

상이한 정렬에 따른 비교 분자장 분석(CoMFA) 방법을 이용한 새로운 2-Alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체들의 살균활성에 관한 3차원적인 정량적 구조와 활성과의 관계

성낙도* · 윤태용¹ · 송종환² · 정훈성

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

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

Nack-Do Sung*, Tae-Yong Yoon¹, Jong-Hwan Song² and Hoon-Sung Jung

Division of Applied Biologies and Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-784, Korea

¹Research Institute, Dongbang Agro Corporation, Buyeo Chungnam 323-930, Korea

²Cytosine Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yusong, Daejeon 305-606, Korea

Received January 18, 2005; Accepted March 4, 2005

3D QSAR studies for the fungicidal activities against resistive phytophthora blight (RPC; 95CC7303) and sensitive phytophthora blight (*Phytophthora capsici*) (SPC; 95CC7105) by a series of new 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one derivatives (X: A = propynyl & B = 2-chloropropenyl) were studied using comparative molecular field analyses (CoMFA) methodology. The CoMFA models were generated from the two different alignment, atom based fit (AF) alignment and field fit (FF) alignment. The atom based alignment exhibited a higher statistical results than that of field fit alignment. The best models, A3 and A7 using combination fields of H-bond field, standard field, LUMO and HOMO molecular orbital field as additional descriptors were selected to improve the statistic of the present CoMFA models. The statistical results of the two models showed the best predictability of the fungicidal activities based on the cross-validated value q^2 (r^2_{cv} = RPC: 0.625 & SPC: 0.834), non cross-validated value (r^2_{ncv} = RPC: 0.894 & SPC: 0.915) and PRESS value (RPC: 0.105 & SPC: 0.103), respectively. Based on the findings, the predictive ability and fitness of the model for SPC was better than that of the model for RPC. The fungicidal activities exhibited a strong correlation with steric (66.8-82.8%), electrostatic (10.3-4.6%) and molecular orbital field (SPC: HOMO, 12.6% and RPC: LUMO, 22.9%) factors of the molecules. The novel selective character for fungicidal activity between two fungi depend on the positive charge of ortho, meta-positions on the N-phenyl ring and size of hydrophilicity of a substituents on the S-phenyl ring.

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

서 론

농업용 살균제의 분류기준(FRAC)¹⁾에 따른 살균작용 기작은 대략 25가지로 분류되어 있으며 상용화 된 약 133여 품목에 함유된 활성 성분들의 작용 기작과 전체비율을 살펴보면 ergosterol 생합성 저해제(DMI: demethylation inhibitor) 32성분(24.1%), multi site activity 저해제 13성분(9.8%) 및 fungal

respiration 중 complex III 저해제가 8 성분(6.0%) 그리고 작용 기작이 알려져 있지 않은 11성분(8.3%)의 순으로 구성되어있다.²⁾

여기에서 다룬 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체들은 2N-phenylisindoline-1-one 유도체³⁾ 그리고 2-(5-alkoxyphenyl)-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체⁴⁾들과 유사한 cyclic imide(CyI)계 protox(ptotoporphyrinogen oxidase) 저해제 들로서 제초활성에 관한 구조-활성관계(SAR)에 대하여는 보고 되었으나^{5,6)} 살균활성에 대하여는 다루어 진 바가 없다. 제초제 이외의 용도로 개발된 CyI계 화합물들은 모두 부분적으로 phthalimides 구조만을 가진 화합물들로서 예컨대, 살균제로서 상용화된 화합물은 captafol 및 captan 그리고 살충제로는

*Corresponding author
Phone: 82-42-821-6737; Fax: 82-42-825-3306
E-mail: ndsung@cnu.ac.kr

tetramethrin 및 그의 1R-isomers 등이 알려져 있을 따름이다.⁷⁾

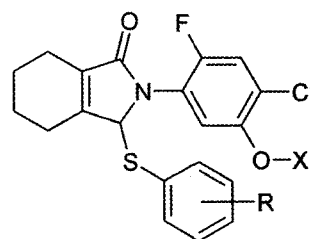
본 연구에서는 새로운 농업용 살균제로서의 활용 가능성을 탐색하기 위하여 일련의 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체들의 구조 변화에 따른 저항성(RPC)과 감수성(SPC) 고추 역병균(*Phytophthora capsici*)의 살균활성에 관한 3차원적인 구조-활성 관계(3D-QSAR)를 정렬(alignment) 방법⁸⁾이 상이함에 따른 비교 분자장 분석(CoMFA)⁹⁾ 방법으로 검토하였다.

재료 및 방법

분자의 구조와 활성. 새로운 2-alkoxy(X)phenyl-3-(R)-phenylthioisindoline-1-one 유도체(Fig. 1)의 N-phenyl 고리상 산소원자에 X-치환기로서 A = propynyl 및 B = 2-chloropropenyl group 그리고 S-phenyl 고리상 R-치환기들이 도입된 2-(4-chloro-2-fluoro-5-propynyloxyphenyl)-3-(R-phenylthio)-2,3,4,5,6,7-hexahydroisindoline-1-one(A: 1~14) 및 2-(4-chloro-2-fluoro-5-(2-chloropropenyloxyphenyl)-3-(R-phenylthio)-2,3,4,5,6,7-hexahydroisindoline-1-one(B: 15~24) 유도체를 합성하고¹⁰⁾ 저항성(RPC; 95CC7303)과 감수성(SPC; 95CC7105) 고추역병균주(*Phytophthora capsici*)의 살균활성을 측정하였다.¹¹⁾ 또한, 24개 data set 화합물 중에서 20개의 화합물로 구성된 training set에 대하여 두 군주별 CoMFA 모델을 유도하고 무작위로 선택된 4개 화합물의 test set로부터 모델들의 예측성을 평가하였다.

