

第一章 序論

第一節 研究動機

傳統新藥開發研究過程中，從先趨化合物的找尋，到發現具有活性物質的化合物，透過毒理與藥理的測試，藥物動力學與藥效學研究，實際運用到動物安全試驗、人體臨床試驗。這一連串的過程，需要花費不少經費、人力與時間。

近年來利用電腦輔助藥物設計，透過分子接合的方法，找到一些具有潛力的化合物，進一步經由實驗驗證，已有許多成功案例 (Shoichet et al., 2002)。因此，如何在最短時間內，利用電腦輔助，找到一些可能具有活性的物質，輔助建立快速新藥篩選與開發的系統，來縮短尋找活性化合物的時間，將會在新藥研發過程中，扮演著重要角色。

而本論文試著採用分子接合 (Molecular docking) (Shoichet et al., 2002) ; Schneider and Böhm, 2002) 的方法，從已知的蛋白質結晶結構，基於小分子與目標蛋白質的結合部位，其在分子形狀上之互補 (Lock and Key) (Chen, 2002) 與攜帶電荷互補的理論上。透過電腦理論模型計算，嘗試能在藥物資料庫中，找出具有與 NS3 protease 接合的化合物，也經由這樣的分析流程，開發篩選登革熱 NS3 protease 抑制劑之系統。

第二節 研究目的

本論文的重點在於提出一個 *in silico* 的篩選系統，透過所建立的資料庫篩選流程，期能將龐大的藥物資料庫的數目，透過此方法，先剔除掉多數不適合的化合物，將數量降低，得到為數較少分子化合物作為先趨物用於篩選。對初步經由 *in silico* 的篩選結果，本論文更進一步的做分析與評估，找出較具潛力的分子化合物並說明其理由，以供 *in vivo* 的篩選測試。藉由這樣的分析流程，對 database 測試，希望能找到一些能與登革熱 NS3 protease 之間有較佳結合方式的化合物。這些化合物可作為先趨化合物篩選對象，供再進一步的實驗來印證結果。本論文主要的研究內容可分兩個階段：

1. 挑選出目的結構蛋白後，如何找出並驗證受質的活性結合部位並探討序列與結構之間的相關性。
2. 小量資料庫篩選系統的建立與分析方法。

第三節 研究策略

1.3.1 標的蛋白質的選擇

登革熱病毒標的蛋白質的選擇與可能的研究策略方法，可以以下列幾個方向來考量。

A. 與病毒入侵或複製有主要關連性。

B. 有現成的 crystal structure 或可用電腦作 modeling 的病毒基因。

可能用來作為標的物，有下列幾種：

1. Envelope glycoprotein

登革熱病毒感染細胞的過程中，第一步就是病毒外膜蛋白吸附 (attachment) 到寄主細胞的細胞膜上，兩者互相作用後，接著再進行穿入 (penetration) 的動作 (Heinz, 2001)。因此，若能阻止病毒外膜蛋白與寄主細胞細胞膜之間的作用，若許，就能達到抑制病毒感染的方式。

登革熱病毒的 envelope glycoprotein 具有三個 domain： domain I & II 與酸性誘導結構改變有關係，其中 domain II 包含 fusion peptide， domain III 則是受質的結合部位。已知酸性條件能促使 envelope glycoprotein fusion (Kuhn et al., 2002)。因此，假設藥物若是能離子化，改變 PH 值，利用 $[H^+]$ 或 $[OH^-]$ 的變化，或許可能降低 fusion 的功能。另外，抑制劑若能與 fusion peptide 的 hydrophobic domain 或

是 domain III 的受質結合部位結合，皆有可能達到抑制的效果。

2. NS3 protease

NS3 protease 具有 RNA helicase 與 NTPase 功能 (Li et al., 1999)，藉由抑制或降低 NS3 protease 的活性，或許可以降低或阻斷 RNA 的複製，達到抑制病毒複製的效果。若選擇 NS3 protease 來當作標的蛋白時，結合區 (Binding site) 與活化區 (Active site) 的結合位置 (Aloy et al., 2001)，可以當作抑制劑結合部位的考量之一。一般來說，結合區 (Binding site) 是沒有催化功能的地方，活化區 (Active site) 則是具有催化功能的區域。由於 flavivirus 的某些重要的胺基酸序列，具有高度的保存性，以它來作為標的蛋白的好處為，可能降低因胺基酸的突變而使抑制劑失效，同時所得的結果可適用在其他家族成員中。

3. NS2B cofactor

在 HCV 與 DEN2 皆需要 cofactor 的結合來活化 NS3 protease 的酵素活性，兩者的 cofactor 皆具有一段 hydrophobic 的胺基酸序列，推測主要為與 NS3 protease 結合與作用的部位 (Brinkworth et al., 1999)。

因此，可以利用 cofactor interaction site (圖一) 來與抑制劑做結合，阻止 NS3 protease 與 NS2B cofactor 之間的作用，來達到抑制效果。不過，有研究指出，在 in vitro 實驗中，缺乏 NS2B cofactor 的情況下，NS3 protease 還是具有些微的酵素活性 (Yusof et al., 2000)。因此，在這裡若想採用 NS2B cofactor interaction site 的方式，似乎是不太合適的。

4. Metal Co-factor interaction site (Zn, Cu..et al)

而有些 NS3 protease，例如：HCV 的 NS3 protease，需要金屬原子 Zn 的存在 (Love et al., 1996)，這些金屬原子可能扮演 Lewis acid 催化的角色並穩定蛋白質的結構。不過，這些因子，大多皆由金屬元素、雙硫鍵、鹽橋…等方式，來穩定由多個 domain 所組成的蛋白質或在酵素反應過程中，可能扮演著催化或構形改變的角色之一，破壞這些蛋白質與金屬 co-factor 間的 interaction，可以降低或阻斷病毒的複製。

在本實驗論文中，則採用 NS3 protease binding site 及 active site 為目標，已知在 NS3 protease 中 His-Asp-Ser (Catalytic triad) 扮演著催化功能的角色 (Murthy et al., 1999)，而且不論在受質的結合區或是催化機制皆有較多研究報告，因此選用這些區域來當作我們的標的蛋白，在較多合理的資訊下，期盼能提供用於分析我們的結果並加以對照。

