

知識天地

SARS 蛋白酶的抑制與抗病毒藥物研發

梁博煌（生化所副研究員）

病毒的研究在台灣雖有相當的基礎，但其研究的方向較偏重於臨床案例、病毒的流行病學及病理的分子機制等，較少著重化學生物學（Chemical Biology）層面的藥物合成與測試，以致病毒疾病的用藥仍由大藥廠開發，並取得專利權行銷全世界。事實上，藥物的開發在技術層面並非全由藥廠掌握，學術界發展出來的獨特技術亦相當關鍵，因此在先進國家常有學術界的教授，因獲得有利用價值的發現，而自行開創新公司。但是藥物的研發需要龐大資金，失敗率高，恐怕只有藥廠才有辦法完成最後藥物的開發，故學術界的發現最後均可能被藥廠收購。當然如能因此藥物而救人，也是功不可沒。總而言之，由學界來當火車頭推動藥物研發，是很合理且值得，無怪乎每年都有許多和藥物研發相關的國際研討會，顯示學術界及工業界對於藥物研發相關資訊的渴望。

有關藥物研發的科學期刊也愈來愈多，最著名的《Nature》有《Nature Biotechnology》、《Nature Medicine》及《Nature Review Drug Discovery》外，最近也出刊《Nature Chemical Biology》刊載關於化合物可影響生命現象的報告。Chemical Biology 是用化學的方法來研究生命現象，範疇包括生物有機化學、生物無機化學、生物分析化學及生物物理化學等生物化學，有別於細胞生物學、發育生物學、分子生物學等生物學。事實上，生物學及化學在藥物研發上是同等重要，也需先有對疾病分子機制的瞭解，例如發現產生突變的基因，使得表現的蛋白活性和正常不同，才能對症找藥，以 Chemical Biology 的方法發現藥物，最後測試藥物的活性。而在使用化學的方法來研究藥物時，所需要的技術為針對疾病相關酵素之活性及反應機制作研究，以發展出測試活性的方法，並依此篩選化合物庫來取得候選藥物。另一方式是利用解析酵素三級結構，接著以結構為基礎來設計藥物；以電腦軟體為輔，設計並合成酵素抑制劑，並在體外或細胞內測試其效能，這時可以再將抑制劑和酵素共結晶，依其結構修飾抑制劑結構，以便合成更佳候選藥物。候選藥物在通過動物活體及人體的測試後，才能尋求政府藥物管理機關的認證而成為藥品。

以 SARS 藥物研發為例，SARS 於 2002 年底在中國大陸廣東省發生，2003 年傳播到全球 20 幾個國家，造成 8 千多個病例，約 8 百人死亡。台灣也因有人受感染而造成人心惶惶，政府也啟動緊急應變措施，由國科會撥專款研究 SARS；由本院賴明詔副院長及台大陳定信院長擔任總指揮，組成國內各個實驗室之團隊，在對抗 SARS 的各個層面上努力。藥物研發也在本院基因體中心翁啟惠主任的召集下，由該中心、化學所及生化所一些具 Chemical Biology 研究專長的實驗室組成研究團隊，本實驗室也為其中一員，參加以 SARS 蛋白酶為目標的藥物研發。蛋白酶在 SARS 病毒複製過程中，扮演非常重要的角色，其功能為在病毒侵入人體後，生成多胜肽上切割 11 個定點而使一些重要酵素變成有活性的成熟酵素。這些酵素包括蛋白酶本身、helicase、RdRp（RNA-dependent RNA polymerase）及一些未知功能的蛋白。而 RdRp 對於稍後病毒 RNA 的複製，最後產生病毒外部結構蛋白很重要，所以蛋白酶對於整體病毒複製為必要的催化，若能發現其抑制物，可能可發展成為殺死病毒的藥物。

