

國立交通大學

生物資訊及系統生物研究所

碩士論文

以官能基為基礎之區域官能基地圖



Moiety-based Site-moiety Map

研究生：許彥超

指導教授：楊進木 教授

中華民國一百年十二月

以官能基為基礎之區域官能基地圖

Moiety-based Site-moiety Map

研究生：許彥超

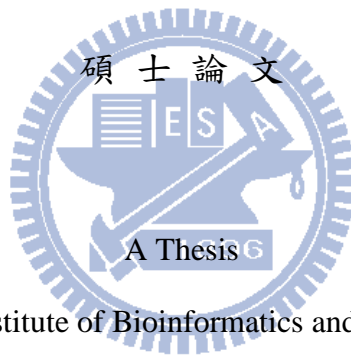
Student: Yen-Chao Hsu

指導教授：楊進木

Advisor: Jinn-Moon Yang

國立交通大學

生物資訊及系統生物研究所



Submitted to Institute of Bioinformatics and System Biology

College of Biological Science and Technology

National Chaio Tung University

in partial Fulfillment of Requirements

for the Degree of Master in

Bioinformatics and System Biology

December 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百年十二月

以官能基為基礎之區域官能基地圖

學生：許彥超

指導教授：楊進木

國立交通大學生物資訊及系統生物研究所碩士班

摘要

了解生物體內生化反應中蛋白質與配體間交互作用的機制，將對藥物設計相關研究有所助益。目前虛擬藥物篩選是電腦輔助藥物設計中相當有效率的策略，能與實驗互補進而有效降低藥物開發成本。由於蛋白質結構的數量快速增加，虛擬藥物篩選也變得更加重要，然而由於蛋白質與配體之間交互作用尚未被完整地理解，導致在預測潛在藥物時常常不準確。

現今大多數的分子嵌合程式是以能量為基礎計分，而這樣的方法經常忽略蛋白質與配體結合區域中的關鍵交互作用區。為了解決此問題，實驗室於先前發展了以化合物為基礎之區域官能基地圖，區域官能基地圖利用蛋白質結晶結構以及大量(大於 1000 個)共結晶或與其嵌合的化合物來描述蛋白質結合區域中官能基偏好以及物理化學特性兩者間的關係，此區域官能基地圖可用來了解蛋白質與配體在結合區域中產生的關鍵交互作用以及其作用機制。然而在建立區域官能基地圖前需要將目標蛋白質與上千個化合物執行分子嵌合步驟，而這個過程需要花費大量時間。此外，以化合物為基礎之區域官能基地圖的結果容易受到所嵌合化合物之官能基組成影響，導致在統計官能基偏好時會侷限於特定官能基。

針對這兩項議題，我們提出一個新的概念：建立以官能基為基礎之區域官能基地圖，經由統計 1382 個 FDA 認證藥物與 6163 個生物體代謝物，發現 34 個經常出現在藥物與生物代謝物中的官能基，再利用這些官能基直接與目標蛋白質執行分子嵌合步驟，而無需嵌合大量化合物，可大幅減少執行時間，而且由於所使用的官能基資料集是經由大量統計現有藥物以及生物代謝物而來，這些官能基可能會是藥物作用或是影響生物體內生化反應的關鍵因素。

我們初步將以官能基為基礎之區域官能基地圖測試在 5 個重要疾病之目標蛋白質上。我們的實驗結果顯示透過嵌合官能基所識別出的錨點常常位於蛋白質與配體結合區域中的關鍵交互作用區，統計結果指出有 82% 的錨點與這 5 個目標蛋白質的受質結合有關，而且 98% 錨點中的胺基酸在演化上具有高度的保存性，推測這些錨點在生物體內生化反應中扮演重要的角色。此外，符合越多錨點數目的化合物通常具有較佳之作用活性。我們相信以官能基為基礎之區域官能基地圖將能幫助藥物發展、藥物最佳化以及快速地了解蛋白質與配體間交互作用之機制。

Moiety-based site-moiety map
student: Yen-Chao Hsu advisor: Dr. Jinn-Moon Yang
Institute of Bioinformatics and System Biology
National Chiao Tung University

Abstract

Understanding the mechanism of protein-ligand interaction is helpful for drug design. Currently, the virtual screening technique is widely used to predict protein-ligand interactions for reducing the cost and time of drug development. In addition, the rapid increase in the number of protein structures has made the success of virtual screening. However, the accuracy of virtual screening remained intensive. One of the major reasons is our incomplete understanding of protein-ligand interactions involved in biological functions and the imprecise scoring functions.

Scoring functions used in virtual screening often ignore key interactions between moieties of compounds and pockets of protein-binding sites, leading a low hit rate. To address this issue, our lab developed a new method, namely compound-based site-moiety map (compound-based SiMMap), to understand the mechanism of protein-ligand interactions and identify the key interactions. A SiMMap utilizes protein structures and numerous docked compounds to describe the relationship between the moiety preferences and the physico-chemical properties of binding site. A SiMMap is composed of several anchors, and each anchor includes three elements: (1) binding pockets (a part of the binding site), (2) moiety preference of the pockets, and (3) pocket-moiety interaction types. SiMMap provides clues to understand key interactions in protein-ligand binding site and their mechanism. However, constructing a SiMMap requires at least 1,000 docked compounds, which is a time-consuming procedure. In addition, the compound-based SiMMap may be biased by moiety compositions of docked compounds.

To address these two issues, we propose a novel method namely moiety-based site-moiety map. We firstly identified the 34 most common moieties in 1,382 FDA-approved drugs or 6,163 metabolites. Then, we replaced the compound docking procedure by docking the 34 relevant moieties to save time. Furthermore, the anchors of the moiety-based site-moiety map could be useful to drug discovery and lead optimization because the moieties are the key features of drug actions and metabolisms.

We initially tested moiety-based site-moiety map on five important disease target proteins: (1) Thymidine kinase, (2) Estrogen receptor, (3) Shikimate kinase, (4)

Dihydrofolate reductase and (5) Rho-associated protein kinase 1. We then examined the anchors of the moiety-based site-moiety maps derived by the docked moieties by biological functions or binding mechanisms. Our results reveal that the anchors often located in key interaction areas of protein-ligand binding sites. For example, in the five target proteins, 82% of anchors are involved in the substrate binding or inhibitor binding, and 98% of anchor residues are highly conserved. These suggest that the anchors may play important roles in biological functions and drug design. In addition, we found that the compounds matching more anchors often have better activities. We believe the moiety-based site-moiety map is useful for drug development, drug optimization, and understanding the mechanism of protein-ligand interaction.



誌謝

彥超要在此感謝許多人的幫助，才能夠完成這篇論文以及碩士學位。

首先我要感謝我的指導教授楊進木老師，老師在研究與教學上，都有極大的熱忱，對於學生也十分有耐心，除了在研究上給予許多指導與方向，在會議上引導大家討論，為我們建立在科學上求真求知的精神，也教導我們許多為人處事的態度。

接著要感謝在碩士班期間實驗室的大家，感謝 PIKI 學長，時常對於研究上遇到的問題給予建議及討論，感謝帶過我的章維學長以及宇書學長，還有同組的伸融在程式相關方面，凌婷、宣人以及仁琥在我最後準備口試時提供許多協助，志達學長跟一原學長也同樣給了許多建議。感謝怡瑋以及其他學弟妹幫忙張羅舉辦口試所需。感謝同屆的力仁、峻宇以及韋帆，我們一起打拼，一起打球。還有永遠的大學長—俊辰學長、阿甫學長、小強學長和怡馨學姊，以及實驗室的大家，很高興能認識你們。

當然還有我最親愛的家人，尤其是我的父母，在我從小到大的求學過程中，始終帶給我最大的支持與鼓勵，不論是我回到台中或是你們來新竹，都帶給我最多的溫暖，讓我能更有活力去面對一切。感謝我的女朋友 Cathy 一路上相互扶持，總是默默地替我加油打氣，陪我度過這些日子。

最後要感謝彭慧玲教授以及楊昶良教授來擔任彥超的碩士學位口試委員，在口試時給予關於本研究的寶貴意見以及之前沒有考慮過的觀點，讓彥超對本研究有更多不同的想法。

總目錄

摘要.....	i
Abstract.....	ii
誌謝.....	iv
總目錄.....	v
表格目錄.....	vi
圖目錄.....	vii
第一章 緒論.....	1
1.1 研究動機與目的.....	1
第二章 材料與方法.....	4
2.1 材料.....	4
2.1.1 官能基.....	4
2.1.2 目標蛋白質.....	4
2.2 方法.....	7
2.2.1 遺傳演算法.....	7
2.2.2 GEMDOCK.....	9
2.2.3 SiMMap.....	10
2.2.4 實驗流程.....	12
2.2.5 驗證.....	16
第三章 結果與討論.....	18
3.1 結果.....	18
3.1.1 官能基.....	18
3.1.2 目標蛋白質.....	21
3.1.2.1 Thymidine Kinase.....	21
3.1.2.2 Estrogen receptor.....	25
3.1.2.3 Shikimate kinase.....	27
3.1.2.4 Dihydrofolate reductase.....	30
3.1.2.5 Rho-associated protein kinase 1.....	33
3.2 討論.....	36
參考文獻.....	39
附錄一 名詞中英對照.....	42
附錄二 FDA 驗證藥物其官能基組成.....	43

表格目錄

表格 一 錨點周圍殘基列表—Thymidine kinase	24
表格 二 錨點周圍重要殘基列表—Thymidine kinase	24
表格 三 錨點周圍殘基列表—Estrogen receptor	27
表格 四 錨點周圍殘基列表—Shikimate kinase.....	30
表格 五 錨點周圍重要殘基列表—Shikimate kinase.....	30
表格 六 錨點周圍殘基列表—Dihydrofolate reductase.....	33
表格 七 錨點周圍重要殘基列表—Dihydrofolate reductase.....	33
表格 八 錨點周圍殘基列表—Rho-associated protein kinase 1	36
表格 九 錨點周圍重要殘基列表—Rho-associated protein kinase 1	36



圖目錄

圖 一	5 個目標蛋白質結構以及其結合區域圖.....	6
圖 二	遺傳演算法中的雜交與突變操作.....	8
圖 三	運用遺傳演算法找尋能量最低位置示意圖.....	9
圖 四	SiMMap 方法流程圖	11
圖 五	目標蛋白質結合區域準備流程圖.....	13
圖 六	識別靜電作用力錨點流程圖.....	14
圖 七	識別四種作用力錨點流程圖.....	16
圖 八	官能基統計數量百分比折線圖.....	18
圖 九	官能基統計數量百分比比例排序圖表.....	19
圖 十	官能基資料集.....	20
圖 十一	錨點位置圖—Thymidine kinase.....	21
圖 十二	錨點與受質位置圖—Thymidine kinase.....	23
圖 十三	錨點位置圖—Estrogen receptor	25
圖 十四	錨點與受質位置圖—Estrogen receptor	26
圖 十五	錨點位置圖—Shikimate kinase	28
圖 十六	錨點與受質位置圖—Shikimate kinase	29
圖 十七	錨點位置圖—Dihydrofolate reductase	31
圖 十八	錨點與受質位置圖—Dihydrofolate reductase	32
圖 十九	錨點位置圖—Rho-associated protein kinase 1.....	34
圖 二十	錨點與受質位置圖—Rho-associated protein kinase 1.....	35
圖 二十一	錨點參與受質結合統計圖表.....	37
圖 二十二	錨點周圍殘基 Consurf 分數圖表.....	37

第一章 緒論

1.1 研究動機與目的

在生物體內的生化反應過程中，蛋白質與配體間交互作用扮演著關鍵的角色，舉例來說，在某些酵素的催化反應以及生化訊號的傳遞鏈中，便有許多蛋白質與配體間交互作用參與其中^{1,2}。蛋白質與配體結合的根本是兩分子間的界面，是由一、蛋白質結合區域，二、配體官能基，以及三、結合區域與官能基間的交互作用所組成³。蛋白質結合區域包括空間上鄰近並且具有特定物化性質的殘基，其會與配體官能基產生交互作用，進而觸發或抑制蛋白質執行其生物體反應。透過了解蛋白質與配體間的界面結合以及其他相關生物機制，將可提供研究者找尋能與目標蛋白質產生交互作用之前導化合物，此為藥物設計初期的重要步驟。因此，若能了解蛋白質與配體間交互作用，將對藥物設計相關研究有所助益。

在電腦輔助藥物設計的相關研究中，虛擬藥物篩選是一個具有前景且具有效率的研究策略⁴⁻⁸。在虛擬藥物篩選的過程中，首先將目標蛋白質對化合物資料庫中數以百萬計的化合物利用分子嵌合程式做分子嵌合⁹⁻¹¹，再利用各種計分方程式根據兩分子間的親和力計算得分並排名，最後將排名頂尖的化合物做篩選後分析或是交由實驗驗證。虛擬藥物篩選之所以能成功並迅速地被接受，可歸納有以下四個原因：第一、有越來越多的蛋白質結晶結構可被取得；第二、結構蛋白質組學的出現；第三、虛擬藥物篩選的數量和速度；以及第四、虛擬藥物篩選對於減少藥物開發成本的貢獻。

由於蛋白質結晶結構的數量快速地增加，虛擬藥物篩選方法在前導化合物搜尋上變得更為重要且更有幫助，許多著名的虛擬藥物篩選程式(例如 GEMDOCK^{9,10}、DOCK¹²、AutoDock¹³ 以及 GOLD¹¹)經證實都能成功地辨識出目標蛋白質的前導化合物。然而由於蛋白質與配體之間交互作用尚未被完整地了解

^{14,15}，導致上述這些程式預測潛在藥物時常常不準確。

現今大多數的分子嵌合程式，是以能量為基礎來計分⁹⁻¹³，然而這樣的計分方式，經常會使篩選出來的化合物偏向於高分子量或者是具有極性的化合物^{14,15}。上述方法經常忽略蛋白質與配體結合區域中的關鍵交互作用區，而這些交互作用力屬性可能會是觸發或抑制生物體反應的重要關鍵。雖然藥物技術曾經被用於找尋關鍵屬性^{14,16,17}，但是此方法需要一群已知具有活性之配體，而這些活性資料必須透過實驗取得，使得應用性大為受限。因此，發展更好的篩選後分析方法去發現關鍵屬性以及了解其相關生物機制才是在虛擬藥物篩選中最重要，而這樣的方法將提供給藥物設計潛在的巨大價值。

為了解決此問題，實驗室於先前的研究中發展了以化合物為基礎之區域官能基地圖的網路服務來推論關鍵屬性³。根據我們的調查，SiMMap 是第一個利用蛋白質結晶結構和其嵌合(或者是共結晶)的化合物來辨識區域官能基地圖的網路服務。區域官能基地圖利用蛋白質結晶結構以及大量(大於 1000 個)共結晶或與其嵌合的化合物來描述蛋白質結合區域中官能基偏好以及物理化學特性兩者間的關係。一張區域官能基地圖是由數個錨點所組成，而每個錨點包含三個元素，分別是第一、數個經常嵌合化合物而與其產生交互作用之孔洞，第二、孔洞對嵌合化合物官能基之偏好，以及第三、孔洞與官能基間交互作用力類型，此區域官能基地圖可用來幫助研究者了解蛋白質與配體在結合區域中產生的關鍵交互作用以及其作用機制。

然而，在建立區域官能基地圖時，需要先對目標蛋白質執行分子嵌合步驟，後取其嵌合位置用以推論結合區域上的關鍵交互作用區，並且至少需要嵌合上千個化合物，其結果才較具統計意義，而這樣的過程需要花費大量時間。此外，以化合物為基礎之區域官能基地圖的結果容易受到所嵌合化合物之官能基組成影響，導致在統計官能基偏好時會侷限於特定官能基。

針對上述這兩項議題，我們提出了一個新的概念：建立以官能基為基礎之區

域官能基地圖，經由統計 1382 個美國食品藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration，簡稱 FDA)認證藥物與 6163 個生物代謝物，發現 34 個經常出現在藥物與生物代謝物中的官能基，接著利用這些官能基直接與目標蛋白質執行分子嵌合步驟，而無需嵌合大量化合物，可大幅減少執行時間，而且由於所使用的官能基資料集是經由大量統計現有藥物以及生物代謝物而來，這些官能基可能會是藥物作用或是影響生物體內生化反應的關鍵因素。



第二章 材料與方法

2.1 材料

根據我們的研究目標，所準備的實驗材料包括官能基以及目標蛋白質結合區域。

2.1.1 官能基

首先，在官能基資料集部分，基於對藥物設計的需求，從 DrugBank(<http://drugbank.ca/>)網站取得共 1382 個 FDA 認證藥物資料以及從 KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)網站取得共 6163 個生物體代謝物資料，並且根據生物體代謝物的定義：生物體代謝物是生物體在新陳代謝過程中所產生的中間物以及產物，挑選至少一次出現在任何一個 KEGG 網站上所記錄之生化反應中的化合物，才確認其為生物體代謝物。接著使用 checkmol(<http://merian.pch.univie.ac.at/~nhaider/cheminf/cmmm>)程式來計數上述這些化合物的各種官能基的數量組成，checkmol 總共定義了 204 個官能基，觀察其中是否有大量存在的官能基，以做為初步挑選官能基資料集的參考依據。

2.1.2 目標蛋白質

我們實做本研究在 5 個有蛋白質結構資料的目標蛋白質上，這些蛋白質的 PDB(Protein Data Bank)代碼(蛋白質名稱)分別為 1KIM¹⁸ (Thymidine kinase, 胸苷激酶)、3ERT¹⁹ (Estrogen receptor, 細胞核接受器)、1ZUH²⁰ (Shikimate kinase, 莽草酸激酶)、1HFR²¹(Dihydrofolate reductase, 二氫葉酸還原酶)以及 2ETR²²(Rho-associated protein kinase 1, Rho 相關蛋白激酶一)。

以下對這些目標蛋白質做簡單的介紹：圖 一是這 5 個目標蛋白質結構以及

其結合區域圖，會在後續章節說明選取目標蛋白質結合區域的過程。

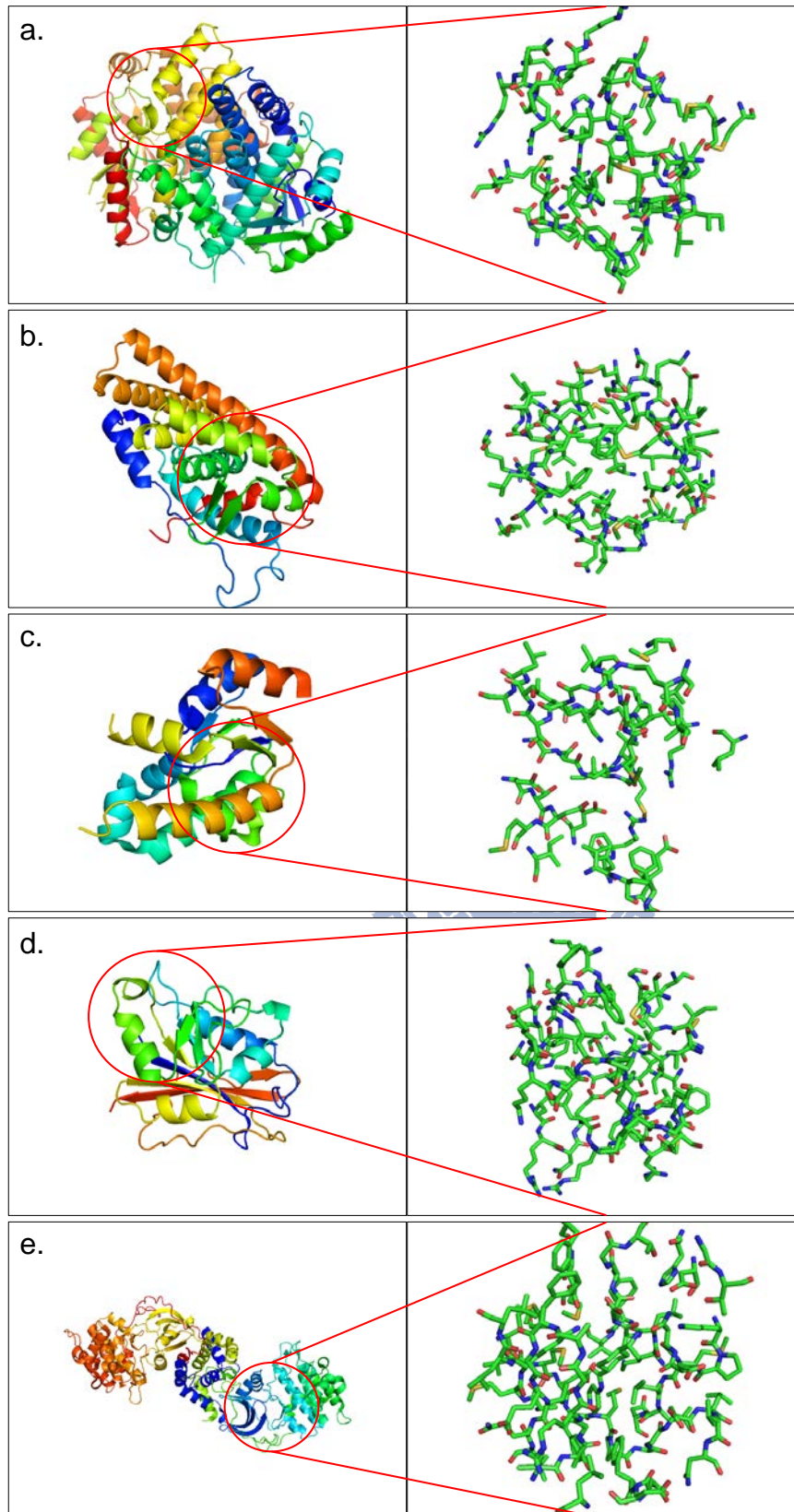
PDB 代碼 1KIM：此結構所結晶之蛋白質是單純皰疹病毒的一個轉移酶²³，稱為胸苷激酶(Thymidine kinase)。根據基因本體論(Gene Ontology)對此蛋白質的註解：參與 DNA 複製相關之生物路徑，其生化功能則是核苷酸結合。而且胸苷激酶是一個在由治療第一型單純皰疹病毒所引起之疾病的藥物目標蛋白質。

