

壹、緒論

一、研究背景

翻開近半個世紀的藥物研究開發史，有許許多多的新藥產生方式，但無意間偶然發現的藥物還是佔大多數，不然就是在對發酵產品，化學產品或是天然物進行大量篩選的結果。由於大多數前導化合物由於生物活性不夠強、目標蛋白質的選擇性不佳、缺乏良好的藥物動力學性質—吸收、分佈、代謝與排泄(ADME)或是具有毒性，所以必須經過前導藥物最佳化(lead optimization)的過程來增加藥物的活性、選擇性和藥物動力學性質，來提供更安全的候選藥物以供進一步的臨床試驗¹。

傳統上前導藥物最佳化的是一項耗費大量時間和金錢的過程，亦是藥物開發的瓶頸之一，因為先導藥物最佳化的過程是執行辛苦又繁瑣的化學修飾來達到增強其活性和降低毒性的工作。這種以合成類似化合物來尋找新藥的方法，需要一定數量以上的化合物才能建立起結構與活性的構效關係 (structure-activity relationship)²，作為下次合成與修飾之依據。然而這種作法屬於回顧性的作法，缺乏前瞻性的理論來做合理的推論，使其無法有效的預期結果。雖然這種尋找新藥方法有缺點，但西方業國家能採取這種策略來引進了不少新藥上市。例如早期發現的磺胺藥、青黴素以及 5-FU 等，但通常都是無意中去發現，有些則是靠篩選合成化學品時候，才發現活性，並且要經過一段時間的研究後才能去了解藥物的作用機制。經由早期藥物的研究，了解到無論是來自化學合成藥物或是天然藥物，均由抑制病原體上特定酵素造成殺死病原體而達到療效，因此之後，發展酵素抑制劑漸漸成為化學療法之後的藥物設計主流方式。

過去十年來，由於分子生物學與蛋白質化學的突飛猛進，可以提供大量且高純度的蛋白質進行結構之分析與鑑定。伴隨著 X 繞射晶體技術 (X-ray crystallography)、磁核共振光譜 (NMR spectroscopy) 以及電腦工作站之技術的進步，加速在蛋白質三度立體空間的測定。利用這些高科技所輔助產生的資料，使得藥物設計者可以觀察配體或抑制劑在酵素活性部位原子間相互作用之情形，來從事有效的藥物設計。因此有別於早期的藥物探索方式，可以准許從何角度去觀察活性分子與酵素在原子層次互相作用之情形，例如氫鍵數、靜電引力、疏水區、立體效應等。因此可以依照實際觀察並找尋各種不同種類之化合物，以產生各種不同的化合物，有助於合理地去開發具不同藥理活性之不同結構活性化合物，這種方法在進十年來普遍受到重視並且被廣泛的應用在藥物設計領域上。有別於過去傳統的方式，一般相信，這種方法依照結構去從事藥物設計，將可以提供更便宜，快速且合理的尋找藥物先導藥物化合物的方式。

然而在近年來文獻中可以看到，運用虛擬藥物篩選的方式所尋找到有效化合物的例子，可以說是越來越多。但是大部分所找到的有效化合物(active compound)的半數最大抑制濃度或是解離平衡常數 K_d 大約都是在 $\mu\text{M}(10^{-6}\text{M})$ 左右，和真正大部份所上市的藥物大約都是在 $\text{nM}(10^{-9}\text{M})$ 這樣的強度相比，還是有著巨大的差距。雖然這些初步找到的有效化合物有些可以繼續發展成為真正適合的藥物的潛力，這些藥物就會被當做藥物發展過程中的前導化合物。而如何去從篩選有效化合物到前導藥物化合物，通常是將化合物限制在於「drug-like」的化合物，「drug likeness」³ 泛指在過程中如穩定度，溶解度及脂溶性等可以影響藥物吸收及排泄的重要性質。因此在做化學資料庫的篩選的時候，drug-like 的化合物就顯的特別重要，因為在一般資料庫中，大部分的化合物會比較像是試劑 (reagent-like) 而非藥物。而由 Teague 等人⁴ 根據一般開發藥物中的先導藥物來源及演進，提出依據結合親合力應考慮三大類先導化合物：drug-like lead、lead-like lead 和 high-affinity lead。而通常第一類 lead-like 的化合物有低的親和力，經由增加其分

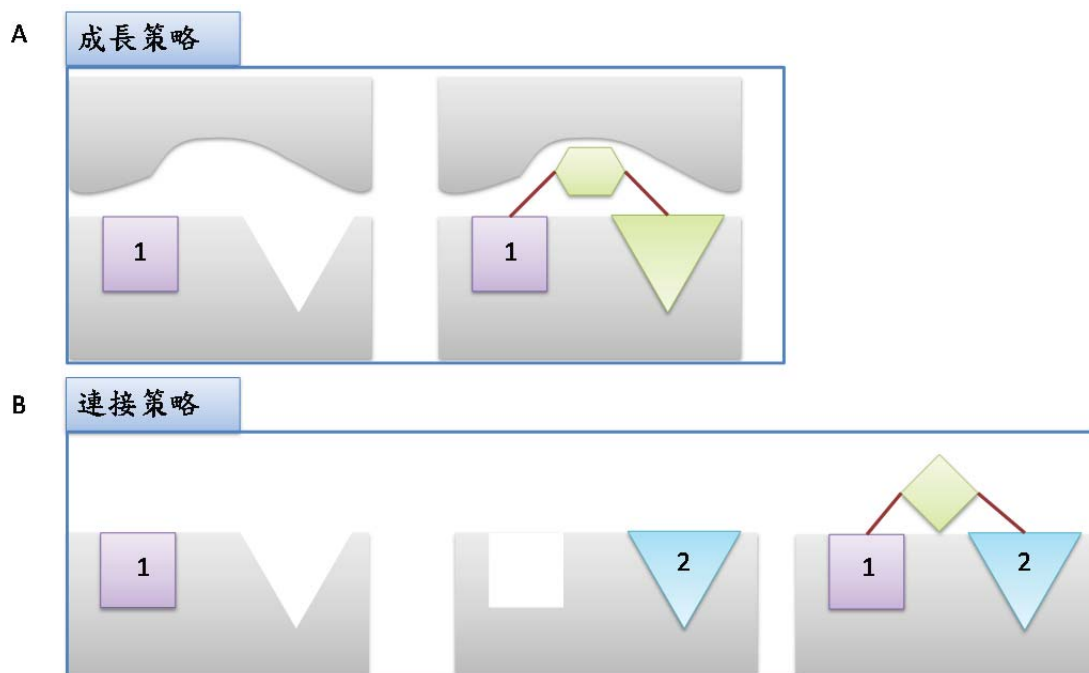
子量和脂溶性來優化活性，第二類通常是具有高分子量及高親和力的化合物，則是可以經由減少分子量以及增加親脂性來改善其藥物動力性質並維持其活性。也有研究利用分析 World Drug Index 內的化合物性質所歸納出來的五項原則(rule of five)⁴來作為化合物是否適合做為藥物的選擇依據，當化合物有下列情況時的口服吸收效果會較差：分子量大於 500；疏水性分配係數(CLOGP)大於 5；氫鍵提供者多於 5 以及氫鍵接受者多於 10，而目前也有計算方法可以用來上面的事情當做評估項目，用來評估藥物動力學性質。因此，在虛擬藥物篩選尋找到前導藥物後，需要經過前導藥物最佳化的過程，方能將化合物修改為活性強、選擇性佳、具備良好藥物動力學性質且安全的候選藥物以供進一步的臨床試驗。傳統上先導藥物最佳化是一項耗費大量時間與金錢的過程，也常是藥物開發的瓶頸。而在藥廠激烈競爭下，『速度』往往造成整個藥物開發的成敗。因而發展一個良好的前導藥物最佳化的方法，對於藥物設計上有極大價值。

二、 相關研究

目前在藥物設計發展上作用在前導藥物最佳化的方法主要可以區分為兩大類⁵⁻⁷：基於受體虛擬篩選(Receptor-Based Virtual Screening)和基於配體虛擬篩選(Ligand-Based Virtual Screening)，兩者最大的差異點是在利用的資料類型上的不同。基於受體虛擬篩選主要是一般應用由 X-ray 結晶學或核磁共振光譜學所提供的蛋白質結晶結構資訊來輔助設計具有藥理性質的化合物，通常稱為片段對接方法(fragment docking)⁸；而基於配體虛擬篩選主要是由於目標蛋白質的結構尚未被結構出來亦或是無法得知，因此利用一群已知活性配體的結構進行歸納分析來間接性進行藥物設計，主要可以區分為兩大類：第一類為利用定量構效關係(QSAR)^{9,10}，第二類為利用藥效團模型(pharmacophore)^{11,12}。

受體虛擬篩選是依靠蛋白質結構資訊來輔助設計具有藥理活性的新穎化合物，配合以電腦方式進行藥物設計或是高通量篩選的方法可以快速的篩選出擁有

特有化學官能基如電荷、疏水基及提供或接受氫鍵等的化合物，可以結合於或模擬蛋白質活性位置，可以直接提供資訊去尋找更多有關目標蛋白質有結合能力的化合物。利用上述的資訊，可以加入組合化學(combinatorial chemistry)的觀念¹³，利用重新設計的概念去將各個分開的藥效團或是化學片段以合理的方式連接起來，形成新型態且合乎化學原理的虛擬結構，所產生的化合物可以直接當作配體，或是作為模版去查詢資料庫尋找有潛力之抑制劑或是配合組合方法以減少需要合成的化合物的數量。若是已經知道化合物與目標蛋白質的結合位置，則可藉由電腦模擬產生的化合物是否能在同一位置與蛋白質產生更強的結合能力，或是去針對目標蛋白質做重新設計化合物，用電腦模擬方式產生一些可以與此位置結合的新化學結構，兩種方法都可用來找出新的化合物做前導化合物或是去改善已知化合物的活性。而產生配體的方式大致上可以分為兩種¹⁴：成長以及連接。如圖一所示，在成長策略中，由一個已知在目標蛋白質內化合物的結合位置，以此化合物作為種子結構，並逐漸接上符合位置特性的藥效團或是化學片段，以達到符合整個結合區域的特性；在連結策略中，同樣地以一個事先在結合位置的分子為種子結構，不過此種子結構被拆開為各個片段以達到與靶標有最大的相互作用，然後再逐漸重新連接各個片段，最後設計成新的配體分子。相對於傳統方法必須合成及測試龐大數量化合物，利用結構篩選的方法能夠降低測試和合成化合物的數目，因而加速了新藥開發的過程。但這種方式需要依靠準確的記分方程式，但目前的記分方程式都有不準確的問題。



圖一：描述在受體虛擬篩選所採用的兩種策略

(A)成長策略是由一個已知的官能基團 1 去找出適當的官能基團到另外一個區域。

(B)連接策略是分別由兩個已知的官能基團 1 和 2，去尋找中間的可能連些方式。

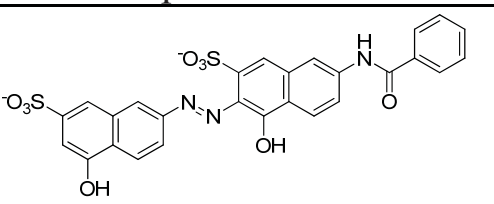
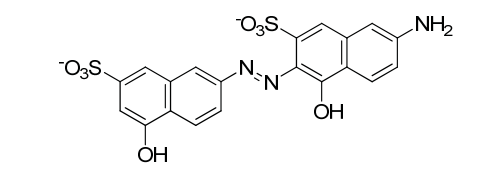
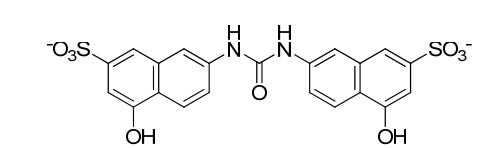
定量構效關係是在傳統構效關係的基礎上，結合物理化學中常用的經驗方程的數學方法出現的藥效團模型。首先發展的是二維定量構效關係²，是將化合物整體的結構性質作為參數，對化合物生理活性進行回歸分析，建立化學結構與生理活性相關性模型的一種藥物設計方法，通常採用的參數可以區分為活性參數和結構參數兩大類，活性參數由人們根據研究所選擇不同的活性參數，常見的有：半數有效量、半數有效濃度，半數抑菌濃度，半數致死量及最小益菌濃度等。通常都是用物質的量最為單位，去真實的反應化合物的生理活性。而常見的結構參數有：疏水參數、電性參數、立體參數、幾何參數、拓普參數及理化性質參數等。但利用這些參數所建構出來的模型，都是將化合物作為一個整體去考慮其性質，並不能反應化合物的三維結構與生理活性之間的關係。因此後來有引入藥物化合物的三維結構來進行定量構效關係的研究¹⁵，這種方法間接地反映藥物化合物與