根據其它類似的 3C 蛋白酶研究，SARS 蛋白酶為一類似 chymotrypsin 的蛋白酶，但不同於 chymotrypsin 使用 Ser、His、Asp 三個重要氨基酸，SARS 蛋白酶使用 Cys、His 催化水解反應，因此病毒也稱為 3C-like（3CL）蛋白酶。因為 SARS 病毒還有另一個蛋白酶稱為 papain-like 蛋白酶，所以 3CL 蛋白酶又稱主要蛋白酶（main protease）。我們首先用大腸桿菌來表達此 SARS 的主要蛋白酶，並設計螢光胜肽基質，將胜肽兩端接上螢光團，一端是發出螢光的 Edans，一端是吸收螢光的 Dabcyl，當蛋白酶切斷胜肽，兩端為之遠離而螢光上昇，而當有抑制劑存在時，蛋白酶活性減低，螢光上昇的速度減緩；由此螢光的高靈敏度變化，便可藉以尋找蛋白酶的抑制物，成為對抗 SARS 的可能藥物。我們也對此蛋白的反應速率常數及蛋白是否形成具有活性的雙體（dimer）加以探討。之後國防大學國防醫學院預防醫學研究所詹家琮上校篩選了超過一萬個化合物，包括 FDA 通過的藥物、合

成的化合物、傳統中草藥及其他蛋白酶抑制物等，找到約 50 個有效分子可抑制病毒複製，其中 3 個為上市藥物。我們從這些分子證實，由翁主任實驗室發展的抗貓愛滋病毒的蛋白酶抑制物 TL-2 (圖一) 也是 SARS 蛋白酶的抑制物。從另一分子庫，我們也找到一些含金屬離子的化合物及一些紅茶裡的多酚類 (圖一) 可有效抑制蛋白酶的活性，也發現一類 benzotriazole 會和蛋白酶形成緊密的共價物。^{註 1}

當王惠鈞所長實驗室解開了 SARS 蛋白酶的結晶結構後，發現了一個新奇的現象：在原本應該是雙體 (dimer) 的蛋白酶，被周圍另一個雙體 (dimer) 的蛋白酶分子將其 C 端 (C-terminal) 6 個氨基酸插到蛋白酶的中心活性區域，便成 3 個單體蛋白酶的複合體 (見圖二左)。因此在中間的單體的中心活性區域，便有另一個單體的 N 端及第三個單體的 C 端插入。試想 SARS 蛋白酶原來本身也包含在多肽中，自己必須把自己切出，而切的過程須在 N 端及 C 端各切一刀，因此難怪 N 端及 C 端在某些條件下會在蛋白酶的中心活性區域出現。我們也發現在大腸桿菌表現具有 N 端或 C 端切位，但多出一段其它蛋白的蛋白酶，破菌後純化到的蛋白酶已經切割了切位，可知蛋白酶可藉切自己 (auto-processing) 而成熟 (auto-maturation) 且具活性 (auto-activation)。我們另製備沒活性、且 N 端及 C 端都具切位的定點突變蛋白酶 C145A，用成熟的蛋白酶來切它，發現切 N 端的速度比切 C 端快了 55 倍，因此我們提出 SARS 蛋白酶成熟化的分子機制 (見圖二右)，在此機制中未成熟的長蛋白首先要互相接近然後互切：先切 N 端讓半成熟蛋白位移 (flip) 到其 N 端，卡入正確位置，再切 C 端產生成熟的蛋白。

有了 C 端鑲嵌到活性區域的三度空間結構，我們接著依此結構設計藥物，並以先前藥廠發展出的 AG7088 為出發點。AG7088 為一類胜肽 (peptide-like) 的鼻病毒 3C 蛋白酶抑制劑，其 P1 位置帶有環化的 Gln (此類蛋白酶皆認 P1 上的 Gln)，且在 P1' 帶有會和蛋白酶活性區的 Cys 共價結合的 α, β -不飽和雙鍵的酯類 (a Michael acceptor)，所以可抑制鼻病毒 3C 蛋白酶。但 SARS 蛋白酶和鼻病毒蛋白酶的結構有些不同，所以 AG7088 並不能抑制 SARS 蛋白酶，台大方俊民教授實驗室便合成了其類似物，由我們來測試其對 SARS 蛋白酶的抑制能力^{註 1}，發現在 P1 用 Phe 來取代環化的 Gln 則會產生有抑制活性的分子，從一系列合成的化合物中，我們找到最具抑制能力 ($K_i = 0.5 \mu\text{M}$) 的分子為列在圖一，但此 α, β -不飽和雙鍵的酯類並不會和和蛋白酶活性區的 Cys 共價結合，也許是 P1 的 Phe 移位到 P2 的結合處，所以 Cys 打不到 Michael acceptor。確定了 P1 要有 Phe，我們又替換了 P1'，發現 2-chloro-4-nitro aniline 在 P1' 可使抑制能力大為提升，此名為 anilide 化合物也列在圖一，具有 $K_i = 0.03 \mu\text{M}$ 的效果，而且也在細胞實驗發現其具有抵抗病毒的能力。在尋找更有效的抑制物過程中，我們也用電腦模擬以協助改進抑制物。我們同時運用依酵素結構設計出來的藥物 (rational design) 和上述的高通量藥物篩選 (high throughput screening) 作抗 SARS 藥物研發。

