

사이클로옥시게나제의 작용부위 모델

김양배[†] · 정우태* · 박일영*

서울대학교 약학대학, *충북대학교 약학대학

(1996년 1월 31일 접수)

A Model for the Active Site of Cyclooxygenase

Yang Bae Kim[†], Uoo Tae Chung* and Il Yeong Park*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742

*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received January 31, 1996)

The active site of cyclooxygenase was modeled by complementary receptor-cavity mapping procedure using 3D structures of the non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs). A total of 50 NSAIDs were chosen as data ligands which compete the same site on the enzyme. Partial atomic charges were estimated, and the energetic differences for various conformations were calculated so as to meet the need for a most efficient overlapping of the probably-equivalent functional groups of the ligand molecules. The structure activity relationships of the NSAIDs, if available, were fully considered throughout the modeling. The overall shape of the model obtained is similar to a boot-without-bottom. Most of inner surface of the cavity appeared as hydrophobic; two polar counterparts except the carboxyl-binding position were found. By this model, some clear explanations could be given on the experimental observations which were not satisfiably understood yet.

Keywords—Receptor modeling, Cyclooxygenase, Antiinflammatory drugs, 3D-structure

비스테로이드성 소염진통제(non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)는 prostaglandin의 생합성의 초기단계, 즉 arachidonic acid에 산소분자를 첨가하여 고리화하는 과정을 억제하여 여러가지 염증증상을 완화시키는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁷⁾ 이 과정의 관여효소를 cyclooxygenase (EC 1.14.99.1)라 하며, 이 효소는 72000 정도의 분자량을 가진 단백질 두개로 구성된 중합체이다.⁸⁾

많은 연구자들이 NSAIDs의 작용양식을 밝혀보고자 연구해왔으나, 이들의 화학구조와 생리효과가 매우 다양하여 아직 불확실한 부분들이 많다. 대체적으로 이 물질들은 효소의 작용부위, 즉 기질인 arachidonic acid가 결합하는 위치에 상경하는 것으로 생각되고 있으나,⁹⁾ 일부 물질의 경우에는 작용위치가 다를 가능성을 있음을 시사하는 보고도 있다.^{10,11)} 대부분의 NSAIDs가 cyclooxygenase에 대하여 상경적 길항을 하는 것으로 밝혀진 데 비하여, 어떤 물질은 억제

초기단계에서는 상경적 길항을 하다가, 시간이 지남에 따라 비상경적이 되는 것도 발견되었으며,¹²⁾ 아스피린의 경우에는 아에 효소에 아세틸기를 옮겨붙여주는 (transacetylation) 효과도 있음이 밝혀져 있다.¹³⁾ NSAIDs들은 매우 소수성이며, 대부분 carboxyl group을 가지고 있는 산성물질인데, 어떤 종류는 그렇지 않은 산성물질인 경우도 있으며, 한편 산성이 아닌 소염제도 있다.

하지만, 연구결과들을 종합하면, 비상경적으로 되는 물질들도 반응 후에 전혀 변화되지 않은 상태(intact molecule)로 회수할 수 있었으며,¹²⁾ 두번째의 결합위치가 있는 것으로 생각되는 물질들 역시 효소의 작용부위, 즉 arachidonic acid가 결합하는 위치와 두번째의 결합 위치에 모두 결합할 수 있으나, 작용부위에 상경하는 것이 그 약물의 억제효과에 더욱 중요한 것으로 생각되는 결과들을 얻을 수 있었다.¹¹⁾ aspirin은 양쪽의 부위에 모두 결합할 수 있는 것으로 생각된다. 결국 NSAIDs

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

중에서 가장 많은 수를 차지하는, carboxyl group을 가진 물질들은 cyclooxygenase의 작용부위-기질의 결합 부위에 상경합을 주요 작용양식으로 보는 것이 현재까지의 보편적 결론이라고 말할 수 있다.

어떤 약물군이 한 가지 수용체의 같은 위치에 작용한다면, 그 약물군은 그 위치에 결합할 수 있는 특정구조를 공통적으로 가지고 있어야 하며, 또한 이러한 개개 분자의 구조들에는 그 수용체의 작용부위의 구조에 대한 정보가 들어있다고 할 수 있다. 이러한 점을 기초로 한, cyclooxygenase의 작용부위의 구조에 대한 몇가지의 추정모델이 제안되어 있다.

이들 중 가장 그럴듯한 것은 Shen 등이 제안한 것으로,⁹⁾ 이는 indomethacin의 구조를 바탕으로 하여 두 개의 평면부위가 서로 약간의 각도를 가지고 비스듬히 존재하는 형태의 구조이다. 그러나 이 모델은 NSAIDs 중 arylacetates만을 기초로 하였기 때문에, 같은 위치에 결합하는 것으로 생각되나 acetyl group 대신 방향성환에 carboxyl group이 직접 결합되어 있는 fenamate와 salicylate에는 적용되기가 어렵다. 또한 Appleton 등은 고려되 되기 직전의 기질의 과산화물의 분자구조를 바탕으로, 약물의 carboxyl group이 이 과산화물의 산소위치에 상경하리라 생각하여 모델을 제안하였는데,¹⁴⁾ 이는 효소에 기질, 또는 억제약물이 결합하기 전에 산소분자가 이미 효소의 작용부위에 준비되어 있을 것이라는 점과, 과산화물이 된 후에는 기질의 소수성 및 효소와의 친화성이 급격히 감소함으로써 생성물의 분리가 이루어질 것으로 생각되는 점에서 그다지 공감미 가지 않는다. 제안된 다른 모델중의 하나는 carboxylic acid류가 아닌 piroxicam의 구조를 기본으로 모든 NSAID류가 결합할 수 있는 형태를 유도한 것으로,¹⁵⁾ 이는 모델이 너무 크고 결합의 자유도가 너무 높다.

위와 같은 모델들을 다스간에 이용하여 새로운 NSAID의 개발에 성공한 사례들도 보고되어 있다. 그러나, 위의 모델들은 모두 효소의 작용부위를 약물의 한쪽면과의 상호작용만으로 고려한 평면적 구조(area)로 생각하고 있다. NSAID들은 매우 소수성이 큰 물질들이며, 또한 그 효소의 기질은 지방산이라는 점을 고려하여 볼 때, 효소의 결합부위는 매우 소수성일 수 밖에 없을 것이다. 일반적으로 세포액과 접하고 있는 단백질의 표면은 비교적 친수성인 그룹들로 이루어져 있고, 소수성의 부분들은 단백질의 내부에 존재하는 것으로 알려져 있다. 결국 NSAIDs의 작용부위

는, 효소의 표면이 아닌, 표면 안쪽의 소수성의 영역 내부에 있을 것이라고 추정되며 이는 당연히 어떤 공간의 형태(cavity)로 생각하여야 할 것이다.

수용체의 상부구조를 추정하기 위해서 보통 많은 연구자들이 molecular mechanical 또는 quantum mechanical approximation 등을 대표적인 기법으로 사용하고 있으며, 구조적 자료로서 화합물의 결정구조나, molecular mechanics로 추정한 energy-minimized structure를 그 화합물의 active conformation, 즉 수용체에 결합된 상태의 conformation으로 가정하는 경우가 대부분이다.¹⁶⁾ 그러나 어떤분자의 conformation은, 그 분자가 존재하고 있는 현재 그 주위환경(microenvironment)의 물리화학적 성질의 함수이기 때문에, 수용체의 결합공간환경을 정확히 알고 재현할 수 없는 이상, X-선 회절분석의 결과(주위가 동종의 분자인 고체상태의 구조)는 물론, 분자역학적 또는 양자역학적으로 추정한 에너지 최소화 구조(기체 또는 액체상태일 때의 근사) 역시 그 약효물질의 active conformation이라 할 수 없음은 자명하다. 따라서, 이러한 기법들은 매우 유용하기는 하지만, active conformation를 직접 도출해내는 도구로서가 아니라, 너무 conformation energy가 높아 실질적으로 가능하지 않은 형태를 걸러내는 제한적 범위의 도구로서 사용되는 것이 더 과학적이라 생각된다.

꼭 맞는 열쇠가 옆에 있다고 해서 자물쇠가 저절로 열리지는 않는다. 화합물이 수용체에 결합하기 위해서는 이들간의 인력이 필요하며, 이러한 인력의 본질은 London force를 포함, 현재까지 알려진 바로는 정전기적 인력일 것이다. 최근 Andrew 등이 약물-수용체 상호작용에 각 원자(단)이 기여하는 정도를 회귀분석한 결과에 의하면,¹⁷⁾ 극성이 큰 원자(단)일수록 결합에 기여하는 정도가 큰 것으로 계산되었다. 즉 어떤 약물분자의 개개의 원자(단)이 그 약물의 활성에 기여하는 정도는 서로 같지 않으며, 극성이 높은 원자(단)일수록 결합에 더욱 중요한 역할을 하는 것으로 볼 수 있을 것이다.

