약학회지 제 46 권 제 4 호 219~225 (2002)
Yakhak Hoeji Vol. 46, No. 4

藥學會誌

CoMFA 법을 이용한 3-아릴이소퀴놀린 화합물들의 SK-OV-3 암세포에 대한 가상의 약물 작용 수용체 해석

김의기 · 민선영 · 정병호 · 천승훈 · 최보길 · 조원제#
전남대학교 약학대학

(Received June 12, 2002; Revised August 5, 2002)

Hypothetical Drug Binding Receptor Site Analysis Using CoMFA Method for 3-Arylisoquinolines Active against SK-OV-3 Tumor Cell Line

Eui-Ki Kim, Sun Young Min, Byung-Ho Chung, Seung Hoon Cheon, Bo-Gil Choi and Won-Jea Cho#
College of Pharmacy, Chonnam National University, Yongbong-dong Buk-gu, Kwangju 500-757, Korea

Abstract — We have performed a 3D-QSAR/ CoMFA analysis of the cytotoxic activities of thirty-five 3-arylisoquinoline derivatives against SK-OV-3 tumor cell line. The results suggested that the electrostatic, steric and hydrophobic factors of 3-arylisoquinolines were strongly correlated with the antitumor activity. Considerable predictive ability (cross-validated r2 as high as 0.841) was obtained through CoMFA.

Keywords □ 3D-QSAR, CoMFA, 3-Arylisoquinolines, SK-OV-3, Cytotoxicity

천연물 유래의 물질을 이용하여 항암제를 개발하고자 하는 노력의 일환으로 benzophenanthridine 화합물이 최근 주목을 받고 있다.[1] 우리는 benzophenanthridine 알칼로이드를 합성하는 과정에서 얻어진 중간물질 7,8-dimethoxy-2-methyl-3-(4,5-methylenedioxy-2-vinyphenyl)-isoquinolin-1(2*H*)-one (1) 이 강한 항암활성을 나타냄을 밝혔으며 다양한 3-arylisoquinolines을 합성하여 구조-활성 상관연구를 수행하여 보고 하였다.[2] 특히 CoMFA(comparative molecular field analysis)를 이용하여 약리작용단을 규명하는 연구를 수행하여 가상의 약물작용 수용체를 제시하기도 하였다.[3] Styrene 화합물 (1)은 topoisomerase I, II 에 대한 저해활성을 나타냄으로써 항암 활성을 보이는 benzo[*c*]phenanthridine 의 bioisostere로 여길 수 있다(Fig. 1). 일련의 연구를 통하여 항암활성을 나타내기 위해서는 3-arylisoquinoline 화합물의 amide carbonyl 기 및 benzene ring 의 알킬기가 중요한 역할을 한다는 것을 알았다. 동물실험 및 *in vivo* 시험을 위해서는 물에 난용성인 물질을 수용성 약물로 변형시켜야 할 필요가 있다. 우리는 3-arylisoquinoline 물질의 수용성을 증가시키기 위해서 amide carbonyl 기를 다양한 amine 기로 변형시킨 후 염산염으로 만들었다. 그 결과 *in vitro* 활성은 유지하면서 우수한 *in vivo* 활성 및 oral bioavailability 값을 나타내는 1-(4-methylpiperazinyl)-3-phenylisoquinoline(CWJ-a-5) 물질을 얻을 수 있었다.[4] 우리가 합성한 화합물 중 35개의 물질을 이용하여 SK-OV-3(human ovalian tumor cell)에 대한 cytotoxicity[5] 값을 이용하여 CoMFA를 수행하기로 하였으며 약리작용단의 규명 연구를 수행하였다. CoMFA는 약물의 작용부위가 명확히 규명되지 않을 경우에 이용되는 ligand-based drug design 의 수단으로 자주 이용되는 방법이다.[6] 항암활성이 있는 3-arylisoquinolines 화합물의 작용기전이 아직 명확히 밝혀져 있지 않기에 CoMFA법을 이용하여 이 약물이 작용하는 가상의 수용체를 규명하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 062-530-2933 (팩스) 062-530-2911
(E-mail) wjcho@chonnam.ac.kr

