

Cyclooxygenase-1 과 Cyclooxygenase-2 에 대한 4,5-Diarylpyrroles 의 Docking Mode

이종달* · 도성탁* · 구분기

영남대학교 약학대학, *대구보건대학 임상병리과

(Received February 12, 1999)

Docking Mode of 4,5-Diarylpyrroles into Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2

Jong-Dal Rhee,[#] Seong-Tak Doh* and Bon-Ki Koo

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

*Department of Clinical Pathology, Taegu Health College, Taegu 702-722, Korea

Abstract — Dockings of 4,5-diarylpyrroles into cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 were carried out by GOLD program. The sulfonyl groups bonded to 5-phenyl ring of 4,5-diarylpyrroles are directed to Arg513 of COX-2 and Tyr385 of COX-1. COX-2 docking modes of pyrroles are different from COX-1. Tyr385 and Arg120 of COX-1 and COX-2 have been recognized as important residues. Val523 of COX-2 may be also important. A new COX-2 selective inhibitors could be designed from the docking study.

Keywords □ Docking mode, 4,5-diarylpyrroles, cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2.

많은 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)는 cyclooxygenase(COX)의 작용을 차단하여 항염작용을 나타낸다고 한다.¹⁻³⁾ COX에는 COX-1과 COX-2가 있으며 일반적으로 NSAIDs는 이 두 효소의 작용을 차단하므로 인하여 그 다음의 단계에서 필요한 생체물질을 생성하지 못하게 한다. 이에 따라 소염제의 부작용이 생길 수 있을 뿐 아니라, 이들 효소의 작용을 받지 못한 Arachidonic Acid(AA)가 lipooxygenase 관여하는 경로로 우회하므로 부작용도 발생할 수 있을 것이다. 그런데 COX-2는 염증반응이 생기는 부위에 집중적으로 존재하므로 이 효소의 작용만을 차단할 수 있는 약을 개발하면 기존의 NSAIDs 항염제의 부작용인 위출혈을 경감할 수 있을 것이다.

그래서 최근에 많은 연구자들이 COX-2에 선택적인

작용을 가진 신약개발에 많은 노력을 하고 있다.⁴⁻⁹⁾ Kaigutar 등¹⁰⁾은 Aspirin의 유도체인 APHS(*o*-acetoxyphenyl)hept-2-ynylsulfide)를 합성하였다. 이 물질은 COX-2의 작용을 선택적으로 저해할 수 있다고 한다. 선택적 COX-2저해제의 최신 근황은 Marnett등이 잘 기술하고 있다.¹¹⁾

COX-1의 결정구조는 1996년^{12,13)}에, COX-2의 결정구조는 1997년^{14,15)}에 발표되었다. 이들은 cyclooxygenase의 작용과 peroxidase(PER)의 작용을 동시에 가지고 있다. COX의 정식 명칭은 PG endoperoxide synthase이지만 일반적으로 약칭하여 COX라 한다. 그러나 이들 구조의 분해능이 약 3.0~3.4Å로 그렇게 좋은 편은 아니나 active site에서는 각 잔기의 위치가 그런 대로 잘 규명되어 있어 docking하는 데는 그렇게 문제가 되지 않았다. Active site의 구조가 더욱 정확하여야 좋은 docking 결과를 얻을 수 있다.

본 연구에서는 설포닐기를 함유하는 4,5-diarylpyrroles를 COX-1과 COX-2에 docking시키고, 결합

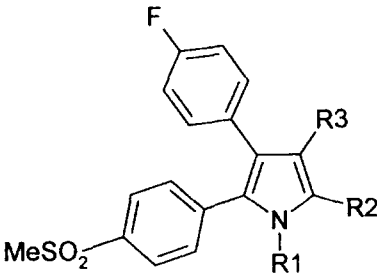
[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-810-2826 (팩스) 053-811-3871

mode를 조사하고자 한다. 여기서 얻어지는 결과를 응용하면 구조에 의거한 새로운 항염제의 개발에 상당한 기여를 할 수 있을 것으로 생각한다. 현재까지의 docking program은 거대분자의 구조의 변화는 없는 것으로 가정하고 단지 수소결합이 가능한 곳만 회전할 수 있도록 하고 ligand는 회전이 가능한 모든 결합을 회전시킬 수 있도록 한 것이다. 그러나 이는 생체 내에서의 조건과는 대단히 차이가 있다. 그러므로 이들을 사용하여 얻은 본 연구의 결과도 정량적이 아니고 정성적 해석임을 밝혀둔다.

