

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C40B 30/04 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710065119.7

[43] 公开日 2007 年 10 月 31 日

[11] 公开号 CN 101063234A

[22] 申请日 2007.4.4

[21] 申请号 200710065119.7

[71] 申请人 南开大学

地址 300071 天津市南开区卫津路 94 号

共同申请人 清华大学

中国科学院生物物理研究所

[72] 发明人 饶子和 孙玉娜 娄智勇 向科辉

[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

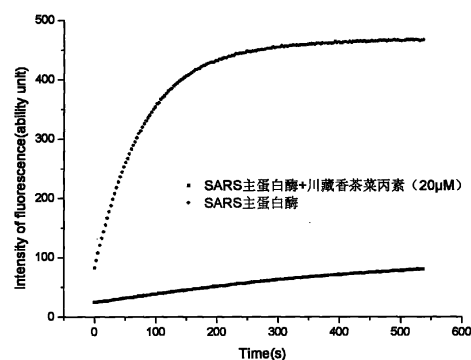
权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图 9 页

[54] 发明名称

从中药等天然产物混合物备选库中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的新方法

[57] 摘要

本发明提供了从天然产物混合物备选库中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法：将 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体与“有抑制活性的样品”接触，获得与 SARS 冠状病毒主蛋白酶结合的小分子抑制剂的电子密度；以与 SARS 冠状病毒主蛋白酶结合的小分子抑制剂的电子密度为基础，鉴定小分子抑制剂，从而得到 SARS 冠状病毒主蛋白酶与小分子抑制剂复合体的精细三维结构。本发明据此方法筛选得到了 SARS 冠状病毒主蛋白酶的小分子抑制剂川藏香茶菜丙素。川藏香茶菜丙素能够有效抑制冠状病毒主蛋白酶活性，可以治疗或者预防 SARS 冠状病毒、传染性胃肠炎病毒或者禽传染性支气管炎病毒等冠状病毒感染。



1、从天然产物混合物备选库中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法，其特征在于包括步骤 A：测定天然产物混合物备选库中的备选样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性，获得对 SARS 冠状病毒主蛋白酶有抑制活性的“有抑制活性的样品”；将 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体与“有抑制活性的样品”接触，得到 SARS 冠状病毒主蛋白酶与小分子抑制剂复合体的晶体。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于步骤 A 之后还包括步骤 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 SARS 冠状病毒主蛋白酶结合的小分子抑制剂的电子密度。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于步骤 B 之后还包括步骤 C：以步骤 B 中获得的与 SARS 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 SARS 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 SARS 冠状病毒主蛋白酶复合体的精细三维结构。

4、根据权利要求 3 所述的方法，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 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性。

5、根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于其中所述的天然产物混合物备选库中的备选样品，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。

6、根据权利要求5所述的方法，其特征在于：

步骤(a)中乙醇溶液与初级原料的用量质量比为6:1-12:1；所用乙醇溶液浓度为70%-95%；

步骤(b)中浸膏与悬浮用双蒸水的质量比为1:5-1:15，萃取用有机溶剂为乙酸乙酯或氯仿，其体积与悬浮用双蒸水的体积比为6:1-10:1；

步骤(c)中所用乙醇溶液浓度为50%。

7、根据权利要求1-6中任一项权利要求所述的方法，其特征在于在步骤A中：SARS冠状病毒主蛋白酶晶体与“有抑制活性的样品”接触时，使用的方法为晶体浸泡或共结晶的晶体浸泡方法。

8、根据权利要求7中所述的方法，其特征在于在步骤A中：SARS冠状病毒主蛋白酶的晶体与“有抑制活性的样品”接触时，可分别与单一的“有抑制活性的样品”接触，也可与混合的“有抑制活性的样品”的接触。

9、根据权利要求8中任一项所述的方法，其中所述天然产物混合物备选库中的备选样品源自中药。

10、根据权利要求9中任一项所述的方法，其中所述天然产物混合物备选库中的备选样品源自下述初级原料：鱼腥草，野菊花，大青叶，芦根，金银花，连翘，黄芩，知母，四季青，穿心莲，鸭跖草，栀子，射干，山豆根，马勃，玄参，地骨皮、川藏香茶菜、鄂西香茶菜。

11、根据权利要求 1-10 中任一项的方法获得的复合体的晶体，其是 SARS 冠状病毒主蛋白酶-川藏香茶菜丙素复合体的晶体。

12、根据权利要求 1-10 中任一项所述的方法，其中所述筛选出的小分子抑制剂是川藏香茶菜丙素。

13、川藏香茶菜在制备治疗冠状病毒感染的药物中的用途。

14、川藏香茶菜丙素在制备治疗或者预防冠状病毒感染的药物中的用途。

15、根据权利要求 13 或 14 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。

从中药等天然产物混合物备选库中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶 抑制剂的新方法

技术领域

本发明涉及药物的筛选方法，更具体而言，涉及以 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体结构为基础，从中药等天然产物混合物备选库中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制剂的新方法及基于此方法发现的 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制剂。

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，这个属又可以被分为三个组群 (group)：其中第一组群有 TGEV, Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus (猪传染性胃肠炎病毒) 等；第二组群有 SARS 冠状病毒等；第三组群有 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、复制功能 (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, 是一个伟大的药物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。

陈曙霞的 CN1600308A (2005.03.30) 中公开了从众多的中药中筛选出唯一一味低毒有效成分——槐果碱单体(sophocarpine, 简称 SC), 其用于抗 SARS 病毒是有效果。但是其实质上并不是对中药整体的筛选, 而是根据基于 SARS 病毒与柯萨奇 B 病毒存在的共同点, 而槐果碱单体对于柯萨奇 B 病毒有治疗效果而推导得出的, 其中并没有阐述该单体的作用机理。

徐筱杰等的 CN1602853A(2005.04.06)中公开了一种抑制 SARS 冠状病毒感染的中药有效成分及其生物活性测定方法, 具体涉及从植物五倍子中分离出的抑制 SARS 冠状病毒侵染宿主细胞的有效成分, 该成分针对的是冠状病毒的关键结构域 S2 蛋白。黄建平的 CN1803168A (2006.07.19) 公开了一种治疗严重急性呼吸综合征 (SARS) 的中药, 该中药来源于临床治疗 ARDS 有效验方, 依据上述 SARS 病因病机及治则加减组方, 由大青叶(干品)15-30g, 生槐子 5-15g, 金银花 15-30g, 炒僵蚕 10-15g, 玄参 10-15g, 牡丹皮 10-15g, 紫丹参 15-30g, 西洋参 5-10g, 生甘草 15-30g, 桑白皮 10-30g, 葶苈子 15-30g, 汉防己 5-10g,

生大黄 5-10g(后下)共十三味中药材组成，具有清热平喘，解毒化浊，凉血消斑，活血化瘀，利水祛湿，泻肺通腑，益气养阴之功效，主要用于 SARS 喘憋期治疗，入汤剂口服，一日两剂，一次煎取药液 600 毫升，每隔 1-2 小时喝一次。该文献中并没有对各种中药的作用机理做出任何阐述。

目前还没有以 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体结构为基础，从中药等天然药物系统（如中药等天然产物混合物备选库）中来筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的技术。本发明提供了一种从来源于中药等天然产物混合物备选样品中筛选靶向与 SARS 冠状病毒主蛋白酶结合，且结合能力最好的小分子抑制剂的方法，并从原子水平阐释了其对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制机理。

发明内容

本发明提供了一种从天然产物混合物备选库中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法，此方法包括步骤 A：测定天然产物混合物备选库中的备选样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性，获得对 SARS 冠状病毒主蛋白酶有抑制活性的样品，这些样品称为“有抑制活性的样品”，将 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体与“有抑制活性的样品”接触，得到 SARS 冠状病毒主蛋白酶与小分子抑制剂复合体的晶体。SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体与“有抑制活性的样品”接触时，根据需要，可分别与单一的“有抑制活性的样品”接触，也可与混合的“有抑制活性的样品”接触。

在得到 SARS 冠状病毒主蛋白酶与小分子抑制剂复合体的晶体后，再进行步骤 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 SARS 冠状病毒主蛋白酶结合的小分子抑制剂的电子密度。

获得与 SARS 冠状病毒主蛋白酶结合的小分子抑制剂的电子密度后，再进行步骤 C：以步骤 B 中获得的与 SARS 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 SARS 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 SARS 冠状病毒主蛋白酶复合体的精细三维结构。

在步骤 C 之后，再进行步骤 D：测定小分子抑制剂对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性。

本发明中用来筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的天然产物混合物备选库，可以是以任何天然产物为原料，以任何方法制备得到的备选样品。

本发明优选如下初级原料制备用于筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的天然产物混合物备选库：包括传统药材、按中药处方规定的药材种类和用量组成的混合药材等中药，还未进行药用开发的动植物品种、海洋生物、微生物等等。

由于中药等天然产物粗提物所含的成分是相当复杂的，因此必须对天然产物的粗提物进行优化，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库。本发明提供了可以实现这一目的制备备选库的技术方案，其基本原理为：对初级原料提取后，提取物先使用不同极性的溶剂如乙酸乙酯进行萃取、萃取后的水相再用大孔树脂分离的方法进行处理，这样既能保证去除蛋白、多糖等干扰因素，又能利用两种不同分离机制的差别，使小分子集中到极性不同的段位，由此得到含有适中分子量的并能够用于以 SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体结构为基础进行抑制剂筛选的天然产物混合物备选库。

