

KR-31064의 수용체-리간드 결합특성에 대한 연구

이 승호#

상명대학교 천안캠퍼스 공과대학 의생명공학과 (Received January 10, 2014; Revised January 18, 2014; Accepted January 21, 2014)

Receptor-Ligand Binding Characteristics of KR-31064

Sunghou Lee#

Dept. of Biomedical Technology, Sangmyung University, Cheonan 330-720, Korea

Abstract — KR-31064 was developed for the strong angiotensin II receptor antagonist among the one of pyridyl imidazol series compounds. To investigate the receptor-ligand binding characteristics of this nonpeptide antagonist, binding experiments were deployed in various conditions and $ex\ vivo$ contractile responses were tested toward the standard compound, losartan. Receptor binding experiments with radiolabeled angiotensin II, the IC $_{50}$ value for KR-31064 resulted 0.67 nM without any activities toward type 2 angiotensin II receptor. The comparative potency against losartan was more than 18 fold and the specific activity in type 1 angiotensin II receptor was more than 10,000 fold comparing to the type 2 receptor. Scatchard analysis of saturation binding data showed KR-31064 acted on the receptor in a competitive mode. KR-31064 inhibited the contractile response derived by angiotensin II (pK $_{\rm B}$: 9.86) similar to that of losartan with decreased maximum signals. As a potent and specific type 1 angiotensin II receptor antagonist, KR-31064 may have possibilities for the development of diagnostic ligands that can be used as tools for various biochemical research experiments and non-invasive diagnostics.

Keywords

KR-31064, angiotensin receptor antagonist, antihypertension, receptor ligands, diagnostics, losartan

현재까지 혈압조절과 관련된 안지오텐신 시스템의 중요한 생리적 역할을 응용하여 다양한 시도를 통한 혈압조절물질을 개발하려고 하는 노력을 거듭해 왔다.¹⁾ 최근 알리스키렌이라고 하는 레닌 저해제가 개발되었는데 실험결과, 단독 또는 병용투여를 통하여 안전하고도 만족할 만한 혈압강하 효과가 나타났다고 보고된 바 있다.²⁾ 또한 안지오텐신 생성을 억제하는 안지오텐신 전환효소 억제제의 경우 고혈압과 울혈성 심부전 증상의 치료를 위하여 임상적으로 유효한 결과가 도출되었으나,³⁾ 마른 기침, 맥관부종 등과 같은 부작용^{4,5)}들이 보고되었다. 이에 부작용을 최소한으로 줄이면서도 안지오텐신 시스템을 적극적으로 억제할 수 있는 새로운 약물개발 연구들이 활발하게 일어나게되었다.

안지오텐신 II 수용체 아형1(angiotensin II receptor subtype

*Corresponding Author

Sunghou Lee

Dept. of Biomedical Technology, Sangmyung University, Cheonan 330-720, Korea

Tel.: 041-550-5388 Fax.: 041-550-5184

E-mail: lees@smu.ac.kr

1:AT₁, subtype 2:AT₂)에 작용하는 로자탄^{6,7)}은 부분 작동제 효과가 나타나지 않는 약물⁸⁾로 경구형 혈압강하제로서의 신기원을 이룩하였는데, 작용기전이 안지오텐신 전환효소의 억제가 아니라 안지오텐신 수용체에 대한 직접적인 길항작용을 통하여 안정적이고도 선택적인 작용을 나타내게 되었다. 현재 로자탄은 최초의 경구형 안지오텐신 수용체 길항제^{9,10)}로서 고혈압 치료를 위하여 상용되고 있다. 이러한 혈압조절제로서의 실질적인의미를 넘어서 점차로 발전해가고 있는 비침투성 진단연구에그 응용영역을 넓히고 있는 안지오텐신 수용체 길항제¹¹⁻¹³⁾들은 양전자방출단층촬영¹²⁻¹⁴⁾을 위한 리간드로서도 발전가능성이 매우 높은 것으로 평가되고 있다. 따라서 최근 국내에서 개발된 피마자탄¹⁵⁾을 비롯한 이러한 영역의 약물들은 고혈압 치료제로서의 역할뿐만 아니라 진단시약으로서의 부가적인 역할도 기대된다.