실험방법

Computer Modeling Tools

CoMFA 수행과 structure generation은 Silicon Graphics Inc. 의 workstation model INDY R5000 및 Tripos Inc.의 SYBYL Molecular Modeling Software(version 6.3)를 사용하였다.[7] Structure optimization과 field-fit minimization은 최소에너지

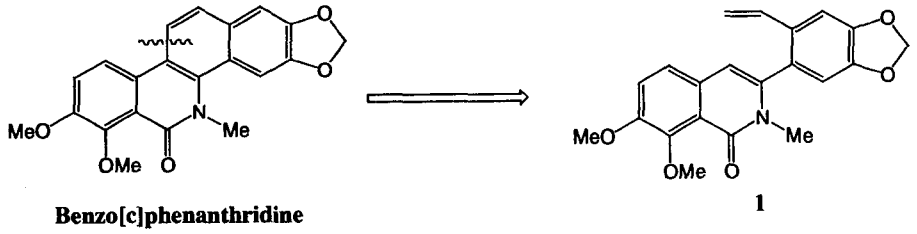

Fig. 1 – Bioisosteric analysis of benzo[c]phenanthridine skeleton and 3-arylisoquinoline.

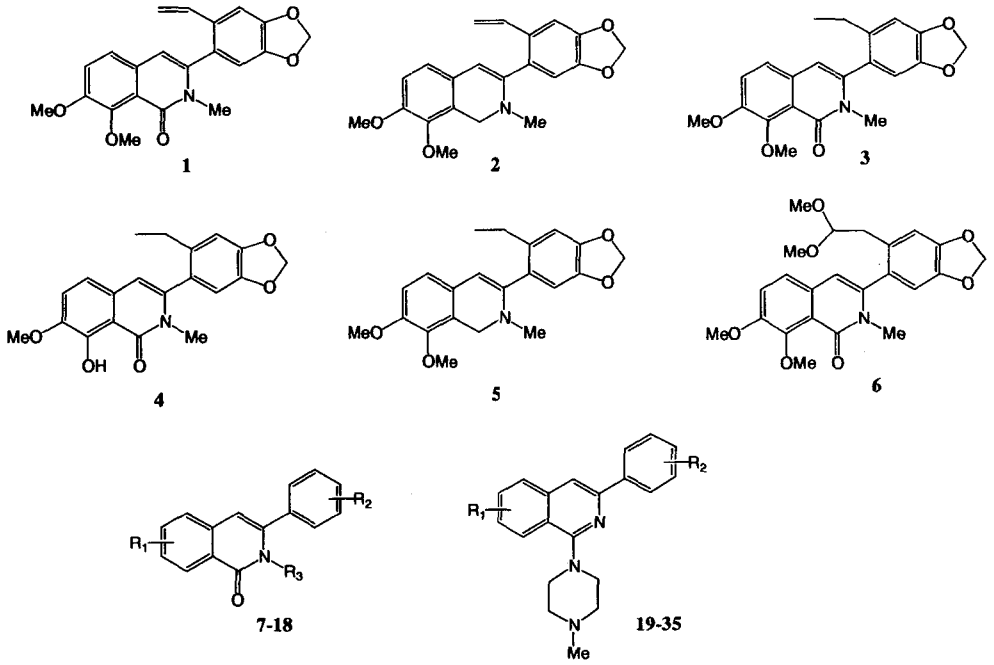

Fig. 2 – The structure of 3-arylisoquinolines.

cutoff를 100,000회로 설정하여 standard Tripos force field를 이용하여 수행하였다. 각 분자의 전하는 SYBYL에 포함된 Gasteiger-Huckel 방법으로 계산하였다. SYBYL grid search method는 15° 씩 torsion angle을 증가시키고, electrostatic energy와 maximum energy의 차이가 0.005 kcal/mol이 되도록 energy option을 설정하여 에너지가 가장 낮은 상태의 conformation을 찾는데 이용하였다. 각 화합물들과 활성 값 사이의 통계처리에는 PLS(partial least square) 방법을 사용하였다.