本发明提供的制备用于筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂天然产物混合物备选库的方法，具体包括下述步骤：

(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。

本发明提供的制备天然产物混合物备选库的优选方法为：步骤(a)中乙醇溶液与初级原料的用量质量比为 6:1-12:1；所用乙醇溶液浓度为 70%-95%；

步骤(b)中浸膏与悬浮用双蒸水的质量比为 1:5-1:15，萃取用有机溶剂为乙酸乙酯或氯仿，其体积与悬浮用双蒸水的体积比为 6:1-10:1；

步骤(c)中所用乙醇溶液浓度为 50%。

上述制备方法中，优选的初级原料为中药，更优选的初级原料为：鱼腥草，野菊花，大青叶，芦根，金银花，连翘，黄芩，知母，四季青，穿心莲，鸭跖草，栀子，射干，山豆根，马勃，玄参，地骨皮、川藏香茶菜、鄂西香茶菜。

此外，本发明提供的从天然产物混合物备选库中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法，更优选在步骤 A 中：SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体与“有抑制活性的样品”接触时，使用的方法为晶体浸泡或共结晶的晶体浸泡方法。

在一个实施方案中，本发明获得了 SARS 冠状病毒主蛋白酶-川藏香茶菜丙素复合体的晶体。

在另一个实施方案中，本发明筛选得到了 SARS 冠状病毒主蛋白酶的小分子抑制剂川藏香茶菜丙素。

在另一个实施方案，本发明提供了川藏香茶菜可以用于治疗或预防 SARS 冠状病毒、传染性胃肠炎病毒或者禽传染性支气管炎病毒等冠状病毒感染。

在另一个实施方案中，本发明提供的川藏香茶菜丙素能够有效抑制冠状病毒主蛋白酶活性，可以用于治疗或者预防 SARS 冠状病毒、传染性胃肠炎病毒或者禽传染性支气管炎病毒等冠状病毒感染。

在另一个实施方案中，本发明提供了能够有效抑制 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性的川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品、鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品、黄芩乙酸乙酯萃取样品、鱼腥草乙酸乙酯萃取样品、山豆根乙酸乙酯萃取样品、栀子乙酸乙酯萃取样品、知母乙酸乙酯萃取样品 7 种中药样品及其制备方法。

本发明选取 SARS 冠状病毒中晶体结构已知的主蛋白酶，对我国传统中药等天然产物混合物样品进行活性成分筛选，是从一种新的角度去研究中药学、天然产物学和生物学。其实质内容可包括两方面：第一，靶蛋白的表达、纯化及结晶，这属于生物大分子的研究范畴；第二，使中药等天然产物混合物样品中非孤立存在的天然产物小分子自由地与靶蛋白——SARS 冠状病毒主蛋白酶进行竞争性的结合，这属于化学特别是天然产物化学研究的范畴。

本发明的抑制剂筛选的方法以 SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体结构为基础，从中药等天然产物混合物备选库中进行筛选，能够快速、准确的寻找对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的特异性的抑制剂，提高了筛选的准确性。本发明的方法相对简单、成本较低，但筛选效率高、快捷、准确，并可以从混合物样品中，得到结合能力最好的抑制剂小分子。

具体而言，与现有方法相比，本发明的抑制剂的筛选方法的优点如下：

(1) 首先，该方法省去了繁琐的天然产物分离纯化步骤，大大减少工作量，而且本方法的中药等天然产物混合物备选库的中的样品适宜于进行 SARS 冠状病毒主蛋白酶的体外活性测定和 X 射线晶体学测试，极大地提高了筛选效率和命中率。

(2) 使用 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体作为诱饵，浸泡有活性的天然产物混合物样品，可以把对 SARS 冠状病毒主蛋白酶有抑制作用的小分子抑制剂从混合物样品中分离出来，获得 SARS 冠状病毒主蛋白酶与小分子抑制剂结合的复合体的精细三维结构，并从原子水平上阐释该小分子抑制剂对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制机理。。

(3) 使用本发明方法，通过使用 SARS 冠状病毒主蛋白酶浸泡天然产物混合物样品，可以从天然产物混合物样品中找到与 SARS 冠状病毒主蛋白酶结合能力最好的小分子(竞争结合的原理)，优化选择了小分子抑制剂。

附图说明

图 1 本发明的野菊花，芦根，金银花，连翘，四季青，鸭跖草，栀子，射干，马勃，玄参，地骨皮的水相 50%乙醇洗脱样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑

制活性曲线图。样品浓度：100 μ g/mL

图 2 本发明的鱼腥草，大青叶，黄芩，知母，穿心莲，山豆根的水相 50%乙醇洗脱样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图。样品浓度：100 μ g/mL

图 3 本发明的金银花，黄芩，穿心莲，四季青，鸭跖草，马勃，玄参，芦根，大青叶，地骨皮的乙酸乙酯萃取样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图。样品浓度：100 μ g/mL

图 4 本发明的鱼腥草，野菊花，连翘，知母，栀子，射干，山豆根的乙酸乙酯萃取样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图。样品浓度：100 μ g/mL

图 5 本发明的鱼腥草、山豆根、栀子、知母、黄芩的乙酸乙酯萃取样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图。样品浓度：10 μ g/mL

图 6 本发明的鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品、水相 50%乙醇洗脱样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图。样品浓度：100 μ g/mL

图 7 本发明的鄂西香茶菜乙酸乙酯萃取样品、水相 50%乙醇洗脱样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图。样品浓度：10 μ g/mL

图 8 本发明的川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品、水相 50%乙醇洗脱样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图。样品浓度：100 μ g/mL

图 9 本发明的川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品、水相 50%乙醇洗脱样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图。样品浓度：10 μ g/mL

图 10 本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性位点附近电子密度对比图。a 为 SARS 冠状病毒主蛋白酶母体晶体活性位点的电子密度显示；b 为 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活性位点的电子密度显示；c 为 SARS 冠状病毒主蛋白酶与川藏香茶菜丙素浸泡后的晶体活性位点的电子密度显示。图中所示的电子密度，蓝色为 $2fofc$ 电子密度，为 1.0σ ；青色和绿色为 $1fofc$ 差值电子密度，为 2.5σ

图 11 本发明的川藏香茶菜乙酸乙酯萃取物样品中的存在的小分子的电子密度与 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性位点 Cys145 残基电子密度形成共价键的显示图。蛋白质分子用白色飘带图表示，活性位点的 Cys145 残基用球棍模型表示；蓝色

电子密度表示 Cys145 的电子密度，红色电子密度表示未知小分子的电子密度。
图 12 本发明的 SARS 冠状病毒主蛋白酶与川藏香茶菜提取物乙酸乙酯萃取样品作用前后的质谱图。蓝色表示 SARS 冠状病毒主蛋白酶本身的质谱峰；红色表示 SARS 冠状病毒与川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品作用后的质谱峰。

图 13 20 μ M 的川藏香茶菜丙素对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图

图 14 2 μ M 的川藏香茶菜丙素对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图

图 15 20 μ M 的川藏香茶菜丙素对 TGEV 主蛋白酶的抑制活性曲线图

图 16 2 μ M 的川藏香茶菜丙素对 TGEV 主蛋白酶的抑制活性曲线图

图 17 100 μ M 的川藏香茶菜丙素对 AIBV 主蛋白酶的抑制活性曲线图

图 18 10 μ M 的川藏香茶菜丙素对 AIBV 主蛋白酶的抑制活性曲线图

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。

具体实施方式

实施例 1

1. SARS 冠状病毒主蛋白酶的表达、纯化和晶体生长

根据文献 (Yang H et al. Proc Natl Acad Sci. 2003 Nov; 100(23):13190-5) 进行 SARS 冠状病毒主蛋白酶 (氨基酸序列见序列表部分) 的表达、纯化和晶体生长，得到衍射分辨率较高 (高于 2.6Å) 的 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体。具体地：

a. SARS 冠状病毒主蛋白酶的表达载体构建

具体步骤包括：

(1.1) 利用北京华大基因中心提供的编号为 BJ01 的 SARS 病毒毒株的 cDNA 文库，用 PCR 技术进行体外扩增。

正向引物：5' -CGGGATCCAGTGGTTTTAGGAAAATG- 3'

反向引物：5' -CCGCTCGAGTCATTGGAAGGTAACACCAGA- 3'

(1.2) 经 PCR 扩增的基因片段经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶酶切后，用琼脂糖凝胶电泳回收大小为 1 kb 左右的片段。

(1.3) 将回收片段与 T 载体进行连接，然后用连接产物转化大肠杆菌

Escherichia coli DH5 α 感受态细胞，并涂在 LB 平板（含 100mg/L 氨苄青霉素）上，培养过夜。

(1.4) 从平板上挑取多个单克隆，分别接种于装有约 5mL 的 LB 的试管（该 LB 溶液中加入氨苄青霉素，使其终浓度为 100 mg/L）中，培养过夜。然后用质粒提取试剂盒（博大泰克公司 B 型质粒小量快速提取试剂盒）提取质粒，并用 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切，然后用琼脂糖凝胶回收大小约为 1kb 左右的目标基因片段。