PDB 代碼 3ERT：此結構所結晶之蛋白質是人類的一個細胞核接受器蛋白質²⁴，稱為雌激素受體(Estrogen receptor)。根據基因本體論對此蛋白質的註解：其細胞位置位於細胞核中，參與轉錄調控以及與 DNA 相關之生物路徑，其生化功能則是 DNA 結合。另外有研究指出雌激素受體是一個用於治療骨質疏鬆以及乳癌的重要目標蛋白質²⁴。

PDB 代碼 1ZUH：此結構所結晶之蛋白質是幽門螺旋桿菌的一個轉移酶¹⁰，稱為莽草酸激酶(Shikimate kinase)。根據基因本體論對此蛋白質的註解：其細胞位置位於細胞質中，參與磷酸化相關之生物路徑，其生化功能則是核苷酸結合。由於莽草酸激酶所參與之生物路徑不存在哺乳類體內，因此有潛力成為發展新型抗菌劑的目標蛋白質。

PDB 代碼 1HFR：此結構所結晶之蛋白質是人類的一個氧化還原酶，稱為二氫葉酸還原酶(Dihydrofolate reductase)。根據基因本體論對此蛋白質的註解：其細胞位置位於細胞質與核質中，參與氧化還原相關之生物路徑，其生化功能則是藥物結合。

PDB 代碼 2ETR：此結構所結晶之蛋白質是人類的一個轉移酶，稱為 Rho 相關蛋白激酶一(Rho-associated protein kinase 1)。根據基因本體論對此蛋白質的註解：參與蛋白質胺基酸磷酸化之生物路徑，其生化功能則是蛋白質激酶作用。



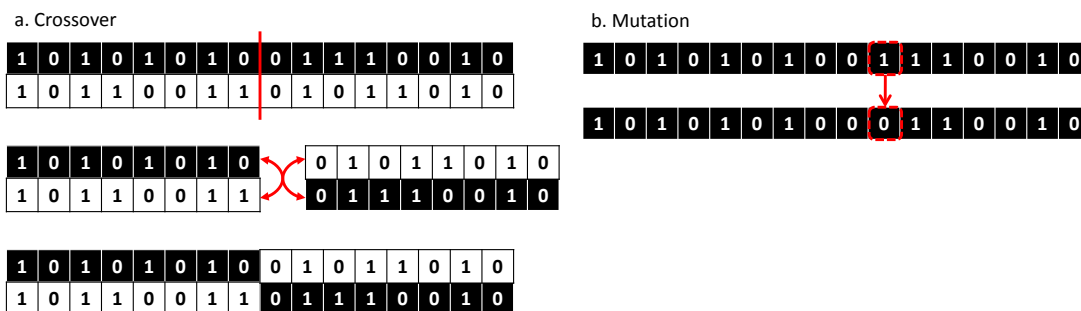
圖一 5 個目標蛋白質結構以及其結合區域圖。圖 a. 為 Thymidine kinase(PDB 代碼 1KIM)，圖 b. 為 Estrogen receptor(3ERT)，圖 c. 為 Shikimate kinase(1ZUH)，圖 d. 為 Dihydrofolate reductase(1HFR) 以及圖 e. 為 Rho-associated protein kinase 1(2ETR)。

2.2 方法

2.2.1 遺傳演算法

遺傳演算法(Genetic algorithm)²⁵ 是電腦科學領域中一套模擬生物體在自然演化的過程而發展出來的演算法，這套演算法的概念最早是在 1970 年代由一位美國科學家 John H. Holland 所提出。遺傳演算法由於擁有在運算過程中，得到的解可能會不斷地進化的特性，因而經常被運用在產生近似最佳解問題以及搜尋問題上。遺傳演算法模擬了生物體在自然演化過程中表現的某些特徵，其中包括了族群、世代、親代與子代、雜交、突變以及適者生存等用語或概念。

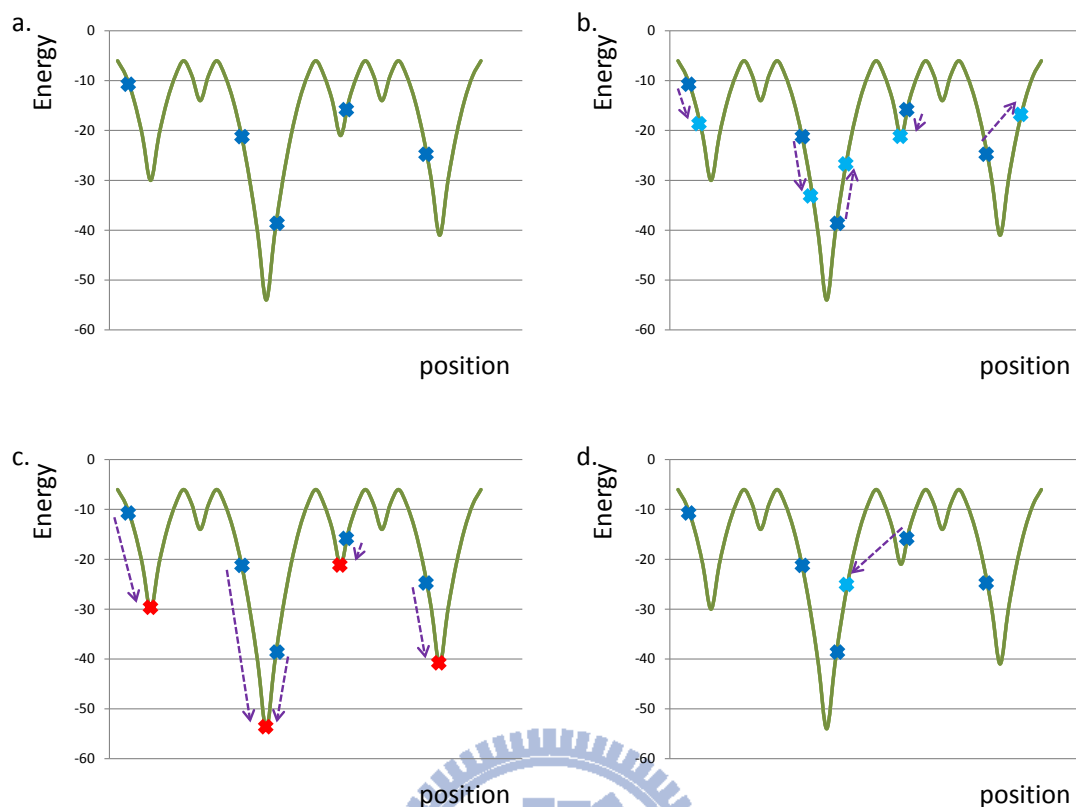
將以上這些生物學上的用語對應到電腦科學的問題上：族群對應到電腦問題上就是候選解群，指的是在運算過程中所產生的解之集合；世代對應的是要執行多少次產生新解的過程，一般而言，在解集合收斂之前，越多世代意謂可以得到越好的解，但由於有執行時間及儲存空間等其他考量，還是必須有所取捨；親代與子代則是對應到目前的候選解群與經過雜交或突變等操作後所產生出來的新候選解群，這兩組前後候選解群彼此的互稱；圖 二圖 a. 中雜交是模仿生物體在繁殖過程中精卵結合時染色體的配對，選擇候選解群中的兩個解，交換彼此部分的位元組，進而產生出新的解；圖 二圖 b. 中突變則是將候選解群中的某些解，改變其某一位元(從 0 變 1 或從 1 變 0)，可能可以得到原候選解群如何配對雜交都無法產生的新解；適者生存對應到適應性函數，此函數是用來評估候選解群中個體的優劣，以決定哪些解須保留，哪些解該捨棄，就像是生物演化過程中的天擇。遺傳演算法主要就是藉著上述幾個操作來解決最佳解或搜尋問題。



圖二 遺傳演算法中的雜交與突變操作。圖 a. 為雜交：將兩個解以位元方式呈現，交換雙方半數的位元成為新的解；圖 b. 為突變：將一個解中的一個位元由 1 變成 0 或由 0 變成 1 (圖中為第 10 個位元由 1 變 0) 成為新的解。

將遺傳演算法的概念套用到我們的問題上，如圖三所示，假設這是某一官能基在某一蛋白質結合區域中不同位置所計算出來的能量分布示意圖。x 軸代表的是此官能基在結合區域中的位置，y 軸代表的則是此官能基與蛋白質結合區域中的殘基之間的交互作用力所計算出來的能量，能量越低表示此官能基在該位置越穩定，能與附近結合區域上的殘基產生交互作用。綠色線代表的是該官能基在結合區域中所有位置的的能量分布曲線，也就是如果要尋找該官能基在結合區域中最低能量位置，所有的解構成的解集合。

假設我們將遺傳演算法中的族群數設為 5，如圖三圖 a. 所示，一開始在所有位置中隨機挑選 5 個位置做為初始族群，散布在解集合中，就是圖上 5 個藍點的位置。經過雜交運算過程產生 5 個 (也可設定成更多個) 下一世代的解，如圖三圖 b. 上淺藍色的點所示，這群子代經過適應性函數評估，可能可以得到比親代更好的解，當然也可能產生比親代差的解，子代嵌合位置的的能量可能比親代高或比親代低，然後我們從這 10 個解中，留下 5 個較好的解做為新的族群個體，維持族群大小，繼續下一輪的運算。理論上來說，經過足夠多的世代運算過程之後，我們預期族群分布會如圖三圖 c. 上紅點所示，逐漸接近區域最小值或總體最小值，也就是嵌合位置將會是結合區域中，交互作用力能量較低或最低的位置。圖三圖 d. 表示透過突變運算過程，可能可以得到跳躍較大的解，加快演化速度。



圖三 運用遺傳演算法找尋能量最低位置示意圖。圖 a.：5 個初始解族群分布；圖 b.：利用遺傳演算法產生新解；圖 c.：理想狀況下，解族群最後分布在區域最小值或總體最小值；圖 d.：利用遺傳演算法中的突變產生跳躍解。

2.2.2 GEMDOCK

本研究利用 GEMDOCK 做為官能基與目標蛋白質嵌合時所使用的分子嵌合程式。

GEMDOCK(Generic Evolutionary Method for molecular DOCKing)是一套用於計算在目標蛋白質活性區域中配體之構形與位向的程式。GEMDOCK 利用 PLP(piecewise linear potential, 分段線性潛力)來衡量蛋白質與化合物之間的分子間潛在能量。

針對本研究的需要，我們對原來的 GEMDOCK 程式做了一些調整，原來的 GEMDOCK 預設輸出是透過遺傳演算法運算，將最後一個世代中能量最低的嵌合位置輸出做為嵌合位置結果，在本研究中，希望在遺傳演算法運算過程中，記

錄下能量低於一特定能量之所有嵌合位置，做為之後 SiMMap 識別錨點使用。對於不同類型的官能基錨點，使用不同的篩選條件，將在後續章節敘述。

2.2.3 SiMMap

本研究利用 SiMMap 做為使用官能基嵌合位置識別作用力錨點的工具。

SiMMap 是實驗室於 2010 年發表在 NUCLEIC ACIDS RESEARCH 的網路服務。SiMMap 利用蛋白質結晶結構以及大量(大於 1000 個)共結晶或與其嵌合的化合物來描述蛋白質結合區域中官能基偏好以及物理化學特性兩者間的關係。一張區域官能基地圖是由數個錨點所組成，而每個錨點包含三個元素，分別是第一、數個經常嵌合化合物而與其產生交互作用之孔洞，第二、孔洞對嵌合化合物官能基之偏好，以及第三、孔洞與官能基間交互作用力類型，分為靜電作用力、氫鍵作用力以及凡得瓦作用力三種。

圖 四是 SiMMap 建立區域官能基地圖的流程圖：步驟一是準備目標蛋白質的結構以及它的配體嵌合(或是共結晶)位置，通常配體的數量建議是在 600 至 1000 個；步驟二是產生蛋白質與化合物交互作用剖繪並且識別化合物的官能基；步驟三是藉由識別產生交互作用重要的殘基與官能基($Z\text{-score} \geq 1.645$)取得錨點候選人；步驟四是藉由將鄰近且具有相同類型的錨點候選人分群合併決定錨點。針對每個錨點，識別它的結合孔洞、產生交互作用的重要殘基、官能基偏好以及錨點類型；步驟五是確定區域官能基地圖與錨點，並且對化合物重新計分；步驟六是輸出圖形化區域官能基地圖，錨點包含官能基結構與組成比例，以及孔洞與官能基之間的交互作用。

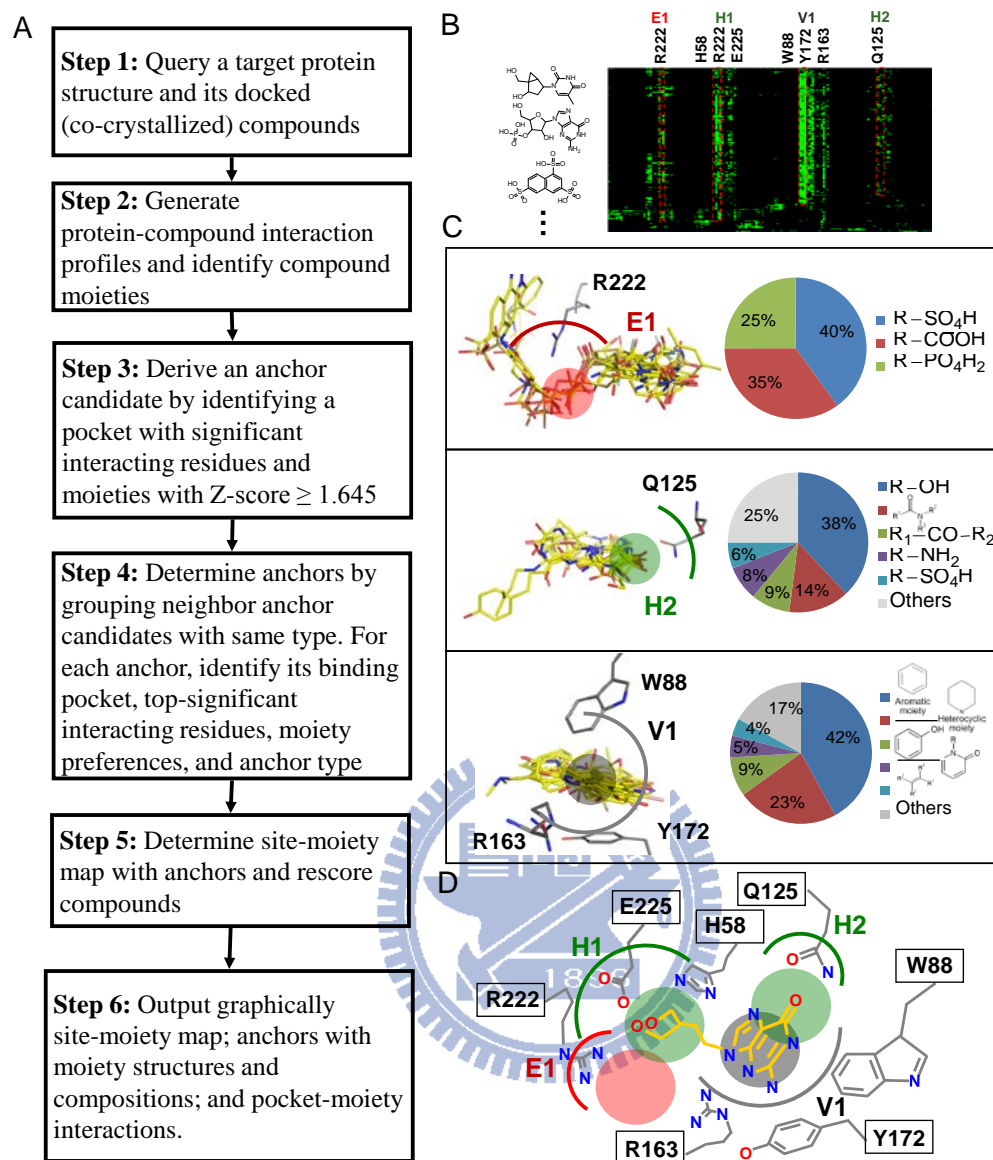


圖 四 SiMMap 方法流程圖。圖 A：SiMMap 步驟流程；圖 B：嵌合化合物與殘基的交互作用剖面繪；圖 C：錨點—包含孔洞、官能基偏好組成以及作用力類型(E, H, V)；圖 D：區域官能基示意圖。

在本研究中，利用 SiMMap 將配體嵌合位置經過一系列計算統計產生錨點的流程，使用官能基嵌合位置來取代配體嵌合位置，透過 SiMMap 識別不同類型的官能基產生不同類型的錨點，也就是說，使用靜電作用力類別官能基來決定靜電作用力錨點；使用氫鍵作用力類別官能基來決定氫鍵作用力錨點；使用凡得瓦作用力類別官能基來決定凡得瓦作用力錨點。另外根據過去對於區域官能基地圖的觀察，發現氫鍵作用力錨點與凡得瓦作用力錨點經常在同一孔洞中伴隨出現，因此我們另外定義了新類型的錨點—氫鍵與凡得瓦作用力錨點。

總結來說，SiMMap 利用配體嵌合位置產生三種交互作用力的錨點，分別是靜電作用力、氫鍵作用力以及凡得瓦作用力；在本研究中，則是利用官能基嵌合位置取代配體嵌合位置產生四種交互作用力的錨點，其中三種與 SiMMap 相同，另外新增氫鍵與凡得瓦作用力錨點。

2.2.4 實驗流程

首先，我們需要準備目標蛋白質的結合區域，在圖 五中以 Thymidine kinase 為例說明，從 PDB 的網頁(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)下載 PDB 代碼為 1KIM 的 Thymidine kinase 結晶結構檔案，此結晶結構有 A 鏈和 B 鏈兩條結晶鏈，挑選 B 鏈，利用 Swiss-PdbViewer²⁶ 程式選取 B 鏈結構中的配體 THM 周圍 8Å 區域內蛋白質的殘基，做為目標蛋白質的結合區域。目標蛋白質結合區域的準備流程—以 Thymidine kinase (PDB 代碼 1KIM) 為例：圖 五圖 a. 是 PDB 代碼為 1KIM 的蛋白質結構，包含 A 鏈(藍色)與 B 鏈(綠色)，挑選其中 B 鏈如圖 五圖 b. 所示，B 鏈中有一受質 THM 在圖 五圖 c. 中以紫色標示，以 THM 為球心向外延伸 8Å 的距離所包含的殘基如圖 五圖 d.，將以這些殘基做為 Thymidine kinase 的結合區域。