이러한 생각들을 기초로 하여, NSAIDs 류의 입체적인 구조를 비교검토함으로써, 상보적인 수용체의 구조에 대한 보다 사실에 가까운 공간구조를 추론하여 보고자 시도하였다. 같은 효소의 같은 위치에 상경하는 물질들은, 결합공간(cavity)의 같은 위치에 비슷한 성질을 갖는 원자(단)이 결합할 것이므로, 원자(단)의 화학적 특성은 물론, 공간적 배향형태와 점유위치 및

적용가능한 potential field 등의 물리적 특성을 부가하여 생각하는 것이 더욱 중요하리라고 판단된다. 이들은 기질의 분자용적을 크게 초과하지 않는 범위내에서 비슷한 물리화학적 특성을 가진 치환기끼리 서로 잘 중첩될 수 있어야 하며, 많은 수의 활성물질들이 겹쳐진 형태의 외형은 수용체의 결합공간의 상보적인 구조를 보여주는 결과가 될 것이다.

본 연구에는 다음과 같은 2 가지의 가정이 전제되어 있다.

1. 본 연구에 구조적 자료로서 사용된 50종의 약물은 모두 cyclooxygenase의 공통부 위에 결합할 수 있다.

2. 극성이 큰 원자(단)일수록 결합에 더 크게 기여한다.

약물분자들의 시작구조 (initial structure)는 X-선 회절분석의 결과를 이용하거나, 보고되지 않은 경우에는 분자역학적 접근법에 의하여 추정하였다. 전 추론과정에 걸쳐서 구조-활성 상관관계의 연구보고들을 우선적으로 고려하여 중첩배향의 가능성을 검진하였고, 회전가능한 결합들을 이용, conformation을 변화시켜 가면서 개개의 분자들이, 특히 극성이 큰 원자단에 관하여 가장 잘 중첩될 수 있는 배향을 추정하였다. conformation 변화에 따른 자유에너지 변화를 병행계산하여 가능한 한 안정한 형태를 취하였으며, 설정된 값 이상을 넘어가는 형태는 고려대상에서 제외하였다.

실험방법

자료약물의 입체구조의 산정 및 conformation 분석)

NSAIDs의 구조적 특징 및 재분류—대부분의 NSAIDs류는 2~3개의 방향족 환에 carboxyl group 또는 에놀성 산성기들이 치환되어 있는 형태이며, pKa가 약 3~6의 범위의 값을 가지는 산성물질이다. 이들의 분자량은 대개 250~350의 범주에 들며, 물에는 녹기어렵다(slightly soluble). 이 약물들은 대체로 흡수가 잘 되며, 95% 이상이 혈청단백과 결합하는 것으로 보고되어 있다.¹³⁾

많은 수의 활성물질들 중에서 임상적으로 비교적 많이 사용되어 오고 있으며, 분자의 크기가 큰 물질을 우선적으로, cyclooxygenase에의 상경위치가 동일하다고 추정되는, 전체를 대표할 수 있는 50개의 화합물을 선정하고 이를 자료군으로 하였다. NSAIDs들 중에서

carboxyl group이 있는 물질들만 자료군으로 사용하였고, carboxyl group이 없는 에놀성 물질이나 비산성 물질들은 상경위치의 동일성이 불명확하여 자료군에서 제외하였다. NSAIDs는 관용적으로 분류해오던 분류 체계가 있으나, 본 연구에서는 공간구조와 물리적 특성의 유사점에 대한 논리적 추론을 쉽게하기 위해서 이들물질들의 carboxyl group의 위치를 기준으로 phenyl 등의 큰 소수성 치환기의 위치를 편의상 PARA, META 및 ORTHO 위치군 등으로 명명하여 크게 6개의 그룹으로 재분류하였고, 또 각 그룹에서 치환기의 특성을 고려하여 각 그룹당 2~3 종류의 소그룹으로 나누어서 생각하였다(Table I).

각 분자들의 입체구조의 산정 및 conformation 분석—분자의 입체적인 구조를 다루는 유용한 프로그램들이 많이 나와 있으며,¹⁸⁾ 이들은 대체로 분자역학 또는 양자역학적인 방법들을 이용하고 있다. 먼저 각 분자중 수용체에의 결합에서 중요한 역할을 하는 원자(단)을 알아보기 위하여 CONBIO 프로그램¹⁹⁾에 내재되어 있는 CNDO/2(ON)²⁰⁻²²⁾를 이용하여 각 원자의 부분전하를 계산하였다. 계산된 결과들은 대체로 전술한 Andrew 등의 회귀분석의 결과로부터¹⁷⁾ 추정되는 경향과 일치하였다. 추후로 각화합물에 있어서의 각 원자(단)의 중요성은 이와같이 계산된 극성의 정도와 구조활성 상관관계의 보고들에 준해서 결정하여 이들의 효과적인 중첩을 우선적으로 고려하였다. 계산상의 편의를 위해서 carboxylic acid 는 해리되지 않은 산의 형태로 계산하였으나, 이들의 해리상수를 고려해 볼 때, 체액에서 이들은 상당분율이 해리되어 이온으로 존재하리라 생각된다. 이렇게 해리되었을 경우는 실제 전하를 가지게되므로 당연히 결합에 더욱 크게 기여할 것이라고 추측할 수 있다.

회전가능한 단일결합들을 회전시켜 가면서 중첩의 가능성을 검진하기 위하여 회전자유에너지 변화를 분자역학적인 방법을 이용한 software인 PCMODEL²³⁾ 과 HyperChem²⁴⁾, CONBIO¹⁹⁾ 등을 이용하여 계산하였다. 만일 어떤 화합물이 수용체에 맞는 형태로 변화되기 위해서 소요되는 회전자유에너지 증가가, 그 화합물이 수용체에 결합함으로써 유리될 수 있는 값을 초과할 경우에는 당연히 그 화합물은 결합에 실패할 것이며, 활성이 있을 수 없다. 대체적으로 약물의 결합에너지는 약 10~15 kcal/mol로 추정되고 있음과¹⁷⁾ 각 program 들이 내포하는 오차의 범위를 감안하여, 이들로 계산하였을 때 가장 안정한 형태에 비해서 10 kcal/mol 이상의

Table I—*Drugs Used as Data and Re-classification of the NSAIDs.*

1. Compounds with the PARA-site substituents to acetate		
1) PARA-direct-Aromatic compounds(PADARs)		
Fenbufen	Flurbiprofen	Pirprofen
Miroprofen	Indoprofen	Xenbucin
2) PARA-direct-Not-Aromatic compounds(PADNAs)		
Alclofenac	Alminoprofen	Clidanac
Fenclorac	Ibuprofen	
3) PARA-bridged-Substitution PABRSs)		
Ketorolac	Loxoprofen	Suprofen
2. Compounds with META-site substituents to acetate		
1) META-direct-Aromatic compounds(MEDARs)		
Clopirac	Fenclozic	acid
2) META-bridged-Aromatic compounds(MEBRAs)		
Amfenac	Fenoprofen	Ketoprofen
Tiaprofenic acid		Tolmetin
3. Compounds with linked META and PARA-site substituents		
1) META-PARA-linked-3Ring compounds(MPL3Rs)		
Carprofen	Metiazinic acid	Pranoprofen
Protizinic acid		
2) META-PARA-linked-3Ring-7Membered compounds(MPL7Ms)		
Isoxepac	Oxepinac	Tiopinac
3) META-PARA-linked-2Ring compounds(MPL2Rs)		
Naproxen	Benoxaprofen	
4. Compounds with ORTO-site substituents		
1) ORTHO-bridged-Aromatic compounds(ORBRAs)		
Diclofenac	Fenclofenac	
2) ORTHO-META-Disubstituted compounds(ORMDSs)		
Fentiazac	Lonazolac	
5. Compounds with linked ORTHO and META-site substituents		
1) ORTHO-META-linked-3Ring compounds(OML3Rs)		
Etodolac	Pemedolac	Prodolic acid
2) ORTHO-META-linked-Indoleacetates(OMLINs)		
Cinmetacin	Indomethacin	Clometacin
Sulindac		
6. Compounds without acetates but direct carboxyl group		
1) Direct-Carboxyl Fenamates(DCFENs)		
Floctafenine	Flunixin	Enfenamic acid
Meclofenamic acid		Mefenamic acid
Niflumic acid		Tolfenamic acid
2) Direct-Carboxyl Salicylates(DCSALs)		
Diflunisal	Fendosal	

conformation 에너지를 수반하는 구조는, 중첩에 더 유리해도 받아들일 수 없는 구조로 생각하여 고려대상에서 제외하였다.

