

[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 200710065245.2

[51] Int. Cl.

C40B 30/04 (2006.01)

A61K 36/30 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 11 月 7 日

[11] 公开号 CN 101067213A

[22] 申请日 2007.4.9

[21] 申请号 200710065245.2

[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 张 畅

[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

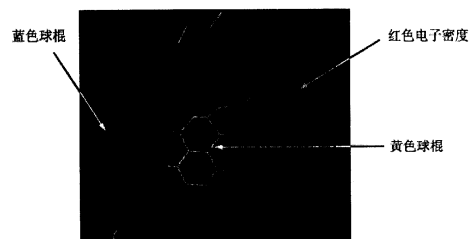
权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 2 页

[54] 发明名称

从中药等天然产物混合物备选库中筛选 HCV NS5B 蛋白的抑制剂的新方法

[57] 摘要

本发明提供了一种从天然产物混合物备选库中筛选 HCV NS5B 蛋白的抑制剂的新方法，将 HCV NS5B 蛋白的晶体与“有抑制活性的样品”接触，得到 HCV NS5B 蛋白与小分子抑制剂复合体的晶体，以小分子抑制剂的电子密度为基础，鉴定与 HCV NS5B 蛋白结合的小分子抑制剂，从而获得小分子抑制剂与 HCV NS5B 蛋白复合体的精细三维结构。本发明筛选得到了 HCV NS5B 蛋白的小分子抑制剂乙酰紫草素。乙酰紫草素可用于制备治疗或者预防 HCV 感染的药物。



1、从天然产物混合物备选库中筛选 HCV NS5B 蛋白的抑制剂的方法，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 HCV NS5B 蛋白的抑制活性，获得对 HCV NS5B 蛋白 “有抑制活性的样品”，将 HCV NS5B 蛋白的晶体与 “有抑制活性的样品” 接触，得到 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白结合的小分子抑制剂的电子密度为基础，鉴定与 HCV NS5B 蛋白结合的小分子抑制剂，获得小分子抑制剂与 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白的抑制活性。

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，其制备方法包括如下步骤：

(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。

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 所述的方法，其特征在于在步骤 A 中：HCV NS5B 蛋白晶体与“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 所述的方法，其特征在于在步骤 A 中：HCV NS5B 蛋白的晶体与“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”接触。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其中所述的 HCV NS5B 蛋白的晶体是按如下结晶条件制备的：20-25%PEG4000，10%甘油，5mM DTT，50mM MES pH5.0~6.0。

10、根据权利要求 9 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。

11、根据权利要求 10 所述的方法，其中所述中药为：紫草、板蓝根、香附、

荔枝核、山药、地骨皮、石韦、天花粉、百部、辛夷、桑枝、虎帐。

12、根据权利要求 1-11 中任一项的方法获得的 HCV NS5B 蛋白-乙酰紫草素复合体的晶体。

13、根据权利要求 1-11 中任一项所述的方法筛选出的小分子抑制剂是乙酰紫草素。

14、紫草在制备用于治疗或预防 HCV 感染的药物中的用途。

15、乙酰紫草素在制备用于治疗或者预防 HCV 感染的药物中的用途。

从中药等天然产物混合物备选库中筛选 HCV NS5B 蛋白的抑制剂的新方法 技术领域

本发明涉及药物的筛选方法，更具体而言，涉及以 HCV NS5B 蛋白的晶体结构为基础，从中药等天然产物混合物备选库中筛选 HCV NS5B 蛋白的抑制剂的新方法及基于此方法发现的 HCV NS5B 蛋白的抑制剂。

背景技术

HCV (Hepatitis C Virus) 属于黄病毒科 (flaviviridae)，是丙型肝炎的病原体。由于缺乏疫苗和有效的治疗药物，HCV 感染已经成为一种世界性的流行病。由于缺乏合适的动物模型和组织培养系统，目前还不能有效的进行病毒的扩增和相应的病毒学研究，因此开发针对 HCV 的特效药物成为一个世界性的难题。

随着一些 HCV 复制过程中的重要蛋白以及这些蛋白与相关配体或抑制剂的精确三维结构的解析，基于这些蛋白的三维结构设计、筛选治疗 HCV 感染的药物，成为目前开发治疗 HCV 药物的重要手段。NS5B 是 HCV 的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)，在 HCV 复制过程中起着关键的作用 (Behrens, S. E 等人 EMBO J 1996: 15(1)12-22)。但全长的 HCV NS5B 蛋白溶解性较差，Ferrari 等为提高 NS5B 的溶解性，在构建 NS5B 表达载体时切除了 C 端的 21 个氨基酸 (称为 HCV NS5B Δ 21)，在 *E.Coli* 中获得了保持酶活性的高度可溶的蛋白 (Ferrari, 等人 1999)。虽然在 HCV 不同的基因型和亚型中，NS5B 的蛋白质序列不尽相同，但是相关活性位点却非常保守，这就为我们从已解析结构的 NS5B 出发，筛选针对不同基因型的 HCV 的药物提供了重要的依据。