Data Sets

CoMFA 수행을 위해 사용된 3-arylisoquinoline 유도체들은 이미 활성이 보고된 35개의 화합물을 이용하였다. 이 화합물은 SK-OV-3 암세포에 대한 세포독성을 측정했으며 Table I에 나타냈다. 각 물질의 항암활성 수치는 화합물이 암세포의 성장을 50% 억제시키는 효과를 나타내는 농도인 ED_{50}에 -log를 취한 pED_{50}의 형태로 변형시켜 사용하였다.

Starting Geometry

Lead 화합물인 7,8-dimethoxy-2-methyl-3-(4,5-methylenedioxy-2-vinylphenyl)isoquinolin-1(2*H*)-one (1)에 대한 SYBYL의 energy minimization method를 이용하여 starting geometry를 정하였다. 즉, Grid search 를 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Fig. 3에서 보여주듯이 자유 회전이 가능한 C1-C2-C3-C4의 torsion angle을 τ1으로, C3-C4-C5-C6를 τ2로 설정하여 각각의 torsion을 15°씩 증가시켰다. 이에 따라 얻어지는 576개의 conformer의 에너지를 비교하였다. 이때 에너지의 계산은 Gasteiger-Huckel 방법을 이용하여 실시하였다. 이 conformer들은 비록 가장 낮은 에너지 상태의 conformation을 갖고 있다고는 하더라도 아직까지 실제적인 3차원 구조와는 차이가 있다고 말할 수 있다. Grid search가 끝난 후 각각의 conformer들 중, energy가 가장 낮은 상태의 conformation을 갖는 20개의 conformer를 선택하였다. 선택된 20 개의 conformer에 대한 실제 구조와 유사한 conformation을 얻기위해, 처음의 energy minimization과 동일한 방법을 이용하여 한번 더

Table I – Observed cytotoxicities of the compounds against SK-OV-3

No.	R1	R2	SK-OV-3[a)]	No.	R1	R2	SK-OV-3
1	-	-	6.31	19	H	H	4.65
2	-	-	5.46	20	H	2-Me	4.64
3	-	-	6.34	21	H	3-Me	4.65
4	-	-	4.80	22	H	4-Br	4.77
5	-	-	5.87	23	H	4-Cl	4.72
6	-	-	5.57	24	H	4-Me	4.70
7	H	H	5.61	25	H	4-OMe	4.33
8	H	2-Me	5.00	26	5-N(Me)2	H	4.95
9	H	3-Me	4.61	27	5-N(Me)2	2-Me	4.54
10	H	4-Br	4.46	28	5-N(Me)2	3-Me	5.30
11	H	4-Cl	3.94	29	5-N(Me)2	4-Br	5.07
12	H	4-Me	4.86	30	5-N(Me)2	4-Cl	5.12
13	H	4-OMe	3.03	31	5-N(Me)2	4-OMe	4.88
14	5-N(Me)2	4-OMe	4.95	32	6-Me	H	5.10
15	6-Me	H	5.77	33	6-Me	2-Me	5.29
16	6-Me	2-Me	5.37	34	6-Me	4-Cl	5.24
17	6-Me	4-Cl	5.22	35	6-Me	4-Me	5.15
18	6-Me	4-Me	5.31				

[a)] -log [ED_{50}]

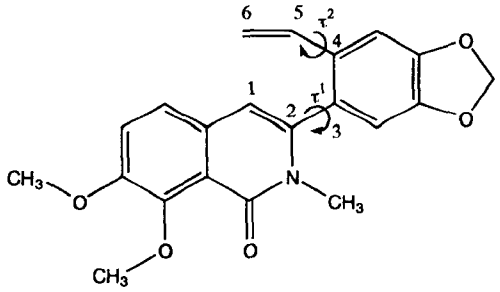

Fig. 3 – Torsion angles of 7,8-dimethoxy-2-methyl-3-(4,5-methylene-dioxy-2-vinylphenyl)-isoquinolin-1(2H)-one (1).

energy minimization을 진행하였다. 이에 따라 이들 20개의 conformer들은 Table II에서 보여주듯이 5개의 conformer로 나누어 졌다.