개개분자의 중첩의 방향-Active Conformation의 추론

Carboxyl group의 배향—Carboxyl group은 각 약물들과 기질인 arachidonic acid에 공통이라는 점에서, 또한 CNDO/2(ON)으로 계산한 부분전하가 가장 큰 원자(단)이며 Andrew 등이 계산한 결과에서도 아주 큰 기여도를 갖는다는 점에서, 이 계열분자들의 원자(단)

중 가장 중요한 부분으로 생각할 수 있다. 대체적으로 NSAIDs에는 방향족환에이 carboxyl group이 acetic acid 나 propionic acid의 형태로 치환되어 있다. 방향족환은 대표적인 phenyl에서 볼 수 있는 것과 같이 폭(나비)이 약 7 Å, 두께는 약 3 Å 정도 되는 구조로 되어있다(CPK model). 따라서 효소의 작용공간이 매우 넓어 이 방향족환이 자유로 회전할 수 있는 경우가 아니라면, 이 방향족환의 위치와 carboxyl group의 상호배향이 매우 중요한 인자가 될 수 있을 것이다.

Arylacetate에서 acetate에의 α -탄소와의 치환은

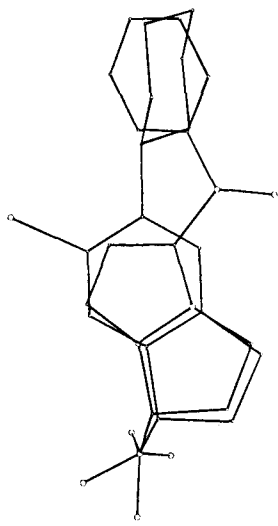


Figure 1—A possible overlapping feature of clidanac and ketorolac aligned for most efficient overlap. A projection from a viewpoint with regard to the central ring was drawn at the left side, and its another projection after 90° rotation of the whole structure was drawn at the right side of the figure for the ease of understanding. All the remaining figures were produced by the same method.

이 물질들의 활성에 매우 중요한 영향을 미치며, S (+)-이성체들이 활성을 나타내는 것이 밝혀져 있다.²⁵⁾ 다행스럽게도 이러한 물질군 중에서 α-탄소에 치환된 부분이 다시 cyclization에 의해 그 위치가 고정된 물질이 두가지 있어, 그들의 결정구조에서 carboxyl group의 방향화에 대한 위치를 추정하였다. 즉 이들의 위치는 Fig. 1에서와 같이 방향화 평면으로부터 약 60°C정도 뒤쪽으로 회전되어 있는 것으로 clidanac²⁶⁾과 ketorolac²⁸⁻³¹⁾의 결정구조로부터 추론하였다. 이후 모든 화합물의 carboxyl group은 이와 같은 배향으로, carboxyl group 중 더 이상 자유도가 없는 탄소원자를 기준으로 삼아, 이를 가상적 공간의 원점으로 정의하여 추론을 진행하였다.

PARA 와 META 치환체들의 배향 및 극성 원자(단)의 위치—방향족환들은 앞, 뒷면으로 대칭적인 특성(2-fold symmetry)를 가지므로 각화합물들의 중첩에 있어 중앙평면 부분의 어느 방향을 선택할 것인지가 필요하다. 또한 carboxyl group을 기준으로 PARA 위치의 치환체가 다시 META 위치에 치환됨으로서 환을 형성하고 있는 물질들이 있었으므로, 이들의 구조로부터 PARA 치환체와 META 치환체들의 위치에 대한 정보를 얻을 수 있었다. Oxepinac^{32,33)}과 isox-

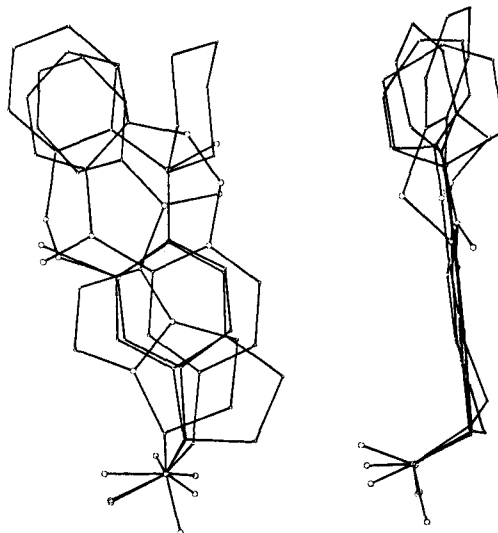


Figure 2—A (most probable) overlapping diagram of four compounds: clidanac, ketorolac, oxepinac, isoxenac (PARA, META group).

epac^{34,35)}의 구조로부터 두군데의 활성에 중요한 영향을 미치는 원자(단)이 각각 기준점인 carboxylic carbon 으로부터 약 7.0 Å과 5.5 Å 근처에 존재함을 알 수 있었고, 이들의 가장 가능성 높은 중첩의 모양은 Fig. 2의 형태로 추정할 수 있었다.

ORTHO 치환체들의 배향—ORTHO 치환체들은 PARA나 META 치환체들이 점유하는 공간에 효과적으로 중첩시키기가 어려웠으며, 이들이 결합하는 새로운 공간이 필요한 것으로 생각되었다. 또한 PARA 치환체와 ORTHO 치환체가 모두 있는 fentiazac^{2,36)}의 결정 구조로부터 이 물질의 PARA 치환체가 위에서 추정한 PARA 및 META 치환체들이 결합하는 공간을 점유할 경우, ORTHO 치환체가 점유할 수 있는 공간의 배향은 중앙환의 좌, 우 양쪽의 두가지 가능성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 비교적 최근에 개발된 약물인 etodolac³⁷⁻⁴⁰⁾의 결정구조로부터, 중앙환에 대하여 carboxyl group이 뒤쪽으로 배향하고 있는 현재의 추정 결과에 의하면, 이 화합물은 S-이성체로서 오직 오른쪽의 공간을 점유하는 경우 외에는 자유도가 없었다. 따라서 ORTHO 치환체들은 Fig. 3에 보인 것과 같이 중앙환의 오른쪽으로 배향하는 것으로 생각하였다.

Fenamates 와 Salicylates—이 화합물들은 앞의 arylacetate 류와 달리 방향족환에 carboxyl group이 직접(acetyl 형태로서가 아닌) 치환되어 있다. 이들은 clidanac 과 ketorolac 등의 α-methyl 부분이 고리화

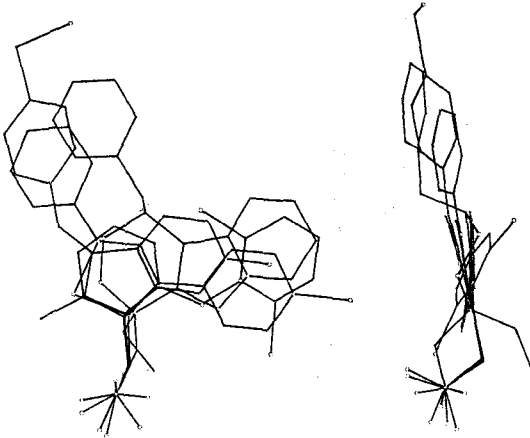


Figure 3—A (most probable) overlapping diagram of PARA, META and ORTHO substituted groups.

되어 있는 화합물에서의 고리 부분이 차지하는 위치에서 이 물질들의 방향환이 결합할 수 있으리라 생각하였으며, 현재까지 추정된 중첩의 형태를 고려하여, 크게 그 용적을 증가시키지 않는 범위에서 이들을 효과적으로 중첩시킬 수 있었다. 특히 다른 소염진통제들에 비하여 매우 거대한 구조를 가지고 있는 salicylate인 fendosal⁴¹⁾ 역시 효과적으로 중첩될 수 있음을 발견하였다.

치환체들의 뒤틀림허용범위

PARA 및 META 위치의 치환체의 경우—지금까지 언급된 각 화합물들의 치환체들은 큰 경우 방향족 환으로서, 이들이 자유로이 회전할 수 있는 정도의 공간이 효소내부의 활성부위에 존재하리라고는 생각하기 어렵다. 따라서 이들의 뒤틀림이 어느 정도의 회전범위까지 허용될 수 있는지를 알아보기 위해 회전이 제한되어 있는 물질들의 경우를 먼저 검색하고, 회전가능한 물질들의 회전 자유에너지 변화를 계산하여 봄으로서 그 범위를 추정하였다. Caprofen¹³⁾의 경우와 같이 중앙환과 거의 동일 평면에 위치하는 고정된 치환체를 가지고 있는 물질군으로부터 중앙환 동일평면의 연장선이 허용됨을 알 수 있었고, Tiopinac⁴²⁾의 경우로부터 중앙환과는 동일평면으로부터 앞 또는 뒤쪽으로 약 $\pm 35^\circ$ 정도 뒤틀려 있는 형태를 가질 수 있는 치환체가 허용됨을 발견할 수 있었다. 중앙평면의 앞 또는 뒤쪽의 2가지 가능성에 대해서는 loxoprofen⁴³⁻⁴⁵⁾의 활성대사체의 결정구조로부터, 이 대사체의 hydroxyl group 주변의 입체화학적 구조를 고려하여 볼 때, 이 hydroxyl oxygen이 위에서 추정된 극성 위치에 효

과적으로 중첩되기 위해서는 오직 뒤쪽의 배향만이 허용되는 것을 알 수 있었다. 치환체의 회전이 가능한 약물인 flurbiprofen, indoprofen, clinadac 등의 회전자유에너지 변화를 계산하여 본 바, 중앙환 평면에 대하여 0° 에서 35° 정도의 회전 위치에서는 모두 허용되는 범위내에 들게됨을 알 수 있었고, 결과적으로 PARA 및 META 치환체들은 중앙환 평면의 연장면으로부터 약 35° 정도의 회전범위까지 뒤쪽으로 뒤틀림이 허용됨을 추정할 수 있었다.