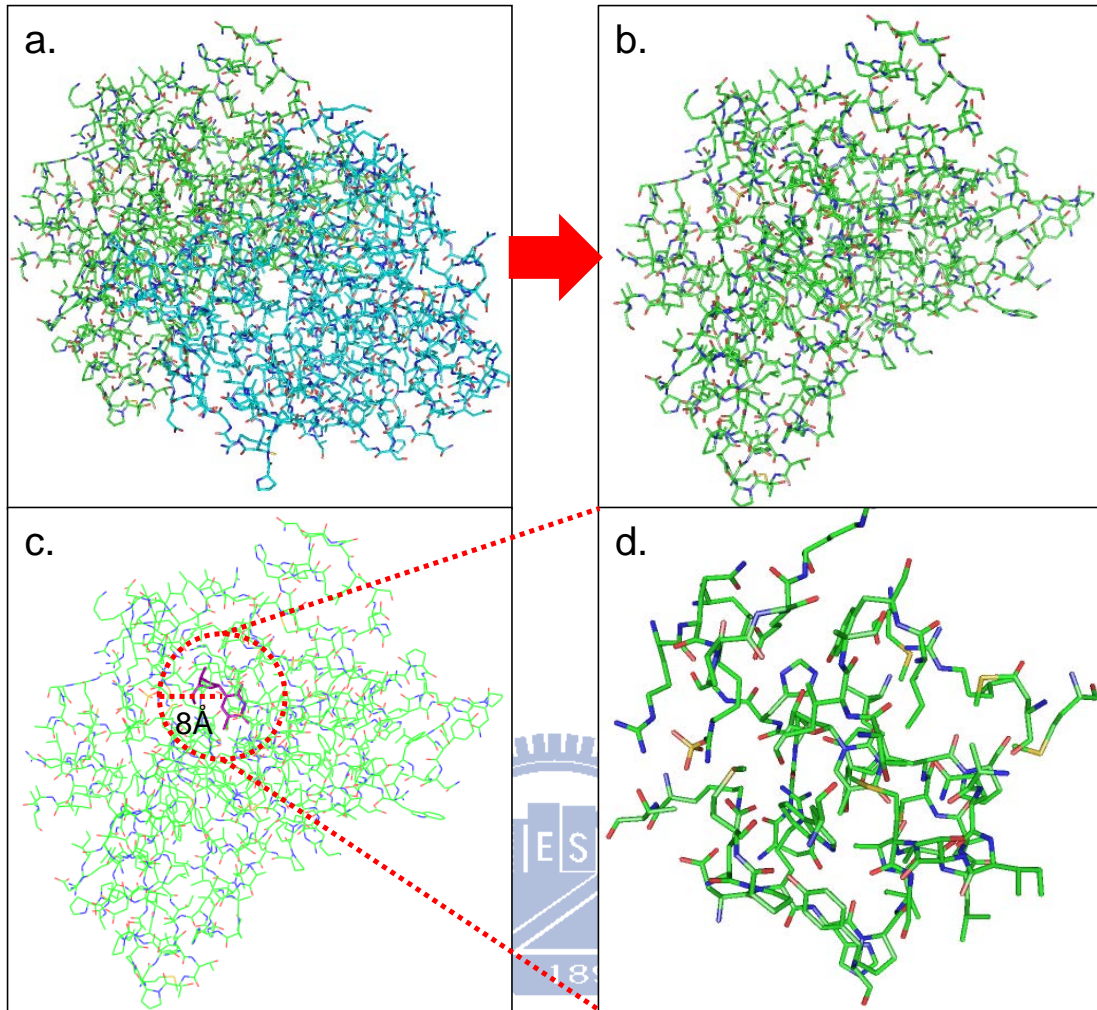
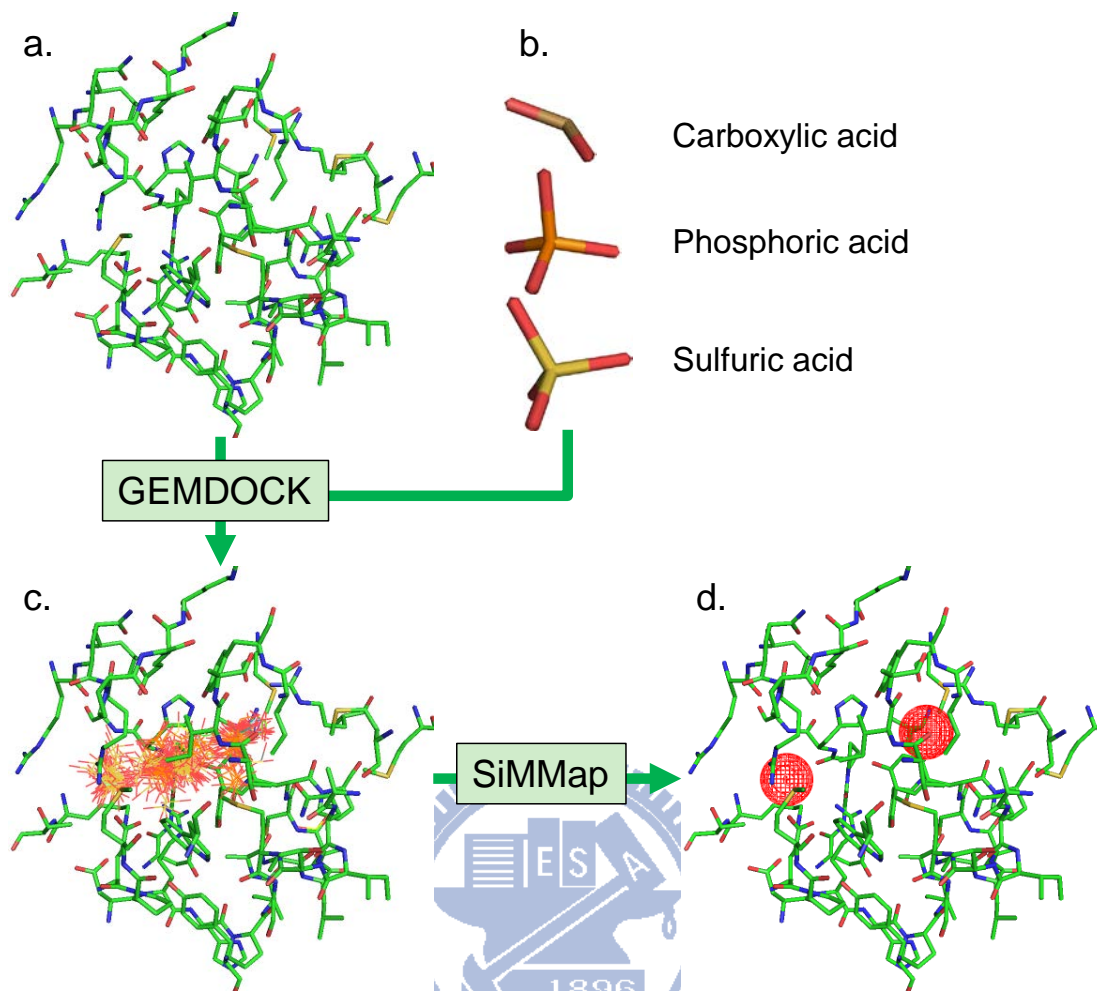


圖 五 目標蛋白質結合區域準備流程圖。以 Thymidine kinase(PDB 代碼 1KIM)為例，圖 a.：1KIM 蛋白質結構圖(A 鏈以藍色標示，B 鏈以綠色標示)；圖 b.：1KIM 中的 B 鏈結構圖；圖 c.：B 鏈中的受質 THM(以紫色標示)；圖 d.：受質周圍 8Å 距離內殘基圖，將以這些殘基做為 Thymidine kinase 的結合區域。



圖六 識別靜電作用力錨點流程圖。圖 a. 為目標蛋白質 Thymidine kinase 的結合區域；圖 b. 為 3 個靜電作用力類型官能基；圖 c. 為使用 GEMDOCK 執行分子嵌合後，靜電作用力類型官能基嵌合位置；圖 d. 為利用 SiMMap 識別出 2 個靜電作用力錨點。

識別四種作用力錨點流程，以識別靜電作用力錨點為例說明如圖六：將目標蛋白質 Thymidine kinase 的結合區域(如圖六 a.)和 3 個靜電作用力類別官能基(如圖六 b.)做為分子嵌合程式(GEMDOCK)的輸入，篩選出通過我們所設定的最低能量限制的輸出結果，可得到靜電作用力類別官能基在 Thymidine kinase 的結合區域中嵌合位置(如圖六 c.)。接著再將這些嵌合位置做為 SiMMap 程式的輸入，識別出 2 個靜電作用力類別官能基的錨點(如圖六 d.)。

所設定的能量篩選條件，分成靜電作用力、氫鍵作用力與凡得瓦作用力，在靜電作用力類型官能基，設定靜電作用力能量小於等於-1.5，其他作用力能量小於等於 0；氫鍵與凡得瓦作用力類型官能基，設定氫鍵作用力能量小於等於-1.0，

凡得瓦力能量小於等於-10.0，其他作用力能量小於等於0；氫鍵作用力類型官能基，設定氫鍵作用力能量小於等於-1.0，其他作用力能量小於等於0；凡得瓦作用力類型官能基，設定凡得瓦力能量小於等於-10.0，其他作用力能量小於等於0。

執行完上述的操作，可以得到靜電作用力類別官能基的錨點，接著還要再識別其他三種類別官能基的錨點。我們假設在蛋白質結合區域中，會有某些特定子區域偏好與某一種類別的官能基產生交互作用，換句話說，希望識別出來的這四種類型官能基的錨點，彼此之間的距離不要太近，而能在蛋白質結合區域不同的子區域中，出現這些不同類型的錨點。同時也根據一般對於這四種類型作用力重要性的認知，制訂了識別錨點的順序如下：靜電作用力→氫鍵與凡得瓦作用力→氫鍵作用力→凡得瓦作用力，依照這樣的順序做分子嵌合以及識別錨點，圖 七繼續以 Thymidine kinase 為例，說明識別四種類型官能基錨點的過程：以 Thymidine kinase 的結合區域(如圖 七 a.)和靜電作用力類型官能基做為分子嵌合程式的輸入，加上一些對輸出結果最低能量限制的篩選條件，可以得到靜電作用力類型官能基在 Thymidine kinase 的結合區域中的嵌合位置(如圖 七 b.)，再將這些嵌合位置做為 SiMMap 程式的輸入，可識別出 2 個靜電作用力類別官能基的錨點(如圖 七 c.)。接著我原本的 Thymidine kinase 的結合區域中的 2 個靜電作用力類別官能基錨點，各擺上一個磷(P)原子，目的是為了阻塞住這個孔洞，讓接下來嵌合其他類別的官能基，不會嵌合到此孔洞，再以這樣的結合區域和氫鍵與凡得瓦作用力類別官能基利用分子嵌合程式可以得到氫鍵與凡得瓦作用力類型官能基在 Thymidine kinase 的結合區域中的嵌合位置(如圖 七 d.)，再透過 SiMMap 可識別出 2 個氫鍵與凡得瓦作用力類別官能基的錨點(如圖 七 e.)。重覆上述的步驟操作在氫鍵作用力類型官能基以及凡得瓦作用力類型官能基上，可依序得到 2 個氫鍵作用力類型官能基錨點以及 1 個凡得瓦作用力類型官能基錨點。因此，經過四次嵌合與四次識別錨點流程之後，在 Thymidine kinase 的結合區域上，識

別出四種作用力類型官能基共 7 個錨點(如圖 七 f.)。

由於在篩選嵌合位置時有設定最低能量限制，導致在嵌合程式執行過程中有可能會出現沒有嵌合位置輸出結果或是只有少量結果，當 SiMMap 程式在判斷是否有錨點存在時，會考慮該處附近聚集嵌合位置的數量與整個結合區域中所有嵌合位置的比例，要是附近的嵌合位置數量不足，將不一定會有錨點被識別。也就是說，在建立四種類別官能基錨點的過程中，如果有某種類別官能基沒有被識別出錨點，那就會省略阻塞孔洞的這項步驟，直接拿取原來的結合區域與下一種類別官能基做嵌合，而繼續操作識別四種類別官能基錨點的步驟。

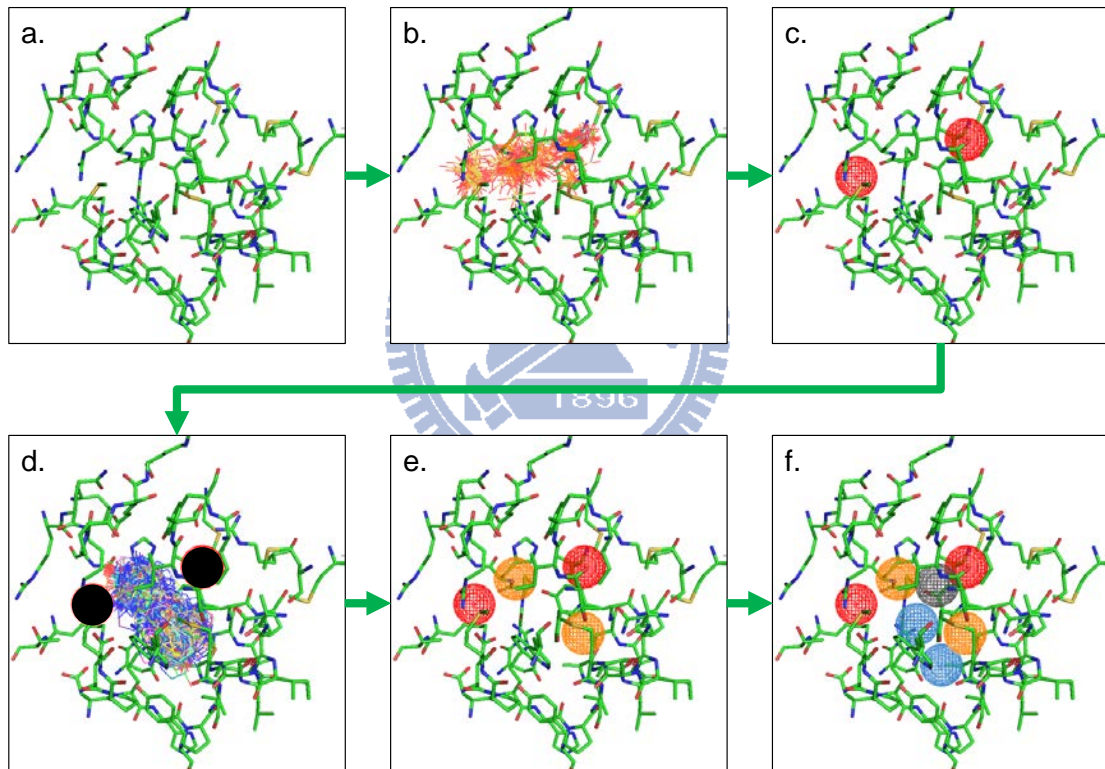


圖 七 識別四種作用力錨點流程圖。圖 a.為目標蛋白質 Thymidine kinase 的結合區域；圖 b.為靜電作用力類型官能基嵌合位置；圖 c.為 2 個靜電作用力錨點；圖 d.為阻塞 2 個靜電作用力錨點，氫鍵與凡得瓦作用力類型官能基嵌合位置；圖 e.為 2 個靜電作用力錨點以及 2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點；圖 f.為四種作用力錨點。

2.2.5 驗證

我們將從以下三個分析構面驗證這些錨點的合理性，分別是第一、從與目標

蛋白質結合的受質來觀察錨點所在的位置，以及第二、從錨點周圍的殘基在演化上的保存性來觀察，還有第三、錨點周圍的殘基是否為結合區域中，參與催化反應殘基或是其他文獻上被記錄為重要的殘基，將運用上述的方式來證明由本研究所識別出的錨點，會具有一定的生物意義。

其中關於殘基在演化上的保存性，利用 ConSurf(<http://consurf.tau.ac.il/>)²⁷ 網站所計算目標蛋白質上每個殘基的保存分數，此網站提供使用者輸入蛋白質結構，透過 PDB 註記將輸入蛋白質結構轉成蛋白質序列，利用 PSI-BLAST 蒐集輸入蛋白質的同源蛋白質序列，接著利用 MUSCLE²⁸ 或 CLUSTAL-W²⁹ 做多重序列比對 (MSA)，再利用 MSA 結果產生這些同源蛋白質序列的演化樹，再依照此演化樹來計算輸入蛋白質上每個殘基的保存分數。ConSurf 所定義的記分系統是 1 至 9 分：若分數是在 1 至 3 分的殘基，會被認為是在演化上變動較大的，是低保存性的殘基；若分數是在 7 至 9 分的殘基，則會被認為是在演化上變動較小的，也就是具有高度保存性的殘基，而這樣的殘基可能會是結合區域中，相對較為重要的殘基。

至於在結合區域中，參與催化反應的殘基，則是查詢 Catalytic Site Atlas(<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>)³⁰ 網站，此網站是一個資料庫，記錄具 3D 結構之酵素的活化區和催化反應殘基，CSA 包含兩種類型的條目：第一類是原始人工註解條目，主要來自文獻；第二類是同源條目，是由第一類條目透過 PSI-BLAST 之比對所找到的同源蛋白質加以註解。由於該資料庫所收錄之蛋白質多為酵素，若目標蛋白質非酵素，我們另外還參考了在 UniProt(<http://www.uniprot.org/>) 網站上所註記蛋白質上重要的活化區以及重要的殘基。

第三章 結果與討論

3.1 結果

3.1.1 官能基

圖 八是統計 1382 個 FDA 認證藥物以及 6163 個生物體代謝物兩個資料集中由 checkmol 所定義之 204 個官能基出現的次數：其中 x 座標軸代表的是由 checkmol 所定義的官能基編號，y 座標軸則是具有該官能基的化合物在資料集中所占百分比，藍色線所代表的是 FDA 認證藥物的分布線，而紅色線所代表的則是生物體代謝物的分布線。

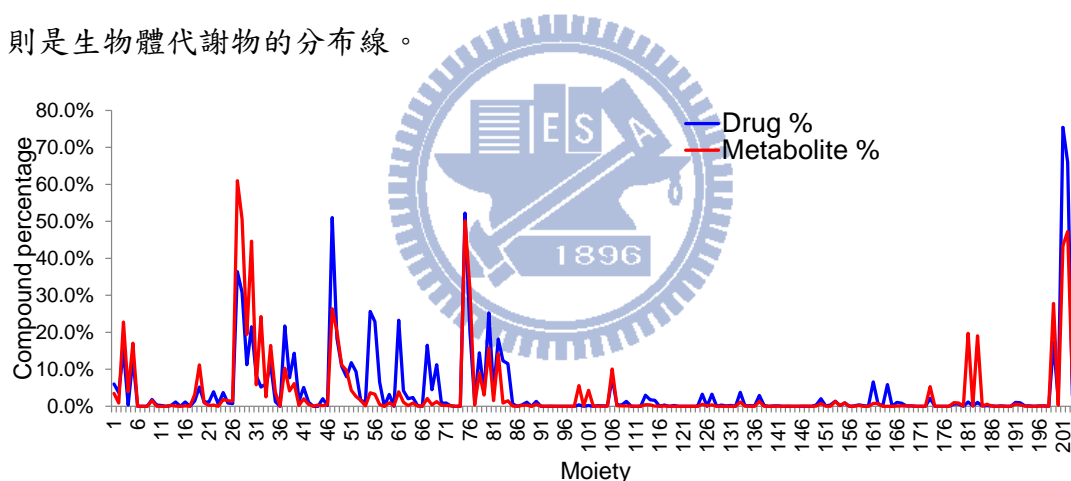


圖 八 官能基統計數量百分比折線圖。x 軸為 checkmol 所定義之官能基編號，y 軸為具有該官能基的化合物在資料集中所占百分比，藍線為 FDA 認證藥物資料集分布線，紅線為生物代謝物資料集分布線。

接著把這兩項百分比取其平均值做為排序索引，其中平均值大於 10% 的官能基共計有 14 個，條列在圖 九圖表中：可以看到前三名的官能基百分比平均值都超過了 50%，它們分別是芳香環族化合物(aromatic compound)、雜環族化合物(heterocyclic compound)以及羧基酸衍生物(carboxylic acid deriv.)，所占百分比平均值分別為 59.4%、56.6% 以及 51.2%。















