

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710195754.7

[51] Int. Cl.

C12Q 1/37 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/215 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月29日

[11] 公开号 CN 101418334A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 11/00 (2006.01)

[22] 申请日 2007.12.14

[21] 申请号 200710195754.7

[71] 申请人 清华大学

地址 100084 北京市清华园1号

共同申请人 南开大学

中国科学院生物物理研究所

[72] 发明人 饶子和 姜智勇 孙玉娜 马明

张妍 郭宇 张畅 薛飞

[74] 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司
代理人 李红团

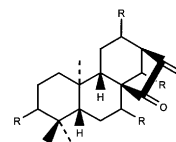
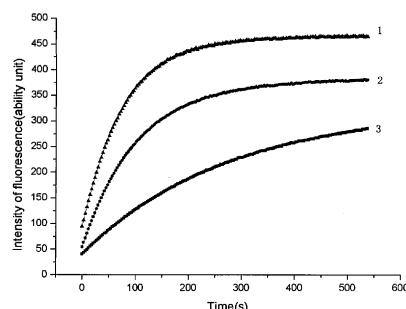
权利要求书3页 说明书20页 附图15页

[54] 发明名称

SARS 等冠状病毒主蛋白酶的二萜类天然产物抑制剂及其筛选方法

[57] 摘要

本发明提供了一种以 SARS、TGEV、AIBV 等冠状病毒主蛋白酶的体外抑制活性筛选和晶体结构为基础，从鄂西香茶菜中筛选二萜类天然产物抑制剂的方法。本发明发现具有下述结构通式的化合物能够有效抑制冠状病毒主蛋白酶的活性。



1、一种冠状病毒主蛋白酶抑制剂的筛选方法，其特征在于包括如下步骤：

A、将冠状病毒主蛋白酶的晶体与备选样品接触浸泡，得到冠状病毒主蛋白酶与小分子抑制剂复合体的晶体；

B：收集并分析步骤 A 中得到的复合体的晶体的 X 射线衍射数据，获得与冠状病毒主蛋白酶结合的小分子抑制剂的电子密度；

C：以步骤 B 中获得的与冠状病毒的主蛋白酶结合的小分子抑制剂的电子密度为基础，鉴定与冠状病毒主蛋白酶结合的小分子抑制剂，获得小分子抑制剂与冠状病毒主蛋白酶复合体的精细三维结构。

2、根据权利要求 1 所述的筛选方法，其特征在于在步骤 C 之后还包括步骤 D：测定小分子抑制剂对冠状病毒主蛋白酶的抑制活性。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的筛选方法，其特征在于其中所述的备选样品，是用如下方法制备：

(a)、取一定量的初级原料，用乙醇溶液回流提取，合并提取液，浓缩得浸膏；

(b)、称取一定量步骤(a)中所得的浸膏，用双蒸水悬浮，用有机溶剂萃取，分离有机溶剂相和水相；合并水相，备用；合并每次有机溶剂萃取物，蒸除其中的有机溶剂，得到干膏状有机溶剂相样品，备用；

(c)、蒸除步骤(b)中萃取后的水相部分的水中溶解的少量有机溶剂，用大孔树脂柱层析分离，依次用水和乙醇溶液为流动相洗脱；弃去水洗部分，蒸除乙醇溶液洗脱部分的溶剂，得干膏状样品备用；

(d)、上述步骤(b)中制得的干膏状有机溶剂相样品和步骤(c)中制得的干膏状样品即为源自一种初级原料的 2 个备选样品。

4、根据权利要求3所述的筛选方法，其特征在于步骤(a)中所述初级原料为鄂西香茶菜。

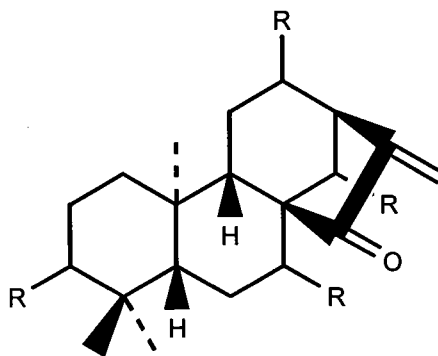
5、根据权利要求4所述的筛选方法，其特征在于所获得的复合体的晶体是王枣子甲素与 SARS 冠状病毒主蛋白酶复合物晶体。

6、根据权利要求4所述的筛选方法，其特征在于其中所述筛选出的小分子抑制剂是王枣子甲素。

7、鄂西香茶菜在制备治疗冠状病毒感染的药物中的用途。

8 根据权利要求7所述的用途，其中所述的冠状病毒为 SARS 冠状病毒、猪传染性胃肠炎病毒或者禽传染性支气管炎病毒。

9、下述通式 (I) 的化合物及其药学可接受的酸加成盐或溶剂化物在制备用于治疗或者预防冠状病毒感染的药物中的用途：



(I)

其中 R=H, OH, OAc, OCH₃, OCH₂CH₃, OCH(CH₃)₂, OXO，其中 OAc 代表乙酰氧基，OXO 代表此位置形成羰基。

10、权利要求9中化合物或其药学可接受的盐或溶剂化物与一种或多种药学可接受的载体组成的药物组合物在制备用于治疗或者预防冠状病毒感染的药物中的用途。

11、根据权利要求 9 或 10 所述的用途，其中所述的冠状病毒为 SARS 冠状病毒、猪传染性胃肠炎病毒或者禽传染性支气管炎病毒。

SARS 等冠状病毒主蛋白酶的二萜类天然产物抑制剂及其筛选方法

技术领域

本发明涉及药物的筛选，更具体而言，涉及以 SARS、TGEV、AIBV 等冠状病毒主蛋白酶的体外抑制活性筛选和晶体结构为基础，从鄂西香茶菜中筛选二萜类天然产物抑制剂的方法。

背景技术

SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) 为引起严重急性呼吸道综合症(非典型性肺炎)的简称，其病原体为冠状病毒属的一种病毒(Peiris J. et al. Lancet, 2003, 361: 1319-1325)。冠状病毒是正链 RNA 病毒。冠状病毒隶属于冠状病毒科。在目前已知的正链 RNA 病毒中，它们的基因组是最大的 (Siddell, S.G. 等人 Coronaviruses, toroviruses, and arteriviruses. in Topley & Wilson's Microbiology and Microbia Infections, 10th edition, Vol. Virology (eds. Mahy, B.W.J. & ter Meulen, V.) 823-856 (Hodder Arnold, London, 2005)。这个属含有约 26 个种；按照它们的自然宿主、基因序列以及血清型关系，这个属又可以分为三个组群：其中第一组群包括 TGEV, Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus (猪传染性胃肠炎病毒) 等；第二组群包括 SARS 冠状病毒等；第三组群包括 AIBV, Avian Infectious Bronchitis Virus (禽传染性支气管炎病毒) 等 (Spaan, W.J.M. and Cavanagh, D. Coronaviridae. in Virus taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. 945-62 (Elsevier-Academic Press., London, 2004)。

SARS 冠状病毒 2/3 到 3/4 的基因组编码了两个复制酶多蛋白(replicase polyproteins) pp1a 和 pp1ab(Ziebuhr, Snijder et al. 2000; Thiel, Herold et al. 2001; Anand, Yang et al. 2005; Ziebuhr 2005), 它们只有在病毒编码的蛋白酶切割成独立亚基之后才能使病毒完成正常转录、复制(Ziebuhr, Snijder et al. 2000; Anand, Yang et al. 2005; Bartlam, Yang et al. 2005)。SARS 冠状病毒主要蛋白酶(main protease, 简称主蛋白酶)在这个过程中起主要作用。如果能够抑制 SARS 冠状病

毒主蛋白酶的水解作用，那么将会有效地抵御 SARS 冠状病毒对人体的侵染。因此，SARS 冠状病毒的主蛋白酶是抗 SARS 药物筛选的一个主要靶标。

天然产物又称次级代谢产物 (Secondary Metabolites)，具有结构的多样性和生物活性的多样性。天然产物及其衍生物在以往的疾病治疗中发挥了无可限量的作用，也是当今药物研发过程中最具潜力的资源之一 (Newman DJ, Gragg GM, Snader KM. Nat Prod Rep, 2000, 17(3): 215-234; Lee K-H. J Nat Prod. 2004, 67(2): 273-283)。现在对中药等传统药物、海洋生物以及微生物代谢过程中的天然产物研究方兴未艾，每年都会有大量结构新颖的化合物被发现提供出来，这些新颖化合物是合成方法所无法实现的药物和药物先导化合物的重要源泉，在新药和先导化合物的发现中起着重要作用。对于天然产物尤其是来源于中药等的天然产物的研究是很有必要的，因为中药在我国已有数千年应用的历史，是一个小分子化合物的宝库，因此从中药等天然产物中进行重要病毒或重要疾病相关靶蛋白抑制剂的筛选是很有必要的。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种能够有效抑制冠状病毒主蛋白酶活性的中药小分子抑制剂。

本发明的又一个目的是提供所述中药小分子抑制剂在制备用于治疗或者预防冠状病毒感染的药物中的用途。

本发明的另一个目的是提供一种筛选冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法。

本发明提供的一种筛选冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法包括如下步骤：

A、将冠状病毒主蛋白酶的晶体与备选样品接触浸泡，得到冠状病毒主蛋白酶与小分子抑制剂复合体的晶体。

B、收集并分析步骤 A 中得到的复合体的晶体的 X 射线衍射数据，获得与冠状病毒主蛋白酶结合的小分子抑制剂的电子密度。

C、以步骤 B 中获得的与冠状病毒的主蛋白酶结合的小分子抑制剂的电子密度为基础，鉴定与冠状病毒主蛋白酶结合的小分子抑制剂，获得小分子抑制剂与冠状病毒主蛋白酶复合体的精细三维结构。

D、测定小分子抑制剂对冠状病毒主蛋白酶的抑制活性。

本发明所用的备选样品，优选如下方法制备：

(a)、取一定量的初级原料，用乙醇溶液回流提取，合并提取液，浓缩得浸膏；

(b)、称取一定量步骤(a)中所得的浸膏，用双蒸水悬浮，用有机溶剂萃取，分离有机溶剂相和水相；合并水相，备用；合并每次有机溶剂萃取物，蒸除其中的有机溶剂，得到干膏状有机溶剂相样品，备用；

(c)、蒸除步骤(b)中萃取后的水相部分的水中溶解的少量有机溶剂，用大孔树脂柱层析分离，依次用水和乙醇溶液为流动相洗脱；弃去水洗部分，蒸除乙醇溶液洗脱部分的溶剂，得干膏状样品备用；

(d)、上述步骤(b)中制得的干膏状有机溶剂相样品和步骤(c)中制得的干膏状样品即为源自一种初级原料的 2 个备选样品。

本发明中所用的初级原料优选为鄂西香茶菜。

本发明的鄂西香茶菜各备选样品可采用如下方法制备：

取 500 克干燥粉碎的鄂西香茶菜药材，用 4500 毫升 95%乙醇回流提取，提取 3 次，每次 2 小时，合并提取液，浓缩得浸膏。

称取此浸膏 20.5 克，用 150 毫升双蒸水悬浮，倾入 1000 毫升分液漏斗中，用乙酸乙酯萃取 3 次，每次萃取用乙酸乙酯 650 毫升，充分振摇，静置 6-10 小时分层。萃取后得到乙酸乙酯相和水相。乙酸乙酯萃取物用 EYELA N1001 型旋转蒸发仪蒸除溶剂，得干膏状鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品，备用。

萃取后的水相部分用 EYELA N1001 型旋转蒸发仪蒸除水中溶解的少量乙

酸乙酯，用 HP-20 型大孔树脂柱层析分离(大孔树脂用 170 毫升，玻璃柱规格 30×300 mm)，依次用水、50%乙醇为流动相洗脱。先用水洗脱 8 次，每次洗脱 250 毫升，弃去水洗部分。然后用 50%乙醇洗脱 5 次，每次洗脱 300 毫升，合并各次 50%乙醇洗脱得到的洗脱液。将 50%乙醇洗脱部分使用 EYELA N1001 型旋转蒸发仪蒸除溶剂，得干膏状鄂西香茶菜水相大孔树脂 50%乙醇洗脱样品，备用。

上述乙酸乙酯萃取样品和水相大孔树脂 50%乙醇洗脱样品即为鄂西香茶菜对 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性的备选样品。

步骤 B 中晶体的 X 射线衍射数据收集与整理可采用如下方法：

首先使用 Hampton Research 公司的尼龙晶体环，从晶体浸泡液中获取浸泡一定时间（浸泡时间控制在 2—48 小时之间）的晶体，并迅速使用 Rigaku 公司的冷却系统或 Oxford Cyrosystem 公司的冷却系统，将晶体在以上所述的两种冷冻系统产生的低温氮气流中冷冻至零下 150°C—180 °C；使 X 射线通过晶体，使用旋转法收集 X 射线衍射数据。

在收集到将靶标蛋白质的晶体与天然产物混合物备选样品接触后的晶体的 X 射线衍射数据后，需要按照下述步骤进行相应的数据处理：

首先，使用 HKL2000 等（包括 Mosflm、D*trek 等）衍射数据处理程序包等本领域已知的常用的数据处理的方法，对上一步骤中收集得到的衍射数据进行处理，获得完整的数据文件；

