

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

血清素轉運體相關疾病之電腦模擬及藥物設計研究

**Molecular modeling to investigate the serotonin transporter
related disease and drug design**

計畫編號：1002001INER081

受委託機關(構)：國立臺北科技大學

計畫主持人：劉宣良 教授

聯絡電話：(02)2771-2171 轉 2574

E-mail address：f10894@ntut.edu.tw

核研所聯絡人員：趙建華 博士

報告日期：100 年 12 月 13 日

目 錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、計畫緣起與目的.....	5
貳、研究方法與過程.....	7
一、研究總流程.....	8
二、蒐集血清素轉運體(SERT)抑制劑分子.....	9
三、藥物分子三維結構預測.....	9
四、建立 SERT 藥效基團模型與驗證.....	10
五、以藥效基團模型為基礎的虛擬篩選.....	10
參、主要發現與結論.....	11
一、決定 SERT 藥效基團模型的重要化學基團.....	11
二、SERT 藥效基團模型的建立.....	12
三、SERT 藥效基團模型的驗證.....	14
(一)、測試組預測法.....	14
(二)、費雪隨機試驗法.....	14
(三)、接收者操作特徵曲線法.....	15
四、以 SERT 藥效基團為基礎的虛擬篩選.....	16
五、和過去所開發出 SERT 抑制劑之結構特性比較.....	17
六、結論.....	18

肆、參考文獻.....19

中文摘要

血清素轉運體位於神經元末端的半透膜上，負責把胞外過多的血清素利用主動運輸進行再回收到神經內的動作，而達到調節胞外血清素正常濃度的功能。過去的研究顯示，罹患憂鬱症的病人其腦中的血清素濃度較低且血清素的結合位也偏少。因此，血清素濃度的變化被指出和憂鬱症有直接關係，因此，血清素轉運體被視為是開發抗憂鬱藥物的主要目標。最近，電腦輔助藥物設計已被廣泛的運用在藥物開發中，設計工具包含了分子嵌合，藥效基團模型，活性-結構定量關係分析以及虛擬藥物篩選，但如何整合這些工具使得在開發藥物上能更精確、更有效率便成為至今研究的主要課題。因此，本研究主要目的為：以美國 Accelrys 所開發的生物分子模擬軟體 Discovery Studio 2.5 設計以配體為基礎的血清素轉運體藥效基團模型，並用多種方法進行驗證；接者，此藥效基團模型會作為三度空間的搜索依據並套用於虛擬篩選上，以獲得前導藥物來抑制血清素轉運體。最後篩選出的數個具潛力的化合物分子將可供為後續的實驗以測試其真正的藥效活性。

關鍵字：血清素轉運體；電腦輔助藥物設計；藥效基團；虛擬篩選

Abstract

The neurophysiological function of serotonin transporters (SERT) is to regulate the extracellular concentrations of serotonin in the brain by performing active transport (or re-uptake) of released serotonin from the extracellular space into neurons or glial cells. Previous reports of that depressed patients had reduced serotonin binding sites on platelets and low serotonin metabolite levels in cerebrospinal fluid. These findings were provided the evidence for serotonin changes in depression. So, the SERT is therapeutic significance as target of antidepressant drug treatment. Until recently, computer-aided drug design (CADD) has emerged as a powerful technology in the drug discovery process. While CADD includes several tools, such as molecular docking, pharmacophore, quantitative structure-activity relationship (QSAR), and virtual screening, the question of how to develop more efficient methods for drug screening by integrating these tools has become an important issue. The goals of this project will be to build a ligand-based SERT pharmacophore model using Discovery Studio 2.5, and the model was validated using different methods. Next, the pharmacophore model was further used as a three-dimensional query in database searching to

retrieve virtual leads for SERT inhibition. We selected number of potential compounds that can for future experimental studies in diseases associated SERT inhibition.