大分子之間的交互作用過程中兩者間的非鍵結交互作用力特徵，相對於於二維定量構效關係有更加明確的物理意義和更豐富的信息量。經由電腦模擬分析一系列已知具有各種與蛋白質或酵素不同結合能力的化合物，排列並重疊各個化合物，找出其共通性，進而決定與蛋白質結合的構效關係，如此即可決定出在三維空間中化學分子重要作用力的立體關係。模型建立後，即可用來查詢各種化學或藥學資料庫，尋找符合藥效團的化合物，或是對目標藥物去進行修飾作用來提高藥物動力學性質。自 1980 年代以來，三維定量構效關係逐漸取代了二維定量構效關係的地位，成為基於機理的合理藥物設計的主要方法之一。目前應用廣泛的三維定量構效關係方法是 CoMFA¹⁶、CoMSIA¹⁷ 及 QSiAR¹⁸ 等眾多方法。

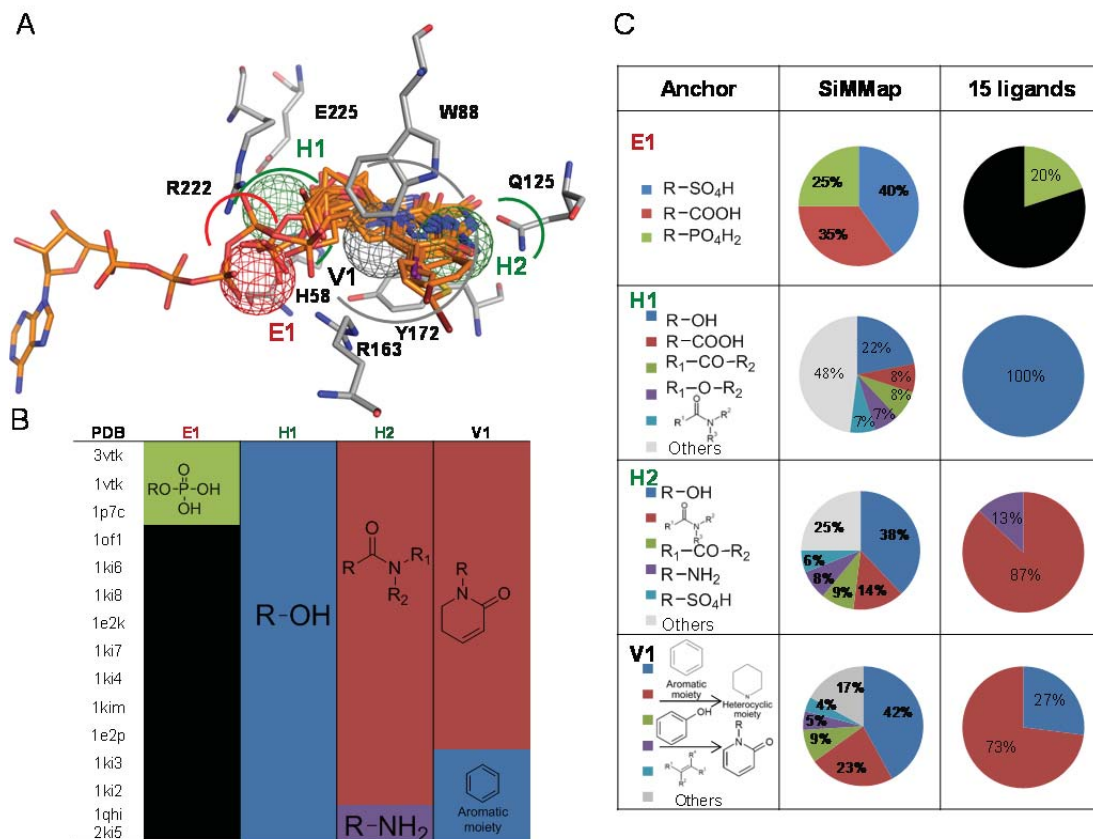
早期藥物化學家將藥效團由一個抽象的概念定義為：能使化合物表現出活性最基本的官能基；在一系列或是擁有相同的生物活性的化合物，通常可以找出共通的結構特徵，換句話說就是對生物活性可以有重要作用的化學結構特徵。一般而言，藥效團利用上述的結構特徵並以化合物內的原子為基礎去定義其化學性質，如酸、鹼、疏水性 (hydrophobe) 或芳香性 (aromatic) 等，不過有時立體結構特徵也被包括在內，如平面 (plane) 及法線 (normal) 等。目前在建立藥效團的方式大致上可以分為兩大類：第一類是在受體結構未知或作用機制尚不明確的情況，經由電腦分析對一系列結構不同的活性化合物進行藥效團研究，通過構象分析、化合物疊合等方法，歸納得到各化合物間立體構形的共通性與特異性，進而決定對化合物活性有關鍵作用的藥效團，最後建立蛋白質或酵素結合的藥效團模型。第二類為直接分析目標蛋白質的結構信息，分析受體與藥物分子的作用模式，可以找出同時具有化學特性以及結合模式的配體，此種結合的藥效集團與結構虛擬篩選 (pharmacophore-structure-based virtual screening)¹⁹ 將會是有潛力的藥物最佳化方式但此種方式比較耗時。但這兩種方式有著共同的限制是需要一組已知活性的化合物來去建立運算模型，其結果通常都是與已知活性化合物相似的結構，無法去尋找新型態的藥物。

實驗室在 2010 年時候，由於在使用以受體虛擬篩選的方法時候，往往會因為記分方式的不準確而造成通過篩選條件所選取的化合物都是具有高分子量和帶有高極性的分子，因而造成再建立模型的時候會有偏差，而使得後序的分析有精準度的疑慮，而在以配體為虛擬篩選的方法的缺陷在於需要有一五已經知道活性的化合物來進行建立模型，而且通常只能夠發現到與原先化合物相似結構的類似化合物，無法去發現新型態的藥物。因此實驗室發展出了區域官能基地圖的方法，利用一群不需對目標蛋白質已知實驗活性但需要經過虛擬藥物對接或是共同結晶的化合物，利用交互作用力列表尋找出在統計基礎上有意義($Z\text{-Score} \geq 1.65$)的胺基酸，所建立出來的錨點，並去統計在化合物中錨點內出現的官能基的比例，而全部錨點所合併起來就稱為目標蛋白質的區域官能基地圖。

在實驗室所發展的區域官能基地圖²⁰這個方式，利用統計的方式來對目標蛋白質與一群可不知道活性，但需已對接或是共結晶配體所產生的交互作用，推測位於目標蛋白質結合區域內的錨點(Anchor)，並用以描述分布在結合區域中的化合物官能基偏好(moiety preference)以及物化特性集合。錨點內為目標蛋白質結合區域內的重要位置，並包含重要交互作用力的胺基酸以及所適合的官能基，如圖二所示。此方法可以用來解決在受體虛擬藥物篩選所遇到記分方程式不準確的問題，更進一步可以利用這個錨點去尋找新型態的藥物，使其不受限有藥物的影響。更進一步，在實驗室之前的研究中，成功的在流感病毒神經胺酸(neuraminidases)這個目標蛋白質尋找到新型態的抑制劑，如圖三所示。

Compound structure	IC50(μM)
	4.7
	4.5
	5.3

圖二：利用區域官能基地圖在流感病毒神經胺酸所發現的新型態藥物



圖三：舉胸腺嘧啶核苷激酶為區域官能基地圖例子

(A)表現出區域官能基地圖內有四個錨點(包含結合區域位置和重要交互作用胺基酸)和其 15 個共同結晶結構化合物位於蛋白質活性區域。(B)15 個共結晶化合物在每個錨點內的官能基。(C)1000 個已對接化合物與 15 個共結晶化合物在每個

錨點內的官能基組成。

三、 研究動機

從前導藥物到政府核准上市所需要的時間往往是快要十幾年，而且在進行前導藥物最佳化的開發過程中的時間單位通常是用『年』，且在進行合成上是耗費大量金錢。雖然，進行研發新藥的所需要耗費的金錢十分龐大，但新藥若能夠搶先上市所能各獲得的利潤是十分驚人的，舉 2009 年全球銷售第一的降血脂藥品“Lipitor”所帶來的營收達 114 億美元收入，投資的成本自然可以回收。但是若被別人搶得先機，新藥率先上市就把市佔率提高，那麼後來上市的藥物只能從較小的市場內獲取較小的利潤，那當初的投資和努力也有可能是無法回收的。因此在二十一世紀新藥開發的成功關鍵在於『速度』，以目前方法來看，最有可能去加速的過程就是在提升尋找有效的前導藥物的成功率以及前導藥物最佳化的步驟。

而在電腦輔助前導藥物最佳化的方法中，目前主要有三大類：藥效基團為基礎(pharmacophore)、定量結構關係(QSAR)為基礎及片段對接方式(fragment docking)。但在前兩類被限制先有一組已知實驗資料的化合物來建立數學模型，因此所找出的結果都與已知化合物有相似的結構。而片段對接方式則是需要利用記分方程式去預測能量，但記分方程式通常都是不準確的。因此發展新的方法去應用在前導藥物最佳化上，對於藥物設計上市有很大的價值。

由於實驗室之前所開發的區域官能基地圖的觀念運用在對已經知道結晶結構的蛋白質上去尋找新型態的抑制劑或是促進劑有一些初步的成果，且區域官能基地圖的錨點內有官能基的偏好比例，因此若能夠使用一種量化數值去量度官能基在錨點內的合適程度，以及在此量化數值是否可以和做實驗資料有呈線性的關係。若能夠有這方面的資訊，可以將區域官能基地圖的應用範圍在更加拓廣，不只能夠在尋找新型態的藥物和提供錨點內的合適官能基，並能夠直接去判別是否

能夠提高藥物的活性，能夠成功降低合成化學物衍生物的次數以及提升成功率，更能夠降低實驗所需耗費的成本。因此對於在做前導藥物最佳化得過程中可以扮演一個『加速』的重要腳色。

四、 論文總覽

我們利用區域官能基地圖概念，是否可以利用錨點內的官能基組成去加速或指導前導藥物最佳化的過程，在第二章提出錨點能量這個新的量度方法去衡量在錨點內的官能基符合此區域位置的程度，主要是由計算錨點內重要胺基酸與官能基之間的關係。且由於區域官能基地圖的特性，是不需要事先有一組活性資料的化合物，因此不會受限於現有的藥物，更能找出較為新穎的官能基團，因此能夠對修飾成更新穎的化合物。第三章利用神經胺酸水解酶擁有的許多結構活性關係的資料，可以用來作為判錨點是否可以符合有活性的化合物，並可將錨點能量與半數最大抑制濃度之間的相關性，並初步驗證此方法。再者流行性感冒對人類來說是一項會廣泛流行的疾病，且由於它的高致死率與易造成大流行，因此設計藥物來對抗流行性感冒是一件重要的事情。最後，舉出在此篇論文的主要貢獻以及未來研究在於尋找新目標蛋白質或是將藥物發展到 150-loop 的區域。

貳、 研究材料與方法

一、 流感病毒 H1N1 與其藥物

「流感」是流行性感冒的簡稱，是由流行性感冒病毒所引起，而會被簡稱為「流感」是因為在大流行的時期非常容易致病。流感為一種急性呼吸道傳染疾病，以飛沫傳染為主要途徑，主要感染上呼吸道上皮細胞，其潛伏期約為一至三日。一般而言，在發病初期有受過適當治療的情況下，病人通常都可以漸漸回復健康，但流感並不同於一般感冒，其可怕之處在於傳染的快速、散播區域的廣泛以及對體力弱的人所以引起的併發症而導致死亡，尤其是病毒性或是細菌性肺炎。

流感病毒可依照基質蛋白與核心核糖核蛋白(ribonucleoprotein)來區分為 A、B、C 三型，其中以 A 型病毒最容易爆發大流行。就過去一百多年來，全球至少爆發數次大區域的流行，其中以 1918 年所造成的「西班牙流感」為最嚴重。在自然界中，流感病毒也會感染人類以外的動物，如一些禽鳥類、豬、碼、鯨魚等哺乳類動物。因此，流感疫情幾乎每年都會發生，無法徹底根絕病毒。然而最近所爆發的禽流感就是以感染鳥類為宿主的流感病毒所造成的疫情^{21,22}。然而，通常這類病毒只會針對此特定的鳥類或是豬隻進行感染，對人體並不會造成影響。但在 1997 年香港所爆發的禽流感中，首次證實有 18 人被感染且 6 人死亡的案例²³。外，新的 H1N1 流感病毒株已經迅速蔓延到許多國家。新的 H1N1 流感病毒株起源於豬隻病突變可以感染人類，且已迅速蔓延到許多國家²⁴。這種現象，讓我們擔心此類病毒可能因基因突變或與人類流感病毒基因基因重組，形成對人類生命健康有重大威脅的超級病毒。