到目前为止，在 NCBI PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上可以检索到与 HCV NS5B 抑制剂相关的文章已有 53 篇，但是在蛋白质结构数据库 (Protein Database Bank, PDB) 中能够检索到的 NS5B 与抑制剂结合的复合物的三维结构只有 15 个，也就是说相当一部分抑制剂的开发只进行到体外酶活测定阶段，而没有得到相应的抑制剂与蛋白质结合的复合体三维结构，因此没有给出这些抑制剂抑制 HCV NS5B 蛋白确切的分子机制。

目前还没有以 HCV NS5B 蛋白的晶体结构为基础，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 HCV NS5B 蛋白的抑制剂的技术。

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 HCV NS5B 蛋白结合，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于 HCV NS5B 蛋白的抑制机理。

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 HCV NS5B 蛋白的抑制剂的方法，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 HCV NS5B 蛋白的抑制活性，获得对 HCV NS5B 蛋白有抑制活性的样品，这些样品称为“有抑制活性的样品”，将 HCV NS5B 蛋白的晶体与“有抑制活性的样品”接触，得到 HCV NS5B 蛋白与小分子抑制剂复合体的晶体。HCV NS5B 蛋白的晶体与“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 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白结合的小分子抑制剂的电子密度。

获得与 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白结合的小分子抑制剂的电子密度为基础，鉴定与 HCV NS5B 蛋白结合的小分子抑制剂，获得小分子抑制剂与 HCV NS5B 蛋白复合体的精细三维结构。

本发明的实施方案中，在步骤 C 之后还包括步骤 D：测定小分子抑制剂对 HCV NS5B 蛋白的抑制活性。

本发明中用来筛选 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白的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 HCV NS5B 蛋白的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 HCV NS5B 蛋白的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：紫草、板蓝根、香附、荔枝核、山药、地骨皮、石韦、天花粉、百部、辛夷、桑枝、虎帐。

此外，本发明提供的从天然产物混合物备选库中筛选 HCV NS5B 蛋白的抑制剂的方法，更优选在步骤 A 中：HCV NS5B 蛋白的晶体与“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。

本发明还提供了 HCV NS5B 蛋白的表达、纯化和晶体生长的方法：

构建在 pET-21b 载体上的 HCV NS5B Δ 21: genotype1b, isolate BK (丙型肝炎病毒基因型 1b 分离株 BK 缺失 C 端 21 个残基的 NS5B: 氨基酸序列见序列表部分) 质粒获赠于中科院生物物理所高光谱教授实验室，该质粒在大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中表达后进行进一步分离纯化参见 (Ago, 等人 1999)。但在实验中，我们发现该方法的步骤较为繁琐，而且损失蛋白较多，不利于进行抑制剂筛选的目的，因此对实验步骤进行了改进，流程如下所示：

(1) 将上述构建在 pET-21b 载体上的 HCV NS5B Δ 21 质粒转化至 E. coli BL21 (DE3) 菌株，并用 LB 平板 (含 100 mg/L 氨苄青霉素) 筛选阳性克隆。

(2) 在(1)中所述的平板上挑取阳性克隆培养过夜后转入 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 200 μ M 左右的 IPTG，在 16 $^{\circ}$ C 培养 12 小时左右。

(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 13000—15000 rpm 离心 20—40 min 后收集上清液。

(4) 将上清液加入 MCAC-0 预平衡的 Ni NTA 亲和层析柱 (GE 公司) 中，用 MCAC-20 淋洗 20—30 个柱床体积去除杂蛋白。最后加入 MCAC-500 冲洗 10 个柱床体积，收集 HCV NS5B 蛋白。

(5) 将 (4) 获得的蛋白换至离子交换的低盐缓冲液 (300mM NaCl, 20mM MES pH 6.5)，再用 Resource S (GE 公司) 阳离子交换层析进行纯化。

(6) 将(5)中获得的 HCV NS5B 蛋白换至结晶缓冲液 (600 mM NaCl, 10%(v/v) 甘油, 5mM DTT, 10mM Tris-HCl pH 7.5)，并浓缩至 30mg/ml，于 -80 $^{\circ}$ C 冻存，备用于晶体生长。

(7) HCV NS5B 的晶体生长参考文献 (Ago 等人 1999)，并进行了初步的实验，结果发现在文献中报道的蛋白结晶条件下 (21—28% (w/v) polyethylene (PEG) 4000, 0.2—0.35 M ammonium acetate, 0.1 M sodium acetate, and 0.02 M TES (pH 6.0—7.5).) 虽然能够生长出文献报道的晶体，但是该晶体不但尺寸较小，孪