Keywords: serotonin transporter; computer-aided drug design; pharmacophore; virtual screening

作者及所屬單位：

周政利（國立臺北科技大學工程科技研究所）

廖晃聖（國立臺北科技大學工程科技研究所）

劉宣良（國立臺北科技大學化學工程與生物科技系）

壹、計畫緣起與目的

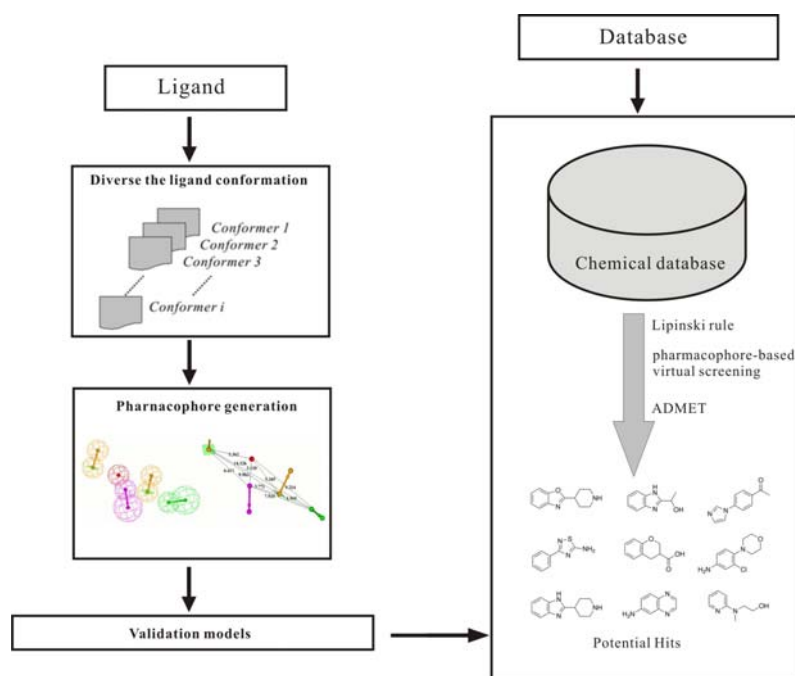
血清素 (serotonin) 是一種重要的一級胺神經傳導物質 (monoamine neurotransmitter)，而位於神經元末端的半透膜上的血清素轉運體 (serotonin transporter; SERT) 則扮演管制血清素含量的重要角色。SERT 為 SLC6 gene 家族下的轉運體蛋白，需要運送 Na^+ - Cl^- 離子穿越膜孔洞來協同運輸受質。結構上共有十二個穿膜區 (transmembrane domain)，而截至目前並未有 SERT 的結晶結構，故在設計 SERT 藥物上都參考在 2005 年所被提出的細菌白胺酸轉運體 (leucine transporter; LeuT) 當作參考資訊的來源[1]。而從許多過去的研究指出，腦內若無法維持正常濃度的血清素將會出現如憂鬱、情緒不穩及行為異常等症狀，故在發展抗憂鬱藥物中 (antidepressants)，主要目的為維持腦中正常的血清素濃度，而 SERT 便為首要藥物開發之目標，如設計選擇性血清素再吸收抑制劑 (selective serotonin reuptake inhibitors)。傳統開發一新型藥物除了需要十到十二年的時間，研發費用可能更高達數十億元，所以為了縮短藥物研發時間與過多的經費支出，電腦輔助藥物設計 (computer-aided drug design; CADD) 方法則成為有用的工具，藉由高效能的電腦運算能力，可對具藥效潛力的化合物進行虛擬實驗亦或是預測配體 (ligand) 和受體 (receptor) 嵌合的可能構型。目前常被使用

到的電腦輔助藥物設計工具包含了分子嵌合(molecular docking)、藥效基團模型(pharmacophore)、活性-結構定量關係分析(QSAR analysis)以及虛擬藥物篩選(virtual screening)，但如何整合這些工具使得在開發藥物上能更精確、更有效率便成為至今研究的主要課題。因此，本研究主要目的為：以 SERT 作為目標蛋白，並使用由美國 Accelrys 所開發的生物分子模擬軟體 Discovery Studio 2.5 (DS 2.5)來設計一連串具系統性的篩選藥物流程，並期望在最後可以成功的搜尋出具潛力的 SERT 抑制劑。在本研究計畫中，我們首先將蒐集近幾年的 SERT 抑制劑並以此來建立以配體為基礎的藥效基團模型(ligand-based pharmacophore)，並使用多種驗證方式來進行驗證，包含：(一)測試組預測(test set prediction)、(二)費雪隨機試驗(Fischer's randomization test)與(三)接收者操作特徵曲線(receiver operating characteristic curve; ROC curve)評估模型的準確性與其預測活性能力；驗證後的藥效基團模型將套用虛擬篩選上，我們以 NCI(National Cancer Institute)分子資料庫直接進行虛擬藥物篩選，以獲得理論上具親合性的新型化合物分子；最後篩選出的新型化合物分子在未來將再以分子嵌合進一步進行抑制劑與 SERT 的結合力測試，而保有高預測活性與高預測結合力的化合物分子將可供為後續的活體試驗用(*in vivo*)以測試其真正的藥效活性。