설명인자와 분자정렬. CoMFA 및 통계(partial least square, PLS) 분석은 Tripos사¹²⁾(Ver. 6.91)의 분자 모델링 소프트웨어(Sybyl)를 사용하였다. 그리고 소수성 결합 성분을 고려한 HINT(hydrophobic interaction technique) 프로그램(Ver. 3.07S)를 사용하여 분자의 소수성장을 분석하였다. 또한, 수용체와 분자 리간드와의 상호작용이 전하나 이온 이동반응인 경우에는 Coulombic field 만으로 정전기적인 특성을 나타내는 것이 적절하지 않기 때문에 LUMO(lowest unoccupied molecular orbital)와 HOMO(highest occupied molecular orbital) 에너지로 표현되는 분자 궤도장(molecular orbital field)¹³⁾이 반응성을 설명하는 데 있어서 적절한 설명인자가 되는 경우가 있다. 그런 경우를 대비하여 Sybyl 프로그램에서 이용할 수 있는 MOPAC 프로그램(Ver. 6.0)을 활용하여 HOMO와 LUMO 에너지(e.v.)값을 계산하여 부가적 설명인자¹⁴⁾로 사용하였다.

가장 안정한 분자의 형태를 탐색하기 위하여 2D 구조를 3D 구조의 분자로 전환하는데에는 기본골격의 비 치환 분자를 simulated annealing 방법¹⁵⁾으로 potential 에너지가 최소화 된 가장 안정한 형태(conformer)를 탐색하였다. 즉, 200~1,000°C 사이의 온도 조건과, 10회 Cycle을 실행하고 에너지는 Tripos force field에서 그리고 특정 원자의 부분 전하는 Gasteiger-Huckel charge¹⁶⁾를 사용하여 최적화함으로써 가장 낮은 최소화 에너지를 가지면서 potential 에너지가 가장 낮은(minimization energy: 6.369 Kcal/mol) 안정한 형태를 구하였다. 그리고 정전기장의 계산을 위하여 분자의 X-치환기와 R-치환기 부분을 제외한 공통 부분인 2-(4-chloro-2-fluorophenyl)-3-(phenylthio)-2,3,4,5,6,7-hexahydroisindoline-1-one의 구조를 기본골격(template)으로(Fig. 1) atom based fit (AF)방법¹⁷⁾과 field fit(FF)방법¹⁸⁾으



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

Fig. 1. Superimposition criteria of 2-(4-chloro-2-fluoro-5-alkoxy(X)phenyl-3-(R)phenylthio)-2,3,4,5,6,7-hexahydroisindoline-1-one derivatives (X=A & B).

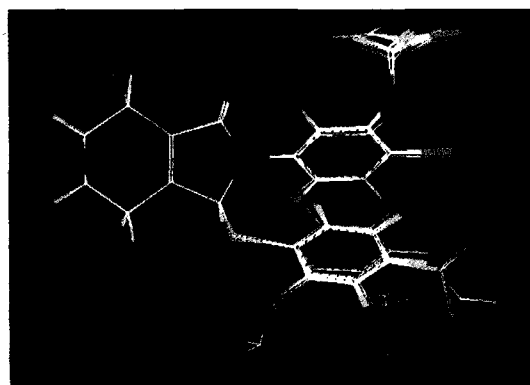


Fig. 2. The superimpose of the potential energy minimized substrate structure using atom based fit (AF) alignment.

로 3차원 공간상에 중첩시키고 정렬(Fig. 2)하였다.

CoMFA-PLS 분석. 3차원 공간상에 정렬된 각 분자들을 3차원 입방격자 공간상에 space gride를 1.0~3.0Å로 변화시켜 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 steric field(Van der Waals potential) 에너지를 계산한다. 모델의 상관성을 높이기 위하여 입체장(SF)과 정전기장(EF)을 위시하여 소수성적 상호작용(HINT)으로 조합된¹⁹⁾ CoMFA field로 구성된 모델을 유도하고자 3차원 공간상에 정렬된 화합물들의 3D 구조적 특징에 관한 설명 인자와 생물 활성간의 상관관계를 부분 최소자승(PLS) 법²⁰⁾으로 계산하였다.

최적의 주성분 수를 결정하기 위하여 LOO(leave-one-out) cross-validated(cv.)과정을 실행하여 q²값(또는 r²_{cv})과 최적의 성분수를 탐색한다. 이것을 근거로 non cross-validation(ncv.)과정으로 r²_{ncv}값은(scaling: CoMFA standard, column filtering: 2.0 kcal/mol) 조건으로 실행시켜 구 하였다. 모델의 적합성을 뜻하는 r²_{ncv} 값이 0.90 이상, 그리고 예측성 척도인 q²값이 0.5 이상의 값이 얻어졌을 경우에 한하여 유도된 모델이 안정성과 합리적인 예측성을 갖는 것으로 판단한다. 이때 성분수가 증가하게 되면 q²값이 증가하기 때문에 data point의 over fitting을 피하기 위하여 가능한 적은 수(3~5)의 성분(component)이 적절하다.

등고도와 활성의 예측. 관측값(Obs. pI_{50})을 근거로 가장 큰 살균활성(RPC: 4.16 및 SPC: 3.98)을 보인 화합물인 3-fluoro 치환체(11)를 대상으로 CoMFA 모델에 포함된 정보들을 분석하기 위하여 CoMFA 결과들은 분자의 공통된 특성을 입체장과 정전기장 및 소수성장을 구분하고 가시적으로 확인(graphic analyses)하므로서 pharmacophore를 규명하는데 이용하고자 살균활성 변화에 관한 CoMFA coefficient들은 field type (stdev*coeff)을 사용하여 CoMFA장의 등고도(contour map)로 나타내었다. 또한, CoMFA 모델의 예측성을 확인하기 위하여 test set 분자들을 대상으로 살균 활성을 예측하였다. 고 활성 화합물의 예측은 선택된 CoMFA 모델로 optimizing QSAR (Method: Random, Cycle: 100 및 Best: 10)을 실시하여 분자의 S-phenyl 고리상 비(R=H) 치환체(Fig. 1)를 기준으로 309개의 치환체들에 대하여 예측을 실시하였다.