晶现象严重，而且很难得到衍射质量好的晶体（图 1.a），不利于我们进行进一步的晶体浸泡和共结晶试验，从而进行相应的抑制剂筛选工作。因此我们对结晶条件进行了相应的改进，结晶条件如下：20-25%(w/v) PEG4000，10%(v/v)甘油，5mM DTT，50mM MES pH5.0~6.0。在该结晶条件和 25~30mg/ml 的蛋白浓度下，得到尺寸较大（通常能够达到 $3 \times 1.5 \times 1$ mm，图 1.b）、衍射分辨率较高（高于 2.6Å）的晶体。

在一个实施方案中，本发明获得了 HCV NS5B 蛋白-乙酰紫草素复合体的晶体。

在另一个实施方案中，本发明筛选得到了 HCV NS5B 蛋白的小分子抑制剂乙酰紫草素。

在另一个实施方案，本发明提供紫草在制备用于治疗或预防 HCV 感染的药物中的用途。

在另一个实施方案中，本发明提供乙酰紫草素在制备用于治疗或者预防 HCV 感染药物中的用途。乙酰紫草素能够有效抑制 HCV NS5B 蛋白的活性，可用于治疗或者预防 HCV 感染。

在另一个实施方案中，本发明提供了能够有效抑制 HCV NS5B 蛋白活性的紫草乙酸乙酯萃取样品、山药乙酸乙酯萃取样品、虎帐乙酸乙酯萃取样品 3 种中药样品及其制备方法。

本发明选取 HCV 中晶体结构已知的 NS5B 蛋白，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—HCV NS5B 蛋白进行竞争性的结合，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 HCV NS5B 蛋白的晶体结构为基础，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 HCV NS5B 蛋白的特异性的抑制剂，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中的样品适宜于进行 HCV NS5B 蛋白的体外活性测定和 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 HCV NS5B 蛋白的晶体作为诱饵，浸泡有活性的天然产物混合物样品，可以把对 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白的抑制机理。。

(3) 使用本发明方法，通过使用 HCV NS5B 蛋白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 HCV NS5B 蛋白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 是本发明中所述的对于 HCV NS5B 晶体进行改进后的结果。其中 a 为按照文献 (Ago, Adachi 等人, 1999) 中描述的结晶溶液进行晶体生长后 HCV NS5B 的晶体，b 为对该文献中的结晶溶液进行改进后进行晶体生长后 HCV NS5B 的晶体

图 2 是紫草、板蓝根、香附、荔枝核、山药、地骨皮、石韦、天花粉、百部、辛夷、桑枝、虎帐 12 种药材的乙酸乙酯萃取样品对 HCV NS5B 蛋白的抑制活性曲线图。A1: 紫草乙酸乙酯样品、A2: 板蓝根乙酸乙酯样品、A3: 香附乙酸乙酯样品、A4: 荔枝核乙酸乙酯样品、A5: 山药乙酸乙酯样品、A6: 地骨皮乙酸乙酯样品、A7: 石韦乙酸乙酯样品、A8: 天花粉乙酸乙酯样品、A9: 百部乙酸乙酯样品、A10: 辛夷乙酸乙酯样品、A11: 桑枝乙酸乙酯样品、A12: 虎帐乙酸乙酯样品、A13: 对照。T5: 时间为 5 分钟时取样、T10: 时间为 10 分钟时取样、T15: 时间为 15 分钟时取样、T20: 时间为 20 分钟时取样。a:20 μ g/mL:12 个中药乙酸乙酯样品浓度为 20 μ g/mL。b:10 μ g/mL:12 个中药乙酸乙酯样品浓度为 10 μ g/mL。

图 3 是 HCV NS5B 蛋白 His502 活性位点附近电子密度对比图。a 为母体活性位点的电子密度；b 为浸泡过紫草乙酸乙酯萃取物之后该处的电子密度，c 为

b 旋转 90°后的显示。图中 $2fofc$ 电子密度为 1.0σ ， $1fofc$ 差值电子密度为 2.3σ 。

图 4 是乙酰紫草素与未知电子密度的吻合。蓝色球棍为蛋白质的氨基酸残基。红色表示未知电子密度。黄色球棍为乙酰紫草素的结构式。

具体实施方式

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。

实施例 1

1、 HCV NS5B 蛋白的表达、纯化和晶体生长

构建在 pET-21b 载体上的 HCV NS5B $\Delta 21$: genotype1b, isolate BK (丙型肝炎病毒基因型 1b 分离株 BK 缺失 C 端 21 个残基的 NS5B: 氨基酸序列见序列表部分) 质粒获赠于中科院生物物理所高光侠教授实验室, 该质粒在大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中表达后进行进一步分离纯化参见 (Ago, 等人 1999)。但在实验中, 我们发现该方法的步骤较为繁琐, 而且损失蛋白较多, 不利于进行抑制剂筛选的目的, 因此对实验步骤进行了改进, 流程如下所示:

(1) 将上述构建在 pET-21b 载体上的 HCV NS5B $\Delta 21$ 质粒转化至 E. coli BL21 (DE3) 菌株, 并用 LB 平板 (含 100 mg/L 氨苄青霉素) 筛选阳性克隆。

(2) 在(1)中所述的平板上挑取阳性克隆培养过夜后转入 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 200 μ M 左右的 IPTG, 在 16°C 培养 12 小时左右。

(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 13000-15000 rpm 离心 20-40 min 后收集上清液。

(4) 将上清液加入 MCAC-0 预平衡的 Ni NTA 亲和层析柱 (GE 公司) 中, 用 MCAC-20 淋洗 20-30 个柱床体积去除杂蛋白。最后加入 MCAC-500 冲洗 10 个柱床体积, 收集 HCV NS5B 蛋白。

(5) 将 (4) 获得的蛋白换至离子交换的低盐缓冲液 (300mM NaCl, 20mM MES pH 6.5), 再用 Resource S (GE 公司) 阳离子交换层析进行纯化。

(6) 将(5)中获得的 HCV NS5B 蛋白换至结晶缓冲液 (600 mM NaCl, 10% (v/v) 甘油, 5mM DTT, 10mM Tris-HCl pH 7.5), 并浓缩至 30mg/ml, 于 -80°C 冻存, 备用于晶体生长。

(7)HCV NS5B 的晶体生长: 结晶条件如下: 20-25%(w/v) PEG4000, 10%(v/v) 甘油, 5mM DTT, 50mM MES pH5.0~6.0。在该结晶条件和 25~30mg/ml 的蛋白浓度下, 得到尺寸较大 (通常能够达到 $3 \times 1.5 \times 1$ mm, 图 1.b)、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

源自紫草 (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb.et Zucc.) 的天然产物混合物备选样品的制备

(1) 制备紫草提取物浸膏:

取 500 克干燥粉碎的紫草药材, 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) 制得紫草乙酸乙酯萃取样品:

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 型旋转蒸发器蒸除溶剂, 得干膏状紫草乙酸乙酯萃取样品, 备用;

(3) 制得紫草水相大孔树脂 50%乙醇洗脱样品:

萃取后的水相部分用 EYELA N1001 型旋转蒸发器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 型旋转蒸发器蒸除溶剂, 得干膏状紫草水相大孔树脂 50%乙醇洗脱样品, 备用;

(4) 获得源自紫草的天然产物混合物备选样品:

上述步骤 (2) 制得的紫草乙酸乙酯萃取样品、步骤 (3) 制得的紫草水相大孔树脂 50%乙醇洗脱样品组成了源自初级原料: 紫草的 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 11 种 (板蓝根、香附、荔枝核、山药、地骨皮、石韦、天花粉、百部、辛夷、桑枝、虎帐) 中药的 22 个天然产物混合物备选样品的制备按照源自紫草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 24 个天然产物混合物备选样品组成了本发明的用于进行 HCV NS5B 蛋白的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 HCV NS5B 蛋白抑制活性测定

HCV NS5B 的体外活性测定方法参见 (Robert A. 等人. *Journal of Virology*, July 2003:7575-7581)。

按照本发明制备的用于进行 HCV NS5B 蛋白的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 24 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 24 个天然产物混合物备选样品的 DMSO 溶解物。

天然产物混合物备选样品对 HCV NS5B 的抑制活性如下测定: 在缓冲溶液 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM MgCl₂, 0.5mM MnCl₂, 1mM DTT, 1mg/ml polyA, 1mg/ml OligodT (18 个 T), 1mg/ml UTP, 1mg/ml P³²-UTP 中加入 HCV NS5B 蛋白 (终浓度 0.8μg/ml), 天然产物混合物备选样品的 DMSO 溶解物 (如紫草乙酸乙酯萃取样品的 DMSO 溶解物) (终浓度 20ug/ml、10ug/ml), 每 5 分钟取样一次, 将到达取样时间的 2-4μl 反应后的溶液滴于处理好的 DEAE 滤纸上以终止反应。当反应完成后, 用 2×SSC 溶液和 95% 乙醇先后洗涤 DEAE 滤纸 4 次, 以除去残余 P³²-UTP, 晾干后, 使用 PhosphorImage 或者底片曝光, 以测定中药混合物备选样品对 HCV NS5B 的抑制活性, 结果示于图 2。由图 2 可以看出紫草、山药、虎帐的乙酸乙酯萃取样品对 HCV NS5B 蛋白有较好的抑制活性。选定这些样品进行下一步的晶体浸泡工作。

4. HCV NS5B 蛋白的晶体浸泡紫草乙酸乙酯萃取样品

由于用于 HCV NS5B 蛋白的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 HCV NS5B 蛋白结晶体系的影响较大, 无法获得