貳、研究方法與過程

一、研究總流程

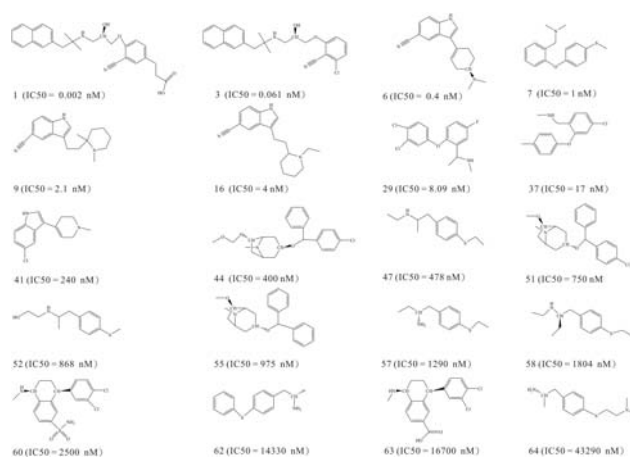
本研究計畫的理論計算將採用由美國 Accelrys 公司開發及台灣分子視算股份有限公司代理的生物分子模擬軟體 DS 2.5。其研究方法流程如圖一所示，並簡述如下：



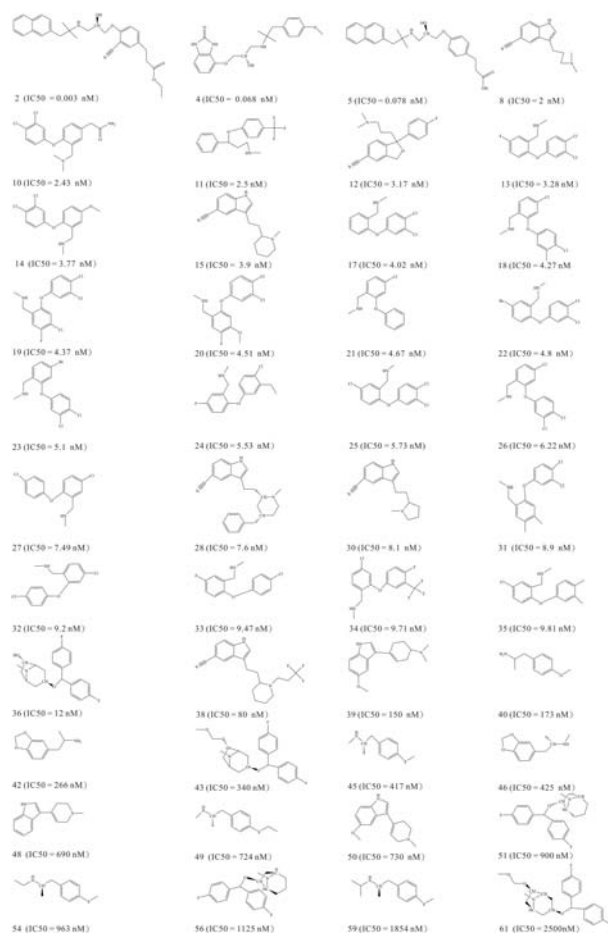
圖一、本計劃所設計之電腦輔助藥物篩選藥物流程。先搜集已知的抑制劑群，進行結構多樣性預測後並套用至藥效基團模型的建立，並驗證模型準確性。接著進行以藥效基團模型為基礎的虛擬篩選，最後決定出數個具藥效潛力的化合物分子。

二、蒐集 SERT 抑制劑分子

本步驟將先決定出作為藥效基團模型架設所必須的抑制劑群。首先，我們從線上化合物分子資料庫”The Binding Database”網站中鍵入關鍵字”serotonin transporter”作搜尋，搜尋條件侷限在近五年內並具有 IC₅₀ 值(IC₅₀ 值指抑制劑具有 50%抑制效果時的濃度)，最後共從六篇文獻中搜尋到 204 個 SERT 抑制劑分子[2-7]。我們把 204 個 SERT 抑制劑分子其中的 64 個作為架設藥效基團模型用，並將其分組成訓練組(training set)共 24 個化合物與測試組(test set)共 40 個化合物。而剩下的 140 個將應用在驗證藥效基團模型之接收者操作特徵曲線。為了要提供軟體其 SERT 抑制劑分子的結構資訊，我們先以 ChemDraw Ultra 軟體描繪出各分子的二維(2D)構型，再將其檔案讀取到 DS 2.5 軟體轉換成三維(3D)構型，以備後續實驗用。計畫中所使用的訓練組與測試組化合物群其分子結構圖與抑制活性分別呈現在圖二與圖三。