ORTHO 위치의 치환체의 경우—ORTHO 위치의 치환체들의 경우는 sulindac^{46,47)}에서와 같이 비교적 중앙환의 가까운 근처에서 중앙환의 연장면에 존재하는 회전 불가능한 치환체가 있음을 알 수 있었고, fen-tiazac의 경우에서와 같이 회전은 가능하나 결정구조 및 회전자유에너지에서 추정되는 것처럼 중앙 평면에서의 일치하는 부분에서 선호되는 구조가 있을 수 있었다. 그러나 Diclofenac^{48,49)}의 경우는 결정구조에서나, 회전자유에너지 계산에서나 모두 두 개의 chlorine으로 인한 steric repulsion 때문에 중앙환과 일치하는 평면에 존재할 수 없었으며 약 $30\sim 150^\circ$ 사이의 회전범위에 있는 conformation만이 가능한 것을 발견할 수 있었다. 한편 최근에 개발된 pemedolac⁵⁰⁾의 결정구조와 그 입체화학적 특성을 고려하여 볼 때, 이 물질의 PARA 위치의 치환환이, 추정된 구조의 PARA 위치에 중첩되기 위해서는, ORTHO 부분의 indole 평면은 중앙환과 거의 일치하거나 회전된다해도 (+) 방향으로(counterclock to imaginary x-axis) 회전되는 방법 이외에는 다른 선택이 없었다. 따라서 이 부분은 중앙환의 연장면으로부터 약 $0\sim 30^\circ$ 정도의 뒤틀림 허용범위를 갖는 것으로 생각되었다.

Carboxyl group 자체의 배향—Carboxyl group의 두 개의 산소는 역시 자체의 회전이 가능하다. 그러나 수용체 작용공간의 이들이 결합하는 위치는 어떤 배향이 있을 것이므로 이들의 배향을 찾아보고자 시도하였다. 하지만 각 물질의 회전자유에너지를 계산한 결과로서는 모든 물질이 약 $1\sim 4$ Kcal/mol의 범위의 에너지장벽을 갖는 것으로 계산되었으며, 이는 결국 회전자유에너지로서는 결합의 배향을 찾을 수 없다는 결론을 얻은 셈이다. 한편 중앙환에 대한 carboxyl group의 결합선의 방향이, 전체 자료군들에서 서로 다른 군들이 있었는데 etodolac의 그룹과, fenamate 및 salicylate의 방향이 서로 달랐다. 이를 고려하여 이들이 각각의 방향에서 각각 carboxyl group을 회전시켰을

경우의 최대 중첩위치를 찾아 이를 carboxyl group의 배향위치로 간주하였다. 그러나 이는 뚜렷한 정보물질이 없어, 중첩공간의 전체부피를 줄이고자 하는 의도로서(편의상) 선정되었다고 할 수 있다.

전 자료물질로의 중첩의 확대 및 중첩된 구조의 표면의 산정

전 자료물질의 중첩—위에서 추정 또는 결정된 치환체들의 점유허용범위를 기준으로 모든 자료물질의 가장 효과적인 중첩을 시도하였다. 먼저 점유허용범위, 특히 극성원자(단)의 중첩 허용위치를 우선적으로 고려하여 개개물질의 형태를 수정한 후, 분자운동론적 에너지 최소화 과정을 반복하여 각 물질의 active conformation을 설정하였다. 다음에 이렇게 설정된 입체구조를 전술한 바와 같이 carboxyl group의 탄소를 원점으로하여 가상공간에 차례로 중첩시켜 갔다. 이 과정에서는 설정된 분자의 형태를 강체(rigid body)로 취급하여 가상공간의 원점을 기준으로 어떤 회전배향에서 가장 효과적인 중첩이 될 수 있는지만을 고려하였다. 50 분자들의 중첩된 모양을 Fig. 4에 도시하였다.

중첩구조의 표면 및 표면전하분포의 계산—중첩된 구조의 각원자들의 van der Waals 반경을 계산하여 전체의 외형표면을 추정하였다. van der Waals 반경은 원소에 따라 서로 조금씩 다르나, 수용체와의 상호작용에 의해서, 원자간의 거리가 van der Waals 반경과 약간 다른값을 가질 수 있으며, 또한 본 연구의 오차범위를 고려하여 볼 때 오직 대체적인 근사(rough approximation) 만이 가능할 것이므로 모든 원소에 일률적으로 1.7 Å를 적용하였다.

언어진 구조표면의 정전기적 특성을 살펴보기 위하여, 표면전하분포를 추산하였다. 즉 CNDO/2(ON)으

로 계산된 자료분자들의 각 원자들의 부분전하를 이용하여, 각 자료분자가 점유되어 있을 때의 표면의 각 점에서 느끼는 electric field의 크기를 계산하였고, 이를 전 자료분자들에 대하여 normalize 하였다. 예측대로 carboxyl group이 결합하는 위치의 electric field의 크기가 가장 강하였고, 이외에도 약간 내부쪽에 극성인 원자(단)이 결합할 수 있을 곳이 두 군데 정도 있는 것으로 추산되었다. 기타 내부는 모두 소수성표면인 것으로 나타났다.

결과 및 고찰

수용체 작용부위의 모델

많은 수의 활성물질이 중첩된 형태의 외형은 그들이 작용하는 수용체의 적용공간의 상보적인 형태일 것이다. 따라서 위에서 추정된 van der Waals 표면을 수용체 작용공간의 공간구조의 모델로서 제안할 수 있다고 생각하였다(Fig. 5). 다만 이 과정에서 다시 두가지의 의문점이 있을 수 있었으며, 첫째는 추정된 표면이 효소내부에 허용되는 공간의 최대 범위인가 하는 점과, 둘째는 이 모델이 사실과 근사하다면 효소의 작용공간에서 체액쪽으로 열려 있는 부분(opening)은 어느 쪽인가 하는 점이었다.

연구의 초기단계부터 가능한 한 분자의 크기가 큰 물질을 선정하여 자료군으로 삼았으며, 또한 이 단계에서 다시 한번 구조-활성 상관관계 보고들을,⁵¹⁻⁸⁴⁾ 특히 크기가 큰 치환체들이 어느 정도의 크기에서 활성이 급격히 감소하는지를 주시하여 검색하였다. 대체로 보고된 치환기들의 효과가, 본 모델에서의 예측과 잘 들어 맞았으나, 모델의 오른쪽 아래부분의 위치에서는 상당히 다양한 크기와 형태의 치환체들이, 치환으로

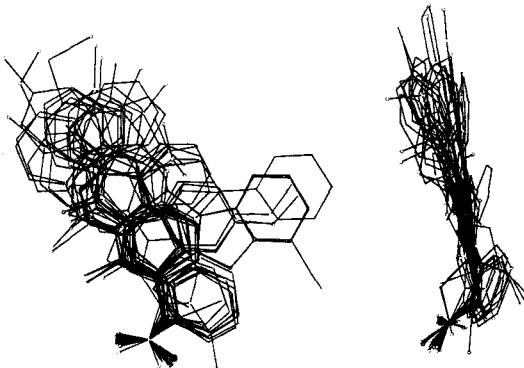


Figure 4—Overlap of 50 compounds with (most probable) conformations and orientation.

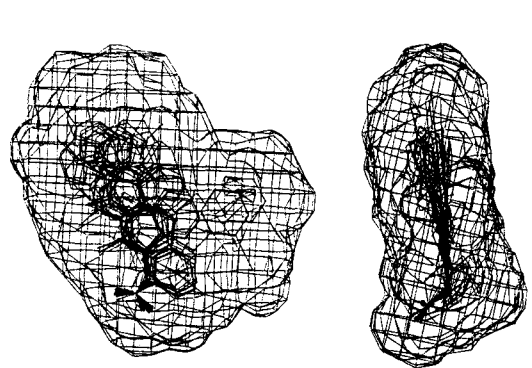


Figure 5—The deduced model of binding cavity of the cyclooxygenase.

유래하는 활성의 상승은 없으나, 또한 급격한 감소없이 허용된다는 것을 etodolac 류의 경우^{37-39,50,85)}에서 발견하였다.