其次，使用 CNS 或者 CCP4 程序包中的 Phaser、Molrep 等各种分子置换（Molecular Replacement）程序等本领域已知的常用的数据处理方法，利用分子置换（Molecular Replacement）的方法，以靶标蛋白的母体晶体结构为初始模型，得到候选的靶标蛋白与靶分子的复合体的精细三维结构；

再次，使用程序 O、COOT、XtalView 等可视化程序包等本领域已知的常用的数据处理的方法，观测可能的靶标蛋白与抑制剂或者配体小分子复合体的电

子密度。如果此时发现，在靶标蛋白相应的活性位点，有不属于蛋白质分子本身的、不属于溶剂分子的、不属于结晶溶液中存在的分子的未知电子密度存在，并且该电子密度与靶标蛋白的活性位点的氨基酸有产生包括氢键作用、共价作用等在内合理的化学环境，则可以确认此天然产物混合物备选样品中，有抑制剂小分子等配体分子与靶标蛋白结合。

本发明中的冠状病毒包括 SARS 冠状病毒、猪传染性胃肠炎病毒或者禽传染性支气管炎病毒。本发明还对鄂西香茶菜各分离段位（即用萃取、大孔树脂等方法分离得到的各个部分的样品）、王枣子甲素进行了 TGEV、AIBV 等冠状病毒主蛋白酶的体外抑制活性测定。

由于鄂西香茶菜中所含的成分是相当复杂的，因此必须对其粗提物进行优化，目的是去除对 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外活性测定和晶体浸泡实验中的干扰因素如蛋白、多糖等，保留成药性较好的小分子并使之尽量集中，提高其相对浓度，以制备适用于以 SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体结构为基础进行抑制剂筛选的备选样品。本发明不仅提供了可以实现这一目的制备备选样品的技术方案，而且对筛选有抑制活性的样品，用各种色谱、波谱方法分离、鉴定了其中小分子抑制剂-王枣子甲素的结构。

目前，基于SARS冠状病毒主蛋白酶晶体结构为基础进行的药物筛选，所发现的小分子抑制剂绝大多数为SARS冠状病毒主蛋白酶底物类似物及其衍生物（Dariusz P., Marcin H., Marcin G., et al. *Chem. Biol. Drug. Res.*, 2007, 69: 269-279; Haitao Y., Wenqing X., Xiaoyu X., et al. *PLOS Biology*, 2005, 3 (10): 1742-1752），这类多肽类抑制剂不仅造价昂贵，而且口服利用度低，在血液中的半衰期短，对制服SARS感染发病带来了难度。本发明筛选出的抑制剂-王枣子甲素，为不含肽键的二萜类天然产物，其在20 μM 的浓度时仍对SARS冠状病毒主蛋白酶显示出较强的抑制活性，是极好的药物或潜在的药物前体。另外，我们通过分析SARS冠状病毒主蛋白酶与王枣子甲素结晶复合物的精细三维结构发现，与王枣子甲

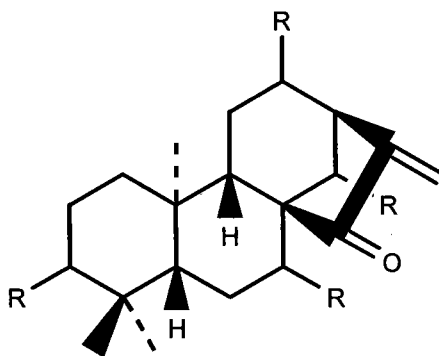
素结构类似的一些二萜类化合物会结合在SARS冠状病毒主蛋白酶的活性位点，从而产生抑制活性。这为进一步的药物设计和筛选提供了宝贵的依据和参考。

本发明发现王枣子甲素是能够有效抑制 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性的抑制剂。

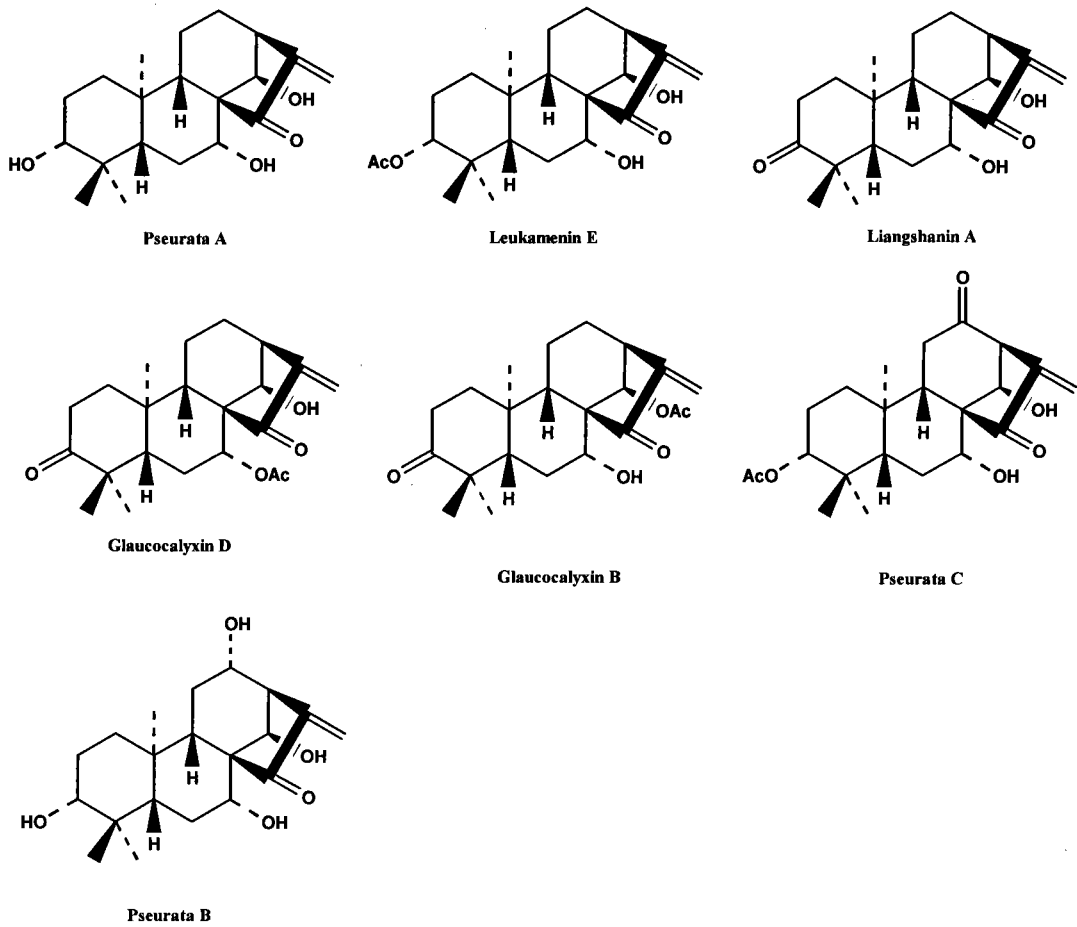
本发明发现鄂西香茶菜可治疗冠状病毒如 SARS 冠状病毒、猪传染性胃肠炎病毒或者禽传染性支气管炎病毒感染。

本发明发现王枣子甲素可治疗或者预防冠状病毒如 SARS 冠状病毒、猪传染性胃肠炎病毒或者禽传染性支气管炎病毒感染。

本发明发现具有下结构通式 (I) 的化合物能与 SARS 冠状病毒主蛋白酶结合并产生抑制作用。下结构通式 (I) 的化合物或其药学可接受的盐或溶剂化物与一种或多种药学可接受的载体组成的药物组合物可用于治疗或者预防冠状病毒如 SARS 冠状病毒、猪传染性胃肠炎病毒或者禽传染性支气管炎病毒感染。



其中 R=H, OH, OAc, OCH₃, OCH₂CH₃, OCH(CH₃)₂, OXO (其中 OAc 代表乙酰氧基, OXO 代表此位置形成羰基)。查阅文献, 符合上列通式的已发现的天然产物有下列结构:



附图说明

图 1 为本发明的鄂西香茶菜筛选样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性抑制曲线图。样品浓度： $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。1：对照（不加入任何样品的 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性曲线）2：鄂西香茶菜水相大孔树脂 50% 乙醇洗脱样品对 SARS 主蛋白酶的活性抑制曲线 3：鄂西香茶菜总提取物样品对 SARS 主蛋白酶的活性抑制曲线 4：鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品对 SARS 主蛋白酶的活性抑制曲线

图 2 为本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性位点附近的电子密度对比图。左边显示了 SARS 冠状病毒主蛋白酶母体晶体活性位点的电子密度；右边显示了 SARS 冠状病毒主蛋白酶与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品浸泡后的晶体活性位点的电子密度。图中所示的电子密度，黑色为 $2f\sigma_c$ 电子密度，为 1.0 sigma；红色为 $1f\sigma_c$ 差值电子密度，为 2.5 sigma

图 3 显示了本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物分段样品 a1 浸泡后的晶体活性位点的电子密度。

图 4 显示了本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物分段样品 a2 浸泡后的晶体活性位点的电子密度。

图 5 显示了本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物分段样品 a3 浸泡后的晶体活性位点的电子密度。

图 6 显示了本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物分段样品 a4 浸泡后的晶体活性位点的电子密度。

图 7 显示了本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物分段样品 a5 浸泡后的晶体活性位点的电子密度。

图 8 显示了本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物分段样品 a6 浸泡后的晶体活性位点的电子密度。

图 9 显示了本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物分段样品 a7 浸泡后的晶体活性位点的电子密度。

图 10 为本发明的鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物分段样品 a3 和 a4 合并部分的 HPLC 色谱图。

图 11 为本发明的化合物 1 的 ESIMS 图。

图 12 为本发明的化合物 1 的 ^1H NMR 谱。

图 13 为本发明的化合物 1 的 ^{13}C NMR 谱。

图 14 为本发明的化合物 1 的 HMQC 谱。

图 15 为本发明的化合物 1 的 HMQC 谱部分截图。

图 16 为本发明的化合物 1 的 HMBC 谱。

图 17 为本发明的化合物 1 的 HMBC 谱部分截图。

图 18 为本发明的王枣子甲素对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性抑制曲线图。1: 对照（不加入任何样品的 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性曲线）；2: $20\mu\text{M}$ 的王

枣子甲素对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性抑制曲线；3: 200 μ M 的王枣子甲素对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性抑制曲线。

图 19 显示了本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶与化合物 1（王枣子甲素）浸泡后的晶体活性位点的电子密度。图中所示的电子密度，黑色为 $2fofc$ 电子密度，为 1.0σ ；红色为 $1fofc$ 差值电子密度，为 2.5σ 。

图 20 为本发明的王枣子甲素与 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性位点 Cys145 残基形成共价键的图。蛋白质分子用白色飘带图表示，活性位点的 Cys145 残基与王枣子甲素形成共价键用球棍模型表示；蓝色表示王枣子甲素的电子密度。

图 21 本发明的王枣子甲素对猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）的主蛋白酶的活性抑制曲线图。1: 对照（不加入任何样品的 TGEV 主蛋白酶的活性曲线）；2: 100 μ M 的王枣子甲素对 TGEV 主蛋白酶的活性抑制曲线。

图 22 本发明的王枣子甲素对禽传染性支气管炎病毒（AIBV）的主蛋白酶的活性抑制曲线图。1: 对照（不加入任何样品的 AIBV 主蛋白酶的活性曲线）；2: 100 μ M 的王枣子甲素对 AIBV 主蛋白酶的活性抑制曲线。

图 23 为本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶与王枣子甲素的结合位点图。其中王枣子甲素 17 位的碳原子与 SARS 冠状病毒主蛋白酶的 145 位半胱氨酸形成共价键，王枣子甲素 12 位碳原子上的氢与 SARS 冠状病毒主蛋白酶的 141 位亮氨酸和 144 位的丝氨酸形成氢键。

为了更加详细地解释本发明，下面将结合附图给出本发明的具体实施例。应当理解，下述实施例仅仅是用于解释本发明，而不应当理解为以任何方式限制本发明的范围。

具体实施方式

1. SARS 冠状病毒主蛋白酶的表达、纯化和晶体生长

将 SARS 冠状病毒主蛋白酶在大肠杆菌菌株 BL21(DE3)中进行进一步分离纯化和结晶（参见：Yang H et al. 2003. The Crystal Structures of SARS Virus Main Protease Mpro and Its Complex with an Inhibitor. *PNAS*, 100(23): 13190-13195）。

2. 鄂西香茶菜备选样品的制备

取 500 克干燥粉碎的鄂西香茶菜药材，用 4500 毫升 95%乙醇回流提取，提取 3 次，每次 2 小时，合并提取液，浓缩得浸膏。

称取此浸膏 20.5 克，用 150 毫升双蒸水悬浮，倾入 1000 毫升分液漏斗中，用乙酸乙酯萃取 3 次，每次萃取用乙酸乙酯 650 毫升，充分振摇，静置 6-10 小时分层。萃取后得到乙酸乙酯相和水相。乙酸乙酯萃取物用 EYELA N1001 型旋转蒸发仪蒸除溶剂，得干膏状鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品，备用。