圖二、應用在架設SERT藥效基團的20個訓練組化合物。



圖三、應用在架設SERT藥效基團的44個測試組化合物。

三、藥物分子三維結構預測

化合物分子的三維結構於空間中具有多重的構形，而這些構形直接影響與蛋白質受體結合時的特定性。為了廣泛且準確地計算出這些分子的構形空間(conformational space)，本研究將利用 DS 2.5 中的 *Diverse Conformation Generation* 模組進行計算，而其方法主要在於透過改變分子內鍵結的旋轉角度，並且限制在特定的能量範圍

(一般為 20 kcal/mol)內產生出許多不同的構形。這個演算法會進一步將任何新產生的構形與已經存在的構形相互比較，如果太過接近則會擇一去除，已確保能夠獲得具有代表性的分子三維結構。此步驟我們把訓練組的 SERT 抑制劑分子都經由 *Diverse Generate conformations* 模組各產生 250 個構型(conformers)，並限制在 20 kcal/mol 的能量範圍中以”best conformational analysis”方法做計算。

四、建立 SERT 藥效基團模型與驗證

藥效基團定義為能使分子表現出藥效活性的最基本官能基，也可稱之為化學特性(chemical feature)。在前一步驟所得到的具多重構型後的訓練組化合物群我們將利用 DS 2.5 中的 *Hypogen* 演算法(3D QSAR pharmacophore generation)模組由系統產生十組假說(Hypothesis)，除了系統本身的驗證方法外，我們再由另外三種驗證方法來加以驗證模型的準確性。包含了測試組預測、費雪隨機試驗與接收者操作特徵曲線法。

五、以藥效基團模型為基礎的虛擬篩選

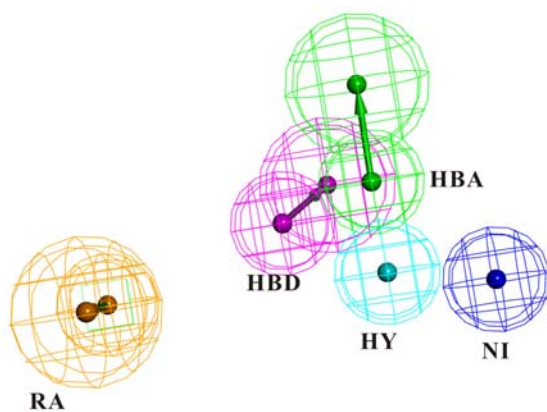
在前一步驟所架設的藥效基團將作為搜尋依據，以國際上常被作為分子模擬所使用的 NCI 分子資料庫來進行化合物檢索，而這些分子的結構可從網站上下載，並可直接進行虛擬藥物篩選。而在進行虛擬篩選後，為了確保具潛力的化合物分子具有良好的結合能力，我們將在將來計劃中進行分子嵌合實驗，以獲得理論上具親合

性的新型抑制劑分子。

參、主要發現與結論

一、決定 SERT 藥效基團模型的重要化學基團

藥效基團模型最重要的概念為決定出可以代表藥效活性的結構特徵，並利用這些結構特徵去定義其化學基團特性。故在架設藥效基團模型前決定出對的化學基團種類供軟體計算是非常重要的步驟。故我們利用所蒐集到的 SERT 抑制劑中活性最高的 compound 1 以 *HipHop* 模組直接建立藥效基團模型，結果如圖四所示。架設出來的藥效基團模型其化學基團種類包含了：氫鍵接受者 (hydrogen-bond acceptor; HBA)、氫鍵捐贈者 (hydrogen-bond donor; HBD)、與苯環-芳香族 (ring aromatic; RA)、疏水性 (hydrophobic; HY) 與負電離子 (Negative ion; NI)，這些化學基團種類將作為下一步架設藥效基團模型之依據參考。



