

상이한 정렬에 따른 비교분자 유사성 지수분석(CoMSIA) 방법을 이용한 새로운 2-Alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체들의 살균활성에 관한 3차원적인 정량적 구조와 활성과의 관계

성낙도* · 윤태용¹ · 송종환² · 정훈성

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부, ¹동방아그로(주) 연구소, ²한국화학연구원 세포화학연구팀

요약 : 일련의 새로운 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체들의 구조 변화에 의한 저항성(RPC; 95CC7303)과 감수성(SPC; 95CC7105) 고추역병 균주(*Phytophthora capsici*)들의 살균활성에 대한 3차원적인 정량적 구조-활성관계(3D-QSAR)를 비교분자 유사성 지수분석(CoMSIA) 방법으로 연구하였다. 그 결과, RPC 균주는 field fit 정렬시 정전기장(E)과 수소결합 받게장(A) 및 분자궤도장(LUMO)이 조합된 조건에서 모델 R5를 그리고 SPC 균주는 atom based fit 정렬시 입체장(S)과 분자궤도장(HOMO)의 조건에서 모델 S1(또는 S5)이 가장 양호한 예측성과 적합성을 나타내는($q^2=0.714\sim0.823$ 및 $r^2_{ncv}=0.918\sim0.954$) CoMSIA 모델이었다. 또한, RPC 균주에는 LUMO (24.4%), SPC 균주에는 HOMO(13.5%) 분자 궤도장이 그리고 두 균주에 대하여 공통적으로 수소결합 받게장(A)이 살균활성에 기여하는 특성을 나타내었다. 그리고 CoMSIA 등고도 분석결과, 두 균주에 대한 선택적인 살균활성은 N-phenyl 고리상 X-치환기와 S-phenyl 고리상 R-치환기의 구조변화로 이루어 질수 있을것으로 판단된다.(2005년 1월 21일 접수, 2005년 3월 23일 수리)

색인어: 3D-QSAR, 2-알콕시페닐-3-페닐싸이오아이소인돌린-1-온, 항균활성, 저항성 및 감수성 고추역병 균(*Phytophthora capsici*), 구조 변화에 따른 비교 분자장 분석, CoMSIA 모델.

서 론

2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체는 cyclic imide계통의 화합물로서 Protox (ptotoporphyrinogen oxidase) 저해성 peroxidizing herbicide이다(Boger 등, 1999). 이들 광역동성(photodynamic) 제초제(Pallett, 1991)들의 대부분은 2-fluoro-4-chloro-5-alkoxyanilino group이 제초성을 발현하는 중요한 구조적 요소이기 때문에 alkoxyanilino-치환체들의 구조 변형에 따른 제초활성에 관하여 연구되고 있으며(Fujita, 2002) 특히, 헤테로 고리의 변화에 따른 관심이 집중되고 있다(Pallett, 1997).

앞서 연구들과 관련하여 저자들은 1-(5-methyl-3-phenylisoxazolin-5-yl)methoxy-2-chloro-4-fluorobenzene 유도체들(성 등, 2004a; 2004b) 뿐만 아니라, 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체들의 제초활성에 관한 구조-활성관계(SAR)에 대하여 보고한 바 있다(강, 2002; 이 2003). 그러나 phtalimide 구조를 가진 captafol 및 captan 등이 농업용 살균제로 상용중인

사실에 근거하여(Tomlin, 2000) 2-alkoxyphenyl-3-phenylthio-isindoline-1-one 유도체의 식물 병원성 균주들에 대한 살균 활성을 알아보기 위하여 metalaxyl 살균제에 대하여 저항성(RPC)과 감수성(SPC)을 나타내는 고추역병 균주(*Phytophthora capsici*)들의 살균활성을 측정하고 구조 변화에 따른 비교 분자장 분석(CoMFA)을 시도한(성 등, 2005) 바 유의할 만한 결과를 얻었다.

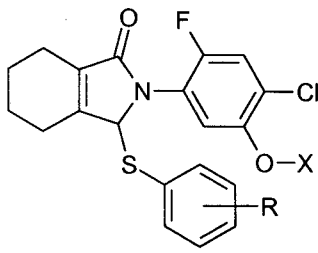
본 연구에서는 전보(성 등, 2005)에서 시도된 결과를 바탕으로 상이한 정렬(Klebe 등, 1993)에 따라 구축된 모델의 예측성을 개선하기 위함은 물론, CoMFA(Cramer 등, 1988) 분석에서 확인 할 수 없는 수소결합 받게장과 수소결합 주계장의 영향과 기여정도를 탐색하기 위하여 3차원적인 정량적 구조-활성관계(3D-QSAR)를 비교분자 유사성 지수분석(CoMSIA) 방법(Klebe 등, 1999)으로 검토하였다.

재료 및 방법

분자 모델링과 설명인자

살균제 metalaxyl에 대하여 저항성(RPC; 95CC7303)

*연락저자



X: A=propynyl (1~14) &
B=2-chloropropenyl (15~24)

Fig. 1. 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one derivatives used as template for molecular alignment.

과 감수성(SPC; 95CC7105)을 나타내는 고추역병균주 (*Phytophthora capsici*)에 대한 2-alkoxy(X)phenyl-3-(R)-phenylthioisindoline-1-one(유 등, 1995) 유도체들(그림 1)의 살균 활성값(윤, 2002)을 활용하여 CoMSIA 분석을 실행하였다. 20개의 화합물로 구성된 training set에 대하여 두 균주별 CoMSIA 모델을 유도하고 무작위로 선택된 4개 화합물의 test set로부터 모델들의 예측성을 각각 평가하였다.