실험방법

Docking Program은 Autodock,¹⁶⁻²⁵⁾ Dock, Dokvision,²⁶⁾ 그리고 GOLD^{27,28)}가 사용되었다. GOLD 프로그램은 다른 프로그램과 달리 protein과 ligand의 수소원자 전체를 계산에 포함시키고 있어 수소결합 형태를 잘 볼 수 있고, 사용방법이 타 프로그램에 비해 편리한 장점이 있다. GOLD의 결과를 VMD,²⁹⁻³²⁾

Table 1 - Structure Data for Compound 1-19



Compd	R1	R2	R3
1	H	H	H
2	H	SCN	H
3	H	SMe	H
4	H	Br	H
5	H	COCF ₃	H
6	H	I	H
7	H	SO ₂ Me	H
8	H	Cl	H
9	H	Br	H
10	Me	CN	H
11	H	NO ₂	H
12	H	I	I
13	H	Br	Cl
14	H	Cl	Cl
15	H	Cl	Br
16	COMe	Br	H
17	Me	Cl	Cl
18	Me	Cl	Cl
19	Me	H	H

Sybyl³³⁾로 그림화 하였다.

GOLD 시험조건은 다음과 같다.

GA configuration :

No. of islands	5
Population size	100
Selection pressure	1.1
Flood fill radius	12
Flood fill origin	8037(COX-1) 8048(COX-2)
Cross weight	95
Mutate weight	95
Migration weight	10
Niche size	2

기타 다른 실험 조건은 생략한다.

4,5-diarylpyrroles은 Wilkerson⁹⁾의 data 19개를 사용하였다(Table 1).

실험결과 및 고찰

COX-1과 COX-2의 active site에서의 구조적 상이점은 COX-1의 Ile434, Ile523, His513이 COX-2의 Val434, Val523, Arg513에 해당한다(여기서는 COX-1과 COX-2의 잔기의 서열번호를 맞추었다. 위의 COX-2의 잔기번호에 12를 뺀 것이 COX-2의 원래 잔기의 서열번호이다).

본 실험에서는 ligand가 결합한 것과 결합하지 않은 COX-1, COX-2¹²⁻¹⁵⁾에 약물을 docking시켰다. 그 이유는 ligand가 결합한 것과 결합하지 않은 것의 active site에서의 conformation 차이가 있을 것으로 생각되기 때문이다. COX-1과 COX-2의 active site에 용매가 접근가능한 곳을 GOLD프로그램^{27,28)}을 이용하여 계산하고, 그 결과를 active site에 있는 중요한 잔기와 함께 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1a, b에서 보면 COX-1의 경우는 그림상으로는 차이가 많아 보이지만 실제로는 거의 없다. Fig. 1c, d에서 보면 COX-2의 경우는 그렇지 않다. 그 이유는 COX-1에 결합된 것은 분자 크기가 작은 살리칠 산이고 COX-2에 결합한 것은 Sc-558¹⁵⁾로서 매우 큰 것이다. COX-2의 경우는 큰 ligand가 Val523의 위치를 밖으로 밀어내어 그 결과 channel의 공간이 더 커진 것으로 생각된다.

Active site의 전체 크기를 살펴보면 COX-2가 COX-1보다 더 크다. 그 주된 이유는 COX-1의 Ile523이 COX-2에서는 Val^{14,10)}로 되어 있기 때문^{14,10)}에 그렇다. 이