(1.5) 将目标载体 pGEX-4T-1（购自 Pharmacia 公司）用 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切，然后用琼脂糖凝胶回收酶切的片段。

(1.6) 将 (1.4) 和 (1.5) 获得的片段连接（将酶切回收后的目标基因片断和目标载体片段按照摩尔数 3: 1—6: 1 的比率混合，按照 Takara DNA Ligation 的要求在 16°C 反应 30 分钟—18 小时），转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞，涂在 LB 平板（含 100mg/L 氨苄青霉素）上培养过夜。将筛选到的阳性克隆，用于鉴定和测序。

测序结果表明，SARS 冠状病毒的主蛋白酶编码基因已被正确地克隆到 pGEX-4T-1 载体中。

b. SARS 冠状病毒主蛋白酶的表达与纯化

包括步骤：

(2.1) 将上述步骤 a 中得到的含有编码 SARS 冠状病毒主蛋白酶基因的 pGEX-4T-1 载体转化 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 的菌株，并用 LB 平板（含 100 mg/L 氨苄青霉素）筛选阳性克隆。

(2.2) 在 (2.1) 中所述的 LB 平板上挑取阳性克隆（在含有氨苄青霉素的 LB 平板上生长出来的单克隆），培养过夜，然后转入 1L 的 LB 培养基（含 100mg/L 氨苄青霉素），当 OD₆₀₀ 达到 0.6-0.8 时，加入 1mM 左右的 IPTG，在 16°C 培养 12 小时左右；

(2.3) 5000—8000 rpm 离心 10—15min 收集细胞，然后冰浴超声破菌 20-30 分钟；破菌液 13000rpm—15000 rpm 离心 20—40 min 后收集上清液。

(2.4) 将上清液加入 PBS 预平衡的 GST 亲和层析柱（GE 公司）中，用 PBS

淋洗 20-30 个柱床体积去除杂蛋白。最后加入 2ml 0.1mg/ml 左右的人类鼻病毒 3C 蛋白酶，在 4℃酶切 12-20 小时，之后收集 SARS 冠状病毒主蛋白酶。

(2.5) 将 (2.4) 获得的蛋白再用 Mono Q (GE 公司) 阴离子交换层析进行纯化

c. SARS 冠状病毒的主蛋白酶的晶体生长

SARS 冠状病毒的主蛋白酶的晶体生长是采用悬滴气相扩散法，在 289-297K (K 是温度单位开尔文，摄氏温度 16℃~24℃) 下，用组织培养板进行的。用 Hampton Research 公司的晶体生长试剂盒 (Crystal Screening Kit I & II, PEG/ION Kit, PEG 6000 Grid Kit 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Kit) 对初始结晶条件进行筛选。在 PEG 6000 Grid Kit 的 C3 (20% PEG 6000, 0.1 M MES (pH 6.0)) 条件下的液滴中有红色球状沉淀，并在沉淀的边缘出现微晶。在此结晶条件下，我们尝试了不同 pH 值的缓冲液 (如 pH 值从 5.5 到 6.5 之间进行)、不同聚合度的 PEG (如从 PEG 3350 到 PEG 10000 之间进行)、不同蛋白浓度 (如从 2mg/ml 到 30mg/ml 之间进行) 和各种添加剂 (Hampton Research 公司地添加剂试剂盒) 等来优化晶体。最后，在 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) 以及蛋白浓度为 5~12mg/ml 时获得了衍射分辨率较高 (高于 2.6Å) 的晶体。

2. 中药等天然产物混合物备选库的制备

源自川藏香茶菜 (*I. pharicus (Prain) Murata*) 的天然产物混合物备选样品的制备

(1) 制备川藏香茶菜提取物浸膏:

取 500 克干燥粉碎的川藏香茶菜药材，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;

(2) 制得川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品:

称取此浸膏 10.5 克，用 85 毫升双蒸水悬浮，倾入 1000 毫升分液漏斗中，用乙酸乙酯萃取。每次萃取用乙酸乙酯 850 毫升，充分振摇，静置 6 小时分层。共萃取 6 次，合并各次乙酸乙酯萃取物。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，得干膏状川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品，备用；

(3) 制得川藏香茶菜水相大孔树脂 50%乙醇洗脱样品：

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。水洗脱 8 次，每次洗脱 250 毫升，弃去水洗部分。50%乙醇洗脱 5 次，每次洗脱 300 毫升。将 50%乙醇洗脱部分使用 EYELA N1001 型旋转蒸发仪蒸除溶剂，得干膏状川藏香茶菜水相大孔树脂 50%乙醇洗脱样品，备用；

(4) 获得源自川藏香茶菜的天然产物混合物备选样品：

上述步骤(2)制得的川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品、步骤(3)制得的川藏香茶菜水相大孔树脂 50%乙醇洗脱样品组成了源自初级原料川藏香茶菜的 2 个备选样品(按照上述方法制备的每一个备选样品都含有多种天然产物小分子化合物，因此称为天然产物混合物备选样品)。

源自其它初级原料的天然产物混合物备选样品的制备：

由于中药中的清热药往往有抗菌、抗病毒作用，并且非典期间国家中医药管理局公布的三个处方中也大多含此类药(比如处方一药物组成为鱼腥草 15 克、野菊花 6 克、茵陈 15 克、佩兰 10 克、草果 3 克。其功效清热解毒、利湿化浊，其中鱼腥草、野菊花为清热药；处方二药物组成为蒲公英 15 克、金莲花 6 克、大青叶 10 克、葛根 10 克、苏叶 6 克。其功效清热解毒、散风透邪，其中蒲公英、金莲花、大青叶为清热药；处方三药物组成为芦根 15 克、金银花 10 克、连翘 10 克、薄荷 6 克、生甘草 5 克。其功效清热解表、疏风透邪，其中芦根、金银花、连翘为清热药)。故先从这些药入手。查中药学专著(黄兆胜主编，人民卫生出版社，2002 年 8 月第 1 版)常用的此类药有 44 种，其中 17 种归肺经，为：鱼腥草，野菊花，大青叶，芦根，金银花，连翘，黄芩，知母，四季青，穿心莲，鸭跖草，梔子，射干，山豆根，马勃，玄参，地骨皮(中国科学院云南昆明植物所提供)，列为用于进行 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的初级原料。

另有鄂西香茶菜（中国科学院云南昆明植物所提供）是我国民间用来治疗多种炎症的有效药物，且最近从该属植物中分离出多种被证明具有抗病毒、抗肿瘤等生理活性的二萜类成分，故也列为用于进行 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的初级原料。

源自以上 18 种初级原料的 36 个天然产物混合物备选样品按照上述源自川藏香茶菜 (*I. pharicus (Prain) Murata*) 的天然产物混合物备选样品的制备方法制备。

按照上述方法制备的 38 个天然产物混合物备选样品组成了用于进行 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。

3. 天然产物混合物备选样品对 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 320nm 和 405nm。

按照本发明制备的用于进行 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样品称为天然产物混合物备选样品。将步骤 2 中制备的 38 个干膏状天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 50mg/mL，分别制得 38 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（含或不含 DTT））中加入 SARS 冠状病毒主蛋白酶（终浓度 0.5 μ M），加入天然产物混合物备选样品的 DMSO 溶解物（如川藏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，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—图 9 中。

图 1—图 4 以及图 6、图 8 为 38 个天然产物混合物备选样品对 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制活性的测定结果，其中每个备选样品的浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

由以上图 1—图 9 可以看出，其中大部分备选样品均对 SARS 冠状病毒主蛋白酶有抑制活性，其中抑制活性较好的有 7 个，分别是黄芩、鱼腥草、山豆根、栀子、知母、川藏香茶菜、鄂西香茶菜的乙酸乙酯萃取物样品。

图 5、图 7 和图 9 是以上 7 个抑制活性较好的：黄芩、鱼腥草、山豆根、栀子、知母、川藏香茶菜、鄂西香茶菜的乙酸乙酯萃取样品的浓度稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的对 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制活性测定结果，可以发现，将黄芩、鱼腥草、山豆根、栀子、知母、川藏香茶菜、鄂西香茶菜的乙酸乙酯萃取物浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，对 SARS 冠状病毒主蛋白酶仍有较强的抑制活性。

这就说明在这 7 种中药的乙酸乙酯萃取样品中可能含有某种成分能够有效的抑制 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性，也说明这 7 种中药有可能成为治疗 SARS 冠状病毒的有效药物。为了了解它们对 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制作用的确切的分子机理，我们可以选择这 7 种中药的乙酸乙酯萃取样品进行 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体浸泡或共结晶实验。

4、SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体浸泡川藏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，提高浸泡时川藏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、将川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品的 DMSO 溶解物（按照步骤 3 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, 13000—15000rpm 高速离心, 之后取上清液, 得浸泡液 1, 备用。

方法二、将干膏状的川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品 (步骤 2 制备) 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, 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, 不至于使川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品中的小分子化合物浓度过高影响晶体的衍射质量, 因此将浸泡液 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, 将晶体在以上所述的两种冷冻系统产生的低温氮气流中冷冻至 -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 (分辨率最好大于 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 冠状病毒主蛋白酶母体、SARS 冠状病毒主蛋白酶与川藏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 $\beta = 104.7$	a = 107.8 b = 82.5 c = 52.9 $\beta = 104.9$
分辨率 (Å)	50-1.50 (1.55-1.50)	50.0-3.0 (3.1-3.0)
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)	8.2 (67.5)
完整度 (%)	87.7 (40.6)	99.9 (100.0)