以對抗 SARS 為目標的團隊，除了我們之外還有許多團隊，其合作研究規模之大為國內第一遭，事後證明在對抗威脅自身生命財產的疾病上做研究是不容缺席的，在 SARS 研究上幾個當事的國家都展現其研發實力。筆者認為國內此次 SARS 的合作研究模式是成功的。在某些重要領域上，可採取更積極的合作，以產生足夠的研發能量，以有限的資源做更有價值的運用。雖說 SARS 已經不見，所以藥物開發並未到上市階段，但已經獲得一些候選藥物，我們也正在利用這些化合物測試對其他有相似蛋白酶的病毒的抑制能力，以期開發出有效的新藥。其他如流感病毒、肝炎病毒、愛滋病毒等仍在危害人類的疾病，或許可循此研究模式進行，並開發成商品，以促進國內生技產業的發展。

註 1：

Kuo, C.J. *et al.* (2004) Characterization of SARS main protease and inhibitor assay using a fluorogenic substrate.

Biochem Biophys Res Commun, **318**, 862-867.

Wu, C.Y. *et al.* (2004) Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10012-10017.

Hsu, J.T., *et al.* (2004) Evaluation of metal-conjugated compounds as inhibitors of 3CL protease of SARS-CoV. *FEBS Lett.* **574**, 116-120.

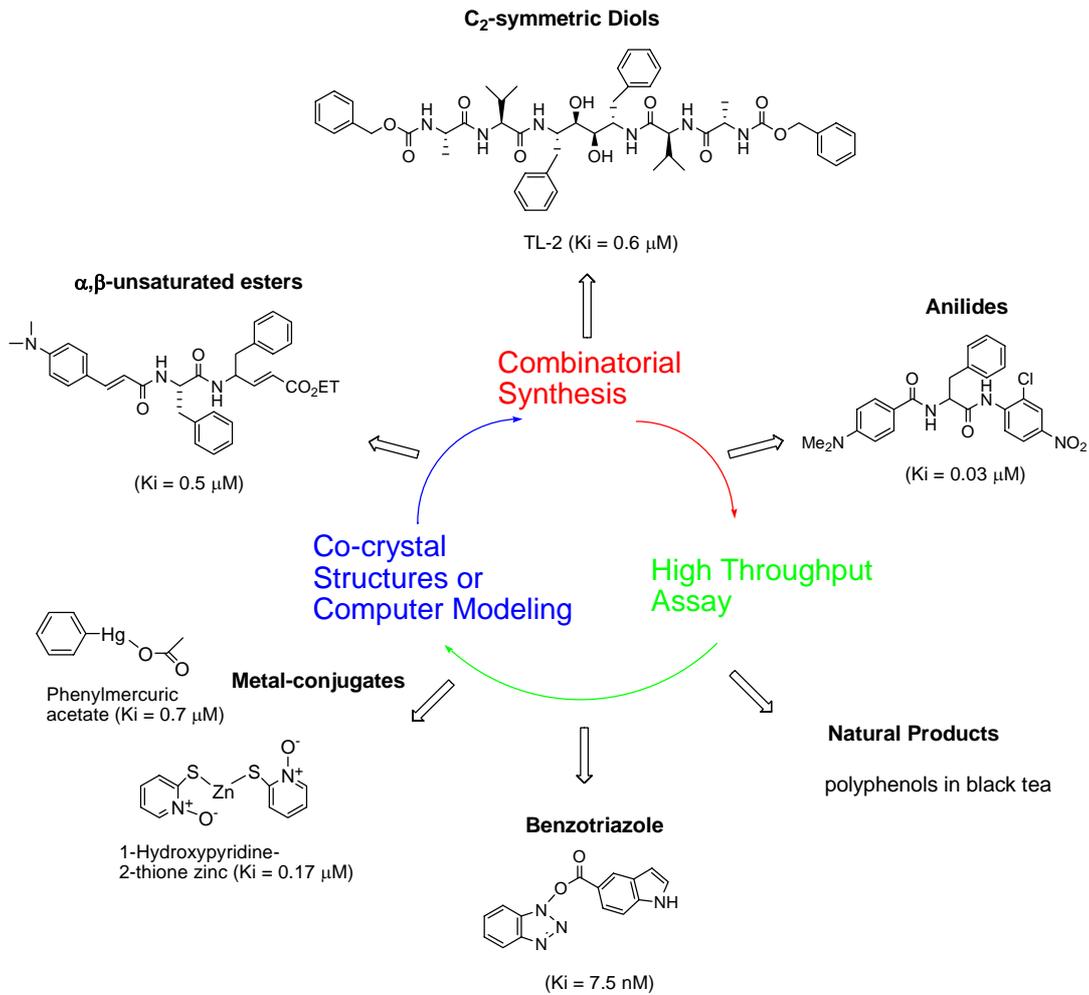
Chen, C. N. *et al.* (2005) Inhibition of SARS-CoV 3C-Like Protease Activity by Theaflavin-3,3'-digallate (TF3). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2**, 209-215.