萃取后的水相部分用 EYELA N1001 型旋转蒸发仪蒸除水中溶解的少量乙酸乙酯，用 HP-20 型大孔树脂柱层析分离(大孔树脂用 170 毫升，玻璃柱规格 30×300 mm)，依次用水、50%乙醇为流动相洗脱。先用水洗脱 8 次，每次洗脱 250 毫升，弃去水洗部分。然后用 50%乙醇洗脱 5 次，每次洗脱 300 毫升，合并各次 50%乙醇洗脱得到的洗脱液。将 50%乙醇洗脱部分使用 EYELA N1001 型旋转蒸发仪蒸除溶剂，得干膏状鄂西香茶菜水相大孔树脂 50%乙醇洗脱样品，备用。

上述乙酸乙酯萃取样品和水相大孔树脂 50%乙醇洗脱样品即为鄂西香茶菜对 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性的筛选样品。

3. 鄂西香茶菜备选样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制活性测定

SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性测定是使用荧光底物 MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH₂（纯度大于 95%，上海吉尔生化有限公司）来完成的。该荧光底物的氨基酸序列来源于 SARS 冠状病毒主蛋白酶的 N 端自剪切序列。

用于荧光强度测定的仪器为 Fluoraskan Ascent 荧光仪 (ThermoLabsystems, Helsinki, Finland), 激发光和发射光的波长分别为 320 nm 和 405 nm。

将步骤 2 中制备的 2 个干膏状的自然产物混合物备选样品溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 使其终浓度为 50 mg/mL, 分别制得 2 个天然产物混合物备选样品的 DMSO 溶解物。

在缓冲溶液 (50mM Tris-HCl (pH 7.3), 1mM EDTA 中加入 SARS 冠状病毒主蛋白酶 (终浓度 0.5 μ M), 加入上述天然产物混合物备选样品的 DMSO 溶解物 (如鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品的 DMSO 溶解物) 使其终浓度为: 100 μ g/mL, 上文中 SARS 冠状病毒主蛋白酶的荧光底物浓度为 20 μ M, 298 K 放置 10 分钟后, 迅速加入荧光标记底物 (MCA-AVLQ↓SGFRL(DNP)L-NH₂, 终浓度 20 μ M)。激发波长和发射波长分别为 320 nm 和 405 nm, 温度保持 298 K, 每 2 秒钟记录一次荧光读数。

对照: 不加入备选样品, 其余条件相同。结果示于图 1 中。由图 1 可知鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物具有较强的抑制活性, 说明鄂西香茶菜中的小分子抑制剂主要存在于乙酸乙酯萃取样品中。

4、SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体浸泡鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品

由于用于 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂筛选的中药等天然产物混合物备选库中的每一个样品都含有许多种天然产物小分子 (因此, 将其称为天然产物混合物备选样品), 若采用共结晶的方法, 对 SARS 冠状病毒主蛋白酶结晶体系的影响较大, 无法获得衍射质量好、数量充足的 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体, 甚至可能无法生长晶体, 因此, 主要采用晶体浸泡的方法来获得 SARS 冠状病毒主蛋白酶与小分子抑制剂复合体的晶体。

为了尽可能的在保证晶体质量的基础上, 提高浸泡时鄂西香茶菜乙酸乙酯样品中小分子化合物的浓度, 可以采用如下两种方法制备 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体浸泡液:

方法一、将鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品的 DMSO 溶解物（按照步骤 3 中的方法制备）10 倍稀释至 SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体生长池液（1.8~12% 的 PEG 6000, 3% 二甲基亚砷（DMSO），1mM DTT, 100 mM MES 缓冲液（pH 5.0~PH6.0））中，以 13000—15000rpm 高速离心，之后取上清液，得浸泡液 1，备用；

方法二、将干膏状的鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品直接溶解于 SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体生长池液（1.8~12% 的 PEG 6000, 3% 二甲基亚砷（DMSO），1mM DTT, 100 mM MES 缓冲液（pH 5.0~PH6.0））中，以 13000—15000rpm 高速离心，之后取上清液，得浸泡液 2，备用；

为了保证晶体浸泡时，不至于使鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品中的小分子化合物浓度过高而影响晶体的衍射质量，将浸泡液 1 和 2 分别稀释至原液浓度的 10 倍，备用。

浸泡时，利用尼龙晶体环等工具，将已生长好的 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体从结晶池液中取出，分别加入浸泡液 1 和 2 中以及相应的 10 倍稀释液中，浸泡 2—48 小时。

5. 晶体衍射数据的收集和分析

在步骤 4 的基础之上，使用具备较好衍射能力(分辨率优选大于 2.6Å)的晶体，进行 X 射线衍射数据的收集和分析。

进行数据收集时，首先使用 Hampton Research 公司的尼龙晶体环，从浸泡液 1 和浸泡液 2 中获取浸泡一定时间（通常为 2—48 小时）的晶体；并迅速使用 Rigaku 公司的冷却系统或 Oxford Cyrosystem 公司的冷却系统，将晶体在上述的冷冻系统产生的低温氮气流中冷冻至零下 150°C-180°C；使 X 射线通过晶体，使用螺旋法收集 X 射线衍射数据。

选择衍射质量好的晶体（分辨率优选大于 2.6Å）进行数据收集、处理，检测是否有小分子的结合。数据收集的统计如下表 1：

表 1: SARS 冠状病毒主蛋白酵母体、SARS 冠状病毒主蛋白酶与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物样品浸泡后的复合体数据收集统计

统计参数	SARS 冠状病毒主蛋白酵母体晶体	SARS 冠状病毒主蛋白酶与川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品浸泡后的晶体 (复合体)
空间群	C2	C2
晶胞参数 (Å, °)	a = 108.4 b = 81.8 c = 53.6 β = 104.7	a = 107.8 b = 82.5 c = 52.9 β = 104.9
分辨率 (Å)	50-1.50 (1.55-1.50)	50.0-2.6 (2.6-2.7)
所有衍射点	219,294	63,908
独立衍射点	63,241	9,039
冗余度	3.5 (2.5)	7.1 (6.4)
I/σ (I)	30.4 (2.0)	13.9 (3.1)
Rmerge (%)	3.8 (28.6)	5.9 (47.9)
完整度 (%)	87.7 (40.6)	98.1 (97.4)

通过观察相同角度的 SARS 冠状病毒主蛋白酵母体和复合体的活性位点电

子密度图(图2)(黑色是蛋白质本身的电子密度),可以发现,在复合体的活性位点能够观察到清晰的非蛋白质本身的电子密度(红色表示),表明可能有小分子化合物结合在蛋白质分子上。左边图显示的是 SARS 冠状病毒主蛋白酶母体结构的活性位点附近的电子密度,右边图为 SARS 冠状病毒主蛋白酶与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品浸泡后晶体活性位点附近的电子密度。

仔细观察复合体的活性位点的电子密度,我们可以发现存在于鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物样品中的未知小分子的电子密度与 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性位点处 Cys145 的电子密度紧密结合在一起,提示我们这应该是小分子与 Cys145 的 γ 硫原子形成了共价键,从而抑制了 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性。

6. 结合小分子的分析与鉴定

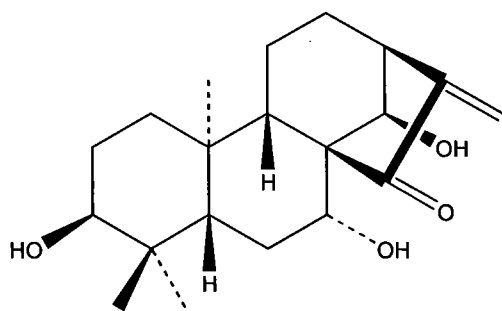
为了确定存在于鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物样品中的未知小分子抑制剂的化学结构,我们重新对鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物样品进行了分析处理。具体步骤如下:

将鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物(9.2克)用甲醇溶解,拌入25克硅胶(柱层析160-200目),用硅胶柱色谱进行分离(180克柱层析硅胶160-200目),以氯仿-丙酮系统为流动相,分别以氯仿、氯仿-丙酮(30:1)、氯仿-丙酮(20:1)、氯仿-丙酮(15:1)、氯仿-丙酮(10:1)、氯仿-丙酮(7:1)、丙酮进行洗脱,每个梯度洗脱5-10个保留体积。以薄层色谱检测,合并组成相似的接收部分。其中氯仿-丙酮(30:1)洗脱部分经薄层色谱检测含有较多10%硫酸乙醇溶液加热显色的斑点,并且除去了大部分色素。将此氯仿-丙酮(30:1)洗脱部分继续用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析分离,以氯仿-甲醇(1:1)为流动相洗脱,共接收合并了7个部分:a1-a7。

将 a1-a7 每个部分分别与 SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体接触,并进行 X 射线衍射,对数据进行收集处理,得到 7 份 SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体活性位点附近的电子密度图(参见图 3-图 9)。由图 3-图 9 可知:a3 和 a4 部分主要含

有具抑制活性的小分子，故将 a3 和 a4 两部分合并，用 HPLC 进行分析（色谱柱：YMC ODS-A, 150×4.6 mm, 10 μm，分析条件：0-10 分钟，甲醇-水（50:50）洗脱；10-25 分钟，甲醇-水（50:50→75:25）梯度洗脱；25-40 分钟，甲醇-水（75:25→100:0）梯度洗脱），分析结果见图 10。

由图 10 可知，保留时间最长的色谱峰所对应的化合物（编为化合物 1），是 a3 和 a4 合并部分中主要所含的化合物，由于酶活筛选样品在很低的浓度下就表现出较强的抑制活性，很可能化合物 1 就是 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂。将 a3 和 a4 合并部分用半制备型 HPLC（色谱柱：YMC ODS-A, 150×10 mm, 10 μm）分离，以甲醇-水（44:56）为流动相洗脱，得到纯品化合物 1（3 毫克）。化合物 1 的化学结构经综合运用各种波谱学数据（包括 ORD, ESIMS, ¹H NMR, ¹³C NMR, HMQC, HMBC，见图 11-图 17）鉴定为 3β, 7α, 14β-三羟基-对映-贝壳杉-16-烯-15-酮，即王枣子甲素（wangzaozin A）。化合物 1 的结构和波谱数据归纳如下：



化合物 1：白色无定型固体， $[\alpha]_D^{20} -61.6^\circ$ (c 0.10, MeOH)；

ESIMS m/z 357 $[M + Na]^+$, 691 $[2M + Na]^+$, 1025 $[3M + Na]^+$ ；

¹H NMR (MeOH- d_4 , 500 MHz) δ 6.03 和 5.35 (each 1H, br s, H₂-17), 4.83 (1H, H-14), 4.14 (1H, dd, $J = 11.5, 4.0$ Hz, H-7), 3.31 (1H, br s, H-3), 1.06 (3H, s, Me-20), 0.92 (3H, s, Me-18), 0.84 (3H, s, Me-19)；

¹³C NMR (MeOH- d_4 , 125 MHz) δ 33.9 (C-1), 26.3 (C-2), 76.5 (C-3), 40.8 (C-4), 47.6 (C-5), 29.5 (C-6), 75.4 (C-7), 62.4 (C-8), 56.1 (C-9), 38.4 (C-10), 18.3

(C-11), 32.3 (C-12), 47.2 (C-13), 76.1 (C-14), 208.8 (C-15), 149.7 (C-16), 117.7 (C-17), 29.1 (C-18), 22.6 (C-19), 18.4 (C-20);

其 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 数据与王枣子甲素数据（王先荣，王兆全，石鹏程等。王枣子的新二萜-王枣子甲素。安徽医学，1982，2：50-53）完全一致。

7、王枣子甲素对 SARS 冠状病毒的主蛋白酶抑制活性的测定

我们使用分离得到的纯品化合物小分子（王枣子甲素）（其来源如果是特殊的，比如某个厂家哪年的商品，请注明），测定了其对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性。王枣子甲素对 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制活性的测定按照如下步骤进行：在缓冲溶液（50mM Tris-HCl（pH 7.3），1mM EDTA（含或不含 DTT））中加入 SARS 冠状病毒主蛋白酶（终浓度 0.5 μM ），王枣子甲素（终浓度为：200 μM ），SARS 冠状病毒主蛋白酶的荧光底物浓度为 20 μM ，298 K 放置 10 分钟后，迅速加入荧光标记底物（MCA-AVLQ↓SGFRL(DNP)L-NH₂，终浓度 20 μM ）。激发波长和发射波长分别为 320 nm 和 405 nm，温度保持 298 K，每 2 秒钟记录一次荧光读数。然后又在 20 μM 测定其对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性。对照：不加入备选样品，其余条件相同。活性测定结果见图 18。从图 18 中可以发现，200 μM 的王枣子甲素对 SARS 冠状病毒主蛋白酶具有较强的抑制活性，当其浓度为 20 μM 时对 SARS 冠状病毒主蛋白酶仍然有抑制活性。这就说明中药鄂西香茶菜里面含有的王枣子甲素能够有效的抑制 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性、王枣子甲素为治疗 SARS 冠状病毒的有效药物。

