21 (0.88)	4.51 (0.85)	6.38 (0.79)

a. Units in degrees.

b. Standard deviation in parenthesis.

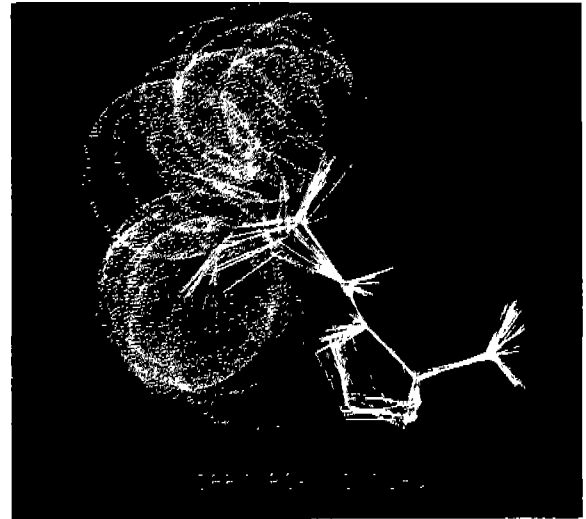
c. Units in Å.

d. Units in Å².

해 약간의 계산 결과가 발표되었다(Mayer 등, 1987; Saunders 등, 1987). 그러나 이들의 계산은 정전기적 상호작용을 고려하지 않았거나 고려하였어도 한가지 conformation에 관하여서만 관계를 찾으려고 노력하였다.

본 연구에서 행해진 분자동력학적인 연구는 각 유도체의 carboxylate ionic form과 acidic form, 그리고 수용액과 vacuo 상태에서의 네 가지 경우로 나누어 행하여졌다. 얻어진 분자구조의 운동 양상을 보여주는 궤적 데이터로부터 pharmacophoric sites, proline ring의 carboxylate carbon과 proline unit의 carbonyl oxygen, 그리고 sulfur atom 간의 거리와 사이각들을 계산하여 평균치와 standard deviation 값을 얻었다.

Table I과 Table II에서 Captopril stereoisomer들의 ionic form의 vacuo와 수용액상의 결과를 볼 수 있다. 계산치들을 살펴보면 vacuo 상태의 결과는 별다른 의미를 찾을 수 없음을 알 수 있었고 수용액상의 결과가

**Fig. 3.** Superposition of calculated conformational snapshots for each stereoisomer of Captopril during molecular dynamics simulations: yellow, active Captopril-H; green, active Captopril-S; violet, inactive Captopril-R.**Table III.** Electrostatic Fields of Isolated Ions, Solvent Effects^a

Site	Captopril-S	Captopril-R	Captopril-H
N	147 (2) ^b	149 (3)	149 (2)
S	87.9 (2.6)	88.4 (2.8)	111.8 (11.6)
CO1	158 (5)	158 (8)	165 (7)
CO ₂			
O2	242 (4)	240 (3)	236 (5)
O3	236 (2)	238 (4)	230 (10)
Reaction Field	-130.3 (2.5)	-130.2 (2.9)	-125.7 (3.6)
	-77.1 (1.5) ^c	-77.1 (1.7)	-74.4 (2.2)

a. Units in kT/e.

b. Standard deviation in parenthesis.

c. Units in kcal/mole.

생리활성을 설명할 수 있음을 알 수 있다. 먼저 pharmacophoric site들로 이루어진 삼각형의 모양에서 생리활성이 있는 S와 H 형태의 경우 유사성을 찾을 수 없는데 Table I에서 S형태의 사이각들(126.20, 31.08, 22.72)과 H 형태의 사이각(76.20, 56.07, 47.73)들 처럼 매우 다르고 서로간 거리에서도 다르다. 그러나 Table II에서 보면 S와 H 형태의 경우, (131.85, 28.44, 19.71)과 (121.80, 36.15, 22.05)로 매우 유사하며 서로간 거리와 삼각형의 넓이가 R 형태의 stereoisomer와 구별되어 있다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 생리활성이 있는 S와 H형태 구조들의 황(S)원자의 방향이 왼쪽위를 향하며 활성이 없는 R형태의 경우 아래쪽을 향하고 있음을 생각할 때 ACE의 활성부위의 금속 아연(Zn)이 왼쪽위의 연장선상에 있음을 추측할 수 있다. 다음의 두 Table(Table III와 Table IV)은 ionic form들의 수용액상과 vacuo 상태의 분자동

Table IV. Electrostatic Fields of Aqueous Ions, Solvent Effects^a

Site	Captopril-S	Capropril-R	Captopril-H
N	152 (3) ^b	148 (3)	153 (3)
S	70.3 (1.2)	90.4 (6.1)	79.4 (5.2)
CO1	170 (6)	172 (7)	178 (6)
CO ₂			
O2	247 (2)	246 (2)	248 (3)
O3	242 (3)	241 (5)	244 (5)
Reaction Field	-136.6 (1.5)	-135.1 (2.6)	-137.1 (3.2)
	-80.8 (0.9) ^c	-80.0 (1.6)	-81.1 (1.9)

a. Units in kT/e.
 b. Standard deviation in parenthesis.
 c. Units in kcal/mole.