Rank	Moiety name	Drug %	Metabolite %	Average %	
1	aromatic compound	75.4%	43.5%	59.4%	
2	heterocyclic compound	66.0%	47.2%	56.6%	
3	carboxylic acid deriv.	52.2%	50.1%	51.2%	
4	hydroxy compound	36.4%	61.0%	48.7%	
5	amine	51.0%	26.4%	38.7%	
6	carboxylic acid	20.2%	31.6%	25.9%	
7	alkene	17.2%	27.8%	22.5%	
8	carboxylic acid amide	25.3%	15.7%	20.5%	
9	prim. amine	18.4%	20.2%	19.3%	
10	ether	21.7%	10.3%	16.0%	
11	phenol	11.4%	16.5%	13.9%	
12	halogen deriv.	23.2%	3.9%	13.6%	
13	carboxylic acid ester	14.5%	9.0%	11.7%	
14	phosphoric acid deriv.	1.2%	19.7%	10.4%	

圖 九 官能基統計數量百分比比例排序圖表。欄位由左至右依序為排名、官能基名稱、在藥物資料集中所占百分比、在生物代謝物資料集中所占百分比、前兩項百分比平均值以及該官能基結構圖。

除了以上統計 FDA 認證藥物及生物體代謝物而得到在這兩個資料集中大量存在的官能基之外，另外根據實驗室的知識及經驗，將經常存在 20 個胺基酸以及在一些激酶抑制劑上的官能基，加入到官能基資料集中。挑選了以上兩個資料集任一資料集中，官能基百分比大於 10% 的官能基共有 16 個(含有鹵素原子的官能基不計)，另外從 20 個胺基酸以及激酶抑制劑上挑選 11 個常見的官能基，接著考量到靜電作用力官能基較少，加入硫酸官能基，以及 6 個純粹由碳原子所構成的長鏈或環，最後總共挑選了 34 個官能基做為官能基資料集如圖 十所示，

根據每個官能基產生的主要交互作用力的特性，將這些官能基區分成四種類型：第一種類型是主要產生靜電作用力的官能基，包含了 3 個官能基，這類型的官能基主要的特徵是帶有電荷；第二種類型是主要產生氫鍵作用力以及凡得瓦作用力的官能基，包含了 10 個官能基，這類型的官能基主要特徵是環上帶有能產生氫鍵鍵結的原子如氧(O)原子或氮(N)原子；第三種類型是主要產生氫鍵作用力的官能基，包含了 13 個官能基，這類型的官能基的主要特徵是能與目標蛋白質結合區域中的某些鄰近殘基產生氫鍵鍵結；第四種類型則是主要產生凡得瓦作用力的官能基，包含了 8 個官能基，這類型的官能基的主要特徵是全由碳原子所組成，與目標蛋白質結合區域中的鄰近殘基間只有凡得瓦作用力，可再依其構形區分為兩類，分別是長鏈狀以及環狀。

Type	Count	Moiety structure
E	3	
HV	10	
H	13	
V	8	

圖 十 官能基資料集。由左至右欄位為官能基作用力類型，屬於該作用力類型的官能基數量，以及官能基結構圖。總計 34 個官能基，依作用力類型可分為 4 種類型：第一、靜電作用力(E)類型官能基，計有 3 個；第二、氫鍵與凡得瓦作用力(HV)類型官能基，計有 10 個；第三、氫鍵作用力(H)類型官能基，計有 13 個；以及第四、凡得瓦作用力(V)類型官能基，計有 8 個。

統計 34 個官能基在 1382 個 FDA 認證藥物中出現情形，將結果條列於附錄之中，礙於篇幅只列出 100 個分子量在 650 以下並且官能基出現次數較多的 FDA 認證藥物列表如附錄二。

3.1.2 目標蛋白質

以下是使用本實驗方法實做在 5 個目標蛋白質結構結合區域上的結果：

3.1.2.1 Thymidine Kinase

我們在 Thymidine kinase 的結合區域中，總共識別出 7 個錨點，其中有 2 個靜電作用力錨點、2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點、2 個氫鍵作用力錨點，還有 1 個凡得瓦作用力錨點，根據這些錨點被識別之先後順序，依序稱之為 E1、E2、HV1、HV2、H1、H2 和 V1，如圖 十一所示。錨點 E1 周圍的殘基有 ARG-163、LYS-62 和 ARG-222；錨點 E2 周圍的殘基有 ARG-176；錨點 HV1 周圍的殘基有 GLU-225、TYR-101 和 HIS-58；錨點 HV2 周圍的殘基有 GLN-125；錨點 H1 周圍的殘基有 ARG-163 和 GLU-83；錨點 H2 周圍的殘基有 TYR-132、ALA-168 和 ARG-163；錨點 V1 周圍的殘基有 ILE-97、TYR-101 和 TYR-172。

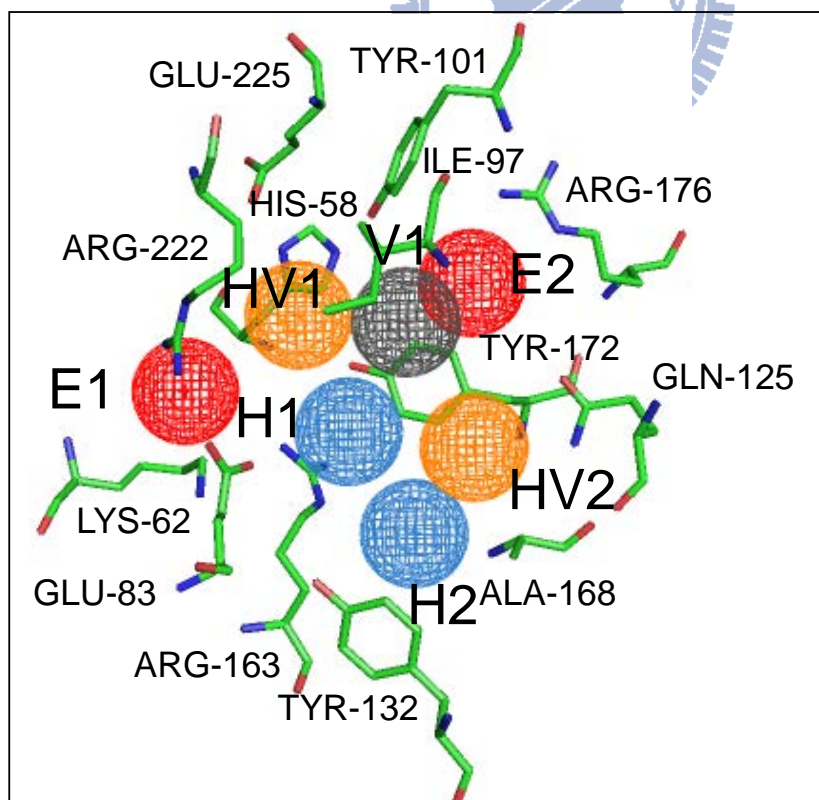


圖 十一 錨點位置圖—Thymidine kinase。共 7 個錨點：2 個靜電作用力錨點，2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點，2 個氫鍵作用力錨點以及 1 個凡得瓦作用力錨點。

從與目標蛋白質結合之受質的角度來驗證這些錨點存在之合理性，如圖 十二圖 a.所示：選取 10 個與目標蛋白質 Thymidine kinase 結合的受質，觀察這 10 個受質與錨點的相關位置，可以得到如圖 十二表格 b.，錨點 HV1 包含了 6 個受質的官能基部分，錨點 HV2 包含了其中 9 個受質的官能基部分，錨點 H1 包含了 7 個受質的官能基部分，錨點 H2 包含了其中 6 個受質的官能基部分，以及錨點 V1 包含了 5 個受質的官能基部分，圖 十二圖 c.為 5 個與受質官能基結合的錨點放大圖。除了錨點與受質的相對位置接近之外，被氫鍵與凡得瓦作用力錨點包含的官能基部分，主要結構是環上帶有可產生氫鍵的原子，而被凡得瓦作用力錨點所包含的官能基部分，主要結構是環。雖然靜電作用力錨點 E1 以及 E2，無法以此方式驗證，將以後續驗證方式再對靜電作用力錨點 E1 以及 E2 做觀察。其餘錨點透過這樣的觀察可知，這些錨點與這 10 個受質所產生的物化性質一致，顯示經由本實驗方法所識別出的錨點確實能反映出在結合區域中不同孔洞所產生的物化特性。



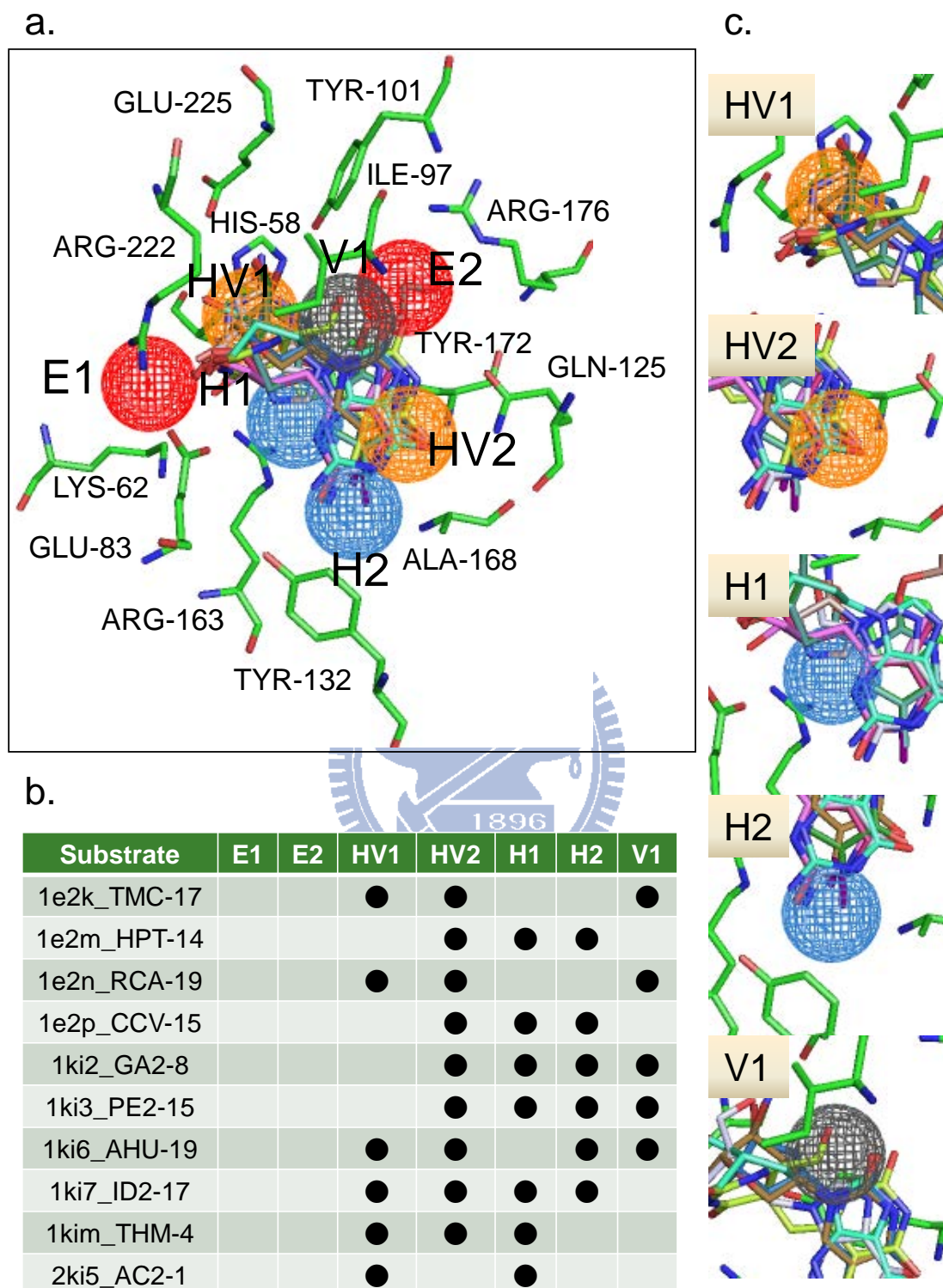


圖 十二 錨點與受質位置圖—Thymidine kinase。7 個錨點與 10 個受質中至少一個結合的錨點共有 5 個。

接著從殘基在演化上的保存性來驗證這些錨點周圍的殘基之合理性，表格一為 Thymidine kinase 的結合區域中 7 個錨點周圍的殘基列表，括號內的數字是

經 ConSurf 網站所計算的 consurf 保存分數，可以觀察到除了在錨點 V1 周圍的 3 個殘基中的 ILE-97 分數為 6 分之外，其他錨點周圍的殘基分數都在 7 至 9 分，顯示經由本實驗方法所識別出的錨點其周圍的殘基在演化上確實具有較高的保存性。

表格 一 錨點周圍殘基列表—Thymidine kinase

錨點	殘基(consurf 分數)
E1	ARG-163(9), LYS-62(9), ARG-222(9)
E2	ARG-176(9)
HV1	GLU-225(9), TYR-101(7), HIS-58(9)
HV2	GLN-125(9)
H1	ARG-163(9), GLU-83(9)
H2	TYR-132(9), ALA-168(7), ARG-163(9)
V1	ILE-97(6), TYR-101(7), TYR-172(8)

在 CSA 與 UniProt 查詢 Thymidine kinase(PDB 代碼 1KIM)(UniProt 代碼 P03176)記錄的重要殘基，整理與本實驗方法所識別出的錨點相關殘基列在表格二，結果顯示本實驗方法可以找出目標蛋白質上重要殘基。

表格 二 錨點周圍重要殘基列表—Thymidine kinase

殘基	資料來源	註解	錨點
GLU-83	CSA、UniProt	Active site: Proton acceptor (Potential)	H1
TYR-101	UniProt	Binding site: Substrate	HV1、V1
GLN-125	UniProt	Binding site: Substrate	HV2
ARG-163	CSA	--	E1、H1、H2
ARG-222	CSA、UniProt	Binding site: Substrate	E1

3.1.2.2 Estrogen receptor

我們在 Estrogen receptor 的結合區域中，總共識別出 4 個錨點，其中有 2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點，還有 2 個凡得瓦作用力錨點，根據這些錨點被識別之先後順序，依序稱之為 HV1、HV2、V1 和 V2，如圖 十三所示。錨點 HV1 周圍的殘基有 GLU-353、LEU-387 和 ARG-394；錨點 HV2 周圍的殘基有 GLY-420、GLY-521 和 HIS-524；錨點 V1 周圍的殘基有 LEU-387、MET-388 和 LEU-391；以及錨點 V2 周圍的殘基有 LEU-384 和 LEU-525。

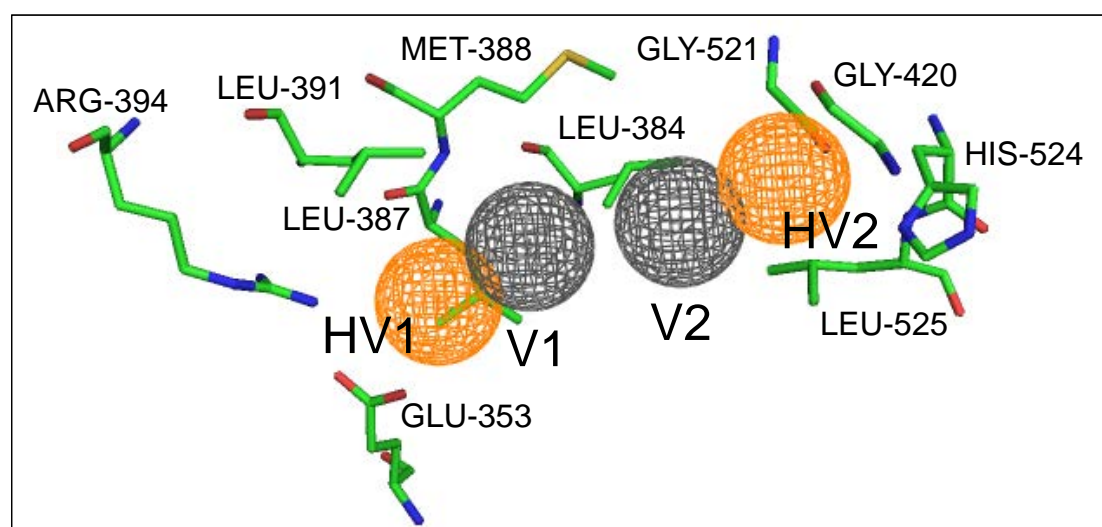


圖 十三 錨點位置圖—Estrogen receptor。共 4 個錨點：2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點以及 2 個凡得瓦作用力錨點。

從與目標蛋白質結合之受質的角度來驗證這些錨點存在之合理性，如圖 十四圖 a.所示：選取 10 個與目標蛋白質 Estrogen receptor 結合的受質，觀察這 10 個受質與錨點的相關位置，可以得到如圖 十四表格 b.，錨點 HV1 包含了 10 個受質的官能基部分，錨點 HV2 包含了其中 7 個受質的官能基部分，錨點 V1 包含了 10 個受質的官能基部分，以及錨點 V2 包含了 10 個受質的官能基部分，圖 十四圖 c.為 4 個與受質官能基結合的錨點放大圖。除了錨點與受質的相對位置接近之外，被氫鍵與凡得瓦作用力錨點包含的官能基部分，主要結構是環上帶有可產生氫鍵的原子，而被凡得瓦作用力錨點所包含的官能基部分，主要結構是環。透過這樣的觀察可知，這些錨點與這 10 個受質所產生的物化性質一致，顯示經

由本實驗方法所識別出的錨點確實能反映出在結合區域中不同孔洞所產生的物化特性。

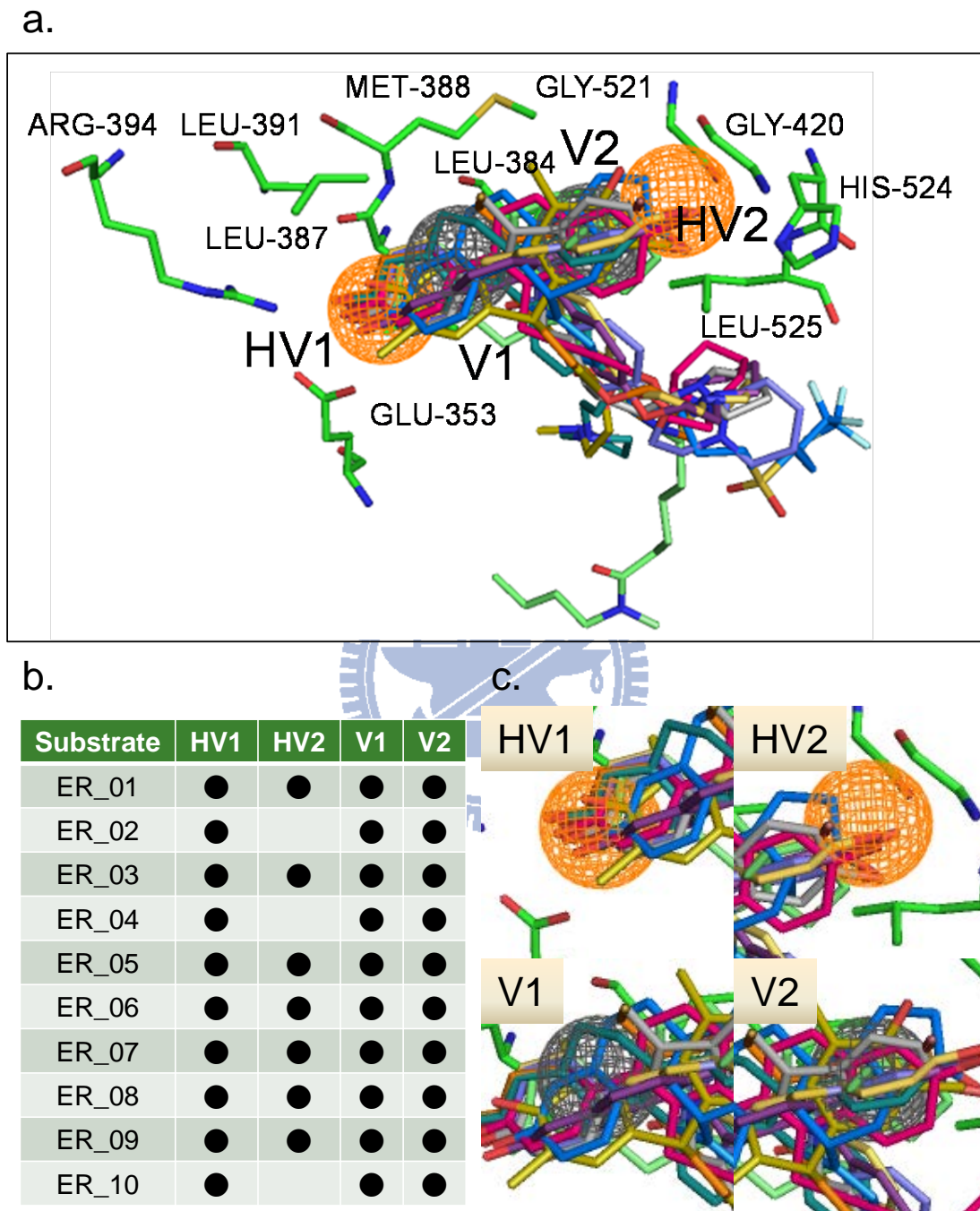


圖 十四 錨點與受質位置圖—Estrogen receptor。4 個錨點與 10 個受質中至少一個結合的錨點共有 4 個。

接著從殘基在演化上的保存性來驗證這些錨點周圍的殘基之合理性，表格二為 Estrogen receptor 結合區域中 4 個錨點周圍的殘基列表，括號內的數字是經 ConSurf 網站計算的 consurf 保存分數，可以觀察到這些錨點周圍的殘基分數都