衍射质量好、数量充足的 HCV NS5B 蛋白的晶体，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 HCV NS5B 蛋白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，提高浸泡时紫草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 HCV NS5B 蛋白的晶体的浸泡液。

方法一、将紫草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 HCV NS5B 蛋白的晶体生长池液（25%(w/v) PEG4000，10%(v/v)甘油，5mM DTT，50mM MES pH5.0~6.0）中，13000—15000rpm 高速离心，之后取上清液，得浸泡液 1，备用。

方法二、将干膏状的紫草乙酸乙酯萃取样品（实施例 1 制备）直接溶解于 HCV NS5B 蛋白的晶体生长池液（25%(w/v) PEG4000，10%(v/v)甘油，5mM DTT，50mM MES pH5.0~6.0）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，不至于使紫草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 HCV NS5B 蛋白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，使用旋进法收集 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

测是否有小分子抑制剂的结合。数据收集的统计如下表 1:

表 1 HCV NS5B 的晶体浸泡紫草乙酸乙酯萃取样品后的晶体衍射数据处理及结构修正结果

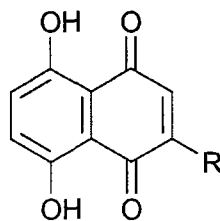
统计参数	HCV NS5B 浸泡紫草乙酸乙酯萃取样品后的晶体 (复合体)
空间群	$P2_12_12_1$
晶胞参数 (\AA , $^\circ$)	$a = 52.8$
	$b = 97.2$
	$c = 67.7$
	$\beta = 103.1$
马休斯常数 ($\text{\AA}^3\text{Da}^{-1}$)	1.6
溶剂含量 (%)	52
分辨率 (\AA)	50-2.6 (2.7-2.6)
所有衍射点	190,084
独立衍射点	51,775
冗余度	3.7 (3.6)
$I/\sigma(I)$	10.4 (3.7)
R_{merge} (%)	10.7 (57.0)
完整度 (%)	99.9 (99.5)

通过观察相同角度的 HCV NS5B 蛋白母体的晶体和复合体活性位点电子密度图 (图 3), 可以发现, 在复合体的活性位点 (二体化位点, His502 附近) 能够观察到清晰的非蛋白质本身的未知电子密度 (红色部分), 提示可能有小分子结合在蛋白质分子上。

6. 结合小分子的分析与鉴定

紫草 (Sinkiang) 属紫草科药用多年生草本植物, 味甘、性寒, 归心肺经。因其凉血活血、解毒透疹的显著功效, 在各中医药典籍中均有详细记载。在《本草纲目》中以解表凉血、清热解毒、活血化淤等广谱疗效被列为上品 (以根入药)。在现代医学研究中, 因其具有抗感染、促进伤口愈合、抗肿瘤、抗微生物和抗血栓等众多功效, 被广泛地用于医学研究和疾病治疗 (Papageorgiou 等人, 1999. "The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products." *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 270-300) 。

到目前为止, 已经鉴定出紫草中的多种主要成分, 这些主要成分对紫草在治疗疾病方面的疗效起着关键性的作用。而相关研究 (Papageorgiou 等人, 1999. "The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products." *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 270-300) 表明这些成分主要都是紫草素 (skikonin/alkannin) 母核的衍生物, 该母核的结构式为:



紫草中主要成分的母核的结构式。其中 R 基团不同代表不同的化合物。

目前已知的 R 基团包括如下面所示的 36 种。我们首先根据未知电子密度的显示, 去除一些基团过大而不可能放入该处电子密度的化合物。然后准备候选的小分子的 PDB 数据, 读入 COOT 后, 利用 COOT 的 Realspace Refinement 的功能,