Molecular Superimposition

이상과 같은 방법에 따라 CoMFA 연구에 사용될 모든 화합물에 대한 3차원 구조가 결정되면 각 화합물들이 미지의 active site에 대하여 동일한 mechanism으로 작용하도록 모든 화합물을 포개어 놓는 과정(superimposition)이 필요하다. CoMFA에서 이용할 수 있는 superimposition 방법은 두 가지로 구분될 수 있다. 그 중 첫 번째 방법은 "Fit Atoms" 방법이다. 이 방법은 분석에 사용될 분자들에 대하여 특정 원자와 원자를 연구자가 직접 포개어 놓는 방법이다. 이러한 "Fit Atoms" 방법은 분석하려는 분자들간에 공통된 부분이 적은 경우, 또는 각 분자들이 동일한 series가 아닌 경우에 효과적으로 사용될 수 있는 방법이다. 다른 한가지 superimposition 방법은 모든 분자내에 공통적으로 포함된 부분을 선택하여 이 부분에 모든 분자를 포개어 놓는 방법

Table II – Torsion angles of 7,8-dimethoxy-2-methyl-3-(4,5-methylene-dioxy-2-vinyl-phenyl)isoquinolin-1(2H)-one (1)

No.	τ1	τ2	Energy (kcal/mol)	Minimized Energy [a)] (kcal/mol)
1	60.0	-150.0	31.20	30.5349[b)]
2	90.0	-150.0	31.79	30.3549
3	75.0	180.0	31.81	30.5349
4	75.0	-150.0	31.85	30.5349
5	60.0	-135.0	31.85	30.5349
6	60.0	45.0	32.03	30.6991[c)]
7	-120.0	-150.0	32.07	30.2312[d)]
8	60.0	150.0	32.11	30.2131[e)]
9	75.0	-135.0	32.19	30.5349
10	-120.0	-165.0	32.44	30.2312
11	-105.0	-150.0	32.54	30.2312
12	60.0	180.0	32.55	30.5349
13	105.0	-165.0	32.63	30.5349
14	60.0	-165.0	32.72	30.5349
15	75.0	165.0	32.83	30.2131
16	75.0	-165.0	32.84	30.5349
17	105.0	180.0	32.94	30.2131
18	60.0	-120.0	32.94	30.5349
19	105.0	-30.0	33.01	30.6690[f)]
20	-105.0	-135.0	33.06	30.2312

τ1 = C1-C2-C3-C4: τ2 = C3-C4-C5-C6.
[a)]Gasteiger-Huckel method
[b)]τ1 = 66.4°: τ2 = -149.8°.
[c)]τ1 = 26.3°: τ2 = 40.1°
[d)]τ1 = −114..2°: τ2 = -150.9°.
[e)]τ1 = 114.8°: τ2 = 150.9°
[f)]τ1 = 119.4°: τ2 = -37.0°.

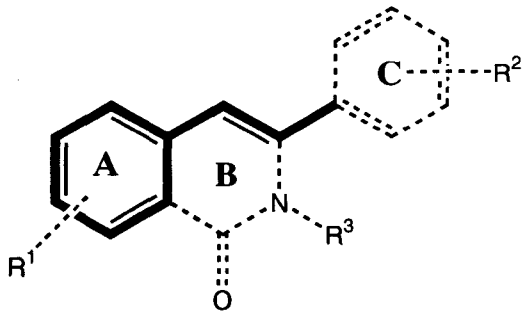

Fig. 4 – *Core Structure for molecular superimposition.*

인 "Align Database" 방법이다. 이 방법은 동일한 series의 화합물로만 구성된 경우에 매우 효과적으로 이용할 수 있는 방법이며, 각 분자 구조들이 database에 저장된 상태라면, database를 단순히 template molecule에 대하여 포개어 놓기만 하면 되는 매우 간단히 수행할 수 있는 방법이다.

