

技术与方法

以 MERS-CoV 主蛋白酶为靶点的药物 筛选体系的建立及应用*

张宁^{1,3} 潘丽^{1,3} 牛国君³ 王文明⁴ 周红刚² 杨诚^{2,3**}

(1 天津科技大学生物工程学院 天津 300457 2 南开大学药学院 天津 300457)

(3 天津市国际生物医药联合研究院有限公司 天津 300457 4 南开大学生命科学学院 天津 300457)

摘要 目的: 以新型冠状病毒(MERS-CoV)主蛋白酶 NSP5 为靶点,应用荧光共振能量转移法(FRET)建立药物筛选体系,并进行抑制剂的筛选。方法:采用原核表达系统、利用基因重组以及蛋白表达纯化技术得到目的蛋白, FRET 法检测蛋白酶活性,优化反应条件以及确定酶、底物的浓度,建立药物筛选体系,对 700 种化合物进行了检测。结果:应用建立的药物筛选体系,筛选到抑制率较高的化合物共 6 种,并测得 IC_{50} 值,其中 MDCCCL002330 的 IC_{50} 值最低,为 $(0.43 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$ 。结论:建立的药物筛选体系较为理想,适用于 NSP5 抑制剂的筛选,促进先导化合物的研发。

关键词 NSP5 抑制剂 高通量筛选 MERS-CoV

中图分类号 Q819

2012 年初,一名沙特男子感染新型冠状病毒死亡^[1]。同年 9 月,一名卡塔尔男子也感染了这种病毒^[2],之后该病毒相继在中东其他国家及欧洲蔓延,至今导致 94 人感染,死亡率达到 50%^[3]。经世界卫生组织证实,这种新型冠状病毒与 SARS 病毒同属一个家族。因于 2012 年在中东首次被鉴定出来,将其命名为中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)^[4]。该病毒能够引起人下呼吸道感染,症状表现与 SARS 相似,其病毒基因组分析显示与蝙蝠身上发现的冠状病毒 HKU-4、HKU-5 具有很高的同源性^[5-6]。Memish 等^[7]的最新研究进展表明这种冠状病毒与沙特阿拉伯一小种群蝙蝠的核酸序列相似度为 100%,证实了其来源,并推测可能存在其他传播载体。之后 Reusken 等^[8]又发现该病毒可能

以单峰驼作为传播中介,传入中东。新的晶体结构揭示这种新型冠状病毒能以宿主细胞表面二肽基肽酶 DPP4 作为功能受体,通过病毒表面 S 蛋白与 DPP4 结合,介导病毒融合,从而激发感染^[9-10]。

MERS-CoV 作为单股正链的 RNA 病毒,基因组可作为 mRNA 直接与核糖体作用表达蛋白。位于其基因组 5'末端的基因区包含两个相互重叠的编码区,分别为复制酶多蛋白 pp1a 和复制酶多蛋白 pp1ab,这两个酶多蛋白对病毒在人体内的复制和转录起着非常重要的作用,复制酶多蛋白上含有约 16 个左右的功能亚基,只有当这些功能亚基被病毒编码的蛋白酶切割成独立的蛋白单元,病毒才能完成正常的转录、复制功能,而承担这一水解功能的就是主蛋白酶 NSP5^[11-12],因此在药物研发中成为一个重要的靶点。

MERS-CoV 的主蛋白酶是一种半胱氨酸蛋白酶,分子量约为 34kDa,主要以同源二聚体的形式存在,且每个单体包括 3 个结构域。结构域 I 与结构域 II 主要由反平行的 β 折叠构成,结构域 III 包含了 5 个 α -螺旋。底物结合

收稿日期:2013-09-17 修回日期:2013-10-26

* 蛋白类生物药和疫苗发展专项—建立天津生物技术药物研发开放实验室和 GMP 中试服务平台资助项目

**通讯作者,电子邮箱:cheng.yang@htmdc.org

位点和催化中心 Cys148-His41 位于结构域 I、II 间的缝隙中。MERS-CoV 主蛋白酶 NSP5 与抑制剂之间主要通过形成共价键及氢键发生结合(图 1^[12])。

