

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103142566 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(21) 申请号 201310058603.2

(22) 申请日 2013.02.25

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 刘志杰 欧阳松应 焦联营
牛峰峰 栾棋浩 尼尔·肖恩

(74) 专利代理机构 北京市汉信律师事务所
11373

代理人 王文生

(51) Int. Cl.

A61K 31/185 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表6页 附图4页

(54) 发明名称

发热伴血小板减少综合症中重要蛋白的抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及利用小分子化合物抑制病毒复制。具体地,本发明公开了小分子化合物苏拉明(Suramin)在制备用于治疗疾病的药物中的用途,所述疾病是由布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒引起的,并且具体地是由发热伴血小板减少综合征病毒引起的。

1. 一种用于治疗由布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) 白蛉病毒属 (Phlebovirus) 的病毒引起的疾病的药物组合物,所述药物组合物包含苏拉明 (Suramin) 作为活性成分。
2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒是发热伴血小板减少综合征病毒 (SFTSV)、布埃纳文图拉 (Buenaventura) 病毒或格拉纳达 (Granada) 病毒。
3. 根据权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述由布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒引起的疾病是发热伴血小板减少综合征 (SFTS)。
4. 苏拉明在制备用于治疗疾病的药物中的用途,所述疾病是由布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒引起的。
5. 根据权利要求 4 所述的用途,其中所述布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒是发热伴血小板减少综合征病毒、布埃纳文图拉病毒或格拉纳达病毒。
6. 根据权利要求 4 所述的用途,其中所述疾病是发热伴血小板减少综合征。
7. 一种用于治疗由布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒引起的疾病的试剂盒,所述试剂盒包含苏拉明。
8. 根据权利要求 7 所述的试剂盒,其中所述布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒是发热伴血小板减少综合征病毒、布埃纳文图拉病毒或格拉纳达病毒。
9. 根据权利要求 7 所述的试剂盒,其中所述疾病是发热伴血小板减少综合征。

发热伴血小板减少综合症中重要蛋白的抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及利用小分子化合物抑制病毒复制。具体地,本发明涉及利用小分子化合物苏拉明(Suramin)抑制布尼亚病毒科(Bunyaviridae)白蛉病毒属的病毒复制,尤其是抑制发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒(SFTSV)的复制。

背景技术

[0002] 近年来,由于全球气候变化等因素,在我国曾发生过几起对人类健康造成巨大危害的公共传染性疾病,如手足口病、禽流感、SARS、猪链球菌病等。这些高传染性疾病对我国的社会、经济和国家安全提出了严峻的挑战,对这些高危病原体的科学研究、研发有效防治手段具有一定的重要性和紧迫性。新发传染病特异性治疗药物和疫苗的研发对我国传染病的防控工作至关重要,对新发传染病病原体重要蛋白的结构与功能缺乏深入的认识严重制约了传染病防控工作的有效开展。

[0003] 2009年以来,各大媒体接连报道河南等多地发生蜱咬引发以“发热”为主要临床特征的疾病流行,引起社会各界广泛关注。卫生部专家在各地开展病原分离与现场调查工作,2008年目标被锁定为人粒细胞无形体病(Human granulocytic anaplasmosis, HGA)^[1]。今年3月17日,中国疾病预防控制中心病毒所的李德新和梁米芳团队在《The New England Journal of Medicine》发表了相关最新研究成果,鉴定了自2009年以来发生在我国中部蜱咬病的真正“元凶”,即引起发热伴血小板减少综合征(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)的新型布尼亚病毒,并命名为发热伴血小板减少综合征病毒(SFTS virus, SFTSV),发病初期病死率高达30%^[2]。

[0004] 布尼亚科病毒通常为具有包膜的球形负链RNA病毒,直径约80-120nm,表面具有糖蛋白突起(如图1)。布尼亚病毒科具有350多个病毒成员,是虫媒病毒中病毒数最多的一科,分为5个属,其中4个能感染人和动物,包括白蛉病毒属(Phlebovirus)、布尼亚病毒属(Bunyavirus)、汉坦病毒属(Hantavirus)和内罗病毒属(Nairovirus),以及一个至今仅发现感染植物的番茄斑萎病毒属(Tospovirus)^[3]。除了汉坦病毒属的病毒通过啮齿类与食虫类动物传播外,其他4个属的病毒均由蚊、白蛉、蜱、蠓和蓟马等节肢动物传播。

[0005] 发热伴血小板减少综合征SFTS主要传播途径为蜱虫叮咬,最近的一些病例表明接触可能为其传播途径之一^[4]。SFTS的发病机理尚不明确,该病毒具有泛嗜性,对血液系统、内脏、消化道等都有侵犯,主要表现为发热,血小板显著减少,白细胞减少,严重者出现多脏衰竭而死亡^[5]。然而,该新型布尼亚病毒SFTSV感染引起的疾病具有病程进展快速、疾病后果危重,并且能通过动物媒介和接触传播的特点,极可能引起局部地区的暴发流行,而造成突发的公共卫生事件。由于对新型布尼亚病毒SFTSV感染的致病机制认识有限,缺乏成熟的治疗手段,而且目前该类病毒在国内部分地区和国外仍不断涌现^[6,7],因此,对于新型布尼亚病毒SFTSV特效治疗药物或疫苗的研发迫在眉睫。

[0006] 苏拉明(Suramin,又称309F,309Fournneau, Bayer205, Moranyl, Naganin, Naganine等)是由德国Oskar Dressel和Richard Kothe于1916年发明的,目前仍以

“Germanin”的商标名在销售。苏拉明主要用于治疗锥体虫引起的人类嗜睡病和盘尾丝虫病 (onchocercosis)^[8,9]。另外,苏拉明也可以用于治疗前列腺癌^[10]。目前仍无苏拉明及其类似物用于治疗发热伴血小板减少综合症病毒 (SFTSV) 等布尼亚病毒家族 (Bunyaviridae family) 白蛉病毒属 (Phlebovirus) 病毒报道。

发明内容

[0007] 发热伴血小板减少综合征是由一种新型布尼亚病毒 (SFTSV) 引起的急性传染病,临床表现以发热伴血小板减少为主要特征,少数患者病情较重且发展迅速,可因多脏器功能衰竭而死亡。该病毒属于布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) 白蛉病毒属 (Phlebovirus)。与布尼亚病毒科白蛉病毒属的裂谷热病毒 (Rift Valley fever virus, RVFV)、Uukuniemi 病毒 (UUKV) 的氨基酸同源性约为 30%。本发明涉及通过高通量筛选方法获得一种高亲和力小分子药物苏拉明 (Suramin),其特异性结合白蛉病毒属核蛋白从而抑制病毒的复制和增殖。采用结构生物学方法解析了 SFTSV 核蛋白及其与小分子药物苏拉明的复合物的晶体的结构,该小分子苏拉明能明显抑制 SFTSV 的复制。

[0008] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0009] 1. 一种用于治疗由布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) 白蛉病毒属 (Phlebovirus) 的病毒引起的疾病的药物组合物,所述药物组合物包含苏拉明 (Suramin) 作为活性成分。

[0010] 2. 根据第 1 项所述的药物组合物,其中所述布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒是发热伴血小板减少综合症病毒 (SFTSV)、布埃纳文图拉 (Buenaventura) 病毒或格拉纳达 (Granada) 病毒。