이와 같은 현황에 비추어 새롭게 개발된 KR-31064의 생리 활성 기능에 대한 연구 내용을 수용체-리간드 측면에서 분석한 결과들을 중심으로, 안지오텐신 수용체에 작용하는 비펩타이드 리간드로서의 KR-31064에 대한 연구내용들을 보고하고 자 한다.

Fig. 1 – Chemical structure of KR-31064.

재료 및 실험방법

시약

KR-31064 (2-butyl-5-dimethoxymethyl-6-(pyridyn-2-yl)-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-3H-imidazo[4,5-b] pyridine, US patent #5691348, Fig. 1)은 한국화학연구원 의약화학연구팀에서 개발 및 합성되었으며 비교연구를 위하여 표준물질인 L-159809, PD-123177 및 로자탄도 고순도로 합성되어제공받았다. [Sar¹, Ile³]-Angiotensin II, Angiotensin II(AII) acetate, arterenol bitartarate, vasopressin acetate, isoproterenol hydrochloride들은 Sigma Chemical Co.(미국)를 통하여 구입하였으며, 방사성동위원소 리간드인 [125I] [Sar¹, Ile³]-AII와 [125I] CGP 42112A(2200 Ci/mmol), 수용체 시약인 human recombinant AT₁ and AT₂ receptor들은 PerkinElmer life and analytical sciences(미국)으로부터 구입하여 사용하였다. KR-31064와 로자탄은 dimethyl sulfoxide에 용해하여 사용하였으며 최종 희석액은 안지오텐신 수용체 결합실험에 사용한 완충액을 사용하였다.

수용체 결합실험

KR-31064의 안지오텐신 수용체에 대한 리간드로서의 결합특성을 연구하기 위하여 적용한 방법은 이미 개발된 피리딘 이미다졸 시리즈의 다른 화합물들에 대한 연구논문 16 과 같은 방법으로 진행하였다. AT_1 수용체와 AT_2 수용체에 대한 리간드들의 선택적 활성을 연구하기 위하여 사용한 방사성동위원소가 표지된리간드에 의한 수용체 결합실험 방법은, $0.21\,\mathrm{nM}$ 의 [125 I] [Sar¹, Ile 8]-AII와 $0.5\,\mathrm{nM}$ of [125 I] CGP 42112A가 표지 리간드로 사용되었다. KR-31064를 포함하여 실험에 사용된 합성물질들은 최초 $2.5\,\mathrm{mM}$ 동도로 dimethylsulfoxide에 녹인 후 완충액을 사용하여 10개의 다른 농도로 연쇄희석하여 사용하였다.

실험완충용액(50 mM Tris, 5 mM $\mathrm{MgCl_2}$, 1 mM EDTA , 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4)과 함께 각각의 방사성동위원소 리간드를 96웰을 갖춘 미소판 플랫폼에서 시험약물과 $37^{\circ}\mathrm{C}$ 에서

60분간 반응시킨 후(AT_2 수용체의 경우는 180분) 0.3% polyethylenimine에 충분히 적셔놓은 유리섬유 필터 GF/C를 통하여 여과 하였다. 여과시 차가운 50 mM 농도의 Tris buffer(pH 7.4)가 사용되었으며 여과와 세척이 끝난 필터는 고형증진제를 첨가하여 측정기(MicroBeta, PerkinElmer life and analytical sciences, 미국)에서 동위원소 총량을 측정하였다. 각 수용체 결합실험의 최소 신호는 $10~\mu$ M 농도의 [Sar^1 , Ile^8]-AII를 같이 반응시켜 얻을 수 있었다.