再以「預防勝於治療」的前提下，人類對抗流感病毒的第一道防線是疫苗(vaccine)。世界衛生組織 (World Health Organization, 縮寫為 WHO)每年會根據歷史經驗預測下階段會爆發流行的流感病毒進行疫苗的製作，讓施打的人體可以

對該病毒產生抗體，擁有免疫能力，避免受到流感的傷害。但流感病毒具有易突變性的特徵，所以用疫苗來防疫的成效不佳。再者，疫苗的開發和生產通常需要半年的時間，所以當疫苗無法對人類產生保護的情況下，治療流感的藥物就成為防止流感疾病快速蔓延的最後一道防線，因此，開發抗流感藥物的就顯的特別重要。

在流感病毒的外套膜上有兩組重要的蛋白酶，血球凝集素 (hemagglutinin ，縮寫為 HA) 和 神經胺酸水解酶(neuraminidase ，縮寫為 NA)。在現今發現的流感病毒中，依據抗原性來區分，血球凝集素可以分為 H1~H16 共 16 種而神經胺酸水解酶則可分為 N1~N9 等 9 種。由血球凝集素和神經胺酸水解酶不同抗原性的組合則會產生感染不同宿主的病毒，像 H1N1 和 H3N2 就是針對人類為主的流感病毒。

流感病毒在進入宿主細胞與完成複製脫離宿主細胞的過程中，外套膜上的血球凝集素和神經胺酸水解酶則扮演著重要的角色。病毒入侵動物體的過程中，血球凝集素扮演著辨識宿主細胞膜上的唾液酸受體(sialoside receptors)並與其結合，其結果可以幫助流感病毒外膜與宿主細胞膜相互融合，好讓病毒可以經過細胞膜的融合進入宿主內進行複製。而神經胺酸水解酶則是具有催化水解唾液酸(sialic acid)的受體的活性。當成熟的流感病毒要脫離宿主細胞之際，流感病毒表面的血球凝集素會經由唾液酸與宿主細胞膜保持聯繫，此時就需要神經胺酸水解酶來將唾液酸水解，切斷病毒與宿主細胞的聯繫，以利於病毒進行下一階段的感染。相較於血球凝集素的抗原易變性，A 型流感病毒的神經胺酸水解酶抗原性則顯得較為單純。並可以根據他們彼此之間的演化距離區分為群組一(N1、N4、N5 和 N8)和群組二(N2、N3、N6、N7 和 N9)²⁵。因此神經胺酸水解酶蛋白質對於設計抗病毒藥物上是個良好的目標蛋白質^{26,27}，也是現今發展流感藥物最為成功的一個標的。其作用機制就是抑制神經胺酸水解酶的活性，使病毒不無法切斷與宿主細胞的聯繫，造成子代病毒無法游離去造成下一次的感染。

目前市面上廣泛被使用來治療流感病毒的感染並利用流感病毒神經胺酸水解酶為目標蛋白的藥物主要是瑞樂沙和克流感，這兩種藥物主要是設計在唾液酸的過度型態所產生的結合區位^{25,28,29}並且對於任何的種類的流感病毒神經胺酸水解酶有良好的效用。在1974年的時候，最早的設計在唾液酸過度態的抑制劑為DANA，但活性沒有顯著³⁰。但經過了約二十年，利用DANA為基礎所開發出來的Zanamivir可以大幅改善抑制神經胺酸水解酶的活性，後來由英國葛蘭素史克藥廠所生產並以「瑞樂沙」(Relenza)為商品名在1999年開始販售。但由於生物利用度(bioavailability)不佳，因而採用吸入式(inhalation)噴劑方式噴於患者口腔或黏膜部份，藉由黏膜吸收進入體內達到抑制病毒的功效。在開發瑞樂沙的同時，有另外的想法是模擬DANA含氧六員環陽離子的過度探結構設計合成環己烯為骨架的相似過度態的分子架構來設計神經胺酸水解酶的抑制劑。因此發展出GS4071($IC_{50} = 1 \text{ nM}$)為藥物候選分子，由於GS4071的高極性化學結構在口服的生物利用度不高，但經由乙酯化的化合物(Oseltamivir)改善了近五倍的生物利用度，才發展成為臨床用藥「克流感」。克流感(Tamiflu)是由瑞士羅氏藥廠(Hoffmann-La Roche Ltd.)所開發，屬於前驅藥物(prodrug)並採用口服形式入藥，經由腸胃道吸收進入體內，交由肝臟的酯水解酶(esterase)轉化為具有易至活性的成分。

然而，有越來越多的流感病毒株對於用克流感的治療方式產生抗藥性³¹。因此，在1990年代初期，另外有人提出五員環為主體架構修飾的抑制分子具有抑制神經胺酸水解酶的活性，雖然抑制效果不佳($IC_{50} = 40 \mu\text{M}$)但引起科學家的興趣。依照瑞樂沙的設計思維，設計出帕拉米維(Peramivir)的化合物，並通過臨床一期(Phase I)和二期(Phase II)測試，排除藥物會所造成的併發症或毒性的可能，但在臨床三期(Phase III)因為藥物的口服的生物利用度不足，無法充分進入血液中而失敗。但在2009爆發新型流感病毒的流行，因此人體內季節性H1N1流感病毒的抗體無法與之對抗。因此美國食品藥物管理局於2009年10月23日發布緊急

使用授權(EUA)，核准使用帕拉米維治療有疑似潛在生命危險或實驗室確診的2009年H1N1流感住院病患，適用於流感重症病患因昏迷等原因，但無法吞服克流感或是吸入瑞樂沙的病患，利用靜脈注射和肌肉注射的方式來進行治療。但也有發現對帕拉米維，瑞樂沙和克流感具有多重抗藥性的H1N1流感病毒株。因此，顯而易見在開發新型態的感冒病毒藥物去治療流行性感冒是必需的。

在研發流感病毒的神經胺酸水解酶的藥物二十多年的期間中，唾液酸有許多的化學結構的衍生物和抑制活性之間的關係的資料，可以做為我們在探討錨點和化合物官能基之間的關係，以及在實驗資料上的符合程度，進而可以增加我們錨點再提供官能基的指標上的可信度。更進一步，可以作為在前導藥物最佳化過程中，作為其中的一項指標。

二、 區域官能基地圖、錨點和立體袋槽

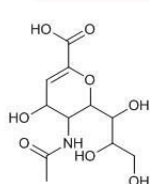
與立體袋槽與官能基有交互作用偏好所構成的錨點為區域官能基地圖的核心。任何一個錨點應該具有三個必需的要件；其一，結合區域立體袋槽應該是由一群高保留性的胺基酸所構成的並擁有特定的物理化學性質；其二，對於立體袋槽有特殊偏好的官能基；其三，立體袋槽和官能基是由特殊的交互作用型態所組成(靜電力、氫鍵與凡得瓦力)。而錨點可以被視為用來呈現特殊具有高保留性交互作用的結合區域的要素或是可以參與生物功能作用的熱點。此外，我們推論一個立體結合帶槽應該是結合區域的一小部份，並且應該包含一些對於化合物的官能基有顯著交互作用的胺基酸。而結合帶槽往往具有特定的物理化學性質和官能基對於幾何形狀上的偏好。區域官能基地圖可以幫助在藉由空間最佳化的情況下去尋找符合立體結構、氫鍵和靜電力上的潛在化合物官能基或化合物，因此在藥物設計發展和了解生物機制上可以有幫助。

三、 建構區域官能基地圖的資料庫

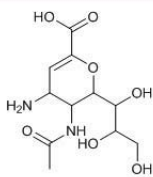
為了去測試和描述區域官能基地圖的功能和效用，我們使用流感病毒神經胺酸水解酶做為我們的目標蛋白。並且收集了通過美國食品藥物管理局所通過的藥物(1024 化合物)、Maybridge (65,947 化合物)、National Cancer Institute (NCI)、(236,962 化合物) 和 Sigma (112,068 化合物)等四個化合物資料庫拿來作虛擬藥物篩選。我們利用 CORINA³² 這個軟體得到化合物的立體結構。而 H1N1 的病毒的立體結晶結構蛋白質是被選用拿來當作虛擬藥物篩選和建構區域官能基地圖的目標，其 PDB 編碼為 3beq³³。這些化合物利用實驗室所發展的 GEMDOCK³⁴⁻³⁷ 軟體用來進行流感病毒神經胺酸水解酶的結合位藥物嵌合過程，而 GEMDOCK 軟體則是在過往的經驗中，可以成功的對某些目標蛋白質辨別出抑制劑和結合區域位置³⁸⁻⁴¹ 並且和目前常用的藥物嵌合軟體進行比較，例如：DOCK⁴²、FlexX 和 GOLD。

首先，我們使用了蛋白質資料庫(Protein data bank)上的 H1N1 流感病毒的神經胺酸水解酶的結晶結構 (PDB 編碼：3beq³³)，並視與瑞樂沙周圍 10 Å 內的胺基酸為結合區域位置。接下來，我們利用在 GEMDOCK 對上述的化合物資料庫所得到的能量，選擇排名在前壹仟名的化合物拿來當作建立流感病毒神經胺酸水解酶的區域官能基地圖的資料庫。此外，為了要做驗證，利用 Bissantz et al⁴³ 的方式，另外準備了十個目前已知對流感病毒神經胺酸有活性的化合物和從 Available Chemical Directory (ACD) 利用亂數所選取的 990 化合物並且當作對流感病毒神經胺酸沒有活性，用來去測試利用區域官能基地圖是否可以有效提升虛擬藥物篩選的準確率。最後，為了去驗證區域官能基地圖的正確性，收集了三個目前對流感病毒神經胺酸水解酶的藥物，及其相關的衍生物共 18 個化合物，如圖四所示。

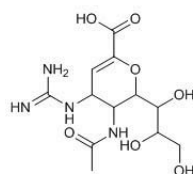
A Zanamivir SAR compounds



Neu5Ac2en
(DANA)
4000nM

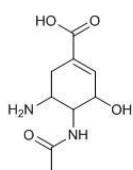


4-amino-Neu5Ac2en
150nM

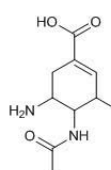


4-guanidino-Neu5Ac2en
(Zanamivir)
1nM

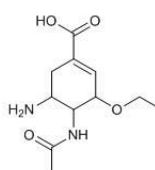
B GS4071 SAR compounds



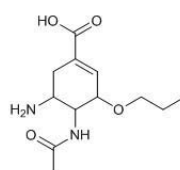
8
6300nM



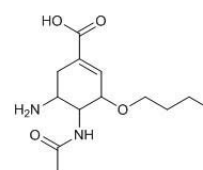
6a
3700nM



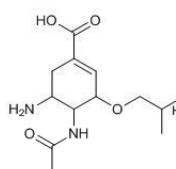
6b
2000nM



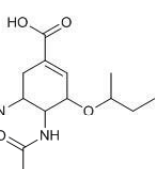
6c
180nM



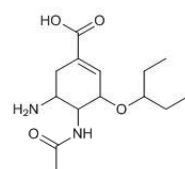
6d
300nM



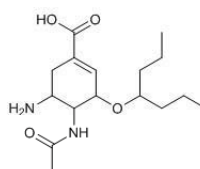
6e
200nM



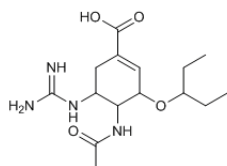
6f
10nM



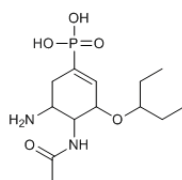
6h (GS4071)
1nM



6i
16nM

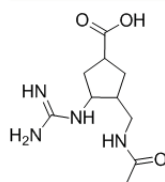


Carbocyclic
Analogue 62
0.5 nM

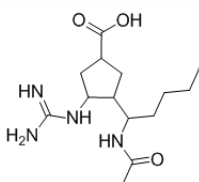


3a
0.3 nM

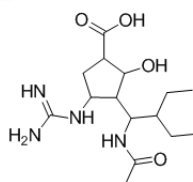
C Peramivir SAR compounds



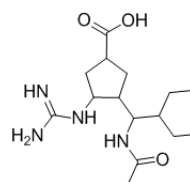
6
N2: 27,400 nM
N9: 115,000 nM



7
N2: 25nM
N9: 100 nM



Peramivir
N2 : <1nM
N9: 0.1-1.4 nM



50
N2: <1
nM

圖 四：收集流感病毒神經胺酸的藥物和其衍生物

(A)瑞樂沙和其衍生物。(B)克流感和其衍生物。(C)帕拉米維和其衍生物。

四、 建構區域官能基地圖的流程

首先，將 H1N1 流感病毒的神經胺酸水解酶的結晶結構 (PDB 編碼:3b7e³³) 上與瑞樂沙周圍 10 Å 內的胺基酸從結晶結構上收取下來，作為虛擬藥物篩選中目標蛋白質的結合區域位置。並且，我們利用 GEMDOCK 程式來將上述的四個化合物資料庫對 H1N1 流感病毒的神經胺酸水解酶進行虛擬藥物篩選，並利用能量的方式去挑選和 H1N1 流感病毒的神經胺酸水解酶的結合區域位置具有立體結構和物理化學性質上有互補作用的前一千名化合物 (大約佔了 0.24 百分比)，並利用這一千個化合物當作建立區域官能基地圖所需的已經做過分子嵌合化合物資料庫。