第二章 文獻探討

本章在前面的部分，將針對登革熱病毒與其 NS3 protease 作介紹，其後會分別對分子接合與高速虛擬藥物篩選作進一步探討。

第一節 登革熱病毒探討

2.1.1. 流行病學

1779 年，西方首次有登革熱的記載，在印尼與埃及同時流行。第二次世界大戰後，出血性登革熱 (dengue hemorrhagic fever, DHF) 及休克性登革熱症候群 (dengue shock syndrome) 出現於東南亞各地 (Henchal et al., 1990)。登革熱主要流行於亞洲、美洲與非洲之熱帶和亞熱帶地區。尤其以東南亞最為嚴重，根據世界衛生組織的估計，每年約有一億人感染登革熱 (Gubler and Clark, 1995)。

1942 年爆發台灣最嚴重的登革熱大流行之後 (王正雄, 陳秀玲, 1997)，直到 1981 年，小琉球爆發登革熱流行 (吳盈昌, 1986)。由於埃及斑蚊，主要分佈北迴歸線以南，所以，以往出現的地區，以高雄、屏東為主要 (戴佛香, 1981)。在 1981 年後，登革熱有擴大範圍的現象，且藉由白線斑蚊，為其另一傳媒，遍佈全省。因此，在 1995 年登革熱藉由白線斑蚊為媒介，在台北縣有病例發生 (王正雄, 1997)。大體而

言，病媒與溫度跟降雨量有相關性，不適的溫度會限制斑蚊的族群生長，也決定其地理分佈性，下雨過後的積水處，亦為蚊媒的滋生場所（杜武俊，1995）。因此，為了防治登革熱造成流行，在清除滋生源，降低病媒蚊的密度，將是極為重要的工作。

感染登革熱病毒的臨床特徵主要如下，可分為典型登革熱(classic dengue fever, DS)，其症狀為發燒、肌肉骨骼酸痛，輕微之症狀，死亡率很低。另一型為登革出血熱 (dengue hemorrhagic fever, DHF) /登革休克症候群 (dengue shock syndrome, DSS)，特徵為血管通透性增加，和不正常出血，甚至造成休克，死亡 (McBride et al., 2000)。因為登革熱目前尚無有效疫苗或藥物可以應用 (Murthy et al., 1999)，因此，現階段還是採支持性療法為主要。所以，預防方法主要還是從環境的管制與監控，來避免蚊媒的滋生，其次，希望能在藥物或疫苗研究上，有新的突破，來達到預防或治療的效果。

2.1.2 病毒學

登革熱 (dengue fever) 是由登革熱病毒 (dengue virus) 所引起之人類急性傳染病 (Kautner, 1997)。臨床表徵登革熱病毒為單鏈正股RNA 病毒，屬於黃質病毒科 (*Flaviviridae*)。依其血清型可以分為四個血清型 (Henchal and Putnak, 1990)。

病毒的基因體大小全長為約 11KB，病毒基因複製時，會先轉譯 (translation) 出一條 polypeptide，再經由病毒的 NS2B/NS3 protease 及寄主的 proteases 的切割 (Falgout et al., 1991) (圖二)，產生三個結構蛋白與七個非結構，具有功能性的蛋白質 (表一)。其中三個結構蛋白包含核心蛋白質 (Core protein)，其為組成病毒蛋白質的核心，前驅膜蛋白質 (prM protein) 經由切割產生膜蛋白質 (Membrane protein)，而外膜蛋白質 (Envelope protein) 為醣蛋白與細胞受體間的辨識跟膜與膜之間的 fusion，扮演重要的功能 (Kuhn et al., 2002)。

在非結構蛋白中，NS1 為醣蛋白，跟 RNA 複製有關 (Mackenzie et al., 1996)。NS2A 功能未知，可能與切割 NS1-NS2A 有關。而 NS2B 為 NS3 protease 的 cofactor，負責活化 NS3 protease 酵素活性 (Murthy et al., 1999)。NS3 則同時具有 protease、helicase、NTPase 活性，在病毒複製中扮演重要角色 (Li et al., 1999)。NS4A 與 NS4B 功能尚

未清楚，被推測與 RNA 複製有關。NS5 為 RNA-dependent RNA polymerase (Kapoor et al., 1995)，與病毒複製有關。

第二節 登革熱 NS3 protease 簡介

登革熱 NS3 protease 是屬於 Serine protease 家族系列。一般來說，凡是水解肽鍵的酵素，可統稱為蛋白酶 (protease)。Serine protease 其成員包含了 Chymotrypsin、Trypsin、Elastase、Thrombin、Plasmin (莊榮輝, 2000)。一般來說，在活性部位具有相同的催化機制，catalytic triad 皆由 His-Asp-Ser 所構成，偏好作用於 Lys 與 Arg 鹼性胺基酸，只在於催化目標的專一性不同。

登革熱 NS3 protease 在病毒複製過程中，扮演重要的角色。藉由正確切割 polypeptide 位置來產生 10 個具有功能與活性的蛋白質 (Falgout et al., 1991)。登革熱 NS3 protease 切割四個主要的位置，NS2A/2B (Arg-Ser)，NS2B/NS3 (Arg-Ala)，NS3/NS4A (Lys-Ser)，NS4B/NS5 (Arg-Gly)，其中 NS2A/2B，NS2B/NS3 屬於 cis cleavage 而 NS3/NS4A，NS4B/NS5 則是 trans cleavage (Zhang et al., 1992)。

NS3 protease 的酵素活性與 NS2B cofactor 有正相關性。在缺乏 NS2B 的存在下，NS3 protease 的酵素活性是相對低的 (Yusof et al., 2000)。不過在定點突變實驗的觀察中，NS2B 或許不能顯著有效影響 P1

residue side chain 與 S1 pocket 的結合 (Valle and Falgout., 1998)
(註一)。

然而，Serine protease的催化部位 (Catalytic traid) 具有高度的保留性。其催化機制為charge relay system (Murthy et al., 1999)，過程中，Aspartic acid穩定Histidine所提供的氫原子，Histidine則扮演base的功能，抓取Serine O^γ 原子上的氫，使得Serine 具有nucleophile 的性質，去攻擊c=o 官能機，進行親核性醯基取代反應。過程中，所形成的tetrahedral intermediate，藉由oxyanion hole 所提供的氫鍵來穩定acyl enzyme中間體，降低其反應活化能，促使反應向右，利於催化反應的進行 (圖三)。

因此，不論在 catalytic traid 與扮演 oxyanion hole 角色之胺基酸殘基跟 S1 專一性受質結合的 pocket，在受質辨識與催化過程中，扮演著重要角色。這樣的資訊，可以作為分析抑制劑與 protease 之間作用的參考。

(註一) S : Binding site on protease.

P : Amino acids of substrate that bind in the active site of the protease.