결과 및 고찰

살균 활성과 분자정렬. 상이한 정렬에 따라 두 균주(RPC 및 SPC) 별로 구축된 모델의 예측성을 개선하기 위하여 atom based fit¹⁷⁾ (AF)방법과 field fit¹⁸⁾ (FF)방법으로 분자 정렬을 실행하였다. 그 중에서 한 예로, AF 정렬에 따른 CoMFA 모델에

의한 예측값(Pred. pI_{50}) 및 두 값의 차이값(Dev.)들을 Table 1에 정리하였다. 이들 화합물은 대체로 낮은 살균활성을 보이는 경향이었으며 3-fluoro 치환체(11) (RPC: 4.16 및 SPC: 3.98)가 제일 큰 활성을 나타내었다. 전반적으로 살균활성의 크기는 SPC 보다 RPC가 약간 큰 경향이었으며(RPC > SPC) 두 균주에 대한 관측값들은 1차식의 양호한 비례관계(Obs.(pI_{50} SPC) = 1.044Obs.(pI_{50} RPC)) - 0.271, n = 24, s = 0.092, F = 164.12 및 r^2 = 0.882)를 나타내었다.

두 균주별 CoMFA 모델을 유도하기 위한 사전 단계로서 분자를 정렬하기 위한 형태의 탐색은 simulated annealing 방법¹⁵⁾에 따라 기본구조(template)에 N-phenyl 고리상 산소원자에 X-치환기로서 A = propynyl 및 B = 2-chloropropenyl group 그리고 S-phenyl 고리상에 R-치환기가 도입된 치환체들에 대하여 (Fig. 1) standard Tripos force field에서 Gasteiger-Huckel charge를 사용하여 최적화하였다. 가장 낮은 에너지를 갖는 안정한 형태(conformer)의 template 분자에 training set 및 test set 중, 모든 분자들의 안정한 형태들을 두 정렬방법으로 3차원 공간상에 중첩시켰으며 한 예로, AF 정렬된 구조를 Fig. 2에 제시하였다. 이로부터 입체적으로 분자간 중첩에서 벗어난 N-phenyl 고리상 X-치환기와 S-phenyl 고리상 R-치환기들의 변화에 따라 살균 활성이 변화됨을 알 수 있다.

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

No.	R (Sub.)	RPC			SPC		
		Obs.	Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}	Obs.	Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}
1	H	3.62	3.65 ^{c)}	-0.03 ^{c)}	3.59	3.68	-0.09
2	2-Methoxy	3.84	3.79	0.05	3.67	3.65	0.02
3	4-Methoxy	3.60	3.72	-0.12	3.54	3.72 ^{c)}	-0.18 ^{c)}
4	2-Methyl	3.83	3.60 ^{b)}	0.23 ^{c)}	3.89	3.69	0.20
5	3-Methyl	3.62	3.63	-0.01	3.55	3.61	-0.06
6	4-Methyl	3.61	3.59	0.02	3.62	3.63	-0.01
7	2-Chloro	3.71	3.79	-0.08	3.64	3.72	-0.08
8	3-Chloro	3.84	3.84	0.00	3.80	3.72	0.08
9	4-Chloro	3.82	3.81	0.01	3.69	3.75	-0.06
10	2-Fluoro	3.94	3.93	0.01	3.79	3.77	0.02
11	3-Fluoro	4.16	4.03	0.13	3.98	3.76 ^{c)}	0.22 ^{c)}
12	4-Fluoro	3.81	3.79	0.02	3.74	3.77	-0.03
13	3-Trifluoromethyl	3.54	3.93 ^{c)}	-0.39 ^{c)}	3.61	3.61	0.00
14	4-Trifluoromethyl	3.80	3.86	-0.06	3.69	3.86 ^{c)}	-0.17 ^{c)}
15	H	3.16	3.25	-0.09	3.06	3.18	-0.12
16	2-Methoxy	3.20	3.38 ^{c)}	-0.18 ^{c)}	3.10	3.15	-0.05
17	3-Methoxy	3.40	3.39	0.01	3.14	3.12	0.02
18	4-Methoxy	3.48	3.34	0.14	3.32	3.22	0.10
19	2-Chloro	3.39	3.40	-0.01	3.25	3.24	0.01
20	3-Chloro	3.54	3.43	0.11	3.27	3.23 ^{c)}	0.04 ^{c)}
21	4-Chloro	3.39	3.43	-0.04	3.31	3.27	0.04
22	3-Fluoro	3.50	3.62	-0.12	3.28	3.27	0.01
23	3-Trifluoromethyl	3.47	3.49	-0.02	3.28	3.24	0.04
24	4-Trifluoromethyl	3.54	3.48	0.06	3.32	3.37	-0.05
	Ave. ^{d)}			0.056			0.060
	Test set ave. ^{e)}			0.208			0.153

A=1~14, B=15~24., Abbreviation: RPC; Resistive *Phytophthora capsici*, SPC; Sensitive *Phytophthora capsici*, ^{a)}predicted value by A3 (RPC) & A7 (SPC) model, ^{b)}difference between observed values and predicted values, ^{c)}test set compound, ^{d)}average residual of training set., ^{e)}average residual of test set.