圖四、初步以最有活性之 compound 1 以 *HipHop* 模組架設之藥效基團模型，模型包含了五種化學基團：HBA、HBD、RA、HY 與 NI。

二、SERT 藥效基團模型的建立

建立藥效基團模型時須考量到多種參數，如決定訓練組與測試組化合物的數目、決定化學基團間的最小與最大 Interfeature 距離與化學基團數目。由於截至目前為止，尚無 SERT 的藥效基團模型資訊供參考，故我們考量多種參數共架設了 12 種藥效基團模型組別，每組系統將產生 10 種 Hypothesis 共產生 120 組 Hypothesis。最後以統計上的參數如迴歸係數值(R)(以實際活性值與預測活性值作迴歸)、RMSD 值與作 cost function 做初步的模型品質判定，表一為整合這十二組每組的第一個 Hypothesis 的結果分析(系統預測第一個 Hypothesis 為最評分最高)。結果發現，組別一中的 Hypothesis 1(Run1/Hypo1)擁有最高的迴歸係數(R)值達 0.86，其 total cost 最低(132.81)、 Δ cost 的值偏大(95.7)、RMSD 值也偏小(1.98)，其化學基團包含了氫鍵予體(hydrogen-bond acceptor; HBA)、氫鍵受體(hydrogen-bond donor; HBD)、疏水性 (hydrophobic; HY)與苯環-芳香族(ring aromatic)各一個並呈現在圖五(A)，我們同時將此模型的 3D 位向與訓練組化合物的疊合情形分別呈現在圖五(B)、(C)與(D)中，圖中發現活性最好的 compound 1 可以準確的與我們模型完全疊

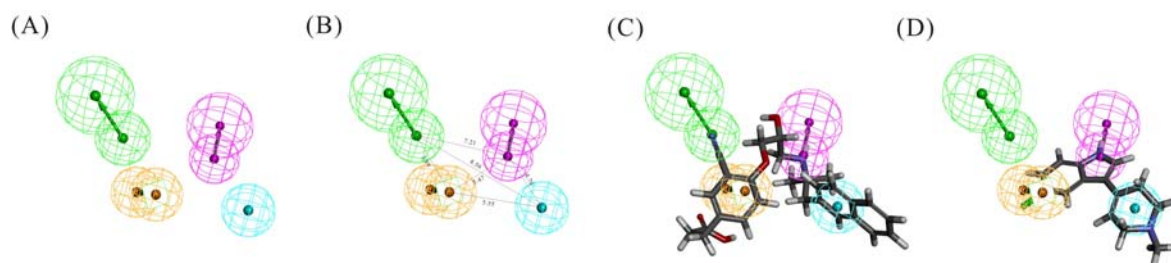
合，反之，活性最差的 compound 64 則疊合程度極差，故 Run1/Hypo1 具初步的預測能力，我們再以測試組預測、費雪隨機試驗與接收者操作特徵曲線進行進一步驗證。

表一、整合十二組藥效基團每組的第一個 Hypothesis 的結果分析。

Run number	Best hypothesis	Pharmacophoric features in generated hypotheses ^a	Total cost	Δ cost ^b	RMSD	Correl (R)	% cat. scramble
1	1	HBA ,HBD, HY, RA	132.81	95.7	1.98	0.87	95%
2	1	HBA ,HBA, HBD, HY	139.53	94.1	1.99	0.66	95%
3	1	HBA ,HBA, HBD	148.72	92.3	2.02	0.67	95%
4	1	HBA ,HBD, HY, RA	149.59	96.2	2.14	0.69	95%
5	1	HBA ,HBD, HY, NI	138.46	95.5	1.71	0.66	95%
6	1	HBA ,HBD, HY, RA	133.75	94.1	1.78	0.61	95%
7	1	HBA ,HBD, HY, RA	134.12	97.8	1.87	0.71	95%
8	1	HBA ,HBD, HY, RA	132.46	99.5	1.65	0.65	95%
9	1	HBA ,HY, RA, RA	140.15	93.5	1.78	0.55	95%
10	1	HBA ,HY, RA, RA	142.16	91.1	1.88	0.55	95%
11	1	HBA ,HY, RA, RA	141.11	95.2	1.91	0.51	95%
12	1	HBA ,HY, RA, RA	140.12	92.2	1.99	0.43	95%

^aHBA, hydrogen-bond acceptor; HBD, hydrogen-bond donor; HY, hydrophobic; RA, ring aromatic; NI, negative ionizable