S: Specificity determinant=Most important site，一般而言，是決定其專一性結合的胺基酸。

P1:則是受質上與S1作用的胺基酸殘基。

第三節 登革熱 NS3 protease 活性結合部位的探討

預測或找出蛋白質的結合位置，目前可以從下列幾個方向來探討。現在可以藉由測定 homologous protein 中的保留序列，將序列訊息轉成 3D 結構，找出其可能的結合位置，分析蛋白質與受質間作用的殘基，或是利用蛋白質的活性位置 (active site)，通常是 hydrophobic pocket 的特性來找出結合位置 (Sternberg et al., 1998)。而在生物實驗上可以藉由定點突變的方式，來說明胺基酸功能上的重要性。

在登革熱 NS3 protease 的序列比對結果，可以發現在所有的 flavivirus 中，其 catalytic traid (His-Asp-Ser) 具有高度的保留性 (Brinkworth et al., 1999)。從生物定點突變的實驗中，也證明 catalytic traid (His51-Asp75-Ser135) 的重要性 (Murthy et al, 1999) 同時也找到高度保留性的區域並推測與受質結合的胺基酸殘基可能為 Asp129, Tyr150, Asn152, Gly153 (Valle and Falgout, 1998)。

目前，已知對登革熱 NS3 protease 具有抑制效果的抑制劑為 Mung Beans Bowman - Birk Inhibitor (MbBBI) (Murthy et al., 2000)，其來源為豆科植物，為 cysteine-rich 蛋白質，其分子結構為 double handed，可以同時與兩分子的 protease 結合，其中一端 Cys-Thr-Lys-Ser-Ile-Pro (Lys hand)，另一端為 Cys-Thr-Arg-Ser-Met-Pro (Arg

hand)，分子結構藉由雙硫鍵而穩定，具有 hydrophobic core，皆能抑制 NS3 protease 與 NS2B/NS3pro complex 的酵素活性。

從 MbBBI 與 NS3 protease 的結合情形（表二）可以得知，NS3 protease 在 S1 pocket 的結合部位，Lys hand 與 Arg hand 是稍有不同的。不過，兩者在 S1 pocket 內的 Ser131，Gly133，Ser135，Tyr150，Ser163，皆有所作用，其中 Gly133，Ser135，Gly151 為組成 oxyanion hole 的胺基酸，與 Ser135 的 O^γ 原子作用，穩定中間活化體，這幾個胺基酸在多重序列的結果顯示亦具有高度的保留性。

而與 MbBBI 在 S1 pocket 內形成氫鍵的的胺基酸為 Tyr150，Ser163，而 Ser131 則會與水分子形成氫鍵。而在 double mutation 的實驗中，也證明 NS3 protease 活性的降低 (Valle and Falgout., 1998)。從上述結果，可以拿去比較分析，有抑制劑與沒有抑制劑的結晶結構其受體活性部位的構型，是否有所不同？若有所差異，是否為上述的胺基酸殘基。

第四節 分子接合的簡介

目前分子接合軟體，依照其作用原理，可以粗分為下列兩種

1. Energy Model

Goodford (1985) 或 Miranker (1991) 使用 van der Waals 及 electrostatic potentials 能量之間的交互作用，在 receptor 與不同 probe 之間，利用這樣的方式去找出，在能量上，最有可能的結合位置，這一類的研究的方式，主要依據其演算法 (Algorithm) 與評分函數 (Scoring function)。

另外，要成功的將分子嵌合到標的蛋白的活性部位，則是依靠較具準確性的評分函數來達成 (Schneider and Böhm, 2002 ; Abagyan and Totrov, 2001)。主要依據動力學與熱力學基本原理，評估影響彼此之間作用的因子。其中，包含 hydrophobic interaction (疏水性作用力)，van der Waals interaction (凡得瓦力)，dispersion interactions (分散作用力)，hydrogen bonding (氫鍵作用力)，electrostatic interaction (靜電力)，solvation effect (溶媒效應) 等等 (Joseph-McCarthy, 1999)。

2. Geometric Model

另外一種方式，就是純粹地使用幾何的方法 (Geometric method)，使用小球對受體結構滾動，描述出分子結構的輪廓，判斷表面的凹處，並使用 grid 來描述 molecular volume，並且計算表面位置的分數 (exterior site score)，在較內部的位置，則給予較高的評分，來計算 pocket site (Hendlich et al., 1997)。

如果要用 geometric method 的方式去找出 (預測) binding site，就要先有一個已知同類型的 binding site 做參考，這樣才可以提高其軟體的可行性，目前這樣的軟體，MOE & PASS，可以做為參考。

一般來說，這兩類的研究，其目的與應用有所不同，在已知的活性結合位置，多會採用 Energy model 以動力學與熱力學為基礎，依據其演算法與評分函數來找到較為精確的結合模式與結合部位，作為進一步分析。而使用 Geometric model 的方式，主要用於未知的結合部位，鑑定可能的 pocket，希望藉此快速判定結合部位。

第五節 Glide的簡介

Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics) (Eldridge et al., 1997) program 採用階層過濾的方法，在不同階段採用不同的策略來找尋 ligand 在活性結合部位可能座落的位置。在 ligand 方面會先產生大量的 conformation，經由 heuristic search 的方式，剔除在 position 與 orientation 不合適的 ligand，接著進行 energy minimization，最後使用 GlideScore 來挑選出與 receptor 之間有最佳結合的 pose (註二)。

Glide 首先會以 receptor 為中心點，產生一個 2\AA 的 grid site point，接著針對 ligand conformation 先進行 rough scoring，來挑出最佳的 pose，其挑選過程如下 (圖四)。

- 2a. Diameter test: 先確認在 ligand diameter 的原子與 receptor 之間是否具有太多 steric clashes，過多的 steric clashes pose 將會被剔除掉。
- 2b. Subset test: 旋轉 ligand diameter 約為 15° 的增加量，並對所有能與 site point 之間產生氫鍵，或與金屬原子作用的原子作評分。
- 2c. Greedy scoring: 使用 GlideScore 來對所有原子移動在 $\pm 1\text{\AA}$ 的 X, Y, Z 方向位置作評分。

2d. Refinement: 移動整個 ligand 在 X, Y, Z 方向位置為 $\pm 1\text{\AA}$ 的距離，重新評分並將 5000 個 pose 降低到 400 個 pose 進一步來做 energy minimization。

在 energy minimization 的部分，使用預先計算的 OPLS-AA vdW 與 electrostatic grids。同時在 flexible docking 時，將 torsional angles 最佳化，並使用蒙地卡羅 (Monte Carlo) 的方法來探討低能量 pose 其 torsional minima 的情形。

而 GlideScore 是以 ChemScore (Eldridge et al., 1997) 為主軸架構，加以修改而來，評分函數 (Scoring Function) 屬於 Empirical-base scoring function (Eldridge et al., 1997)，因此，其演算法會偏好於 hydrophobic、hydrogen bonding、metal-ligand interactions 與 steric clashese 之間的作用力。

而在挑選最佳的分子接合結構，是採用結合 Coulomb-vdW energy、GlideScore 與 Internal strain energy 的 model energy score (E model)。另外，Glide 也計算 Coulomb-vdW interaction-energy score，避免過度重視 charge-charge interaction，而忽略 charge-dipole、dipole-dipole interaction。

(註二) Pose: A *pose* is a complete specification of the ligand: its position and orientation.