Table V. Molecular Dynamics Results of WY-SS, WY-RS, 5-Oxocaptopril, and Fentiapril Ions in Aqueous Solution

	WY-SS	WY-RS	5-Oxocaptopril	Fentiapril
Angle ^a				
θ_1	127.02 (6.04)	112.51 (12.16)	129.65 (8.54)	129.56 (5.85)
θ_2	32.60 (3.79)	34.17 (6.98)	30.62 (5.41)	30.35 (3.45)
θ_3	20.38 (2.41)	33.33 (5.62)	19.72 (3.25)	20.09 (2.57)
Distance ^b				
l_1	4.95 (0.10)	3.31 (0.24)	4.89 (0.14)	4.84 (0.10)
l_2	3.20 (0.14)	3.26 (0.14)	3.25 (0.14)	3.29 (0.10)
l_3	7.32 (0.14)	5.43 (0.41)	7.38 (0.17)	7.38 (0.14)
Area ^c				
A	6.30 (0.71)	4.87 (0.65)	6.08 (0.99)	6.13 (0.75)

a. Units in degrees.
 b. Units in Å.
 c. Units in Å².

력학적인 결과로부터 얻은 많은 conformer들의 각 pharmacophoric site에서의 정전기적 field를 계산한 결과를 볼 수 있는데 팔호안의 것들은 표준편차이다. 각 site은 pharmacophoric site의 중요한 원자들인 질소(N), 황(S), carbonyl 산소(CO1), carboxylate 산소들인 O2와 O3들로 각 원자의 위치에서 느끼는 정전기적인 field를 살펴 봄으로써 생리활성이 있는 S와 H 형태의 stereoisomer들과 활성이 없는 R형태의 화합물 간의 정전기적인 차이를 알아내기 위함이다. Isolated ions의 데이터는 컴퓨터로 각 stereoisomer들의 분자동력학적인 simulation을 행할 때 용매인 물의 영향을 고려하지 않고 drug 분자만을 계산한 것이고 aqueous ions의 데이터는 drug 분자 주위에 용매인 물 분자를 5 Å 정도의 두께로 둘러싼 후 계산해 낸 결과이다.

Reaction field는 분자를 구성하는 모든 원자들의 field 값을 합한 결과이다. 이 값들을 비교해 보면 수용액상의 계산치가 S-form과 H-form의 activity를 잘 설명해 줌을 알수 있다. 생리활성을 설명할 수 있는 데이터는 황(S)의 위치에서의 정전기적 field로, isolated ions일 경우 S, R,

Table VI. Electrostatic Fields of Aqueous Ions, Solvent Effects^a

Site	WY-SS	WY-RS	5-Oxocaptopril	Fentiapril
N	153 (1) ^b	150 (1)	145 (3)	142 (1)
S	69.7 (1.1)	95.9 (11.6)	77.8 (1.3)	77.2 (2.5)
CO1	171 (4)	170 (5)	164 (4)	164 (4)
CO ₂				
O2	248 (2)	237 (3)	238 (2)	240 (2)
O3	241 (3)	245 (2)	232 (2)	229 (5)
Reaction Field	-136.8 (1.6)	-134.1 (1.7)	-127.1 (1.4)	-129.6 (1.9)
	-81.0 (1.0) ^c	-79.4 (1.0)	-75.3 (0.9)	-76.8 (1.1)

a. Units in kT/e.
 b. Standard deviation in parenthesis.
 c. Units in kcal/mole.

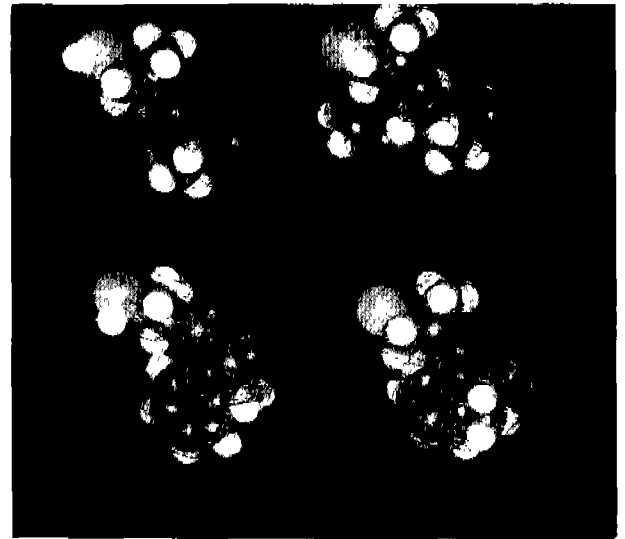


Fig. 4. Electrostatic potential map showing the shapes of pharmacophoric sites for each Captopril derivative: yellow, sulfur; red, oxygen; green, carbon; white, hydrogen; top left, Fentiapril; top right, 5-Oxocaptopril; bottom left, inactive WY-RS; bottom right, WY-SS.