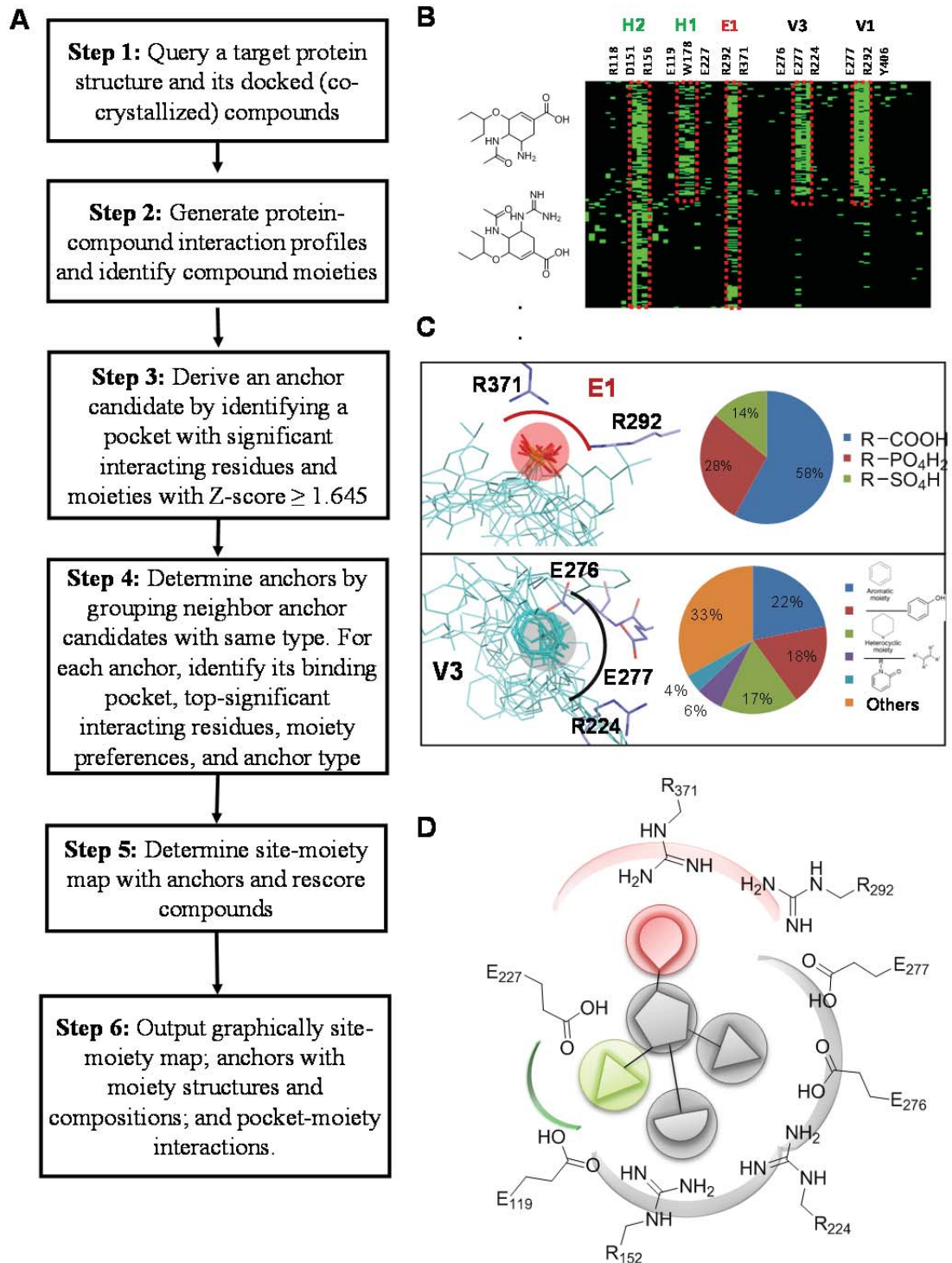


圖 五：利用流感病毒神經胺酸水解酶作為區域官能基地圖例子

(A)建立區域官能基地圖的步驟。(B)上傳化合物與目標蛋白質所建立起來的交互作用力列表。(C)舉靜電力錨點(E1)和凡德瓦力錨點(V3)作為例子去解釋錨點內所包含的胺基酸及官能基組成。(D)流感病毒神經胺酸在唾液酸位置所建構出來的區域官能基地圖。

區域官能基地圖伺服器對於每個查詢主要採用六個步驟，如圖五所示。首先，使用者可以上傳一個蛋白質結構和對上傳蛋白質結構做過分子嵌合化合物。接著，伺服器對上傳的化合物利用 checkmol 軟體來進行官能基的判定並且對於上傳蛋白質利用 GEMDOCK 軟體產生靜電力(E)、氫鍵(H)及凡得瓦力(V)的交互作用列表。每個交互作用列表皆會產生矩陣來進行計算的動作，最大的矩陣大小是 $N \times K$ (N : 上傳化合物的數目; K : 與上傳化合物有交互作用的蛋白質胺基酸的數目)。對於每個交互作用列表矩陣 $P(I)$ 並帶有各自的型態 I (E, H, or V)，表達方式如下

$$P(I) = \begin{bmatrix} p_{1,1} & p_{1,2} & \cdots & p_{1K} \\ p_{2,1} & p_{2,2} & \cdots & p_{2K} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ p_{N,1} & p_{N,2} & \cdots & p_{NK} \end{bmatrix}$$

其中， p_{ij} 代表由化合物(i)和交互作用胺基酸(j)所產生的一個二進位的數值。對於靜電力(E)和氫鍵(H)的交互作用列表中，如果從化合物(i)和蛋白質胺基酸(j)的原子配對所產生的交互作用可以產生氫鍵的化， p_{ij} 會被視為 1 (綠色)，相反的，沒有辦法產生氫鍵則 p_{ij} 會被視為 0 (黑色)。對於凡得瓦力(V)的交互作用列表中，如果從化合物(i)和蛋白質胺基酸(j)的原子配對所產生的交互作用所產生的能量小於 -4 (仟卡/摩爾)， p_{ij} 會被視為 1 (綠色)，相反的，能量大於 -4 (仟卡/摩爾)時，則 p_{ij} 會被視為 0 (黑色)。

區域官能基地圖可以藉由分子交互作用列表來判斷在擁用類似物理化學性質的化合物官能基和蛋白質胺基酸的關係中，找到比較具有一致現象的交互作用力。我們利用 Z-score 的數值的方式來評估在官能基及蛋白質胺基酸對於每個交互作用胺基酸 (交互作用列表 $P(i)$ 中的一列) 一致性與否。將分子交互作用列表用隨機洗牌的 1000 次的方式來計算出標準差 (σ) 和平均值 (μ)。經過上面的方式後，可以將蛋白質胺基酸 j 算出交互作用頻率 f_j ，其表示為下

$$f_j = \sum_{i=1}^N \frac{p_{ij}}{N}$$

並且可計算出蛋白質胺基酸 j 的 Z-score 的分數，可以表示為下

$$Z_j = \frac{f_j - \mu}{\sigma}$$

在鄰近空間上，有交互作用的胺基酸和官能基的位置且胺基酸的 Z-score 的分數在統計意義上具有顯著的意義 ($Z\text{-score} \geq 1.645$)，這些位置被視為錨點候選點。同類型的錨點候選點彼此之間在空間上有部分重疊的情況下將會被合併，用彼此的交互作用官能基幾何中心經過加權的處理，來當作新的錨點。假設兩個錨點中心距離小於 3.5 Å，則合併兩個錨點。在每個錨點中，Z-score 分數在前三名的胺基酸則被視為形成結合區域的重要胺基酸，並且我們分析分子嵌合化合物利用 checkmol 軟體所分析出來具有代表性的官能基和組成。最後，組合這些錨點後就構成了區域官能基地圖。

區域官能基地圖可以應用在以結構為基礎的虛擬藥物篩選的理論上去確定有效的化合物。而目前因為在化學上完全理解化合物在與配體結合中所參與的化學機制的，因而導致在虛擬藥物篩選所使用的計算分數方程式產生了問題。當一個化合物能夠高度符合區域官能基地圖的錨點，則表示這個化合物可能可以活化或是抑制目標蛋白質。區域官能基地圖所提供的分數是由 GEMDOCK 所預測的結合能量和在符合區域官能基地圖的錨點等兩種分數所組成。區域官能基地圖對一個化合物(i)所描述的分數可以由下面公式所表示

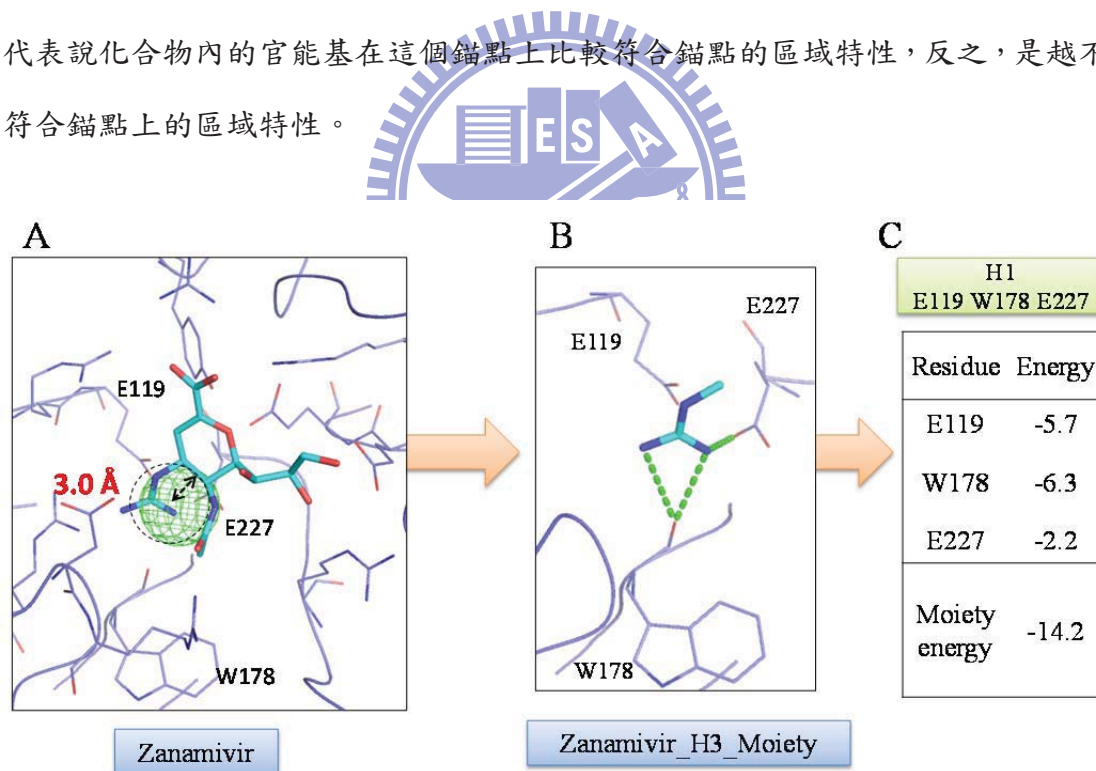
$$S(i) = \sum_{a=1}^n AS_a(i) + (-0.001) \frac{E(i)}{M^{0.5}}$$

在這裡 $AS_a(i)$ 是化合物(i)在錨點(a)所表示的分數、n 表示全部錨點的個數、 $E(i)$ 表示化合物在 GEMDOCK 所預測的結合能量和 M 是化合物所有的原子總數。錨點分數假如化合物(i)在錨點(a)有符合的官能基則視為 1。我們認為利用錨點分數和化合物原子總數 M 的平均根($M^{0.5}$)可以有減少因為記分方式的缺失，所造成