第六節 高速虛擬藥物資料庫篩選

近年來，利用分子接合配合高速虛擬藥物資料庫篩選，找到一些具有生物活性的分子，已有一些成功的案例 (Shoichet et al., 2002)。然而在進行虛擬藥物資料庫篩選時，有幾點是必須加以探討的，例如：在結構上，我們如何去獲得合理的結構。在分子接合中，ligand 如何與受質的結合部位作用，評分函數是否可以用於這樣的案例當中 (Sternberg et al., 1998)。表三為高速虛擬藥物篩選的流程，從當中可以知道在進行資料庫篩選時，每個階段中，主要的目標與可能遭遇到的問題與限制 (Abagyan and Totrov, 2001)，利用高速虛擬藥物篩選的好處，可以將分子化合物的數量降低，去除一些不合適的化合物，而所得到的少量的化合物，可以進一步作生物實驗，這樣的方式可以加速新藥開發的研究過程。

第三章 材料與方法

第一節 蛋白質分子受體結構的建立

3.1.1 多重序列的比對

從Protein Information Resource (PIR) 中，得到以下序列：Dengue virus type 1 (A42551)，Dengue virus type 2 (GNWVDP)，Dengue virus type 3 (GNWVD3)，Dengue virus type 4 (GNWVDF)，Hepatitis C virus (GNWVTC)，Japanese encephalitis virus (GNWVJS)，Kunjin virus (GNWVKV)，Murray Valley encephalitis virus (GNWVMV)，Tick-borne encephalitis virus (GNWVTB)，Yellow fever virus (GNWVYP)。接著到 <http://workbench.sdsc.edu/>，來進行多重序列比對。其操作流程如下：



1. 首先，必須先申請帳號來登入工作站。
2. 進入工作站後，接著在 Session Tools --> Start New Session。
3. Protein Tools --> Add New Protein Sequence，上傳所有的 Fasta file，並修改一下 description。
4. Protein Tools --> 將所要做 ClustalW 的 sequence 選起來，選下 CLUSTALW-Multiple Sequence Alignment。
5. 按 Submit。

6. 到 Alignment Tools，選剛剛做的 ClustalW，再選底下的 BOXSHADE - Color-Colored Plots of Pre-Alignment Sequences。

7. Submit 後可看到圖，可存下 Download a PostScript version of the output，是.ps 檔，可用 ghostview 看，也可用 Acrobat Distiller 轉成 PDF 檔。

3.1.2 結構重疊比對

在這裡我們使用兩套軟體來做結構重疊比對，第一個使用 CE 來做比對 (http://cl.sdsc.edu/ce/ce_align.html)，其中，在 PDB chain 1 和 chain 2 的文字方塊中打入 1NS3:A (代表只拿 HCV NS3 protease 1NS3 的結晶結構 A chain) 及 1BEF:A (代表只拿 DEN2 NS3 protease 1bef 的結晶結構的 A chain) 就可以看到二個結構的 RMSD 和 sequence identity 部分。

第二個使用 Swiss pdbviewer (Guex et al., 1997)，先 download 1ns3 和 1bef pdb file，都只 show backbone，1ns3 把 chain BCD 關掉，用 Fit --> Magic fit--> Caculate RMS，就可算出 RMSD。

3.1.3 登革熱 NS3 protease 結構

從 PDB 下載得到 1df9 與 1bef 結構，其中 1df9 是與 MbBBI 結合的 bound 結構，而 1bef 則是 unbound 結構。一般來說，unbound protein 其部分原子在未受到受質或抑制劑彼此間的作用，所以，缺少了分子間的作用力，因此，所得到的構形，兩者可能會有些許的不同。為了確定得到的結構是較近於真實的結構，因此，使用 Swiss pdbviewer 將兩者結構去做結構重疊，並比較其活性位置上，是否有所差異。

第二節 分子接合的軟體操作流程

3.2.1 Receptor preparation

Receptor 的結構採用 1df9 A chain 結構，先將其轉成 mae 的檔案型式後，分開兩者受質與 ligand，依照 Glide 操作手冊說明來做前處理的工作。過程中，採用 ligand center 方式來做 grid，接著將 MbBBI ligand 接合到 receptor，評估其結果，若 RMSD 結果不錯，則以此 grid 結構與參數來做為之後的操作依據。

3.2.2 Dengue substrate modeling

用 Swiss pdbviewer 突變的功能，來產生一個序列為 KRSW 的 tetrapeptide，此為登革熱 NS2A/2B 的切割位置，在 Glide 下加氫處理後，拿去與 receptor 作分子接合，藉此探討其接合位置，作為判定參數設定是否合適。由於本論文所採用的 NS3 protease 缺乏 NS2B cofactor 存在，而根據研究指出 (Yusof et al., 2000)，在缺乏 NS2B cofactor 情況下，NS3 protease 亦具有些微活性，substrate 亦能結合到 S1 pocket，並推測 NS2B cofactor，主要為加強 S2 與 S3 pocket (註一) 辨識，在 trans cleavage 扮演重要的角色。

由於 NS2A/2B 是屬與 cis cleavage (Yusof et al., 2000)，而這也是採用 NS2A/2B 來當作 substrate 的原因，希望在缺乏 NS2B cofactor 的 NS3 protease 結構下，能得到較合理的分子接合結果。

3.2.3 Serine ligand test sets

從PDB database中挑選出Serine protease family，剔除相同重複的ligand與protein-protein complex結構，最後得到 53 個已知可以抑制Serine protease 的抑制劑（表四），其中，包含登革熱已知的抑制劑（MbBBI）並加入登革熱的受質（NS2A/NS2B）與 HIV-1 reverse transcriptase抑制劑 1rt1_MKC，將上述 55 個ligand拿去與receptor做分子接合測試，由於程式的限制，rotation bond數目若大於 35 的話，將會被skip掉，之後，將得到的結果，採用E-model排序進行分析。