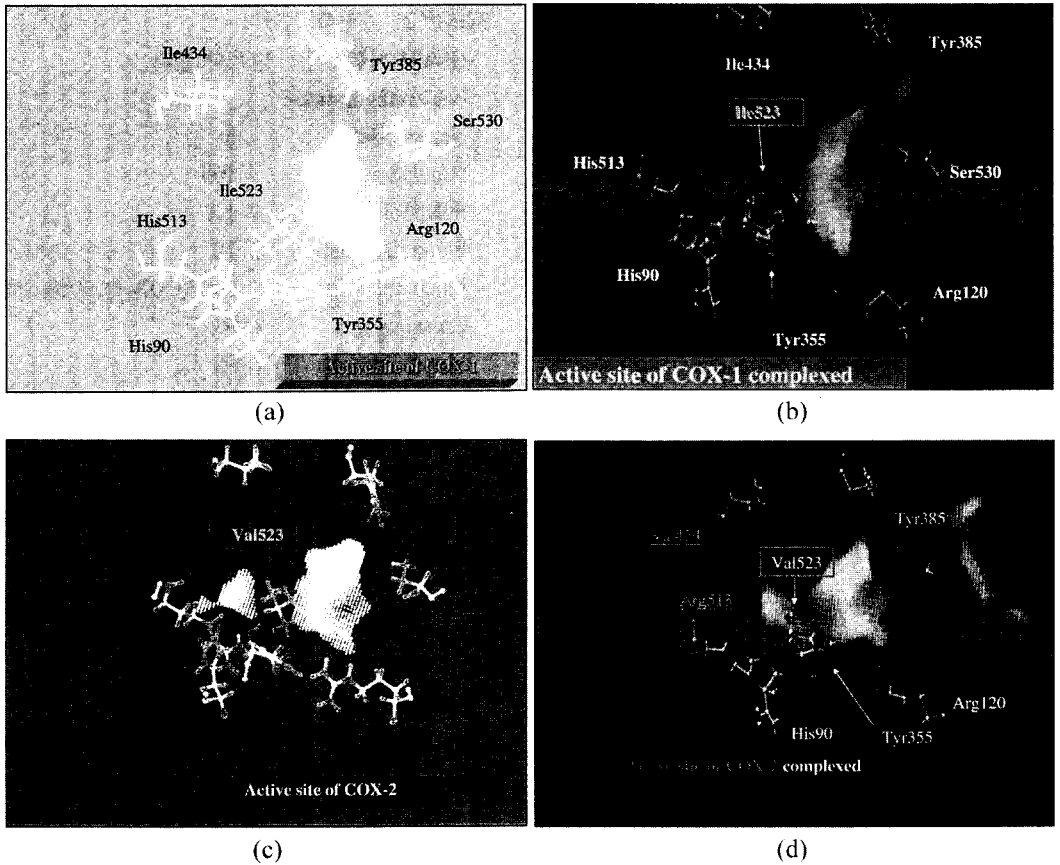


Fig. 1 – (a)-(d)-COX's active site and solvent accessible regions.

로 인하여 COX-2 경우는 side pocket이 있는 것을 그림에서 알 수 있다. 이 COX-2의 side pocket의 존재가 저해제 개발에 이용되어 sulfonyl기를 가진 선택적 저해제가 개발되어 임상실험 단계에 있다.¹⁴⁾

지금까지 알려진 중요 잔기는 Arg120, Tyr385, 그리고 Ser530이다. Aspirin은 Ser530의 -OH기에 acetylation하므로 항염작용을 나타낸다는 것은 잘 알려진 사실이다.^{34,35)}

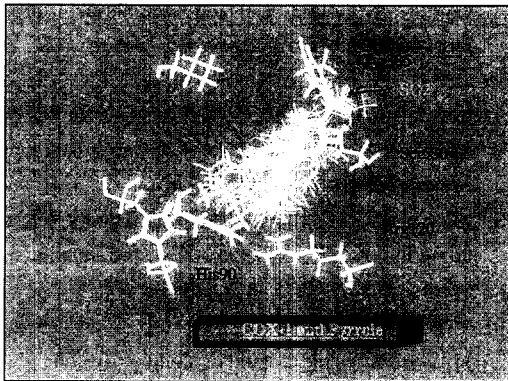
최근에는 COX-2에 선택적으로 acetylation하는 물질도 알려져 있다. Tyr385는 효소작용시 tyrosyl 기로 변환하고 arachidonic acid의 산화에 관여하는 것으로 알려져 있다.³⁶⁻³⁹⁾

4,5-Diarylpyrroles 19개를 ligand가 결합하지 않은 COX-1과 COX-2에 docking한 결과를 Fig. 2에 도시하였다. Ligand가 결합한 COX-1과 COX-2에 docking한 결과도 이와 유사 하였다. 그림에서 보는 바와 같이 COX-1의 경우에는 sulfonyl기가 모두