[0011] 3. 根据第 1 项所述的药物组合物,其中所述由布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒引起的疾病是发热伴血小板减少综合征 (SFTS)。

[0012] 4. 苏拉明在制备用于治疗疾病的药物中的用途,所述疾病是由布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒引起的。

[0013] 5. 根据第 4 项所述的用途,其中所述布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒是发热伴血小板减少综合症病毒、布埃纳文图拉病毒或格拉纳达病毒。

[0014] 6. 根据第 4 项所述的用途,其中所述疾病是发热伴血小板减少综合征。

[0015] 7. 一种用于治疗由布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒引起的疾病的试剂盒,所述试剂盒包含苏拉明。

[0016] 8. 根据第 7 项所述的试剂盒,其中所述布尼亚病毒科白蛉病毒属的病毒是发热伴血小板减少综合症病毒、布埃纳文图拉病毒或格拉纳达病毒。

[0017] 9. 根据第 7 项所述的试剂盒,其中所述疾病是发热伴血小板减少综合征。

[0018] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

附图说明

[0019] 图 1:苏拉明的筛选, A:苏拉明的结构;B:FTS 实验方法验证 SFTSV-N 与苏拉明结合;C:ITC 法验证 SFTSV-N 与苏拉明结合 ($K_d = 0.44 \mu M$)。

[0020] 图 2:苏拉明特异性结合布尼亚家族白蛉病毒属成员 N 蛋白, A:FTS 实验方法证明苏拉明与白蛉病毒属成员 GRAV 和 BUEV 的 N 蛋白结合;B 和 C:ITC 法证明 GRAV-N($K_d =$

2.02 μ M) 和 BUEV-N(Kd = 2.48 μ M) 分别与苏拉明结合 ;D :FTS 实验方法证明苏拉明与白蛉病毒属成员 RVFV 和变复性的 SFTSV-N 结合 ;E :FTS 实验方法证明苏拉明与非白蛉病毒属成员 N 蛋白不结合, CCHFV :克里米亚 - 刚果出血热病毒 ;LEAV :Leanyer 病毒 ;Hantaan :汉坦病毒 ;Flu :A 型流感病毒 ;RV :狂犬病病毒 ;HIV :人类免疫缺陷病毒 / 爱滋病病毒 ;Lassa :拉沙病毒。

[0021] 图 3 :SFTSV-N 蛋白与白蛉病毒属其它同源 N 蛋白的序列进行比对。SFTSV-N 和 RVFV-N 二级结构分别标记在序列的上下端。序列号为 :SFTSV-N(GenBank 号 GI :395406763)、BUEV-N(GenBank 号 GI :146336910)、GRAV-N(GenBank 号 GI :308197170)、SFSV-N(GenBank 号 GI :146336862)、CORV-N(GenBank 号 GI :146336856)、PHLV1-N(GenBank 号 GI :146336838), PHLV2-N(GenBank 号 GI :146336850)、PUTV-N(GenBank 号 GI :146336898)、MASV-N(GenBank 号 GI :208610196)、PUNV-N(GenBank 号 GI :269799032)、SFNV-N(GenBank 号 GI :146336883)、UUKV-N(GenBank 号 GI :38371708)、HEAV-N(GenBank 号 GI :399207760)、RVFV-N(GenBank 号 GI :127925)。

[0022] 图 4 :苏拉明抑制细胞内 SFTSV 复制。

[0023] 图 5 :苏拉明与 SFTSV-N 复合物的结构解析,A :SFTSV-N/ 苏拉明复合物整体结构 ; B :苏拉明头部萘 -1,3,5- 三磺酸密度显示及与 SFTSV-N 的氢键 (黄色氨基酸) 和疏水性 (粉红色氨基酸) 相互作用 ;C :苏拉明头部萘 -1,3,5- 三磺酸结合于中心正电荷沟槽中 ;D :精确的苏拉明头部萘 -1,3,5- 三磺酸与 SFTSV-N 相互作用。

具体实施方式

[0024] 实施例 1、SFTSV-N 蛋白 (SFTSV N 蛋白, SFTSV 核蛋白) 及 SFTSV-N/ 苏拉明复合物制备

[0025] 将编码 SFTSV-N(GI :395406763) 的基因序列 (SFTSV-N 的氨基酸序列见 SEQ ID NO. 1, 其编码核酸序列见 SEQ ID NO. 2) 构建到 pMCSG7 载体 (见 参考文献 [11]) 中得到阳性重组质粒 pMCSG7-SFTSV-N, 并将其转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 的表达菌株 (Novagen) 中, 并涂布新鲜的带有氨苄青霉素抗性的 LB 平板培养基上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 挑取单克隆接入 5ml 的 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 12 小时左右。然后将其以 1 : 100 的比例转入 500ml 的 LB 培养基进行扩大培养。待细菌 OD600 达到 0.6-0.8 时, 把培养温度降到 16 $^{\circ}$ C, 加入 IPTG 至终浓度 0.2mM, 继续培养约 20 小时后, 离心 (4000rpm, 30min) 收菌, 菌体直接使用或储存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。重组蛋白以可溶性蛋白形式高量表达。菌体用 PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 50mM Na₂HPO₄ 和 10mMKH₂PO₄, pH7.4) +3M 尿素 +1M NaCl 缓冲液重悬后转移到烧杯中 (按 1L 培养基使用 40ml PBS 的比例) 放置于冰上用超声破碎仪裂解细菌。超声功率 100W, 工作时间 10 秒, 间隙 10 秒, 每个工作循环 10 次, 依细菌量进行 3-5 个循环, 待细菌颜色比较清澈为止。破碎后的菌体在 4 $^{\circ}$ C, 18,000rpm/min 离心 30 分钟使破碎后的细胞碎片与目标融合蛋白溶液分开。取上清液直接上到用 PBS 缓冲液平衡好的 Ni-NTA 离子亲和层析柱中。上样结束后, 用 PBS+50mM 咪唑充分清洗去除杂蛋白 (100ml)。然后用 300mM 咪唑洗脱并收集目的蛋白 (10ml)。将收集的蛋白用浓缩管换缓冲液至 20mMTris-HCl7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT。加入适量的 TEV 酶进行酶切, 4 $^{\circ}$ C 过夜 (视目标蛋白稳定性而定)。酶切后跑 SDS-PAGE 检测酶切效率, 若未有切干净则适量补充 TEV 酶继续酶切至基本切完为止。酶

切完成后的样品再次过 Ni 离子亲和柱,用 10ml 的 20mM 咪唑清洗介质。收集流穿和 20mM 咪唑洗脱的蛋白。收集的蛋白样品浓缩,加载到用缓冲液 (20mM Tris-HCl 7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT) 充分平衡的分子筛 (Superdex G75, 120ml), 收集蛋白样品。分子筛和 SDS-PAGE 电泳结果表明目的蛋白以均一形式存在。对于 SFTSV-N/ 苏拉明复合物的制备,将苏拉明 (Sigma) 与 SFTSV-N 蛋白以 1.2 : 1 的比例 (摩尔比) 混合孵育 1-2 小时后,再次过分子筛 (SuperdexG75, 120ml) 以去除未结合的苏拉明,获得 SFTSV-N/ 苏拉明复合物。