^b Δ cost = (null cost - total cost)

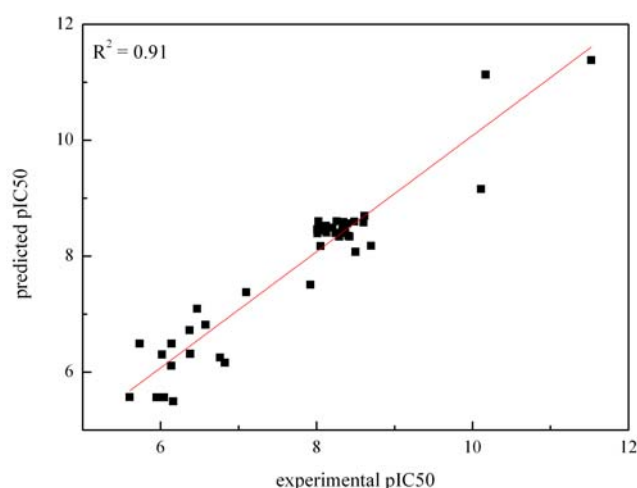


圖五、(A)Run1/Hypo1 的重要化學基團與 3D 位向。(B)Run1/Hypo1 重要化學基團間的距離。(C)Run1/Hypo1 與活性最好的抑制劑 (compound 1; IC50 = 0.002 nM) 其疊合示意圖與 (D)Run1/Hypo1 與活性最差的抑制劑 (compound 64; IC50 = 43290 nM) 其疊合示意圖。

三、SERT 藥效基團模型的驗證

(一)、測試組預測法

此驗證方法是以 Run1/Hypo1 來預測 44 個測試組的化合物群活性值，並以預測活性值與實際活性值來作迴歸並呈現在圖六，我們將以迴歸係數值(R^2)來判定此模型的預測能力。如圖六所示，我們的迴歸係數值(R^2)達到 0.91，代表此模型的預測能力特佳。

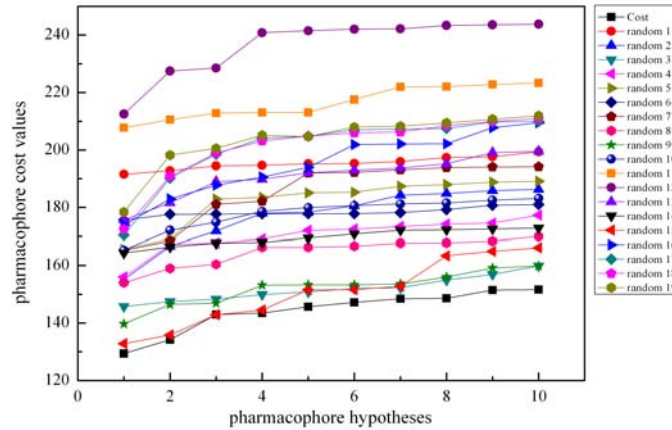


圖七、44 個測試組的化合物群其預測活性值與實際活性值的迴歸係數(R^2)圖，其 R^2 高達 0.91。

(二)、費雪隨機試驗法

接下來我們以費雪隨機試驗法方法來驗證此模型，而為了達到 95% 的信心水準，我們額外作 19 次隨機測試組別，並以 cost value 來判定模型的優劣，結果如圖八所示。如圖八所示，我們的 Run1/Hypo1 (Cost) 比起額外隨機產生 19 組(random 1 ~ random 19)其