안지오텐신 길항제로서의 KR-31064를 표준물질들과 비교하기 위하여 IC_{50} 수치를 도입하게 되었는데 이는 어떠한 리간드가 유효한 수용체 결합신호를 50% 억제하는 농도를 나타내는 것으로 다양한 리간드들의 비교를 위하여 필수적인 요소이며 이번 연구에서는 주로 KR-31064와 로자탄을 비교하기 위하여 사용하였다. IC_{50} 수치의 변형이라고 할 수 있는 $K_i(K_i=IC_{50}/(1+L/K_d))$ 수치는 IC_{50} 결과로부터 실험에 사용된 리간드의 농도를 반영함으로 써 계산하였다. $I^{(17)}$

혈관수축실험

세포에서 생산된 수용체를 이용한 리간드의 결합특성 실험결 과를 재확인하기 위하여 토끼의 대동맥을 이용한 혈관 수축실험 이 도입되었다. 국내(삼육실험동물, 수원)에서 사육된 2~3 kg 정 도의 뉴질랜드 흰토끼를 허가된 동물실험 절차에 따라 희생시키 고 하부 가슴대동맥을 3~4 mm 폭을 가지는 링 형태로 잘라서 20 ml 용량의 조직수조에 넣고 크렙스 완충액(NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11.0 mM, pH 7.4)을 혼합가스(95% O₂, 5% CO₂)와 함께 37°C에서 유지하였다. 실험에 사용된 혈관 링은 2g의 장력으로 90분간 평형화 시켰으며 다양한 안지오텐신 농도(10⁻¹⁰~10⁻⁵ M)에 의한 농도의존적 수축현상을 모니터하기 위하여 각 농도의 안지오텐신이 처리된 이후 혈관조직은 적어도 3차례 이상 완충액으로 세척하였다. KR-31064의 효과를 실험하 기 위하여 서로 다른 농도에서(10⁻⁹, 3×10⁻⁹, 10⁻⁸M) 30분간 처 리한 혈관시료에 안지오텐신을 가하여 약물의 혈관수축 억제현 상을 등장성 수축력을 기록하는 방식으로 측정하였다(Grass FT03, Grass Ins., 미국). 비교분석에 필요한 표준물질로는 로자탄(10⁻⁷, 3×10⁻⁷, 10⁻⁶ M)을 사용하였으며, 실험결과의 정량적인 수치로 pK_B(pK_B=[antagonist]/(dose ratio-1)) 값을 쉴드공식으로 변환 한 pA2 값을 사용하였다.

자료분석 및 검증

실험 결과로 나타낸 모든 자료는 평균값에 대한 표준오차(mean ±S.E.M.)를 나타낸 것으로 이러한 자료들은 컴퓨터 소프트웨어 인 GraphPad사의 PRISM을 사용하여 직선형 회귀법 및 비직선형 회귀법으로 계산하였다. 결과분석에 사용된 모든 실험결과는

18 이 승호

최소한 3개 이상의 반복 샘플로 3회 이상 측정되었다.

실험결과 및 고찰

수용체 결합실험 결과 및 분석

 AT_1 수용체 유전자를 발현시킨 수용체를 사용하여 [125 I] [Sar 1 , Ile 8]-AII를 결합시켜 얻은 포화반응곡선을 분석한 결과, 분리상수 값(K_d)이 0.24 ± 0.01 nM로 단일 수용체와 결합하는 것으로 나타났으며 전체 수용체 결합사이트는 mg 단백질 당 46.3 ± 0.7 fmol로 나타났다.

Fig. 2에 표시한 바와 같이 AT_1 수용체에 대하여 KR-31064, 로자탄, L-158809은 농도의존적으로 $0.21\,\mathrm{nM}$ 의 [125 I] [Sar 1 , Ile 8]-AII 결합을 저해하였으며, 특히 KR-31064는 PD-123177이 억제효과(IC $_{50}$ = $4.3\pm1.4\,\mu\mathrm{M}$)를 보인 AT_2 수용체에 대하여 전혀

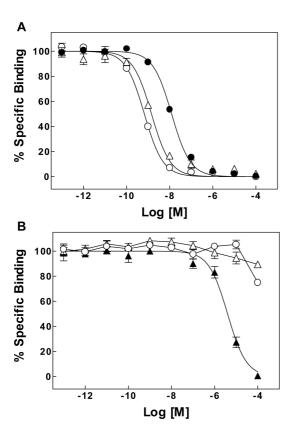


Fig. 2 – Inhibition of specific [125 I] [Sar 1 , Ile 8]-AII binding to human recombinant AT $_1$ (A) and of specific [125 I] CGP 42112A binding to human recombinant AT $_2$ receptor (B) by KR-31064 (open circles), losartan (solid circles), L-158809 (open triangles) and PD-123177 (solid triangles), respectively. The dose-response curve for the inhibition of specific binding by these compounds was determined by incubating the radioligand with 10 concentrations of each compound in the medium of receptor source. The data points represent the mean \pm S.E.M of three separate experiments run in quadruplicate.