어떤 치환체가 그 원 물질(mother compound)의 활성에 영향을 주는 인자로서는 그 치환체의 입체적 형태와 정전기적인 특성을 꼽을 수 있다. 만일 그 치환체가 비극성이라면, cyclooxygenase와 같이 소수성인 작용공간일 경우에는, 주로 입체적 crowding이 문제가 될 것이다. 치환체의 크기가 허용공간의 범주를 넘지않을 경우에는 소수성 상호작용이 증가할것이므로, 결합에너지가 증가하여 활성이 증가되는 경우가 일반적이다. etodolac과 이에 phenylmethyl이 부가되어 있는 pemedolac의 경우를 예로 들 수 있으며, α -탄소의 methyl기 도입효과도 그 한 예로 생각할 수 있다. 용해도 등의 다른 인자가 문제되지 않는다면, 치환체의 크기가 커질수록 활성이 대체적으로 증가하다가, 허용범위를 초과하면 수용체에 결합할 수 없게 되므로 활성이 급격히 감소한다. 그러나 치환체의 도입은 허용되나, 활성의 증가가 없다면 이는 허용되는 공간이 있으나 그 치환체와 효소의 작용부위와의 상호작용은 없는 경우일 것이다. 더구나 다양한 크기의 치환체들이 활성의 큰 변화 없이 허용된다면 이는 외부적으로 열려있는 공간을 점유하는 것으로 생각해 볼 수 있다. 한편, 결합에너지의 상당부분을 기여하는 것으로 생각되는 carboxyl group은 대단히 친수성인 원자단으로서, cyclooxygenase의 작용부위와 같이 매우 소수성인 내부공간을 건너서 침투해 들어간다고 생각하기 보다는, 친수성인 외부쪽의 근처에 자리잡음으로서 분자의 다른부분이 작용공간에 결합해 들어가는 것을 돕는 역할, 즉 닻(anchor)과 같은 역할을 하는 것이라고 생각하는 것이 열역학적인 관점에서 볼 때 훨씬 사실에 가까울 것으로 추정된다.

이러한 점들을 감안해 볼 때 본 모델의 표면은 대체적으로 허용범위와 일치하며, carboxyl group 이 점유하는 위치로부터의 오른쪽 아래, 즉 Fig. 5의 전면에서 보았을 때 오른쪽 아래영역은 효소의 작용공간이 외부로 열려 있는 부분이라고 추정할 수 있다.

본 모델의 특성

모델내부의 용적은 약 730 \AA^3 으로 산출되었으며, 같은 방법으로 계산한 기질, arachidonic acid의 분자용적인 약 300 \AA^3 에 비하여 대략 2.4배의 용적이 되는 것으로 나타났다. 모델의 전체적인 외형은, 일견 바닥이 없는 장화와 같은 L 자형의 형태로서, 대부분의 영

역에서 평면성이 유지되고 있음을 볼 수 있다. Carboxyl group이 결합하는 위치 외에, 모델 내부에 극성 원자(단)이 결합할 수 있는 위치가 두군데 있는 것으로 생각되어진다.

본 모델은 Shen 등이 제안한 표면형태와 상호위배되는 부분은 없는 것으로 보이며, 그들의 모델에 비하여 같은 위치에 결합하는 것으로 알려진 fenamate와 salicylate가 무리없이 잘 적용되고 있다. Appleton 등이 제안한 모델등과는 서로 일치하지 않는다.

한편 본 모델을 적용할 경우, 그동안 잘 이해할 수 없었던 실험적 관찰사실들을 명확히 설명할 수 있게 된 것도 하나의 성과로 생각된다. Acetate group을 가지고 있는 소염진통제의 α -carbon에는 methyl 도입이 허용될 수 있으며, 도입될 경우(전술한 이유로) 효력이 상승한다. 그러나 ORTHO 위치에 치환체가 있는 물질의 경우에는 α -methyl의 도입으로 오히려 효력이 감소하는 결과가 얻어졌으며, pyranoidolacetate 류의 경우에는 이를 도입하면 효력이 아예 없어지는 것으로 밝혀졌다.^{35,86)} 또한 α -methyl이 도입될 경우, S-체가 효력이 있는 것으로 알려져 있으나, 이 역시 화합물에 따라 다르다. Flurbiprofen의 경우에는 S-체와 R-체의 효력의 차이가 100배 이상인 데 반하여, naproxen은 약 70배로 줄고, fenoprofen이나 ibuprofen 등에 있어서는 효력의 차이가 거의 없다.²⁵⁾ 이 실험결과들은 여태까지의 작용기전 연구들로서는 잘 이해할 수 없었던 부분이었다.

본 모델에 flurbiprofen, naproxen, fenoprofen, ibuprofen 등의 S-체와 R-체를 적용시켜 본 바, S-체는 모두 무리없이 적용이 가능하였으나, R-체는 서로 달랐다. Acetate를 기준으로 중앙환의 PARA 위치에 phenyl 기가 연장되어 있는 flurbiprofen의 경우에는 중앙환과 PARA-phenyl이 상호 구부러질 수 없으므로, R 체를 적용하기 위해서는 PARA-phenyl의 일부가 model의 뒷벽을 밀어낼 수 밖에 없는 반면, 비슷한 구조이긴 하나 META-phenoxy로 되어 있는 fenoprofen의 경우에는 두 환 사이의 산소에 의한 단일결합다리에 의하여 치환체가 구부러진 상태로 회전될 수 있음으로 해서, R-configuration에 기인한 뒤틀림을 분자의 상대쪽위치의 치환체의 회전으로 보상할 수 있었다. PARA-isopropyl이 치환되어 있는 ibuprofen의 경우 역시, isopropyl기의 반대쪽으로는 회전이므로 보상이 가능하였고, 치환체가 중앙환과 fusion 되어 있어 회전은 불가능하나 길이가 비교적 길지 않은

naproxen의 경우에는 어느정도의 무리한 적용이 가능하였다. 즉, 이러한 경우, 중앙환의 연장선상에 존재하는 PARA, META 치환체의 크기가 크고 회전이 어려울수록 R-체와 S-체의 효력의 차이는 클 수밖에 없고, 치환체의 크기가 작고 쉽게 회전하여 뒤틀림을 보일 수 있는 경우 효력의 차이는 없어질 것이다.

한편 ORTHO 치환체가 있을 경우에는 α -methyl을 적용해보면, ORTHO 허용공간을 오히려 밀고나가게 됨으로서 무리가 생기게 됨을 알 수 있었으며, pyranoindolacetate의 경우에는 이 acetate가 뺀어나고 있는 방향이 여타물질들과 달라, 다른 물질들에서의 α -methyl이 점유하게 될 공간을 이미 점유하고 있음으로 하여, 치환이 전혀 허용되지 않음을 알 수 있었다. 여러 구조-활성상관의 보고들에서 위의 설명들과 일치하는 실험결과들을 확인할 수 있었다.⁸⁷⁾

기질인 arachidonic acid를 본 모델에 적용시켜 보았다. 이 지방산은 하나건너 반복되는 4개의 시스(cis)형 이중결합을 가지고 있어, 이 부분이 전체적으로 둥그렇게 구부러져 있는 형태를 취하게 되며, 또한 단일결합이 많아, conformational energy minima가 다수 존재한다. 그중 가능한 하나의 conformation을 선택하여 본 모델에 적용시켜 본 바, 별 무리없이 잘 적용될 수 있음을 알 수 있었다.

그러나 본 모델에 있어서 carboxyl group의 두 산소의 배향은 불분명하며 상당히 인위적이다. 또한 ORTHO 위치의 허용공간은 이 영역에 적용할 수 있는 활성물질의 수가 비교적 적음으로 인해 추론의 폭이 좁았고 따라서 다소 분명하지 않다고 생각한다. 본 모델에 의하여 많은 실험적 사실들을 잘 설명할 수 있었으나, 전구약물인 loxoprofen이 그 자체로는 활성이 없는 경우에 대해서 만족스럽게 설명할 수 없는 점 역시 본 모델의 부족한 점 중의 하나이다.

PGHS-1의 X-ray 구조와의 비교

본 모델은 수용체의 구조를 모르는 상태에서 순수하게 ligand의 정보만을 가지고, 수용체의 상보구조를 추정해보고자 하는 노력의 결과이다. 본 연구를 진행해 오던 중 cyclooxygenase의 isoenzyme 중의 하나인 prostaglandin H₂ synthase-1 (PGHS-1)의 X-ray 구조가 밝혀졌다.⁸⁸⁾ 현재 PGHS-1은 peroxidase activity와 cyclooxygenase activity를 모두 가지고 있으나 세포와 세포간의 signalling과 조직의 homeostasis에 주로 관여하고, 염증반응에 따르는 prostaglandin biosynthesis는 또다른 isoenzyme인

PGHS-2가 주관하는 것으로 받아들여지고 있으나, PGHS-1 역시 cyclooxygenase 활성부위의 구조는 PGHS-2와 크게 다르지는 않을 것으로 생각된다.