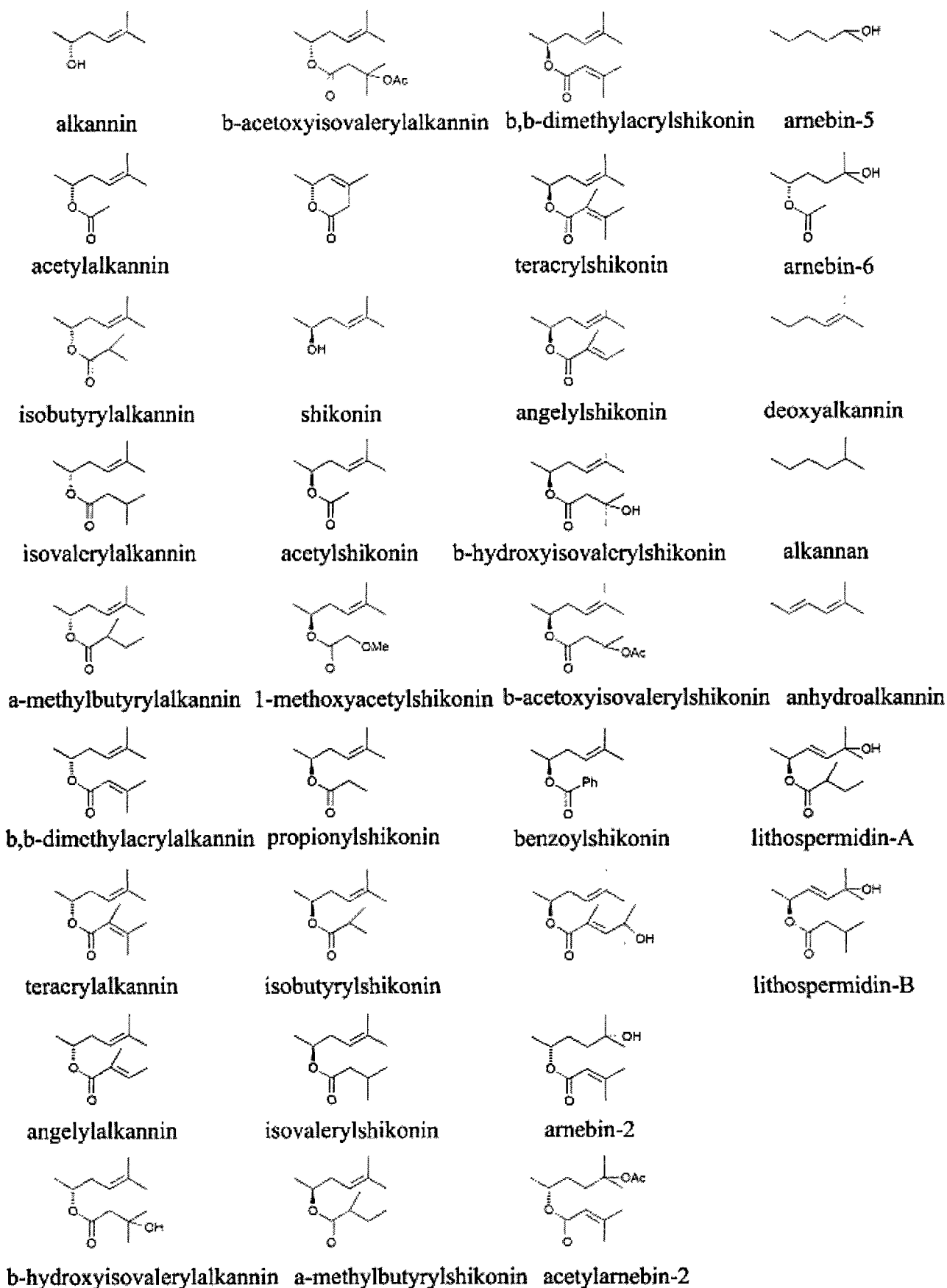
将不同的小分子在电子密度中进行修正。结果显示，乙酰紫草素与未知电子密度的吻合较好，结果如图 4 所示，蓝色球棍为蛋白质本身的氨基酸残基。红色表示未知电子密度，黄色球棍为乙酰紫草素的结构式。

由此获得了乙酰紫草素与 HCV NS5B 蛋白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的巨大优势。按照我们的方法，（1）仅需要筛选一次就可以从紫草乙酸乙酯萃取物中快速发现能够与 HCV NS5B 蛋白结合的小分子，（2）该小分子是紫草乙酸乙酯萃取物中与 HCV NS5B 蛋白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 36 种化合物，而且需要至少进行 36 次的活性测定、并进行至少 36 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、结合小分子—乙酰紫草素抑制 HCV NS5B 蛋白的抑制机理

Qin.W 等人的研究(Qin.w 等人 2002.Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. J.Biol.Chem.277:2132-2137) 显示 NS5B 存在一个重要的二体化位点（由 Glu18 和 His502 构成）。当 NS5B 要行使其聚合酶活性的时候，一个单体 NS5B 上的 Glu18 需要和另外一个单体 NS5B 上的 His502 位氨基酸结合，形成二体化的 NS5B 活性单位。在这一过程中，一旦有其他小分子预先和 Glu18 或者 His502 结合，将会阻碍 NS5B 形成二体化的活性单位，使其失去酶活性。由图 4 可以看出，乙酰紫草素与 HCV NS5B His502 咪唑环上的 N 原子形成了氢键，因而阻止了 NS5B 二体化活性单位的形成，从而抑制了 NS5B 的聚合酶活性。这就说明中药紫草里面含有的乙酰紫草素能够有效的抑制 NS5B 的活性，也说明乙酰紫草素为治疗 HCV 感染的有效药物。