[0026] 以与上述制备 SFTSV-N 蛋白的方法相同的方法制备 Buenaventura 病毒 (布埃纳文图拉病毒) 和 Granada 病毒 (格拉纳达病毒) 的 N 蛋白 (BUEV-N 和 GRAV-N; GenBank 号分别为 :GI :146336910 和 GI :308197170 ;BUEV-N 的氨基酸序列见 SEQ ID NO. 3, 其编码核酸序列见 SEQ ID NO. 4 ;GRAV-N 的氨基酸序列见 SEQ ID NO. 5, 其编码核酸序列见 SEQ ID NO. 6)。

[0027] 实施例 2、基于荧光的热量迁移实验筛选 SFTSV-N 的潜在抑制剂

[0028] 基于荧光的热量迁移 (Fluorescence-based Thermal Shift, FTS) 实验是新近发展起来的一种基于荧光技术的实验检测方法。检测工作原理是利用蛋白质对环境变化敏感的荧光染料,如 Sypro Orange, 来监测体系中蛋白质自身的热稳定性以及可能影响蛋白质热稳定性的相关因子,如相互作用蛋白、缓冲液以及配体等。该技术将 Sypro Orange 染料的高度敏感性和可反映蛋白质折叠状态的特性,以及可以在小体积中反应和检测等特点,与高通量操作并可以进行荧光信号检测的 real-time PCR 相结合。该技术可以通过对体系中蛋白质溶解曲线的检测,实现对上述的蛋白质及其稳定性相关因子的快速高通量筛选与检测 (参见参考文献 [12]、[13] 和 [14])。该技术的运用包括蛋白结构的研究,特别适用于蛋白结晶条件的摸索和优化 ;蛋白相互作用研究,鉴定蛋白配体,后续结晶实验 ;优化蛋白生产、纯化和保存条件 ;蛋白相关药物的筛选等多领域中的应用日益拓宽和深入。

[0029] 本发明便是采用基于荧光的热量迁移实验来筛选潜在小分子抑制剂,筛选实验是在自动化流水工作站上进行的。该流水线采用 Echo550 声音传导机器人 (Labcyte) 来增加小分子化合物, Mosquito 机器人 (TTP Labtech) 来分配蛋白,之后在实时 PCR 仪 CFX384 (Bio-Rad Laboratories) 进行热量扫描并检测荧光。本实验在 384 孔 PCR 板上运行,每孔 10 μ l 包含 Hepes 缓冲液 (20mM Hepes, pH7.5, 150mM NaCl) 和 1 μ g SFTSV-N 蛋白和 10n15000X Sypro Orange (Invitrogen) 染料。化合物添加完成之后以透光膜将 PCR 板封口,混匀并离心。热量扫描从 10 到 95 $^{\circ}$ C, 温度升高速度为 1.5 $^{\circ}$ C /min, 每 10sec 记录一次荧光值。数据分析和报告产生由自制软件 excel FTS 完成。SFTSV-N 蛋白筛选了库容量为 2000 个分子的 Spectrum collection (MicroSource Discovery Systems, Inc) 中的 1600 个。首批筛选有 6 个化合物有温度迁移,其中最明显的是苏拉明,具有可达 12 度的迁移,在 5 μ M 浓度下便开始达到最高值,如图 1A 和 1B 所示。说明苏拉明能以很强的亲和力与 SFTSV-N 蛋白相结合,从而使 SFTSV-N 蛋白更难去折叠,即蛋白变得更稳定。

[0030] 实施例 3、ITC (等温滴定量热法) 验证 SFTSV-N 与苏拉明的相互作用

[0031] 采用 ITC 法进一步验证苏拉明与 SFTSV-N 蛋白的相互作用。采用透析法将如实施例 1 中所述制备的 SFTSV-N 蛋白样品的缓冲液更换为 Tris 缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH8.0, 200mM NaCl, 2mM DTT)。蛋白浓度通过 A280nm 光吸收法测定。滴定前蛋白及苏拉明 (Sigma) 均经过 4 $^{\circ}$ C、18,000Xg 离心 10 分钟以去除可能的碎片和气泡。热量滴定在 MicroCal ITC200

仪器 (Microcal Inc., Northampton, MA) 上进行, 反应温度为 25°C。将 50 μ M SFTSV-N 蛋白反应物放置在 300 μ l 样品室中, 500 μ M 的苏拉明采用注射法分 20 次, 每次 2 μ l (第一次注射 0.5 μ l), 间隔 120 秒。数据采用 ORIGIN 软件分析, 并计算结合常数 (K_a)、热含量变化 (ΔH)、化学计量 (N)。结果发现 SFTSV-N 与苏拉明具有很高的亲和力, K_d 值为 0.44 μ M, 如图 1C 所示。

[0032] 实施例 4、苏拉明特异性结合布尼亚病毒科白蛉病毒属病毒 N 蛋白

[0033] 我们利用如在实施例 2 中所述的 FTS 方法发现苏拉明与布尼亚家族白蛉病毒属成员 Buenaventura 病毒和 Granada 病毒的核蛋白 BUEV-N 和 GRAV-N (如以上实施例 1 中所述方法制备) 具有 6°C 左右的迁移 (图 2A), 该结果表明苏拉明也能与 BUEV-N 和 GRAV-N 蛋白结合从而增加了它们的稳定性。利用如在实施例 3 中所述的 ITC 实验检测苏拉明与上述 BUEV-N 和 GRAV-N 蛋白的亲和力分别为 2.02 μ M 和 2.48 μ M (图 2B、2C)。同样利用如在实施例 2 中所述的 FTS 方法, 我们发现变复性法全部去除了 RNA 的 SFTSV-N 也能结合苏拉明 (图 2D), 而不与布尼亚家族其它病毒属如正布尼亚病毒、内罗病毒或汉坦病毒等病毒的 N 蛋白相结合 (图 2E); 此外, 我们还发现苏拉明不能与 A 型流感病毒、狂犬病毒、拉沙病毒以及 HIV 的核衣壳等蛋白相结合 (图 2E)。因此, 苏拉明是特异性地结合布尼亚家族白蛉病毒属病毒的 N 蛋白。

[0034] 实施例 5、苏拉明抑制 SFTSV 复制实验

[0035] 通过包括以下步骤的方法验证苏拉明对 SFTSV 复制的抑制作用:

[0036] 1) 细胞培养: 非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞, ATCC, CCL-81) 是一种 SFTSV 易感细胞, 其是经猕猴肾细胞培养衍化后产生的。Vero 细胞最适培养温度为 37°C。培养条件为贴壁: 高糖 DMEM+10% FBS+5mM 谷氨酰胺及双抗青霉素-链霉素 (在细胞培养液中推荐的青霉素的工作浓度为 100U/ml, 链霉素的工作浓度为 0.1mg/ml)。需要 CO₂, 培养箱中也需要放水来保持湿度。

[0037] 2) 细胞传代: 弃去废液, 用 PBS 轻洗一次, 然后加入 0.02% EDTA 与 0.25% 胰蛋白酶消化, 轻摇培养瓶, 使消化液流遍所有细胞表面, 即将其吸除或弃去消化 30 秒, 然后吸去, 再让残余的 EDTA/胰蛋白酶作用 30 秒, 镜下观察细胞变圆, 就可加含 10% 血清的 DMEM 终止消化, 反复吹打至细胞都成为单个悬浮细胞即可。12 小时-24 小时 90% 以上细胞贴壁。Vero 细胞传代时为 80-90% 融合度, 传代比例为 1:3 到 1:6。