通过观察相同角度的 SARS 冠状病毒主蛋白酶母体和复合体的活性位点电子密度图 (图 10) (蓝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 (青色表示), 提示可能有小分子化合物结合在蛋白质分子上。图 10a 中显示的是 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，图 10b 为 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晶体活性位点附近的电子密度。

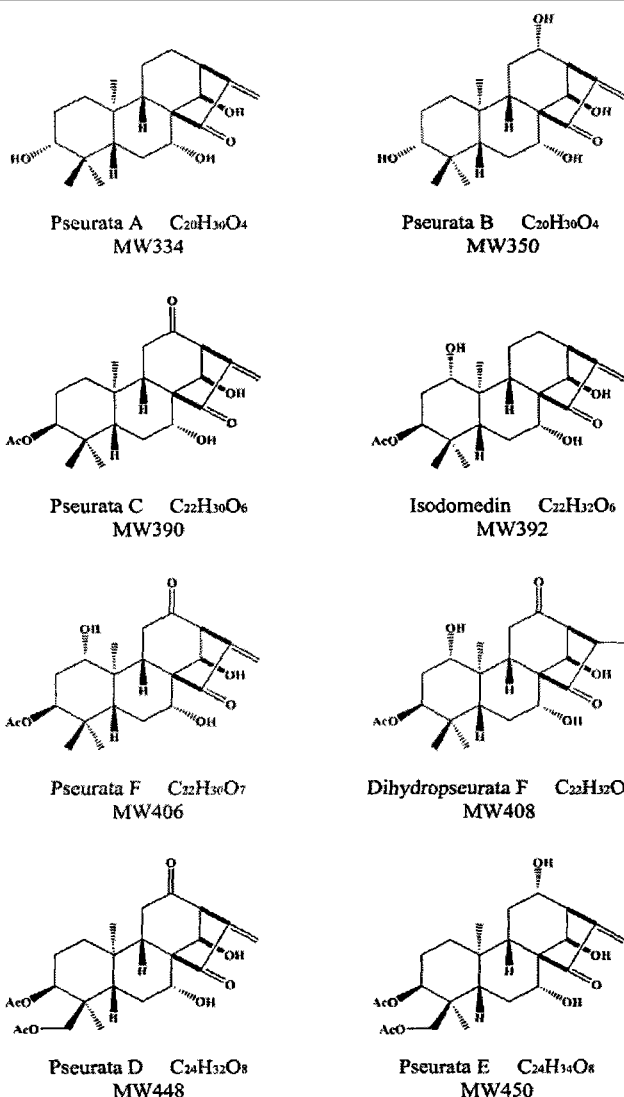
仔细观察该处的电子密度（如图 10 所示），我们可以发现存在于川藏香茶菜乙酸乙酯萃取物样品中的未知小分子的电子密度与 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性位点处 Cys145 的电子密度紧密结合在一起，提示我们这应该是小分子与 Cys145 的 γ 硫原子形成了共价键，从而抑制了 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性（如图 11 所示）。

6. 结合小分子的分析与鉴定

我们将 SARS 冠状病毒主蛋白酶（浓度为 12mg/ml 的 SARS 冠状病毒主蛋白酶水溶液）与川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品按照质量浓度比 1:1-1:4 的比例混合，并在 4°C—16°C 下作用 6—18 小时。将作用后的样品，13,000—15,000rpm 高速离心，弃去沉淀后备用于质谱分析。质谱采用 MALDI（matrix-assisted laser-desorption ionization）谱对样品进行分析，结果参见图 12。

从质谱的结果我们可以发现，在加入川藏香茶菜乙酸乙酯萃取物样品后，分子量出现了明显的偏移，这主要是因为蛋白质分子与川藏香茶菜乙酸乙酯萃取物样品中的小分子结合的原因。通过质谱结果可以计算（用较高的质谱峰值减去较低的质谱峰）发现，结合的小分子分子量约为 390Da。

通过分析已有的川藏香茶菜成分，我们发现，在该分子量水平上，主要存在如下所示的化合物：



我们可以发现在川藏香茶菜的主要成分中，在该分子量范围内，主要成分以二萜类化合物为主，包括川藏香茶菜甲、乙、丙、丁、戊、己素（分别对应上面 PseurataA、PseurataB、PseurataC、PseurataD、PseurataE、PseurataF），Isodomedin 和 Dihydropseurata）等。又由于结合在 SARS 冠状病毒主蛋白酶活性口袋处的小分子，和 Cys145 的 γ 硫原子形成了共价键，推知该小分子为 Michael 受体类小分子，具有 α ， β 共轭不饱和双键。

基于分子量和化学环境的分析，得出结论：结合的小分子为川藏香茶菜丙素或者 Isodomedin。

为了进一步验证，我们从中国科学院云南昆明植物所获得了川藏香茶菜丙素及 Isodomedin 的纯化合物，按照以上所述的方法制备川藏香茶菜丙素以及 Isodomedin 与 SARS 冠状病毒主蛋白酶复合体的晶体，并进行了数据收集（数

据统计结果示于表 2)。通过观察电子密度, 我们只在川藏香茶菜丙素浸泡过的 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体发现了相似电子密度, 如图 10.c 所示。因此可以确定, 从川藏香茶菜乙酸乙酯萃取样品中发现的与 SARS 冠状病毒主蛋白酶相结合的抑制剂小分子应为川藏香茶菜丙素。

在川藏香茶菜乙酸乙酯萃取物样品和川藏香茶菜丙素浸泡过的 SARS 冠状病毒主蛋白酶的晶体活性位点, 未知电子密度还有所区别, 主要是因为不同晶体的数据质量不同, 而且在川藏香茶菜乙酸乙酯萃取物样品中川藏香茶菜丙素的相对浓度比纯品肯定低, 因此可能占有率也有所下降。

因此, 可以确定结合的小分子即为川藏香茶菜丙素。

表 2: SARS 冠状病毒主蛋白酶母体、SARS 冠状病毒主蛋白酶与川藏香茶菜丙素的复合体数据收集统计

统计参数	SARS 冠状病毒主蛋白酶及相关复合体	
	SARS 冠状病毒主蛋白酶母体	SARS 冠状病毒主蛋白酶与川藏香茶菜丙素复合体
空间群	C2	C2
晶胞参数 (Å, °)	a = 108.4	a = 107.3
	b = 81.8	b = 83.3
	c = 53.6	c = 53.3
	$\beta = 104.7$	$\beta = 105.2$
分辨率 (Å)	50-1.50 (1.55-1.50)	50.0-2.4 (2.5-2.4)
所有衍射点	219,294	176,898
独立衍射点	63,241	19,456
冗余度	3.5 (2.5)	9.1 (5.3)
I/ σ (I)	30.4 (2.0)	15.2 (4.1)
Rmerge (%)	3.8 (28.6)	5.4 (56.6)
完整度 (%)	87.7 (40.6)	99.9 (100.0)

由此, 我们获得了 SARS 冠状病毒主蛋白酶与川藏香茶菜丙素复合体的精

细三维结构。

这里，我们可以看到本发明的新方法与传统的抑制剂筛选方法相比，能够对筛选效率有极大的提高。按照我们的方法，（1）仅需要筛选一次就可以从川藏香茶菜乙酸乙酯萃取物中快速发现能够与 SARS 冠状病毒主蛋白酶结合的小分子，（2）该小分子是川藏香茶菜乙酸乙酯萃取物中与 SARS 冠状病毒主蛋白酶的结合能力最好的小分子，（3）无需在抑制剂筛选时制备众多的纯品化合物；而如果利用传统方法，不仅需要在进行筛选前分离提取制备出至少 8 种化合物，而且需要至少进行 8 次的活性测定、并进行至少 8 次晶体浸泡实验等，才有可能发现结合能力最好的小分子化合物。

7、川藏香茶菜丙素对 SARS 冠状病毒的主蛋白酶抑制活性的测定

我们使用纯品化合物小分子（川藏香茶菜丙素），测定了其对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性。川藏香茶菜丙素对 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 μ M），川藏香茶菜丙素（终浓度为：20 μ M），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（结果示于图 13）。然后改变川藏香茶菜丙素的浓度，在 2 μ M 测定其对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性（结果示于图 14）。对照：不加入备选样品，其余条件相同。活性测定结果见图 13—图 14。从图 13—图 14 中可以发现，20 μ M 的川藏香茶菜丙素对 SARS 冠状病毒主蛋白酶具有较强的抑制活性，当其浓度为 2 μ M 时对 SARS 冠状病毒主蛋白酶仍然有抑制活性。这就说明中药川藏香茶菜里面含有的川藏香茶菜丙素能够有效的抑制 SARS 冠状病毒主蛋白酶的活性，也说明川藏香茶菜丙素有可能成为治疗 SARS 冠状病毒的有效药物。

8、川藏香茶菜丙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，加入所述蛋白酶（0.5 μM ），川藏香茶菜丙素（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 2 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 15—图 16 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. 川藏香茶菜丙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，加入所述蛋白酶（1 μM ），川藏香茶菜丙素（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 17-图 18 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 13—图 18 可以看出，川藏香茶菜丙素对 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，可以推断川藏香茶菜丙素对整个冠状病毒家族的主蛋白酶都有抑制活性。