王枣子甲素与 SARS 冠状病毒主蛋白酶复合物晶体经 X 射线衍射，对数据进行收集处理后发现，与鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取物和 SARS 冠状病毒主蛋白酶复合物晶体一样，在复合体的活性位点能够观察到清晰的非蛋白质本身的电子密度（图 19-20），并且小分子的电子密度与 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性位点处 Cys145 的电子密度紧密结合在一起，表明这应该是王枣子甲素与 Cys145 的 γ 硫原子形成了共价键，从而抑制了 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性

8、王枣子甲素对猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 的主蛋白酶抑制活性的测定

在缓冲液 (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM DTT) 中, 加入猪传染性胃肠炎病毒的主蛋白酶 (0.5 μM), 王枣子甲素 (20 μM), 298 K 放置 10 分钟后, 迅速加入荧光标记底物 (MCA-AVLQSGFRL(DNP)L-NH₂, 20 μM)。激发波长和发射波长分别为 320 nm 和 405nm, 温度保持 298 K, 每 2 秒钟记录一次荧光读数。然后改变抑制剂浓度, 在 200 μM 下测定抑制活性。对照: 不加入抑制剂, 其余条件相同。结果示于图 21 中。

TGEV 的表达纯化参考文献: Conservation of substrate specificities among coronavirus main proteases. J. Gen. Virol. 2002; 83(Pt 3): 595-9。

9. 王枣子甲素对禽传染性支气管炎病毒 (AIBV) 的主蛋白酶抑制活性的测定

在缓冲液 (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM DTT) 中, 加入禽传染性支气管炎病毒的主蛋白酶 (1 μM), 王枣子甲素 (100 μM), 298 K 放置 10 分钟后, 迅速加入荧光标记底物 (MCA-AVLQSGFRL(DNP)L-NH₂, 20 μM)。激发波长和发射波长分别为 320 nm 和 405 nm, 温度保持 298 K, 每 2 秒钟记录一次荧光读数。然后改变抑制剂浓度, 在 10 μM 下测定抑制活性。对照: 不加入抑制剂, 其余条件相同。结果示于图 22 中。

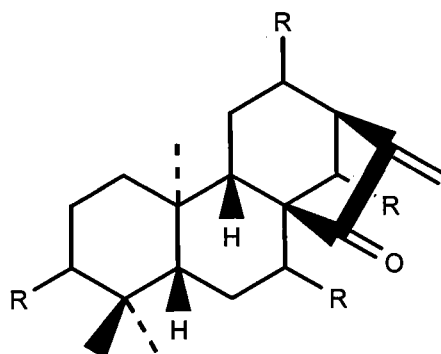
AIBV 的表达纯化参考文献: Preliminary crystallographic analysis of avian infectious bronchitis virus main protease. Acta. Cryst. F. 2007; 63(Pt1): 24-6。

由图 18、图 21 和图 22 可以看出, 王枣子甲素对 SARS、TGEV、AIBV 的主蛋白酶都有抑制活性, 其中对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性最强。由于 TGEV 属于冠状病毒属的第一组群, SARS 冠状病毒属于冠状病毒属的第二组群, AIBV 属于冠状病毒属的第三组群。因此, 可以推测出王枣子甲素对整个冠状病毒家族的主蛋白酶都有抑制活性。

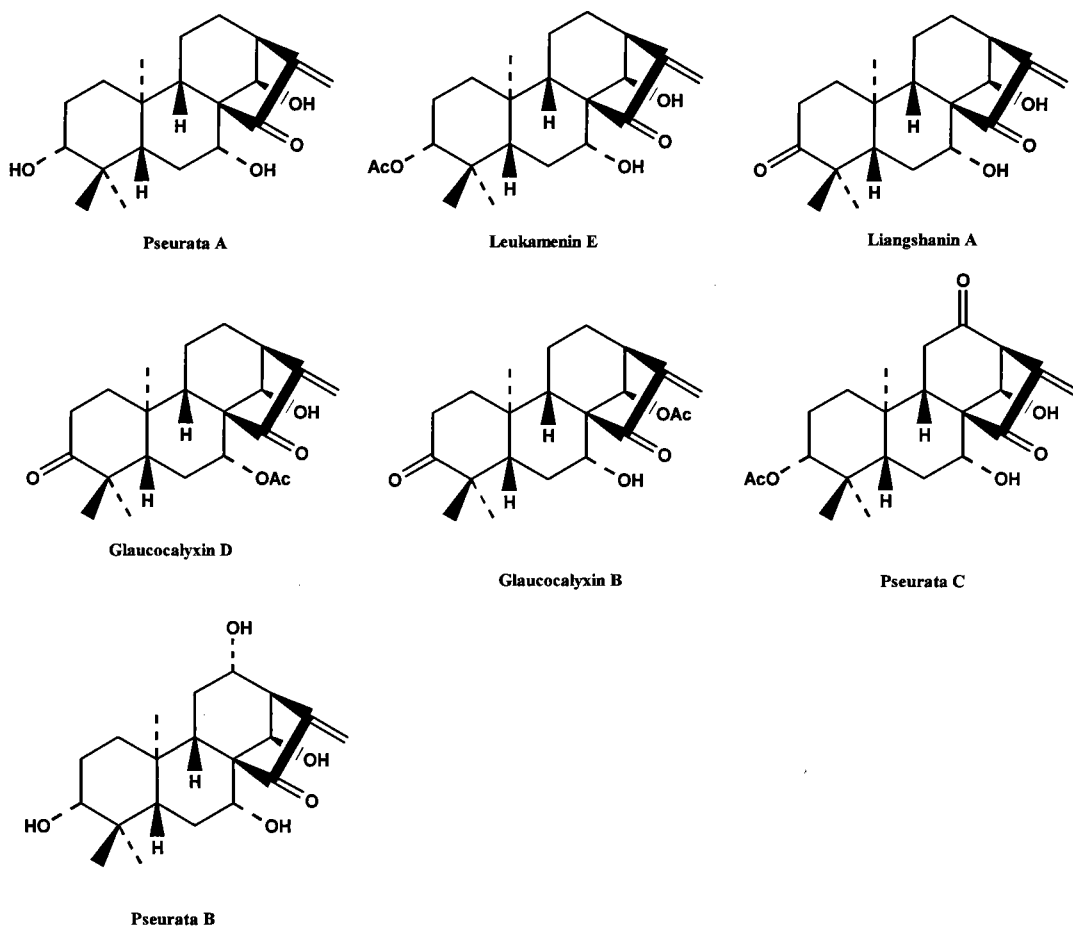
10、基于王枣子甲素与 SARS 冠状病毒主蛋白酶复合物精细三维结构, 进行类

似二萜类化合物的药物设计

通过仔细分析王枣子甲素与 SARS 冠状病毒主蛋白酶复合物精细三维结构，我们得到了 SARS 冠状病毒主蛋白酶与王枣子甲素的结合位点图（图 23）。其中王枣子甲素 17 位的碳原子与 SARS 冠状病毒主蛋白酶的 145 位半胱氨酸形成共价键，王枣子甲素 12 位碳原子上的氢与 SARS 冠状病毒主蛋白酶的 141 位亮氨酸和 144 位的丝氨酸形成氢键。由于 145 位半胱氨酸是 SARS 冠状病毒主蛋白酶行使功能的催化二体之一，因此两者的此种作用不仅导致了 145 位半胱氨酸催化作用的失活，而且 12 位碳原子上的氢与蛋白质其他残基的氢键作用使王枣子甲素更加紧密地结合在 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性口袋，最终导致了 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性的抑制。可以合理地推断，具有与王枣子甲素类似结构的此类对映-贝壳杉二萜化合物，也具有相似甚至更强的抑制作用。因此，根据图 23 对类似王枣子甲素的对映-贝壳杉二萜化合物抑制活性，可以得出下列结论：由于要与 145 位半胱氨酸形成共价键， α , β -不饱和酮（即 15 位的羰基和 16, 17 位的双键）的结构是必需的；12 位如果有含氧取代，如羟基和羰基，可能会更容易与 141 位亮氨酸的羰基或 144 位丝氨酸的羟基形成氢键；由于王枣子甲素结构中的其它部分尤其是离蛋白残基空间距离较远的部分未能与蛋白残基产生作用，因此 3 位、7 位和 14 位的取代基可以有细小的变化并不影响抑制活性。根据上述结论，可以写出下列结构通式 (I)



其中 R=H, OH, OAc, OCH₃, OCH₂CH₃, OCH(CH₃)₂, OXO (其中 OAc 代表乙酰氧基, OXO 代表此位置形成羰基)。查阅文献,符合上列通式的已发现的天然产物有下列结构:



本文中所涉及的各种实验用品(包括但不限于:化学试剂、生物制品、细胞、生物体、仪器等)之中,对于那些特殊的或不易获得的,文中均已注明了制造商、参考文献或详细的制备方法;未经特别说明的,均为常规实验用品,在本申请日之前,可以通过各种方式(例如购买、自行制备等)很方便地获得。

应当理解,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,本领域的普通技术人员可以在形式和细节上对其做出各种改变和改进,而这些均被认为落入本发明的保护范围中。