Table 2. Summary of analyses from CoMFA models based on atom based fit (AF) alignment using additional descriptions

Fungi	Resistive <i>P. capsici</i> (RPC)					Sensitive <i>P. capsici</i> (SPC)				
	Models	A1	A2	A3 ^{a)}	A4	A5	A6	A7 ^{a)}	A8	A9
Descriptors	ClogP	H	L	ClogP+H	ClogP+L	ClogP	H	LUMO	ClogP+H	ClogP+L
Fields	Hb	SHb	SHb	SHb	SIHb	IHb	SIHb	SIHb	SIHb	SIHb
Grid (Å)	1.0	3.0	3.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
NC ^{b)}	6	4	4	4	3	3	3	3	3	3
$r_{cv}^2(q^2)^c$	0.525	0.612	0.625	0.596	0.630	0.830	0.834	0.830	0.825	0.815
r_{ncv}^2 ^{e)}	0.942	0.888	0.894	0.845	0.864	0.910	0.915	0.914	0.914	0.913
SEE _{ncv} ^{d)}	0.068	0.088	0.086	0.104	0.094	0.084	0.081	0.082	0.082	0.082
F value ^{e)}	35.491	29.708	31.786	20.406	33.982	53.623	57.760	56.661	56.594	55.694
Steric	0.874	0.679	0.668	0.419	0.567	0.887	0.828	0.828	0.811	0.804
Electrostatic	-	0.112	0.103	0.080	0.040	-	0.046	0.045	0.050	0.050
ClogP	0.126	-	-	0.217	0.155	0.113	-	-	0.006	0.003
HOMO	-	0.209	-	0.284	-	-	0.126	-	0.133	-
LUMO	-	-	0.229	-	0.238	-	-	0.127	-	0.143

Abbreviation: Descriptors; H=HOMO, L=LUMO, Fields: S=standard, I=indicator, Hb=H-bond., ^{a)}The best model, ^{b)}Number of component, ^{c)}cross-validated (cv.) r^2 , ^{d)}non-cross-validated (ncv.) r^2 , ^{e)}standard error estimate, ^{f)}fraction of explained versus unexplained variance.

Table 3. Summary of analyses from CoMFA models based on field fit (FF) alignment using additional descriptions

Fungi	Resistive <i>P. capsici</i> (RPC)					Sensitive <i>P. capsici</i> (SPC)				
	Models	F1	F2	F3 ^{a)}	F4	F5	F6	F7	F8	F9 ^{a)}
Descriptors	ClogP	H	L	ClogP+H	ClogP+L	ClogP	H	L	ClogP+H	ClogP+L
Fields	SIHb	IHb	IHb	I	IHb	SIHb	SI	SI	S	S
Grid (Å)	1.5	1.5	1.5	3.0	1.5	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
NC ^{b)}	2	3	3	2	3	4	3	3	4	4
$r_{cv}^2(q^2)^c$	0.553	0.642	0.659	0.704	0.650	0.806	0.827	0.825	0.817	0.794
r_{ncv}^2 ^{d)}	0.748	0.874	0.886	0.804	0.881	0.929	0.909	0.910	0.932	0.932
SEE _{ncv} ^{e)}	0.124	0.090	0.086	0.110	0.088	0.077	0.084	0.083	0.075	0.075
F value ^{f)}	25.196	37.072	41.292	34.872	39.673	49.248	53.129	54.162	51.767	51.564
Steric	0.722	0.820	0.820	0.319	0.594	0.760	0.726	0.726	0.598	0.577
Electrostatic	0.166	-	-	-	-	0.142	0.143	0.140	0.247	0.244
ClogP	0.112	-	-	0.327	0.160	0.098	-	-	0.011	0.020
HOMO	-	0.180	-	0.354	-	-	0.131	-	0.144	-
LUMO	-	-	0.180	-	0.246	-	-	0.134	-	0.159

Abbreviation: Descriptors; H=HOMO, L=LUMO, Fields: S=standard, I=indicator, Hb=H-bond., ^{a)}The good model, ^{b)}Number of component, ^{c)}cross-validated (cv.) r^2 , ^{d)}non-cross-validated (ncv.) r^2 , ^{e)}standard error estimate, ^{f)}fraction of explained versus unexplained variance.

균주별 CoMFA 모델. 두 균주 별, 살균 활성값은 종속항 그리고 입체장(SF), 정전기장(EF), 소수성장(clogP) 등의 설명 인자들의 조합을 독립항으로 정렬 유형에 따라 AF정렬 조건에서 유도된 CoMFA 모델(A1~A10)들의 분석 결과를 Table 2 그리고 FF정렬 조건에서 유도된 CoMFA 모델(F1~F10)들의 분석 결과를 Table 3에 각각 정리하였다. 각 경우 space grid는 1.0~3.0Å 범위이었고 잠재변수를 의미하는 성분 수는 2~6이었다. 생물활성 반응에서 가장 중요한 요소중에 하나인 소수성(logP) 적인 특성을 계산하고자 clogP를 포함하여 분석한 결과, 정전기장의 기여도가 작으므로 이를 고려하기 위하여 부가적 설명인자(additional descriptor)로서 HOMO, LUMO, DM 및 MR 상수 등을 추가하였다.¹⁴⁾ 이들 4가지 부가적 설명인자를 첨가하여 분석한 결과, 쌍극자 능률값(DM: Debye)과 MR상수 즉, 몰라 굴절율(molar refractivity: Cm³/mol)로서 입체효과와 분산력에 관련한 파라미터들은 모델의 상관성과 예측성을 향상시키지 못하여 분석에서 제외하였다. 그리고 CoMFA field에

HOMO와 LUMO 분자 궤도장을 개별적으로 첨가하거나 또는 clogP와 조합하여 양호한 모델을 얻을 수 있었다. 여기서 HOMO 에너지는 분자 사이의 결합생성 반응에서 분자가 전자쌍 주개인 Lewis 염기로 작용하는 친핵성 정도(nucleophilicity)의 척도이며 LUMO 에너지는 분자가 전자쌍 받개인 Lewis 산으로 작용하는 친전자성 정도(electrophilicity)의 척도를 의미한다.