[0038] 3) 细胞复苏: 从液氮罐中取出冻存管, 立即投入 37°C 水浴, 并不断的摇动, 使之迅速融化。将溶解的细胞冻存管取出, 用酒精消毒后打开, 吸出溶有细胞的冻存液, 加入事先装好培养液 (37°C 预热, 8~10 倍体积) 离心管内, 稍微吹打混匀, 然后 1000rpm 离心 5min, 去除上清, 加入适量培养液, 吹打成细胞悬液, 以 1×10^5 个细胞/mL 的密度接种于 T25 培养瓶内, 在 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度下培养。

[0039] 4) 病毒感染和给药: 将 Vero 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 当细胞生长至 85% 融合度时, 将 100 μ l 的 100TCID₅₀ 的 SFTSV 病毒 (HB29, 见参考文献 [2]) 加入每孔细胞中, 孵育 1 小时后, 清洗感染的细胞以去除未结合的病毒。之后将苏拉明 (以肝素 (heparin) 为对照, 同苏拉明一样肝素也是携带强负电的小分子) 以 4 个重复孔, 每孔分别为 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 和 0 μ g/ μ l 的浓度梯度添加到预吸收 SFTSV 病毒的 Vero 细胞中。培养液每 3 天更换一次 (补加同样量的苏拉明), 采用 ELISA 法检测培养上清中的 SFTSV 病毒量。

ELISA 是以抗原抗体免疫学反应为基础,将抗原抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合起来的一种高敏感性实验技术。抗原-抗体的反应在一种固相载体聚苯乙烯微量滴定板的孔中进行,每加入一种试剂孵育后,可通过洗涤除去未结合的游离反应物,从而保证实验结果的特异性与稳定性。比较常用的是 ELISA 双抗体夹心法及 ELISA 间接法。操作步骤如下:包被是将抗 SFTSV 多克隆抗体包被在每个聚苯乙烯板的反应孔中 4℃ 12 小时。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液 PBST(1×PBS+0.5% Tween20)洗 3 次后,加入 80 μl 实施例 7 的 Vero 细胞培养上清和 20 μl PBS,孵育 1 小时后,清洗 ELISA 板,并每孔添加 100 μl 15%脱脂奶粉稀释的 HRP-偶联的兔抗 SFTSV-N 抗体,37℃ 孵育 1 小时后再清洗。最后每孔添加 100 μl 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 TMB 底物以显色。每孔 OD450 的数值由酶标仪读取。

[0040] 结果:6 天时检测发现,较高剂量的苏拉明(0.4 μg/μl、0.8 μg/μl)显示了抑制效果(上清中的 SFTSV 病毒量相比对照减少),更低剂量(0.2、0.1、0.05 和 0 μg/μl)的效果与对照肝素相当(如图 4 所示)。第 9 天时,0.8 μg/μl 剂量的苏拉明仍对病毒有抑制效果(如图 4 所示)。因此,0.8 μg/μl 的剂量便可以发挥持续的抑制病毒复制的效果。该结果表明小分子药物苏拉明能够阻碍病毒 SFTSV-N 蛋白对基因组 RNA 的保护作用,从而影响 SFTSV 病毒的产生。

[0041] 实施例 6、SFTSV-N/苏拉明复合物晶体结构解析实验

[0042] 一、结晶筛选及晶体优化

[0043] 初始筛选采用稀疏矩阵法(Sparse matrix screen)的策略来筛选晶体,商业化晶体筛选试剂盒包括 Hampton Research 公司的 Crystal Screen1&2, PEG/ION1&2, Index, SaltRx1&2 以及 Emerald BioSystems 公司的 Wizard1,2,3 和 4 等晶体筛选条件,所用温度为 25℃。采用悬滴气相扩散法,将 1 μl 上述制备的 SFTSV-N/苏拉明复合物与等量结晶条件(5-8% PEG8000, 0.1M NaAc(pH4.3-4.7), 0.2M ZnAc₂)混合,母液体积为 300 μl,25℃下两三天即可获得晶体。蛋白晶体经室内光源检测获得较好分辨率以后,用液氮冻存起来,送同步辐射实验室进行数据收集。

[0044] 二、数据收集、处理和结构解析

[0045] SFTSV-N/苏拉明二元复合物数据收集是在 100K 温度条件下使用日本 KEK 光子工厂(the Photon Factory, KEK, Japan)线站 BL17A 同步辐射光源($\lambda = 0.97928 \text{ \AA}$)上进行衍射数据收集(检测器:ADSC Q315CCD)。衍射数据的处理采用 HKL2000 程序^[15]。结构解析方法为分子置换法 Phaser 程序^[16],模型是 SFTSV-N(PDB code, 4J4R)^[17]。模型构建和反复的精修是交替采用 Coot^[18]、Phenix_refine^[19]和 Refmac^[20]进行。所有结构分子图形由 Pymol^[21]生成。

[0046] 三、结果分析

[0047] 2.30 Å 分辨率的苏拉明与 SFTSV-N 二元复合物五聚体结构(C2 空间群)获得解析(如图 5A),数据收集及结构修正参数见以下表 1。苏拉明的头部羧基-1,3,5-三磺酸密度清晰可见,而其它部分则比较弱并且不连续(如图 5A、5B)。每个苏拉明分子结合一分子 SFTSV-N,这与 ITC 实验结果相一致(图 1C)。苏拉明的羧基-1,3,5-三磺酸部分结合于 SFTSV-N 核心部分的中心形成的口袋内,通过 3 对氢键(K67-NZ 与 077-苏拉明;T63-O 与 N53-苏拉明;N66-N 与 078-苏拉明)和静电吸引力相结合(如图 5C)。详细的相互作用见

图 5D。对苏拉明周围 5.0 Å 内的氨基酸进行分析,我们发现在参与苏拉明结合的 16 个氨基酸中,8 是绝对保守,7 个高度保守,仅一个氨基酸不保守(参见图 3 :SFTSV-N 与白蛉病毒属其它同源 N 蛋白的序列比对结果),表明苏拉明采用非常相似的模式与白蛉病毒属 N 蛋白相结合。

[0048] 表 1. SFTSV-N/ 苏拉明复合物数据收集和结构修正参数

[0049]

| 晶体 | SFTSV-N:苏拉明 |
|-----------------------------|-----------------------|
| 衍射数据 | |
| X 射线源 | KEK |
| 距离 (mm) | 340 |
| 图像张数 | 720 |
| 回摆角 (°) | 0.50 |
| 波长(Å) | 0.97 |
| 空间群 | C2 |
| a, b, c (Å) | 103.15, 154.89, 93.29 |
| α, β, γ (°) | 90.00, 102.12, 90.00 |

[0050]

| | |
|--|---------------------------|
| 镶嵌度(°) | 0.73 |
| 一个非对称单位分子数 | 5 |
| 分辨率区间(Å) | 50.00-2.30 (2.38-2.30) |
| R _{sym} (%) | 10.3(36.3) |
| 平均 I/σ(I) | 24.78(2.00) |
| 完整度(%) | 96.3(79.1) |
| 冗余度 | 6.0(2.4) |
| 精修 | |
| 分辨率 (Å) | 42.72-2.30 |
| 反散原子数 | 60718 |
| R _{work} /R _{free} (%) | 22.33/26.06 |
| 原子数 | 9804 |
| 蛋白原子数 | 9554 |
| 水分子数 | 250 |
| 平均 B 值 (Å ²) | 39.79 |
| 均方根偏差 | |
| 键长 (Å) | 0.007 |
| 键角 (°) | 1.052 |
| 拉马钱德兰 (Ramachandran) 参数 | |
| 偏好值 (%) | 98.75 |
| 允许值 (%) | 1.25 |
| 异常值 (%) | 0 |

[0051] 参考文献

[0052] [1] Zhang L, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA*. 2008 Nov 19 ;300(19) :2263-70.