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。

序 列 表

<110> 南开大学、清华大学、中国科学院生物物理研究所

<120> 从中药等天然产物混合物备选库中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的新方法

<160> 2

<210> 1

<211> 306

<212> prt

<213> SARS 冠状病毒 (SARS Coronavirus)

<400> 1

Ser Gly Phe Arg Lys Met Ala Phe Pro Ser Gly Lys Val Glu Gly Cys
 1 5 10 15

Met Val Gln Val Thr Cys Gly Thr Thr Thr Leu Asn Gly Leu Trp Leu
 20 25 30

Asp Asp Thr Val Tyr Cys Pro Arg His Val Ile Cys Thr Ala Glu Asp
 35 40 45

Met Leu Asn Pro Asn Tyr Glu Asp Leu Leu Ile Arg Lys Ser Asn His
 50 55 60

Ser Phe Leu Val Gln Ala Gly Asn Val Gln Leu Arg Val Ile Gly His
 65 70 75 80

Ser Met Gln Asn Cys Leu Leu Arg Leu Lys Val Asp Thr Ser Asn Pro
 85 90 95

Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Phe Val Arg Ile Gln Pro Gly Gln Thr Phe
 100 105 110

Ser Val Leu Ala Cys Tyr Asn Gly Ser Pro Ser Gly Val Tyr Gln Cys

115	120	125	
Ala Met Arg Pro Asn His Thr Ile Lys Gly Ser Phe Leu Asn Gly Ser			
130	135	140	
Cys Gly Ser Val Gly Phe Asn Ile Asp Tyr Asp Cys Val Ser Phe Cys			
145	150	155	160
Tyr Met His His Met Glu Leu Pro Thr Gly Val His Ala Gly Thr Asp			
	165	170	175
Leu Glu Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Phe Val Asp Arg Gln Thr Ala Gln			
	180	185	190
Ala Ala Gly Thr Asp Thr Thr Ile Thr Leu Asn Val Leu Ala Trp Leu			
195	200	205	
Tyr Ala Ala Val Ile Asn Gly Asp Arg Trp Phe Leu Asn Arg Phe Thr			
210	215	220	
Thr Thr Leu Asn Asp Phe Asn Leu Val Ala Met Lys Tyr Asn Tyr Glu			
225	230	235	240
Pro Leu Thr Gln Asp His Val Asp Ile Leu Gly Pro Leu Ser Ala Gln			
245	250	255	
Thr Gly Ile Ala Val Leu Asp Met Cys Ala Ala Leu Lys Glu Leu Leu			
260	265	270	
Gln Asn Gly Met Asn Gly Arg Thr Ile Leu Gly Ser Thr Ile Leu Glu			
275	280	285	
Asp Glu Phe Thr Pro Phe Asp Val Val Arg Gln Cys Ser Gly Val Thr			
290	295	300	
Phe Gln			
305			