紫草主要成分母核的 R 基团

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> 清华大学、南开大学、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 HCV NS5B 蛋白的抑制剂的新方法
 <160> 1
 <210> 1
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> 丙型肝炎病毒基因型 1b 分离株 BK (Hepatitis C Virus HCV, genotype 1b, isolate BK)
 <400> 1

Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Glu Thr Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg
 20 25 30
 His His Asn Leu Val Tyr Ala Thr Thr Ser Arg Ser Ala Ser Leu Arg
 35 40 45
 Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Asp His Tyr
 50 55 60
 Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr Val Lys Ala
 65 70 75 80
 Lys Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Lys Leu Thr Pro Pro His Ser
 85 90 95
 Ala Arg Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Asn Leu Ser
 100 105 110
 Ser Lys Ala Val Asn His Ile Arg Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu
 115 120 125
 Asp Thr Glu Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val
 130 135 140

Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile
 145 150 155 160
 Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr
 165 170 175
 Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly
 180 185 190
 Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Ala Trp
 195 200 205
 Lys Ala Lys Lys Cys Pro Met Gly Phe Ala Tyr Asp Thr Arg Cys Phe
 210 215 220
 Asp Ser Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser Ile Tyr
 225 230 235 240
 Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Arg Ser Leu
 245 250 255
 Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly Gln
 260 265 270
 Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Ser
 275 280 285
 Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Ala Ala Ala Cys Arg
 290 295 300
 Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu
 305 310 315 320
 Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Glu Ala Ser Leu
 325 330 335
 Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp
 340 345 350
 Pro Pro Lys Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser
 355 360 365
 Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu

370	375	380	
Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Ala			
385	390	395	400
Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Tyr Ala			
	405	410	415
Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser Ile			
	420	425	430
Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Gln Ile Tyr			
	435	440	445
Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile Gln			
	450	455	460
Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro Gly			
465	470	475	480
Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro Pro			
	485	490	495
Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Arg Leu Leu			
	500	505	510
Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn Trp			
	515	520	525
Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser Gln			
	530	535	540
Leu Asp Leu Ser Ser Trp Phe Val Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile			
545	550	555	560
Tyr His Ser Leu Ser Arg			
	565		