[0053] [2] Yu X J, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med*. 2011 Apr 21 ;364(16) :1523-32. Epub 2011 Mar 16.

[0054] [3] 刘雅婷. 布尼亚病毒科全基因组序列比对分析术. 云南农业大学学报. 2008, 23(3) :315-320

[0055] [4] Zhang YZ, et al. Hemorrhagic fever caused by a novel tick-borne Bunyavirus in Huaiyangshan, China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2011 Mar ; 32(3) :209-220.

[0056] [5] 陶文元等. 新型布尼亚病毒感染致发热伴血小板减少综合征 8 例报告. 江苏大学学报 (医学版).

[0057] [6] Anagnostou V, et al. Novel phlebovirus in febrile child, Greece. *Emerg Infect Dis*. 2011 May ;17(5) :940-1.

[0058] [7] Savji N, et al. Genomic and phylogenetic characterization of Leanyer virus, a novel orthobunyavirus isolated in northern Australia. *J Gen Virol*. 2011

Mar14.

[0059] [8]Darsaud A, Chevrier C, Bourdon L, Dumas M, Buguet A, Bouteille B(January2004).Megazol combined with suramin improves a new diagnosis index of the early meningo-encephalitic phase of experimental African trypanosomiasis. Trop. Med. Int. Health9(1) :83-91. doi10. 1046/j. 1365-3156. 2003. 01154. x. PMID 14728611.

[0060] [9]Anderson J,Fuglsang H(July1978). " Further studies on the treatment of ocular onchocerciasis with diethylcarbamazine and suramin" .Br J Ophthalmol 62(7) :450-7. doi10. 1136/bjo. 62. 7. 450. PMC1043255. PMID678497.

[0061] [10]Ahles TA, Herndon JE, Small EJ, et al. (November2004). " Quality of life impact of three different doses of suramin in patients with metastatic hormone-refractory prostate carcinoma :results of Intergroup 0 159/Cancer and Leukemia Group B 9480 " .Cancer 101(10) :2202-8. doi10. 1002/cncr. 20655. PMID 15484217.

[0062] [11]Stols, L. , Gu, M. , Dieckman, L. , Raffen, R. , Collart, F. R. , and Donnelly, M. I. (2002).A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding atobacco etch virus protease cleavage site. Protein Expr Purif 25,8-15.

[0063] [12]Hawe A, SutterM, JiskootW. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. Pharm Res, 2008, 25(7) :1487 ~ 1499.

[0064] [13]Geerlof A, Brown J, Coutard B, et al. The impact of protein characterization in structural proteomics. Acta Cryst, 2006, D62 :1125 ~ 1136.

[0065] [14]Nettleship JE, Brown J, Groves M R, et al. Structural Proteomics. Humana Press, 2008, 426 :299 ~ 318.

[0066] [15]Z. Otwinowski and W. Minor" Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode" ,Methods in Enzymology, Volume276 :Macromolecular Crystallography, Part A, pages307-326, 1997, C. W. Carter, Jr. &R. M. Sweet, Eds. , Academic Press.

[0067] [16]McCoy AJ, et al. (2007)Phaser crystallographic software. J Appl Crystallogr40(Pt4) :658-674.

[0068] [17]Ferron F, et al. (2011)The hexamer structure of Rift Valley fever virus nucleoprotein suggests a mechanism for its assembly into ribonucleoprotein complexes. PLoS Pathog7(5) :e1002030.

[0069] [18]Emsley P&Cowtan K(2004)Coot :model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60(Pt12Pt1) :2126-2132.

[0070] [19]Adams PD, et al. (2010)PHENIX :a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66(Pt2) :213-221.

[0071] [20]Murshudov GN, Vagin AA, &Dodson EJ(1997)Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr D Biol

Crystallogr53 (Pt3) :240-255.

