

知識天地

酵素抑制劑：挑戰高抑制強度與高選擇性以利新藥研發

林俊宏研究員、何靜攻博士班學生（生物化學研究所）

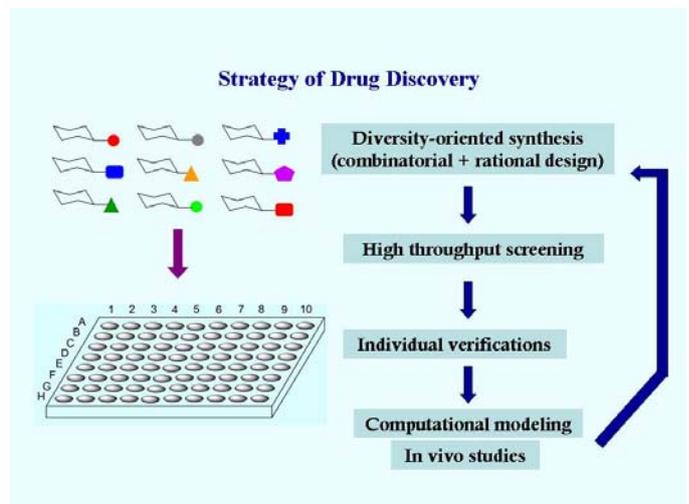
酶，又稱為酵素，是指具有催化功能的蛋白質，在生物體中是具有催化新陳代謝及生合成（biosynthesis）反應的蛋白分子；生物體藉著種種酵素的催化作用與調節，才能有效地完成所需要的許多生理活動。若細胞內的酵素活動受到抑制或干擾，整個生物體就可能出現異狀，所以酵素往往成為開發藥物的重要目標。近年來針對酵素開發的藥物，如克流感（Tamiflu）就是治療流行性感冒病毒的藥物，屬於病毒的唾液酸水解酶（Neuraminidase）的抑制劑（Inhibitor）。我們的研究團隊近年來所研發的新技術，可以快速找到酵素的最佳抑制劑；此技術已成功應用到醣類水解酶中，找到抑制強度最高的分子，它的抑制常數（Inhibition constant: K_i ）達到0.46 pM。醣類水解酶（Glycoside hydrolases），是一種專門水解糖苷鍵（Glycosidic bond）的酵素，是自然界中常見的酵素之一，生物體中此類酵素通常扮演代謝與調節的重要角色。相同的醣水解酶存在於人體的不同區域，甚至同一細胞的不同胞器（Organelle）內，會有不同的角色與功能，另外，也有不同的醣水解酶，即使彼此角色功能不同，但所辨視的受質（Substrate）卻相近。所以在開發抑制劑時，絕大部分的化合物對於類似或同類酵素均會產生多重的抑制行為，使得研究細胞和生物體的專一酵素的生理角色受到限制，因為這些抑制劑將會引起複雜的表徵（Phenotypes）。所以針對單一酵素開發具有高強度兼具高選擇性的抑制物，是目前藥物研發中的最重要的課題，可以減低對其他相似的酵素產生抑制，減少或去除不必要的副作用。

我們在數年前首先針對岩藻醣苷水解酶（ α -L-Fucosidase, EC 3.2.1.51）進行研究，此酵素是負責催化水解反應以釋放出岩藻糖（ α -L-Fucose），而所辨視的岩藻糖大部分會透過各種不同的鍵結方式如 α -1,2、 α -1,3、 α -1,4、 α -1,6 與半乳糖（Galactose）或是 N-乙醯葡萄糖胺（N-acetylglucosamine）形成鍵結，這些具有岩藻糖修飾的醣類分子具有各種不同的生理活性，例如人體中 A, B, H, 及 Lewis 抗原的非還原端常常含有岩藻糖修飾，而這些抗原則是血型分類的重要辨識指標。除此之外，岩藻糖還涉及植物本身的防禦、人體發炎反應、細胞凋亡（Apoptosis）、癌症腫瘤的轉移以及人類基因遺傳疾病Fucosidosis。

我們研發的方法是利用酵素的催化反應中的過渡態（Transition state）為主體，設計並合成它的類似構造。而醣水解酶抑制劑的主體開發即是將糖分子的氧環修改成氮糖分子（azasugar）為主體，接著再以組合式合成（Combinatorial synthesis）由環外與各種官能基結合造成多元性的組合。我們所發展的化學反應因選擇性及產率很高，可直接在微盤（Microtiter plate）上進行。反應後的產物不必經由純化步驟，可以直接以大量連續式的稀釋，降低溶劑干擾後，後續的酵素活性測試也可以繼續在微盤上進行（圖一）。

此技術的開發可以免除傳統作法上繁瑣的純化步驟，在極短的時間內可以完成眾多化合物的合成，以及後續酵素活性的篩選，找出最強的抑制劑，因此研發的費用與時間都可以降到最低。整個程序可在幾小時或幾天內完成，比起傳統的作法省下許多寶貴的時間。這個方法所找到的分子往往專一性極高，不容易對其他類似的酵素產生抑制效果，在藥物研發上亦可避免副作用的發生。此外，這種方法也可以找到緊密結合型抑制劑（Slow, tight-binding inhibitors），藉著額外延伸性的基團與標的酵素（Target enzyme）產生構形改變（Conformational change），而有更緊密的結合，因而使結合強度增加數千、萬倍。