AF 정렬시의 모델. AF 정렬에서(Table 2) RPC의 경우(A1~A5), 모델 A3은 부가적 설명인자로서 LUMO 에너지 단독으로 CoMFA field에 첨가하였을때, standard(S) field와 H-bond(Hb) field가 조합된 CoMFA장(SHb) 조건(grid: 3.0Å 및 성분수: 4)에서 예측성의 정량적 척도인 cross-validated value, $r_{cv}^2(q^2$; predictivity)는 0.625이었다. 여기에서 q^2 값은 최상의 예측성 CoMFA식을 얻기 위하여 얼마나 많은 성분(component)이 필요한가를 의미한다. 그리고 상관성(r_{ncv}^2 ; goodness of fit)은 0.894 그리고 표준편차(SEE_{ncv})는 0.086으로 가장 좋은 통계치를 얻을 수 있었다. CoMFA장의 기여 정도는 입체장: 66.8%, 정전

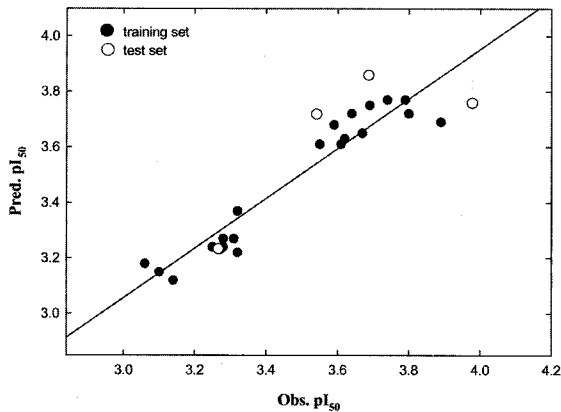


Fig. 3. Relationships between observed values (obs.) for the fungicidal activities against SPC and predicted values (pred.) by A7 model.

기장: 10.3% 및 LUMO: 22.9%로 입체장이 제일 큰 영향을 미치는 요소이었으며 관측값과 예측값 사이의 관계식($\text{Pred. } (pI_{50})_{\text{RPC}} = 0.793\text{Obs. } (pI_{50})_{\text{RPC}} + 0.765$, $n=24$, $s=0.113$, $F=61.967$ 및 $r^2=0.738$)으로부터 두 값들이 대체로 잘 부합되었다.

SPC의 경우(A6~A10), 모델 A7은 부가적 설명인자로서 HOMO 분자 궤도장을 단독으로 첨가하였을 때, standard(S) field, indicator(I) field 및 H-bond field(Hb)가 조합된 CoMFA 장(SIHb) 조건(grid: 2.0Å 및 성분수: 3)에서 예측성의 정량적 척도인 cross-validated value, $r^2_{\text{cv}}(q^2; \text{predictability})$ 는 0.834, 상관성(r^2_{ncv} ; goodness of fit)은 0.915 그리고 표준편차(SEE_{ncv})는 0.081로 가장 좋은 통계치를 얻었다. SPC의 경우에도 RPC의 경우와 같이 입체장: 82.8%, 정전기장: 4.6% 및 HOMO: 12.6%로 입체장이 제일 큰 영향을 미치는 요소이었다. Fig. 3에 SPC 균주에 대한 관측값과 모델 A7에 의한 예측값과의 관계($\text{Pred. } (pI_{50})_{\text{SPC}} = 0.897\text{Obs. } (pI_{50})_{\text{SPC}} + 0.366$, $n=24$, $s=0.095$, $F=140.738$ 및 $r^2=0.865$)를 나타낸 것인데 두 값들이 서로 잘 일치하고 있음을 보이고 있다.

FF 정렬시의 모델. FF 정렬에서(Table 3) RPC 경우(F1~F5), 모델 F3에서는 부가적 설명인자로서 LUMO 분자 궤도장이 단독으로 CoMFA field에 첨가되었을 때, indicator(I) field와 H-bond(Hb) field가 조합된 CoMFA 장(IHb) 조건(grid: 1.5Å 및 성분수: 3)에서 cross-validation, $r^2_{\text{cv}}(q^2)$ 는 0.659, 상관성에 해당하는 non cross-validation(r^2_{ncv})은 0.886 및 표준편차(SEE_{ncv}) 0.086으로 가장 좋은 통계치를 얻을 수 있었다. CoMFA 장의 기여 정도는 입체장: 82.0% 그리고 LUMO: 18.0%로 입체장이 매우 크게 기여하였다. SPC 경우(F6~F10), 모델 F9에서는 clogP와 HOMO를 조합하여 사용하였을 때, standard(S) field로 조합된 CoMFA 장(S) 조건(grid: 3.0Å 및 성분수: 4)에서 $r^2_{\text{cv}}(q^2)$ 는 0.817, 상관성(r^2_{ncv})은 0.932 및 표준편차(SEE_{ncv}) 0.075로 좋은 통계값을 나타내는 모델을 각각 탐색할 수 있었다. 또한, CoMFA 장의 기여 정도는 입체장: 59.8%, 정전기장: 24.7%, 소수성장(clogP): 1.1% 그리고 HOMO: 14.4%로 입체장이 영향을 미치는 요소이었으며 전체적으로 어느 경우이든 입체장이 가장 큰 영향을 미쳤다.