主要選擇高分子量化合物的缺陷³⁷。最後基於區域官能基分數，我們可以得到所上傳化合物所產生的新的排名。

五、 錨點能量

在要去計算錨點能量的第一個步驟是要去建立出來化合物在錨點中的官能基的大小。如圖六所示，以錨點為中心往外距離 3.0Å 所包含的化合物的非氫原子作為化合物在錨點內的官能基。第二個步驟是由錨點所包含重要的胺基酸來去對錨點內的官能基的計算能量，利用 GEMDOCK 軟體的記分方程式來對官能基內每個原子和錨點所包含的重要胺基酸進行給分的動作，最後並將官能基內原子的能量作加總，用來作為描述化合物在這個錨點內的偏好程度。錨點的能量越低，代表說化合物內的官能基在這個錨點上比較符合錨點的區域特性，反之，是越不符合錨點上的區域特性。



圖六：簡介如何計算錨點能量。

(A)舉瑞樂沙與氫鍵錨點(H3)為例子，以氫鍵錨點(H3)為中心，往外延伸 3.0Å 所包含的化合物官能基團(B)瑞樂沙在氫鍵錨點(H3)的官能基團，並且與氫鍵錨點(H3)所包含的重要胺基酸所產生的氫鍵。(C)錨點能量是由各個重要胺基酸所產

生的能量的加總。

六、 區域官能基地圖網站(SiMMap server)的輸入和輸出

我們設計一個簡單使用的區域官能基地圖(SiMMap)網頁，如圖七所示，使用者可以輸入用 PDB 格式所記錄的一個目標蛋白質結晶結構及用 MDL mol 、 SYBYL mol2 或是 PDB 格式的一組已經做過分子嵌合化合物或是共同結晶的化合物。使用者在上傳化合物時，必須將化合物利用其他化合物對接軟體 (例如：DOCK、FlexX、GOLD 和 GEMDOCK)產生已對接化合物的檔案。通常上來說，區域官能基地圖(SiMMap)網頁在計算上傳化合物數目小於一千的資料時，區域官能基地圖所耗費的時間大約是五分鐘。這個網頁服務器提供了區域官能基地圖及錨點成份的視覺化圖形介面，其中包含結合區域內有交互作用的胺基酸、官能基的組成和結構、參與反應化合物的數目及錨點作用的型態。服務器對於每個錨點可以顯示了已對接化合物的立體結構及詳細描述化合物原子或是官能基與結合區域胺基酸所產生的作用力。此外，區域官能基地圖網站可依照符合錨點化合物官能基的數目來進行新的排名。此網站使用兩個開放性軟體來進行圖型介面：Jmol (<http://www.jmol.org/>) 是用來展示蛋白質立體結構以及化合物結構和錨點的相對位置及 OASA(http://bkchem.zirael.org/oasa_en.html) 來產生化合物平面結構圖。另外，使用者可以從網站上下載錨點用 PDB 格式所記錄的立體座標位置、胺基酸和化合物交互作用列表，及利用錨點分數對上傳化合物進行新的排名分數。

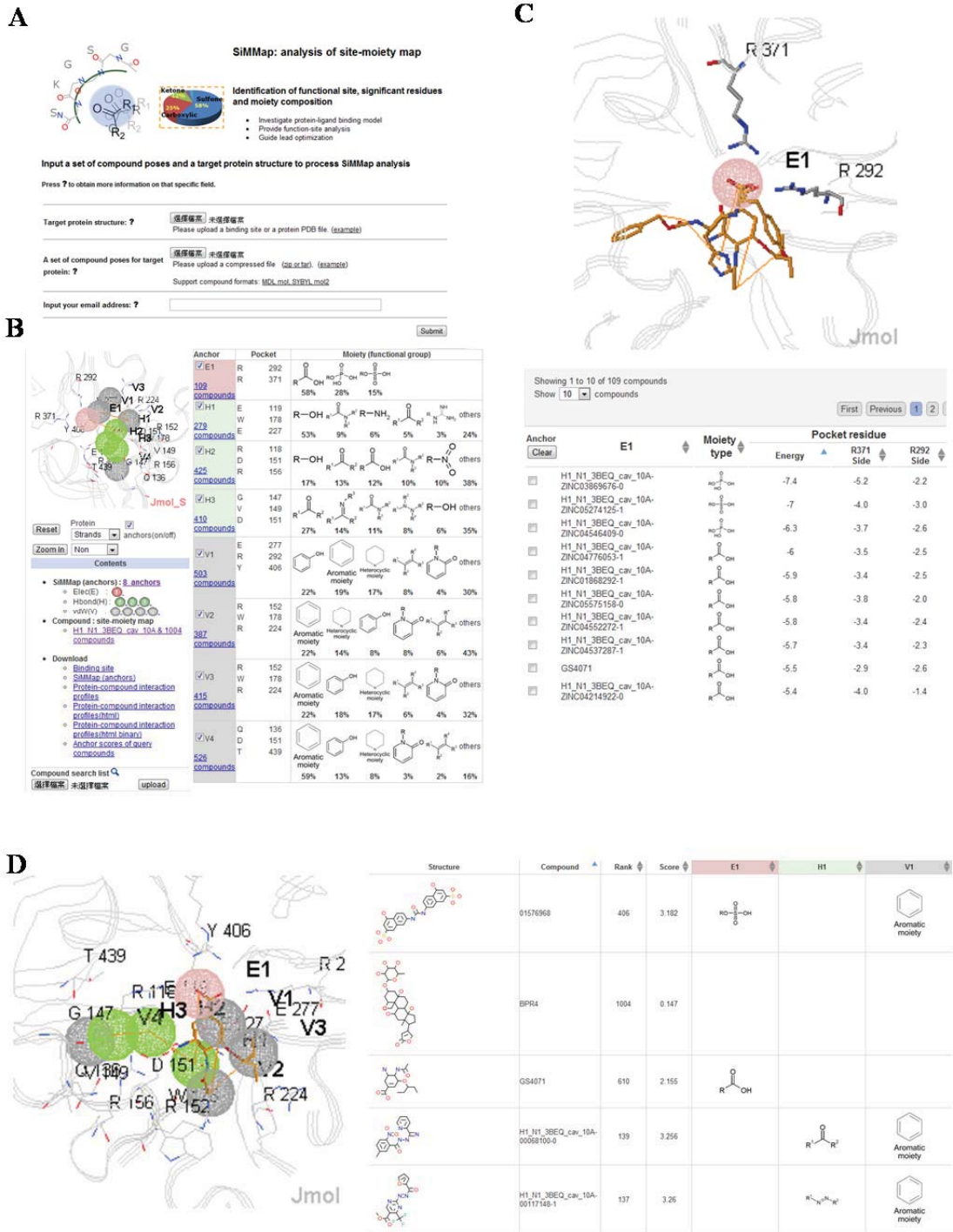


圖 七：用流感病毒神經胺酸水解酶和一千個已對接化合物所產生的結果。(A)區域官能基地圖的輸入畫面，需要一組對目標以虛擬對接化合物或是目標蛋白質共結晶結構的化合物。(B)區域官能基地圖的輸出主畫面，左邊是用 Jmol 所呈現的三度空間立體結構圖，以及各個錨點和上傳化合物的頁面超連結，而右邊是程主要是對所有的錨點內所包含的重要胺基酸以及官能基的組成。(C)是對特定錨點的表現頁，標示出各個化合物與所在錨點的相關位置。(D) 是將所有上傳

化合物對所有錨點做總結，並把化合物在各個錨點符合的官能基表示出來以及在上傳化合物的排名和算出來的區域官能基錨點分數。



參、 結果與討論

一、 流感病毒神經胺酸水解酶區域官能基地圖

區域官能基地圖網站對於 H1N1 流感病毒的神經胺酸水解酶的結晶結構 (PDB 編碼：3beq³³) 所建立出來的區域官能基地圖產生八個錨點，如圖八所示，其交互作用類型可以歸類為一個靜電力，三個氫鍵和四個凡得瓦力，並且可以看出彼此的官能基偏好程度。首先，我們可以將這些錨點利用位在蛋白質結合位置上的區域上面的不同可初步分開成位於唾液酸位置和 150 位置。其中，唾液酸的位置包含了五個錨點，一個靜電力，一個氫鍵和三個凡得瓦力。其中靜電力 (E1) 的錨點是由 109 個化合物所組成，內容包含兩個胺基酸(精胺酸 222 和精胺酸 371) 和三個官能基(碳酸根(58%)、硫酸根(28%)和磷酸根(14%))。另外，氫鍵(H1)由 279 化合物所構成，是由三個胺基酸(穀胺酸 119、色胺酸 178 和穀胺酸 227)和官能基主要由羥基(53%)、羰基(9%)、醯胺(6%)和胺基(5%)所構成。

在 150-loop 的區域錨點總共有三個，依照交互作用例類型可以分成兩個氫鍵和一個凡得瓦力，其中，氫鍵(H2)包含三個重要的胺基酸(精胺酸 118、天門冬胺酸 151 和精胺酸 156)，並且偏好的官能基主要是由羥基(17%)、羰基(13%)、羧基(12%)、醯胺(10%)和硝基(10%)所構成。另外一個氫鍵(H3) 包含三個重要的胺基酸(甘胺酸 147、纈胺酸 149 和天門冬胺酸 151)，並且偏好的官能基主要由羰基(27%)、二級酮亞胺(14%)和醯胺(11%)所構成。凡得瓦力(V4) 包含三個重要的胺基酸(穀氨醯胺 136、天門冬胺酸 151 和蘇胺酸 439)

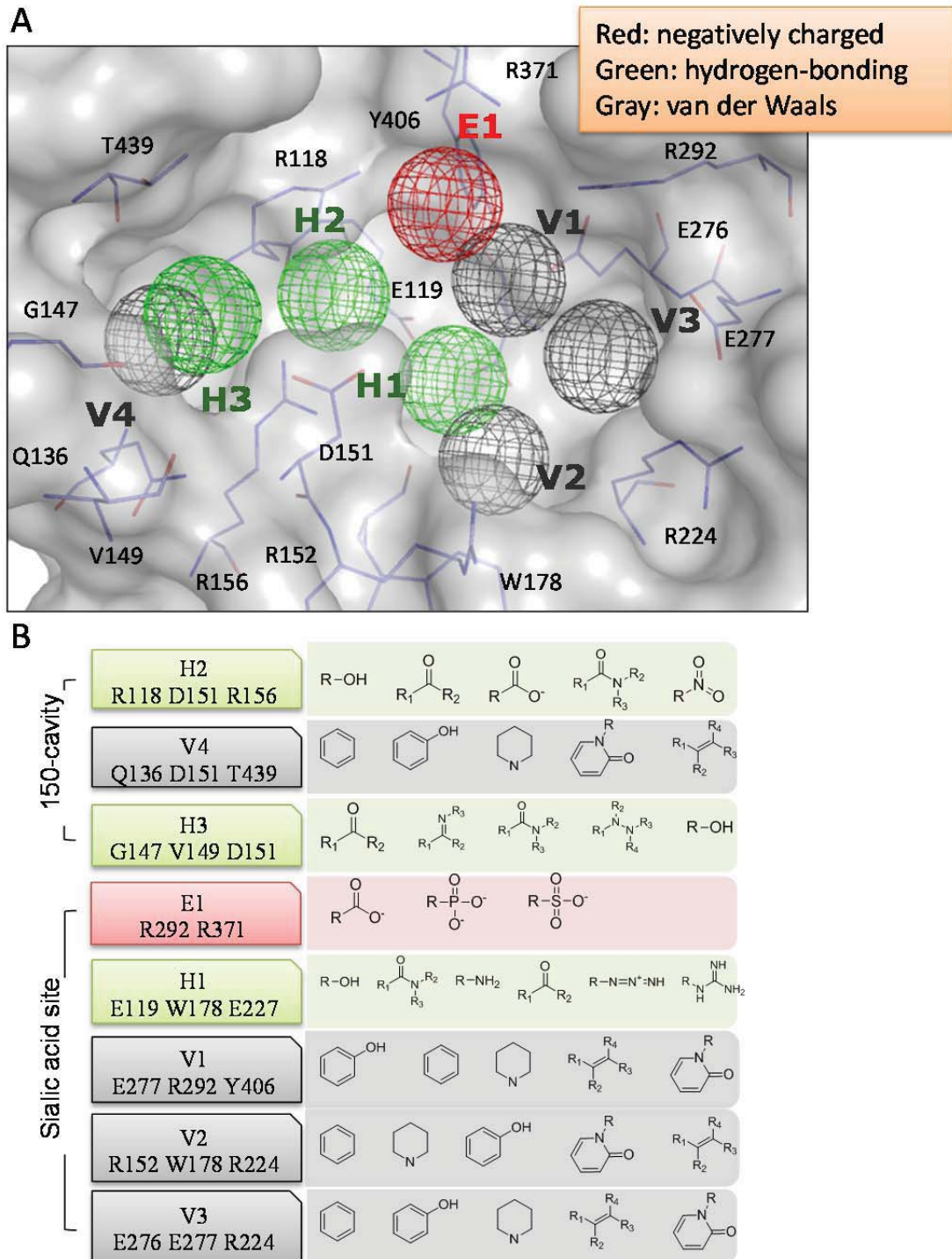


圖 八：流感病毒的神經胺酸水解酶的區域官能基地圖及毛典內部的組成。
 (A) 神經胺酸水解酶的三度空間立體結構圖。錨點的顏色代表不同的交互作用力類型，其中紅色代表靜電力，綠色代表氫鍵，灰色代表凡德瓦力。(B) 錨點內部的組成，包含重要的胺基酸和官能基團。