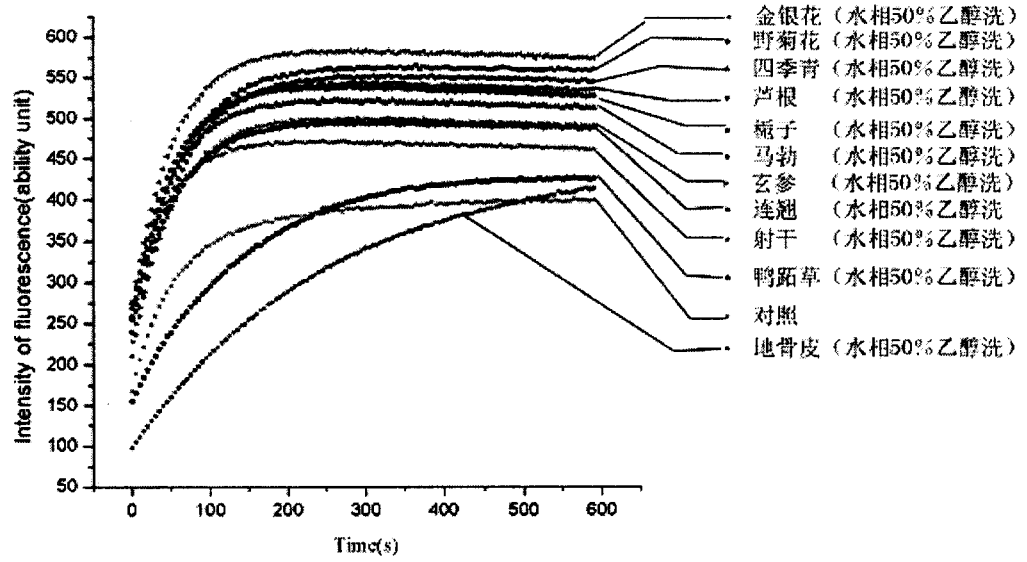


图 1

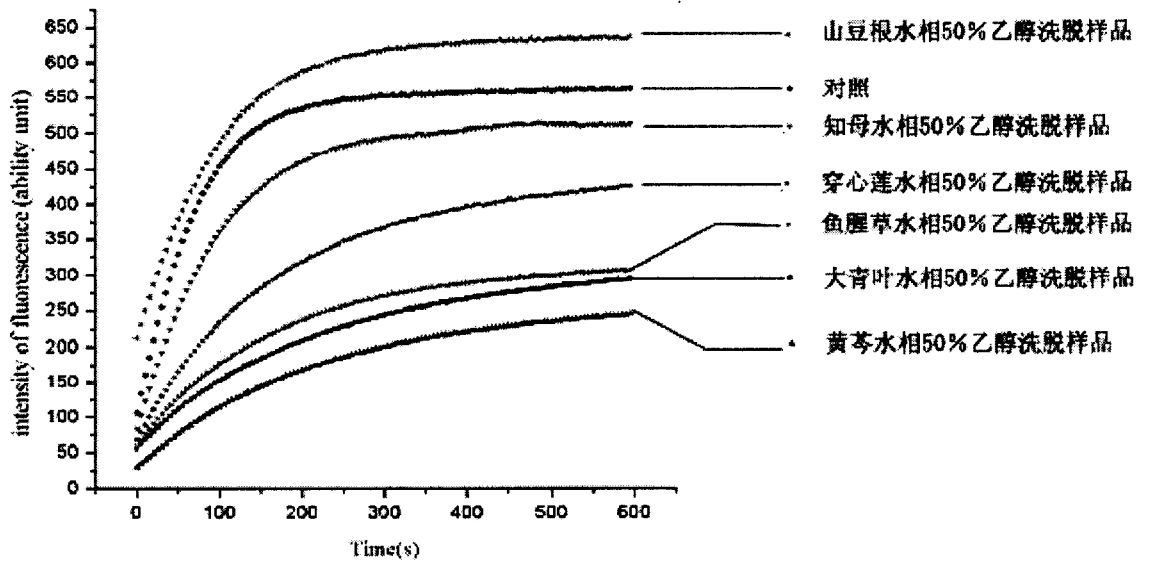


图 2

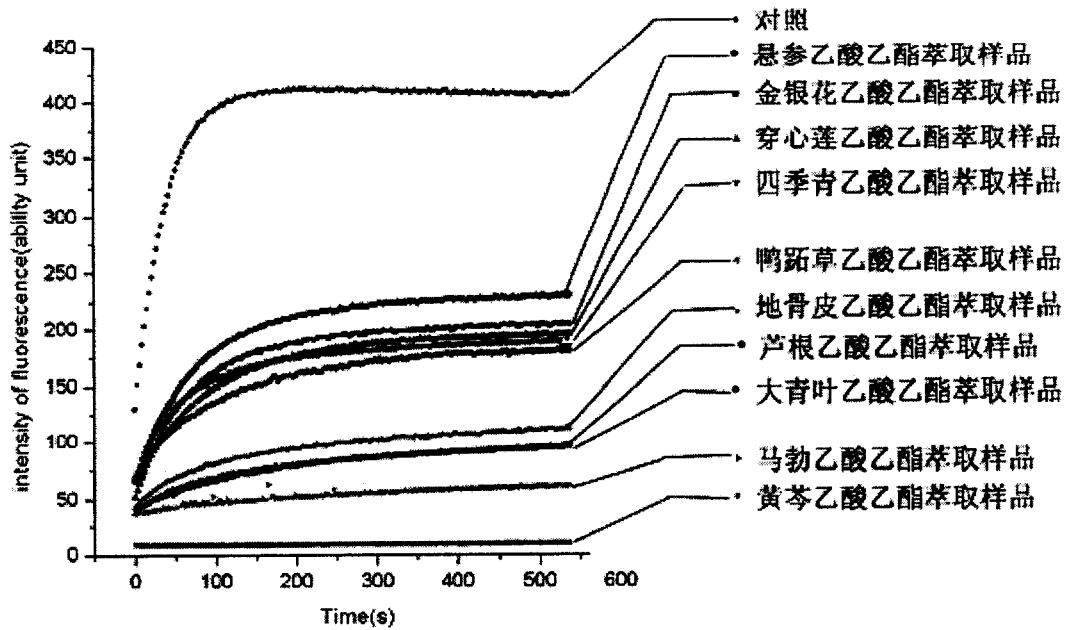


图 3

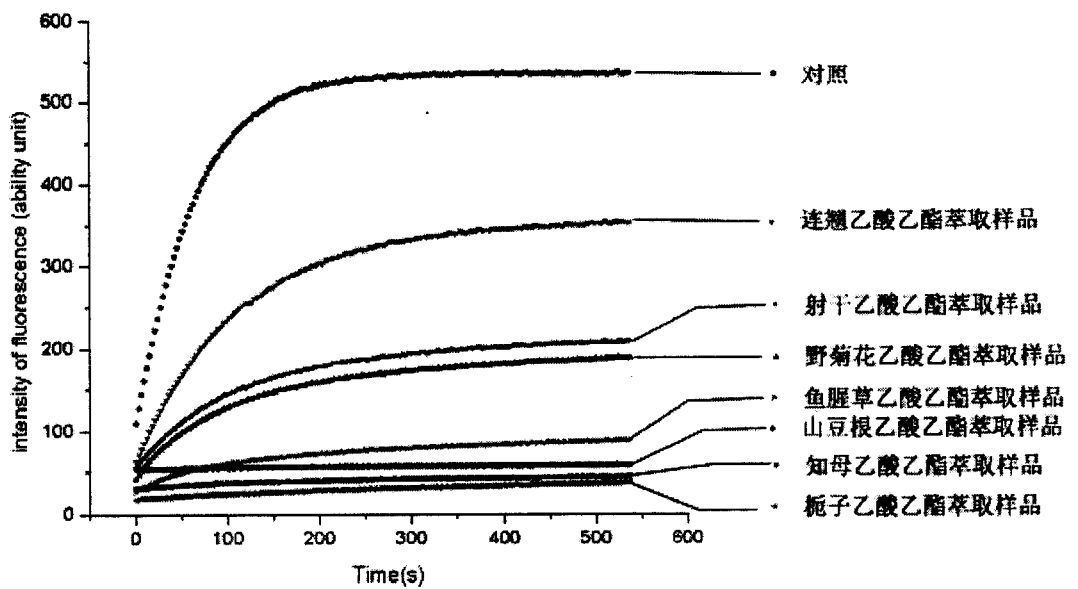


图 4

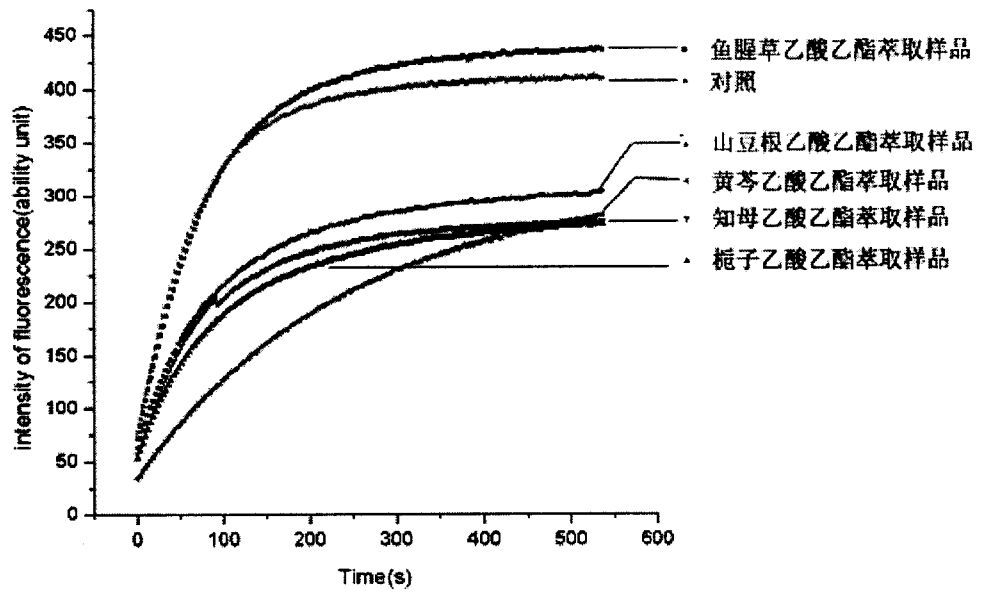


图 5

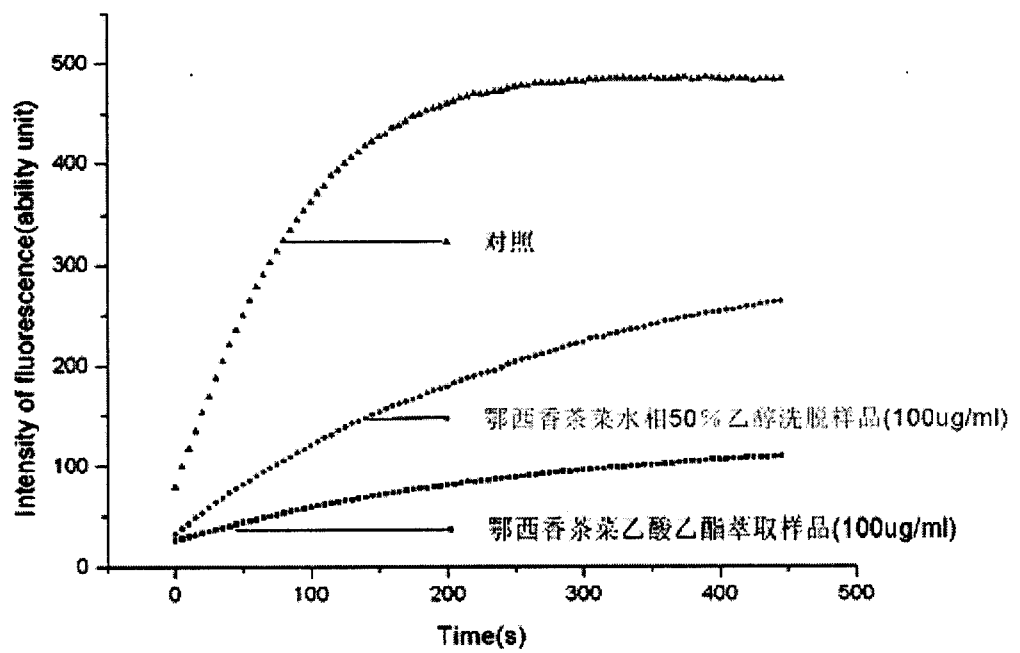