在 7 至 9 分，顯示經由本實驗方法所識別出的錨點其周圍的殘基在演化上確實具有較高的保存性。

表格 三 錨點周圍殘基列表—Estrogen receptor

錨點	殘基(consurf 分數)
HV1	GLU-353(9), LEU-387(9), ARG-394(9)
HV2	GLY-420(8), GLY-521(8), HIS-524(8)
V1	LEU-387(9), MET-388(7), LEU-391(7)
V2	LEU-384(7), LEU-525(8)

3.1.2.3 Shikimate kinase

我們在 Shikimate kinase 的結合區域中，總共識別出 6 個錨點，其中有 1 個靜電作用力錨點、有 2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點、有 2 個氫鍵作用力錨點，還有 1 個凡得瓦作用力錨點，根據這些錨點被識別之先後順序，依序稱之為 E1、HV1、HV2、H1、H2 和 V1，如圖 十五所示。錨點 E1 周圍的殘基有 ARG-57；錨點 HV1 周圍的殘基有 ASP-31、ASP-33 和 SER-15；錨點 HV2 周圍的殘基有 SER-15、GLY-11 和 LYS-14；錨點 H1 周圍的殘基有 ASP-33 和 GLY-80；錨點 H2 周圍的殘基有 TYR-136、ARG-132 和 MET-10；以及錨點 V1 周圍的殘基有 MET-10、GLY-79 和 ASP-33。

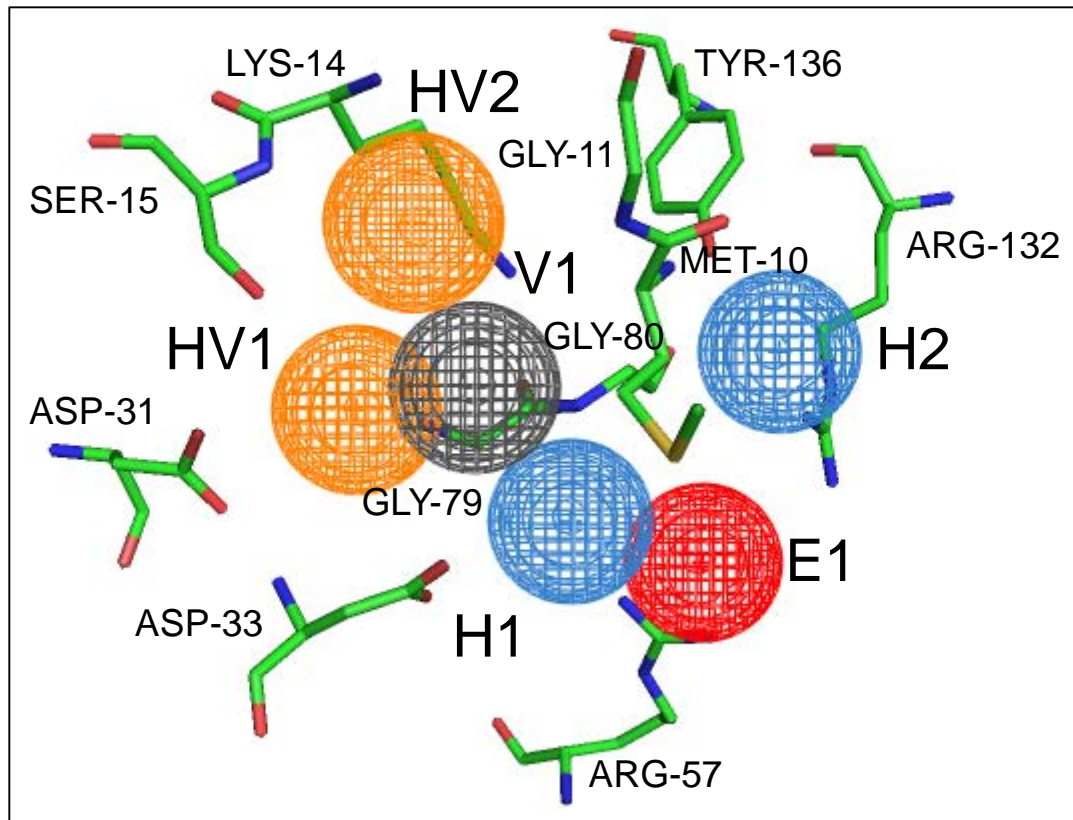


圖 十五 錨點位置圖—Shikimate kinase。共 6 個錨點：1 個靜電作用力錨點，2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點，2 個氫鍵作用力錨點以及 1 個凡得瓦作用力錨點。

從與目標蛋白質結合之受質的角度來驗證這些錨點存在之合理性，如圖 十六圖 a.所示：選取 6 個與目標蛋白質 Shikimate kinase 結合的受質，觀察這 6 個受質與錨點的相關位置，可以得到圖 十六表格 b.，錨點 E1 包含了 4 個受質的官能基部分，錨點 HV1 包含了 4 個受質的官能基部分，錨點 HV2 包含了其中 4 個受質的官能基部分，錨點 H1 包含了 4 個受質的官能基部分，以及錨點 V1 包含了 6 個受質的官能基部分，圖 十六 c.圖為 6 個與受質官能基結合的錨點放大圖。除了錨點與受質的相對位置接近之外，被靜電作用力錨點包含的官能基部分，主要結構是酸根，被氫鍵與凡得瓦作用力錨點包含的官能基部分，主要結構是環上帶有可產生氫鍵的原子，被氫鍵作用力錨點包含的官能基部分，主要結構是能與附近殘基產生氫鍵的原子，而被凡得瓦作用力錨點所包含的官能基部分，主要結構是環。雖然氫鍵作用力錨點 H2，無法以此方式驗證，將以後續驗證方式再對氫鍵作用力錨點 H2 做觀察。其餘錨點透過這樣的觀察可知，這些錨點與這 6

個受質所產生的物化性質一致，顯示經由本實驗方法所識別出的錨點確實能反映出在結合區域中不同孔洞所產生的物化特性。

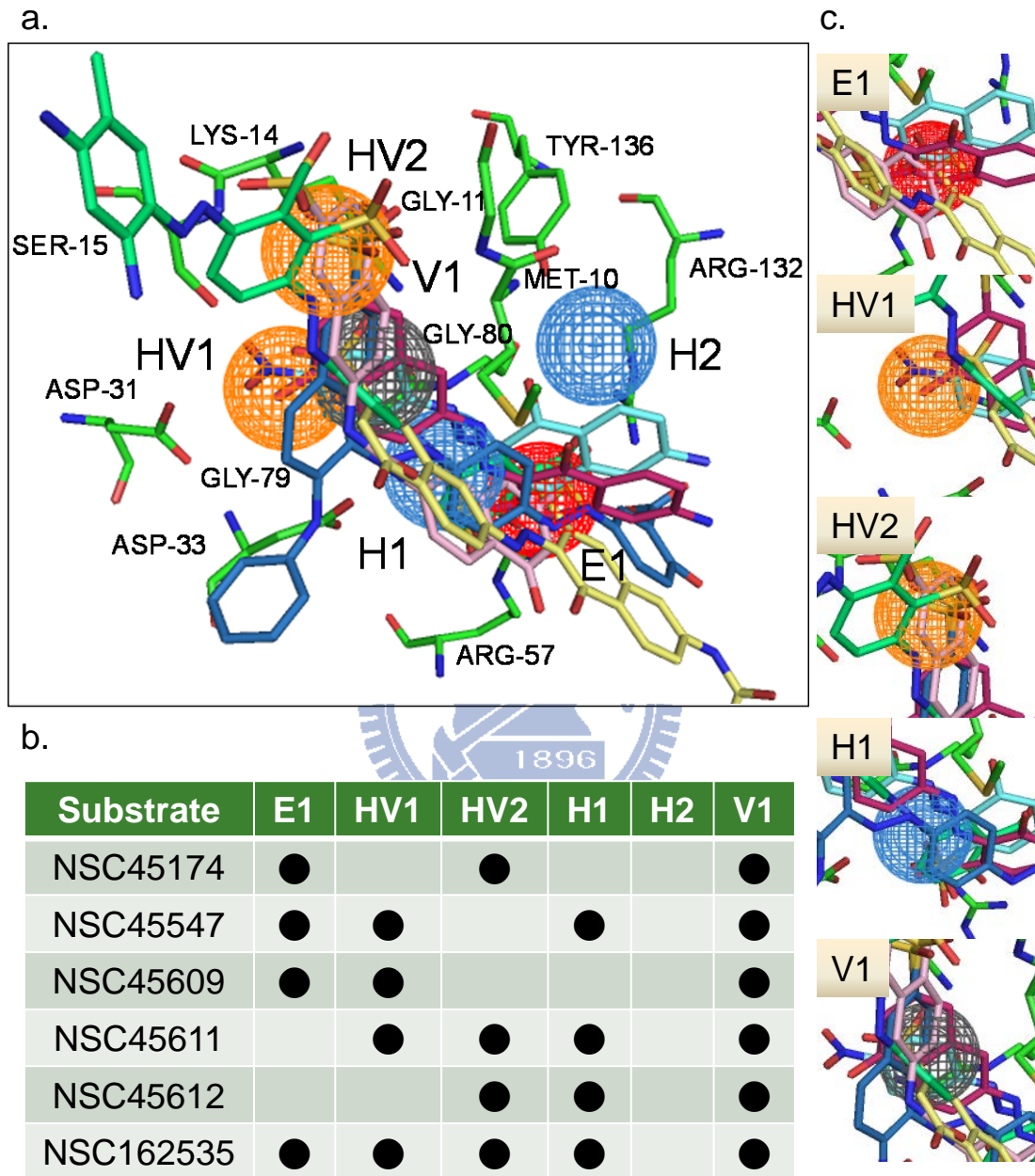


圖 十六 錨點與受質位置圖—Shikimate kinase。6 個錨點與 6 個受質中至少一個結合的錨點共有 5 個。

接著從殘基在演化上的保存性來驗證這些錨點周圍的殘基之合理性，表格三為 Shikimate kinase 結合區域中 6 個錨點周圍的殘基列表，括號內的數字是經 ConSurf 網站計算的 consurf 保存分數，可以觀察到這些錨點周圍的殘基分數都

是 8 分或 9 分，顯示經由本實驗方法所識別出的錨點其周圍的殘基在演化上確實具有較高的保存性。

表格 四 錨點周圍殘基列表—Shikimate kinase

錨點	殘基 (consurf 分數)
E1	ARG-57(9)
HV1	ASP-31(9), ASP-33(9), SER-15(8)
HV2	SER-15(8), GLY-11(9), LYS-14(9)
H1	ASP-33(9), GLY-80(9)
H2	TYR-136(9), ARG-132(9), MET-10(9)
V1	MET-10(9), GLY-79(9), ASP-33(9)

在 CSA 與 UniProt 查詢 Shikimate kinase(PDB 代碼 1ZUH)(UniProt 代碼 P56073)記錄的重要殘基，整理與本實驗方法所識別出的錨點相關殘基列在表格五，結果顯示本實驗方法可以找出目標蛋白質上重要殘基。

表格 五 錨點周圍重要殘基列表—Shikimate kinase

殘基	資料來源	註解	錨點
SER-15	UniProt	Metal binding: Magnesium (By similarity)	HV2
ASP-33	UniProt	Binding site: Substrate	HV1、H1、V1
ARG-57	UniProt	Binding site: Substrate	E1
GLY-80	UniProt	Binding site: Substrate; via amide nitrogen	H1

3.1.2.4 Dihydrofolate reductase

我們在 Dihydrofolate reductase 的結合區域中，總共識別出 6 個錨點，其中有 2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點、2 個氫鍵作用力錨點，還有 2 個凡得瓦作用力錨點，根據這些錨點被識別之先後順序，依序稱之為 HV1、HV2、H1、H2、V1

和 V2，如圖 十七所示。錨點 HV1 周圍的殘基有 GLU-30；錨點 HV2 周圍的殘基有 SER-59；錨點 H1 周圍的殘基有 THR-136、PHE-134 和 VAL-8；錨點 H2 周圍的殘基有 VAL-115 和 TYR-121；錨點 V1 周圍的殘基有 PHE-34 和 PHE-31；以及錨點 V2 周圍的殘基有 PHE-34、ILE-60 和 VAL-115。

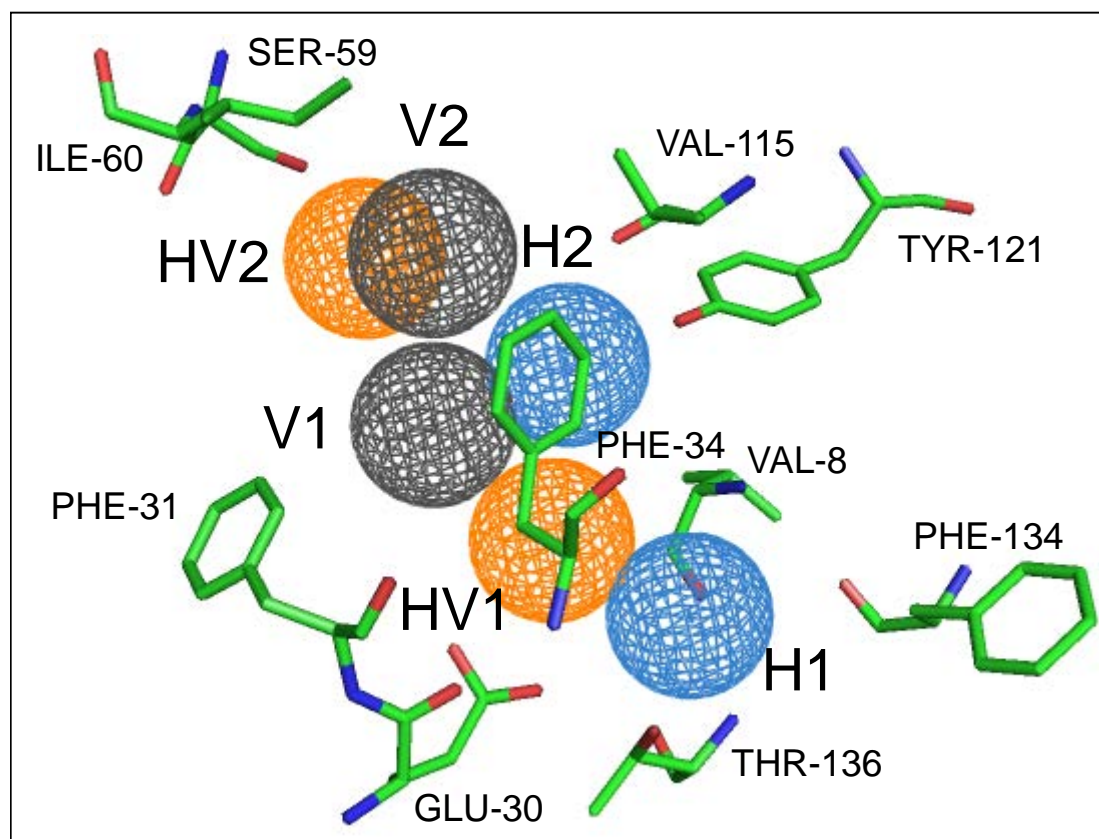


圖 十七 錨點位置圖—Dihydrofolate reductase。共 6 個錨點：2 個靜電作用力錨點，2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點以及 2 個氫鍵作用力錨點。

從與目標蛋白質結合之受質的角度來驗證這些錨點存在之合理性，如圖 十八圖 a.所示：選取 10 個與目標蛋白質 Dihydrofolate reductase 結合的受質，觀察這 10 個受質與錨點的相關位置，可以得到圖 十八 表格 b.，錨點 HV1 包含了 6 個受質的官能基部分，錨點 HV2 包含了其中 5 個受質的官能基部分，錨點 H1 包含了 3 個受質的官能基部分，錨點 H2 包含了 7 個受質的官能基部分，錨點 V1 包含了 7 個受質的官能基部分，以及錨點 V2 包含了 3 個受質的官能基部分，圖 十八 圖 c.為 5 個與受質官能基結合的錨點放大圖。除了錨點與受質的相對位置接近之外，被氫鍵與凡得瓦作用力錨點包含的官能基部分，主要結構是環上帶

有可產生氫鍵的原子，被氫鍵作用力錨點包含的官能基部分，主要結構是能與附近殘基產生氫鍵的原子，而被凡得瓦作用力錨點所包含的官能基部分，主要結構是環。透過這樣的觀察可知，這些錨點與這 10 個受質所產生的物化性質一致，顯示經由本實驗方法所識別出的錨點確實能反映出在結合區域中不同孔洞所產生的物化特性。

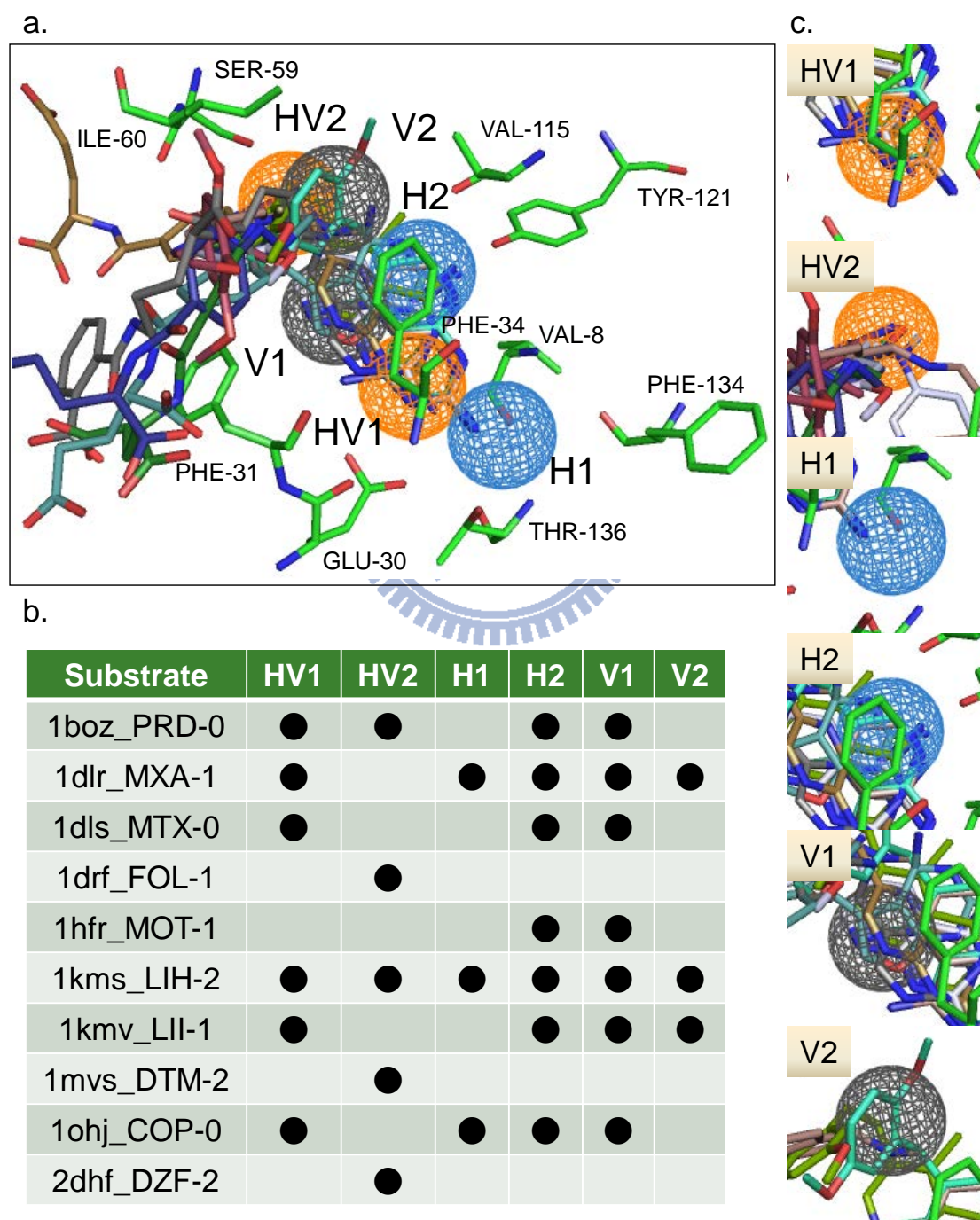


圖 十八 錨點與受質位置圖—Dihydrofolate reductase。6 個錨點與 10 個受質中至少一個結合的錨點共有 6 個。

接著從殘基在演化上的保存性來驗證這些錨點周圍的殘基之合理性，表格四為 Dihydrofolate reductase 結合區域中 6 個錨點周圍的殘基列表，括號內的數字是經 ConSurf 網站所計算的 consurf 保存分數，可以觀察到這些錨點周圍的殘基分數都在 7 至 9 分，顯示經由本實驗方法所識別出的錨點其周圍的殘基在演化上確實具有較高的保存性。