应该指出的是，上列已发现的天然产物和符合上述通式的化合物与 SARS 冠状病毒主蛋白酶结合并产生抑制作用，因此应当理解，它们都应落入本发明的保护范围之内。

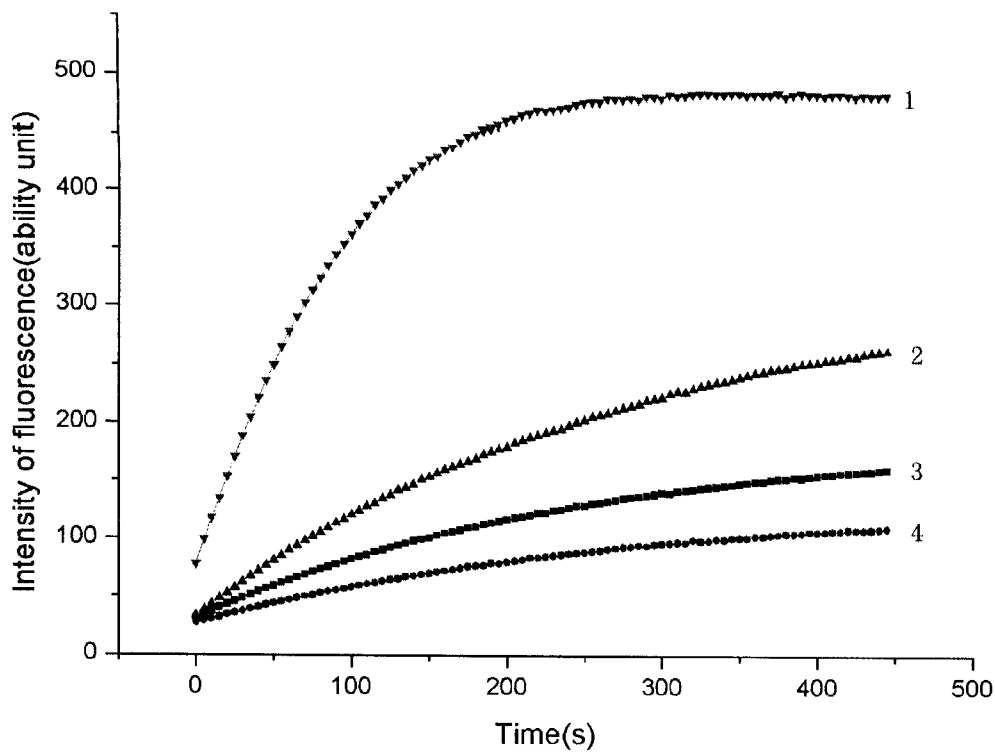


图 1

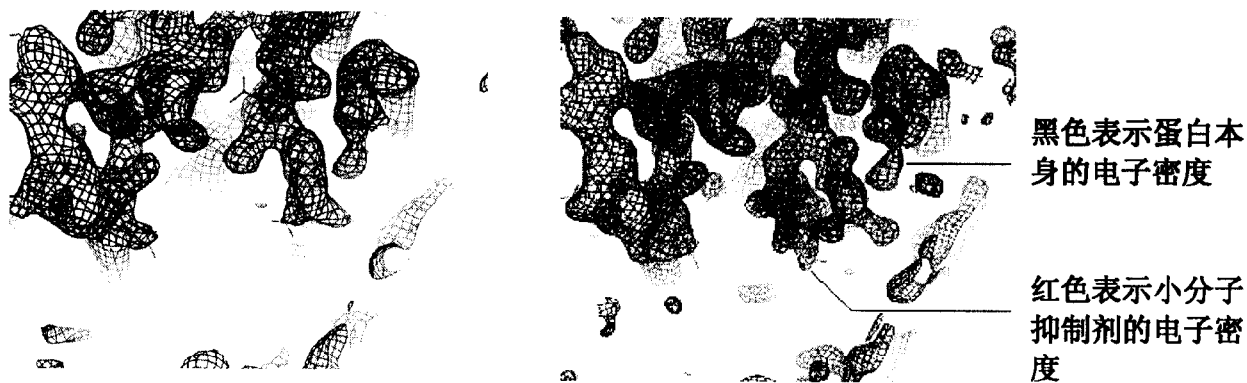


图 2

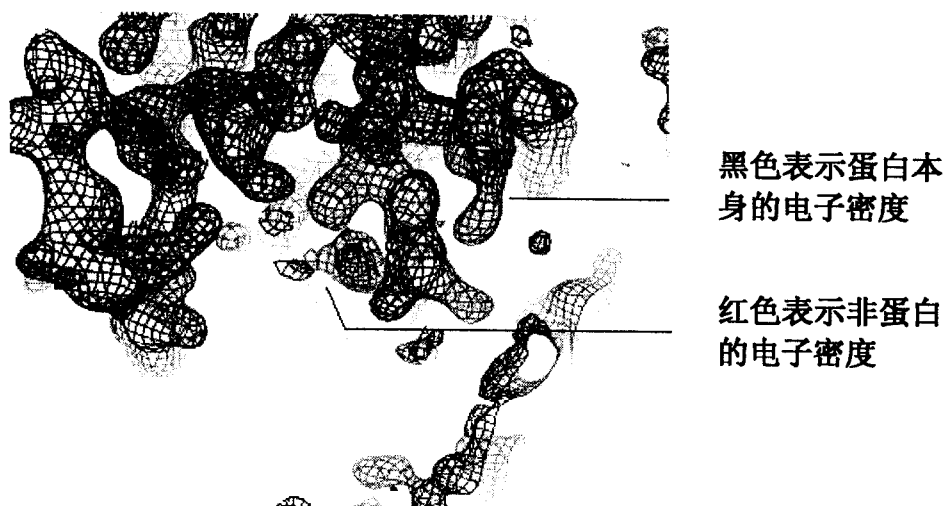


图 3

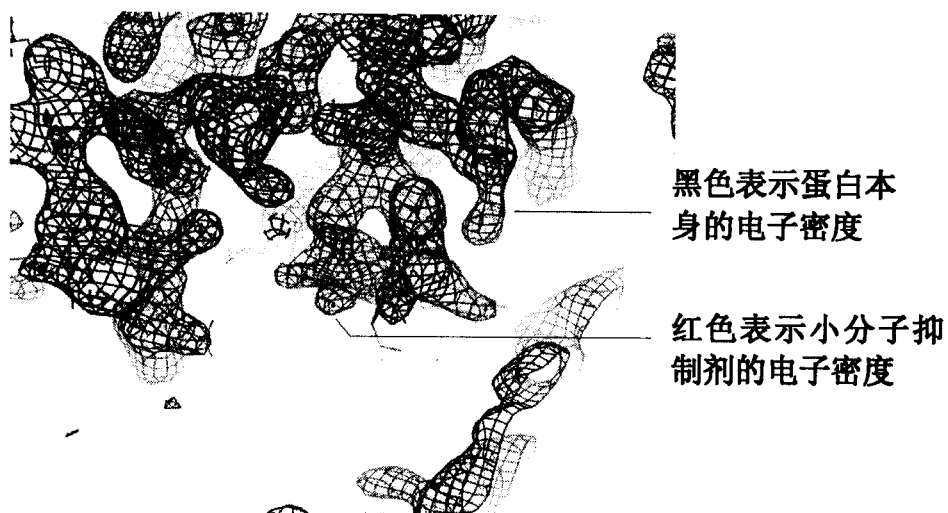


图 4

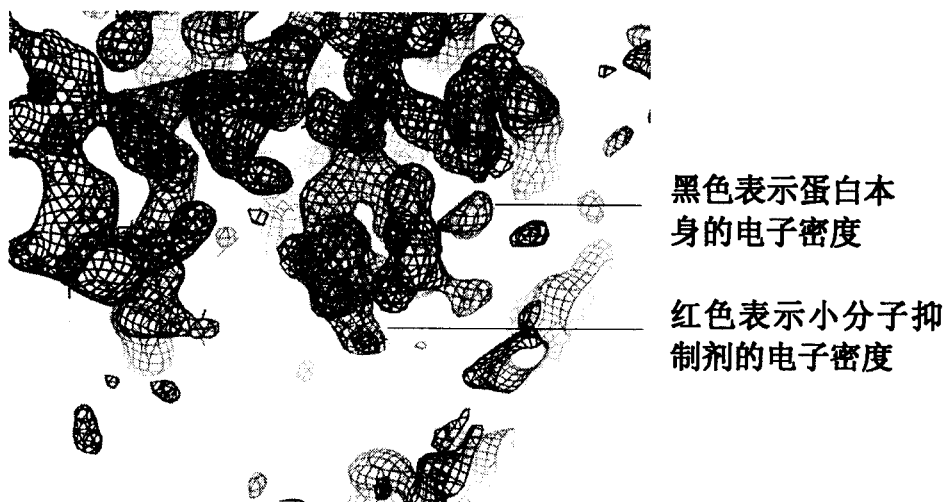


图 5

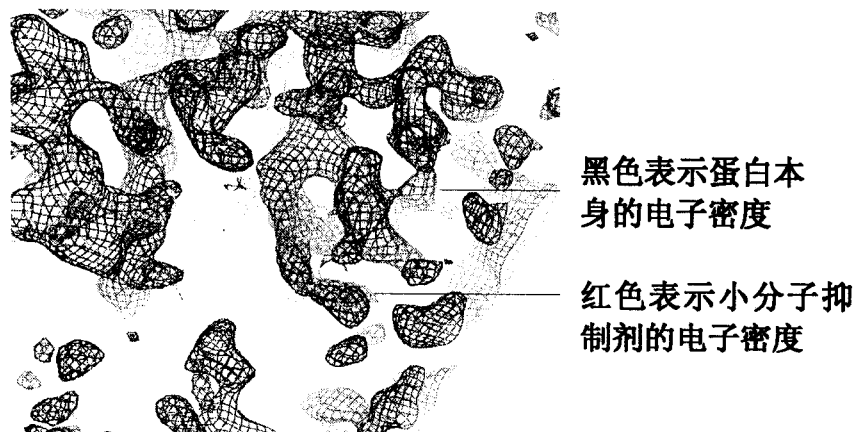