图 6

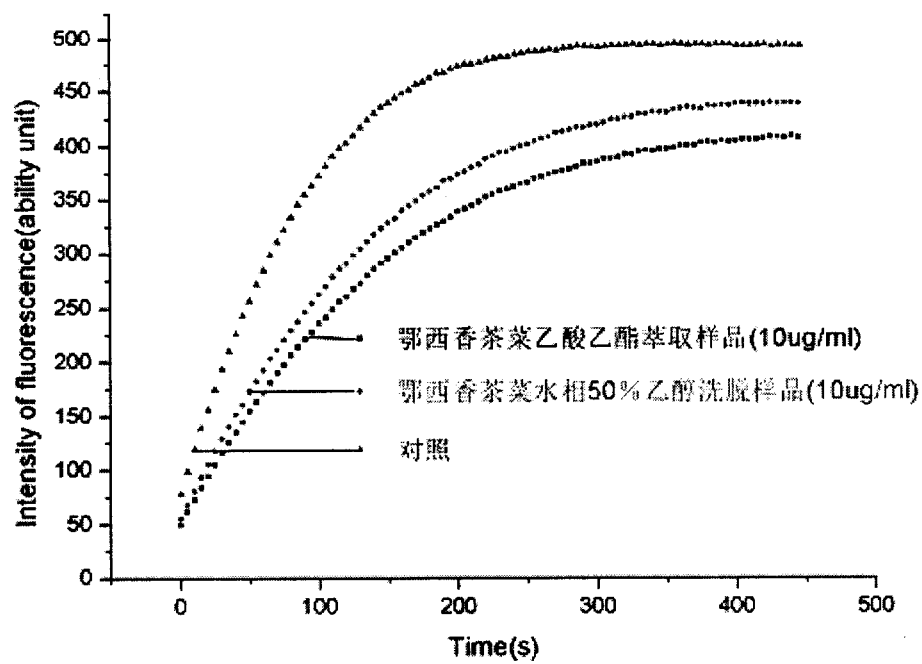


图 7

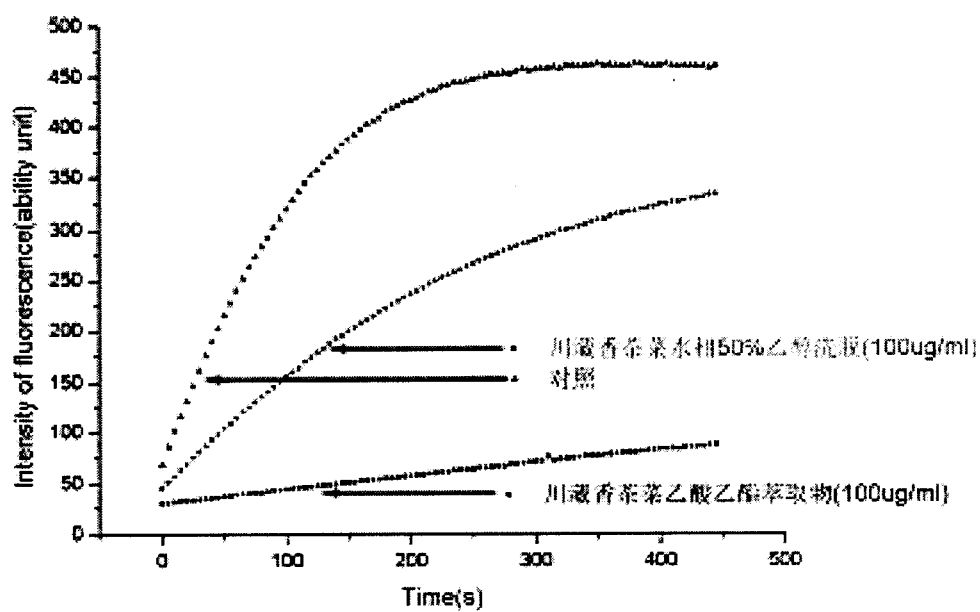


图 8

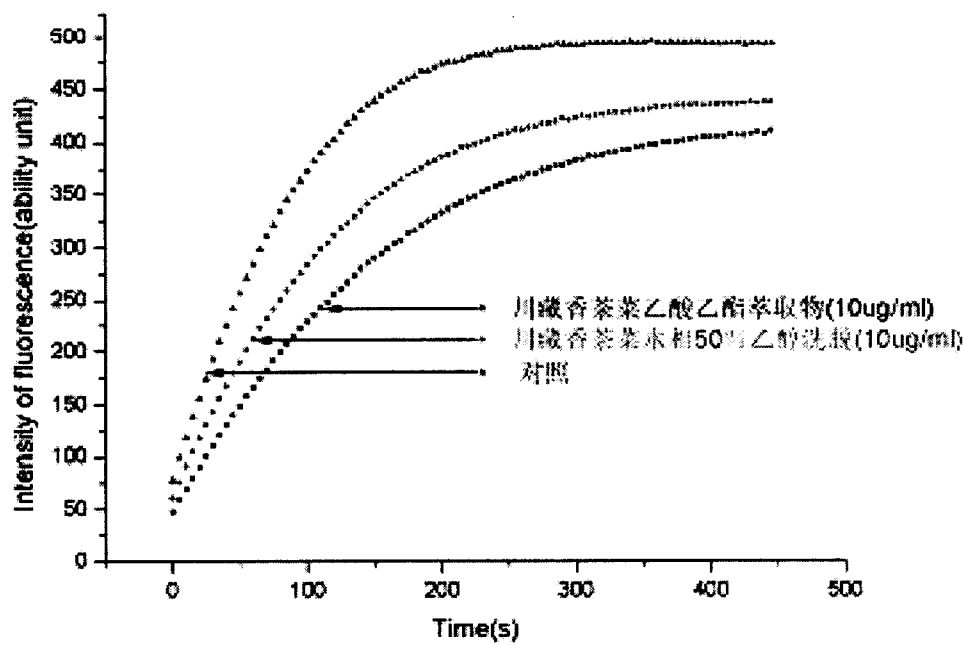


图 9

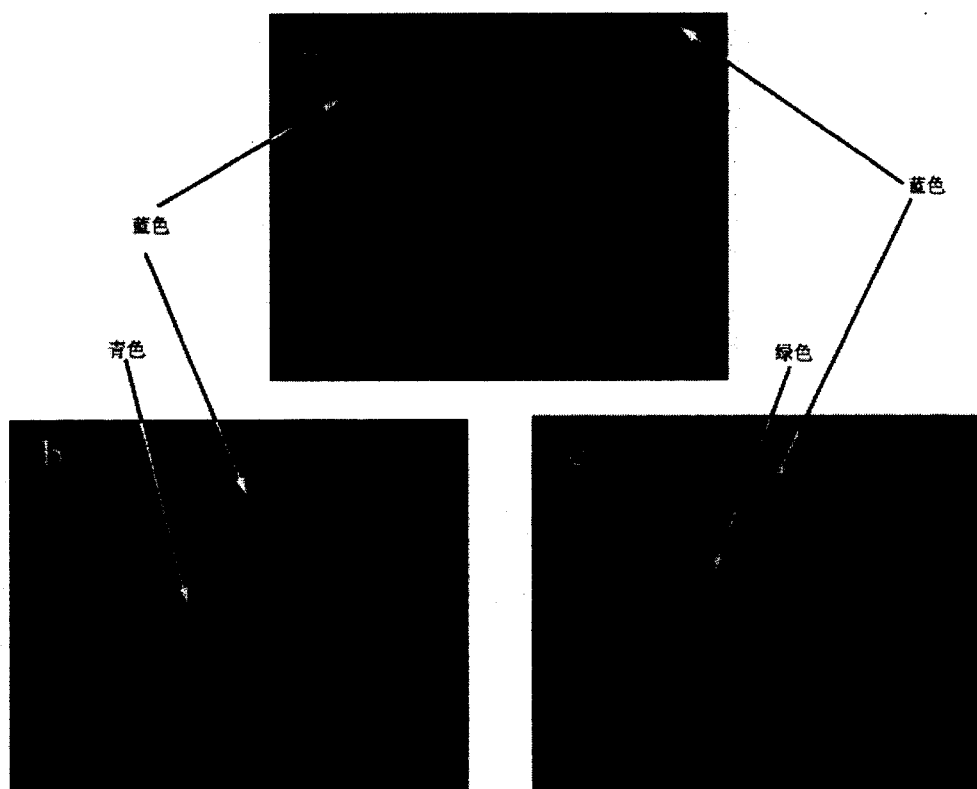


图 10



图 11

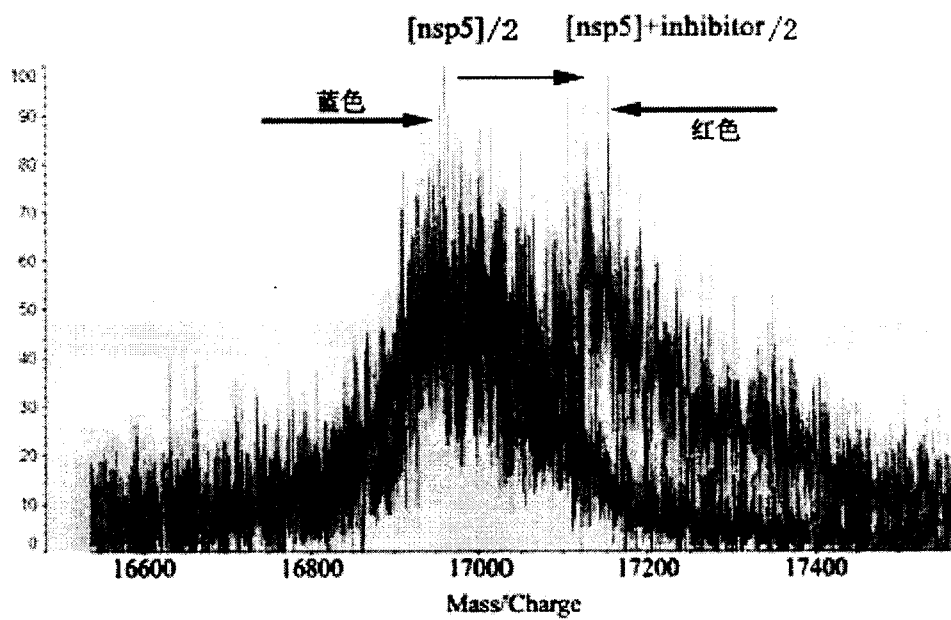


图 12