저해효과를 나타내지 못하고 AT_1 수용체에 대해서만 강력한 결합 억제효과(IC_{50} =0.67±0.10 nM)를 나타내었다. KR-31064는 로자탄(IC_{50} =12.30±1.42 nM)과 비교하여 약 18.4배 정도의 우수한 억제효과를 나타내었으며 L-158809(IC_{50} =1.44±0.34 nM) 보다도 더 강력한 수용체 결합억제 효과를 나타내었다. 억제곡선 그래프를 분석한 결과 Hill 상수는 KR-31064, 로자탄, L-158809 각각 0.98, 0.85, 0.99로 계산되어 전체 실험결과의 데이터 포인트들이 계산된 곡선에 잘 부합하는 것으로 나타났다.

동위원소 리간드인 [125I] [Sar¹, Ile⁸]-AII를 이용한 수용체 포화결합 실험은 KR-31064를 1 nM 처리한 수용체를 사용하였으며 표준물질로 10 nM 로자탄을 처리한 수용체를 비교목적으로 같이 실험하였다. 실험결과 도출된 수용체 포화결합 데이터를 Scatchard 방법으로 전환하여 포물선이 아닌 직선으로 수용체리간드 결합특성을 분석한 결과 Fig. 3과 같이 X축의 일정 지점에서 각 포화직선이 만나게 되는 결과를 보여 결론적으로 KR-31064와 로자탄은 전체 수용체 결합사이트를 변화시키지 않고 리간드의 수용체에 대한 친화도만 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 친화도 증가효과는 KR-31064의 경우 2.54±0.63, 로자탄의 경우 1.37±0.15이었다.

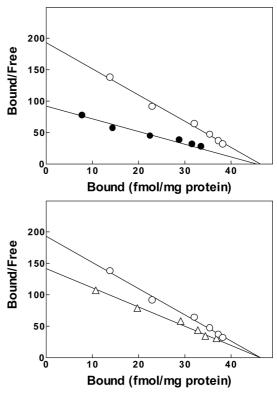


Fig. 3 – Scatchard transformations of saturation binding data for specific [^{125}II [Sar 1 , Ile 8]-AII binding to human recombinant AT $_{1}$ receptor in the absence (open circles) or presence of KR-31064 (1 nM, solid circles) and losartan (10 nM, open triangles). The data points represent the mean of three separate experiments run in quadruplicate.

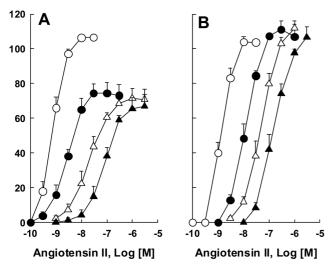


Fig. 4 – Effects of KR-31064 and losartan on the concentration-contractile response curve to AII in isolated rabbit aorta. A: KR-31064: Vehicle (open circles), 10^{-9} M (solid circles), 3×10^{-9} M (open triangles), 10^{-8} M (solid triangles). B: Losartan: Vehicle (open circles), 10^{-7} M (solid circles), 3×10^{-7} M (open triangles), 10^{-6} M (solid triangles). The data points represent the mean percentage of the maximal response \pm S.E.M. (n=4).