图 6

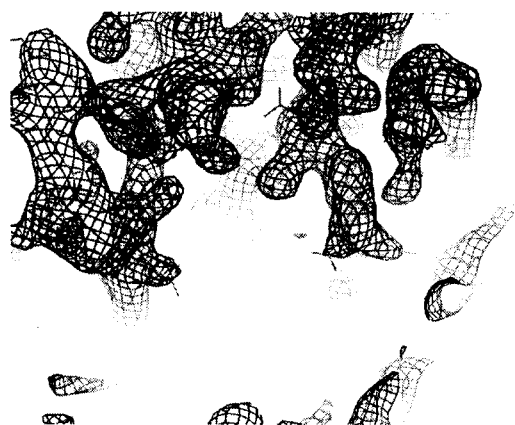


图 7

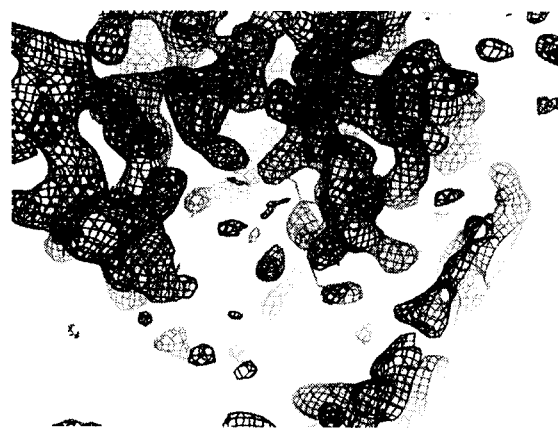


图 8

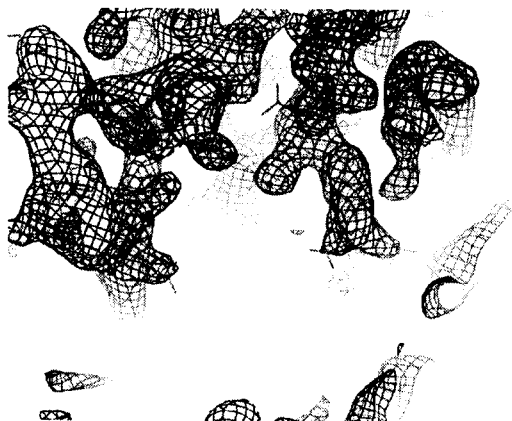


图 9

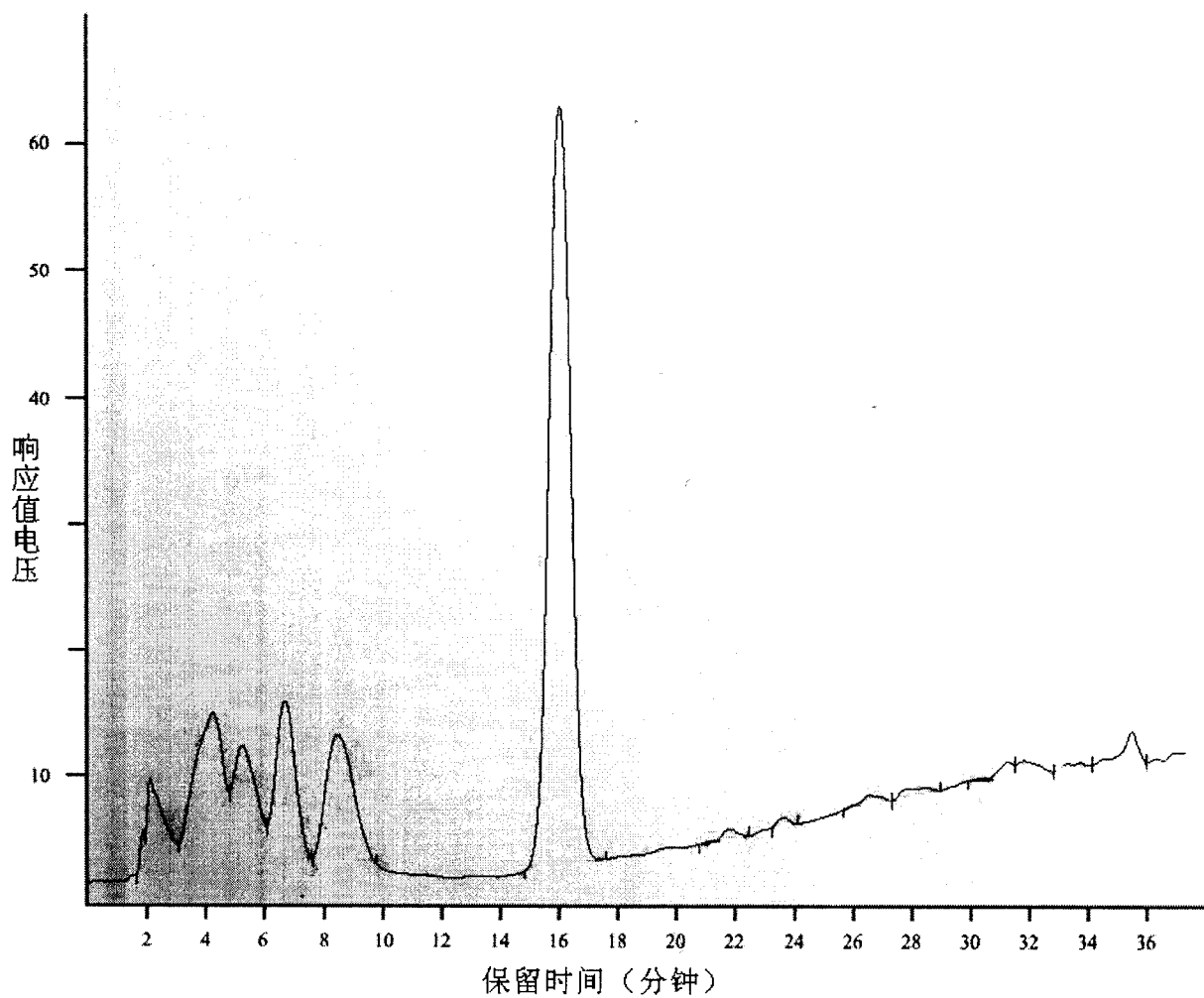


图 10

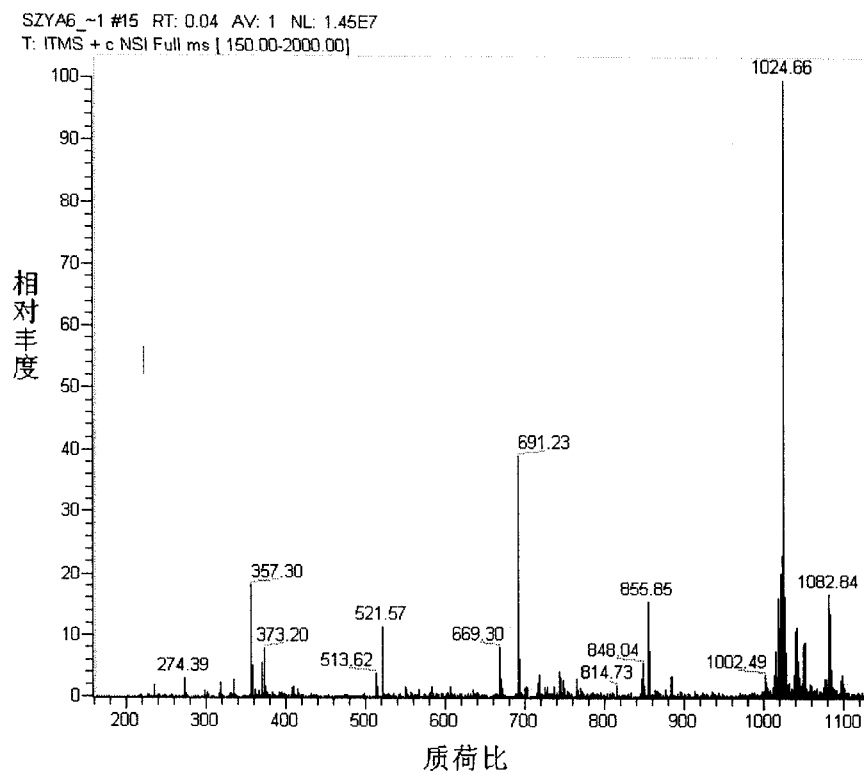


图 11

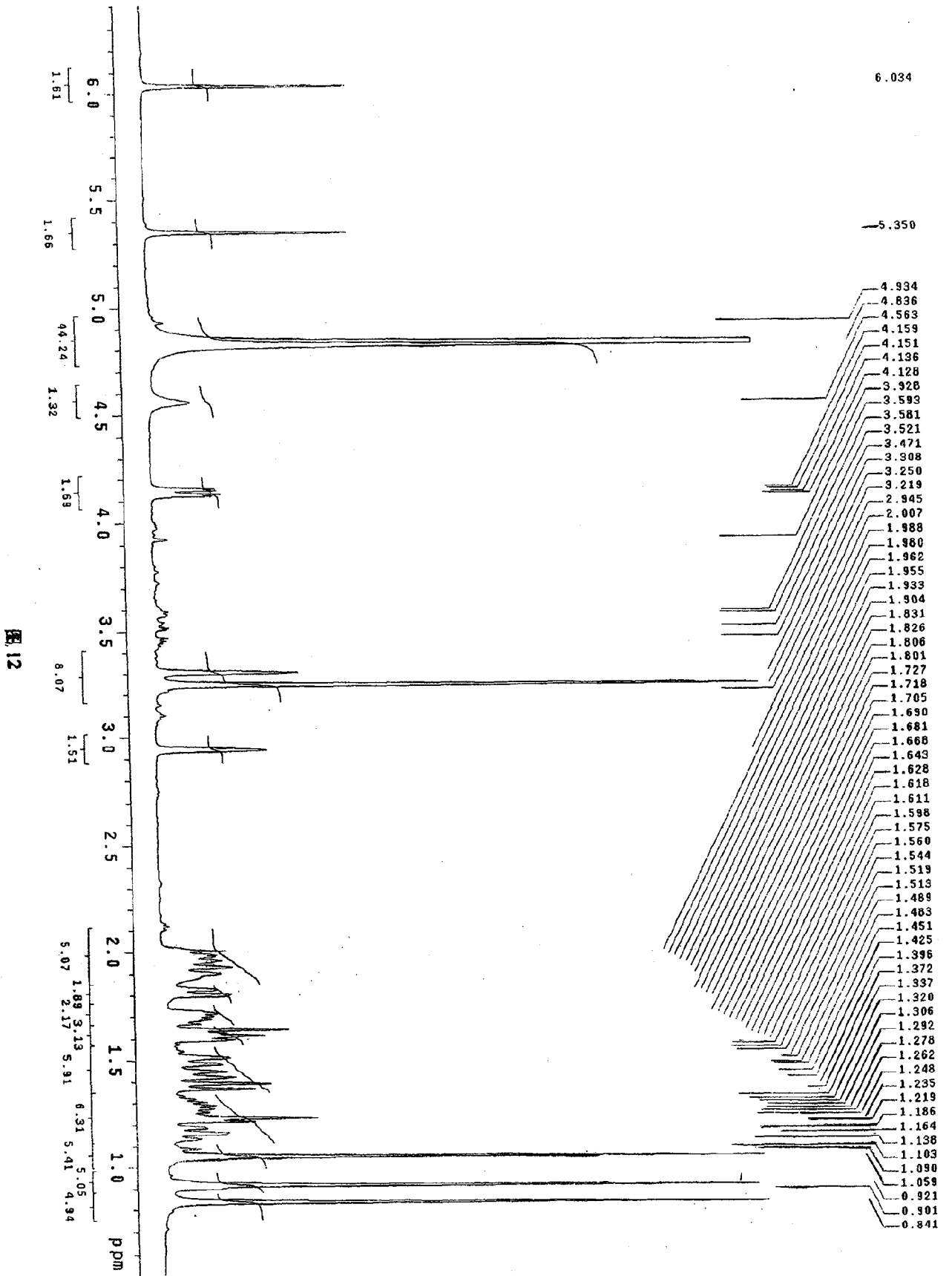
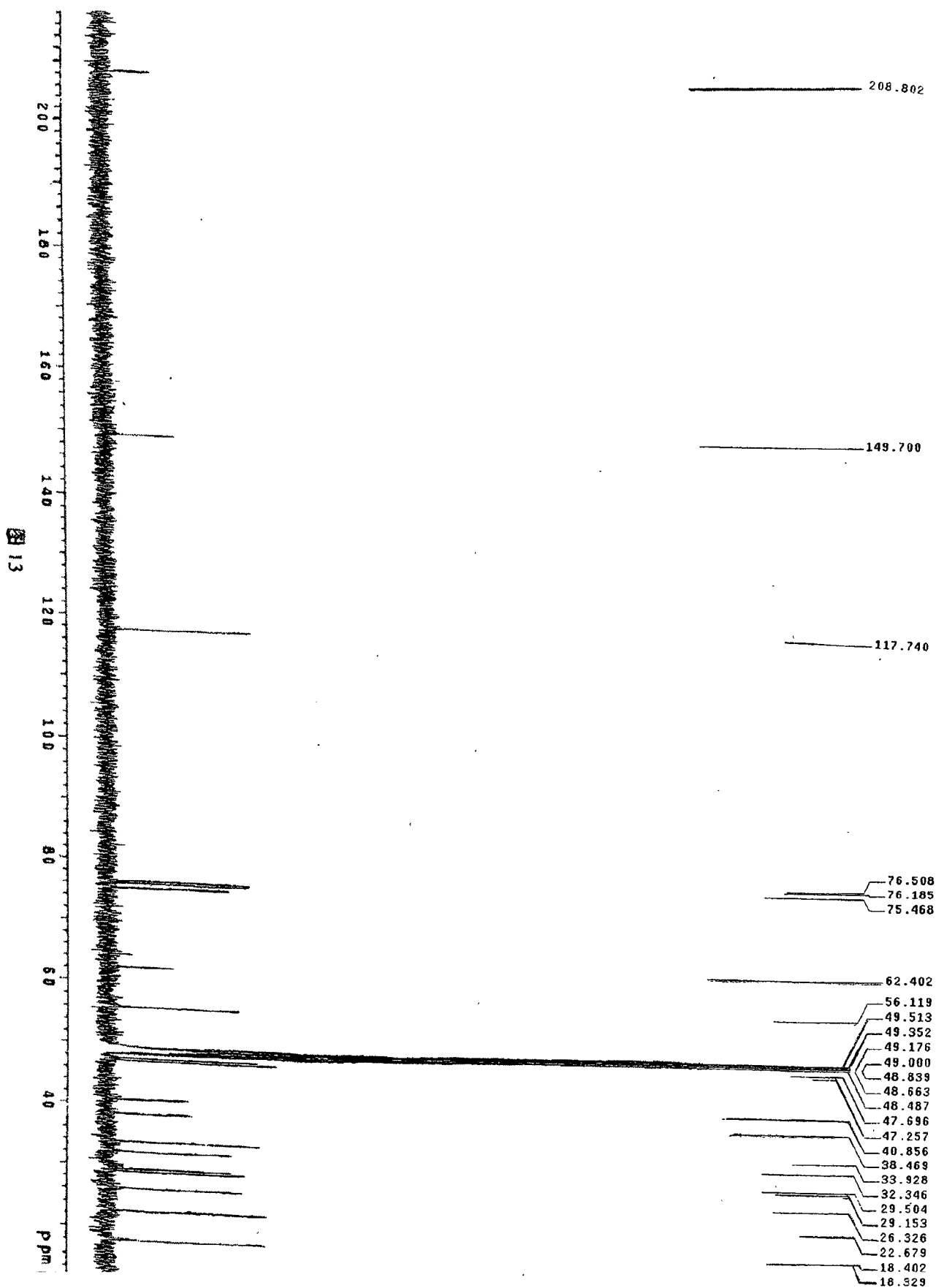