Hsu, M. F. *et al.* (2005) Mechanism of the maturation process of SARS-CoV 3CL protease. *J. Biol. Chem.* **280**, 31257-31266.

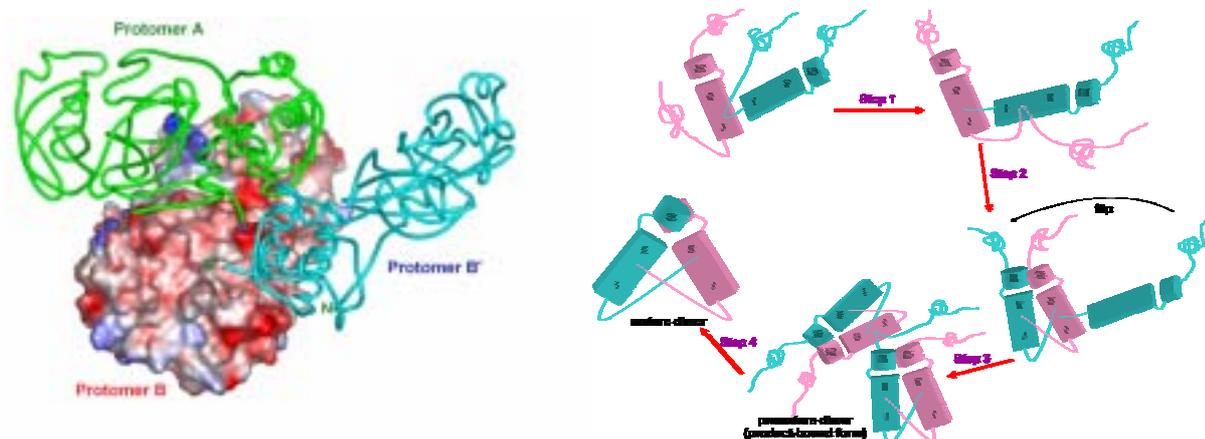
Shie, J. J. *et al.* (2005) Inhibition of the severe acute respiratory syndrome 3CL protease by peptidomimetic α,β -unsaturated esters. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 5240-5252.

Shie, J. J. *et al.* (2005) Discovery of potent anilide inhibitors against the severe acute respiratory syndrome 3CL protease. *J. Med. Chem.*, **48**, 4469-4473.

Wu, C. Y. *et al.* (2005) Stable benzotriazole esters as mechanism-based inactivators of the severe acute respiratory syndrome 3CL protease. *Chem. & Biol.* in print.



▲圖一：經由我們的研究找到一些 SARS 蛋白酶抑制物的例子



▲圖二：SARS 蛋白酶成熟化的複體（左）及其成熟化機制（右）