그러나 실제 많은 의약품이 그 생체내 수용체의 구조를 모르고 있으며, 또 그럼에도 불구하고 보다 나은 의약품을 개발할 필요가 절실하기 때문에, 이러한 complementary receptor-cavity mapping은 나름대로의 시사하는 의미가 있을 것이다. 이에 저자 등은 보고된 PGHS-1의 구조를 전혀 참조하지 않고, ligand만의 정보를 이용하여 연구를 계속하고, 일단 상보구조가 얻어진 다음, 이를 보고된 PGHS-1의 활성부위와 비교해 봄으로서 이러한 작업의 사실과의 부합도를 확인해 보기로 하였었다.

PGHS-1의 X-ray 구조에서 cyclooxygenase의 active site로 보여지는 부분은, Gln 524 및 Arg 120으로부터 Ser 530을 거쳐 Tyr 385에 이르는 안으로 깊숙히 들어간 홈(channel)이며, 현재 이 구조의 해상도는 3.5 Å 수준으로, 각 아미노산 잔기의 위치는 다소 확실하지 않다. 따라서 현재의 구조로서 cyclooxygenase action를 완전히 이해할 수는 없지만, 본 연구에서 얻은 모델을 이에 비교할 때 매우 근사하게 접근하고 있음을 알 수 있었다. 먼저 형태는 X-ray 구조에서는 표면에서 통로처럼 깊숙히 들어간 홈(channel)의 형태로서 밀이 없는 장화의 모양인 본 모델과 매우 유사하였다. Carboxyl group이 결합하는 위치는 모델에서는 작용부위의 체액으로 열린 입구 쪽에 존재하는 것으로 추정된 바, X-ray 구조에서도 역시 입구쪽에(mouth of the channel) 존재하는 Arg 120의 guanidium group에 결합하는 것으로 확인되었다. 작용부위 내부공간의 크기는, X-ray 구조의 각 원자위치가 일부 불확실하고 본 모델이 내포하는 오차가 있어 서로 정확히 비교할 수는 없으나, X-ray 구조가 모델보다는 다소 작은 것으로 여겨진다. 본 모델에서는 carboxyl group이 결합하는 위치 이외에 내부에 두군데의 극성원자(단)이 interaction 할 수 있는 부분이 있는 것으로 추정되었으나, X-ray 구조에서는 활성부위의 내부에, carboxyl과 결합하는 Arg 120 외에 전하를 가질 수 있는 아미노산 잔기로서 Glu 524가 Arg 120의 근처에 존재하고 있으며, 더 안 쪽에는 Ser 530과 Tyr 385의 두 개의 hydroxy 잔기가 내부표면에 노출되어 있는 것으로 나타났다. Ser 530의 위치는 모델에서 제안된 위치와 비슷하였으나, Tyr 385의 위치는 모델에서 추정

된 두 번째의 극성기 결합위치보다 좀 더 안쪽에 존재하는 것으로 생각된다. 기타 내부표면은 모델에서와 마찬가지로 모두 소수성의 아미노산 잔기로 되어 있었다.

두말할 나위없이 이러한 연구의 최종목표는 보다 나은 새로운 의약품을 개발하는 데 있다. 이미 시판품이 100종이 넘는 비스테로이드성 소염제에 또 하나의 비슷한 소염제를 추가하는 것은 그다지 의미있는 일이라 할 수 없으나, 이러한 작업을 계속함으로써 cyclooxygenase의 다음단계, 아직은 그 sequence조차 알고 있지 못한, 효소의 상보구조특성을 찾을 수 있다면 thromboxane 억제 등에 따른 부작용이 없는 선택적 소염진통제를 찾을 수도 있을 것이다. 약효물질군의 구조적 자료만을 이용하여, 이러한 시도로서 사실에 매우 근접한 상보구조를 얻을 수 있다는 것은 대단히 고무적인 일이다.

감사의 말씀

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드린다.

문헌

- 1) R.J. Flower, S. Moncada, and J.R. Vane, Drug therapy of inflammation, In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman, G. A., Goodman, L.S. and Gilman, A. (Ed.), Macmillan Co., New York, pp. 710 (1980).
- 2) A. Kopolkovas, Antiphilogistics, In *Essentials of Medicinal Chemistry*, A. Kopolkovas (Ed.), Wiley, New York, pp. 1091 (1988).
- 3) B. Samuelsson, An elucidation of the arachidonic acid cascade discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotriene, *Drugs*, **33** (suppl. 1), 2 (1987).
- 4) K.F. Austen, The role of arachidonic acid metabolites in local and systemic inflammatory processes, *Drugs*, **33**, 10 (1987).
- 5) F.A. Kuehl Jr. and R.W. Egan, Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation, *Sciences*, **10**, 978 (1980).
- 6) R.J. Flower, Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis, *Pharmacol. Rev.*, **26**, 33 (1974).
- 7) R.J. Flower, J.R. Vane, Inhibition of prostaglandin biosynthesis, *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 1439 (1974).
- 8) B. Samuelsson, M. Goldyne, E. Granstrom, M. Hamberg, S. Hammarstrom and C. Malmstem, Prostaglandins and thromboxanes, *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 997 (1978).
- 9) P. Gund and T.Y. Shen, A model for the prostaglandin synthetase cyclooxygenation site and its inhibition by antiinflammatory arylacetic acids, *J. Med. Chem.*, **20**(9), 1146 (1977).
- 10) R.W. Egan, J.L. Humes and F.A. Kuehl Jr., Differential effects of prostaglandin synthetase stimulators on inhibition of cyclooxygenase, *Biochemistry*, **17**, 2230 (1978).
- 11) J.L. Humes, C.A. Winter, S.J. Sadowski and F.A. Kuehl Jr., Multiple sites on prostaglandin cyclooxygenase are determinants in the action of nonsteroidal antiinflammatory agents, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**(4), 2053 (1981).
- 12) R.J. Kulmacz and W.E.M. Lands, Stoichiometry and kinetics of the interaction of prostaglandin H synthetase with anti-inflammatory agents, *J. Biol. Chem.*, **260**, 12572 (1985).
- 13) T.Y. Shen, Nonsteroidal anti-inflammatory agents, *Burger's Medicinal Chemistry, Part III*, 4th ed., M.E. Wolff (Ed.), John Wiley & Sons, New York, pp. 1205 (1984).
- 14) R.A. Appleton and K. Brown, Conformational requirements at the prostaglandin cyclooxygenase receptor site: a template for designing non-steroidal antiinflammatory drugs, *Prostaglandins*, **18**(1), 29 (1979).
- 15) R.M. Nicholson, J.R. Murphy and J.C. Dearden, A comprehensive receptor for non-steroidal antiinflammatory drugs, *J. Pharm. Pharmacol.*, **34** Suppl., 106 (1982).
- 16) C.L. Prost and T.J. Perun, Introduction to computer-aided drug design, In *Computer-Aided Drug Design, Methods and Applications*, T.J. Perun and C.L. Propst (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 2 (1989).
- 17) P.R. Andrews, D.J. Craik and J.L. Martin, Functional group contributions to drug-receptor interactions, *J. Med. Chem.*, **27**, 1648 (1984).
- 18) S.K. Burt, D. Mackay and A.T. Hagler, Theoretical aspects of drug design: molecular mechanics and molecular dynamics, In *Computer-Aided Drug Design, Methods and Applications*, T.J. Perun and C.L. Propst (Ed.),