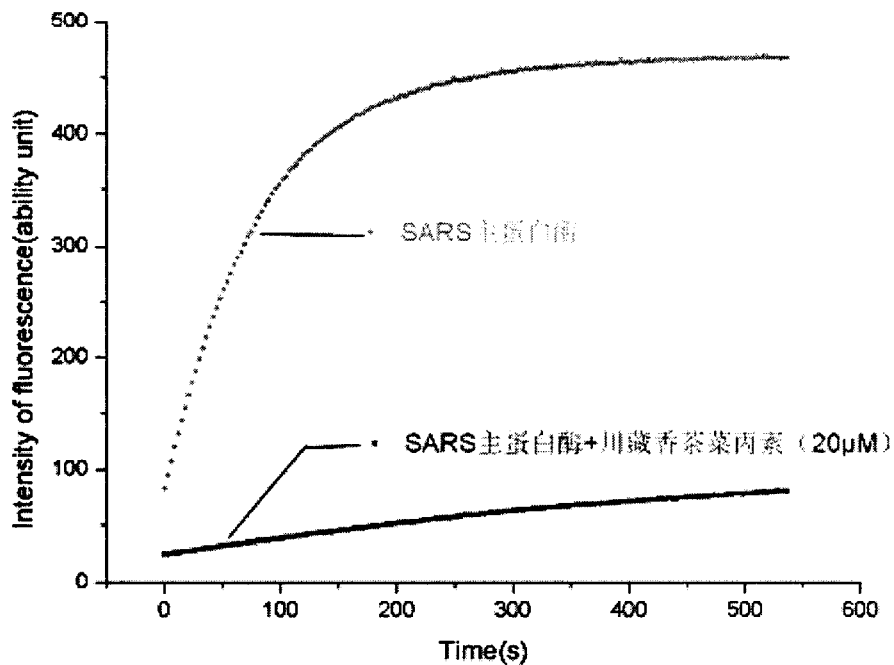


图 13

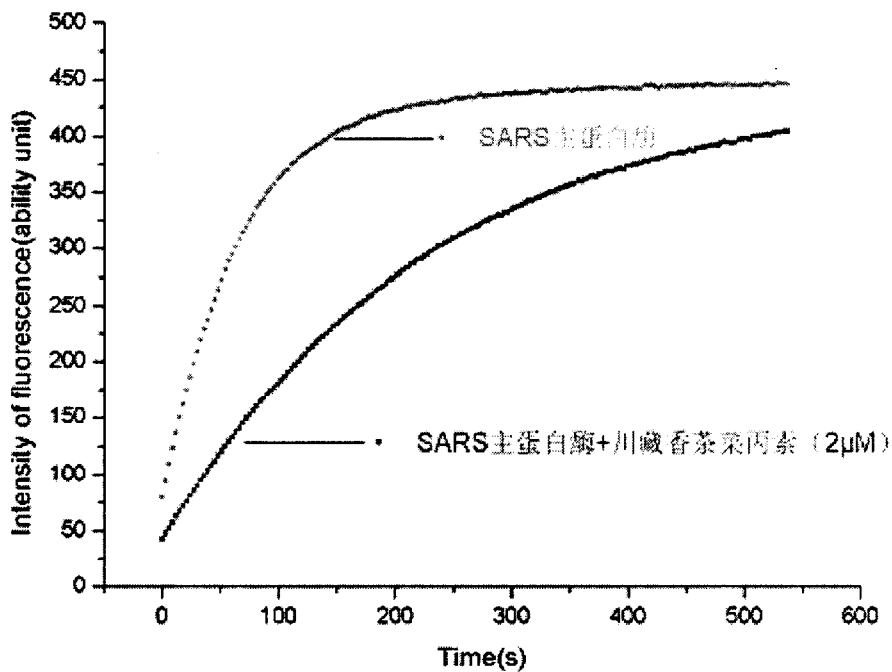


图 14

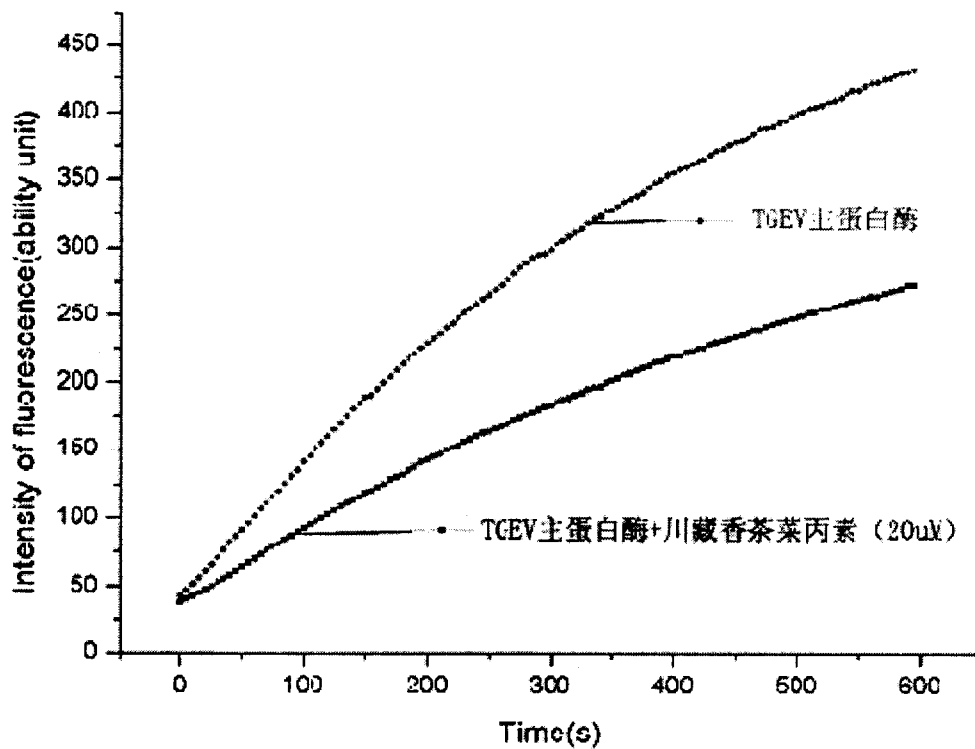


图 15

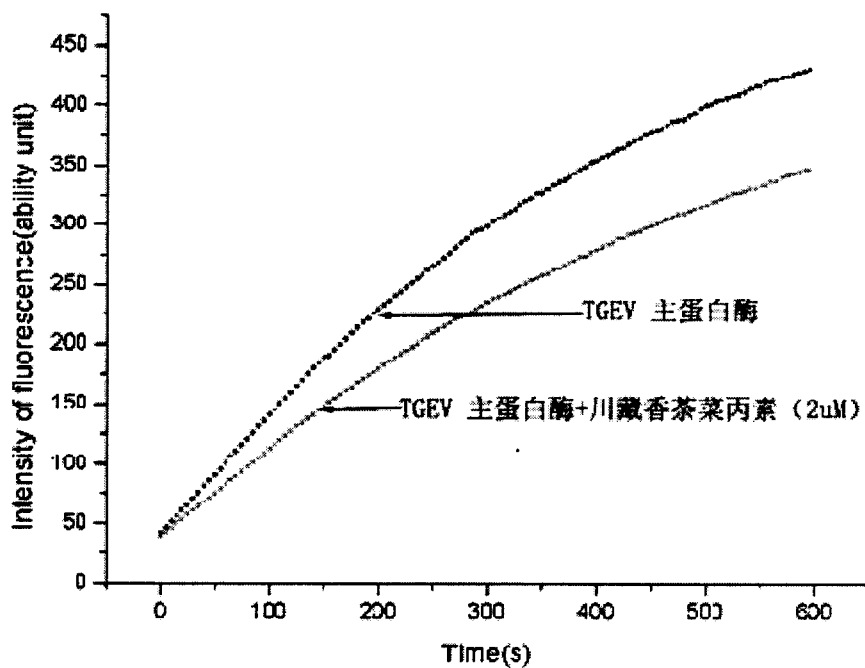


图 16

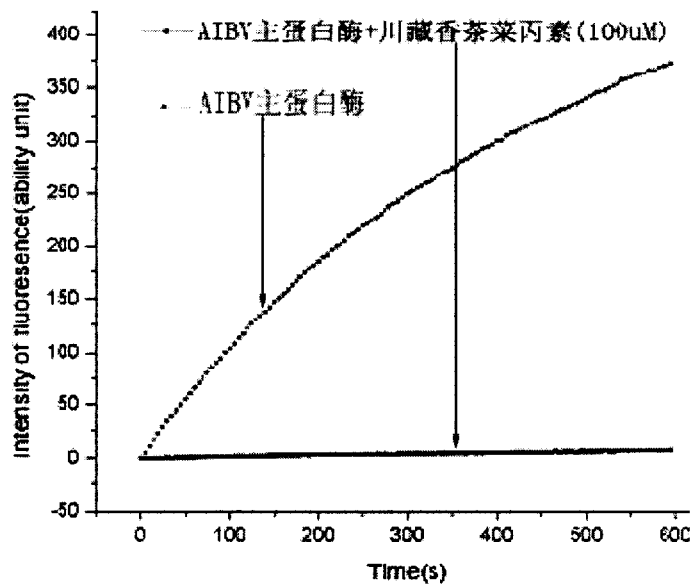


图 17

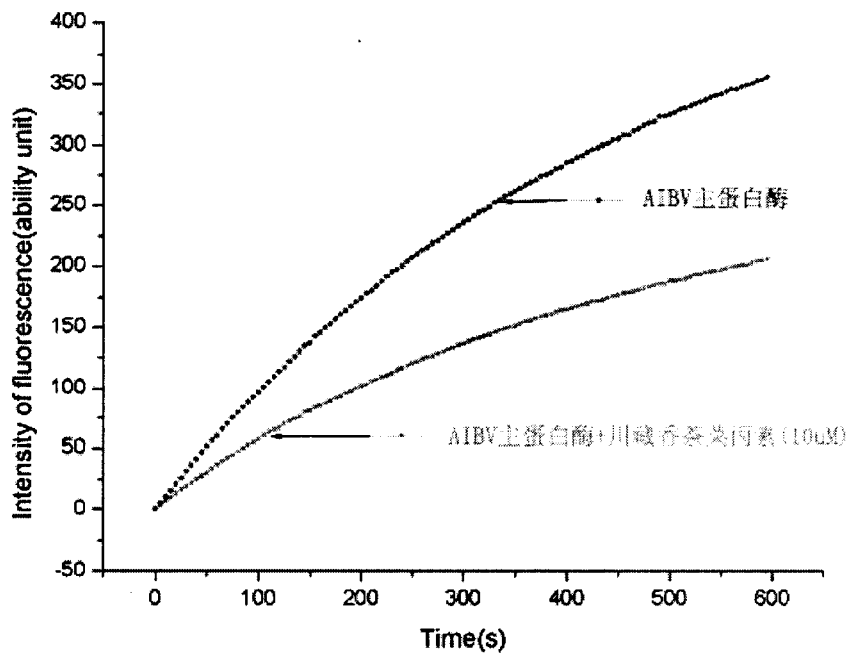


图 18