[0072] [21]Delano WL(2002)PyMOL. <http://www.pymol.org>。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> 发热伴血小板减少综合症中重要蛋白的抑制剂
 <130> IB130219
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> SFTS 病毒 HB29
 <400> 1

```

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

[0002]

Gly Pro Ala Val Met Asn Leu Lys Val Glu Asn Tyr Pro Pro Glu Met
 130 135 140
 Met Cys Met Ala Phe Gly Ser Leu Ile Pro Thr Ala Gly Val Ser Glu
 145 150 155 160
 Ala Thr Thr Lys Thr Leu Met Glu Ala Tyr Ser Leu Trp Gln Asp Ala
 165 170 175
 Phe Thr Lys Thr Ile Asn Val Lys Met Arg Gly Ala Ser Lys Thr Glu
 180 185 190
 Val Tyr Asn Ser Phe Arg Asp Pro Leu His Ala Ala Val Asn Ser Val
 195 200 205
 Phe Phe Pro Asn Asp Val Arg Val Lys Trp Leu Lys Ala Lys Gly Ile
 210 215 220
 Leu Gly Pro Asp Gly Val Pro Ser Arg Ala Ala Glu Val Ala Ala Ala
 225 230 235 240
 Ala Tyr Arg Asn Leu
 245

<210> 2

<211> 738

<212> DNA

<213> SFTS 病毒 HB29

<400> 2

atgtcggagt ggtccaggat tgcagtggag ttggtgagc agcagctcaa ttgactgag 60
 cttgaggact tcgcgagaga gctgacctat gaaggccttg accctgcttt gatcatcaag 120
 aagctgaagg agacaggtgg agatgattgg gtaaggata caaagtteat cattgttttt 180
 gcectgactc gaggcaataa gatcgtcaag gcatcaggga aatgtcaaa ctcagggtcc 240
 aagaggttga tggcactcca agagaaatat ggactggttg agagggcaga gaccaggetc 300
 tcaatcaactc cagtgagggt tgcgcagagc ctteccactt ggacatgtgc tgetgcagea 360
 getctaaagg agtatctccc agtagggeca gcegtcatga acctgaaggt tgagaattat 420
 cccctgaga tgatgtgcat ggcctttgga tcctgatcc caactgcggg ggtatctgaa 480

[0003]

gccacaacca agaccctgat ggaggectac tctctgtggc aagatgcett caccaagact 540
 atcaatgtaa agatgcgegg agccagcaag acagaagttt acaactcett cagggacct 600
 ctteatgctg ctgtgaactc tgtctctttt cccaatgatg ttegggtaaa gtggetgaag 660
 gccaagggga tccttggecc agatggggtc cccagcagag ctgctgaggt tgetgetget 720
 gttacagaa acctgtaa 738

<210> 3

<211> 243

<212> PRT

<213> Buenaventura 病毒

<400> 3

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

[0004]

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Val Glu Asp Ile Val His Ala His Cys Leu Phe Met Ile Gln Phe Ser | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Lys Thr Ile Asn Pro Ser Leu Arg Ser Ser Ser Lys Ser Glu Val Val | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Ser Ser Phe Asp Arg Pro Met Gln Ala Ala Ile Asn Ser Pro Phe Leu | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| Thr Ala Gly Asn Arg Arg Asp Ile Leu Met Ser Leu Gly Leu Ile Asn | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| Ser Asn Leu Lys Pro Ser Pro Thr Val Val Ala Ala Ala Lys Val Tyr | | | |
| | 225 | 230 | 235 |
| Arg Lys Leu | | | 240 |

<210> 4

<211> 732

<212> DNA

<213> Buenaventura 病毒

<400> 4

| | |
|---|-----|
| atgtcttatg aagaaattgc aatccagttt gctagtgaat ctgttgatgc cacaacaatt | 60 |
| gcagcatggg taccagagtt tgcttateca ggetttagtg caagacaagt gatcaacctg | 120 |
| gtcaagcaga ggggaggaga tgactggaag gaggatgtga agaagatgat tgtcctttca | 180 |
| ttaacaagag ggaataagcc atctaagatg ctaaacaaga tgtcagagag tggtcagaaa | 240 |
| attgtgaatg aettgatcag caagtacaag ctaaagtctg gaaatccggg ccgcaatgat | 300 |
| ctcacactct caagaattgc cgctgctttt getggttggg cttgccaage agctgaagtt | 360 |
| gttcaggact atctgccagt aacaggcagg gcaatggatg ctatatctga caagtttcct | 420 |
| agagcactaa tgcaccccag ctctgctggc cttgttgacc caaactgac agaagggctg | 480 |
| gtcgaagaca ttgtgcatgc tcattgetta ttcattgatc agttctctaa gacaateaat | 540 |
| ccatctctga gatcatcctc aaaaagegag gtcgtgtcca gttttgaccg acctatgcag | 600 |
| gctgccataa acagtcctt cctcactgct ggaacagga gagacattct catgtctctt | 660 |
| ggtctgataa actcaaatct gaaaccttct ccaactgtgg tagctgeage caaagtttct | 720 |

[0005]

agaaaattgt ga

732

<210> 5

<211> 254

<212> PRT

<213> Granada 病毒

<400> 5

Met Ser Glu Asp Asn Tyr Arg Thr Ile Ala Leu Ala Phe Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Ser Ala Asp Ser Thr Thr Ile Asn Ala Trp Val Asn Glu Phe Ala Tyr
 20 25 30
 Gln Gly Phe Asp Pro Lys Arg Ile Val Gln Leu Val Lys Glu Arg Gly
 35 40 45
 Thr Ala Lys Gly Arg Asp Trp Lys Lys Asp Val Lys Met Met Ile Val
 50 55 60
 Leu Asn Leu Val Arg Gly Asn Lys Pro Glu Ser Met Met Lys Lys Met
 65 70 75 80
 Ser Glu Lys Gly Ala Ala Ile Val Thr Gln Leu Ile Ser Thr Tyr Gln
 85 90 95
 Leu Lys Glu Gly Asn Pro Gly Arg Asp Thr Ile Thr Leu Ser Arg Val
 100 105 110
 Ser Ala Ala Phe Val Pro Trp Thr Val Gln Ala Leu Lys Thr Leu Ser
 115 120 125
 Glu Ser Leu Pro Val Thr Gly Thr Thr Met Asp Ser Ile Ala Gly Thr
 130 135 140
 Thr Tyr Pro Arg Cys Met Met His Pro Ser Phe Ala Gly Ile Ile Asp
 145 150 155 160
 Leu Glu Leu Pro Asn Asn Thr Gly Ala Met Leu Ala Asp Ala His Gly
 165 170 175
 Leu Phe Met Leu Glu Phe Ser Lys Thr Ile Asn Pro Ser Leu Arg Thr

[0006]

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 180 | | 185 | | 190 | | | | | | | | | | |
| Lys | Gln | Pro | Asn | Glu | Ile | Ala | Ala | Thr | Phe | Glu | Lys | Pro | Asn | Met | Ala |
| | 195 | | 200 | | 205 | | | | | | | | | | |
| Ala | Met | Thr | Gly | Arg | Phe | Phe | Thr | Arg | Asp | Asp | Lys | Lys | Lys | Leu | Leu |
| | 210 | | 215 | | 220 | | | | | | | | | | |
| Ile | Ala | Ile | Gly | Val | Leu | Asn | Glu | Asp | Leu | Val | Pro | Asn | Pro | Ala | Ile |
| | 225 | | 230 | | 235 | | | | | | | | | 240 | |
| Glu | Lys | Cys | Ala | Glu | Lys | Tyr | Lys | Ala | Lys | Val | Gly | Lys | Val | | |
| | | | 245 | | | | | | | | | | 250 | | |

<210> 6

<211> 765

<212> DNA

<213> Granada 病毒

<400> 6