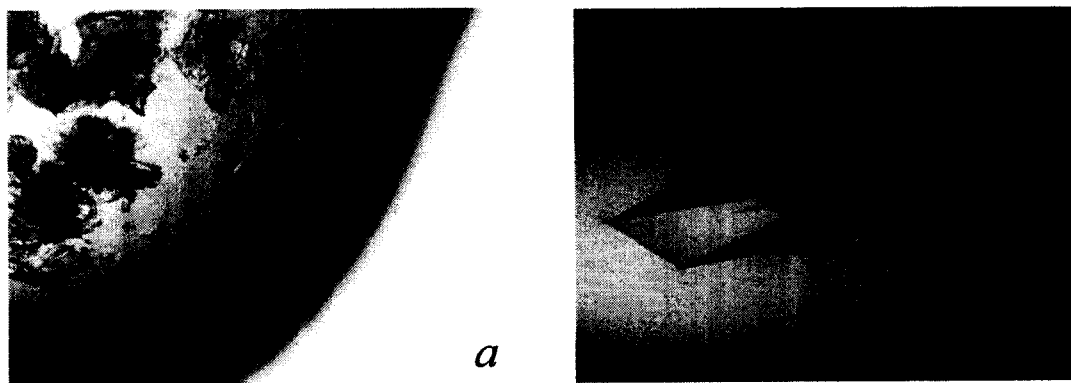


图 1

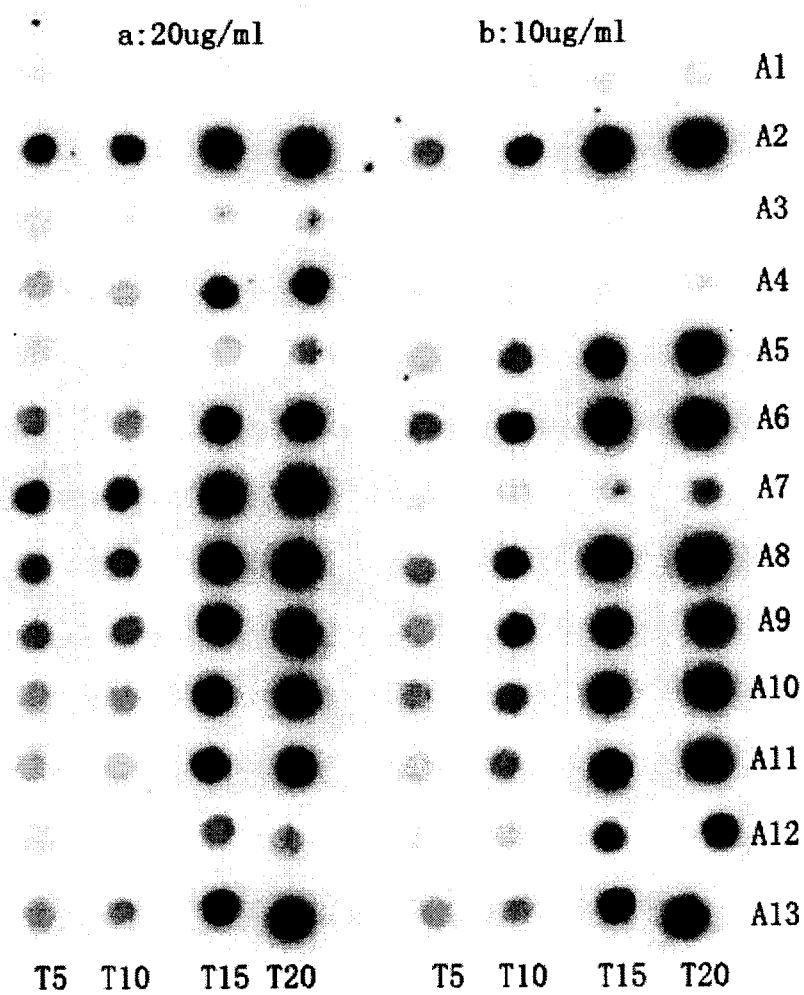


图 2

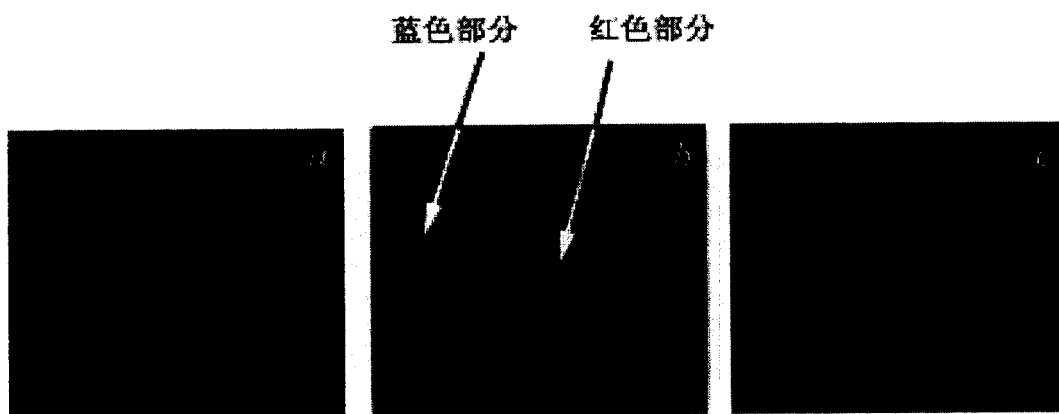


图 3

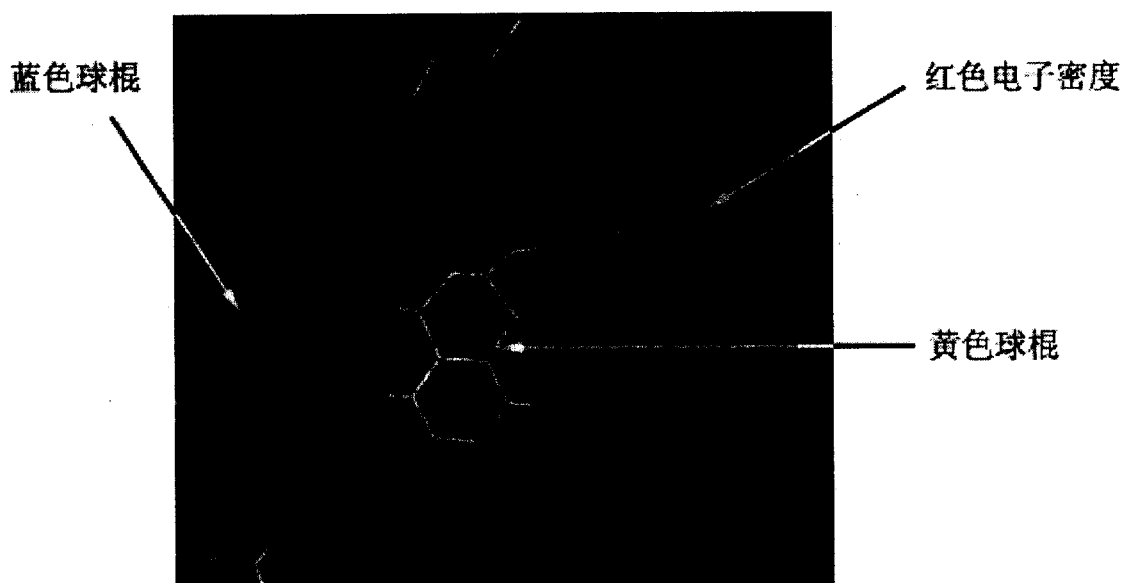


图 4