- Marcel Dekker Inc., New York, pp. 253 (1989).
- 19) Y.K. Kang, *Conformational Analysis Programs for Biological Molecules (CONBIO)*, KRICT Research Report (1988).
 - 20) J.A. Pople, Approximate self-consistent molecular orbital theory. I. Invariant procedures, *J. Chem. Phys.*, **43**, S129 (1965).
 - 21) J.A. Pople and G.A. Segal, Approximate self-consistent molecular orbital theory. II. Calculations with complete neglect of differential overlap, *J. Chem. Phys.*, **43**, S136 (1963).
 - 22) J.A. Pople and G.A. Segal, Approximate self-consistent molecular orbital theory. III. CNDO results for AB₂ and AB₃ systems, *J. Chem. Phys.*, **44**, 3289 (1966).
 - 23) K.E. Gilbert *et al.*, *PCMODEL Molecular modeling software for the IBM PC/XT/AT and compatibles (Ver. 3.0)*, Serena Software, Bloomington (1989).
 - 24) Autodesk developer, *HyperChem for Windows Rel. 2.*, Autodesk, Inc. (1992).
 - 25) G.H. Hamor, In *Principles of Medicinal Chemistry*, 2ed., W.O. Foye (Ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 561 (1981).
 - 26) S. Noguchi, S. Kishimoto, I. Minamida and M. Obayashi, Potential antiinflammatory agents. II. Synthesis and structure-activity relationships of 6-chloro-5-cyclohexylindan-1-carboxylic acid (TAI-284) and related 5-substituted indan-1-carboxylic acids, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**(3), 529 (1974).
 - 27) K. Kamiya, Y. Wada and M. Nishikawa, X-ray analysis of d-6-chloro-5-cyclohexylindan-1-carboxylic acid (d-TAI-284), *Chem. Pharm. Bull.*, **23**(7), 1589 (1975).
 - 28) J.M. Muchowski *et al.*, Synthesis and antiinflammatory and analgesic activity of 5-aroil-1,2-dihydro-3H-pyrrolo(1,2-a)pyrrole-1-carboxylic acids. The 6-substituted compounds, *J. Med. Chem.*, **30**, 820 (1987).
 - 29) J.M. Muchowski *et al.*, Synthesis and antiinflammatory and analgesic activity of 5-aroil-1,2-dihydro-3H-pyrrolo(1,2-a)pyrrole-1-carboxylic acids and related compounds, *J. Med. Chem.*, **28**, 1037 (1985).
 - 30) E.A. Boyle *et al.*, 7-Aroil-2,3-dihydrobenzo(b)furan-3-carboxylic acids and 7-benzoyl-2,3-dihydrobenzo(b)thiophene-3-carboxylic acids as analgesic agents, *J. Med. Chem.*, **29**, 894 (1986).
 - 31) A. Guzman, F. Yuste, R.A. Toscano, J.M. Young, A.R. Van Horn and J. M. Muchowski, Absolute configuration of (-)-5-benzoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo(1,2-a)pyrrole-1-carboxylic acid, the active enantiomer of ketorolac, *J. Med. Chem.*, **29**, 589 (1986).
 - 32) K. Ueno, S. Kubo, H. Tagawa, T. Yoshioka, W. Tsykada, M. Tsubokawa, H. Kojima and A. Kasahara, 6,11-Dihydro-11-oxodibenz(b,e)oxepinacetic acids with potent antiinflammatory activity, *J. Med. Chem.*, **19**, 941 (1976).
 - 33) M.J. Cerelli, D.L. Curtis, J.P. Dunn, P.H. Nelson, T.M. Peak and L.M. Waterbury, Antiinflammatory and aldose reductase inhibitory activity of some tricyclic arylacetic acids, *J. Med. Chem.*, **29**, 2347 (1986).
 - 34) D.E. Aultz, G.C. Hellsley, D. Hoffman, A.R. McFadden, H.B. Lassman and J.C. Wilker, Dibenz(b,e)oxepinalkanoic acids as nonsteroidal antiinflammatory agents. I. 6,11-dihydro-11-oxodibenz(b,e)oxepin-2-acetic acids, *J. Med. Chem.*, **20**, 66 (1977).
 - 35) Y. Nagai, A. Irie, H. Nakamura, K. Hino, H. Uno and H. Nishimura, Nonsteroidal antiinflammatory agents. 1. 10,11-Dihydro-11-dxobenz(b,f)oxepinacetic acids and related compounds, *J. Med. Chem.*, **25**, 1065 (1982).
 - 36) R. Destro, {2-Phenyl-4-(p-chlorophenyl)-5-thiazolyl}acetic acid, *Acta Cryst.*, **B34**, 959 (1978).
 - 37) C.A. Demerson, L.G. Humber, A.H. Philipp and R.R. Martel, Etodolic acid and related compounds. chemistry and antiinflammatory actions of some potent di- and trisubstituted 1,3,4,9-tetrahydropyrano(3,4-b)indole-1-acetic acids, *J. Med. Chem.*, **19**, 391 (1976).
 - 38) C.A. Demerson, L.G. Humber, N.A. Abraham, G. Schilling, R.R. Martel and C. Pace-Asciak, Resolution of etodolac and antiinflammatory and prostaglandin synthetase inhibiting properties of the enantiomers, *J. Med. Chem.*, **26**, 1778 (1983).
 - 39) L.G. Humber *et al.*, Etodolac, a novel antiinflammatory agent. the syntheses and biological evaluation of its metabolites, *J. Med. Chem.*, **31**, 1912 (1988).
 - 40) L.G. Humber, C.A. Demerson, P. Swaminathan and P.H. Bird, Etodolac, (1,8-diehyll-1,3,4,9-tetrahydropyrano(3,4-b)indole-1-acetic acid): A potent antiinflammatory drug. Conformation and absolute configuration of its active enantiomer, *J. Med. Chem.*, **29**, 871

- (1986).
- 41) V.B. Anderson, M.N. Angrew, R.C. Allen, J. C. Wilker, H.B. Lassman and W.J. Novick, Jr., Carboxyarylindoles as nonsteroidal antiinflammatory agents, *J. Med. Chem.*, **19**, 318 (1976).
 - 42) J. Ackrell, Y. Antonio, F. Francio, R. Landeros, A. Leon, J.M. Muchowski, M.L. Maddox, P.H. Nelson, W.H. Rooks, A.P. Roszkowski and M.B. Wallach, Synthesis and antiinflammatory activity of 6,11-dihydro-11-oxodibenzo[*b,e*]thiepinalkanoic acids and related compounds, *J. Med. Chem.*, **21**, 1035 (1978).
 - 43) K. Matsuda, Y. Tanaga, S. Ushiyama, K. Ohnishi and M. Yamazaki, Inhibition of Prostaglandin synthesis by sodium 2-[4((2-oxocyclopentylmethyl)phenyl)propionate dihydrate(CS-600)], a new antiinflammatory drug, and its active metabolite *in vitro* and *in vivo*, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 2473 (1984).
 - 44) M. Sugimoto, T. Kojima, M. Asami, Y. Izuka and K. Matsuda, Inhibition of prostaglandin production in the inflammatory tissue by loxoprofen-Na, an anti-inflammatory prodrug, *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 2363 (1991).
 - 45) T. Hata, S. Sato and C. Tamura, Non-steroidal anti-inflammatory drugs. IV. Structure of (\pm)-(2SR)-2-{4-[(1SR,2RS)-2-hydroxycyclopentyl-methyl]phenyl} propionic acid, *Acta Cryst.*, **C42**, 1191 (1986).
 - 46) R.N. Brogden, R.C. Heel, T.M. Speight and G.S. Avery, Sulindac: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in rheumatic diseases, *Drugs*, **16**, 97 (1978).
 - 47) C.H. Koo, S.H. Kim and W. Shin, Crystal structure of antiinflammatory sulindac, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **6**(4), 222 (1985).
 - 48) E.C. Ku, J.M. Wasvary and W.D. Cash, Diclofenac sodium (GP45840, voltaren), A potent inhibitor of prostaglandin synthetase, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 641 (1975).
 - 49) P. Moser, A. Sallmann and I. Wiesenberg, Synthesis and quantitative structure-activity relationships of diclofenac analogues, *J. Med. Chem.*, **33**, 2358 (1989).
 - 50) D. Mobilio *et al.*, Structure-activity relationships among analogues of pemedolac, cis-1-ethyl-1,3,4,9-tetrahydro-4-(phenylmethyl)pyrano 3,4-b]indole-1-acetic acid, a potent analgesic agent, *J. Med. Chem.*, **31**, 2211 (1981).
 - 51) M.R. Stillings, S. Freeman, P.L. Myersa, M. J. Readhead, A.P. Welbourn, M.J. Rance and D.C. Atkinson, Substituted 5H-dibenz[*b,g*]-1,4-oxazocines and related amino acids with antiinflammatory activity, *J. Med. Chem.*, **28**, 225 (1985).
 - 52) K. Hino, H. Nakamura, S. Kato, A. Irie, Y. Nagai and H. Uno, Non-steroidal antiinflammatory agents. III. Synthesis of the metabolites of 10,11-dihydro-8, α -dimethyl-11-oxodibenz-(*b,f*)oxepin-2-acetic acid (bermoprofen), *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(9), 3462 (1988).
 - 53) L.L. Martin, L.L. Setescak, T.C. Spaulding and G.C. Hesley, Dibenz[*b,e*]oxepinalkanoic acids as nonsteroidal antiinflammatory agents. 4. Synthesis and evaluation of 4-(4,10-dihydro-10-oxothieno[3,2-*c*][1]benzoxepin-8-yl) butanol and γ -butyric acid and related derivatives, *J. Med. Chem.*, **27**, 372 (1984).
 - 54) W.K. Hagmann, C.P. Dorn, R.A. Frankshun, L.A. O'Grady, P.J. Bailey, A. Rackham and H.W. Dougherty, Synthesis and antiinflammatory/analgesic activities of 11H-dibenzo[*b,e*][1,4]dioxepinacetic acids, *J. Med. Chem.*, **29**, 1436 (1986).
 - 55) A. Closse, W. Haefliger, D. Hauser, H.U. Gubler, B. Dewald and M. Baggolini, 2,3-Dihydrobenzofuran-2-ones: A new class of highly potent antiinflammatory agents, *J. Med. Chem.*, **24**, 1465 (1981).
 - 56) G. Rovnyak, P.A. Diassi, S.D. Leuvin and J.T. Sheehan, Synthesis and antiinflammatory activities of (α -cyclopropyl-*p*-tolyl)acetic acid and related compounds, *J. Med. Chem.*, **16**, 487 (1973).
 - 57) K. Hino, H. Nakamura, Y. Nagai, H. Uno and H. Nishimura, Nonsteroidal antiinflammatory agents. 2. [(Heteroaryl-amino)phenyl] alkanolic acids, *J. Med. Chem.*, **26**, 222 (1983).
 - 58) Boettcher, W. Elger, G. Kirsch, F. Siegmund and H. Wachtel, Nonsteroidal antiinflammatory agents. 14. Synthesis and pharmacological profile of 6-chloro-5-(cyclopentylmethyl)indan-1-carboxylic acid, *J. Med. Chem.*, **27**, 413 (1984).
 - 59) A. Andreani, D. Bonazzi, M. Rambaldi, A. Guarnieri, F. Andreani, P. Stocchi and N. Montanaro, Nonsteroidal antiinflammatory