CoMSIA 및 PLS (partial least square) 분석은 Sybyl 분자 모델링 소프트웨어(Ver. 7.0) (Tripos Inc.)를 사용하였으며 CoMFA(Cramer 등, 1988) 분석시와 같이 기본골격(template) (그림 1)을 바탕으로 최적화된 기질 분자들을 atom based fit (AF)방법(Marshall 등, 1979)과 field fit (FF)방법(Clark 등, 1990)으로 정렬법칙에 따라 (Raichurkar 등, 2003) 3차원 공간상에 중첩시켜 정렬하였다(성 등, 2005). AF 정렬은 각 분자내 원자들의 rigid least-squares fit에 의하여 분자들을 설정하는 것이고 FF 정렬은 분자 형태의 탐색에 의하여 분자를 설정한다. 각 분자들은 space gride를 1.0~3.0Å으로 변화시키고 probe atom으로 탄소원자(sp³ 혼성과 +1 전하)를 규칙적으로 배열한 다음에 probe 원자와 분자의 나머지 부분 사이의 Coulombic potential에 의한 정전기장과 분자간 분산력(dispersion)을 설명하기 위하여 Lennard-Jones potential에 의한 입체장(Van der Waals potential) 에너지를 계산한다. CoMSIA 분석에서도 CoMFA에서와 같이 기질분자 주변 grids의 확장을 일정한 크기(Å)로 고정하였다. 그리고 1Å 반경의 수소성 +1, 수소결합 주계 +1 및 수소결합 받게 +1의 probe atom과 기질분자 사이의 격자 교차점에서 유사성 지수들을 각각 계산하였다(Klebe 등, 1999). 그러므로 CoMFA에서 쓰이는 상호작용 에너지 대신에 CoMSIA는 유사성 지수를 사용한다. 따라서 입체장(S), 정전기장(E), 수소성장(H), 수소결합 받게장(A) 및 수소결

합 주계장(D) 등, 5개의 CoMSIA장들 뿐만 아니라, attenuation factor(α)를 0.1~0.9까지 변화시키면서 그에 따른 가장 양호한 통계치(q²값(r²_{cv}) 및 r²_{ncv} 값)를 가지는 모델을 유도하였다.

부가적 설명인자로서 LUMO (lowest occupied molecular orbital) 및 HOMO (highest occupied molecular orbital) 에너지(e.v.) 등, MO 함수의 계산은 MOPAC (Stewart, 1990) (QCPE)중 반경험적 분자궤도(semi-empirical molecular orbital) 계산 방법인 AM1 방법 (Dewar 등, 1985)으로 계산하여 사용하였다.

CoMSIA-PLS 분석

3차원 공간상에 정렬된 화합물들의 3D-구조적 특징과 생물 활성간의 상관성을 부분 최소자승(PLS) 법 (Stahle 등, 1988)으로 계산하였다. 최적의 주 성분수를 결정하기 위하여 LOO (leave-one-out) cross-validated (cv.)과정을 실행하여 q²값(r²_{cv})을 얻은 다음에 non cross-validation (ncv.)과정으로 r²_{ncv} 값을 다음과 같은 조건으로(scaling: CoMSIA standard, column filtering: 2.0 kcal/mol) 실행시켜 구 하였다. 그리고 3D-QSAR 모델은 적합성이 r²_{ncv}=0.90 이상, 그리고 예측성은 q²=0.50 이상의 값이 얻어졌을 경우에 유도된 CoMSIA 모델들이 안정성과 합리적인 예측성을 갖는 것으로 판단한다(Cramer 등, 1988).

CoMSIA 결과들은 field type(stdev*coeff)을 사용하여 CoMSIA장의 기여도로 모델들에 포함된 정보들을 graphic analyses하기 위하여 등고도(contour map)로 표현된다. 따라서 가장 높은 살균활성(Obs.pl₅₀)을 나타낸 3-fluoro-치환체(11)에 대하여 등고도를 제시하였다. 또한, 모델들의 예측성을 확인하기 위하여 test set 분자들(표 1)을 대상으로 살균 활성을 예측하였다. 고활성 화합물의 예측은 유도된 CoMSIA 모델로 optimizing QSAR (Method: Random, Cycle: 300 및 Best: 30)을 실시하여 비 치환체(R=H)를 기준으로 S-phenyl group(R)과 N-phenyl 치환기(X) 각각에 대하여 309개의 치환기를 치환시킴으로써 더욱 개선된 활성값을 갖는 치환기를 예측하고자 하였다.

결과 및 고찰

살균활성과 부가적 설명인자

모델의 개선된 예측성을 탐색하기 위하여 상이한 유형의 AF(atom based fit) 및 FF (field fit) 정렬방법 (Raichurkar 등, 2003)을 실행하였다. 그리고 grid(Å)

및 attenuation factor(α)의 변화 그리고 입체장(S), 정전기장(E), 수소성장(H), 수소결합 받게장(A) 및 수소결합 주게장(D) 등, 5개 CoMSIA 장의 조합에 따른 모델을 유도하였다. 두 군주 별 관측된 살균 활성값(Obs. pI_{50})과 두 정렬 방법 중, 한 예로 FF 정렬 조건에서 유도된 CoMSIA 모델 R5 (및 S1)에 의한 예측값(Pred. pI_{50})을 “표 1에 정리하였다. 자료에 의하면, R=3-fluoro 치환체(11)가 제일 큰 살균 활성(RPC: 4.16 및 SPC: 3.98)을 보였으며 그 크기는 SPC 보다 RPC가 약간 큰 값을 나타내는 경향이였다(RPC>SPC).