二、 流感病毒神經胺酸水解酶的區域官能基地圖的合理性分析

為了去驗證我們在流感病毒神經胺酸水解酶所建立的區域官能基地圖，我們利用文獻中所找出結晶結構、藥物的活性及病毒的活性等資料來證明我們的流感病毒神經胺酸水解酶的區域官能基地圖是合理的。而在既有的資料中，我們只能尋找到位於唾液酸位置有相關的研究，因此驗證合理性的分析主要是專注在唾液酸結合區域位置上，如圖九所示。

在唯一的靜電力錨點(E1)是由一個由兩個精胺酸 292 和精胺酸 371 所構成帶有正電性質的區域位置，通常在位置會與化合物上帶負電或是極性官能基形成靜電力或是氫鍵的交互作用力，而且這兩個胺基酸在所有神經胺酸水解酶上是具有高度保留性的胺基酸²⁵。而在氫鍵 3(H3)的位置是由帶極性的天門冬胺酸 151、穀胺酸 119 及穀胺酸 227 所帶負電為主的胺基酸所構成極性的區域而且剛好都是偏好帶有極性的官能基，例如：羥基、羰基，醯胺及胺基，更進一步來看，唾液酸、克流感和瑞樂沙都在這個區域有一制性的氫鍵的產生。且在之前的研究中有指出，如果穀胺酸 119 突變成為甘胺酸，會造成瑞樂沙降低約 1400 倍的活性⁴⁴。而在凡得瓦力錨點(V1)的時候，是由穀胺酸 277、精胺酸 292 及酪胺酸 406 所組成的，其中，酪胺酸 406 被認為有可能是去切斷受質的催化胺基酸⁴⁵，且在 Ghate 和 Air 的共同研究中指出如果酪胺酸 406 突變會對神經胺酸水解酶的活性有巨大的影響⁴⁶。另外，在凡得瓦力錨點(V2)上是由精胺酸 224、精胺酸 152 和色胺酸 178 所構成的所組成偏好疏水官能基的環境，例如：芳環，雜環組，烯烴，苯酚和環氧丙烷類等之類的官能基。此外由觀察結晶結構(PDB 編碼：3b7e³³、2hu4⁴⁷ 和 1mwe⁴⁸)中可以提供在唾液酸、克流感和瑞樂沙位於這個區域都剛好有甲基類的官能基去和色胺酸 178 有交互作用力。更進一步，在凡德瓦力(V3)錨點位置上可以發現，疏水基團的化合物往往與長側鏈的精胺酸 224、穀胺酸 276 和穀胺酸 276 所形成凡德瓦力。在克流感這個藥物中，這些凡德瓦力的環境對於藥

物的結合過程中亦扮演著重要的角色。

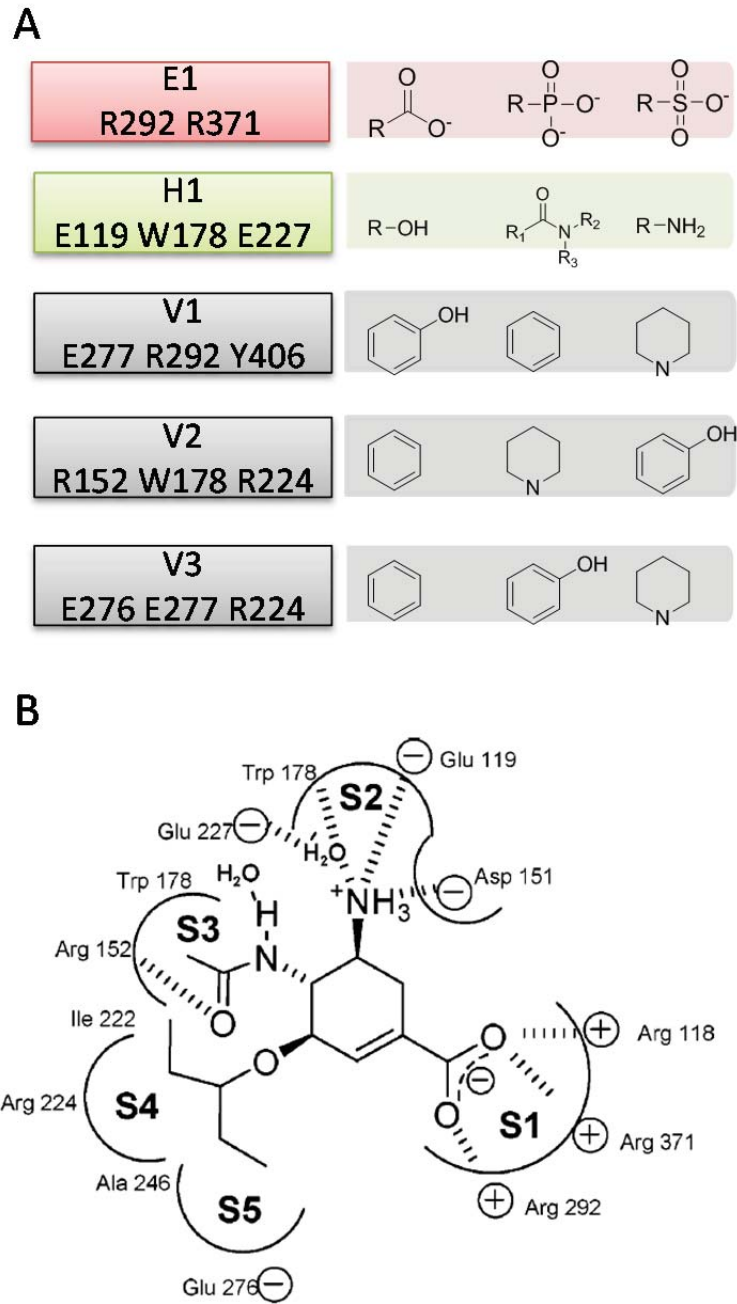


圖 九：錨點內所構成的胺基酸和官能基團與文獻指出重要的胺基酸的比較。

(A) 在唾液酸區域位置的錨點和其標示出重要的胺基酸和官能基團。(B)由文獻

²⁷中指出對克流感具有重要交互作用力的胺基酸。

收集了由克流感和其經過化學合成衍生物的結構活性相關的資料用來作為驗證我們錨點的第二的構面。由圖十的來說，這些化合物所構成官能基團的組成可以由錨點內官能基的偏好程度，將對藥物最佳化的過程中提供一些線索。舉例來說，化合物 3a 是由克流感所經過化學合成的衍生物，是在靜電力(E1)錨點的區域內作磷酸根的替換，可以使得半數最大抑制濃度顯著的由 1 nM 提升至 0.3 nM(圖十 A)，另外可以由克流感的碳環衍生物 53(carbocyclic analogue 53) 的活性值得知，在凡德瓦力(V3)錨點內有符合的碳環，則可以顯著的提升半數最大抑制濃度 (圖十 B)。

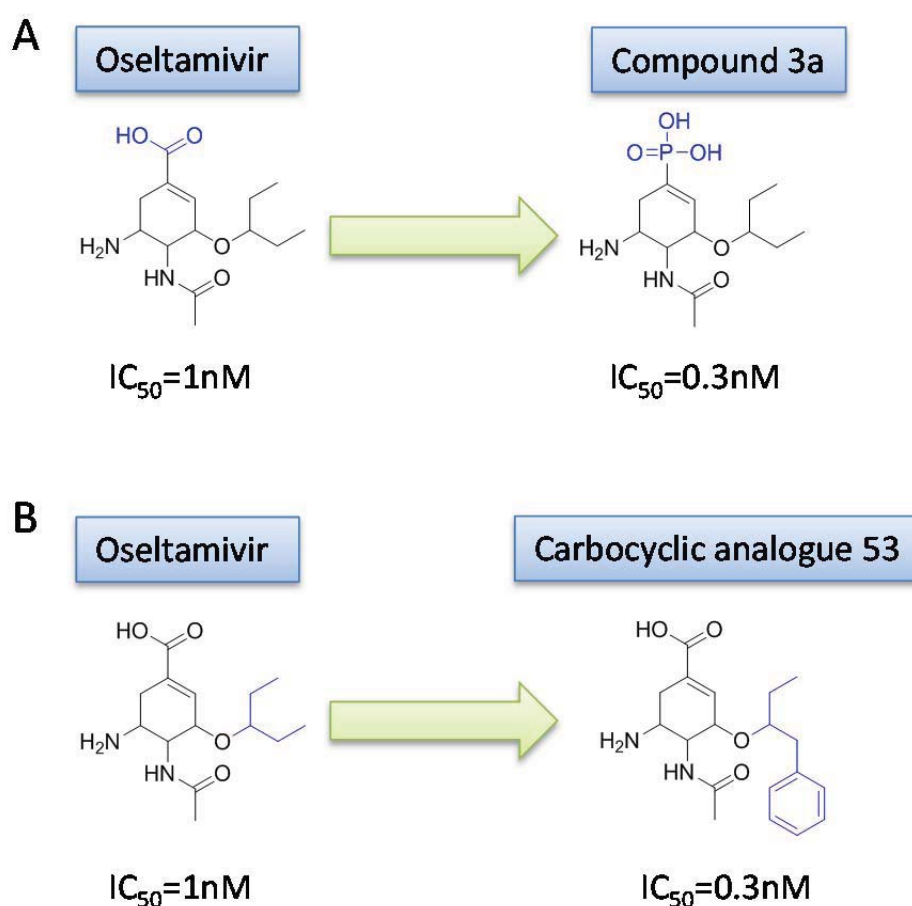


圖 十：藍色部分表示在錨點內的官能基團。

(A) 克流感(Oseltamivir)若在靜電力錨點(E1)內將羧酸根更改為磷酸根可以由 $IC_{50}=1\text{ nM}$ 降低到 $IC_{50}=0.3\text{ nM}$ (B) 克流感(Oseltamivir)若在凡德瓦力(V3)錨點內加上一個一個方香環，可以將活性由 $IC_{50}=1\text{ nM}$ 降低到 $IC_{50}=0.3\text{ nM}$

最後我們去收集對流感病毒神經胺酸水解酶有活性的化合物，其中包含了克流感，瑞樂沙，帕拉米維及其相關的衍生化合物，發現雖然不同的官能基但有相似的物理化學性值可以一致性對錨點內的區域位置有交互作用。如圖十一所示，舉例來說，這些化合物通常都有胺基、胍基和羧酸基團內都可以與在氫鍵錨點(H3)內的位置產生氫鍵作用。同樣的這現象可以從凡德瓦力(V3)錨點內可以找到，錨點內都偏好具有疏水性的官能基團，例如：脂肪鏈、環己烷和芳香基團。如果將這部份的官能基團取代成非疏水性的官能基團時，可能會降低化合物的活性，如：碳環衍生物 31(carbocyclic analogue 31)的活性值只有 6300 nM。



Compound ID	Subtype	IC50 (nM)	Compound Structure	Moiety composition				
				H1	E1	V1	V2	V3
GS4071	H1N1	1						
	H5N1			R-NH ₂	R-C(=O)O ⁻			
	N2							
Compound 3a	H1N1	0.3						
	H5N1	13.3		R-NH ₂	R-C(=O)O ⁻			
	N2							
Carbocyclic Analogue 53	H1N1	0.3						
	H5N1			R-NH ₂	R-C(=O)O ⁻			
	N2							
Carbocyclic Analogue 50	H1N1	1						
	H5N1			R-NH ₂	R-C(=O)O ⁻			
	N2							
C3-Aza Carbocyclic Analogue 3h	H1N1	12						
	H5N1			R-NH ₂	R-C(=O)O ⁻			
	N2							
Carbocyclic Analogue 12	H1N1	100						
	H5N1			R-NH ₂	R-C(=O)O ⁻			
	N2							
Carbocyclic Analogue 58	H1N1	100						
	H5N1				R-C(=O)O ⁻			
	N2							
Carbocyclic Analogue 31	H1N1	6300						
	H5N1			R-NH ₂	R-C(=O)O ⁻			
	N2							
BANA 113	H1N1							
	H5N1				R-C(=O)O ⁻			
	N2	10000						
Benzoic Acid Inhibitor 8	H1N1							
	H5N1				R-C(=O)O ⁻			
	N2	15000						
BANA 108	H1N1							
	H5N1			R-NH ₂	R-C(=O)O ⁻			
	N2	>1.0E7						
Zanami vir	H1N1							
	H5N1				R-C(=O)O ⁻			
	N2							