表格 六 錨點周圍殘基列表—Dihydrofolate reductase

錨點	殘基 (consurf 分數)
HV1	GLU-30(9)
HV2	SER-59(9)
H1	THR-136(9), PHE-134(7), VAL-8(8)
H2	VAL-115(8), TYR-121(8)
V1	PHE-34(9), PHE-31(7)
V2	PHE-34(9), ILE-60(8), VAL-115(8)

在 CSA 與 UniProt 查詢 Dihydrofolate reductase (PDB 代碼 1HFR)(UniProt 代碼 P00374)記錄的重要殘基，在 CSA 的資料是透過 PSI-BLAST 比對 PDB 代碼 1DHF 的蛋白質而來，整理與本實驗方法所識別出的錨點相關殘基列在表格 七，結果顯示本實驗方法可以找出目標蛋白質上重要殘基。

表格 七 錨點周圍重要殘基列表—Dihydrofolate reductase

殘基	資料來源	註解	錨點
GLU-30	CSA	--	HV1

3.1.2.5 Rho-associated protein kinase 1

我們在 Rho-associated protein kinase 1 的結合區域中，總共識別出 5 個錨點，其中有 2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點、2 個氫鍵作用力錨點，還有 1 個凡得瓦作用力錨點，根據這些錨點被識別之先後順序，依序稱之為 HV1、HV2、H1、H2 和 V1，如圖 十九 所示。錨點 HV1 周圍的殘基有 GLU-154；錨點 HV2 周圍的

殘基有 ASP-216 和 GLU-124；錨點 H1 周圍的殘基有 ASP-198、ASN-203 和 ASP-216；錨點 H2 周圍的殘基有 HIS-196、ASN-203 和 ALA-215；以及錨點 V1 周圍的殘基有 LEU-205 和 MET-153。

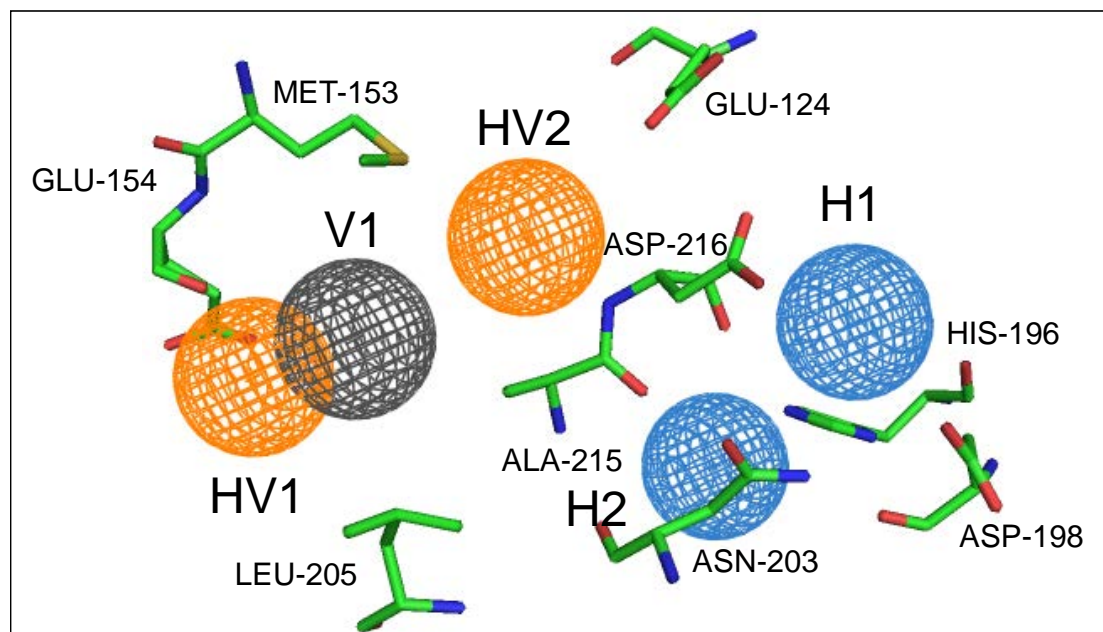


圖 十九 錨點位置圖—Rho-associated protein kinase 1。共 5 個錨點：2 個氫鍵與凡得瓦作用力錨點，2 個氫鍵作用力錨點以及 1 個凡得瓦作用力錨點。

從與目標蛋白質結合之受質的角度來驗證這些錨點存在之合理性，如圖 二十圖 a.所示：選取 10 個與目標蛋白質 Rho-associated protein kinase 1 結合的受質，觀察這 10 個受質與錨點的相關位置，可以得到如圖 二十表格 b.，錨點 HV1 包含了 10 個受質的官能基部分，錨點 HV2 包含了其中 1 個受質的官能基部分，以及錨點 V1 包含了 10 個受質的官能基部分，圖 二十圖 c.為 5 個與受質官能基結合的錨點放大圖。除了錨點與受質的相對位置接近之外，被氫鍵與凡得瓦作用力錨點包含的官能基部分，主要結構是環上帶有可產生氫鍵的原子，而被凡得瓦作用力錨點所包含的官能基部分，主要結構是環。雖然氫鍵作用力錨點 H1 以及 H2，無法以此方式驗證，將以後續驗證方式再對氫鍵作用力錨點 H1 以及 H2 做觀察。其餘錨點透過這樣的觀察可知，這些錨點與這 10 個受質所產生的物化性質一致，顯示經由本實驗方法所識別出的錨點確實能反映出在結合區域中不同孔產生的物化特性。

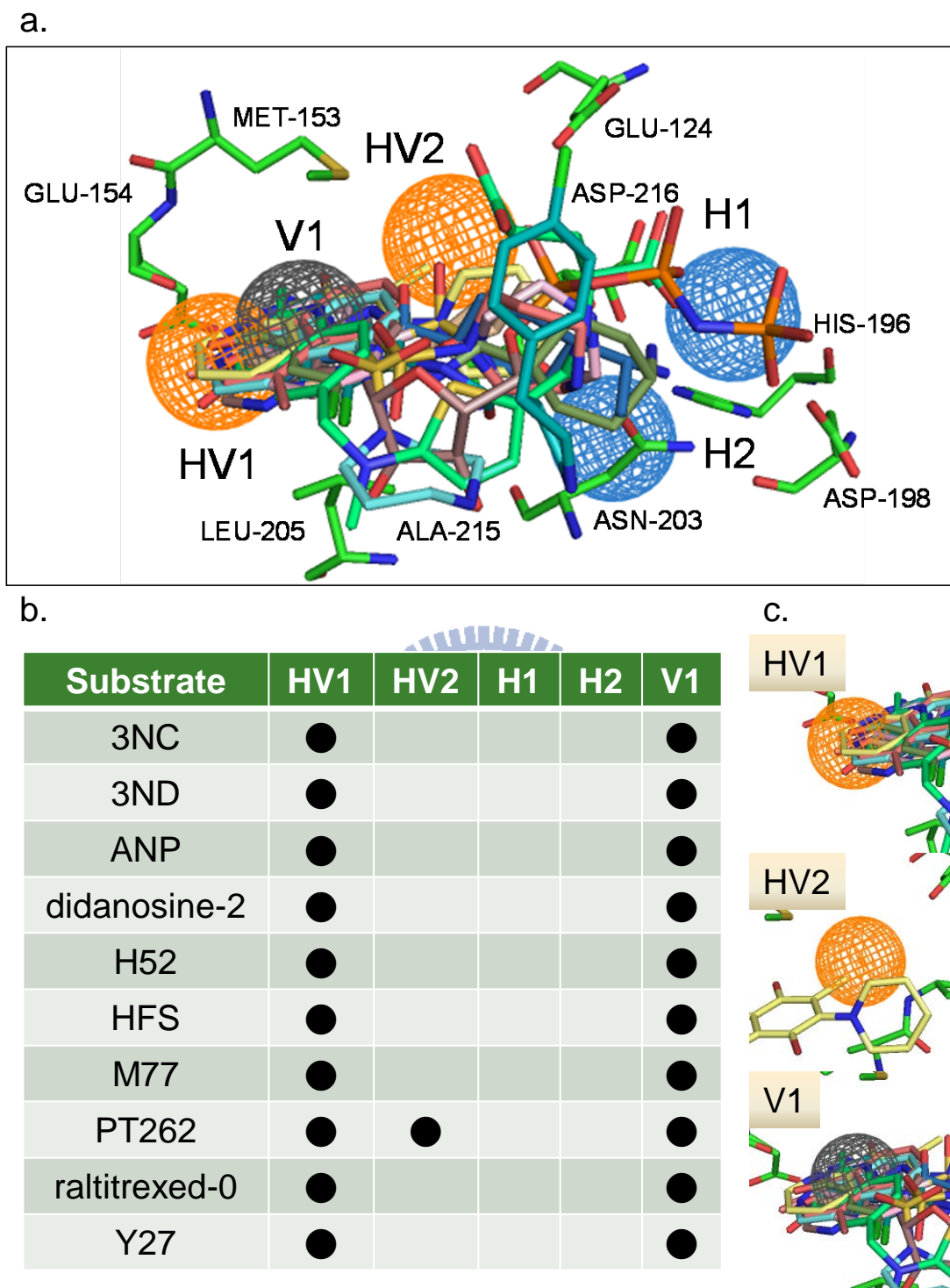


圖 二十 錨點與受質位置圖—Rho-associated protein kinase 1。5 個錨點與 10 個受質中至少一個結合的錨點共有 3 個。

接著從殘基在演化上的保存性來驗證這些錨點周圍的殘基之合理性，表格五為 Rho-associated protein kinase 1 結合區域中 6 個錨點周圍的殘基列表，括號內的數字是經 ConSurf 網站計算的 consurf 保存分數，可以觀察到這些錨點周圍

的殘基分數都是 8 分或 9 分，顯示經由本實驗方法所識別出的錨點其周圍的殘基在演化上確實具有較高的保存性。

表格 八 錨點周圍殘基列表—Rho-associated protein kinase 1

錨點	殘基(consurf 分數)
HV1	GLU-154(8)
HV2	ASP-216(9), GLU-124(9)
H1	ASP-198(9), ASN-203(9), ASP-216(9)
H2	HIS-196(9), ASN-203(9), ALA-215(8)
V1	LEU-205(8), MET-153(8)

在 CSA 與 UniProt 查詢 Rho-associated protein kinase 1(PDB 代碼 2ETR)(UniProt 代碼 Q13464)記錄的重要殘基，整理與本實驗方法所識別出的錨點相關殘基列在表格 九，結果顯示本實驗方法可以找出目標蛋白質上重要殘基。

表格 九 錨點周圍重要殘基列表—Rho-associated protein kinase 1

殘基	資料來源	註解	錨點
ASP-198	CSA、UniProt	Active site: Proton acceptor (By similarity)	H1
ASN-203	CSA	--	H1

3.2 討論

統計在 5 個目標蛋白質上的實驗結果，總共識別了 27 個作用力類型錨點，其中有 22 個錨點(82%)與現有受質結合有關，錨點周圍的殘基共有 53 個，經由 Consurf 計分在 7 至 9 分，也就是在演化上有高度保存性的殘基有 52 個(98%)，製成圖表如圖 二十一以及圖 二十二。

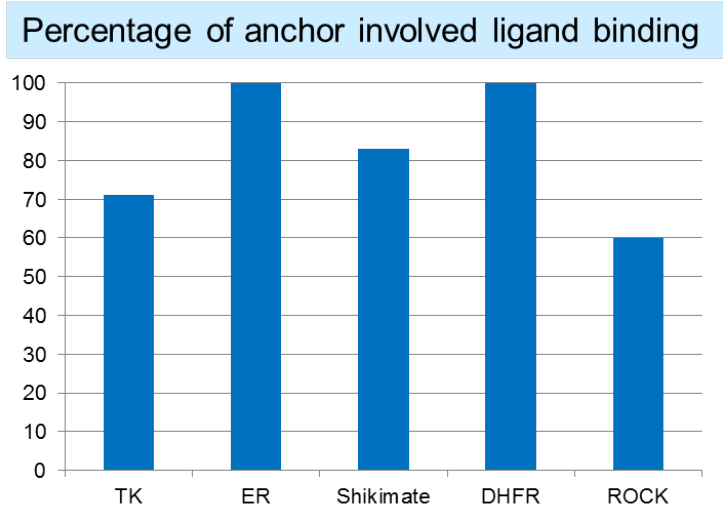


圖 二十一 錨點參與受質結合統計圖表。x 軸為 5 個目標蛋白質，y 軸為在目標蛋白質上，參與受質結合的錨點數與所有錨點數的百分比，以 TK 為例，識別出總共 7 個錨點，其中有 5 個錨點與受質結合有關，比例大約是 71%。

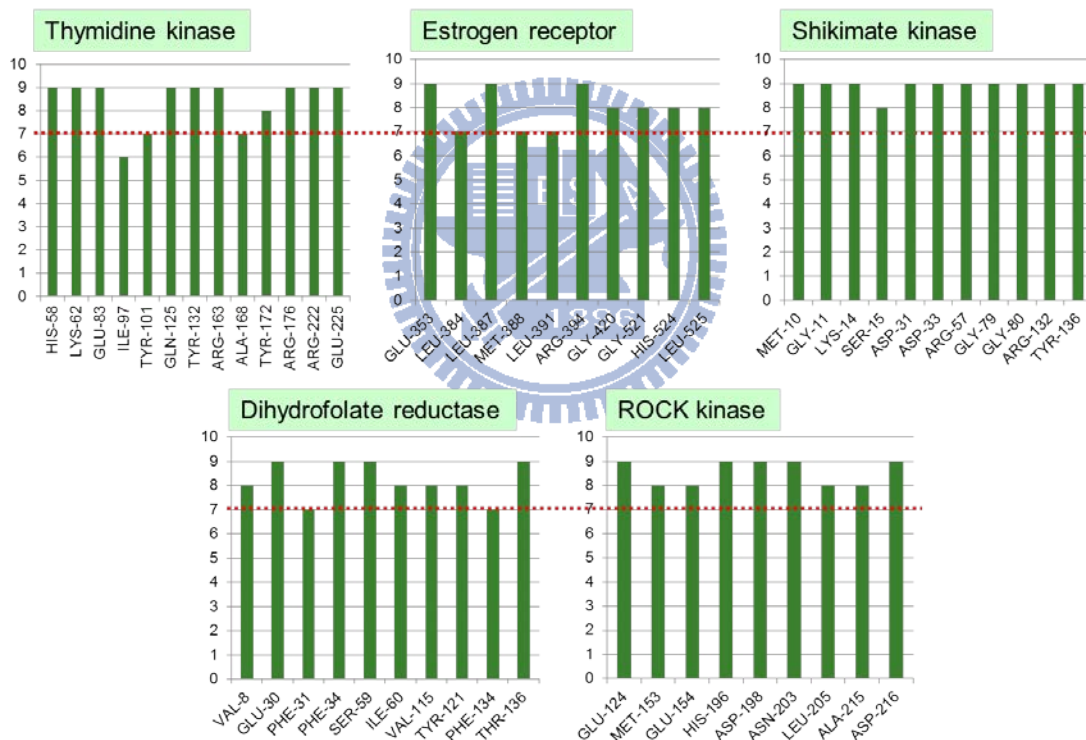


圖 二十二 錨點周圍殘基 Consurf 分數圖表。x 軸為各目標蛋白質所識別出的錨點周圍殘基，y 軸為經由 Consurf 網站所計算的殘基在演化上保存分數，從 1-9 分，在 7 分以上(圖中以紅線標示)的殘基被認為具有高度保存性。

上述結果顯示，透過利用官能基嵌合所識別的作用力類型錨點，常常位於蛋白質與配體結合區域中的關鍵交互作用區，推測這些錨點在生物體內生化反應中扮演重要的角色。我們相信以官能基為基礎之區域官能基地圖將能應用在藥物發

展、藥物最佳化以及幫助相關研究者快速地了解蛋白質與配體間交互作用之機制。



參考文獻

- 1 Blow, D. M., Birktoft, J. J. & Hartley, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **221**, 337-340 (1969).
- 2 Gutteridge, A. & Thornton, J. M. Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 622-629 (2005).
- 3 Chen, Y. F. *et al.* SiMMap: a web server for inferring site-moiety map to recognize interaction preferences between protein pockets and compound moieties. *Nucleic Acids Research* **38**, W424-W430 (2010).
- 4 Lyne, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discovery Today* **7**, 1047-1055 (2002).
- 5 Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews. Drug Discovery* **3**, 935-949 (2004).
- 6 Tanrikulu, Y. & Schneider, G. Pseudoreceptor models in drug design: bridging ligand- and receptor-based virtual screening. *Nature Reviews. Drug Discovery* **7**, 667-677 (2008).
- 7 Tanrikulu, Y. & Schneider, G. Pseudoreceptor models in drug design: bridging ligand- and receptor-based virtual screening. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 667-677 (2008).
- 8 Hajduk, P. J. & Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nature Reviews. Drug Discovery* **6**, 211-219 (2007).
- 9 Hsu, K. C., Chen, Y. F., Lin, S. R. & Yang, J. M. iGEMDOCK: a graphical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis. *BMC Bioinformatics* **12**, - (2011).
- 10 Yang, J.-M. & Chen, C.-C. GEMDOCK: a generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **55**, 288-304 (2004).
- 11 Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R. & Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology* **267**, 727-748 (1997).
- 12 Ewing, T. J., Makino, S., Skillman, A. G. & Kuntz, I. D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of Computer-aided Molecular Design* **15**, 411-428 (2001).
- 13 Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R. & Olson, A. J. Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of autodock 2.4.