수용체와 분자 리간드와의 상호작용이 전하나 이온의 이동반응인 경우에는 Coulombic field 만으로 정전기적인 특성을 나타내는 것이 적절하지 않으므로 LUMO와 HOMO 에너지로 표현되는 분자 궤도장(mole-

cular orbital field)을 부가적 설명인자(Waller 등, 1993)로 활용하였으며 그 경우에 다소 높은 통계값을 나타내었다. 분자 사이의 결합생성 반응에서 HOMO 에너지는 분자가 전자쌍 주게인 Lewis 염기로 작용하는 친핵성 정도(nucleophilicity)의 척도이며 LUMO 에너지는 분자가 전자쌍 받게인 Lewis 산으로 작용하는 친전자성 정도(electrophilicity)의 척도이다.

CoMSIA 분석시, CoMSIA 장의 조합에 따른 모델의 탐색이 시도되었으나 수소결합 주게장(D)의 경우에는 통계값이 불량하여 조합에서 제외되었다. 왜냐하면, 기질분자 내 N 및 O 원자들의 전자 공여작용에 의한 이들 헤테로 원자들과 수용체의 H 원자들 간에 수소결합 받게장 즉, A-형의 H-결합성만을 나타내기 때문으로 설명된다.

Table 1. Observed fungicidal activities (Obs. pI_{50}) against RPC and SPC, predicted values (Pred.) by CoMSIA models and their deviation (Dev.) for training set and test of set using field fit and atom based fit alignment

No.	Sub. (R)	RPC (FF)			SPC (AF)		
		Obs.	Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}	Obs.	Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}
1	H	3.62	3.52 ^{c)}	0.10 ^{c)}	3.59	3.66	-0.07
2	2-Methoxy	3.84	3.86	-0.02	3.67	3.64	0.03
3	4-Methoxy	3.60	3.70	-0.10	3.54	3.83 ^{c)}	-0.29 ^{c)}
4	2-Methyl	3.83	3.38 ^{c)}	0.45 ^{c)}	3.89	3.86	0.03
5	3-Methyl	3.62	3.62	0.00	3.55	3.54	0.01
6	4-Methyl	3.61	3.57	0.04	3.62	3.56	0.06
7	2-Chloro	3.71	3.73	-0.02	3.64	3.72	-0.08
8	3-Chloro	3.84	3.92	-0.08	3.80	3.72	0.08
9	4-Chloro	3.82	3.82	0.00	3.69	3.74	-0.05
10	2-Fluoro	3.94	3.91	0.03	3.79	3.74	0.05
11	3-Fluoro	4.16	4.03	0.13	3.98	3.77 ^{c)}	0.21 ^{c)}
12	4-Fluoro	3.81	3.74	0.07	3.74	3.72	0.02
13	3-Trifluoromethyl	3.54	3.97 ^{c)}	-0.43 ^{c)}	3.61	3.68	-0.07
14	4-Trifluoromethyl	3.80	3.86	-0.06	3.69	3.86 ^{c)}	-0.17 ^{c)}
15	H	3.16	3.19	-0.03	3.06	3.15	-0.09
16	2-Methoxy	3.20	3.48 ^{c)}	-0.28 ^{c)}	3.10	3.14	-0.04
17	3-Methoxy	3.40	3.45	-0.05	3.14	3.15	-0.01
18	4-Methoxy	3.48	3.38	0.10	3.32	3.32	0.00
19	2-Chloro	3.39	3.37	0.02	3.25	3.21	0.04
20	3-Chloro	3.54	3.47	0.07	3.27	3.21 ^{c)}	-0.06 ^{c)}
21	4-Chloro	3.39	3.46	-0.07	3.31	3.24	0.07
22	3-Fluoro	3.50	3.61	-0.11	3.28	3.27	0.01
23	3-Trifluoromethyl	3.47	3.46	0.01	3.28	3.21	0.07
24	4-Trifluoromethyl	3.54	3.48	0.06	3.32	3.37	-0.05
	Training set. Ave. ^{d)}			0.054			0.047
	Test set. Ave. ^{e)}			0.315			0.183

X: A=propynyl (1~14), B=2-chloropropenyl (15~24), ^{a)}predicted value by model R5 & S1, ^{b)}difference between observed values and predicted values, ^{c)}test set compound, ^{d)}average residual of training set., ^{e)}average residual of test set.,

저항성 균주에 대한 모델

정렬 방법에 따른 저항성 균주(RPC)에 대한 살균활성을 예측하기 위하여 입체장(S), 정전기장(E), 소수성장(H), 수소결합 받개장(A) 및 부가적 설명인자로 분자 궤도장 등이 조합된 CoMSIA장 조건에서 유도된 CoMSIA 모델(R1~R8)들의 통계값들을 표 2에 정리하였다.

AF 정렬의 경우, CoMSIA장에 분자 궤도장을 포함하지 않을 때에는 $q^2(r_{cv}^2)=0.467\sim0.515$ 및 $r_{ncv}^2=0.757\sim0.882$ 이었다. HOMO 추가시에는 $q^2=0.476\sim0.526$ 및 $r_{ncv}^2=0.865\sim0.884$ 이었으나 LUMO를 추가하였을 경우에는 다소 향상된 통계값($q^2=0.484\sim0.518$ 및 $r_{ncv}^2=0.872\sim0.890$)을 나타내었다. 그러나 모델 R2의 경우, LUMO 분자 궤도장이 포함된 조합 조건에서 $\alpha=0.1\sim0.9$ 까지 변화시켜 모델을 탐색한 결과, 예측성(q^2)이 약간 향상된 모델($q^2=0.553$, $r_{ncv}^2=0.886$ 및 $\alpha=0.5$)을 얻을 수 있었다.