第三節 小量虛擬資料庫的建立

本論文採用藥物分子資料庫（MDDR database），來當作本實驗中的虛擬資料庫，資料庫的建立，是採用隨機方法，得到394個分子化合物，並加入已知的 NS3 protease 的抑制劑（Dengue 的 MbBBI，HCV 的1dy8_CBZ，1dy9_BOC）與登革熱的 substrate（NS2A/2B），與HIV-1 reverse transcriptase 的抑制劑1rt1_MKC，總共399分子化合物，來當作本論文的小量虛擬藥物資料庫。

第四章 結果

第一節 登革熱 NS3 protease 活性結合部位的鑑定

由於具有非常類似的胺基酸序列的蛋白質，其結構可能具有極相近的功能。因此，經由結構重疊來分析這些胺基酸殘基在三級結構中空間的位置，就有可能找出一些重要的功能區域。

為了確定登革熱 NS3 protease 受體與抑制劑作用的部位，我們利用前述的方法，藉由序列比對的方式，配合文獻資料，與其他的 protease 作比較，找出較具重要性的胺基酸殘基，並將已知具有抑制效果的抑制劑，配合實驗上的結果，來做為判定登革熱 NS3 protease 活性結合部位的依據。從以下的實驗結果，可以得知哪些胺基酸序列是較為重要，找出序列與結構之間的重要的關連性。

圖五為利用多重序列比對，來分析 flaviviruses 病毒的基因序列，可以發現，所有 flaviviruses 中的 Serine protease，在 catalytic traid (His-Asp-Ser) 結構區域，具有高度保存性，Box1-Box3 為 catalytic traid 區域。Box3、Box4 跟 Box5 主要為受質結合的位置，可以看出在這區域內的胺基酸皆具有很高的相同性或同樣性質的胺基酸。

圖六為登革熱 NS3 protease 與 C 型肝炎 NS3 protease 的序列比對結果。序列比對的結果中，global identity 為 17.2%，local identity 則為 36%。圖中綠色的部分為比對後，相符合的胺基酸，藍色的部分則是性質相同的胺基酸，黃色則是沒有對到的部分。雖然兩者序列相似程度低於 25%，但是比較兩者之間重要的胺基酸，就可發現在 catalytic traid 部分，DEN2 已知為 His51-Asp75-Ser135 剛好與 HCV 的 catalytic traid (His57-Asp81-Ser139) 完全互相對應。

此外，在 DEN2 已知受質結合區域內幾個重要的胺基酸 Asp129，Ser131，Gly133，Asn150，Gly153，Ser163 (Murthy et al., 1999)，與 HCV 序列比對中所對應到胺基酸為 Ser133，Leu135，Gly137，Phe154，Ala157，Val167。可以發現，其中，DEN2 Gly133 跟 HCV Gly137 相符合，而 DEN2 Asn150 與 HCV Phe154，DEN2 Gly153 與 HCV Ala157 則是性質相同的胺基酸，以上皆是 HCV 受質結合區域內重要的胺基酸 (Freceer et al., 2004)。不過，在 DEN2 Asn129，Ser131，Ser163 的胺基酸，與 HCV 對應到 Ser133，Leu135，Val167 胺基酸，並沒有任何的相似性，不過，已知 Leu135 也是組成 HCV S1 pocket 的重要胺基酸之一 (Freceer et al., 2004)。

從上面的結果可以說明，登革熱與 C 型肝炎病毒的 NS3 protease 受質的結合區域胺基酸序列互相對應，並且在這些重要的胺基酸位置上，有其相似性，不過，其中幾個重要的胺基酸會有明顯的不同，推測這樣細微的差異，可以讓受體專一性的辨認到合適自己的受質。

為了進一步瞭解這些重要的序列與結構的相對關係，我使用兩者已被公佈的結晶結構來作分析，使用 Swiss pdbviewer 跟 CE 來做結構重疊分析，比較兩者結構的相似度，由圖七與圖八的結果得知，兩者結構之間的 RMSD (root-mean-square deviation) 各為 1.44 與 1.45。接著進一步比較彼此間在活性結合部位的差異，圖九中藍色的部分為 DEN2 的 catalytic traid (His51-Asp75-Ser135)，粉紅色為 HCV 的 catalytic traid (His57-Asp81-Ser139)，可以發現 catalytic traid 的位置，重疊結果兩者位置接近。接著比較序列比對中保留區域的胺基酸，可以發現 DEN2 Gly133, Gly136 胺基酸 (綠色)，皆有重疊到 HCV Gly137, Gly140 的胺基酸 (紅色)。而在 S1 pocket 受質結合區域，黃色胺基酸為 DEN2，橘色的胺基酸則是 HCV，圖中可以明顯看出兩者在 S1 pocket 是略有不同的。

經由序列比對與結構重疊的結果，可以推測登革熱與 C 型肝炎病毒的 NS3 protease 兩者在受質的結合位置雖然可能是十分相似的，但在

辨識受質上，可能會有所差異。以上的結果將會使用在後面作為工具驗證的方法。

目前登革熱已知的結晶結構為 1bef 與 1df9，兩者的差別在於 1df9 是與抑制劑結合的結晶結構，1bef 則只含 NS3 protease。而已知 protease 只有在 extended conformation 情況下才辨識受質與抑制劑，另外，亦有文獻指出 (Cecconi et al., 2001)，folding pathway 可能可以幫助蛋白質抵抗水解或藥物的作用。因此，為了得到較具合理性的 binding mode，將兩者結晶結構去做結構重疊，比較 active site 的胺基酸構形，圖十可以發現兩個結構在活性部位的位置，有所差異。其中，catalytic triad (His51-Asp75-Ser135) 三個胺基酸的構形有所不同，在 S1 pocket 內與受質結合的胺基酸，Ser131，Tyr150，Ser163，也是一樣。其中，以 His 51，Tyr150 的構形改變最大，因為 Tyr150 具有極性的酚基及非極性的芳香環，在極性官能基之間作用力為氫鍵及鹽橋，而在非極性官能基則是 hydrophobic interaction (疏水性作用力) 與 van der Waals (凡得瓦力)。由於芳香環環狀結構較大，推測可能是 hydrophobic interaction (疏水性作用力) 與 van der Waals (凡得瓦力) 所造成的結果。由於兩者結晶結構在活性位置有明顯不同，因此，本論文所採用的結構為 1df9，因其與抑制劑有所結合，結晶結構上，可能會是較符合受質或抑制劑結合的構形。

