尋找SP1的小分子抑制劑以阻斷脊椎損傷病患使用methylprednisolone藥物造成的副作用：新穎輔助治療藥物篩選

吳重孚 [a,b]，李元綺 [a*]
[a] *臺北醫學大學醫學資訊研究所*
[b] *中國化學製藥股份有限公司*
[*]*通訊作者* E-mail: *李元綺*, ycgl@tmu.edu.tw

摘要 (Abstract)

交通意外事件頻傳、高空作業頻繁與其他的意外傷害的增加脊椎損傷 (spinal cord injury, SCI)患者數量，對於患者自己以及其家人造成嚴重影響，藉由病理確認、確認基因角色與電腦軟體提供新穎脊椎損傷患者治療輔助藥物篩選過程資訊，進而提出對 SCI 患者在 methylprednisolone (簡稱 MP)治療下，開發新的輔助藥物以提高 MP 治療效果或降低其副作用的新穎藥物開發的研究與結果。

關鍵字: 脊椎損傷, spinal cord injury, SCI, 對接, docking, 輔助藥物

序論 (Introduction)

疾病與治療 (Diseases and therapy)

脊椎損傷 (Spinal Cord Injury, 簡稱 SCI) 屬於一種嚴重的疾病與對人類健康造成相當程度的高度風險。現代因為交通意外事件頻傳、高空作業頻繁與其他的意外傷害數量的增加，導致 SCI 在臨床的個案持續增加中，預後並非良好，往往造成肢體的跛行或殘障結果 [1]。在國立急性脊椎損傷研究 (The National Acute Spinal Cord Injury Studies, 簡稱NASCIS) II與III級的患者，於 Cochrane 系統性資料庫回顧文獻中所有隨機臨床試驗與其他發表的報告，當於受傷的患者於 8 小時內給予高劑量的 methylprednisolone，確認對於患者有意義地增進運動與感覺功能 [2]。

治療用藥與治療輔助劑 (Medicine and adjunct agents)

最近的醫藥研究藥物或治療輔助劑中，包括糖皮質類固醇 (glucocorticoids) 其中MP是美國食品藥物管理局 (U.S. Food and Drug Administration, 簡稱FDA) 唯一許可治療SCI的用藥，但是長久以來SCI患者忍受MP治療後所產生的副作用，如脂肪組織位移、體重增加、高血壓、糖尿病、高血糖症、白血球增多、失眠、水腫、心律不整、骨質疏鬆、肌肉無力、關節疼痛、骨折等 [3]。所以醫學界思考其他相關輔助的成分或來自天然的物質，企圖增加或補強MP的治療效果，例如鴉片接受體拮抗劑 (opium receptor antagonists)、神經節苷脂 (ganglioside (GM-1)、興奮性氨基酸接受體拮抗劑 (excited amino acid receptor antagonists, 簡稱 EAA)、腺苷 (adenosine) 及其擬似物(stimulators)、一氧化氮合酶 (nitrous oxidases, 簡稱 NOS) 抑制劑、抗氧化劑 (antioxidants) 與自由基清除劑 (free radical Scavengers)、傳統中藥萃取物-川芎嗪 (Ligustrazine)、鈣離子阻斷劑 (calcium channel blockers)、促進神經元再生的藥物治療例如髓鞘相關抑制因子 (myelin-associated growth inhibitors, 簡稱MAGI)、抑制調亡藥物、免疫抑制劑、神經營養因子家族、其他藥物例如促紅細胞生成素 (Erythropoietin, 簡稱 EPO) 等等 [4, 5, 6, 7]。

新藥的研究 (New entity research)

MP在黃金治療時間的使用挽救SCI患者免於喪命，MP有其存在的價值。在不幸的在意外發生後，SCI患者為其家人帶來沉重負擔。許多研究者期待能為此想出一些好方法，使得在黃金治療時間的藥物治療能使得癒後能恢復的更好。研究者從基本的受傷機制去了解，利用受試的實驗鼠在受傷過程中，實驗鼠身體裡發生的生理變化或自我防禦機制，運用設計的各種實驗企圖描繪出它的病理機轉，身體如何應付外在傷害，身體如何啟動保護機制。多年以來，藉由實驗鼠

模擬受傷的過程投予的實驗藥物，MP與EPO經常出現在發表的期刊。近年以來，研究者運用新的技術與工具，透過生物基因晶片 (microarray chips) 工具比較受傷時，間隔時間的變化，投藥後的時間變化，依據以上的變數透過生物基因晶片找出不同的表現量，藉此拼湊出合理的作用機轉路徑 (pathway) [8, 9, 10, 11, 12]。