이번 연구에서는 분석에 사용된 화합물들이 모두 3-arylisoquinoline 계통으로 동일한 series로 간주할 수 있기 때문에 "Align Database" 방법을 이용하여 각 화합물들을 포개어 놓을 수 있었다. 1번 화합물을 template molecule로 하였고 공통적으로 포함된 부분은 Fig. 4에서 볼 수 있는 것과 같이 3-arylisoquinoline의 실선으로 표현한 부분이다. Core structure에서 amide 부분이 제외된 것은 질소의 경우 각 원자들이 amide의 sp^3 질소원자와 imine의 sp^2 질소원자로 각각의 원자 특성이 다른 때문이며, carbonyl group의 탄소의 경우 sp^2 탄소 또는 sp^3 탄소 등으로 탄소의 특성이 다르기 때문이다. C ring의 모든 부분이 제외된 것은 각 화합물의 torsion angle이 다른 까닭이며, A ring의 모든 치환체는 공통적으로 포함된 것이 아니기 때문에 core structure를 구성하는 원자들에서 제외되었다.

이와 같이 template molecule에 core sturcture를 설정한 후 모든 화합물을 포개어 놓았다 .

Table III – Actual vs calculated activities for SK-OV-3 cell

No.	Act.	Steric and Electrostatic[a]		Steric[b]		Electrostatic[c]		H-Bond[d]	
		Calc.	Res.	Calc.	Res.	Calc.	Res.	Calc.	Res.
1	6.31	6.20	0.11	6.32	-0.01	6.21	0.1	6.21	0.1
2	5.46	5.61	-0.15	5.67	-0.21	5.66	-0.2	5.58	-0.12
3	6.34	6.28	0.06	6.09	0.25	6.26	0.08	6.44	-0.1
5	5.87	5.82	0.05	5.85	0.02	5.73	0.14	5.76	0.11
6	5.57	5.67	-0.1	5.67	-0.1	5.70	-0.13	5.55	0.02
8	5.00	4.95	0.05	4.81	0.19	4.85	0.15	4.89	0.11
9	4.61	4.67	-0.06	4.62	-0.01	4.72	-0.11	4.89	-0.28
12	4.61	4.69	-0.08	4.68	-0.07	4.79	-0.18	4.89	-0.28
14	4.95	4.81	0.14	4.95	-0.001	4.80	0.15	4.90	0.05
16	5.37	5.45	-0.08	5.37	0.0049	5.34	0.03	5.13	0.24
17	5.22	5.26	-0.04	5.27	-0.05	5.34	-0.12	5.25	-0.03
18	5.31	5.22	0.09	5.27	0.04	5.25	0.06	5.13	0.18
19	4.65	4.59	0.06	4.62	0.03	4.53	0.12	4.50	0.15
20	4.64	4.64	0.0023	4.67	-0.03	4.64	0.00	4.78	-0.14
21	4.65	4.69	-0.04	4.72	-0.07	4.69	-0.04	4.73	-0.08
22	4.77	4.74	0.03	4.65	0.12	4.79	-0.02	4.91	-0.14
23	4.72	4.71	0.01	4.64	0.08	4.74	-0.02	4.84	-0.12
24	4.70	4.64	0.06	4.61	0.09	4.70	-0.003	4.73	-0.03
25	4.33	4.31	0.02	4.38	-0.05	4.30	0.03	4.44	-0.11
26	4.95	5.05	-0.1	5.11	-0.16	5.00	-0.05	4.90	0.05
28	5.30	5.16	0.14	5.21	0.09	5.16	0.14	5.14	0.16
29	5.07	5.20	-0.13	5.14	-0.07	5.25	-0.18	5.32	-0.25
30	5.12	5.18	-0.06	5.14	-0.02	5.19	-0.07	5.25	-0.13
31	4.88	4.91	-0.03	4.95	-0.07	4.86	0.02	4.97	-0.09
32	5.10	5.08	0.02	5.18	-0.08	4.99	0.11	4.73	0.37
32	5.29	5.32	-0.03	5.22	0.07	5.32	-0.03	5.25	0.04
34	5.24	5.21	0.03	5.20	0.04	5.19	0.05	5.08	0.16
35	5.15	5.13	0.02	5.18	-0.03	5.17	-0.02	4.97	0.18