FF 정렬의 경우, 앞서와 같은 접근방식으로 모델을 탐색한 결과 정전기장(E), 수소결합 받개장(A) 및 LUMO 분자 궤도장(L)의 조합 조건에서 $\alpha=0.1\sim0.9$ 까지 변화시켜 모델 R2 보다도 높은 예측성(q^2)을 나타내는 가장 양호한 모델 R5를 유도하였다. 이때 CoMSIA장의 상대적인 기여 비율은 정전기장 67.3%, LUMO 분자 궤도장 24.4% 및 수소결합 받개(A)장 8.3%의 순으로 살균활성에 영향을 미치고 있음을 설명하고 있다. 또

한, probe atom과 분자내 원자들간의 거리에 사용된 α 값의 변화에 따른 q^2 값의 관계(그림 2)로부터 $\alpha=0.8$ 일 때 가장 높은 예측성($q^2=0.714$)을 나타내었고 적절한 조성의 수는 5이었다. 그러므로 RPC 균주의 경우에는 FF 정렬시 모델 R5가 그리고 AF 정렬시에 유도된 모델 R2보다 양호한($R5>R2$) 경향을 보였다.

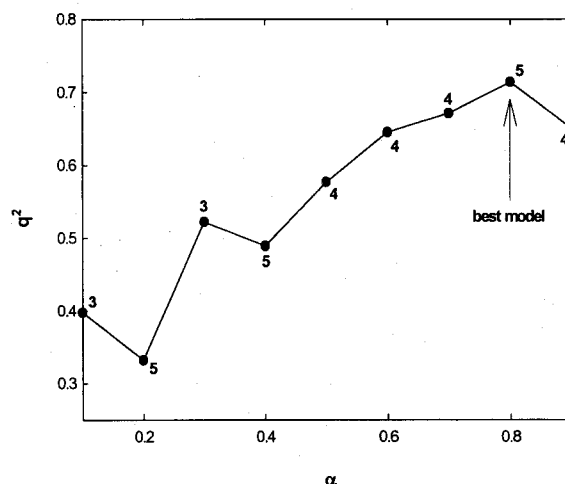


Fig. 2. Variation of q^2 upon changing the attenuation factor, α used in the distance dependence between the probe atom and the atoms of the molecules in CoMSIA model with field fit alignment; RPC. (The number on top & bottom of the point indicates the optimum number of components).

Table 2. 3D-QSAR results of the models with different alignments and field combinations for RPC in CoMSIA-PLS

Alignment types	Atom based fit				Field fit			
	R1	R2	R3	R4	R5 ^{a)}	R6	R7	R8
Models								
Fields combinations ^{b)}	EAL	SEAL	EHAL	SEHAL	EAL	SEAL	EHAL	SEHAL
Space Grid(Å)	3.0	3.0	3.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Component number	5	5	5	5	5	5	5	5
Attenuation factor (α)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.8	0.8	0.8	0.8
Cross-validated r_{cv}^2 (q^2) ^{c)}	0.524	0.553	0.447	0.487	0.714	0.701	0.649	0.637
Non cross-validated r_{ncv}^2 ^{d)}	0.885	0.886	0.879	0.882	0.918	0.917	0.916	0.915
Standard error estimate	0.092	0.092	0.095	0.094	0.078	0.078	0.079	0.080
F value ^{e)}	21.614	21.769	20.337	20.890	31.324	31.086	30.508	29.998
Steric field	-	0.314	-	0.209	-	0.039	-	0.027
Electrostatic field	0.679	0.405	0.427	0.349	0.673	0.635	0.512	0.492
Hydrophobic (logP) field	-	-	0.319	0.197	-	-	0.181	0.176
H-bond acceptor field	0.210	0.163	0.158	0.130	0.083	0.084	0.078	0.077
LUMO molecular orbital field	0.111	0.118	0.096	0.115	0.244	0.242	0.229	0.228

^{a)}The best model, ^{b)}Abbreviation: S = steric field, E = electrostatic field, H=hydrophobic field, A = hydrogen bond acceptor field, L=LUMO, ^{c)}cross-validated r^2 , ^{d)}non-cross-validated r^2 , ^{e)}fraction of explained versus unexplained variance.

민감성 균주에 대한 모델

SPC 균주의 경우에도 살균활성을 예측하기 위하여 CoMSIA장에 분자 궤도장을 추가하지 않았을 경우와 LUMO 및 HOMO 각각을 별도로 추가하였을 경우로 나누어 CoMSIA 장의 조합에 따른 통계치를 구하여 표 3에 정리하였다.