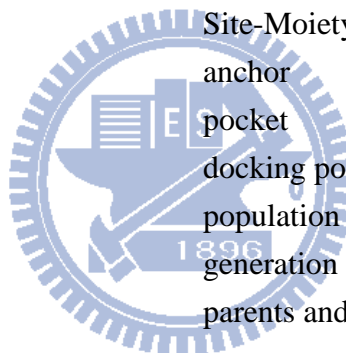
- Journal of Computer-Aided Molecular Design* **10**, 293-304 (1996).
- 14 Yang, J.-M. & Shen, T.-W. A pharmacophore-based evolutionary approach for screening selective estrogen receptor modulators. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **59**, 205-220 (2005).
- 15 Pan, Y., Huang, N., Cho, S. & MacKerell, A. D., Jr. Consideration of molecular weight during compound selection in virtual target-based database screening. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **43**, 267-272 (2003).
- 16 Tafi, A. *et al.* Pharmacophore based receptor modeling: the case of adenosine A3 receptor antagonists. An approach to the optimization of protein models. *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 4085-4097 (2006).
- 17 Wolber, G., Seidel, T., Bendix, F. & Langer, T. Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. *Drug Discovery Today* **13**, 23-29 (2008).
- 18 Champness, J. N. *et al.* Exploring the active site of herpes simplex virus type-1 thymidine kinase by X-ray crystallography of complexes with aciclovir and other ligands. *Proteins* **32**, 350-361 (1998).
- 19 Shiau, A. K. *et al.* The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **95**, 927-937 (1998).
- 20 Cheng, W. C., Chang, Y. N. & Wang, W. C. Structural basis for shikimate-binding specificity of *Helicobacter pylori* shikimate kinase. *Journal of Bacteriology* **187**, 8156-8163 (2005).
- 21 Cody, V. *et al.* Comparison of ternary crystal complexes of F31 variants of human dihydrofolate reductase with NADPH and a classical antitumor furopyrimidine. *Anti-Cancer Drug Des* **13**, 307-315 (1998).
- 22 Jacobs, M. *et al.* The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 260-268 (2006).
- 23 Manikowski, A. *et al.* Inhibition of herpes simplex virus thymidine kinases by 2-phenylamino-6-oxopurines and related compounds: structure-activity relationships and antiherpetic activity in vivo. *Journal of Medicinal Chemistry* **48**, 3919-3929 (2005).
- 24 Zhou, H. B. *et al.* Structure-guided optimization of estrogen receptor binding affinity and antagonist potency of pyrazolopyrimidines with basic side chains. *Journal of Medicinal Chemistry* **50**, 399-403 (2007).
- 25 Holland, J. H. Genetic Algorithms. *Sci Am* **267**, 66-72 (1992).
- 26 Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**,

- 2714-2723 (1997).
- 27 Glaser, F., Rosenberg, Y., Kessel, A., Pupko, T. & Ben-Tal, N. The
ConSurf-HSSP database: the mapping of evolutionary conservation among
homologs onto PDB structures. *Proteins* **58**, 610-617 (2005).
- 28 Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and
high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792-1797 (2004).
- 29 Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. Clustal-W - Improving the
Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence
Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice.
Nucleic Acids Research **22**, 4673-4680 (1994).
- 30 Porter, C. T., Bartlett, G. J. & Thornton, J. M. The Catalytic Site Atlas: a
resource of catalytic sites and residues identified in enzymes using structural
data. *Nucleic Acids Research* **32**, D129-D133 (2004).



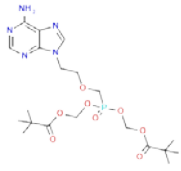
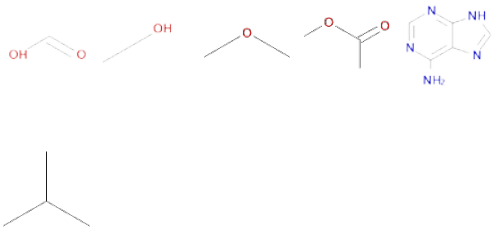
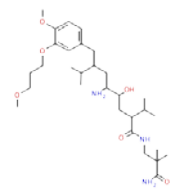
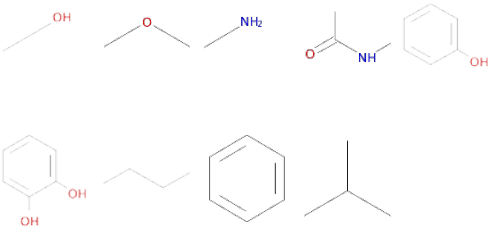
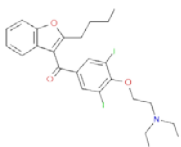
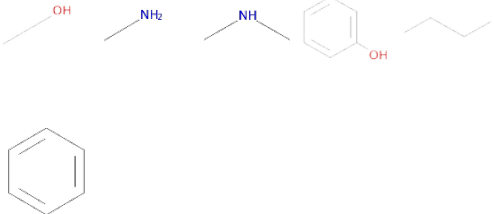
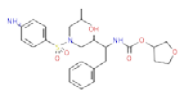
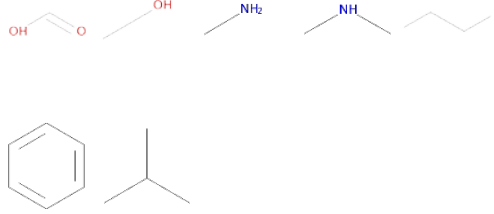
附錄一 名詞中英對照

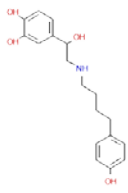
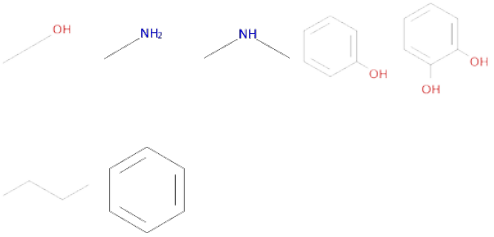
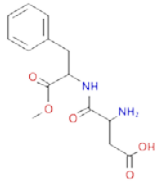
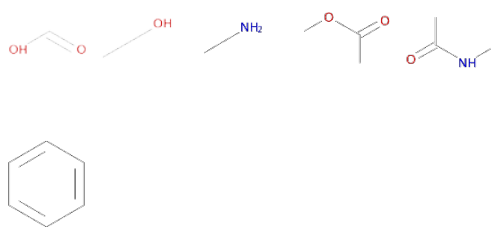
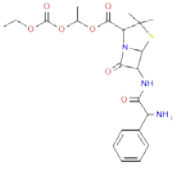
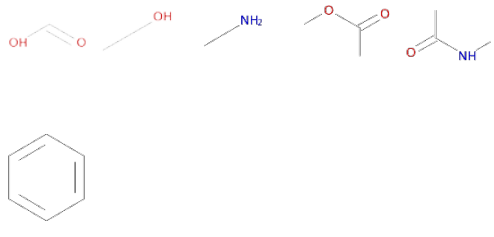
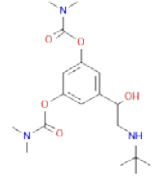
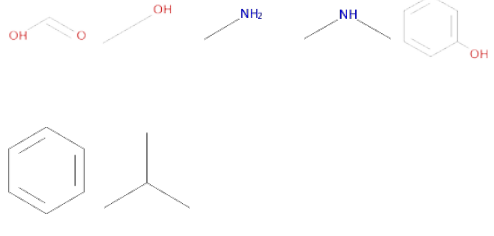
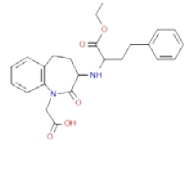
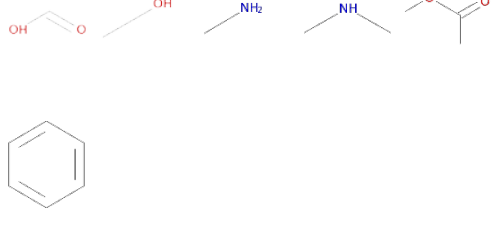
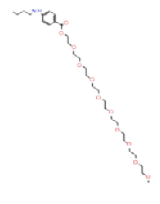
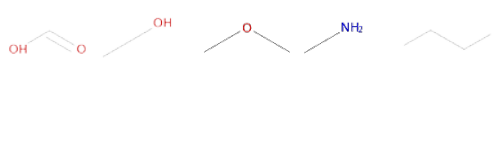
蛋白質與配體間交互作用	protein-ligand interaction
界面	interface
結合區域	binding site
官能基	moiety
殘基	residue
前導化合物	lead compound
虛擬藥物篩選	virtual screening
分子嵌合	molecular docking
計分方程式	scoring function
親和力	affinity
篩選後分析	post-screening analysis
實驗驗證	experimental verification
區域官能基地圖	Site-Moiety Map, SiMMap
錨點	anchor
孔洞	pocket
嵌合位置	docking pose
族群	population
世代	generation
親代與子代	parents and offspring
雜交	crossover
突變	mutation
適者生存	survival of fittest
適應性	fitness
交互作用剖繪	interaction profile
受質	substrate
催化反應殘基	catalytic residue
多重序列比對	multiple sequence alignment, MSA
活化區	active site
胺基酸	amino acid
激酶抑制劑	kinase inhibitor


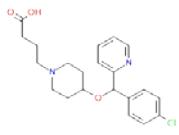




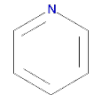

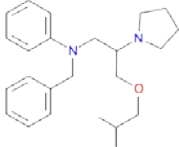






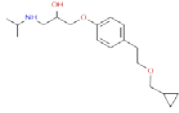






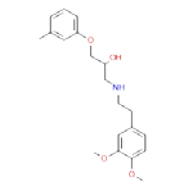




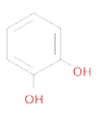

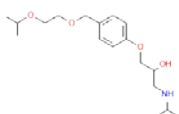








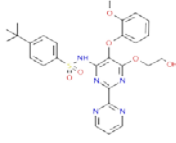
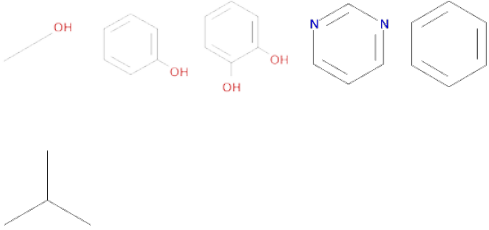
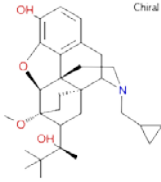
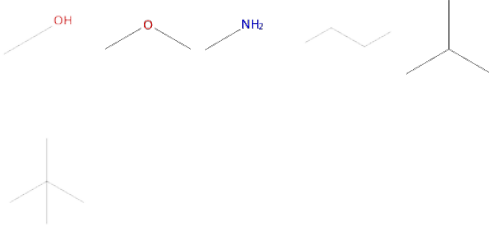
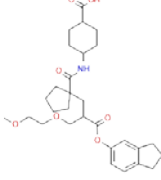
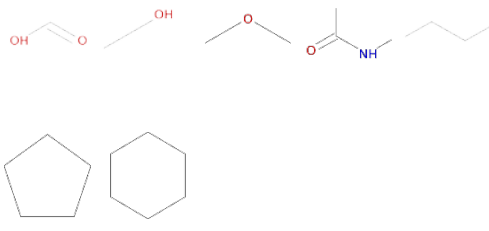
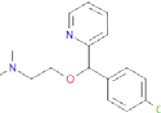
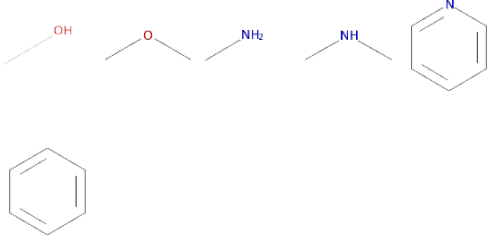
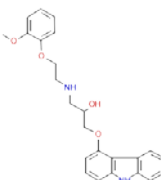
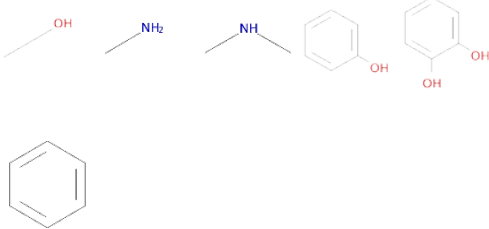
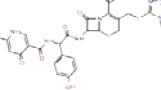
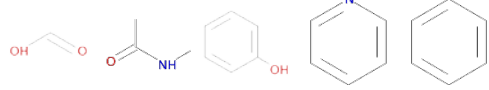
附錄二 FDA 驗證藥物其官能基組成

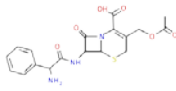
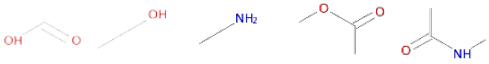

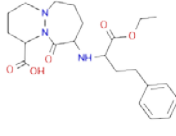
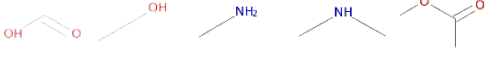

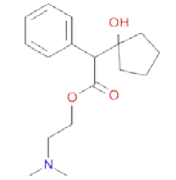
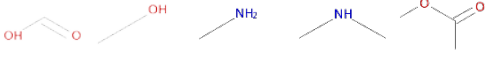


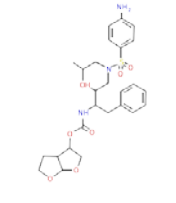



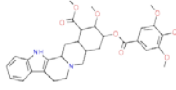
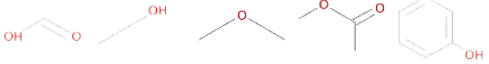


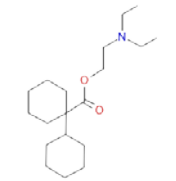
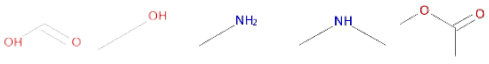
統計 34 個官能基在 1382 個 FDA 認證藥物中出現情形，礙於篇幅只列出 100 個分子量在 650 以下並且官能基出現次數較多的 FDA 認證藥物列表。欄位由左至右分別為 FDA 驗證藥物結構、FDA 驗證藥物名稱以及出現在該藥物上的官能基結構。


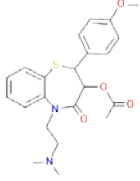
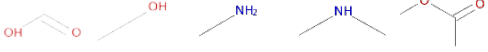
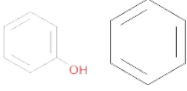
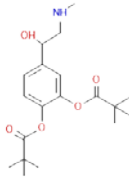
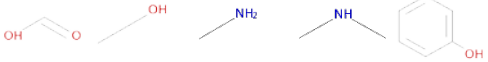
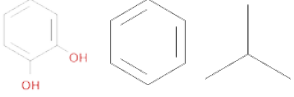
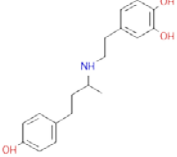
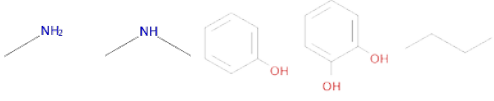

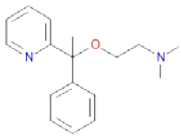
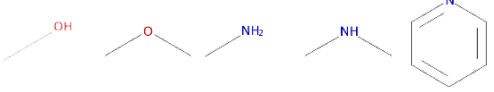

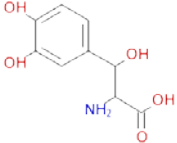
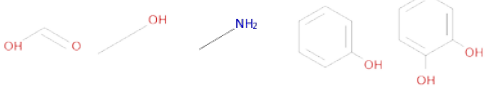

FDA 驗證藥物結構	FDA 驗證藥物名稱	官能基結構
	adefovir_dipivoxil	
	aliskiren	
	amiodarone	
	amprenavir	

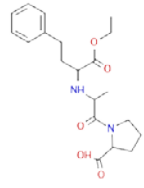
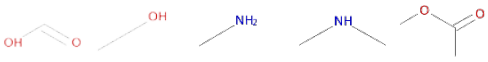

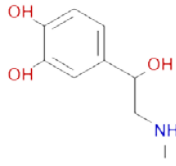
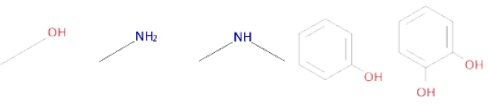

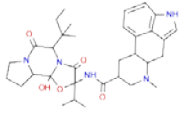
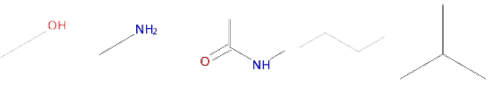

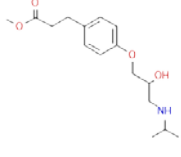
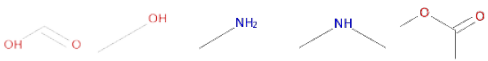
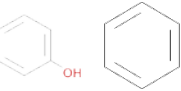
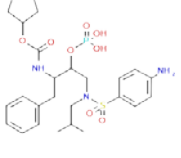
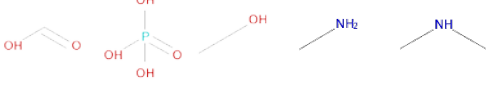

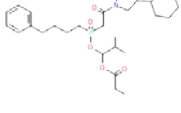
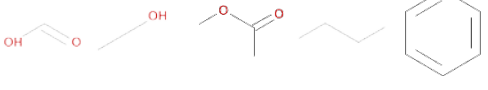
	<p>arbutamine</p>	
	<p>aspartame</p>	
	<p>bacampicillin</p>	
	<p>bambuterol</p>	
	<p>benazepril</p>	
	<p>benzonatate</p>	

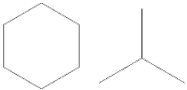
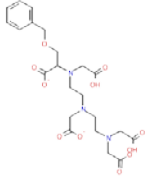
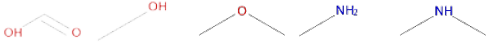

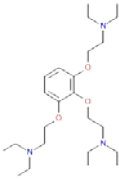
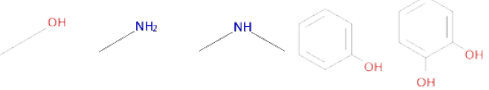

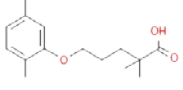
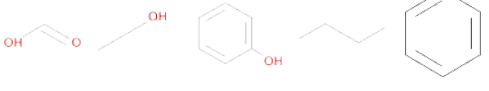

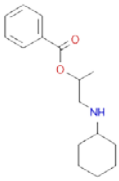
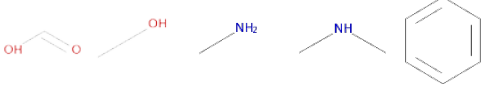

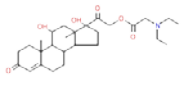
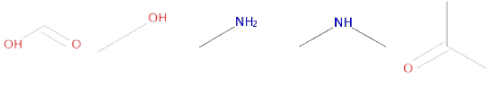

		
	bepotastine	     
	bepridil	     
	betaxolol	     
	bevantolol	     
	bisoprolol	     

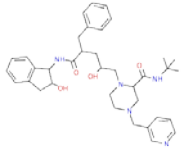
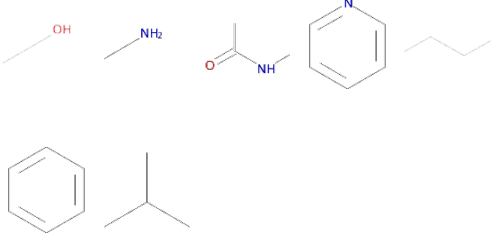
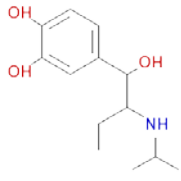
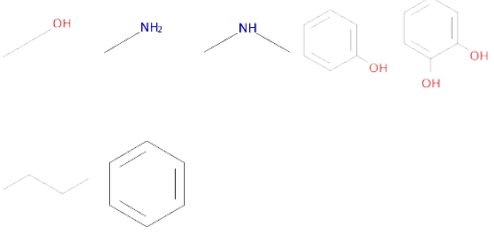
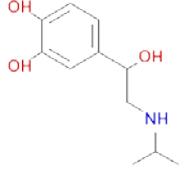
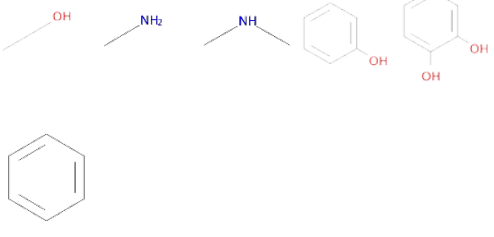
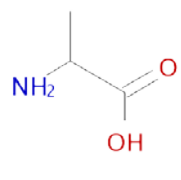
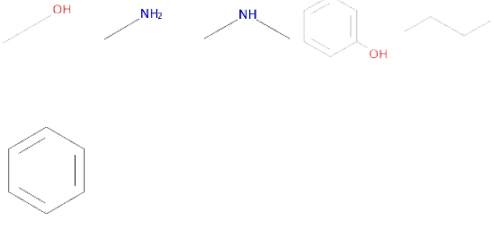
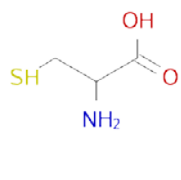
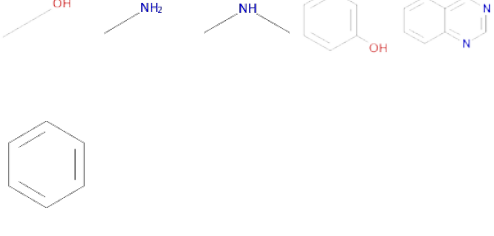
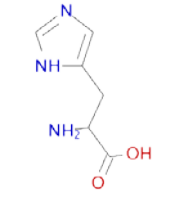
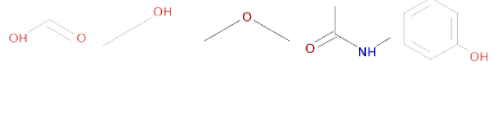
	<p>bosentan</p>	
	<p>buprenorphine</p>	
	<p>candoxatril</p>	
	<p>carbinoxamine</p>	
	<p>carvedilol</p>	
	<p>cefpiramide</p>	