혈관조직 수축실험 결과

KR-31064와 로자탄은 안지오텐신이 반응하는 혈관수축효과를 농도의존적으로 억제하였으며 수용체 결합실험에서의 작용패턴 과는 상이한 현상이 발견되었다(Fig. 4). KR-31064(10^9 , 3×10^9 and 10^8 M)는 농도에 따라 반응 그래프가 오른쪽으로 이동되는 전형적인 반응 결과를 나타내었으나 최고 수축반응이 각 농도에 서 25.5, 29.1, 33.1% 감소하는 효과를 보였다(계산된 pK_B : 9.86 ± 0.13). 하지만 로자탄(10^{-7} , 3×10^{-7} and 10^{-6} M)은 최고 수축효 과가 감소되지 않고 반응 그래프가 오른쪽으로 이동되는 패턴을 보였다(pA_2 : 7.59; 쉴드 그래프의 기울기 값: 1.34).

이러한 특이현상은 수용체에 리간드가 반응할 때 일반적인 경쟁적 길항제와 달리 결합시간이 더 길 때 나타나는 현상으로 이미 BIBR 277, 18) GR 138950, 19) EXP3174²⁰⁾ 등의 연구에서 보고된 바 있다. 이러한 연구결과들을 설명하기 위하여 제시된 기전들은 리간드의 수용체에 대한 결합시간 이외에도 수용체들간의 상호작용, 알로스테릭 수용체 변형^{21,22)} 등이 있다. 현재로서는 이러한 현상들이 어떻게 일어나는지 확실하지는 않은 상황이며 단순히 일정한 기전에 의하여 일어나는 것이 아니라 여러 상황에서 효현제 및 길항제의 종류에 따라 실험 조직 또는 종과 함께 야기되는 실험조건의 변화에 영향을 받는 것으로 판단된다.²³⁾

결 론

신규로 개발된 안지오텐신 수용체 길항제인 KR-31064에 대한

수용체-리간드 결합특성을 연구하기 위하여 인간 유전자를 도입 하여 생성한 AT₁과 AT₂ 수용체에 대한 수용체 결합실험을 방사 성 동위원소 리간드인 [¹²⁵I] [Sar¹, Ile⁸]-AII을 사용하여 분석하 고, 실제 혈관샘플인 토끼 대동맥을 사용한 혈관 수축실험을 통 하여 그 효과와 특성을 검증하였다. KR-31064는 수용체 결합실 험 결과로 현재 AT₁ 수용체 길항제의 표준물질인 로자탄보다 18 배 이상 더 강력한 길항효과를 나타내었으며, 로자탄과 유사한 AT₁ 수용체에 대한 선택성과 경쟁적 길항제 패턴을 보여주었다. 하지만 생체 조직인 토끼 혈관을 이용한 혈관 수축실험에서는 로 자탄과 달리 사전 처리한 KR-31064의 농도에 따라 최대 혈관 수축반응의 감소현상이 관찰되었다. 이상의 실험결과를 종합하 면 KR-31064는 AT, 수용체에 선택적으로 작용하는 강력한 길 항제로 매우 효과적인 혈관 수축억제 기능을 나타내었으며 이러 한 수용체-리간드 결합특성을 응용하여 향후 비침습 진단방법의 개발을 위한 표지 리간드로서의 응용 가능성이 매우 크다고 판 단된다.

감사의 말씀

본 논문은 2012년도 상명대학교 교내 학술연구비 지원에 의해 작성되었음.

참고문헌

- Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A. and Smith, R. D.: Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45, 205 (1993).
- Sever, P. S., Gradman, A. H. and Azizi, M.: Managing cardiovascular and renal risk: the potential of direct renin inhibition. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 10, 65 (2009).
- 3) Williams, G. H.: Converting-enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *N. Engl. J. Med.* **319**, 1517 (1988).
- 4) Coulter, D. M. and Edwards, I. R.: Cough associated with captopril and enalapril. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* **294**, 1521 (1987).
- Roberts, J. R. and Wuerz, R. C.: Clinical characteristics of angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. *Ann. Emerg. Med.* 20, 555 (1991).
- Griendling, K. K., Lassegue, B., Murphy, T. J. and Alexander, R. W.: Angiotensin II receptor pharmacology. *Adv. Pharmacol.* 28, 269 (1994).
- 7) Timmermans, P. B.: Angiotensin II receptor antagonists: an emerging new class of cardiovascular therapeutics. *Hypertension Res.* **22**, 147 (1999).
- 8) Wong, P. C., Price, W. A., Jr., Chiu, A. T., Duncia, J. V., Carini, D. J., Wexler, R. R., Johnson, A. L. and Timmermans, P. B.: In

20 이 승호

vivo pharmacology of DuP 753. Am. J. Hypertens. 4, 288S (1991).