AF 정렬의 경우, 분자 궤도장을 모두 추가하지 않았을 때에는 $q^2=0.666\sim0.733$ 및 $r^2_{ncv.}=0.906\sim0.925$ 를 보였고 LUMO의 추가에서는 $q^2=0.727\sim0.825$ 및 $r^2_{ncv.}=0.911\sim0.940$ 이었다. 그러나 HOMO가 추가된 경우에는 $q^2=0.727\sim0.823$ 및 $r^2_{ncv.}=0.913\sim0.954$ 의 모델을 얻을 수 있었다. 모델 S1에서 입체장(S)과 HOMO장(O)만이 조합된(SO) 조건의 경우, $\alpha=0.1\sim0.9$ 까지 변화시킨 결과, $\alpha=0.3$ 일 때 가장 양호한($grid=3.0\text{\AA}$, $q^2=0.823$ 및 $r^2_{ncv.}=0.954$) 모델이었으며 이 경우, 상대적인 기여 비율은 입체장 86.9%, HOMO장이 13.1% 순으로 입체장(S)이 절대적으로 큰 기여를 보였으나 수소결합 받게장(A)이 관여하지 않음을 설명하고 있다.

FF 정렬의 경우에서도 AF 정렬시와 유사한 경향이었으며 LUMO장 추가시보다 HOMO장의 추가시에 근소한 차이로 향상된($q^2=0.704\sim0.823$ 및 $r^2_{ncv.}=0.927\sim0.955$) 모델 S5 및 S7 등, 두 모델이 양호하였으며 서로 유사한 경향을 보였다. 따라서 SPC 균주의 살균활성에 관한 모델은 AF 정렬시 모델 S1과 FF 정렬시의

모델 S5 (및 S7)이 모두 양호하였으나 모델 S5보다 모델 S1이 $r^2_{ncv.}$ 값 수준에서 높았으므로($r^2_{ncv.}=S1\geq S5$) 모델 S1을 가장 좋은 모델로 선택하였다.

두 균주에 대한 모델의 비교

균주 별 유도된 모델들의 통계값에 관한 검토 결과로부터 가장 양호한 모델은 RPC의 경우, FF 정렬시의 모델 R5이었고 SPC의 경우에는 AF 정렬시의 모델 S1이었다. 따라서 이들 두 모델에 의하여 계산된 예측값을 “표 1”에 정리하였다. 두 모델 별로 관측값과 예측값 차(Dev.)의 평균값(Ave.)으로부터(training set=0.047~0.054 및 test bset=0.183~0.315) 관측값과 예측값 사이에 좋은 일치를 보였으므로 유도된 모델들이 매우 양호함을 시사하고 있다. 이들 가장 양호한 모델을 대상으로 RPC(R5)의 경우에는 기질 분자 내 헤테로 원자들의 전자공여 작용에 의하여 기질분자와 수용체 내 작용점 상의 H 원자들 간 A-형의 수소 결합성에 따른 수소결합 받게장(A)이 영향을 미치는 반면에 SPC(S1 또는 S5)의 경우에는 영향을 미치지 않았다.

한편, 부가적 설명인자로서 분자 궤도장의 경우에도 두 모델은 여기에서 다른 기질 유도체의 CoMFA 분석에서와 같이(성 등, 2005) RPC 균주에는 LUMO (24.4%) 그리고 SPC 균주에는 HOMO(13.1%) 분자 궤도

Table 3. 3D-QSAR results of the models with different alignments and field combinations for SPC in CoMSIA-PLS

Alignment Types	Atom based fit				Field fit				
	Models	S1 ^{a)}	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Fields combinations ^{b)}	SO	SAO	SHAO	SEHAO	SO	SHO	SHAO	SEHAO	
Space Grid(Å)		3.0	2.5	1.5	1.0	2.0	1.0	2.5	2.5
Component number		5	5	4	4	5	5	5	5
Attenuation factor (α)		0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4
Cross-validated $r^2_{cv.}$ (q^2) ^{c)}		0.823	0.780	0.742	0.727	0.823	0.741	0.744	0.704
Non cross-validated $r^2_{ncv.}$ ^{d)}		0.954	0.935	0.925	0.913	0.951	0.952	0.955	0.927
Standard error estimate		0.064	0.076	0.079	0.085	0.066	0.065	0.063	0.081
F value ^{e)}		57.485	40.173	46.153	39.121	54.398	56.135	59.630	35.466
Steric field		0.869	0.837	0.293	0.037	0.853	0.230	0.154	0.025
Electrostatic field		-	-	-	0.736	-	-	-	0.692
Hydrophobic (logP) field		-	-	0.533	0.001	-	0.619	0.439	0.105
H-bond acceptor field		-	0.004	0.018	0.223	-	-	0.272	0.153
HOMO molecular orbital field		0.131	0.159	0.156	0.003	0.147	0.151	0.135	0.025

^{a)}The best model, ^{b)}Abbreviation: S = steric field, E = electrostatic field, H=hydrophobic field, A=hydrogen bond acceptor field, O=HOMO, ^{c)}cross-validated r^2 , ^{d)}non-cross-validated r^2 , ^{e)}fraction of explained versus unexplained variance.

Table 4. Predicted fungicidal activities (pI₅₀) for unknown propynyl (A) substituents using the best CoMSIA models

Order	Sub.(R)	Sub. (X)	RPC		Sub. (R)	Sub. (X)	SPC	
			Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}			Pred. ^{c)}	Dev. ^{b)}
1	<i>o</i> -SCF ₃	-S(CH ₃) ₂ ⁺	4.12	0.09	<i>p</i> -cyclohexyl	-S- <i>tert</i> -butyl	4.45	0.59
2	<i>o</i> -NO ₂	-NHOH	4.04	0.01	<i>p</i> -CHPh ₂	-SO ₂ NHNH ₂	4.43	0.57
3	<i>o</i> -COPh	-N ₂ ⁺	4.03	0.00	<i>p</i> -cyclohexyl	-NHOH	4.42	0.56
4	<i>o</i> -OPh	-S(CH ₃) ₂ ⁺	4.03	0.00	<i>p</i> -cyclohexyl	-CHO	4.42	0.56

^{a)}The values by model R5, ^{b)}The values were difference between predicted values by the model and the highest fungicidal activity compound, **11**(RPC) & **4**(SPC) (pred. pI₅₀(RPC)=4.03, pred. pI₅₀(SPC)=3.86), ^{c)}The values by model S1.