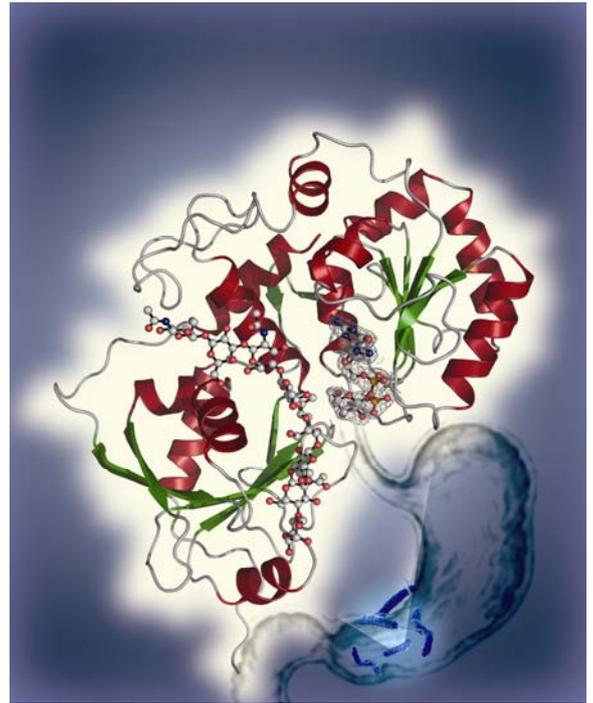
另一方面，我們最近幾年與王惠鈞副院長的結構生物學實驗室合作，在與疾病相關聯的酵素抑制物研發上，有不錯的研究成果發表。與胃部疾病習習相關的幽門螺旋桿菌，它的岩藻糖合成轉移酶（Fucosyltransferase）所催化的反應，是產生路易士抗原的生合成的關鍵步驟。我們已成功地解析出第一個X-ray結晶繞射結構（圖二），並利



圖一

用蛋白質結構推斷出催化的反應機構，並成功地發展出酵素抑制劑。另外在與抗寄生蟲疾病藥物相關的酵素：麩胱甘肽—精胺質合成酵素，我們則是利用酵素與抑制物的結構訊息，發現特殊的反應機構，並指出未來藥物設計與開發的新方向。

我們最近成功針對己醣胺水解酶 (Hexosaminidase) 開發高選擇性的抑制劑，此酵素是主要降解糖胺聚醣 (Glycosaminoglycan) 的醣水解酵素，可由軟骨細胞分泌到細胞外作用，在關節炎病人的關節組織液中是主要的醣水解酵素。過去已有報導，抑制此酵素可以避免或甚至回復軟骨降解的程度。另外，己醣胺水解酶也與溶酶體累積病變 (Lysosomal storage disease) 中的 GM2 神經節苷脂儲積症有關，例如泰—歇克斯症和山德霍夫症 (Tay-Sachs and Sandhoff disease) 是因為形成己醣胺酶的基因突變，導致此酵素的代謝功能喪失。酵素抑制劑目前已知可增加這類缺陷酵素的穩定性，可以維持這些酵素代謝功能的最低程度，這樣的觀念稱為 Pharmacological chaperones。因為己醣胺酶和葡萄糖胺醣水解酶 (O-GlcNAcase) 都是催化水解 N-乙醣葡萄糖胺的反應，兩個酵素都擁有一樣的催化機制。為了要開發這一類藥物並降低副作用，建立具有選擇性和高強度的抑制劑是現今階段的重點。我們最近針對己醣胺酶抑制的研發，最好的抑制強度可以到達 0.69 nM，而且對於 O-GlcNAcase 的選擇性可以高達 1.9×10^5 倍。這項突破性的研究成果希望能進一步發展出針對關節炎的新型用藥。



圖二

最後，我們在這裡感謝王惠鈞副院長及基因體中心楊安綏副主任的實驗室，長期以來的協助與合作，使得許多研究得以順利進行。並感謝本實驗室過去與現在的同仁，他們的努力使一切化為可能。

參考資料：

1. C.-Y. Wu, C.-F. Chang, S.-Y. Chen, C.-H. Wong, C.-H. Lin (2003) Rapid Diversity-Oriented Synthesis in Microtiter Plates for In Situ Screening: Discovery of Potent and Selective α -Fucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**: 4661-4664.
2. C.-F. Chang, C.-W. Ho, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, C.-H. Lin (2004) Discovery of Picomolar Slow Tight-Binding Inhibitors of α -Fucosidase. *Chem. & Biol.* **11**: 1301-1306.
3. C.-W. Ho, C.-F. Chang, Y.-N. Lin, H.-T. Lee, Y.-T. Wu, C.-Y. Wu, S.-W. Liu, Y.-K. Li, C.-H. Lin (2006) Discovery of Different Types of Inhibition between the Human and *Thermotoga maritima* α -Fucosidases by Fuconojirimycin Derivatives. *Biochemistry* **45**: 5695-5702.
4. C.-H. Pai, B.-Y. Chiang, T.-P. Ko, C.-C. Chou, C.-M. Chong, F.-J. Yen, S. Chen, J. K. Coward, A. H.-J. Wang, C.-H. Lin (2006) A Dual Substrate Binding Site for Translocation Catalysis of *Escherichia coli* Glutathionylspermidine Synthetase. *EMBO J.* **25**: 5970-5982.
5. H.-Y. Sun, T.-P. Ko, S.-W. Lin, J.-L. Liu, A. H.-J. Wang, C.-H. Lin (2007) Structure and Mechanism of *Helicobacter pylori* 1,3-Fucosyltransferase: A Basis for LPS Variation and Inhibitor Design. *J. Biol. Chem.* **282**: 9973-9982.

※各期知識天地文章請逕於本院網頁：<http://www.sinica.edu.tw/> 「常用連結」之「週報〈知識天地〉」項下瀏覽。※