상용중인 살균제 133 품목의 유효성분에 대하여 관측된 소

수성 상수(logP)는 약제의 생체내 침투와 이행에 있어서 가장 중요한 척도로서 $\log P = -4.97 \sim 5.83$ 범위이나²¹⁾ 대부분 주로 약 $\log P = 3.0 \sim 4.0$ 부근에서 분포율을 나타내고 있다.²²⁾ 그럼에도 불구하고 CoMFA 모델에서 소수성장의 기여 정도가 작은 이유는 기질 화합물들의 logP가 A = 4.27~5.41 및 B = 4.77~5.65¹¹⁾ 이므로 이들 분자들이 살초활성을 발현하는데 이미 충분한 정도의 소수성을 유지하고 있기 때문이다. 또한, 가장 양호한 통계치를 나타내어 선택된 CoMFA 모델들은 부가적 설명인자로서 RPC에는 LUMO 그리고 SPC에는 HOMO 분자 궤도장이 각각 영향을 미치는 중요한 요소로 작용하였다.

이상과 같은 검토결과, RPC의 경우, 모델 A3은 LUMO 분자 궤도장이 첨가된 조건이었고 SPC의 경우, 모델 A7은 HOMO 분자 궤도장이 각각 첨가되었을 경우이었다. 그러므로 SPC에 대한 모델이 RPC 모델보다 양호한 모델이었으며(r^2_{cv} 및 $r^2_{\text{ncv}} = \text{SPC} > \text{RPC}$) 전반적으로 두 가지 정렬 유형에 따라 두 균주별로 FF 정렬시 보다는 AF 정렬시에 양호한 모델(AF > FF)을 유도하였다.

CoMFA 등고도. 두 균주에 대하여 선택된 모델이 가지고 있는 분자의 입체적, 소수성적 및 정전기적인 특징들을 분석하기 위하여 관측값(Obs.pI₅₀)을 근거로 가장 큰 살균활성을 보이는 3-fluoro 치환체(11) (RPC: 4.16 및 SPC: 3.98)를 대상으로 한 등고도를 Fig. 4 및 5에 각각 나타내었다. Fig. 4는 두 균주의 살균활성에 관한 입체장과 정전기장을 나타낸 등고도이다. 색상에 따라 푸른색(blue)은 양 하전 증가 그리고 붉은색(red)은 음 하전 증가로 활성이 증가함을 의미하며 녹색(green)은 steric bulky한 정도가 클수록 활성이 증가되는 분자의 성질들을 각각 제시한다. 그러므로 RPC 균주(왼편)에서는 S-phenyl 고리상 meta-위치 R-치환기는 음하전, N-phenyl 고리상 X-치환기로서 propynyl group는 입체적으로 크고 양하전을 나타낼수록 활성에 기여할 것임을 나타내고 있다. SPC 균주(오른편)에서 X-치환기로서 propynyl group에는 입체적으로 크고 양하전이 클수록 활성에 기여할 것이다. 또한, ortho, para-위치의 R-치환기는 음하전이 그리고 X-치환기와 ortho, meta-위치에는 양하전이 클수록 살균활성에 기여할 것으로 설명된다. 그러므로 이 두균주의 선택성 요인은 ortho, meta-위치 R-치환기의 양하전에 의한 것으로 예상된다.

한편, 소수성(logP)장에 관한 등고도(HINT map)를 Fig. 5에 나타내었다. 색상에 따라 붉은색(red)은 친수성 증가로 활성이 증가함을 의미하며 녹색(green)은 소수성이 클수록 활성이 증가되는 분자의 성질들을 각각 제시한다. 두 균주에서 등고도 아래부분, N-phenyl 고리상 X-치환기로서 propynyl group은 친수성과 소수성으로 분리된 동일한 양상을 보이고 있다. 그리고 윗부분, S-phenyl 고리상 등고도에서 RPC(왼편)의 경우에는 ortho, meta 및 para-위치의 넓은 영역에 걸쳐서 친수성이어야 하나 SPC(오른편)의 경우에는 para-위치에만 친수성이 클수록 활성이 증가할 것으로 예상된다. 그러므로 두 균주의 선택성은 S-phenyl 고리상 치환기의 친수성 부분의 크기에 의존적임을 설명하고 있다.

이와 같이 CoMFA 등고도의 graphic analyses 결과에 따라 분자의 정량적인 구조와 활성간의 관계(QSAR)를 설명할 수 있

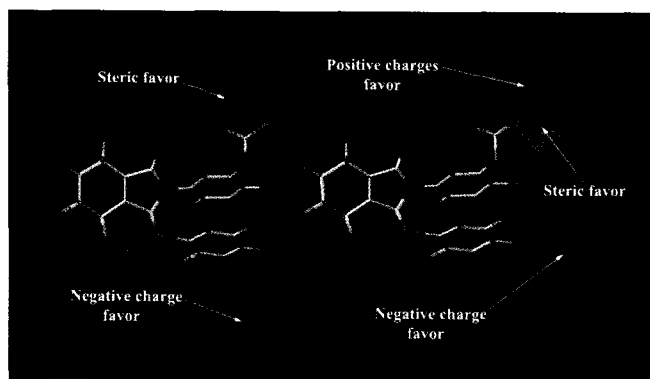


Fig. 4. CoMFA contour maps for the steric and electrostatic field (stdev*coeff) on fungicidal activity against RPC (left) and SPC (right). The most active compound 3-fluoro substituent (11) is shown in capped sticks.