장이 살균활성에 기여하는 특성을 나타내고 있다. 그러므로 분자 궤도장의 영향은 약 2:1의 비율로 RPC 군주가 SPC 군주에 비하여 크게 미치고 있다. 또한, RPC 군주에 대하여 LUMO 분자 궤도장이 상당한 기여 비율을 나타낸다는 사실은 살균 활성이 기질 분자의 전자 친화력에 의존적이므로 기질분자 중 양하전을 띠는 부분이 반응점일 것임을 예상할 수 있다. 반면에 SPC 군주의 살균활성에 대한 모델의 경우에는 기질 분자의 살균 활성이 핵 친화력에 의존적이므로 기질분자 중 음하전을 띠는 부분이 반응점일 것으로 추측된다. 이같은 차이점은 저항성 군주(RPC)에 대하여 선택적으로 살균활성을 개선할 수 있는 근거가 될 것으로 판단된다.

CoMSIA 모델의 예측성

두 군주별 관측된 살균활성과 선택된 모델(R5 및 S1)에 의한 예측값 사이의 관계중에서 한 예로, SPC의 살균 활성에 대한 관측값과 유도된 모델 S1에 의하여 계산된 예측값 사이의 관계(그림 3)로부터 모델의 상관성($r^2=0.867$)이 매우 양호함을 보여주고 있다. 두 군주의 살균활성에 관한 모델의 예측성(q^2)이 $q^2=0.50$ 을 상회하므로 매우 양호한 예측성을 갖을 뿐만 아니라, "표 1"의 test set에 대한 관측값과 예측값의 차(Dev.)가 관측값의 ±10% 미만의 값을 보였으며 두 군주 별로 오차의 평균값(Test. ave.)이 0.183~0.315이었다.

또한, 살균활성의 개선은 물론, 두 군주간 선택성 있는 화합물을 탐색하기 위하여 *N*-phenyl 고리상 X-치환기와 *S*-phenyl 고리상의 R-치환기 각각 309개에 대한 optimizing QSAR을 실시하여 그 결과를 표 4에 정리하였다. 가장 높은 활성이 예상되는 화합물은 A=propynyl-치환체로서 RPC: R=2-SCF₃-, X=-⁺S(CH₃)₂-기 (pred. pI₅₀=4.12) 및 SPC: R=4-cyclohexyl-, X=-S-*tert*-butyl기(pred.pI₅₀=4.45)이었다.

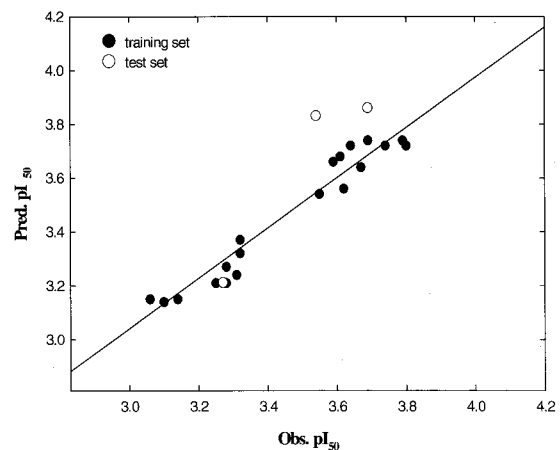


Fig. 3. Relationship between actual values (obs.) and prediction values (pred.) by CoMSIA model S1 for the fungicidal activities against SPC : $Pred.pI_{50}(SPC)=0.933$ $Obs.pI_{50}(SPC)+0.241$ ($n=24$, $s=0.098$, $F=143.440$ & $r^2=0.867$).

이 결과, SPC군주에 대한 경우에 예측된 화합물은 제일 큰 살균 활성을 나타낸 화합물(RPC: **11** 및 SPC: **4**)에 비하여 다소 개선된 화합물(Dev.=0.56~0.59)을 예측할 수 있었다.

CoMSIA 등고도

군주 별 선택된 모델들에 포함된 정보들을 graphic analyses하기 위하여 가장 높은 살균활성(Obs.pI₅₀)을 나타낸 3-fluoro-치환체(**11**)에 대하여 등고도를 제시하였다. 먼저, RPC 군주에 있어서 정전기장(E)과 수소결합 받게장(A) 및 LUMO 등이 조합된 모델 R5에 근거한 등고도를 "그림 4"에 나타내었다. 여기에서는 *S*-phenyl 고리상 ortho 및 para-치환기의 음하전이 증가할수록(red) 그리고 *N*-phenyl 고리상 X-치환기는 양하전이 증가(blue)하고 indolin-1-one의 carbonyl group

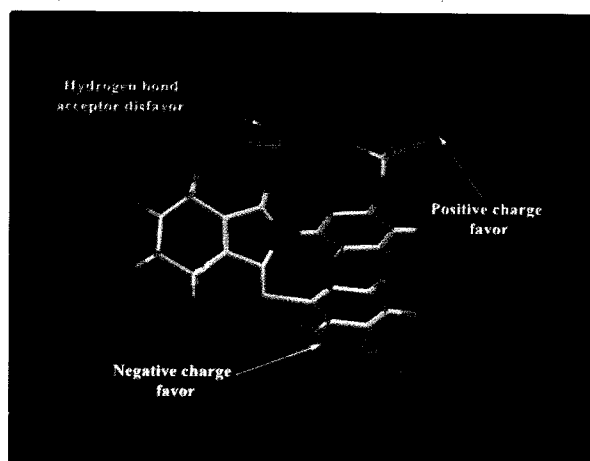


Fig. 4. CoMSIA contour maps for electrostatic field and hydrogen bond acceptor field (stdev*coeff) on the fungicidal activity against RPC. The most active compound 3-fluoro substituent (11) is shown in capped sticks.