H 형태가 (87.9, 88.4, 111.8) kT/e로 S와 R의 형태가 오히려 유사하나 aqueous ions일 때 (70.3, 90.4, 79.4)로 R의 형태가 큰 값을 가져서 S와 H 형태의 값들과 구별되며 reaction field의 값은 (-80.8, -80.0, -81.1)로 isolated ions 경우의 (-77.1, -77.1, -74.4)와 다르게 활성관계를 잘 설명할 수 있었다. 끝으로 다음의 두 Table (Table V와 VI)은 WY-SS와 WY-RS, 5-Oxocaptopril과 Fentiapril의 계산결과로 active한 화합물과 inactive한 것의 구별이 geometrical한 기준과 정전기적 field의 값에서 확실히 이루어짐을 볼 수 있다. Pharmacophoric 삼각형의 형태로 볼 때 생리활성이 있는 WY-SS, 5-Oxocaptopril, Fentiapril들은 (6.30, 6.08, 6.13)의 면적을 가지나 활성이 없는 WY-RS는 4.87의 적은 면적을 가지고



Fig. 5. Superposition of six Captopril derivatives having sulfur atom represented by the ball and dotted surface: red, inactive WY-RS; yellow, inactive Captopril-R; pink, active WY-SS; blue, active Fentiapril; green, active Captopril-S.

정전기적 field의 값도 다른 세개와는 달리 황(S) 위치에서 95.9 kT/e의 큰 값을 가져서 활성과의 관계를 보여주고 있다. Fig. 4에서 4개의 stereoisomer들의 주위에서 느끼는 정전기적인 field를 그물망의 형태와 색으로 표현하고 있는데, 붉은 색 그물은 음(negative)의 field를 푸른색 그물은 양(positive)의 field를 나타내고 있으며 생리활성이 있는 3개의 stereoisomer들의 모습과 없는 WY-RS의 차이를 볼 수 있다. Fig. 5에서 6개의 stereoisomer들의 대표적인 구조들을 중첩하여 놓았는데 작은 공 형태의 황(S)원자와 그것의 부피가 점으로 표현되어 있어서 생리활성이 있는 4개의 황들을 거의 한 방향으로 모여져 있으며 활성이 없는 2개는 그들과 구별되어 있음을 알 수 있다.

결 론

Computer-Aided Drug Design을 행할 때는 대상이 되는 drug와 수용체의 관계를 살펴보아 수용체의 삼차

원적인 분자구조를 알 경우는 다르겠으나, 모를 경우에는 drug 분자자체의 에너지 최소화나 분자동력학적인 연구만으로는 생리활성 결과를 설명하기 힘들다는 것을 알 수 있으며, 특히 model system을 선택할 때 ionic과 acidic의 형태에 유의해야 함을 보여주고 있다. 더우기 vacuo 상태와 수용액상태의 계산 결과는 뚜렷한 차이를 보이고 있다. 이 연구의 결과로부터 찾아낸 ACE 저해제의 pharmacophoric sites의 통태는 후보 저해제들의 예비 screening에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Condon, M. E., Petrillo, Jr., E. W., Ryono, D. E., Reid, J. A., Neubeck, R., Puar, M., Heikes, J. E., Sabo, E. F., Losess, K. A., Cushman, D. W., and Ondetti, M. A. (1982). Angiotensin-converting enzyme inhibitors: importance of the amide carbonyl of mercaptoacyl amino acids for hydrogen bonding to the enzyme. *J. Med. Chem.* **25**, 250-258.
- Gilson, M. and Honig, B. (1987). Calculation of electrostatic potentials in an enzyme active site. *Nature* **330**, 84-86.
- Horiuchi, M., Terashima, T., Fujimura, K., Shimokawa, K., and Iso, T. (1984). Inhibition of angiotensin converting enzyme by (2R, 4R)-2-(2-hydroxyphenyl)-3-(mercaptopropionyl)-4-thiazolidine carboxylic acid, SA446. *Yakugaku Zasshi* **104**, 1257-1262.
- Kim, D. H., Guinesso, C. M., Buzby, G. C., Herbst, D. R., McCaully, R. J., Wicks, T. C., and Wendt, R. L. (1983). (Mercaptopropanoyl)indoline-2-carboxylic acids and related compounds as potent angiotensin converting enzyme inhibitors and antihypertensive agents. *J. Med. Chem.* **26**, 394-403.
- Mayer, D., Naylor, C. B., Motoc, I., and Marshall, G. R. (1987). A unique geometry of the active site of angiotensin-converting enzyme consistent with structure-activity studies. *J. Computer-Aided Mol. Design* **1**, 3-16.
- Pascard, C., Guilhem, J., Vincent, M., Remond, G., Portevin, B., and Laubie, M. (1991). Configuration and preferential solid-state conformations of perindoprilat (S-9780). Comparison with the crystal structures of other ACE inhibitors and conclusions related to structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **34**, 663-669.
- Saunders, M. R., Tute, M. S., and Webb, G. A. (1987). A theoretical study of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Computer-Aided Mol. Design* **1**, 133-142.