- agents. 2. Synthesis and biological activity of 2-chloroindolecarboxylic acids, *J. Med. Chem.*, **20**, 1344 (1977).
- 60) M. Nagakura, T. Ota, N. Shimidzu, K. Kawamura, Y. Eto and Y. Wada, Synthesis and antiinflammatory actions of 4,5,6,7-tetrahydroindazole-5- carboxylic acids, *J. Med. Chem.*, **22**, 48 (1979).
- 61) B.E. Maryanoff, S.L. Keeley and F.J. Persico, Replacement of aromatic or heteroaromatic groups in nonsteroidal antiinflammatory agents with the ferrocene group, *J. Med. Chem.*, **26**, 226 (1983).
- 62) Y. Tamura, Y. Yoshimoto, K. Kunimoto, S. Tada, T. Tomita, T. Wada, E. Seto, M. Murayama, Y. Shibata, A. Nomura and K. Ohata, Nonsteroidal antiinflammatory agents. 1. 5-Alkoxy-3-biphenylacetic acids and related compounds as new potential antiinflammatory agents, *J. Med. Chem.*, **20**, 709 (1977).
- 63) Y. Tamura, Y. Yoshimoto, K. Kunimoto, S. Tada, S. Mastumura, M. Murayama, Y. Shibata and H. Enomoto, Nonsteroidal antiinflammatory agents. 2. Synthesis of 4,5-disubstituted 3-biphenylacetic acids and their derivatives with antiinflammatory and analgesic activities, *J. Med. Chem.*, **24**, 43 (1981).
- 64) Y. Tamura, Y. Yoshimoto, S. Tada, K. Kunimoto, S. Matsumura, M. Murayama, Y. Shibata and H. Enomoto, Nonsteroidal antiinflammatory agents. 3. Synthesis of the positional isomers of 4'-chloro-5-methoxy- 3-biphenylacetic acid and their antiinflammatory and analgesic activities, *J. Med. Chem.*, **24**, 1006 (1981).
- 65) P.W. Sprague and J.E. Heikes, Synthesis and antiinflammatory activity of cis-4,5,6,7,8, 8a,9-hexahydro- α -methyl-5-fluorene-2-acetic acid, *J. Med. Chem.*, **20**, 726 (1977).
- 66) Y. Naito, *et al*, Preparation of biological activity of 2-[4{(thiazol-2-yl)phenyl} propionic acid derivatives inhibiting cyclooxygenase, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(9), 2323 (1991).
- 67) G. Braccaccio, A. Larizzio, G. Lettieri and P. Monforte, 2-(Arylmethyl)arylacetic acids as potential antiinflammatory agents, *J. Med. Chem.*, **24**, 998 (1981).
- 68) D.A. Walsh, H.W. Moran, D.A. Shamblee, I. M. Uwaydah, W.J. Welstead, Jr., L.F. Sancilio, and W.N. Dannenburg, Antiinflammatory agents. 3. Synthesis and pharmacological evaluation of 2-amino-3-benzoylphenylacetic acid and analogues, *J. Med. Chem.*, **27**, 1379 (1984).
- 69) K. Kubo, K. Ukawa, S. Kuzuna and A. Nohara, Synthesis of (3-carboxy- 5-oxo-5H-[1]benzopyrano[2,3-b]pyridin-2-yl)acetic acid derivatives, potential antiarthritic agents, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**(3), 1108 (1986).
- 70) J.S. Kaltenbronn, Antiinflammatory activity of isomeric phenyl-naphthaleneacetic acids, *J. Med. Chem.*, **20**, 596 (1977).
- 71) J.S. Kaltenbronn, 4- And 5-aryl-1-naphthaleneacetic acids as antiinflammatory agents, *J. Med. Chem.*, **16**, 490 (1973).
- 72) P.H. Nelson, G.A. Bartsch, K.G. Untch and J.H. Fried, Synthesis and antiinflammatory activity of some 1,6-methano[10]annuleneacetic acids, *J. Med. Chem.*, **18**, 583 (1975).
- 73) D.W. Dunwell, D.Evans, T.A. Hicks, C.H. Cashin and A. Kitchen, 2-Aryl-5-benzoxazolealkanoic acid derivatives with notable antiinflammatory activity, *J. Med. Chem.*, **18**, 53 (1975).
- 74) D.W. Dunwell and D. Evans, Synthesis and antiinflammatory activity of some 2-aryl-6-benzoxazoleacetic acid derivatives, *J. Med. Chem.*, **20**, 797 (1977).
- 75) N. Hirose, S. Kuriyama, Y. Kato and S. Toyoschima, Antiinflammatory activity of some 2, 3-dihydrobenzofuran-5-acetic acids and related compounds, *J. Med. Chem.*, **19**, 303 (1976).
- 76) D. Evans, C.E. Smith and W.R. Niegel Williamson, Syntheses and antiinflammatory activity of some 2-substituted 4- and 7-benzoxazoleacetic and α -methylacetic acids, *J. Med. Chem.*, **20**, 169 (1977).
- 77) D.W. Dunwell, D. Evans and T.A. Hicks, Syntheses and antiinflammatory activity of some 2-heteroaryl- α -methyl-5-benzoxazoleacetic acids, *J. Med. Chem.*, **18**, 1158 (1975).
- 78) J. Wada, T. Suzuki, M. Iwasaki, H. Miyamatsu, S. Ueno and M. Shimitzu, A new nonsteroidal antiinflammatory agent. 2-substituted 5- or 6-benzothiazoleacetic acids and their derivatives, *J. Med. Chem.*, **16**, 930 (1973).
- 79) D.R. Olson, W.J. Wheeler and J.N. Wells, Rigid analogs of indomethacin, *J. Med. Chem.*, **17**, 167 (1974).
- 80) W.J. Welstead and H.F. Stauffer, Jr., Syn-

- theses and antiinflammatory activity of a series of 2-aroyl-1,1a,2,6b-tetrahydrocycloprop[b]indole-1-carboxylic acids, *J. Med. Chem.*, **17**, 544 (1974).
- 81) S. Sugira, S. Ohno, O. Ohtani, K. Izumi, T. Kitamikado, H. Asai, K. Kato, M. Hori and H. Fujimura, Synthesis and antiinflammatory hypnotic activity of 5-alkoxy-3-(N-substituted carbonyl)-1-phenylpyrazoles 4, *J. Med. Chem.*, **20**, 80 (1977).
- 82) H. Terada, S. Muraoka and T. Fujita, Structure-activity relationships of fenamic acids, *J. Med. Chem.*, **17**, 330 (1974).
- 83) T.R. Westby and C.F. Barfknecht, Acridan-4-carboxylic acids and N-aryl-2-amino-3-toluic acids as planar and antiplanar analogs of antiinflammatory N-arylanthranilic acids, *J. Med. Chem.*, **16**, 40 (1973).
- 84) J. Hannah, W.V. Ruyle, H. Jones, A.R. Matzuk, K.W. Kelly, B.E. Witzel, W.J. Hiltz, R.A. Houser, T.Y. Shen, L.H. Sarett, V.J. Lotti, E.A. Risley, C.G. Van Arman and C.A. Winter, Novel analgesic-antiinflammatory salicylates, *J. Med. Chem.*, **21**, 1093 (1978).
- 85) C.A. Demerson, L.G. Humber, T.A. Dobson and R.R. Martel, Chemistry and antiinflammatory activities of prodolic acid and related 1,3,4,9-tetrahydropyrano [3,4-b]indole-1-aikanoic acids. 1, *J. Med. chem.*, **18**, 189 (1975).
- 86) D.A. Walsh, D.A. Shamlee, W.J. Welstead, Jr. and L.F. Sancilio, Antiinflammatory agents. 2. Syntheses and antiinflammatory activity of substituted 2-aminophenylacetic acid derivatives, *J. Med. Chem.*, **25**, 446 (1982).
- 87) I.Y. Park, Modeling of the receptor-cavity based on three-dimensional structures of the non-steroidal antiinflammatory drugs, Ph. D. Thesis for Pharmacy, Seoul National University (1992).
- 88) D. Picot, P.J. Loll and R.M. Garavito, The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1, *Nature*, **367**(20), 243 (1994).