圖 十一：流感病毒神經胺酸的已知抑制劑的官能基團和各個錨點兩者之間的關係。

已知的抑制劑有包含克流感，瑞樂沙和兩者的化合物類似物的結構活性相關資料。如果官能基團有符合錨點的類型時，相關的格子會著色成黃色，並標示出官能基的簡圖。

更進一步的去分析在唾液酸內的錨點是否對於改進虛擬藥物篩選之中計分程式不準的問題，因此採用了 Available Chemical Directory (ACD)利用亂數所選取的 990 個化合物當作對流感病毒神經胺酸沒有活性，以及十個對流感病毒神經胺酸酶有活性的化合物來作為測試的資料庫，由圖十二所式，

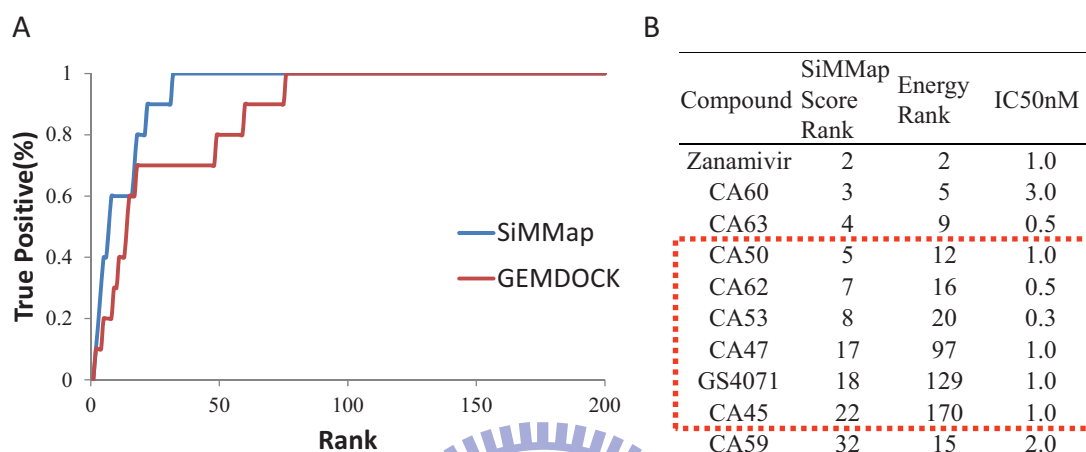


圖 十二：官能基地圖和 GEMDOCK 的正確率比較

(A)共同比較區域官能基地圖和 GEMDOCK 的正確率 (B) 所隨機挑選出來的十名有效化合物在兩者記分方式下排名的關係。

可以發現利用區域官能基地圖所對已對接化合物進行重新算分的動作，可以有效的將正確率提。除了碳環衍生物 59 (carbocyclic analogue 59)以外，皆可以有效的將有用的化合物的排名往前推進。因此使用區域官能基地圖的方式可有效的提升虛擬藥物篩選的正確率。

三、 流感病毒神經胺酸水解酶藥物最佳化過程分析

由於在流感病毒神經胺酸水解酶藥物發展歷史中，如圖十三所示，各個藥物的發展過程經過約二十年的期間，假設我們用電腦模擬的方式去設計感病毒神經胺酸水解酶的藥物，是否可以得到類似的結果，這樣可以有效率並縮短設計藥物的時間。

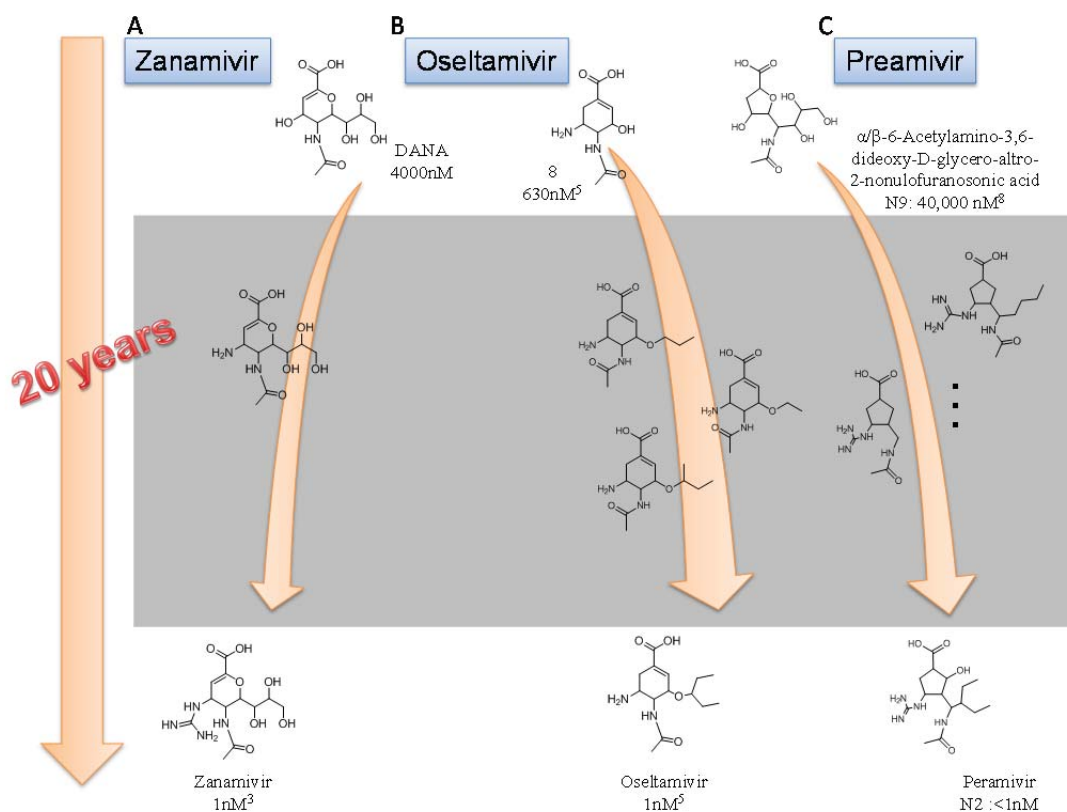


圖 十三：整理出流感病毒神經胺酸水解酶藥物的歷史過程。

(A) 瑞樂沙從 DANA 的發展過程。(B) 克流感從化合物 8(Compound 8)的發展過程。(C) 帕拉米維的發展過程。

我們用模擬瑞樂沙的發展過程中，是由 DANA 這個起始化合物開始發展，其過程。其中，發現在修改的官能基都是在我們的氫鍵錨點(H3)內部，因此我們去使用錨點能量的觀點看是否可以找出原始化合物在官能基上是否可以有修正的地方，以及用模擬官能基的改變和藥物活性質的關係。如圖十四所示，我們可以發現 DANA 化合物的錨點能量在氫鍵錨點(H1)的能量是只有一個氫鍵是屬於偏弱的官能基，因此我們可以依照錨點內的官能基組成去做替換，發現若將官能基團由羥基改變圍胺基團或是胍基團，其錨點能量分別為胺基團的能量是 -3.5，而胍基團的能量是 -14.2，有逐漸提升的趨勢，並與半數最大抑制濃度去做相比，發現有呈現正相關的趨勢。

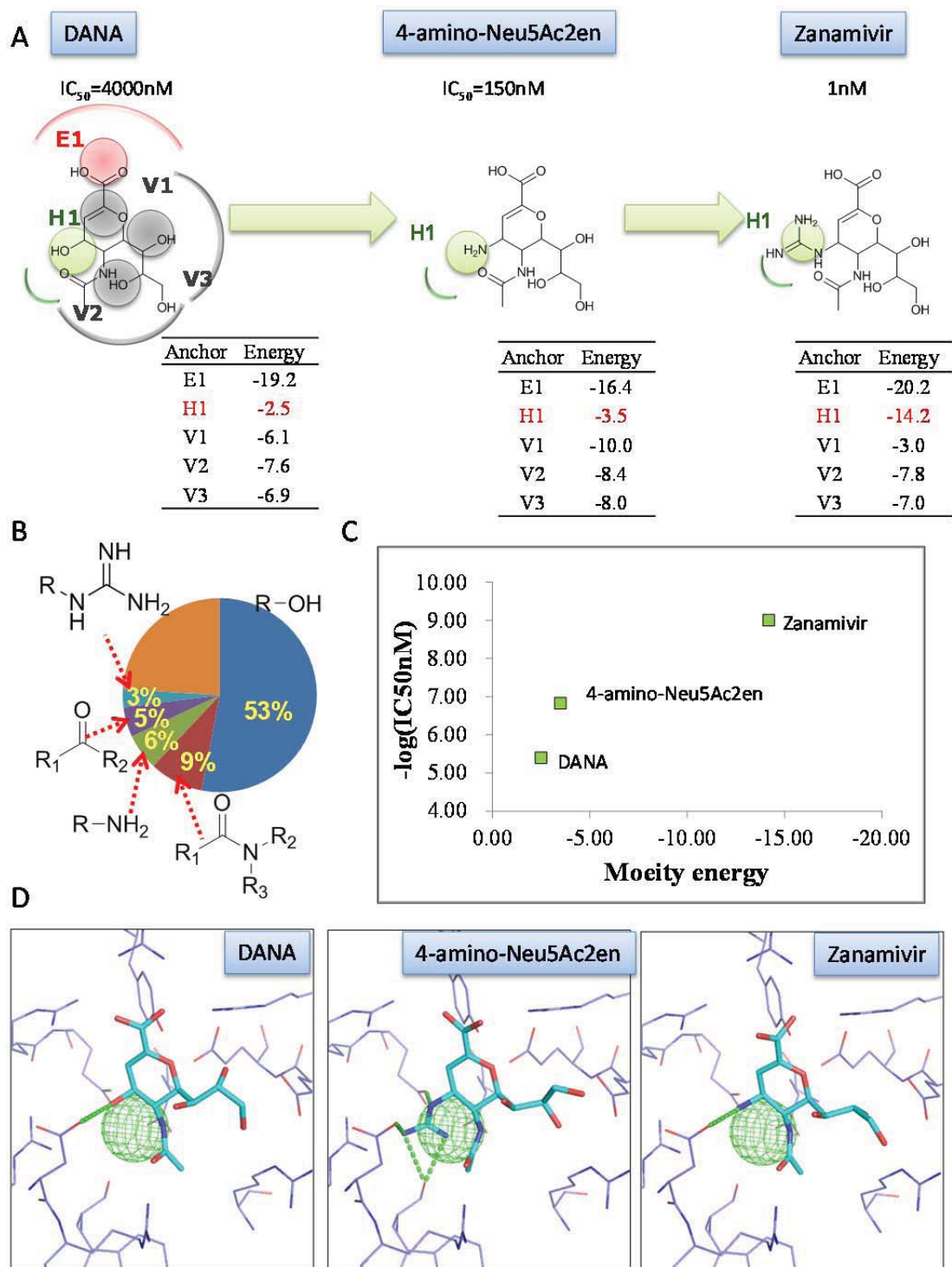
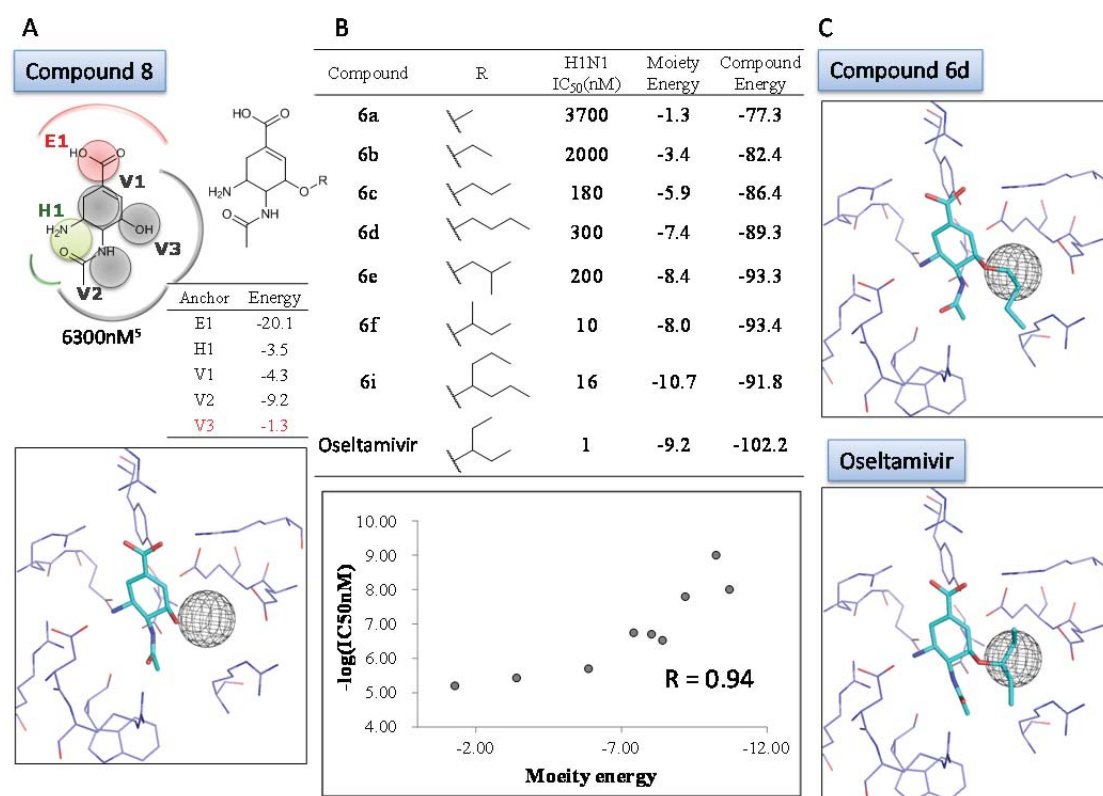