图 12



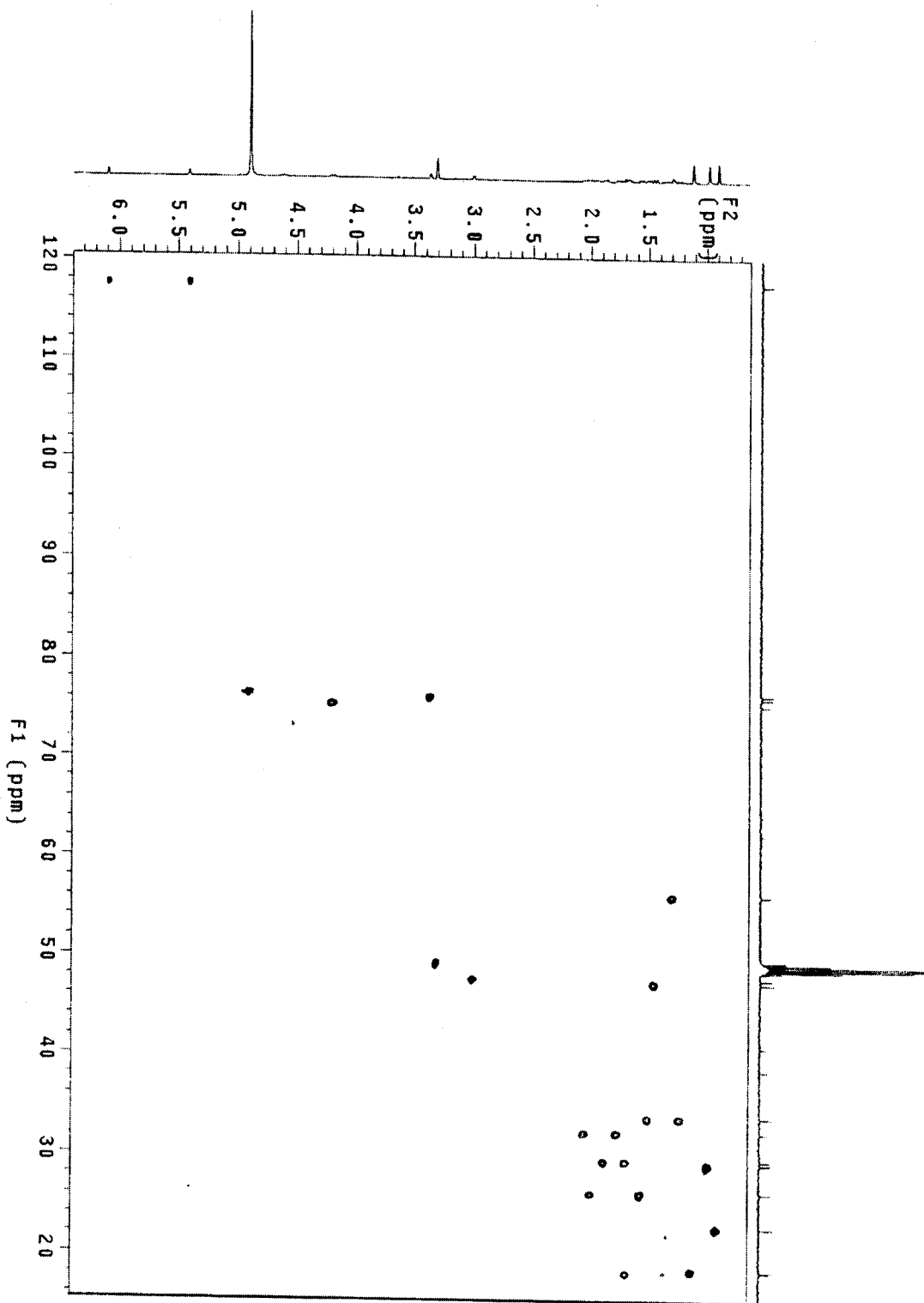


图 14

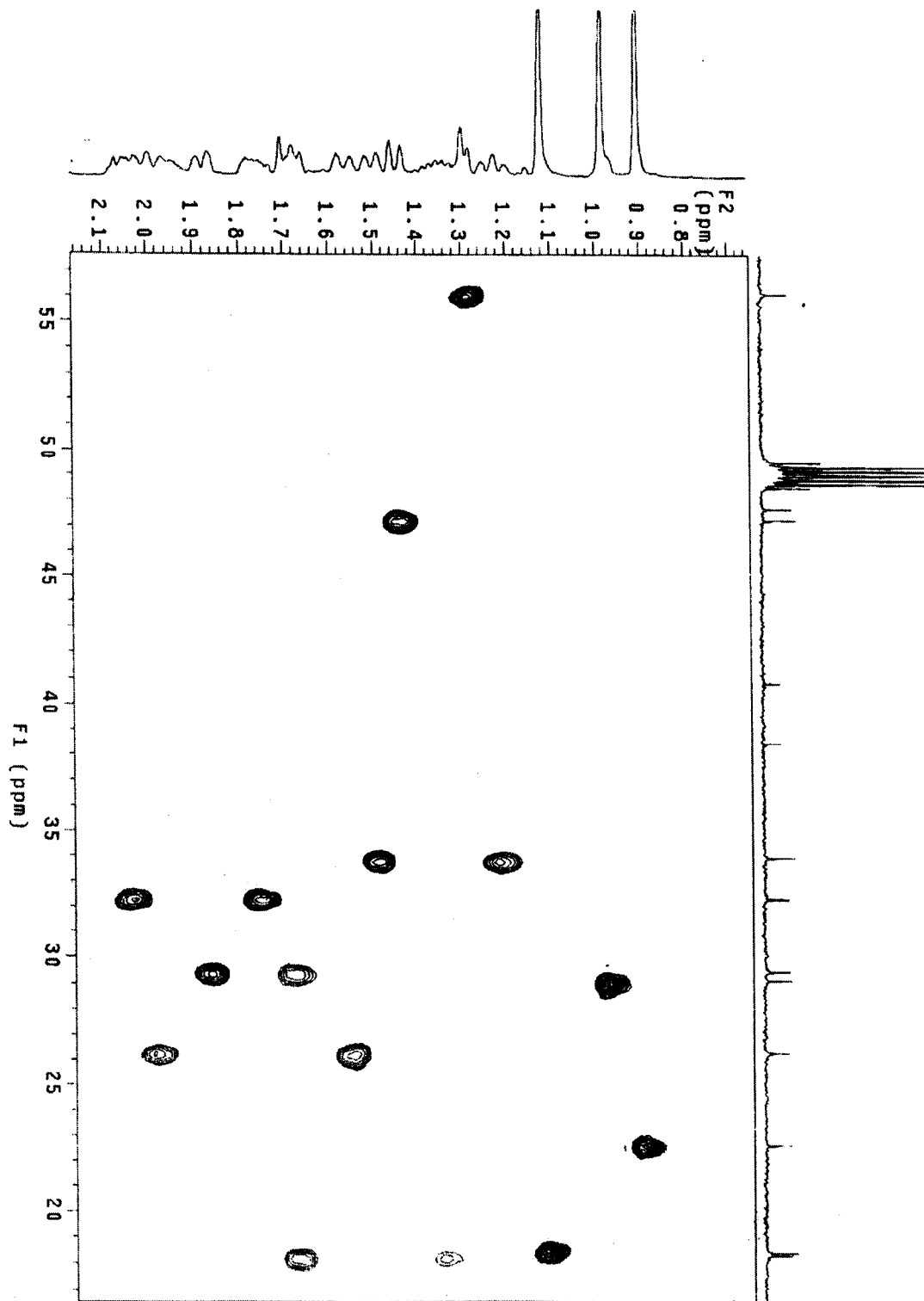


图 15

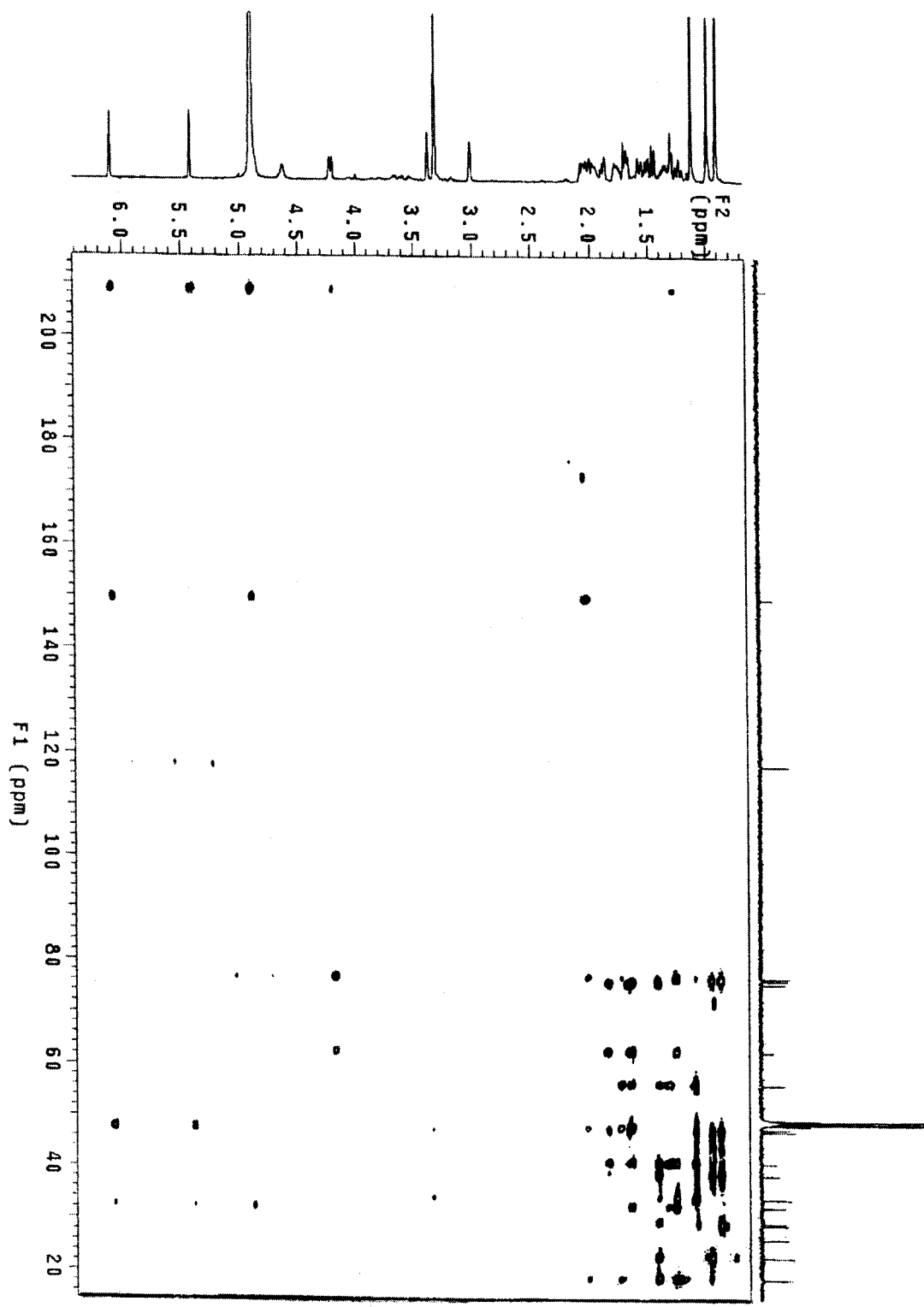


图 16

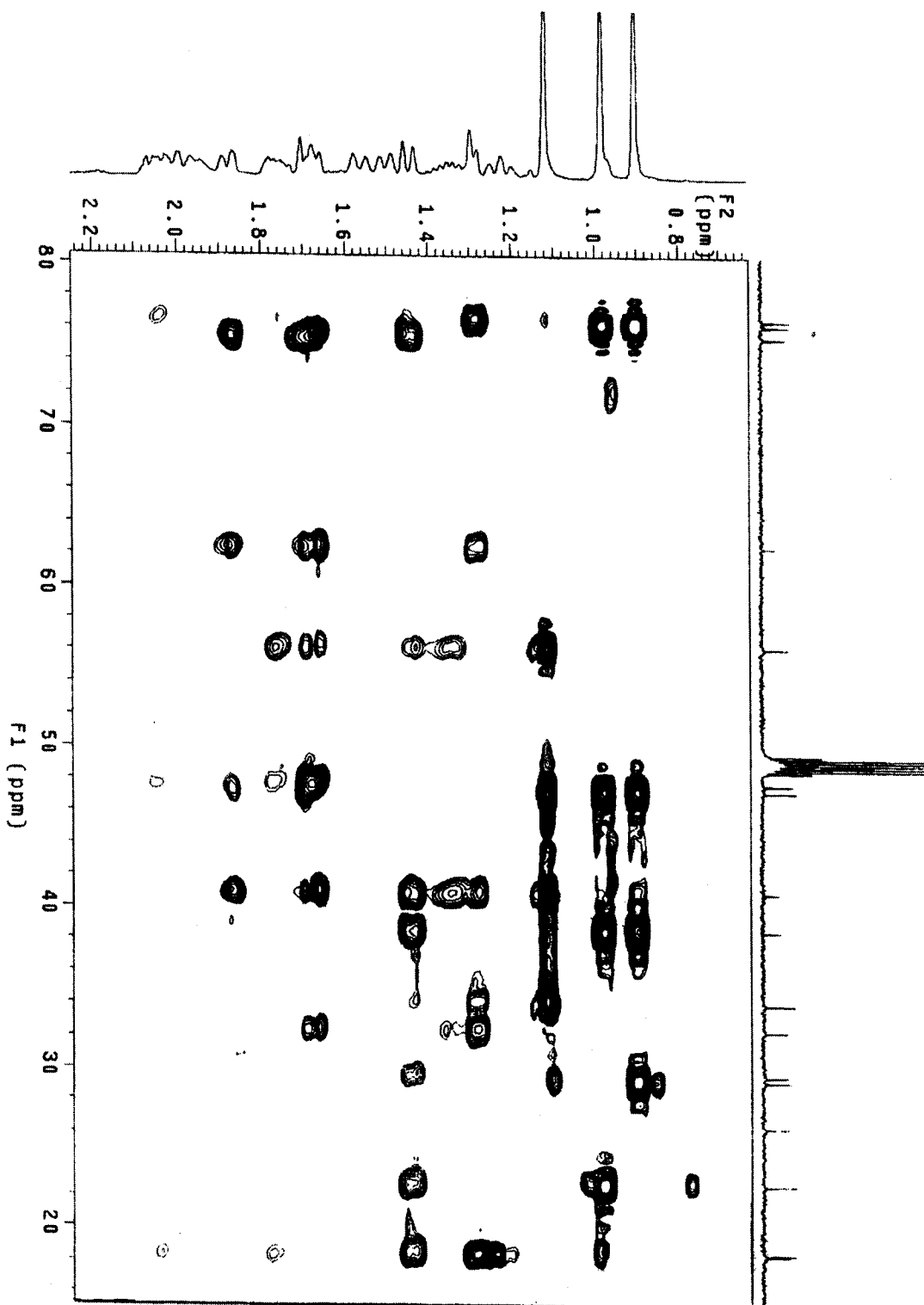


图 17

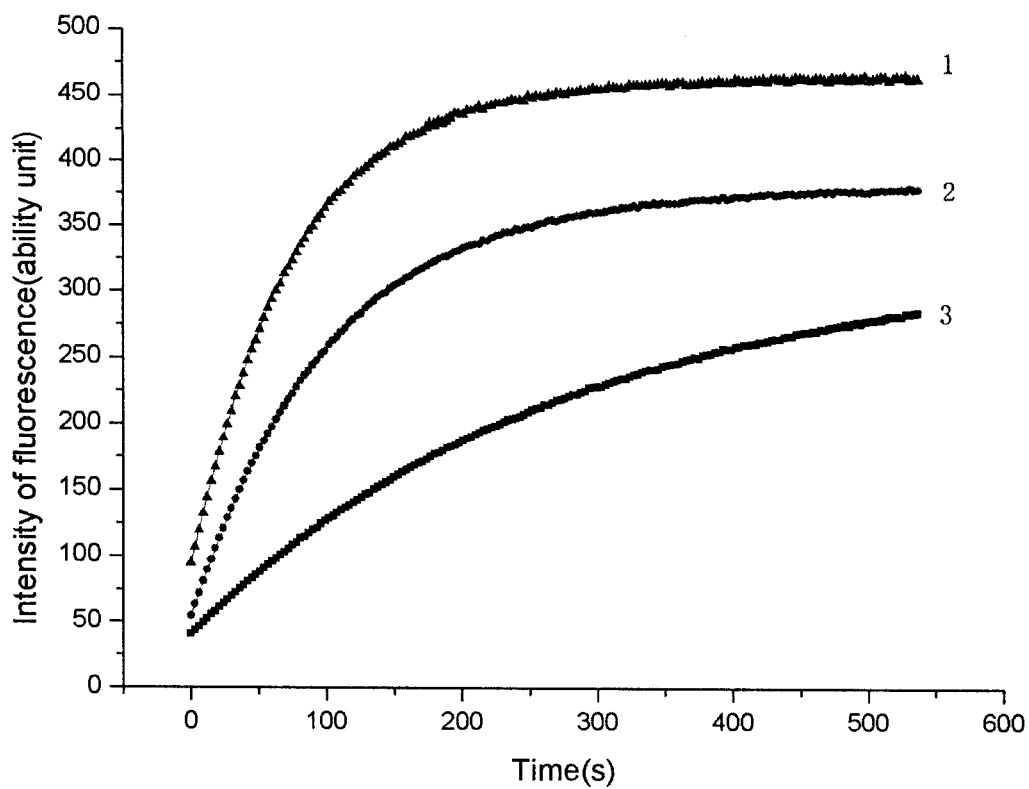