cost value 值都還要低，故我們的模型通過了 95% 的信心水準預測。

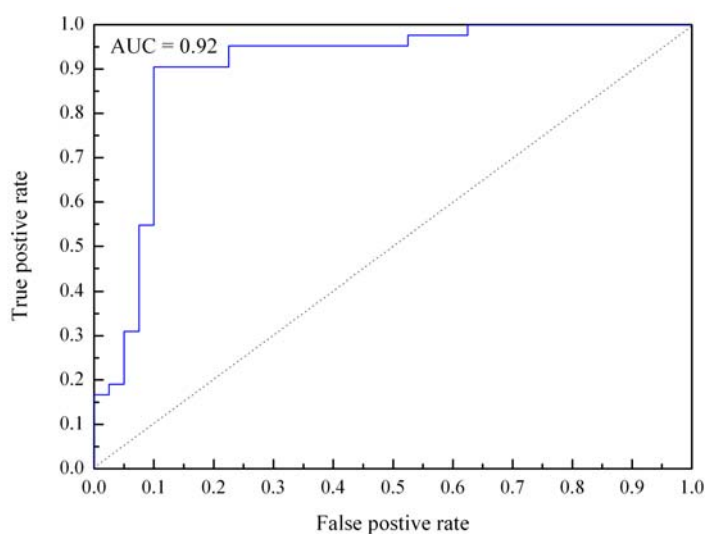


圖八、費雪隨機試驗法方法的驗證結果。

(三)、接收者操作特徵曲線法

最後一個驗證方法我們將以接收者操作特徵曲線法做驗證，接收者操作特徵曲線法是可以針對模型的靈敏度進行描述，即真陽性率(true positive rate; TPR)與假陽性率(false positive rate; FPR)的值為何。真陽性率為在所有陽性樣本中能正確區分陽性的能力，而假陽性率為在所有陰性的樣本中有多少假陽性可被篩選出，最後分別以假陽性率為 X 軸、真陽性率為 Y 軸作出接收者操作特徵曲線來評估此模型的預測能力值。我們另外蒐集 140 個 SERT 抑制劑[2-7]來針對 Run1/Hypo1 作接收者操作特徵曲線，其 140 個 hSERT 抑制劑中活性小於 100 μM 其 Principal 值設為 2，抑制劑活性介於 100~1000 μM 其 Principal 值設為 1，而抑制劑活性大於 1000 μM 的

其 Principal 值則設為 0，其結果曲線結果如圖九所示，Run1/Hypo1 在篩選 140 個 SERT 抑制劑中其計算出的曲線下面積(area under curve; AUC)值高達 0.902 證實了此模型符合了高預測能力，故我們將以此模型套用至後續的虛擬篩選中。



圖九、以 Run1/Hypo1 對 140 個 SERT 抑制劑作接收者操作特徵曲線，其 AUC 值為 0.902，為理想的模型。

四、以 SERT 藥效基團為基礎的虛擬篩選

本計劃所使用的虛擬分子資料庫 NCI 共有 260,071 個化合物，我們首先使用由 Lipinski 所提出的 rule of five 守則來確保初篩後的化合物都具有良好藥效特性，篩完後剩下 190,239 個化合物，我們接著利用 Run1/Hypo1 模型進行虛擬篩選，篩選後的結果我們取 fit value 值大於 3 以上的作為具潛力的化合物，掃出的化合物群為 11,684 個化合物，我們為了考量到搜尋出的化合物必須和現有的

抑制劑結構性質相符，我們蒐集了過去研究中已知對 SERT 有明顯抑制效果的六個抑制劑分子包含了 Citalipram、Fluoxetine、Fluvoxamine、Paroxetine、Seertaline 與 Zimeldine 來做相似度搜尋，我們採用 DS 2.5 內的 *Find Similar Molecules by Numeric Properties* 模組進行，相似度定在 60%，搜尋後的結果有 6,077 個化合物相符，接下來我們利用 DS 2.5 內的 *ADMET*(Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) 預測模組做進一步的藥效特性測定，結果有 514 個化合物通過此門檻。而在藥物發展中期望能找到結構具多樣性的化合物分子，故我們使用 DS 2.5 內的 *Cluster Ligands* 模組將這些化合物群分成五組，並從其中各挑出 fit value 最高的來討論。

五、和過去所開發出 SERT 抑制劑之結構特性比較

我們所找出的化合物群分別為 NSC 618788、NSC 675821、NSC 278002、NSC401197 與 NSC 211040 並呈現於圖十。結構上這五種化合物都和過去所開發出的抑制劑相似，都具備疏水性的芳香環與極易形成氫鍵的官能基；而 NSC 401197 結構偏似於早期所開發出的藥物-三環類抗憂鬱藥物(tricyclic antidepressant; TCA)，而過去研究顯示，這類藥物因容易結合如血清素 2A(5-HT 2A)、組織胺 H1(histaminergic H1)、腎上腺素 α_1 (adrenergic α_1) 和毒蕈鹼 M1(muscarinic M1) 等受體上，故會造成許多副作用產生[8]；而另外