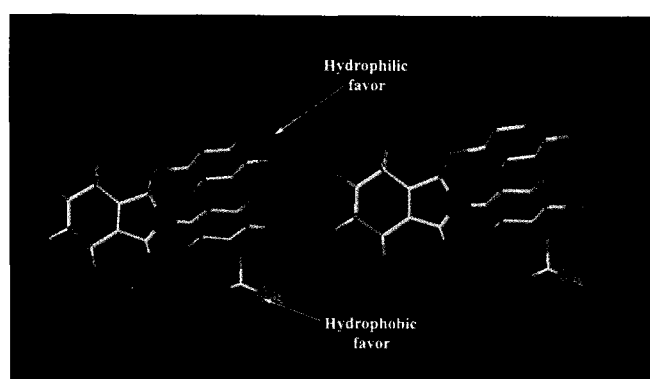


Fig. 5. CoMFA-HINT maps for hydrophobic field (stdev*coeff) on fungicidal activity against RPC (left) and SPC (right). The most active compound 3-fluoro substituent (11) is shown in capped sticks.

을뿐만 아니라, 살균활성 메커니즘을 이해함으로써 활성이 개선된 새로운 분자를 설계하고 선택하는데 효과적으로 이용된다. 따라서 두 균주에 대한 선택성은 *S*-phenyl 고리상 ortho, meta-위치 R-치환기의 양하전 유무와 R-치환기의 친수성 부분의 크기에 의존적일 것으로 예상되며 이러한 특성을 증가시킴으로써 선택적으로 살균활성을 나타낼 수 있을것이라 판단된다.

모델의 예측성. 두 균주의 살균활성에 대한 관측값(obs.)과 AF정렬 조건에서 유도된 모델 A3 및 A7의 예측성을 평가하기 위하여 test set에 대한 예측값(pred.)의 차이(Dev.)를 Table 1에 정리하였다. 차이값이 관측값의 10% 미만의 값을 보였을 뿐 아니라, 두 초종의 부위별로 오차의 평균값이 0.15-0.21이므로 관측값과 예측값 사이에 좋은 일치를 보였다. 따라서 두 균주에 대한 모델 A3 및 A7은 예측성이 양호한 모델이었다.

선택된 CoMFA 모델들로 높은 살균활성을 갖는 화합물을 예측하기 위하여 optimizing QSAR을 실시하고 그 결과를 Table 4에 요약하였다. 즉, *S*-phenyl 치환기(R)를 고정하고 *N*-phenyl 치환기(X)를 변화시키거나 반대로 치환기(X)를 고정한 다음에 *S*-phenyl 치환기(R)를 변화시키든가 또는 두 치환기(R 및 X)를 동시에 치환시켜 고회성 분자의 예측을 시도하였다. 최종적으로 R-치환기를 기존의 활성값(pI₅₀)이 높은 치환기(A: RPC;

Table 4. Predicted (pred.) fungicidal activities (pI₅₀) by optimizing QSAR methodology and deviation (dev.) for unknown propynyl (A) substituents

R	Sub.(X)	RPC		SPC	
		pred.	dev. ^{a)}	pred.	dev. ^{a)}
3-F	CH ₂ N(CH ₃) ₃ ⁺	4.09	0.06	3.81	0.04
3-F	N(CH ₃) ₃ ⁺	4.07	0.04	3.79	0.02
3-F	N=NCN	4.04	0.01	3.79	0.02
2-F	N ₃	4.09	0.06	3.85	0.07
2-F	CH ₂ NH ₃ ⁺	4.05	0.02	3.83	0.05

^{a)}Difference between predicted values by the model and the highest observed fungicidal activity in this study (11: RPC=4.03 & 10: SPC=3.77).

11 = 4.03 및 SPC; 10 = 3.77)로 고정하고 *N*-phenyl 치환기(X)에 309개의 치환기를 치환시킴으로써 X 및 R-치환기 두 부분에서 기존의 예측된 활성값보다 좋은 분자를 탐색하였다. 그 중에서 R = 3-fluoro와 X = CH₂N(CH₃)₃⁺ 치환기가 도입되었을 경우에 가장 양호한 살균활성이 예측되었으나(RPC: 4.09 및 SPC: 3.81) 활성이 크게 향상된 화합물을 찾을 수 없었다.

이상과 같은 검토결과, 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체들의 살균활성은 SPC 보다 RPC에 대하여 약간 큰 값을 나타내는 경향일 뿐만 아니라(RPC > SPC), pI₅₀ = 4.0 수준의 살균활성을 나타내므로 구조적인 수식을 통하여 특히, 저항성 균주(RPC)들에 대한 살균활성을 개선할 수 있을것으로 판단된다. 다음 연구는 이같은 CoMFA 분석결과에 기초하여 수소결합 주계장 및 수소결합 받게장 등에 대한 더욱 구체적인 정보를 얻기 위하여 3D-QSAR 방법 중 하나인 비교 분자 유사성 지수분석(CoMSIA) 방법으로 검토하고자 한다.

초 록

새로운 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one 유도체 (A & B)들의 치환기 변화에 따른 저항성(RPC; 95CC7303)과 감수성(SPC; 95CC7105) 고추역병 균주(*Phyto phthora capsici*)들의 살균활성에 대한 3차원적인 정량적 구조-활성관계(3D-QSAR)를 비교 분자장 분석(CoMFA) 방법으로 연구하였다. 정렬방법에 따라 field fit(FF) 보다는 atom based fit(AF) 정렬시에 양호한(AF > FF) 모델, A3 및 A7을 얻을 수 있었다. AF 정렬시, 부가적 설명인자로서 HOMO 및 LUMO 분자 궤도장이 추가된 H-bond와 standard field에서 유도된 균주별 두 모델의 cross-validated r²_{cv} 값(q² = 0.625~0.834)과 non cross-validated 값(r²_{ncv} = 0.894~0.915)에 근거하여 SPC 균주의 살균활성에 대한 모델, A7이 RPC 균주의 살균활성에 대한 모델, A3보다 양호한 예측성(q²)을 나타내었다. 두 균주에 대한 살균활성은 분자의 입체장(66.8~82.8%), 정전기장(10.3~4.6%) 그리고 분자 궤도장(SPC: HOMO, 12.6% 및 RPC: LUMO, 22.9%)이 영향을 미치는 중요한 요소이었다. 두 균주에 대한 선택성은 *N*-phenyl 고리상 ortho, meta-위치의 양하전과 *S*-phenyl 고리상 치환기의 친수성의 크기에 의존적이었다.