[a]Calculated values derived from steric and electrostatic parameters
[b]Calculated values derived from steric parameter only
[c]Calculated values derived from electrostatic parameter only
[d]Calculated values derived from hydrogen bond parameter only

Table IV – QSAR statistics

Cell line	type	cpd	opt	Q^2	R^2	S	F	RC			Equation
								steric	elect	clogp	
SK-OV-3	B	28	5	0.841	0.974	0.087	164.169	47.1	41.7	11.3	3.904+(0.175)*clogp
	S	28	5	0.744	0.959	0.109	103.891	96.7		3.3	4.675+(0.035)*clogp
	E	28	5	0.784	0.954	0.115	91.529		79.4	20.6	3.900+(0.323)*clogp
	H	28	5	0.738	0.887	0.181	34.621	64.3	7.6	28.2	2.837+(0.476)*clogp

B: Both (steric and electrostatic), S: Steric CoMFA values, E: Electrostatic CoMFA values, H: Hydrogen bond CoMFA values, cpd: Number of tested compounds, opt: Number of optimum components, Q^2: Cross-validated R square, R^2 : Conventional R square, S: Standard deviation, RC: Relative contribution %

Partial Least Squares Analysis of the Training Set

이번 연구에서 사용된 PLS 분석방법은 다음과 같다. Table III 에서 보여주고 있듯이 분석에 사용된 parameter들은 입체효과와 정전기 효과를 동시에 활용하여 계산한 CoMFA value, 입체 혹은 정전기 효과만을 이용한 CoMFA 값, 그리고 수소결합 효율만을 계산한 CoMFA 값들 각각에 대해 소수성 상관 계수인 clogP와 각 화합물의 pED_{50}의 형태로 변형시킨 실제 활성 값을 이용하였다. Validation method는 처음에 component의 수를 5로 설정하고 Leave-One-Out method를 이용하여 'column filtering'을 2.0 kcal/mol'로 설정하여 35개의 3-arylisoquinoline 유도체 전부에 대한 validation을 실시하였다. 이러한 validation 후에 얻어지는 optimum component의 수를 이용하여 No Validation을 실시하였다. 이에 따라 얻어지는 contour plot을 이용하여 실제 값과 계산 값 사이의 편차가 심한 화합물을 제외시킨 나머지 화

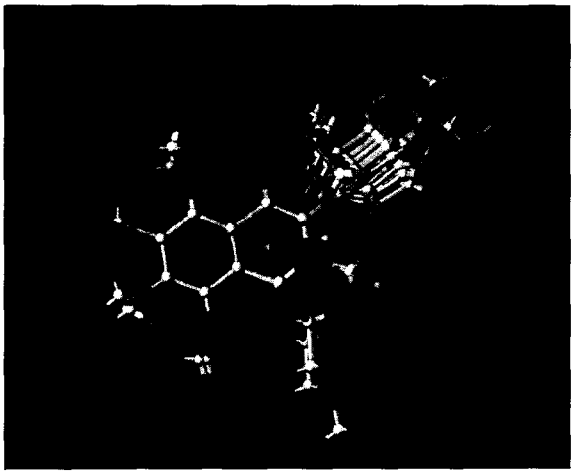

Fig. 5 – Superimposed structures of 3-arylisoquinolines.