我們企圖由試驗中找出在MP治療情況下的相關影響基因，由於SP1調控體內許多基因的轉錄因子。當我們進行設計藥物時，必須考量到面對的對象所扮演的角色，逕行設計成為拮抗劑 (antagonist)、致效劑 (agonist) 或阻斷劑 (blocker) 等等 [13, 14, 15, 16]。在此我們企圖找出最能達到增強MP的治療效果或降低MP所造成的副作用影響的小分子結構為目標。

新藥開發前的準備工作 (Prior work for developing new entity)

藥品開發的新路徑 (Fig. 1)，全球知名藥廠紛紛設置相關部門研究如何縮短開發時間、降低投資成本與提高成功率[17, 18]。運用計量模組方式運算出可能的分子結構，而首要的是確認找出對的基因或接受體，運用適當軟體找出可能的化學結構 [19, 20]。

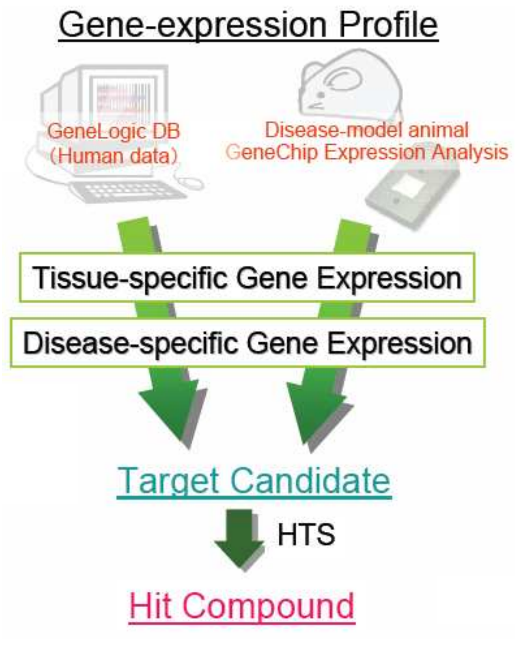

Figure. 1 治療藥務開發流程

材料與方法 (Materials and Methods)

對接目標鑑別 (Drug target identification)

在完成確認 SCI 的 pathway 前，先行準備工作選用與 SCI 有密切關係的基因 1sp1 作為對接目標鑑別基因。

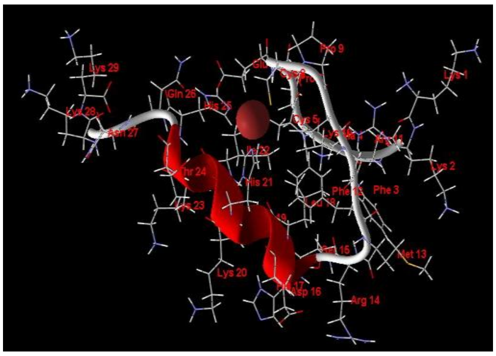

Figure. 2　1sp1 基因

於 NCBI 中找出有關 SP1 的資料 [21]，RCSB PDB (http://www.rcsb.org/) 找出 sp1 (Fig. 2). 以作為對接時的標的物。SP1 由 1sp1 與 1sp2 基因片段組合，SP1 於體內扮演的角色是廣泛性的調控體內許多基因的轉錄因子，許多研究指出與細胞增生和調控細胞生長週期具有相關性 [22]。

化學結構資料庫 (Chemical structure data bank)

由參考文獻中找出 MAYBRIDGE [23]用來執行軟體對接的資料庫，資料庫包括以下內容：

Maybridge Ro3 500 Fragment Library.sdf,

Maybridge Ro3 1000 Fragment Library.sdf

Maybridge_Bromo-Fragment_Collection.sdf

Maybridge_Fluoro-Fragment_Collection.sdf

Maybridge_Fragment_Collection.sdf

合計 38,714 個小分子提供與基因對接。

數據分析 (Data analysis)

市面上有很多軟體能進行對接的試驗，其中經常出現的軟體包括兩大類，學術研究用的版本與商業用途的版本。學術研究用的版本有 UCSF 的 DOCK 6.4、INRIA 的 Hex、The Scripps Research Institute 的 AutoDock 等等；商業用途的版本有 Molegro 的 Molegro Virtual Docker、Schrodinger 的 Glide、The Cambridge Crystallographic Data Centre 的 GOLD、BioSolveIT 的 Flex X、Cresset 的 Field Align 等等。

準備工作除了對接軟體的選定外，還包括篩選條件的設定。對於產出的結果，按照實驗精神必需要有

確效 (validation) 的過程，以確保實驗的品質。

結果 (Results)

以 1sp1 基因與 MAYBRIDGE 資料庫在對接軟體的執行下，順利地有結果產出。目前進行對接中，執行至 2,074 個小分子對接程序，先以最低能量與低於 500 的分子量為篩選門檻，得最低能量的小分子結構如下：