Key words: 3D-QSAR, 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisindoline-1-one, 살균활성, 저항성 및 감수성 고추역병균(*Phytophthora capsici*), 상이한 정렬, CoMFA 모델.

감사의 글

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

참고문헌

- FRAC (2002) Publications, *FRAC fungicide group names and codes, Fungicide Resistance and Action Committee*/www.frac.info.
- Leonard, G. C. and Hewitt, H. G. (1998) In *Chemistry and Mode of Action of Crop Protection Agents*. The Royal Society of Chemistry. UK.
- Lee, Y. J. (2003) Analyses of 2D and 3D-QSARs on the protox inhibition activities of 2N-substituted-phenylisindoline-1-one derivatives., MS Thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Kang, E. K. (2002) Effect of 3-Thioalkoxy groups on the herbicidal activity of 2-(5-alkoxyphenyl)-3-phenylthioisindoline-1-one derivatives. MS Thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Sung, N. D., Ock, H. S., Chung, H. J. and Song, J. H. (2003) Quantitative structure- activity relationship and molecular shape similarity of the herbicidal N-substituted phenyl-3,4-dimethylmaleimide derivatives. *Kor. J. Pesticide Sci.* **7**, 100-107.
- Sung, N. D., Ock, H. S., Chung, H. J. and Lee, Y. G. (2003) Comparative molecular field analysis (CoMFA) on the growth inhibition activity of N-sub.phenyl-3,4,5,6- tetrahydrophthalimide and N-sub. phenyl-3,4-dimethylmaleimide derivatives, *Kor. J. Pesticide Sci.* **7**, 75-82.
- Tomlin, C. D. S. (2000) *The Pesticide Manual* (12th ed.), British Crop Protection Council, 49 Downing Street, Farnham, Surrey GU9 7PH, UK.
- Cramer, R. D., Patterson, D. E. and Bunce, J. D. (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.
- Klebe, G. (1993) In *3D QSAR Drug Design, Theory, Methods and Applications: Structural Alignment of Molecules* ESCOM. (Kubinyi, H. ed.) Leiden. pp. 173-199.
- Ryu, E. G., Kim J. Y., Song, J. H., Chung, G. H. and Kim, J. S. (1995) Herbicidal N-sub.phenyl-3,4-dimethyl-2-(S-sub.thio)-5-oxo-2,5-dihydropyrrol derivatives and their synthetic method. Korea Patent, No 088511.
- Yoon, T. Y. (2002) Quantitative structure-activity relationship (QSAR) on the fungicidal activity of 2-(5-alkoxyphenyl)-3-phenylthioisindoline-1-one derivatives. Ph.D. Thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Tripos Associates, Inc., 1699 S. Hanley Road, Suite 303, St. Louis, MO 63144-2913, USA, <http://www.tripos.com/Bookshelf/qsar/>.
- Waller, C. L. and Marshall, G. R. (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.
- Anand V. Raichurkar and Vithal M. Kulkarni (2003) Understanding the antitumor activity of novel hydroxysemicarbazide derivatives as ribonucleotide reductase inhibitors using CoMFA and CoMSIA. *J. Med. Chem.* **46**, 4419-4427.
- Kerr, R. (1994) Parallel helix bundles and ion channels: molecular modeling via simulated annealing and restrained molecular dynamics. *Biophys. J.* **67**, 1501-1515.
- Purcell, W. P. and Singer, J. A. (1967) A brief review and table of semiempirical parameters used in the Huckel molecular orbital method. *J. Chem. Eng. Data* **122**, 235-246.
- Marshall, G. R., Barry, C. D., H. E. Bosshard, R. A. Dammkoehler, D. A. Dunn (1979) In *Computer-assisted drug design: The conformational parameter in drug design; active analog approach*. Olsen, E. C. and Christoffersen, R. E. (eds), American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 205-226.
- Clark, M., Cramer III, R. D., Jones, D. M., Patterson, D. E. and Simeroth, P. E. (1990) Comparative molecular field analysis (CoMFA). 2. Toward its use with 3D-structural databases. *Tetrahedron Comput. Methodol.* **3**, 47-59.
- Kellogg, G. E., Semus, S. F. and Abraham, D. J. (1991) HINT: A new method of empirical hydrophobic field calculation for CoMFA. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **5**, 545-552.
- Cramer, R. D., Bunce, J. D. and Patterson, D. E. (1988) Cross-validation, bootstrapping, and partial least squares compared with multiple regression in conventional QSAR studies. *Quant. Struct. -Act. Relat.* **7**, 18-25.
- Sung, N. D. and Song, S. S. (2003) Range of physicochemical parameters for active ingredients of fungicides and insecticides as crop protection agents. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 280-284.
- Tanaka, S., Takahashi, M., Funaki, Y., Izumi, K., Takano, H. and Miyakado (1995) In *Classical and Three-Dimensional QSAR in Agrochemistry: Hydrophobicity and Systemic Activities of Fungicidal Triazoles and Blaching Herbicidal Compounds*. Hansch, C and Fujita, T. (eds.) Ch. 8., ACS Symposium Series 606, American Chemical Society, Washington, DC, USA.