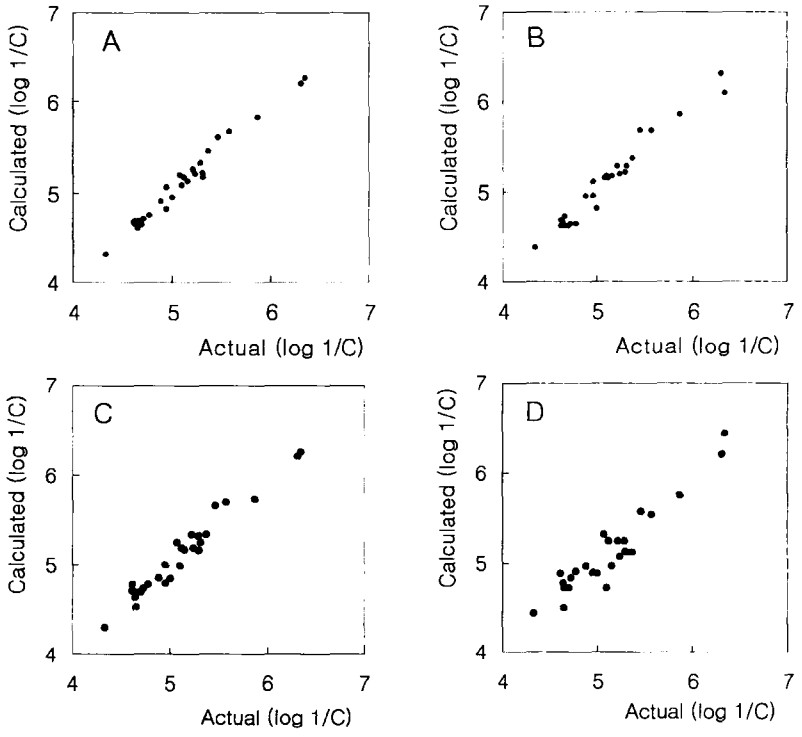

Fig. 6 – Plot of the calculated versus observed pED50 for the CoMFA analysis of the 35 compounds.

합물에 대해 위와 동일한 방법에 따른 validation을 거친 후 QSAR 결과를 얻을 수 있었다(Table IV).

Contour Map

CoMFA 수행으로부터 얻어지는 결과는 선형 방정식 형태의 QSAR 식과 여러 가지 형태의 수치로 나타나는 결과 값들이 있다. 이들 외에도 QSAR 식으로부터 각 화합물의 실제 값과 계산 값 사이의 관계를 그래프로 나타낸 contour plot 및 pharmacophore 모형을 나타내어주는 contour map 역시 중요한 결과로 사용되고 있다. Fig. 6은 앞에서 기술한 바와 같이 실제 활성 값과 계산된 활성 값 사이의 관계를 그래프로 나타낸 것이다. 이 그래프만으로도 QSAR 식의 예측 신뢰도를 확인 할 수 있는데, 이것은 각각의 화합물들에 대한 점들이 그래프상에서 왼쪽 아래 모서리와 오른쪽 위 모서리 방향의 대각선에 대하여 수렴현상이 일어날수록 표준편차는 '0' 근접하며, 이에 따라 매우 우수한 예측성을 갖는다는 것을 알 수 있기 때문이다.

또한 contour map은 미지의 receptor에서 약물 binding site의 가설적인 모형을 예측할 수 있도록 3차원 공간구조 형태의 그림을 보여 주게 된다(Fig. 7). 이 contour map으로부터 활성과 구조에 관련된 경향성을 정확히 예측할 수 있으며, 또한 새로운 활성 화합물을 디자인 할 수 있게 된다. 이렇게 디자인 된 화합물은 그것의 3차원 구조를 이용하여 다시 얻어진 QSAR Table에 대해 활성을 예측하는 것 역시 가능하다.

실험결과 및 고찰

35개의 이소퀴놀린 화합물에 대한 SK-OV-3 cell line 세포독성과 이 약물이 작용하는 부위를 CoMFA를 통하여 해석하였다. Table IV에서 보여주고 있듯이 소수성인자(clogP)값과 동시에 입체적인 파라미터(steric parameter) 와 정전기적인 파라미터(electrostatic parameter)를 고려한 것으로부터 0.841의 높은 Q2 값을 얻을 수가 있었으며 steric, electrostatic 혹은 수소결합을 고려한 경우에는 각각 0.744, 0.784 및 0.738의 Q2 값을 얻었다. 따라서 약물들이 작용하는 부위는 입체적요인(47.7%), 정전기적 요인(47.1%) 및 소수성요인(11.3%)에 의해 영향을 받는다는 것을 알았다. 이 결과로부터 얻어진 방정식으로부터 Table III에서 보여주는 계산값을 구할 수가 있었다.