第二節 檢驗工具軟體正確性並驗證模型結構

4.2.1 結合部位模型的確認

由於所建立的分子結構模型必須被該蛋白質已知的受質或抑制劑，結合到正確已知的位置，才可以得到一個可靠的分子模型。因此，接著將所建立的模型去跟已知的受質與抑制劑去做分子接合來進一步探討與確認模型結構。

圖十一是將登革熱 NS3 protease 跟已知的抑制劑 MbBBI (Mung beans Bowman - Birk Inhibitor) 作分子接合的結果。圖十二的結果顯示，在 Ser135, Gly151, Arg157, Ser163, 有四個氫鍵產生，MbBBI 的 Lys residue 跟 Ser163 之間有氫鍵的作用，顯示 MbBBI 抑制劑有正確接合到 S1 pocket 內，而且抑制劑也與扮演催化功能的 Ser135 有作用。

圖十三是登革熱 NS3 protease 與登革熱 NS2A/2B 受質作用的情形。分子接合的結果顯示，受質接合到 S1 跟 S2 pocket 內 (第十頁 註一)。圖十四為氫鍵的作用位置，可知七個氫鍵分別與登革熱 NS3 protease 作用，接觸位置依序為 His51, Ser131, Gly131, Asn152, Ser163。NS2A/2B 受質與 S1 pocket 內的 Ser131, Ser163 以及 S2 pocket 內的 His51, Asn152 有氫鍵的作用力，這些位置，比對文獻上的結果，可以說明 NS2A/2B 受質與登革熱 NS3 protease 分子接合的結果是可以接受的，因

為受質有嵌合到 S1 跟 S2 的 pocket 內，且跟重要的胺基酸殘基 Ser131 與 Ser163 有所作用。

由以上分子接合結果顯示，使用已知的受質與抑制劑，可以與建立的登革熱 NS3 protease 結構，正確的接合在重要的胺基酸位置上，來加以驗證，確定我們所建立的 NS3 protease 受體結合部位之模型，可以進一步使用在高速虛擬藥物資料庫篩選新的化合物。

4.2.2 小量資料庫掃描測試

要以所建立的活性結合部位結構，去做大量高速虛擬藥物資料庫篩選前，需先實際做小規模的測試。在這裡我們使用了 Serine 家族系列的 protease 抑制劑來做為我們的 test set。選用 Serine protease 抑制劑的原因，是基於由多重序列比對的結果得知 flaviviruses 的 serine protease，在 catalytic triad (His-Asp-Ser) 結構區域，具有高度保存性與其他 serine protease 雖然非常相似，但還是有不同處。因此，抑制劑作用到在催化部位的位置，可能性將會提高。

利用此方式，希望能從結果中找出一些規則，分析 binding site 與抑制劑之間的關係與特性，歸納作為實際挑選 hit 的原則，藉此並確認工具軟體的可信度。此外，希望這樣的資訊亦能提供作為 de novo drug design 的參考。

從 Serine protease 家族的抑制劑中，共得到 53 個抑制劑(表四)，包含 DEN2 及 HCV NS3 protease 抑制劑 (MbBBI, 1dy8_CBZ, 1dy9_BOC) 並混入登革熱 NS2A/2B 受質與 HIV-1 reverse transcriptase 的抑制劑 1rt1_MKC 結構。將這 55 個結構去與登革熱 NS3 protease 結構作分子接合測試。

表五為分子接合排名結果，而抑制劑與登革熱 NS3 protease 氫鍵作用的位置整理於表六。分子接合的結果顯示，登革熱 NS3 protease 的受質 NS2A/2B protein 排名列為第一， MbBBI 抑制劑排名在第七名。C 型肝炎的抑制劑 (1dy8_CBZ, 1dy9_BOC) 則分別排名在第十與第四名。我們以 HCV NS3 protease 1dy8_CBZ 抑制劑為標準，取在這之前的分子化合物來作分析討論。

排名第二的 1a5g_BIC 抑制劑 (圖十五，圖十六) 與 NS3 protease 之間有 6 個氫鍵，分別作用在 NS3 protease 的 Ser131 (兩個氫鍵), Gly133, Gly151, Asn152, Ser163, 由其結果來看，受質有嵌合到 S1 的 pocket 內，並且與 pocket 內的 Ser131 與 Ser163 有三個氫鍵產生，較多的氫鍵作用，可以將結構固定在 S1 的 pocket 內，和登革熱受質 NS2A/2B 相同之處，1a5g_BIC 抑制劑也與 S2 pocket 內的 Asn 152 有氫鍵產生，由 1a5g_BIC 抑制劑接合位置來看，也作用在 S1 與 S2 pocket，其氫鍵數

目高達 6 個，但是其接合位置並沒有與 catalytic site 的 Ser135 有作用，留下足夠活動空間，因此 1a5g_BIC 可能會被分解掉而不能作有效的抑制劑。

1ba8_4res 抑制劑，名列第三。六個氫鍵作用的位置於 Ile 36，Leu98，Leu101，Pro132（兩個氫鍵），Ser135。1ba8_4res 抑制劑作用的位置，非在受質的結合位置，由圖十七及圖十八可以清楚看到，此抑制劑並未與 S1 與 S2 pocket 有所嵌合，加上氫鍵作用的胺基酸位置，跟文獻與實驗上的結果，大為不同 (Brinkworth et al., 1999; (Murthy et al., 1999)。由結構外型上觀之，1ba8_4res 抑制劑並沒有作用在 S1 pocket，但若其六個氫鍵能與結構穩定的作用，加上與催化部位有所反應，或許有可能不會被催化分解掉，這樣的複合結構，阻擋催化部位，或許就能阻止受質與 Ser135 的作用，進而達到抑制的效果。不過，這一部份的假設則需實驗進一步來加以驗證。

HCV 的抑制劑 1dy9_BOC 則排名第四，由圖十九及圖二十可知氫鍵作用位置依序為 Ile36（兩個氫鍵），Ser131（三個氫鍵），Ser135（兩個氫鍵），Gly151，抑制劑雖有與 Ser135 作用，不過，卻沒有與 Ser163 作用，這樣的結果，符合之前序列比對與結構重疊的結果。

排名第五的 1abj_PHE 抑制劑其氫鍵作用位置分別於 Gln35，Ser131，Ser135，Asn152，Ser163，由圖二十一及圖二十二可以知道，抑制劑有接合到 S1 pocket 內與 Ser131，Ser163 與 S2 pocket 內的 Asn152 有氫鍵作用並與 Ser135 有所作用，這樣的結果，可以將此抑制劑列為考量之一。