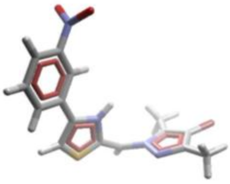

Figure 3. 結構 946

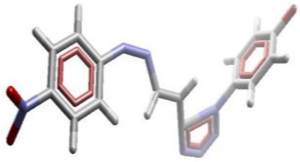

Figure 4. 結構 233

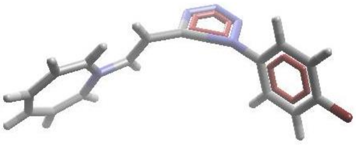

Figure 5. 結構 231

目前這三個小分子結構與 1sp1 對接是為最低能量排序中之前三名。

Table 1 相關數據

結構編號	946	233	231
分子量	393.26	400.19	342.19
平均能量	-126.44	-119.8	-118.98

討論與結論 (Discussion and Conclusion)

作業系統

如前所敘述的數據分析軟體，有的只支援 Linux 版本，有的軟體提供支援 Windows, Linux 甚至 Mac 的版本。無論哪種版本穩定性是特別重要，因為接合的過程需要一日至數日以上，若穩定性不佳，可能產出的數據不見，因此浪費寶貴時間而不能挽回。

軟體的選擇

一般在學術領域，Linux 因為主張軟體自由，強調永久免費，無需支付授權費用，可以自由下載、使用而毫無任何代價，所以大量使用。但在國內推廣程度不如微軟的 Windows 系統，多數人不熟悉 Linux 系統。因此，選用軟體時相對地產生無可避免的問題。因為熟悉 Windows 系統而採用 Windows 版本，做出這樣的決定必定付出慘痛代價。

選用建構在 Linux 系統的軟體是首要的推荐，穩定度比 Windows 上相同的軟體比較，Linux 的軟體超乎尋常地穩定，相對地 Windows 的軟體令人非常地失望。

其次，由於國人不熟悉 Linux 系統，使用前期往往要經過好長段時間的煎熬與痛苦學習，相信系統的穩定與花費點時間相比是值得的。

篩選條件的設定

參照發表的論文期刊，將逐一嘗試與比對找出，適合於進入篩選系統的最佳條件。一般而言，接合的距離要接近 1.5~2.0A 之間、接合的能量是最小的、RMS (root mean square) 值等參數等等 [24, 25, 26, 27, 28]。目前這三個小分子結構與 1sp1 對接，是最低能量排序中之前三名。若持續進行中的對接作業，沒有低於此三個能量者，這三個小分子結構即為 1sp1 可能的產生影響的結構。Figure 6 是結構 946 與 1sp1 對接圖示。

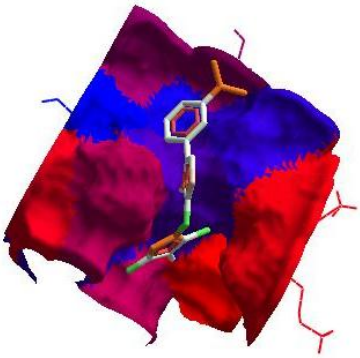

Figure 6 結構 946 與 1sp1 對接圖示

初步找出可能影響的結構

藉由接合軟體的分析結果，初步篩選出符合條件的小分子結構。在化學結構資料庫對接的分子結構總

數多達 4 萬多筆資料，對比出的結果也只能選取排序後的前 10~15 個分子結構。向國外廠商如 Aldrich、Sigma 購買或自行合成出化合物，經過儀器分析確認結構與純度(約 90%即可)。接著，進行 in vitro 確認活性強度，收集結果以利下一步驟的執行。

未來展望

經過 in vitro 確認比對出的化合物結構對 SCI 的影響，為對於 MP 的治療屬於協同作用或抑制作用的影響活性強度。再經過思考對結構上進行修飾，修飾後的結構，再次執行接合動作，由數據上比較前後的差異程度。將活性最佳的修飾化合物結構再次進行合成。再次在 in vitro 確認活性強度，收集結果以利下一步驟的執行。

確效

許多的試驗必定要經過確效的過程，藉以證明試驗的過程是足以被信任的。可惜在前人發表的期刊中，並未詳細加以敘述過程。而實驗又必須執行這個過程，所以可能以不同軟體執行相同的標的物與資料庫的結果比較；或其他自行開發的確效過程來進行確效。

謝誌 (Acknowledgement)

感謝軟體的提供廠商與學術單位。

參考文獻 (Reference)

[1] Niu De-gang et al., Expression and significance of earl y apoptosis in spinal cord injury. HeilongJiang Medicine and Pharmacy, 2008. 31(5): p. 28-30.