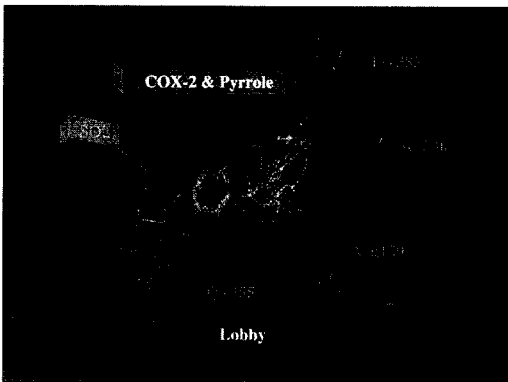
Tyr385쪽에 위치하고 있다. 그러나 COX-2의 경우는 거의 모두가 His90쪽(COX-1에서는 His513, COX-2에서는 Arg513)에 위치하고 있는 것이 특기할 만한 점이다. 즉 COX-1과 COX-2에서 pyrroles의 docking mode가 다르다는 것이다.

이 이유는 COX-1의 Ile523과 COX-2의 Val523의 side chain의 크기가 다른 점과 그리고 COX-1의 His513과 COX-2의 Arg513의 차이로 인한 것이라고 생각된다. 가장 두드러진 특징은 COX-1의 경우 Arg120쪽과 Tyr385쪽이 중요 docking 장소인데 반하여 COX-2는 이들 쪽에다 His90 쪽도 중요한 곳으로 생각한다. 여기서 pyrrole의 R2에 -COOH가 도입되면 COX-2의 선택성이 더 있다고 한다. 이 기가 양전하를 띠는 Arg120쪽으로 위치하게 될 것이라고 생각되기 때문이다(Fig. 3).

COX-1과 COX-2의 active site에서 수소결합을 할 수 있는 위치가 COX-2가 더 많이 있음을 알 수 있



(a)



(b)

Fig. 2 - (a)-(b)-Docking mode of Pyrroles into COX-1 and COX-2.

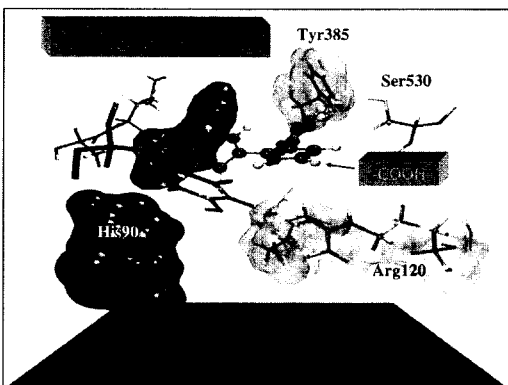


Fig. 3 - Docking mode of Pyrroles into COX-2.

었다. 이 사실은 COX-2 선택성 저해제 개발에 한 수 단으로 사용할 수 있을 것이다.

이 효소의 반응속도론적 분석에 의하면 많은 항염증제는 적어도 이 단계 반응 메커니즘을 거치고 또 그 속도가 느리고 효소와 단단하게 결합한다고 한다. 첫

단계는 빠른 가역반응으로 활성 착물이 생성되고 경쟁적 저해작용을 일으킨다. 그 다음 단계는 이 착물이 시간 의존적으로 단단한 다른 착물로 변환한다고 한다. COX-2에 선택성을 가진 거의 대부분의 저해제는 실제로 COX-1과 COX-2 모두에 경쟁적 저해제이지만 이 시간 의존성 단계에서 COX-2의 선택성을 나타내고, 이 효소의 형태(conformation)의 변화를 초래한다고 한다.⁴⁰⁻⁴¹⁾ 본 실험에서 얻은 docking mode가 두 단계 중 어느 것을 표현하고 있는가를 지금으로는 알 수 없다.

결 론

4,5-diarylpyrroles를 docking한 결과를 종합한 것으로부터 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 1) 설폰닐기가 COX-2에서는 Arg513쪽으로 위치하고 있고, COX-1에서는 Tyr385쪽에 위치하고 있다.
- 2) 용매가 접근 가능한 공간의 계산결과로 거리를 측정하였을 때 Arg120에서 Tyr385까지는 12 Å, Tyr385에서 His90까지는 10 Å, 그리고 Arg120에서 His90쪽(Arg513)까지는 8 Å 정도의 약물이어야 한다. 4,5-diarylpyrroles은 이러한 조건을 만족하고 있다.