排名第六的 1hpg_5res 抑制劑，氫鍵作用位置分別於 Ser 34，Ile36，Ser131，Gly133，Thr134，Ser135，結果顯示並沒有作用在 S1 與 S2 的 pocket 內（圖二十三，圖二十四）。

排名第八的 1a4w_4res 抑制劑，氫鍵作用位置分別於 Ser131，Asn152（兩個氫鍵），Gly153，由圖二十五與圖二十六的結果顯示，氫鍵雖同時作用在 S1 與 S2 的 pocket 內，不過在 S1 pocket 內只有一個氫鍵與 Ser131 作用，在分子間的作用力上，貢獻不大，加上並沒有與 Ser135 作用，有可能被催化掉。

排名第九的 1bmm_BM2 抑制劑，氫鍵作用位置分別於 Ile36，Ser131，Gly133，Gly151，Asn152，Ser163，從抑制劑接合的位置來看，皆有作用在 S1 與 S2 pocket，雖氫鍵數目高達 6 個，不過，其接合位置並沒有與 Ser135 有作用，可能會有被催化分解掉（圖二十七，圖二十八）。

排名第十的 HCV 抑制劑 1dy8_CBZ，氫鍵作用位置為 L1e36，Ser 131，Gly133，Gly153（圖二十九，圖三十），結果顯示在 S1 pocket 內並沒有跟 Ser163 與 Ser135 作用，對照先前的結果，可以發現，HCV 的抑制劑與 Ser163 並沒有任何作用。

在Serine ligand set混入 1rt1_MKC當作是negative control。1rt1_MKC是HIV-1 reverse transcriptase的抑制劑，HIV-1 reverse transcriptase分類上是屬於nucleotidyl transferase，與Serine protease 的作用機制不同。其結果顯示其排名在三十七名，兩個氫鍵作用在 Ser135，Gly151（圖三十一，圖三十二）。抑制劑雖有與 Ser135 作用，不過，由於氫鍵數目過少，加上分子結構沒有擋住 S1 pocket，因此無法成為合理的抑制劑。



4.2.3 抑制劑分析與探討

A. 分析這些抑制劑，以結合的位置探討可以分作三類：

a) 抑制劑結合到 S1 pocket 內，與催化部位的 Ser135 胺基酸結合，可能具有抑制的作用：MbBBI，1dy9_BOC，1abj_PHE。

b) 抑制劑結合到 S1 pocket 內，沒有與催化部位的 Ser135 胺基酸結合，可能會與一般受質的情況一樣而被分解：1a5g_BIC，1a4w_4res，1bmm_BM2，1dy8_CBZ。

c) 抑制劑未與 S1 pocket 作用，但有與催化部位結合，加上較多的氫鍵數目，若其排名在受質 NS2A/2B 之前的話，推測應該有抑制的功效，不過需由實驗來證明：1ba8_4res，1hpg_5res。

B. 分析這些抑制劑能正確嵌合到 S1 pocket 內的官能基，為下列兩種

a) Argine 胺基酸殘基：MbBBI，1a5g_BIC，1ba8_4res，1abj_PHE，1a4w_4res，1bmm_BM2。

b) BOC (Tert-Butyloxycarbonyl Group)：1hpg_BOC，1dy9_BOC。

第三節 高速虛擬藥物資料庫篩選

將三個NS3 protease抑制劑（MbBBI，1dy8_CBZ，1dy9_BOC）與 dengue 的受質 NS2A/2B 跟 HIV-1 reverse transcriptase 抑制劑 1rt1_MKC，加入 394 個MDDR 分子化合物中，使用這 399 分子化合物去做高速虛擬藥物篩選。

表七為資料庫篩選後的結果，其排名在 HCV NS3 protease 之前的分子化合物共有 43 個，其分子間氫鍵作用的機團整理在表八，依照先前的結果，用於挑選可能的先趨化合物原則如下：

1. 主要挑選排名在 NS3 protease NS2A/2B substrate 之前的抑制劑。
其次，在 MbBBI 與 NS2A/2B substrate 之間的化合物最可以為參考。
2. 抑制劑的結構必須嵌合在 S1 pocket 內，並與重要的胺基酸 Ser163，Ser131 有所作用，並且在 pocket 內形成的氫鍵數目愈多，才列入考量，在這裡以受質 NS2A/2B 與 MbBBI 為參考，氫鍵數目至少要為 6。
3. 必須與催化部位的 Ser135 有所作用，避免化合物被催化分解掉。

由於，此次 MDDR 分子化合物的數量只有 394 個，結果顯示，登革熱 NS3 protease 的受質 NS2A/2B 排名還是名列第一，在資料庫數量不多的情況下，沒有找到抑制劑比登革熱 NS3 protease 的受質 NS2A/2B 還要更好的篩選結果。

因此，我們根據上述所建立的挑選原則，分析排名在 NS3 protease MbBBI 抑制劑之內並大致符合上述條件的化合物，只有找到一個 MDDR_185536，其五個氫鍵作用位置在 Ile 36 (兩個氫鍵)，Gly133，Ser135，Ser163 (圖三十三)，雖然分子化合物有嵌合到 S1 pocket 內，但是在 P1 位置的胺基酸殘基 Argine 卻只有一個氫鍵與 S1 pocket 內的 Ser163 作用，因此，若能修飾化合物的結構，增加與 S1 pocket 內胺基酸的作用力，可能會是一個具有潛力的先趨化合物。

另外，為了確認在 MbBBI 之後的分子化合物，沒有存在具有先趨化合物的分子結構。我們將排名在 NS3 protease 之外的結構，觀察其氫鍵的數目，若大於 5，將這樣的結構挑出來作分析。分析的結果找到了 MDDR_168500 分子化合物，其有五個氫鍵，分別作用於 Gln35，Ile 36，Gly133，Ser135，Ser163 (圖三十四)。不過，上述兩個化合物都只有一個氫鍵與 S1 pocket 內的 Ser163 作用，所以，這樣的結構，由於在 S1 pocket 內的氫鍵數目不多，因此，皆不列入可能的先趨化合物。

由這樣的結果說明，依照這種方式來挑選化合物，以排名在 NS2A/2B 受質之前的化合物，推測可能都是能與 NS3 protease 正確結合的化合物，其中可能包含會被 NS3 protease 分解，性質類似受質 NS2A/2B 的化合物，另一類型，就是能與催化部位作用，具有抑制效果的化合物。