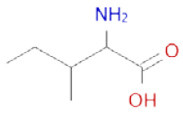






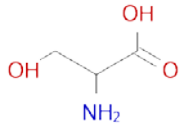








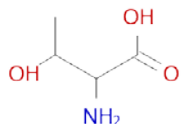






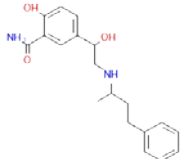








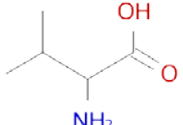








	<p>cephaloglycin</p>	 
	<p>cilazapril</p>	 
	<p>cyclopentolate</p>	  
	<p>darunavir</p>	  
	<p>deserpidine</p>	  
	<p>dicyclomine</p>	

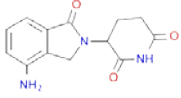
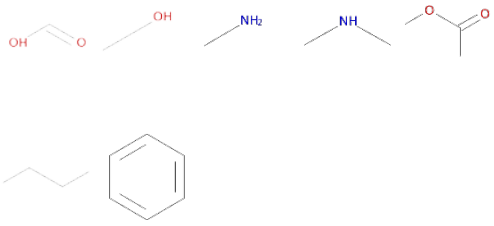
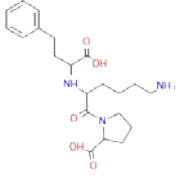
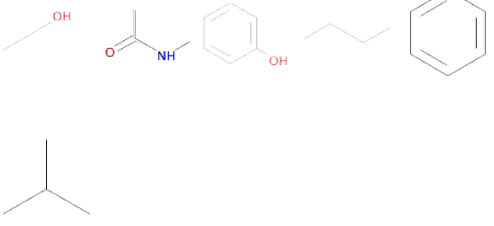
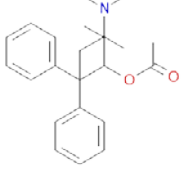
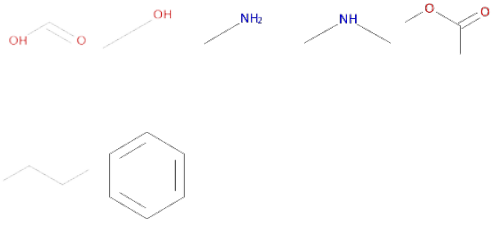
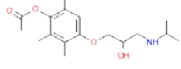
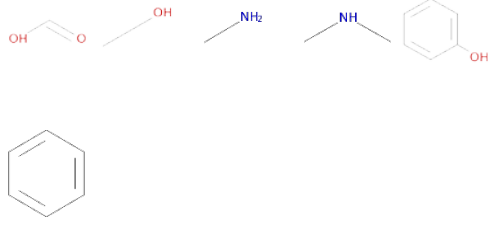
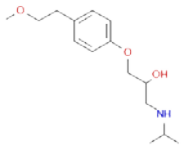
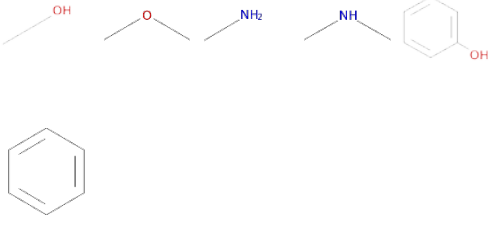
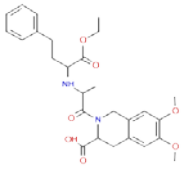
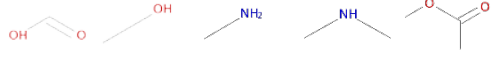
		
	diltiazem	 
	dipivefrin	 
	dobutamine	 
	doxylamine	 
	droxidopa	 


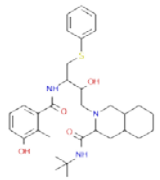


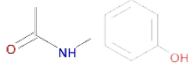



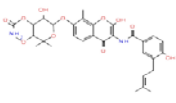


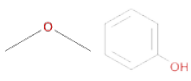

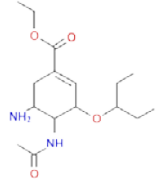





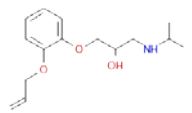


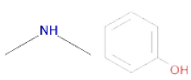
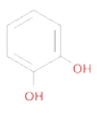

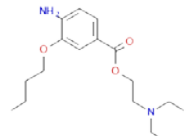



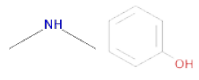


	<p>enalapril</p>	 
	<p>epinephrine</p>	 
	<p>ergoloid_mesylate</p>	 
	<p>esmolol</p>	 
	<p>fosamprenavir</p>	 
	<p>fosinopril</p>	

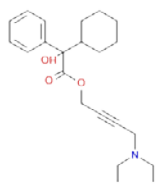
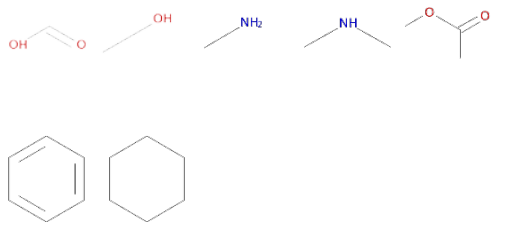
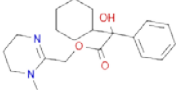
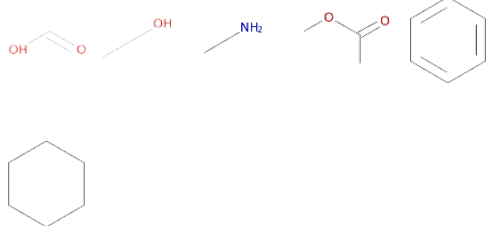
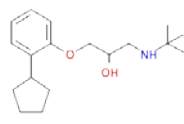
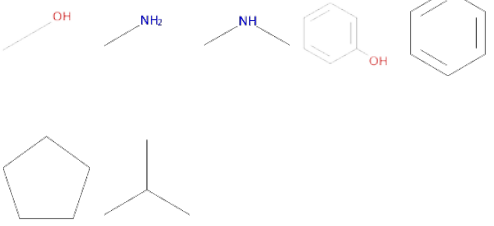
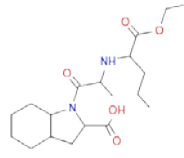
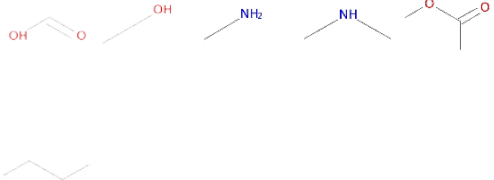
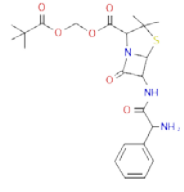
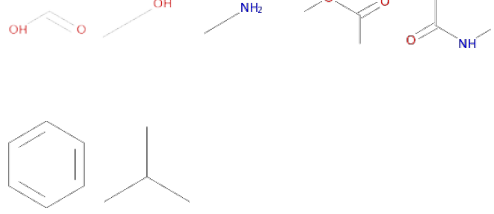
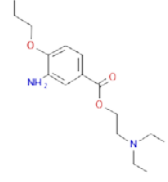
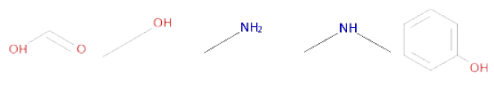
		
	gadobenate_dimeglumine	 
	gallamine_triethiodide	 
	gemfibrozil	 
	hexylcaine	 
	hydrocortamate	 


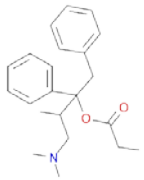








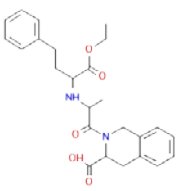






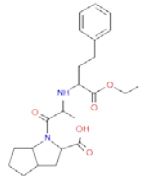






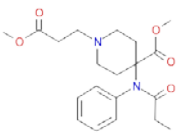






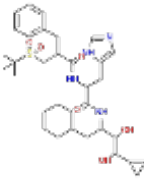

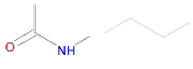



	<p>indinavir</p>	
	<p>isoetharine</p>	
	<p>isoproterenol</p>	
	<p>labetalol</p>	
	<p>lapatinib</p>	
	<p>latamoxef</p>	

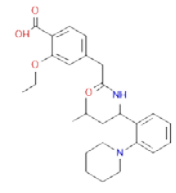
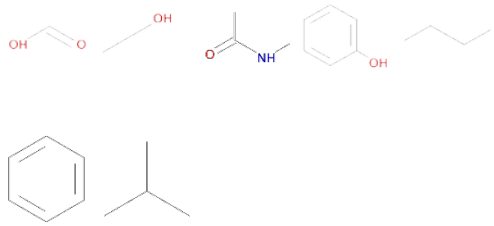
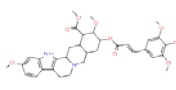
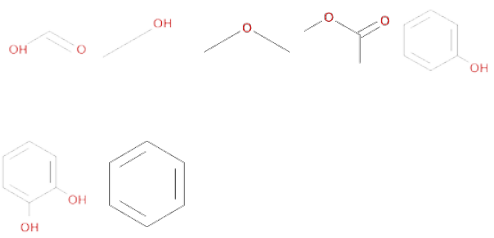
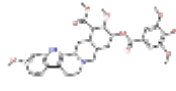
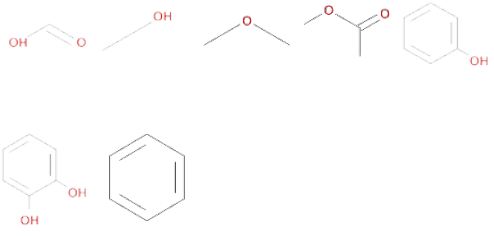
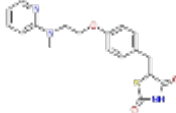
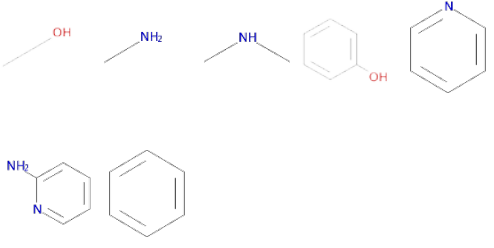
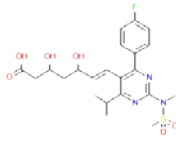
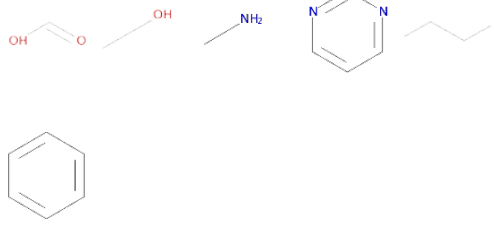
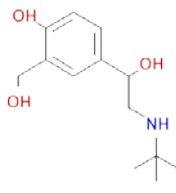
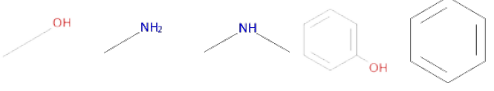
		
	latanoprost	     
	lepirudin	       
	lercanidipine	     
	leuprolide	       
	leuprolide_acetate	       


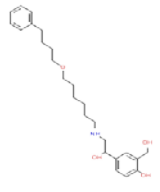
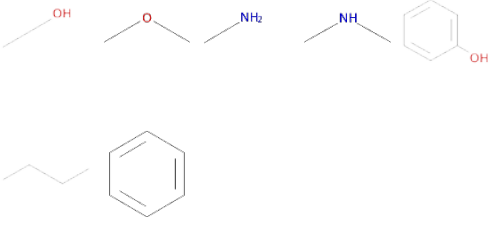
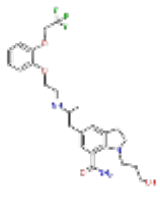
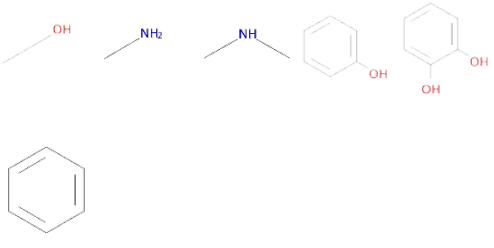
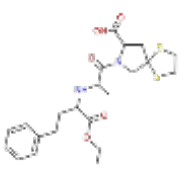
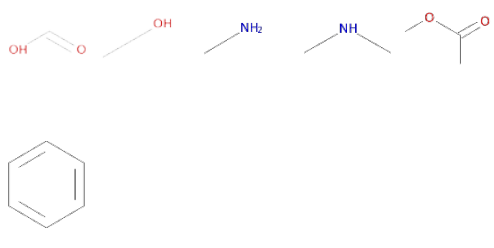
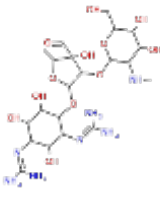
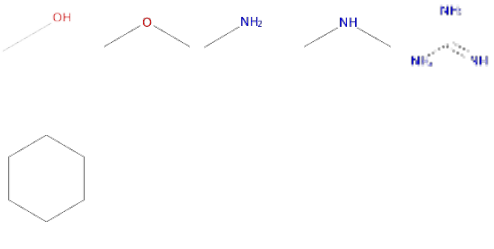
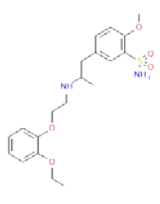
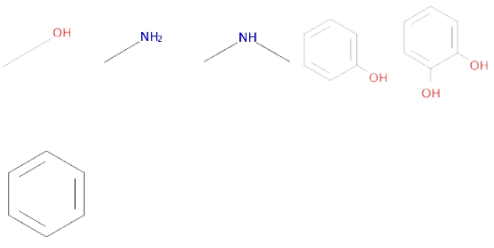
	<p>levomethadyl_acetate</p>	
	<p>lopinavir</p>	
	<p>methadyl_acetate</p>	
	<p>metipranolol</p>	
	<p>metoprolol</p>	
	<p>moexipril</p>	

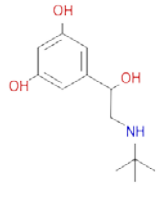
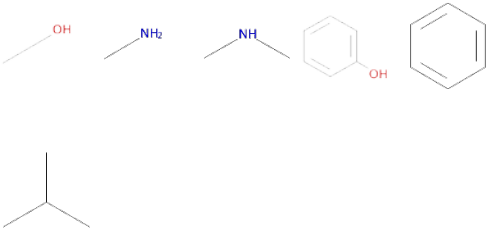
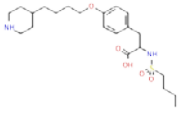
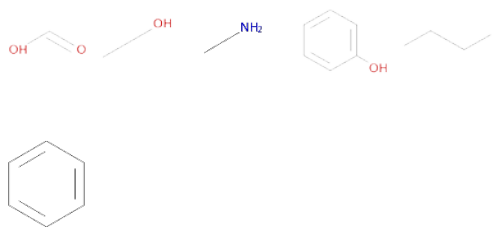
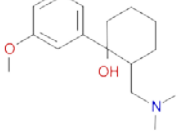
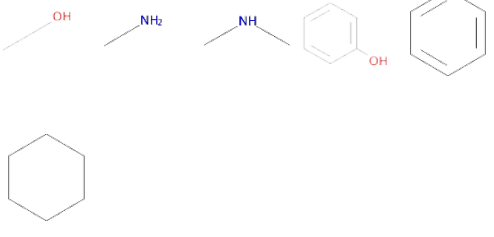
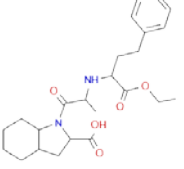
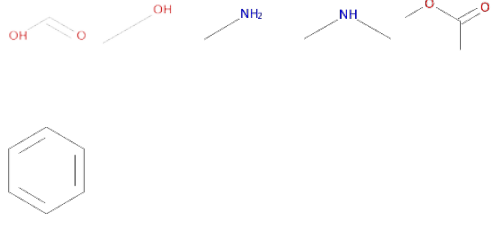
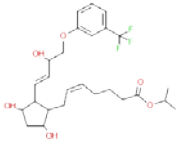
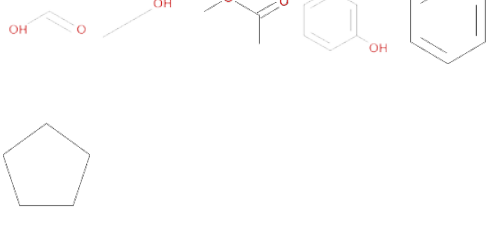
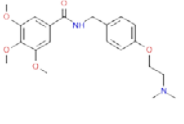
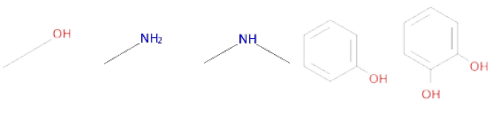
		
	nelfinavir	     
	novobiocin	   
	oseltamivir	    
	oxprenolol	    
	oxybuprocaine	     


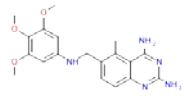






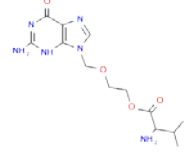







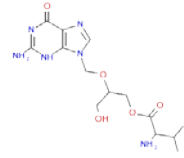







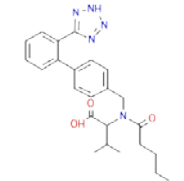






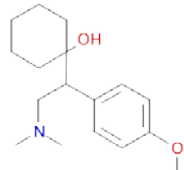



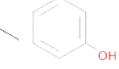


	<p>oxybutynin</p>	
	<p>oxyphencyclimine</p>	
	<p>penbutolol</p>	
	<p>perindopril</p>	
	<p>pivampicillin</p>	
	<p>proparacaine</p>	

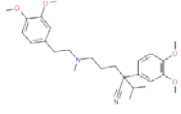
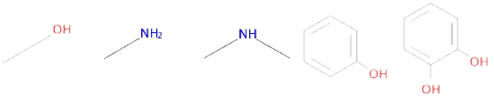

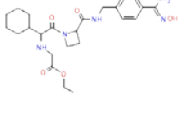
		
	propoxyphene	       
	quinapril	     
	ramipril	     
	remifentanyl	     
	remikiren	    

	<p>repaglinide</p>	
	<p>rescinnamine</p>	
	<p>reserpine</p>	
	<p>rosiglitazone</p>	
	<p>rosuvastatin</p>	
	<p>salbutamol</p>	

		
	<p>salmeterol</p>	
	<p>silodosin</p>	
	<p>spirapril</p>	
	<p>streptomycin</p>	
	<p>tamsulosin</p>	

	<p>terbutaline</p>	
	<p>tirofiban</p>	
	<p>tramadol</p>	
	<p>trandolapril</p>	
	<p>travoprost</p>	
	<p>trimethobenzamide</p>	

		
	trimetrexate	     
	valaciclovir	      
	valganciclovir	      
	valsartan	     
	venlafaxine	     

	<p>verapamil</p>	 
	<p>ximelagatran</p>	