부분이 수소결합 받개로서의 성질이 작을수록(orange) 살균활성이 증가 될 것이다. 그러므로 RPC 균주에 대한 살균활성을 개선하기 위하여 indolin-1-one의 carbonyl group이 수소 결합성을 나타내지 않는 작용기로 대체되어야 할 것으로 판단된다.

SPC 균주의 경우에는 통계값이 유사한 입체장(S)과 HOMO만으로 구성된 모델 S1 대신에 입체장(S), 소수성장(H), 수소결합 받개장(A) 및 HOMO 등이 조합된 모델 S7에 근거한 등고도를 “그림 5”에 제시하였다. 왜냐하면, 공통적으로 입체장(S)을 포함하고 있을뿐만 아니라, 구조상 소수성장(H)과 수소결합 받개장(A)의 크기와 위치를 이해하고자 하였기 때문이다. “그림 5”로부터 S-phenyl 고리상 para-치환기가 steric bulky한 입체성이 크고(green) 수소결합 받개로서의 성질이 작을수록(orange) 그리고 N-phenyl 고리상 meta-위치의 산소원자 위치는 수소결합 받개로서의 성질이 작을수록 활성이 증가할 것임을 알 수 있다. 또한, X=propynyl-기에서 산소원자 가까운 부분은 소수성이 크고(blue) 약간 먼 부분은 소수성이 낮을수록(red) 활성이 증가할 것으로 예상된다. 즉, X-치환기는 작은 크기의 치환기로서 소수성이 큰 치환기가 그리고 N-phenyl 고리상 meta-위치의 산소 원자가 수소결합 받개로서 작용하지 않도록 산소원자를 탄소원자 등으로 변화되면 살균활성이 증진될 것으로 믿어진다. 따라서 전반적으로 두 균주에 있어서 X 및 R-치환기 부근의 상이한 CoMSIA장이 선택성의 근거가 될 수 있을 것으로 판단된다

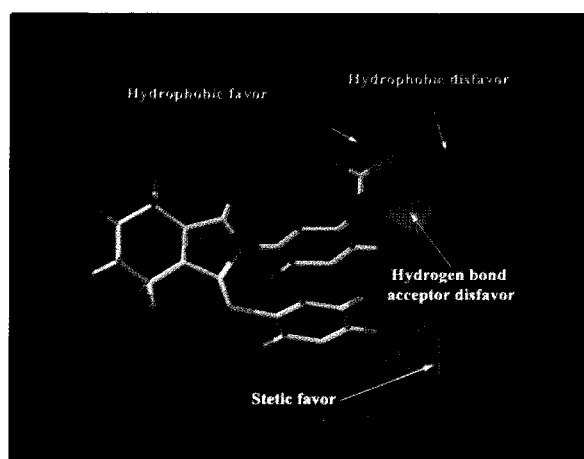


Fig. 5. CoMSIA contour maps for steric field, hydrophobic field and hydrogen bond acceptor field (stdev*coeff) on the fungicidal activity against SPC. The most active compound 3-fluoro substituent (11) is shown in capped sticks.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단(KOSEF) 우수연구센터(ERC) 지원 연구비(No. R11-2002-100-03002-2)에 의하여 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Boger, P and K. Wakabayashi (1999) Peroxidizing Herbicides, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Clark, M., R. D. Cramer III, D. M. Jones, D. E. Patterson and P. E. Simeroth (1990) Comparative molecular field analysis (CoMFA). 2. Toward its use with 3D-structural databases. *Tetrahedron Comput. Methodol.* 3:47-59.
- Cramer, R. D., D. E. Patterson and J. D. Bunce (1988) Comparative molecular field analysis (CoMFA), I. Effect of shape on the binding of steroids to carrier proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 110:5959-5967.
- Dewar, M. J. S., E. G. Zoebish, E. F. Healy and J. J. P. Stewart (1985) AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 107:3902-3909.
- Fujita, T. (2002) Similarities in bioanalogous structural transformation patterns, Ch. 15, *In Agrochemical Discovery, Insect, Weed, and Fungal control* (ed Baker, D. R. and N. K. Umetsu) ACS Symposium Series No. 774. American Chemical Society, Washington, DC.