- 9) Burnier, M.: Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation* **103**, 904 (2001).
- Simpson, K. L. and McClellan, K. J.: Losartan: a review of its use, with special focus on elderly patients. *Drugs & Aging* 16, 227 (2000).
- 11) Iimori, H., Hashizume, Y., Sasaki, M., Kajiwara, Y., Sugimoto, Y., Sugiyama, Y., Watanabe, Y. and Senda, M.: First automatic radiosynthesis of 11C labeled Telmisartan using a multipurpose synthesizer for clinical research use. *Ann. Nucl. Med.* 25, 333 (2011).
- 12) Mathews, W. B., Yoo, S. E., Lee, S. H., Scheffel, U., Rauseo, P. A., Zober, T. G., Gocco, G., Sandberg, K., Ravert, H. T., Dannals, R. F. and Szabo, Z.: A novel radioligand for imaging the AT1 angiotensin receptor with PET. *Nucl. Med. Biol.* 31, 571 (2004).
- 13) Shimizu, K., Takashima, T., Yamane, T., Sasaki, M., Kageyama, H., Hashizume, Y., Maeda, K., Sugiyama, Y., Watanabe, Y. and Senda, M.: Whole-body distribution and radiation dosimetry of [11C]telmisartan as a biomarker for hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B3. Nucl. Med. Biol. 39, 847 (2012).
- 14) Xia, J., Seckin, E., Xiang, Y., Vranesic, M., Mathews, W. B., Hong, K., Bluemke, D. A., Lerman, L. O. and Szabo, Z.: Positron-emission tomography imaging of the angiotensin II subtype 1 receptor in swine renal artery stenosis. *Hypertension* 51, 466 (2008).
- 15) Han, J., Park, S. J., Thu, V. T., Lee, S. R., Long, L. T., Kim, H. K., Kim, N., Park, S. W., Jeon, E. S., Kim, E. J., Yoon, C. H., Cho, G. Y. and Choi, D. J.: Effects of the novel angiotensin II receptor type I antagonist, fimasartan on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Intl. J. of Cardiol.* 168, 2851 (2013).
- 16) Lee, S.: Characterization of angiotensin II antagonism

- displayed by KR-31081, a novel nonpeptide AT1 receptor antagonist. *J. Korea Academia-Industrial Cooperation Soc.* **10**, 2997 (2009).
- 17) Cheng, Y. and Prusoff, W. H.: Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099 (1973).
- 18) Wienen, W., Hauel, N., Van Meel, J. C., Narr, B., Ries, U. and Entzeroth, M.: Pharmacological characterization of the novel nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, BIBR 277. Br. J. Pharmacol. 110, 245 (1993).
- Hilditch, A., Hunt, A. A., Travers, A., Polley, J., Drew, G. M., Middlemiss, D., Judd, D. B., Ross, B. C. and Robertson, M. J.: Pharmacological effects of GR138950, a novel angiotensin AT1 receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 750 (1995).
- 20) Wong, P. C., Price, W. A., Jr., Chiu, A. T., Duncia, J. V., Carini, D. J., Wexler, R. R., Johnson, A. L. and Timmermans, P. B.: Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 211 (1990).
- 21) Panek, R. L., Lu, G. H., Overhiser, R. W., Major, T. C., Hodges, J. C. and Taylor, D. G.: Functional studies but not receptor binding can distinguish surmountable from insurmountable AT1 antagonism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273, 753 (1995).
- 22) Timmermans, P. B. and Smith, R. D.: Angiotensin II receptor subtypes: selective antagonists and functional correlates. *Eur. Heart J.* **15 Suppl D**, 79 (1994).
- 23) Bond, R. A., Ornstein, A. G. and Clarke, D. E.: Unsurmountable antagonism to 5-hydroxytryptamine in rat kidney results from pseudoirreversible inhibition rather than multiple receptors or allosteric receptor modulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 401 (1989).