```

atgtctgagg ataactacag aacaatcgcc ctagegtttt tggacgagtc tgcagactca      60
actaccatta atgectgggt caatgagttc gettaccaag ggtttgacce taaaaggatc      120
gtgcagttgg tgaaggagag aggaactgca aagggcagag attggaagaa ggatgttaag      180
atgatgattg tctgaactt ggtgagaggc aacaagcctg aaagcatgat gaagaagatg      240
tctgagaaag gggetgccat tgtaactcag ctgatetcca cetatcagct gaaagaaggg      300
aatcctggga gagacacat caccttgtct agagtttccg ctgctttcgt gccatggact      360
gttcaggcct tgaagacctt gtcagaatct ctgectgtga ccgggacaac aatggacagc      420
attgetggaa caacttatec taggtgeatg atgeaccaa getttgctgg cataattgat      480
cttgaacttc caaacaacac tggagctatg ctggetgacg cacatgggct gttcatgctg      540
gagttetcaa agaccatcaa cccatctett agaaccaage ageccaacga gattgetgca      600
acatttgaga agccaacat ggctgccatg actggacgat tcttcaccag agatgataag      660
aaaaagetgc teattgetat cggggttctc aatgaagacc tagtgccaaa tccagccatt      720
gagaagltgt ctgagaagta caaggccaaa gttggaaagg ttgga                          765

```

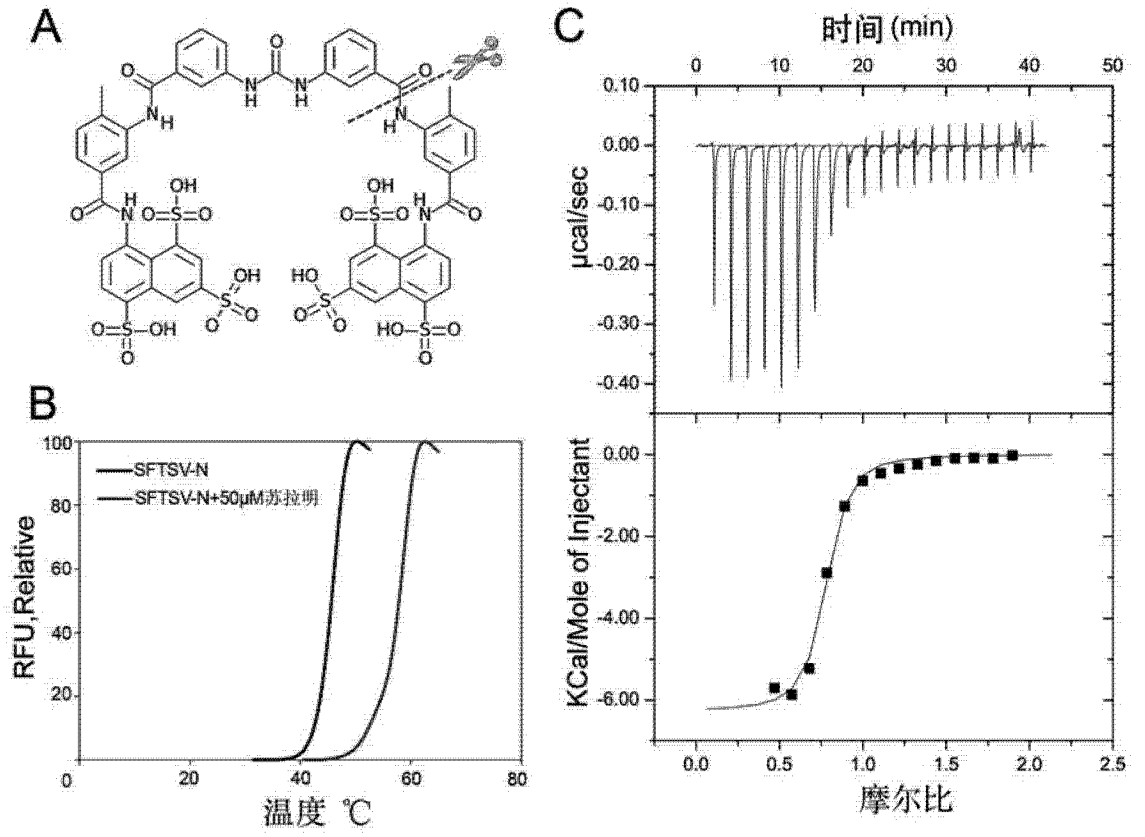


图 1

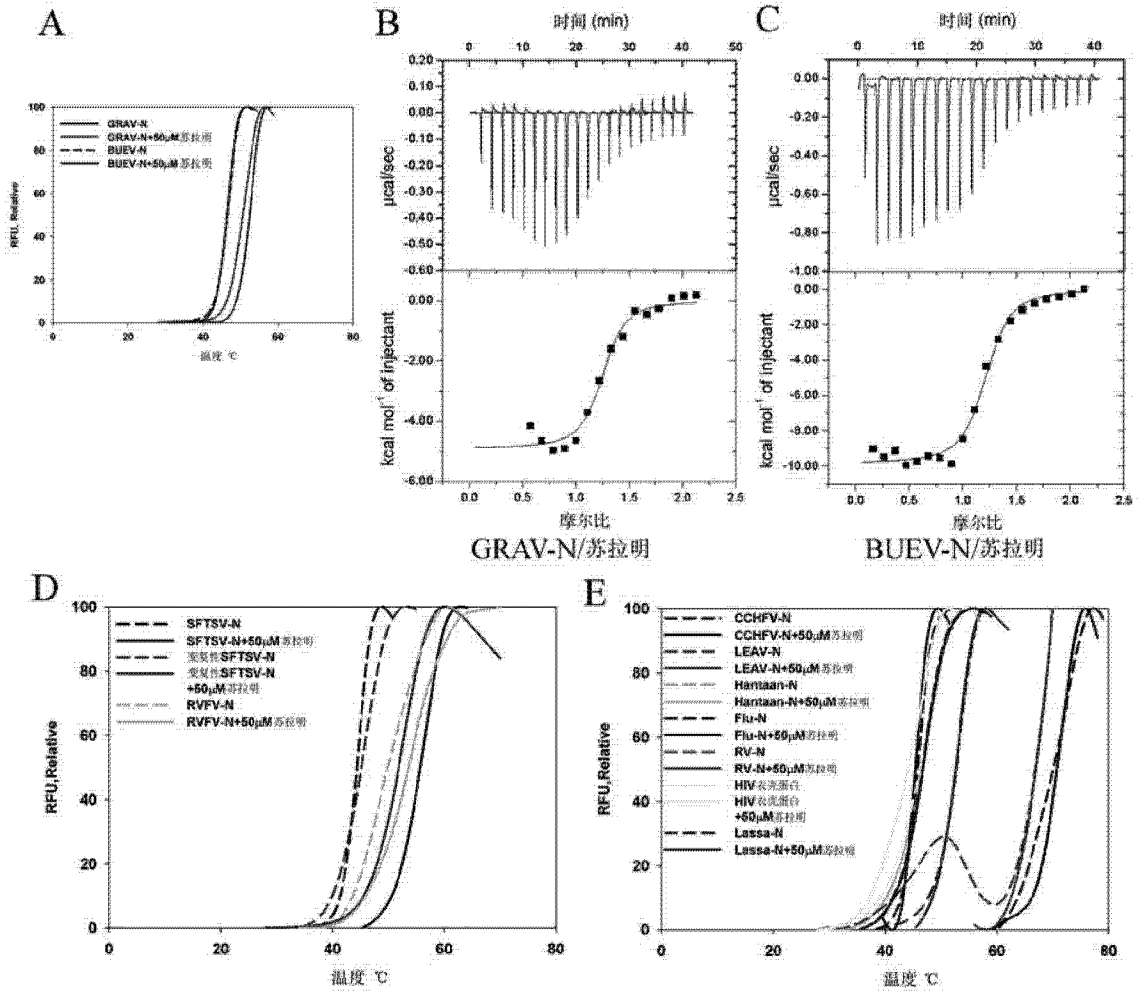


图 2

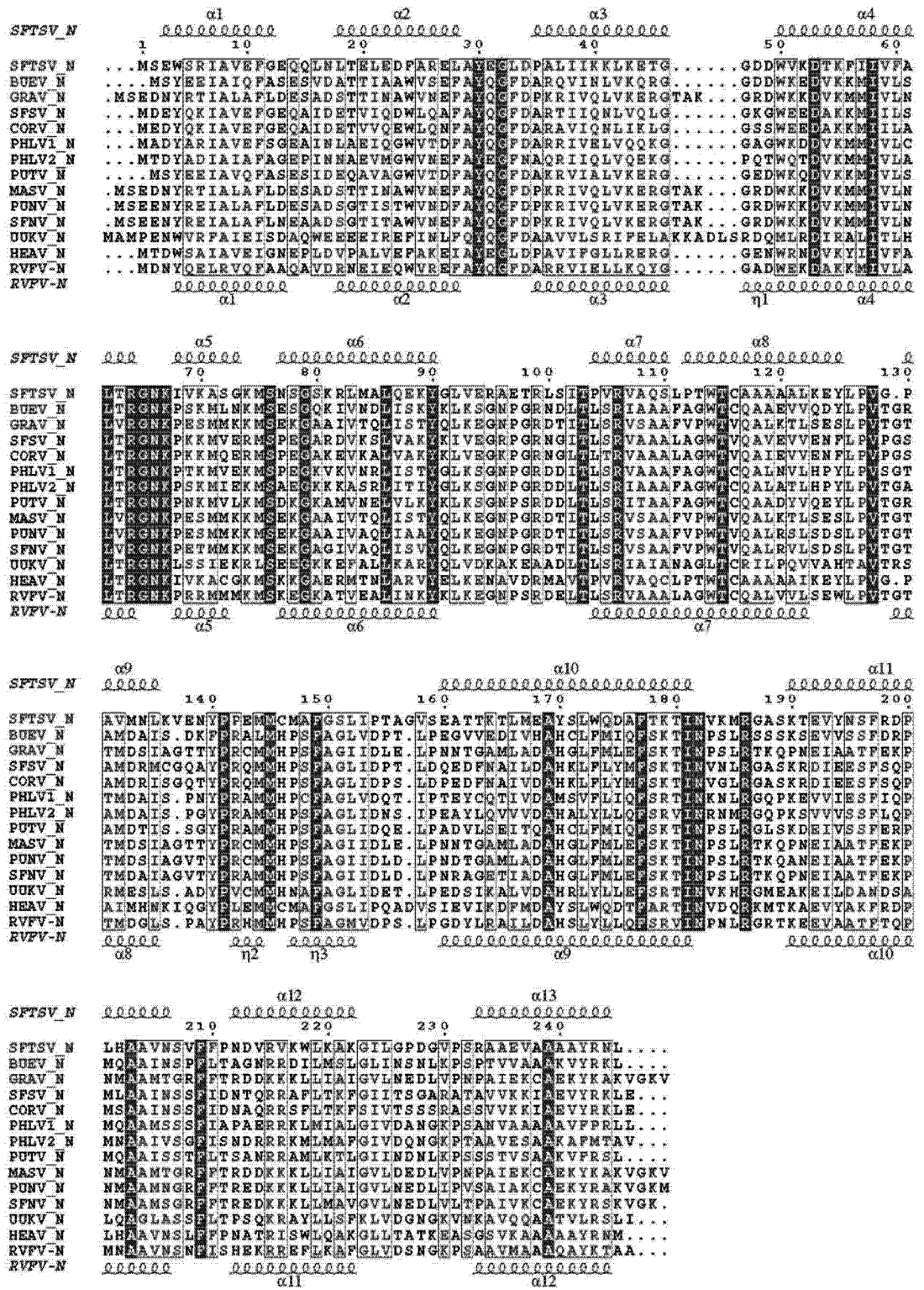


图 3

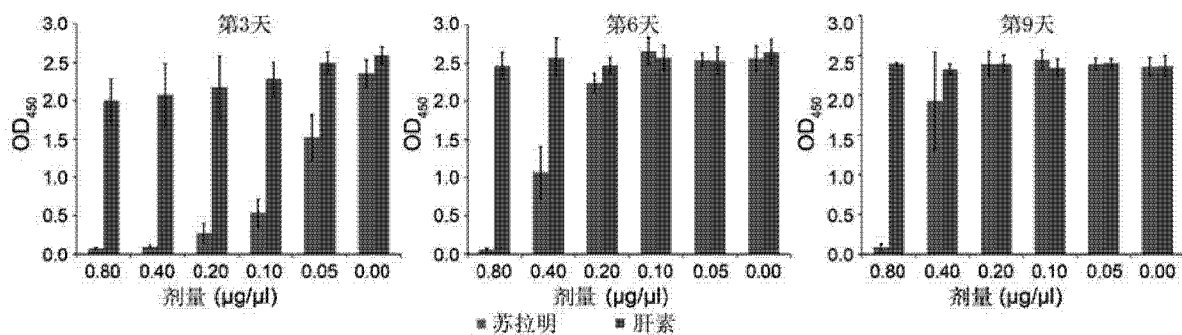


图 4

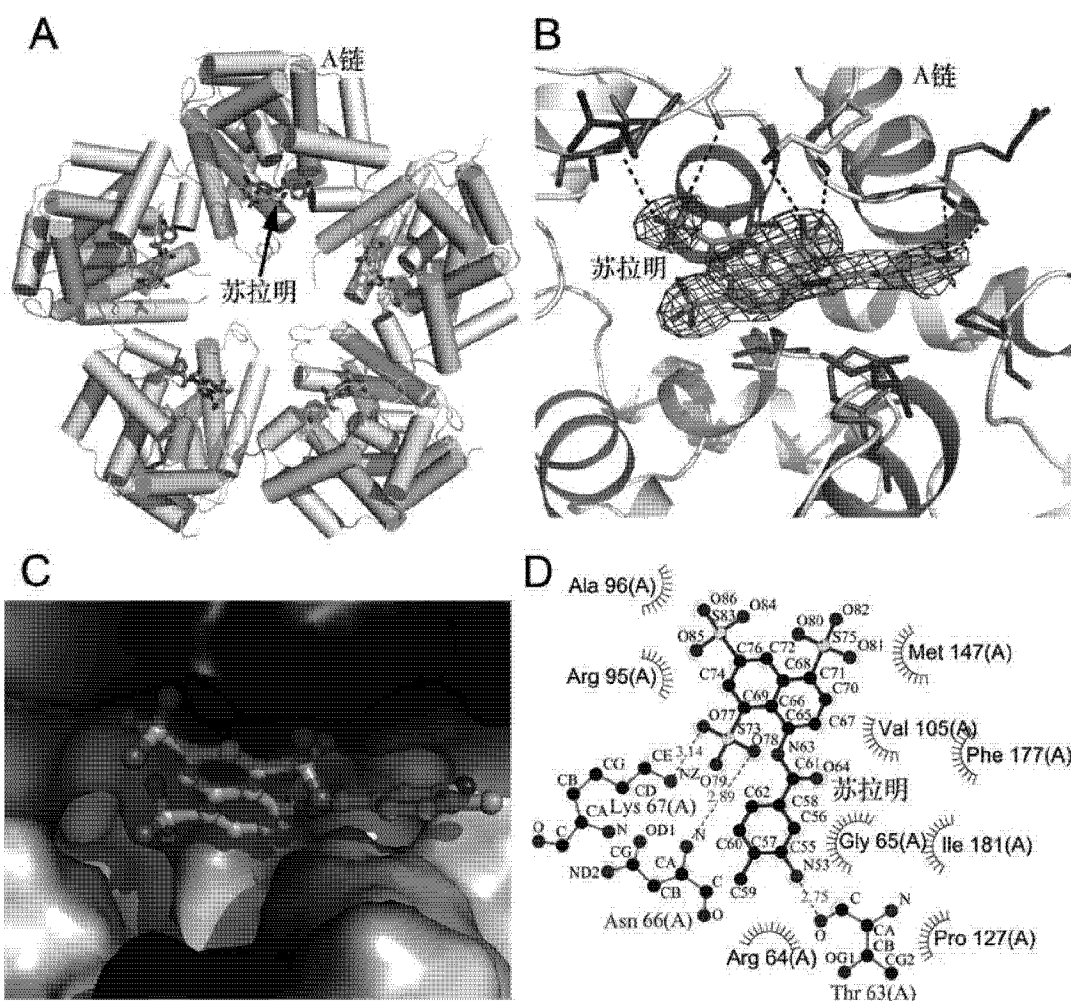


图 5