감사의 말씀

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Abramson, S. R., and Weissmann, G. : The mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Athritus Rheum.* **32**, 1 (1989).
- 2) Smith, W. L. : Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* **268**, F181 (1992).
- 3) Laneuville H. R. Breuer D. K., DeWitt D. L., Hla T., Funk C. D., and Smith W. L. : Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and 2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 927 (1994).
- 4) Gans, K. R., Galbraith, W., Roman R. J., Haber, S. B., Kerr, J. S., Schmidt, W. K., Smith, C., Hewes, W. E. and Ackerman, N. R. : *Antiinflammatory and Safety*

- Profile of PuP697, a Novel Orally Prostaglandin Synthesis Inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**, 180 (1990).
- 5) Meade, E. A., Smith, W. L., and DeWitt, D. L. : Differential inhibition of prostaglandin endo peroxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal antiinflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* **268**, 6610 (1993).
 - 6) Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J., and Vane, J. R. : Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 11693 (1993).
 - 7) Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C., Siebert, K. : Selective Inhibition of Inducible Cyclooxygenase 2 In vivo is An tiinflammatory and Nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3228 (1994).
 - 8) O'Neill, G. P., Mancini, J. A., Kargman, S., Yergey, J., Kwan, M. Y., Falguyret, J. P., Abramvitz, M., Kennedy, B. P., Ouellet, M., Cromlish, W., Culp, S., Evans, J. F., Ford-Hutchinson, A. W., and Vickers, P. J. : Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccine: inhibition by nonsteroidal antiinflammatory drugs and bio synthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Mol. Pharmacol.* **45**, 245 (1994).
 - 9) Wilkerson W. W., Copeland R. A., Covington M., and Trzaskos J. M. : Antiinflammatory 4, 5-Diarylpyrroles. 2. Activity as a Function of Cyclooxygenase-2 Inhibition. *J. Med. Chem.* **38**, 3895 (1995).
 - 10) Kalgutkar A.S., Crews B. C., Rowlinson S .W., Garner C., Seibert K., Marnett L. J. : Aspirin-like Molecules that Covalently Inactivate Cyclooxygenase-2. *Science* **280**, 1268 (1998).
 - 11) Marnett L. J. and Kalgutkar A. S. : Design of selective inhibitors of cyclooxygenase-2 as nonulcerogenic anti-inflammatory agents. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**, 482 (1998).
 - 12) Loll, P. J., Picot, D. and Garavito, R. M. : The Structure basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 637 (1995).
 - 13) Loll, P. J., Picot, D. and Garavito, R. M. : The X-ray crystal structure of the membrane protein prostglandin H₂ synthase-1. *Nature* **367**, 243 (1994).
 - 14) Kurumbail, R. G. *et al.* : Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**, 644 (1996).
 - 15) Kurumbail, R. G. *et al.* : Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, **385**, 555 (1997).
 - 16) Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huly, R. and Olson, A. J. : Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4 *J. Computer-Aided Molecular Design* **10**, 293 (1996).
 - 17) Goodsell, D. S., Morris, G. M. and Olson, A. J. : Docking of Flexible Ligands: Applications of AutoDock. *J. Mol. Recognitio* **9**, 1 (1996).
 - 18) Goodsell, D. S. and Olson, A. J. : Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing. *Proteins: Str. Func. and Genet.* **8**, 195 (1990).
 - 19) Couthino, P. M., Dowd, M. K. and Reilly, P. J. : Automated Docking of Monosaccharide Substrates and Analogues and Melhyl alpha-Acarviosinide in the Glucoamylase Active Site. *Proteins: Str. Func.and Genet.* **27**, 235 (1997).
 - 20) Neurath, A. R., Jiang, S., Strick, K. L., Li, Y.-Y., and Debnath, A. K. : Bovine beta-lactoglobulin modified by 3-hydroxyphthalic anhydride blocks the CD4 cell receptor for HIV. *Nature Medicine* **2**, 230 (1996).
 - 21) Sotriffer, C. A., Liedl, K. R., Winger, R. H., Gamper, A. M., Kroemer, R.T., Linthicum, D. S., Rode, B.-M. and Varga, J. M. : Heteroligation of a mouse monoclonal IgE antibody (La2) with small molecules, analysed by computer-aided automated docking. *Molecular Immunology* **3**, 129 (1996).
 - 22) Zhang, T. and Koshland, D. E. : Modeling substrate binding in Thermus thermophilus isopropylmalate dehydrogenase. *Protein Science* **4**, 84 (1995).
 - 23) Friedman, A. R., Roberts, V. A. and Tainer, J. A. : Predicting molecular interactions and inducible complementarity: fragment docking of Fab-peptide complexes. *Proteins: Str. Func. and Genet.* **20**, 15 (1994).
 - 24) Goodsell, D. S., Lauble, H., Stout, C. D. and Olson, A. J. : Automated Docking in Crystallography: Analysis of the Substrates of Aconitase. *Proteins: Str.*