[2] Donald Schreiber., “Spinal Cord Injuries,” http://emedicine.medscape.com/, 2009

[3] Mathis, A.S., et al., Retrospective Analysis of Early Steroid-Induced Adverse Reactions in Kidney and Kidney-Pancreas Transplant Recipients. Transplantation Proceedings, 2007. 39(1): p. 199-201.

[4] Sing-Yuan, Wang et al., 脊髓損傷藥物治療的研究進展. Journal of Nongken Medicine. 2008. 30(6): p. 503-505.

[5] Jian, Wang et al., 脊髓損傷的藥物治療進展 J. Clin. Res.， 2008. 25(11): p. 2087-2090.

[6] Leppänen et al., The structure of GFRalpha1 domain 3 reveals new insights into GDNF binding and RET activation. The EMBO Journal, 2004. 23: p. 1452-1462.

[7] Dumont, R.J. et al., Acute Spinal Cord Injury, Part II: Contemporary Pharmacotherapy. Clinical Neuropharmacology, 2001. 24(5): p. 265-279.

[8] Meng-Yu, Tsai. The Influence of Methylprednisolone and Erythropoietin to Spinal Cord Injury: Microarray Data Analysis. Unpublished thesis. Graduate Institute of Biomedical Informatics of Taipei Medical University. 2009

[9] Shih-Ying Tsai et al, Injury-induced Janus kinase/protein kinase C-dependent phosphorylation of growth-associated protein 43 and signal transducer and activator of transcription 3 for neurite growth in dorsal root ganglion. Journal of Neuroscience Research, 2007. 85(2): p. 321-331.

[10] Xu, J., et al., Methylprednisolone inhibition of TNF-[alpha] expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats. Molecular Brain Research, 1998. 59(2): p. 135-142.

[11] Fumagalli, F., et al., Single exposure to erythropoietin modulates Nerve Growth Factor expression in the spinal cord following traumatic injury: Comparison with methylprednisolone. European Journal of Pharmacology, 2008. 578(1): p. 19-27.

[12] Ji, L.Y. et al., The experiment study of hypoxia inducible factor-1α expression after spinal cord injury in rats. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2008 23 (1): p. 4-7.

[13] Dong D.M. et al., Gene expression profile in acute spinal cord injury screened by cDNA microarray: experiment with rats. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2006. 86(35): p. 2495-2501.

[14] Xiao et al., cDNA microarray analysis of spinal cord injury and regeneration related genes in rat. ACTA

Physiologica Sinica, 2005. 57(6): p. 705-713.

[15] Imming, P. et al., Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. Nat Rev Drug Discov, 2006. 5(10): p. 821-834.

[16] Overington, J.P. et al., How many drug targets are there? Nat Rev Drug Discov, 2006. 5(12): p. 993-996.

[17] Kumar, N. et al., Applying computational modeling to drug discovery and development. Drug Discovery Today, 2006. 11(17-18): p. 806-811.

[18] Butcher, E.C. et al., Systems biology in drug discovery. Nat Biotech, 2004. 22(10): p. 1253-1259.

[19] David W. Ritchie, Evaluation of protein docking predictions using Hex 3.1 in CAPRI rounds 1 and 2. Proteins: Structure, Function, and Genetics, 2003. 52(1): p. 98-106.

[20] The presentation file of R&D 2006, Dainippon Sumitomo Pharma.

[21] Narayan, V.A. et al., Structures of Zinc Finger Domains from Transcription Factor Sp1. Insights into Sequence-Specific Protein-DNA Recognition. J. Biol. Chem., 1997. 272(12): p. 7801-7809.

[22] Athanikar, J. et al., Promoter selective transcriptional synergy mediated by sterol regulatory element binding protein and Sp1: a critical role for the Btd domain of Sp1. Mol. Cell. Biol., 1997. 17(9): p. 5193-5200.

[23] Xie, H.-Z., et al., Pharmacophore modeling study based on known Spleen tyrosine kinase inhibitors together with virtual screening for identifying novel inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009. 19(7): p. 1944-1949.

[24] Iwase, K. et al., Estimation of active conformations of drugs by a new molecular superposing procedure. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 1999. 13(5): p. 499-512.

[25] Burkhard, P. et al., An example of a protein ligand found by database mining: description of the docking method and its verification by a 2.3Å X-ray structure of a Thrombin-Ligand complex. Journal of Molecular Biology, 1998. 277(2): p. 449-466.

[26] Khedkar, S.M. et al., In silico screening of ligand databases: Methods and applications. J Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. 68(6): p. 689-696.

[27] Rarey, M.K. et al., Multiple automatic base selection: Protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 1997. 11(4): p. 369-384.

[28] Todd J. A. Ewing et al., Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. Journal of Computational Chemistry, 1997. 18(9): p. 1175-1189.