而排名在受質 NS2A/2B 之後，並無找到適合的化合物，因此，這樣的方法，
可以剔除多數不適合的化合物。



第五章 討論

第一節 登革熱NS3 protease活性位置的鑑定


經由序列比對，結構重疊的方法，比對這些重要的胺基酸序列，可以發現，在所有 flaviviruses 中 catalytic traid 極具保留性，而在受質的結合區域同時也具有高度的保留性。比對文獻的結果與已知抑制劑的結合位置，結果相符合，因此，利用這樣的方式，可用來加以確認可能的活性位置或重要的胺基酸，來做為軟體搜尋的區域。

另外，既然所有的 flaviviruses 的受質的結合位置，在多重序列的比對下，似乎皆有相同的胺基酸，若是這樣，所有具有活性的抑制劑應該對所有的 flaviviruses 有效，皆能與受體結構作用，達到抑制的效果。但由於細部結構及胺基酸的差異，可能在結合的程度上會有差別，由於受質與受體兩者之間反應的第一步，必須先有所接觸，其次，再進行催化反應。而 S1 pocket 內的胺基酸，在決定兩者之間的作用中，扮演重要的角色。例如：在登革熱二型的 NS3 protease，其 S1 pocket 內的 131 位置的胺基酸為 Serine，但是在登革熱一、三、四型，則為 Lysine。這樣的資訊可以提供我們作進一步的分析與設計。因此，利用 S1 pocket 胺基酸的特性，我們可以設計或找到針對受體結構較具專一性或結合能力較強的分子化合物。

第二節 檢驗工具軟體的正確性並驗證模型結構

結合部位模型的確認

從 NS3 protease 與受質 NS2A/2B，抑制劑 MbBBI作用的位置，可以得知，兩者都有作用在 S1 pocket內並與Ser163有所作用。原則上受質與受體結合後，經由催化會被分解掉，而抑制劑與受體結合後，被分解的機會較低而達抑制效果。觀察受質 NS2A/2B 與 catalytic traid 的 Ser135 並沒有作用，基於酵素催化機制，推測 NS2A/2B 受質會被 Ser135分解。而 MbBBI 與Ser135之間有氫鍵存在，藉此抑制Ser135作用，而達到抑制的效果。



本研究以 NS2A/2B 來當作positive control的好處為 NS2A/2B 為天然受質，加上有文獻指出 NS3 protease在缺乏NS2B cofactor，還是具有部分活性，並且無法顯著影響P1胺基酸殘基的結合，推測NS2B cofactor在NS3 protease的作用主要為增加 NS3/NS4A與NS4B/NS5 trans cleavage功能。由於NS2A/2B主要為 cis cleavage，所以使用 NS2A/2B 來當作受質，希望能降低binding mode受NS2B影響的因子。

另外，若能找到比受質 NS2A/2B 更能緊密結合的藥物，僅需要投與較少的劑量，就可以抑制住蛋白質的活性。從經濟上的觀點來看，可以減少花費。另外，其若能與蛋白質結合部位做緊密結合的話，不但可以避免與其他的蛋白質做結合，可以提高專一性，亦可減少副作用或毒性的問題發生。

小量資料庫掃描測試

由分子接合的結果顯示，DEN2 與 HCV NS3 protease 抑制劑，排名皆名列在前十名，說明工具軟體，在 Serine ligand set 中，可以區分出 NS3 protease ligand。加上 1rt1_MKC 的結果排名，在後面幾名。如此，至少確認工具軟體在登革熱 NS3 protease 的模型結構上，作分子接合的結果，是可以被信任的。

在 Serine protease ligand set 中，依結合位置加以分類的結果，其中抑制劑有結合到 S1 pocket 內，並與 Ser135 結合的類型，可以發現，其中一個為 Dengue 的 MbBBI 抑制劑，另一個為 HCV 的 1dy9_BOC，兩者皆是 NS3 protease 的抑制劑。分析另一個 1abj_PHE，判定以這種方式分類得到的化合物，應該可以得到具有抑制效果的化合物，而 Ser135 則是決定化合物是否具有抑制性或被催化分解掉的指標。

另一類有與 Ser135 作用，卻沒有與 S1 pocket 作用，如果具有多數的氫鍵作用力的話，推測其可能也具有抑制的效果，不過，此部分需由實驗來加以驗證。

經由以上的結果，可以確認工具軟體可以區分出 NS3 protease，可以進一步使用在高速虛擬藥物篩選。在分析抑制劑當中，可以找到相同性質的特性與結合位置，這樣的訊息，可以當作實際在高速虛擬藥物篩選時，化合物的挑選參考。

第三節 虛擬藥物資料庫掃描

在實際進行高速虛擬藥物篩選時，基於 consensus scoring function 理論 (Clark et al., 2002)，一般採用多套分子接合軟體，取其交集的部分，來降低 false positive rate，盼能提高分子接合結果準確性。然而有時在資源不足情況之下，無法採用上述方式來進行，加上若要一個人在短時間熟悉多套軟體原理並完全熟悉其操作，是有點困難度。因此，本論文採用 NS2A/2B 受質跟 MbBBI 抑制劑為 positive control，先確認兩者結構在 binding mode 是沒有問題的，以排名在 NS2A/2B 受質之前的化合物為考量的對象，首先，就已經剔除大部分的化合物中，進一步使用在 serine ligand test set 中所建立的挑選原則，來挑選可能的先趨化合物。

另外，排名在 NS2A/2B 受質外的化合物，分析這些結構，其實有些化合物，在構型上可能有相符合，但是可能缺乏較強烈的分子間作用力，或是化合物接合的位置，在 S1 pocket 的附近，但是卻沒有與重要的胺基酸有氫鍵的生成（圖三十五～圖三十七），這些化合物若能加以修改或作進一步的分析，或許也能成為好的先趨化合物。

第六章 結論

使用多重序列比對的方法，可以找到重要的胺基酸序列，配合結構重疊，可以瞭解序列與結構之間的相關性，配合文獻資料，來找到 catalytic triad 與可能受質的結合位置。藉由判定 NS2A/2B 受質與已知的 MbBBI 抑制劑是否能正確接合到 active site 來做為程式參數的調整與工具軟體的確認。

在實際進行高速虛擬藥物篩選前，採用 serine ligand set 的方式，可以歸納出抑制劑的性質，與作用的位置，作為高速虛擬藥物篩選時的參考。最後，進行小量 MDDR 藥物資料庫篩選時，結果顯示雖然沒有一個化合物，排名在 NS2A/2B 受質之前，不過，卻可以剔除多數不適合的分子化合物，將先趨化合物的數量降低，利於生物實驗的進行。