四種化合物中的NSC 618788、NSC 675821與NSC 278002具有鹵素官能基，而在過去設計選擇性血清素再活收抑制劑(selective serotonin re-uptake inhibitor; SSRI)藥物與設計選擇性正腎上腺素再活收抑制劑(norepinephrine re-uptake inhibitor; NRI)的研究顯示，具備鹵素的化合物除了可以抑制血清素再回收，而對於正腎上腺素再回收也有抑制的效果[8]，這種結合兩種神經傳導物質抑制效果的抑制劑科學家稱之為血清素與正腎上腺素再活收抑制劑(serotonin and norepinephrine re-uptake inhibitors; SNRIs)，但其選擇度較低便為一問題所在，而在未來計畫我們將繼續使用分子嵌合方法來確認其各篩選出的化合物與SERT結合力的穩定度。



圖十、經由虛擬篩選流程後五個具多樣性的化合物分子其分子結構圖。

六、結論

本計畫主要為運用電腦輔助藥物元件來搜尋具潛力的 SERT 抑制劑，我們主要使用了藥效基團與虛擬篩選兩大元件。計畫前半段為建立起合理的 SERT 藥效基團模型，我們考量多種會影響藥效基團的變因，如：測試組與訓練組的化合物數目、化學基團間的最

小 Interfeature 距離、最大數量化學基團與最小數量化學基團的數目，共設計了 12 組不同參數的藥效基團模型，每組軟體產生 10 組 Hypothesis。我們初步從總數 120 組 Hypothesis 中以軟體內定的評估標準決定出一組具可信的模型，為 Run1/Hypo1，並以測試組預測法、費雪亂數測定法與接收者操作特徵曲線法來做此模型的驗證。我們在這三種驗證方法中都得到好的驗證成果，故此模型我們將套用到虛擬篩選方法上。計畫的後半段為進行以藥效基團為基礎的虛擬篩選，我們以 NCI 化學分子資料庫並透過具系統性的篩選步驟最後挑選出五個化合物分子，並和過去文獻所開發出已知具抑制劑活性的結構特性相似。我們期望在未來計畫中進行分子嵌合實驗中，實際將這些分子群嘗試嵌合回 SERT 的結合區，以確認其結合能力。而本計劃所使用的模組除了可運用在本計劃的研究目標，將來也可以相同的策略套用在其他的藥物開發上。

肆、參考文獻

1. Yamashita A., Singh, S. K., Kawate T., Jin Y. And Gouaux E. *Nature*, 2005, 215-223
2. Simoni D., Rossi M., Bertolasi V., Roberti M., Pizzirani D., Rondanin R., Baruchello R., Invidiata F. P., Tolomeo M., Grimaudo S., Merighi S., Varani K., Gessi S., Borea P. A., Marino S., Cavallini S., Bianchi C. and Siniscalchi, A. *J Med Chem* 2005, 3347-3343
3. Middleton D. S., Andrews M., Glossop P., Gymer G., Jessiman A.,

- Johnson P. S., Mackenny M., Pitcher M. J., Rooker T., Stobie A., Tang K. and Morgan P. *Bioorg Med Chem Lett* 2006, 1434-1439
4. Deskus J. A., Epperson J. R., Sloan C. P., Cipollina J. A., Dextraze P., Qian-Cutrone J., Gao Q., Ma B., Beno B. R., Mattson G. K., Molski T. F., Krause R. G., Taber M. T., Lodge N. J. and Mattson R. *J. Bioorg Med Chem Lett* 2007, 3099-3104
 5. Mente S., Gallaschun R., Schmidt A., Lebel L., Vanase-Frawley M. and Fliri A. *Bioorg Med Chem Lett* 2008, 6088-6092
 6. Denhart D. J., Deskus J. A., Ditta J. L., Gao Q., Dalton King H., Kozlowski E. S., Meng Z., LaPaglia M. A., Mattson G. K., Molski T. F., Taber M. T., Lodge N. J., Mattson R. J. and Macor J. E. *Bioorg Med Chem Lett* 2009, 4031-4033
 7. Marquis R. W., Lago A. M., Callahan J. F., Rahman A., Dong X., Stroup G. B., Hoffman S., Gowen M., DelMar E. G., Van Wagenen B. C., Logan S., Shimizu S., Fox J., Nemeth E. F., Roethke T., Smith B. R., Ward K. W. and Bhatnagar P. *J Med Chem* 2009, 6599-6605
 8. Andersen J., Kristensen A. S., Bang-Andersen B. and Stromgaard K. *Chem Commun* 2009, 3677-3697