- Klebe, G. and U. Abraham (1999) Comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 13:1-10.
- Klebe, G. (1993) Structural Alignment of Molecules, In 3D QSAR Drug Design, Theory, Methods and Applications, (ed. Kubinyi, H.), ESCOM. Leiden, pp.173-199.
- Marshall, G. R., C. D. Barry, H. E. Bosshard, R. A. Dammkoehler and D. A. Dunn (1979) The conformational parameter in drug design: active analog approach. pp.205-226, In Computer-assisted drug design (ed. Olsen, E. C. and R. E. Christoffersen). American Chemical Society, Washington, D.C.
- Pallett, K. E. (1991) Other Primary Target Sites for Herbicides, Ch.5., In Target Sites for Herbicide Action (ed. Kirkwood, R. C.), Plenum Press. New York.
- Pallett, K. E. (1997) Herbicide target sites, recent trends and new challenges. Proceeding of Brighton Crop Protection Conference-Weeds, pp.575-578.
- Raichurkar, A. V. and V. M. Kulkarni (2003) Understanding the antitumor activity of novel hydroxysemicarbazide derivatives as ribonucleotide reductase inhibitors using CoMFA and CoMSIA. *J. Med. Chem.* 46:4410-4427.
- Stahle, L. and S. Wold (1988) Multivariate data analysis and experimental design in biomedical research. *Progr. Med. Chem.* 25:292-334.
- Stewart, J. J. (1990) MOPAC: A semiempirical molecular orbital program. *J. Comp.-Aided Mol. Design.*, 4(1):1-105.
- Tomlin, C. D. S. (2000) A World Compendium: The Pesticide Manual, Eleventh Ed., British Crop Protection Council, 49 Downing St., Farnham, Surrey, UK. Tripos Associates, Inc., 1699 S. Hanley Road, Suite 303, St. Louis, MO 63144-2913, U.S (<http://www.tripos.com/Bookshelf/qsar/>)
- Waller, C. L. and G. R. Marshall (1993) Three-dimensional quantitative structure-activity relationship of angiotensin-converting enzyme and thermolysin inhibitors. 11. A comparison of CoMFA models incorporating molecular orbital fields and desolvation free energies based on active-analog and complementary-receptor-field alignment rules. *J. Med. Chem.* 36:2390-2403.
- 강은규 (2002) 2-(5-alkoxyphenyl)-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체들의 제조활성에 관한 3-Thioalkoxy groups의 영향. 충남대학교 대학원 석사학위 논문.
- 이윤정 (2003) 2N-substituted-phenylisindoline-1-one 유도체들의 protox 저해활성에 관한 2D 및 3D-QSAR 분석. 충남대학교 대학원 석사학위 논문.
- 성낙도, 송종환, 양숙영, 박경용 (2004a) 비교 분자장 분석(CoMFA) 방법에 따른 1-(5-methyl-3-phenylisoxazolin-5-yl)methoxy-2-chloro-4-fluorobenzene 유도체들의 protox 저해활성에 관한 이해. *한국농약과학회지* 8(3):151-161.
- 성낙도, 송종환, 박경용 (2004b) 비교분자 유사성 지수 분석(CoMSIA) 방법에 따른 1-(5-methyl-3-phenylisoxazolin-5-yl)methoxy-2-chloro-4-fluorobenzene 유도체들의 protox 저해활성에 관한 이해. *한국응용생명화학회지* 47(4):414-421.
- 성낙도, 윤태용 송종환, 정훈성 (2005) 상이한 정렬에 따른 비교 분자장 분석(CoMFA) 방법을 이용한 새로운 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체들의 살균활성에 관한 3차원적인 정량적 구조와 활성과의 관계. *한국응용생명화학회지* 48(1):82-88.
- 유응걸, 김재녕, 송종환, 정지현, 김진석 (1995) 제조성 N-치환된 페닐-3,4-디메틸-2-(S-치환된 티오)-5-옥소-2,5-디히드로 피롤 유도체와 그 제조방법. 대한민국 특허, 제088511호.
- 윤태용 (2002) 2-(5-alkoxyphenyl)-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체의 구조와 살균활성과의 관계. 충남대학교 대학원 박사학위논문.

Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Analyses on the Fungicidal Activities of New Novel 2-Alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one Derivatives Using the Comparative Molecular Similarity Indices Analyses (CoMSIA) Methodology Based on the Different Alignment Approaches

Nack-Do Sung^{*}, Tae-Yong Yoon¹, Jong-Hwan Song², Hoon-Sung, Jung (*Division of Applied biologies and Chemistry, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon 305-784, Korea.*, ²*Cytosine Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yusong, Daejeon 305-606, Korea*)

Abstract: 3D-QSAR studies for the fungicidal activities against resistance phytophthora blight (RPC; 95CC7303) and sensitive phytophthora blight (*Phytophthora capsici*) (SPC; 95CC7105) by a series of new 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one derivatives (A & B) were studied using comparative molecular similarity indices analyses (CoMSIA) methodology. From the based on the results, the two CoMSIA models, R5 and S1 as the best models were derived. The statistical results of the models showed the best predictability and fitness for the fungicidal activities based on the cross-validated value ($q^2=0.714\sim0.823$) and non cross-validated value ($r^2_{ncv}=0.918\sim0.954$), respectively. The model R5 for fungicidal activity of RPC generated from the field fit alignment and combination of electrostatic field, H-bond acceptor field and LUMO molecular orbital field. The model S1 (or S5) for fungicidal activity of SPC generated from the atom based fit alignment and combination of steric field and HOMO molecular orbital field. The models also shows that inclusion of H-bond acceptor field (A) improved the statistical significance of the models. From the based graphical analyses of CoMSIA contribution maps, it was revealed that the novel selective character for fungicidal activities between the two fungi by modify of X-substituent on the *N*-phenyl group and R-substituent on the *S*-phenyl group will be able to achievement.

Key words : 3D-QSAR, 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-ones, fungicidal activity, resistance & sensitive phytophthora blight (*Phytophthora capsici*), different alignment approaches, CoMSIA model.

^{*}Corresponding author (Fax. : +82-42-825-3306, E. Mail : ndsung@cnu.ac.kr)