图 18

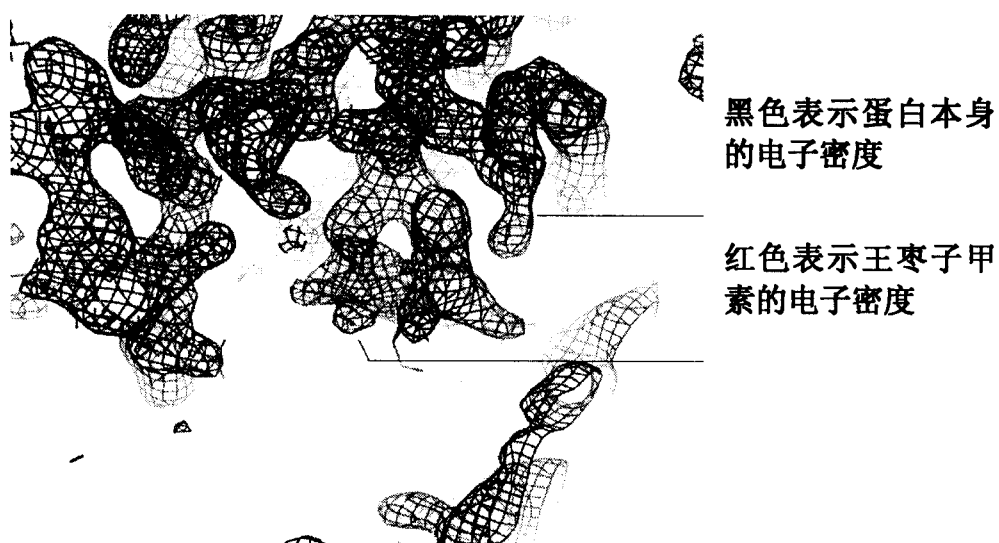


图 19

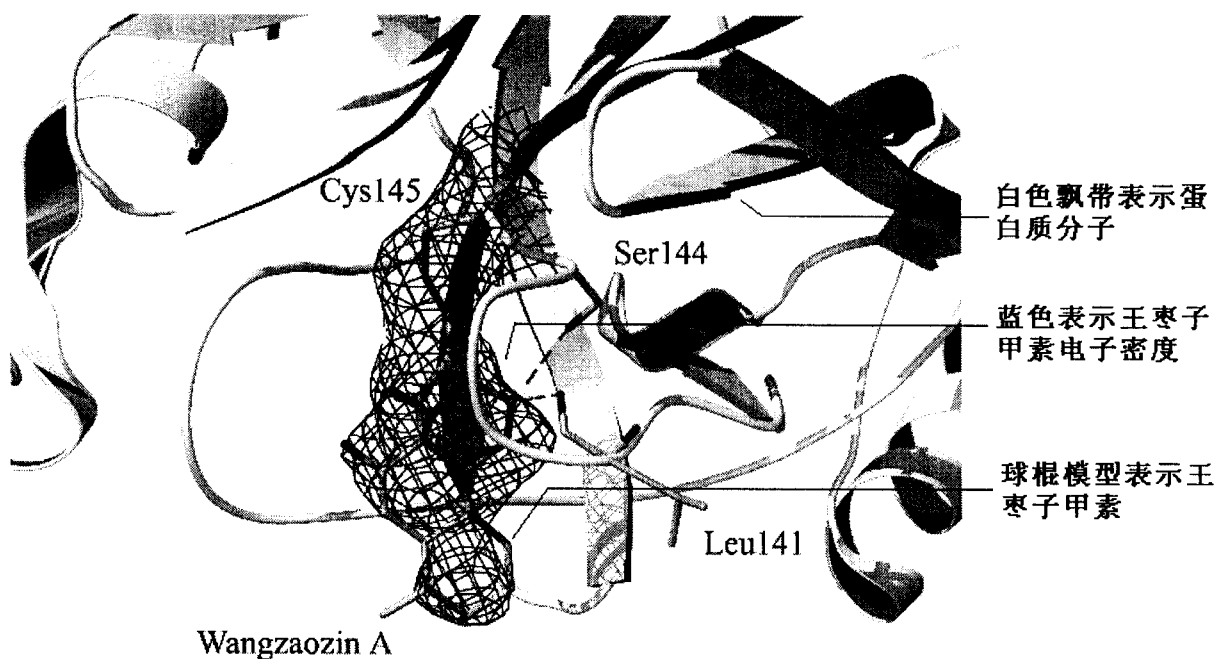


图 20

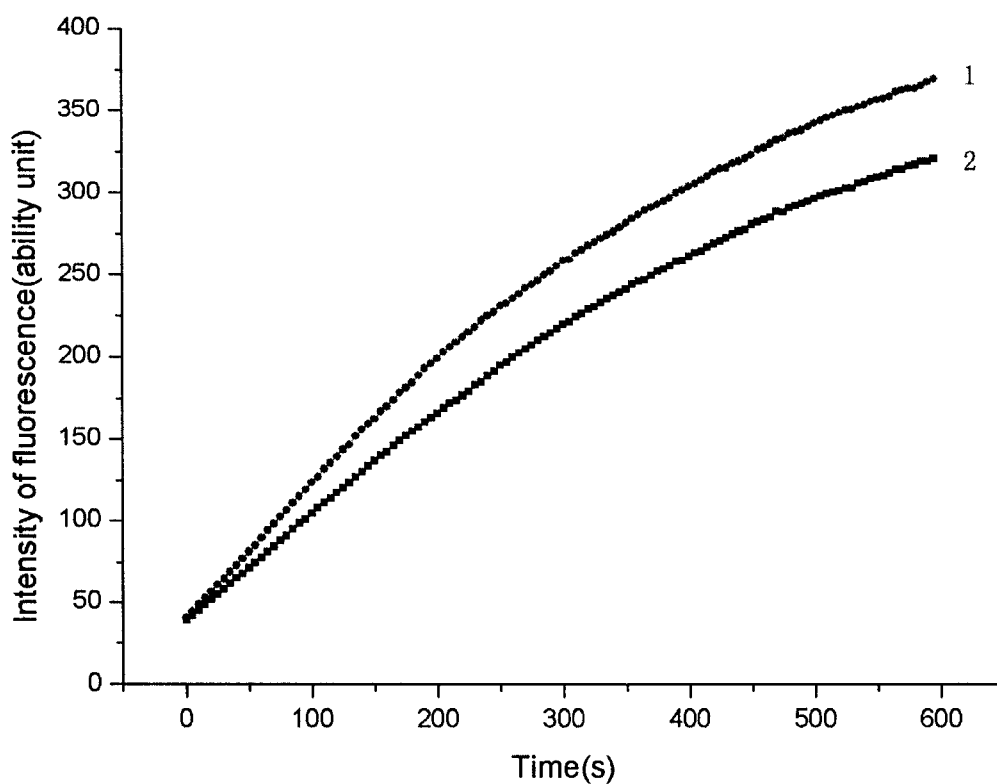


图 21

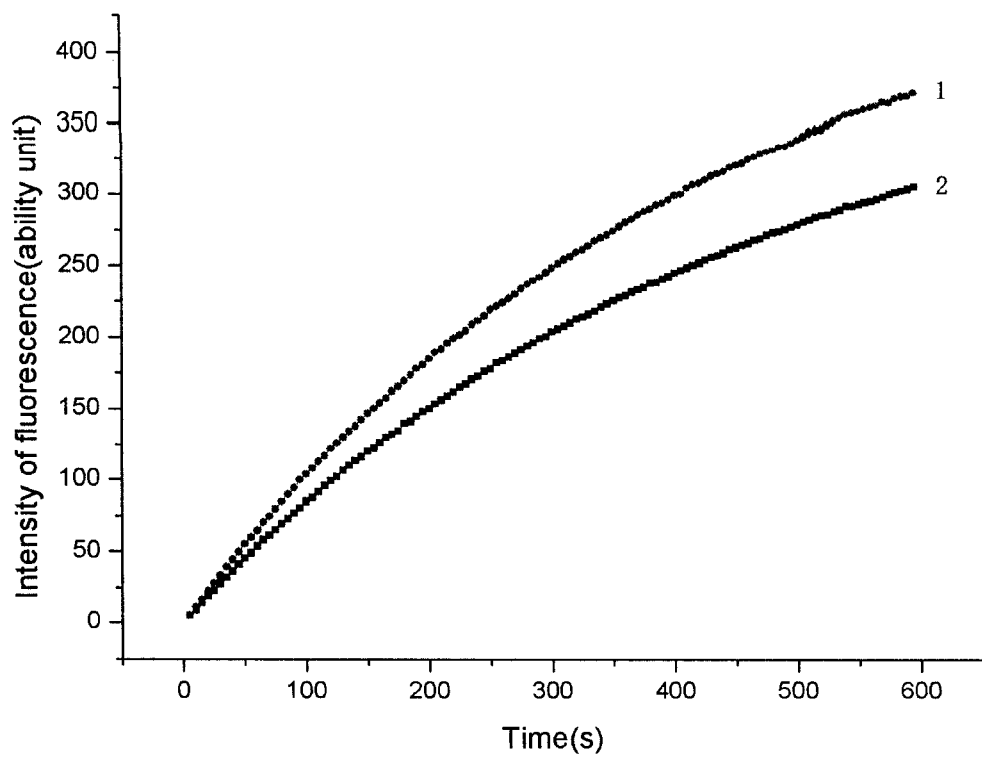


图 22

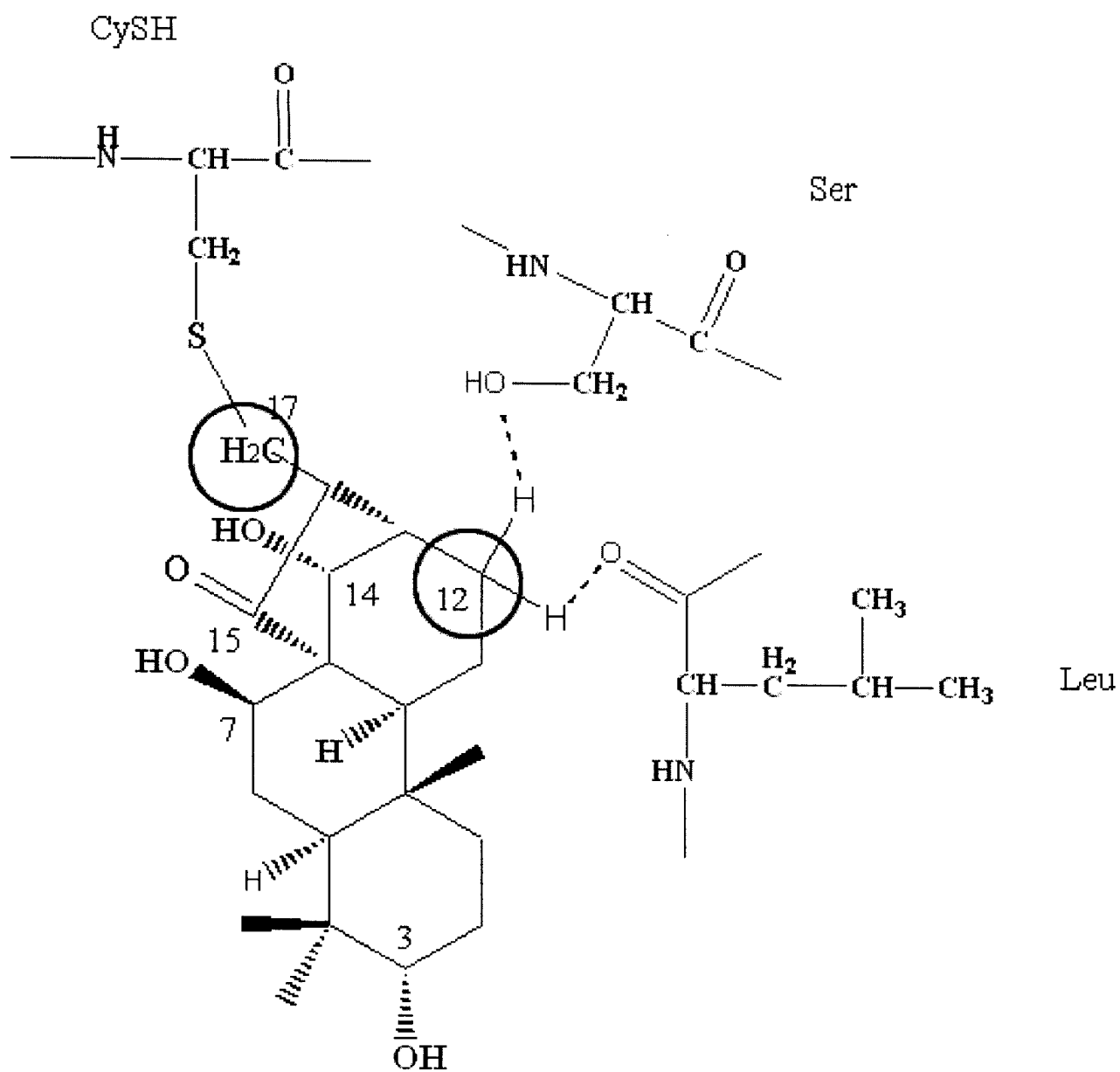


图 23