圖 十四：利用官能基地圖的氫鍵錨點(H1)去模擬瑞樂沙的發展過程。
 (A)瑞樂沙藥物的發展過程。(B)氫鍵錨點(H1)內部官能基的組成及偏好程度。(C)
 錨點能量與半數最大抑制濃度的關係。(D)化合物 DANA、4-amino-Neu5Ac2en
 及瑞樂沙與氫鍵錨點(H1)的三度立體空間結構圖。

此外，我們用模擬克流感的發展過程中，是化合物 8 (compound 8)開始發展的，其中我們去分析化合物 8 (compound 8)的錨點能量時，發現在凡德瓦力錨點 (V3)內的錨點能量只有-1.3，很明顯是可以經過增加具有疏水性的官能基來修飾化合物 8 (compound 8)，使其官能基更能符合凡德瓦力錨點(V3)。而由一系列的疏水性官能基在凡德瓦力錨點(V3)上的改變所造成的錨點能量以及相對應半數最大抑制濃度，發現彼此之間的皮爾遜相關係數(Pearson correlation)是 0.94，而傳統上虛擬藥物篩選的能量與相對應半數最大抑制濃之間的皮爾遜相關係數約為 0.6，因此可以證明我們所採用的錨點能量是能夠去量度化合物的凡德瓦力官能基符合區域官能基地圖錨點內的程度，如圖十五所示。



圖十五：由收集化合物 8 (compound 8)和類似物的錨點能量與活性質的關係。(A)分析化合物 8(compound 8)在唾液酸上的全部的錨點能量，並呈現出三度空間圖。(B)將化合物 8(compound 8)的類似物的在凡德瓦力錨點(V3)上的錨點能量與半數最大抑制濃度之間的關係。(C)挑選化合物 6d(compound 6d)和 克流感與凡德瓦力錨點(V3)的三度空間圖。

更進一步，我們去收集在文獻中的三種藥物的衍生物，並去判斷修改官能基的位置，且用錨點能量的觀點去觀察，如圖十六所示。在現有唾液酸的位置，有三個錨點有修改官能基的資料，包括靜電力錨點(E1)、氫鍵錨點(H1)及凡德瓦力錨點(V3)。並去整理統計錨點能量和半數最大抑制濃度的關係，兩者之間的皮爾森相關係數為 0.78，証明了我們的錨點能量不管是在靜電力、凡德瓦力或是氫鍵下都可以提供一種衡量指標去評斷官能基是否符合在區域官能基內的錨點內。



A

Compound	Class	Anchor	IC50(nM)	Moiety Energy
GS4071	GS4071_E1	E1	1	-19.32
3a	GS4071_E1	E1	0.3	-22.84
DANA	Zanamivir_H1	H1	4000	-2.50
4-amino-Neu5Ac2en	Zanamivir_H1	H1	150	-3.50
Zanamivir	Zanamivir_H1	H1	1	-14.19
GS4071	GS4071_H1	H1	1	-3.50
CA63	GS4071_H1	H1	0.5	-12.38
8	GS4071_V1	V3	6300	-1.28
6a	GS4071_V1	V3	3700	-3.39
6b	GS4071_V1	V3	2000	-5.87
6d	GS4071_V1	V3	300	-8.41
6e	GS4071_V1	V3	200	-8.03
6c	GS4071_V1	V3	180	-7.42
6i	GS4071_V1	V3	16	-9.19
6f	GS4071_V1	V3	10	-10.71
GS4071	GS4071_V1	V3	1	-10.25
6	Peramivir_V1	V3	27400.0	0
7	Peramivir_V1	V3	25.0	-8.71
50	Peramivir_V1	V3	1.0	-9.12
Peramivir	Peramivir_V1	V3	1.0	-9.75

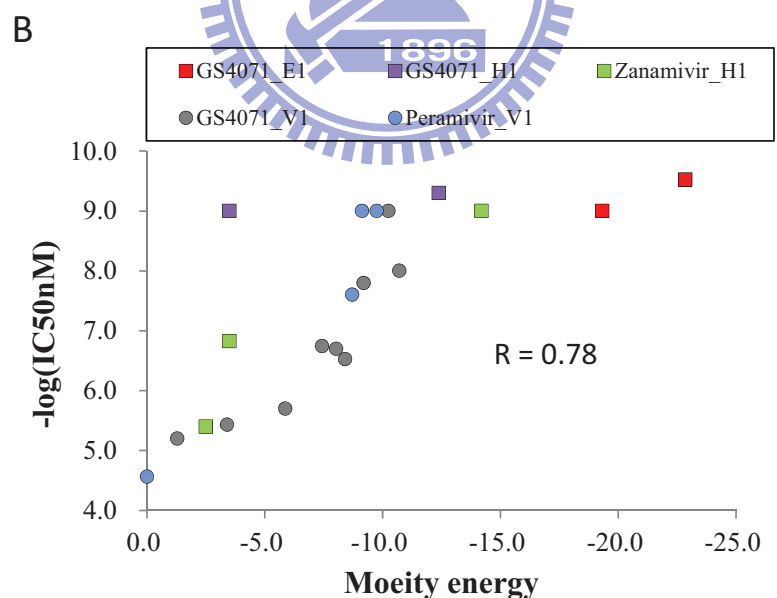


圖 十六：將三種藥物的發展過程在區域官能基地圖上的錨點能量的變化。
 (A)三種藥物的類似物在錨點內的錨點能量與半數最大抑制濃度 (B) 錨點能量與半數最大抑制濃度的相關性，其皮爾森相關係數(Pearson correlation)為 0.78。

此外，若是從克流感為起始化合物，繼續去做藥物最佳化的過程，可以參考我們的區域官能基地圖上所提供的官能基來做修飾，如圖十七所示。可以發現，在靜電力錨點(E1)、氫鍵錨點(H1)及凡德瓦力錨點(V1)可以增進克流感的活性。

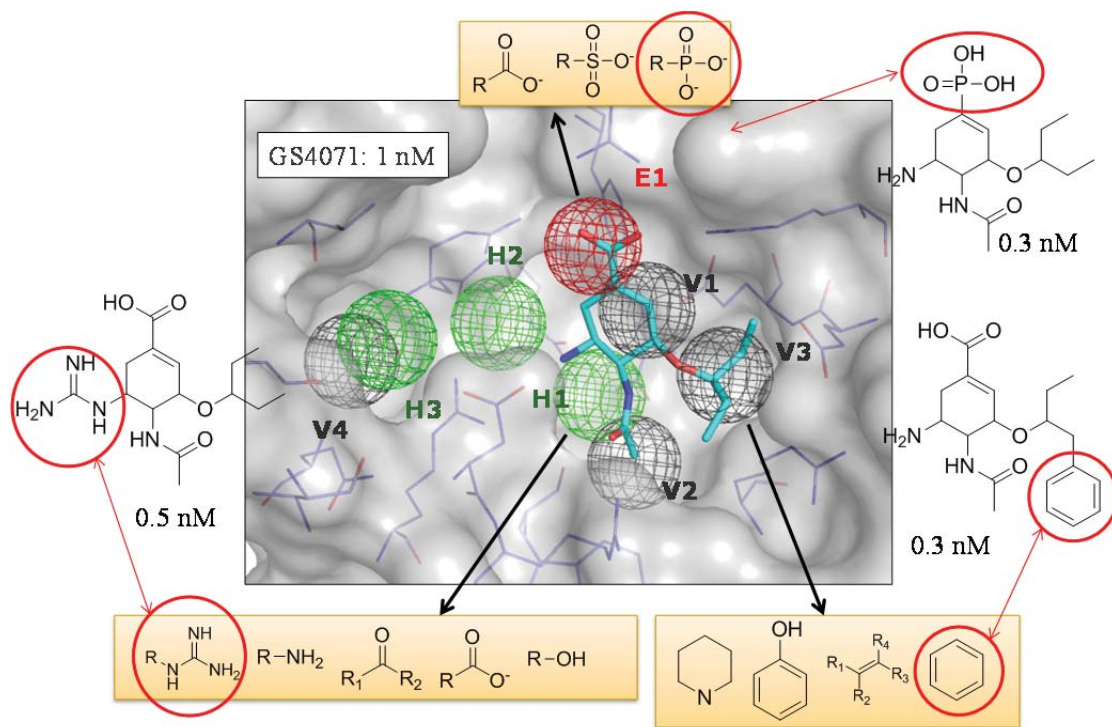


圖 十七：在克流感上依照區域官能基地圖的官能基的組成所修飾後的化合物以其活性質。

肆、 結語

一、 總結

為了去加速藥物發展的過程，我們提出了錨點能量的觀念，藉由描繪官能基與蛋白質內重要胺基酸之間交互作用引力的 大小 ，並結合實驗室之前為了解決虛擬藥物篩選的問題所提出的區域官能基地圖的方法，將蛋白質結合區域位置簡化成錨點，並以此來對化合物內的官能基進行計算能量的動作。同時，我們採用流感病毒神經胺酸的目標蛋白，及對三個流感病毒神經胺酸已知藥物和其衍生物，藉由透過計算其錨點能量的動作，來去模擬藥物開發的過程，再者利用錨點能量與半數最大抑制濃度之間的關係來判斷是否對於挑選官能基有幫助。

二、 主要貢獻

新藥的開發的成功關鍵在於『速度』，而在其重點可以分成提升找到前導藥物的命中率，及先導藥物最佳化過程中降低合成化合物的時間，或是減少需要合成化合物的數目。而實驗室所開發的區域官能基地圖在之前的研究中，不僅能夠提升找到前導藥物的命中率，更能夠找到新型態的藥物。由於在前導藥物最佳化的過程中，所需要的時間是用『年』作為單位，以及其所需要嘗試的化學組合數約為 10^{60} 方⁴⁹，透過區域官能基地圖內，可以由錨點的官能基組成將其組合數降低為 5^8 方，更進一步透過錨點能量的量度方式去衡量官能基對於目標蛋白質活性值得評估，可以提供適當的資訊給組合式化學家去降低所需要合成化合物的數目為一百次，因此可以將時間單位降為『月』，進而達到『加速』前導藥物最佳化的過程。

三、 未來研究

在現今的研究中，已經有一些科學家嘗試將化合物由唾液酸的位置延伸到 150-loop 區域，以求解決目前在流感病毒神經胺酸水解酶藥物使用上有抗藥性的問題，但目前的藥物通常都還是在 μM 。由於，我們在 150-loop 區域有相關的區域官能基錨點，若能夠將現有在唾液酸位置的化合物用成長策略的方式，將化合物連接到 150-loop 上，並能夠有效且加速的發現具有抑制流感病毒神經胺酸水解酶的藥物，將能夠對流感病毒神經胺酸水解酶藥物發展上提供新的方向。

更進一步，此方法作用在流感病毒神經胺酸水解酶有初步的結果，因此可以將區域官能基地圖應用在各種有結晶結構的蛋白質上，從中去尋找對各類型的疾病上是新型態的抑制劑且能夠去做引導續最佳化前導藥物的過程，或是對特定抑制劑去做最佳化動作。