Fig. 7에서 보여주는 contour map은 시각적으로 활성을 높여 줄 수 있는 활성기를 유추해 낼 수 있는 그림이다. 즉, 초록색 부분은 입체적으로 bulky한 치환기가 위치하면 유리한 부분이고, 적색은 electronegative 한 group이 위치하면 활성의 증가가 예측되는 부분이다. 이와는 반대로 파란색 부위는 positive charge가 오면 유리하며 노란색부분은 치환기가 적은 것이 오면 활성발현에 유리한 부분임을 나타낸다.

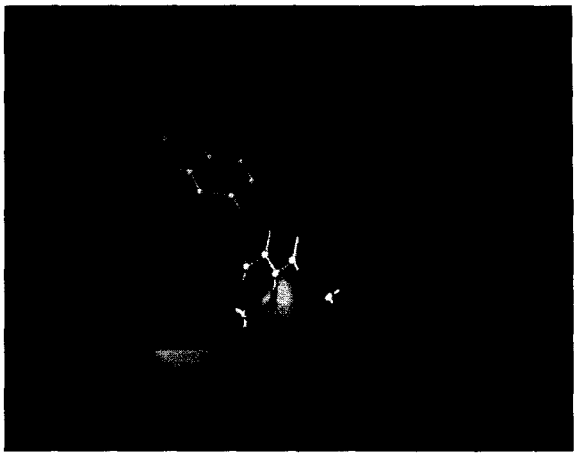

Fig. 7 – Steric and electrostatic contour map from the CoMFA model for antitumor 3-arylisoquinolines. Favoring activity: green, bulky groups; yellow, less bulky groups; blue, positive charge; red, negative charge.

우리는 3D-QSAR/CoMFA 연구를 통하여 SK-OV-3 암세포에 작용하는 3-arylisoquinoline 화합물에 대한 가상의 약리단(pharmacophore)를 정할 수 있었으며 이 정보는 새로운 약물을 설계하는데 유익하게 이용될 수 있을 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 1999년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사 드립니다.

문 헌

1) Mackay, S. P., Meth-Cohn, O. and Waich, R. D. : Advances in Heterocyclic Chemistry, Katritzky, A. R., Editor. Academic Press, p. 345 (1997).
2) (a) Cho, W. J., Yoo, S. J., Chung, B. H., Cheon, S. H., Whang, S. H., Kim, S. K., Kang, B. H., Lee, C. O., *Arch. Pharm. Res.* **19**, 321 (1996). (b) Cho, W. J., Yoo, S. J., Park, M. J., Chung, B. H., Lee, C. O., *Arch. Pharm. Res.* **20**, 264 (1997). (c) Cho, W. J., Park, M. J., Chung, B. H., Lee, C. O., *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **8**, 41 (1998).
3) Cho, W. J., Kim, E. K., Park, M. J., Choi, S. U., Lee, C. O., Cheon, S. H., Choi, B. G. and Chung, B. H., *Bioorg. & Med. Chem.* **6**, 2449 (1998).
4) Kim, K. E., Cho, W. J., Chang, S. J., Yong, C. S., Lee, C. H., Kim, D. D. *Int. J. Pharmaceutics* **217**, 101 (2001).
5) (a) Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A., and Boyd, M. R., *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1113 (1990). (b) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica,

D., Warren, J. T., Bokesch H, Kenney, S., and Boyd, M. R., *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).

6) (1) Cramer, R. D. III, Patterson, D. E., Bunce, J. D., *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5959 (1988). (b) Raghavan, K., Buolamwini, J. K., Fesen, M. R., Pommier, Y., Kohn, K. W., and Weinstein, *J. N., J. Med. Chem.* **38**, 890 (1995).

7) The Sybyl program (Version 6.3) was supplied by Tripos Associates, 1699 South Hanley Road, Suite 303, St. Louis, Missouri 63144, USA.