- Func. and Genet.* **17**, 1 (1993).
- 25) Stoddard, B. L. and Koshland, D. E. : Prediction of a receptor protein complex using a binary docking method. *Nature* **358**, 774 (1992).
- 26) Hart N. N. and Ness S. R. : Dockvision 1.0.2. <http://dockvision.com/developers> (1998).
- 27) Johnes, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach A. R. L. and Taylor R. : Development and validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **267**, 727 (1997).
- 28) Johnes, G., Willett, P. and Glen, R. C. : Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *J. Mol. Biol.* **245**, 43 (1995).
- 29) William F. Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. : VMD-Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **14**, 33 (1996).
- 30) Mark Nelson, William Humphrey, Attila Gursoy, Andrew Dalke, Laxmikant Kal, Robert D. Skeel, and Klaus Schulten. : NAMD-A parallel, object-oriented molecular dynamics program. *International Journal of Super-computing Applications and High Performance Computing*, **10**, 251 (1996).
- 31) Mark Nelson, William Humphrey, Attila Gursoy, Andrew Dalke, Laxmikant Kal, Robert Skeel, Klaus Schulten, and Richard Kuftrin. MDScope-a visual computing environment for structural biology. In S. N. Atluri, G. Yagawa, and T. A. Cr use, editors, *Computational Mechanics* **95**, 1, 476 (1995).
- 32) John A. Board, Jr., Laxmikant V. Kal, Klaus Schulten, Robert D. Skeel, and Tamar Schlick. : Modeling biomolecules: Larger scales, longer durations. *IEEE Computational Science & Engineering, Winter*, 19 (1994).
- 33) Sybyl. Tripos, Inc. 1699 South Hanley Road St. Louis MO 3144-2913. <http://www.tripos.com/developers> (1998).
- 34) Roth G. J., Stanford N., and Majerus P. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 3073 (1975).
- 35) Vane J. R. *Nature New Biol.* **231**, 232 (1971).
- 36) Karthein R., Dietz R., Nastainczyk W., Ruf H. H. : Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzyme during the peroxidase reaction. *Eur. J. Biochem.* **171**, 313 (1988).
- 37) DeGray J. A., Lassmann G., Curtis J. F., Kennedy T. A., Marnett L. J., Eling T.E. and Mason R. P. : Spectral analysis of the protein-derived tyrosyl radicals from prostaglandin H synthase. *J. Biol. Chem.* **1267**, 23583 (1992).
- 38) Tsai A.L., Palmer G., Xiao G., Swinney D. C., and Kulmacz R. J. : Structural characterization of arachidonyl radicals formed by prostaglandin H synthase-2 and prostaglandin H synthase-1 reconstituted with mangano protoporphyrin IX. *J. Biol. Chem.* **1273**, 3888 (1998).
- 39) Goodwin D.C., Gunther M. H., Hsi L. H., Crews B. C., Eling T. E., Mason R. P., Marnett L. J. : Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover : Detection of the radical derivatives of tyrosine 385. *J. Biol. Chem.* **1273**, 8903 (1998).
- 40) Rome L. H. and Lands W. E. M. : Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by inflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 4863 (1975)
- 41) Copeland R. A., Williams J. M., Giannaras J., Nurnberg S., Covington M., Pinto D., Pick S., Trzaskos J. M. : Mechanism of selective inhibition of isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11202 (1994).
- 42) Luong C, and Miller A., Barnett J., Chow J., Ramasha C., Browner M. F. : Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Natl. Struct. Biol.* **3**, 927 (1996).