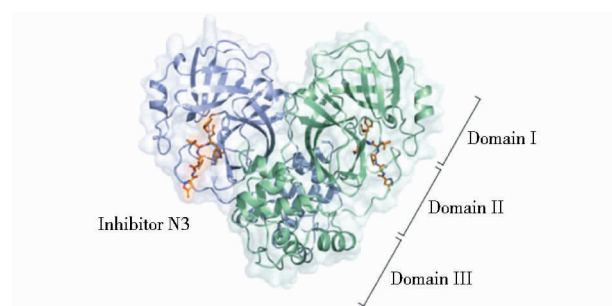


图 1 MERS-CoV 主蛋白酶 NSP5 与抑制剂的复合体结构

Fig. 1 Structure of MERS-CoV main proteinase complexed with an inhibitor

针对冠状病毒药物研发的路程是比较缓慢的。早在非典之前,人们就开始了对冠状病毒及其抑制剂的研究,Ziebuhr 等^[13]发现了 3,4-dichloroisocoumarin、PMSF、TLCK 和 Pefaloc SC 等对人类冠状病毒 229E (The human coronavirus 229E, HCoV-229E) 主蛋白酶的活性有很强的抑制作用,因其专一性差、毒副作用大而没有应用于治疗。非典时期,科学家们试图利用 SARS-CoV 本身潜在的靶点来设计药物,如针对 RNA 聚合酶、S 蛋白、N 蛋白^[14]、主蛋白酶^[15-16]等病毒重要组分研发抑制剂或抗体来阻断病毒的入侵、复制及转录,但开发新药风险大、临床试验用时长,至今仍无针对冠状病毒感染的特效药上市。目前寻找比现有药物更加优良的新药已日渐困难,且人们对新药安全性及有效性的要求也越来越高,基于 MERS-CoV 主蛋白酶在病毒复制转录过程中的重要性,需要以其为靶点建立药物筛选体系,以期获得尽量多的先导化合物用于药物开发。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

重组质粒 pET-SUMO-NSP5 (载体抗性为卡那抗性,构建重组质粒时于目的基因氨基端插入小泛素样修饰蛋白序列以及 6 个连续组氨酸序列)为清华大学提供。大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞购于北京全式金生物技术有限公司。JN-3000 plus 低温超高压连续流细胞破碎机购自广州聚能生物科技有限公司。SORVALL RC-6 plus 高速冷冻离心机、Fluoroskan Ascent 荧光读数

仪购自 Thermo Labsystems 公司 (Finland)。荧光底物 MCA-AVLQSGFR-Lys (Dnp)-Lys-NH₂ 购自 GL Biochem 公司 (China)。二甲基亚砜 (DMSO) 等化学试剂为市售分析纯。泛素样特异性蛋白酶 (ubiquitin-like specific protease, ULP) 由本实验室制备提纯。

待筛选化合物为本实验室化合物库保存,共 700 种。

1.2 目的蛋白的表达与纯化

重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3), 37℃ 培养 12 ~ 16h。挑取单克隆接种至 5ml 含卡那霉素的 LB 培养基中, 37℃ 220r/min 培养过夜。培养后的菌液接种入 800ml 含卡那霉素的 LB 培养基中 220r/min 摇瓶扩大培养至 OD 值约为 0.6 时,加入终浓度为 0.1mmol/L IPTG, 16℃ 继续培养诱导表达 20h。

培养后的菌液于 4℃ 5500r/min 离心 15min, 弃上清, 收集菌体, 并用 30ml 缓冲液 [20mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 150mmol/L NaCl, 4mmol/L MgCl₂] 重悬菌体。100MPa 压力下破碎细胞后, 4℃ 15000r/min 离心 30min, 取上清液流穿 Ni²⁺-NTA 琼脂糖凝胶柱。结合了融合蛋白的 Ni²⁺-NTA 琼脂糖凝胶柱用含 20mmol/L 咪唑的重悬缓冲液冲洗去除杂蛋白, 加入 ULP 4℃ 柱上酶切过夜 (酶切缓冲液为重悬缓冲液)。去除标签后的目的蛋白换成含有 10mmol/L NaCl 的重悬缓冲液, 通过阴离子交换层析柱 Resource Q (GE Healthcare, USA) 得到纯度高且电荷均一的目的蛋白。

1.3 药物筛选体系的建立及应用

1.3.1 药物筛选体系的建立 本模型中以 MCA-AVLQSGFR-Lys (Dnp)-Lys-NH₂ 作为 NSP5 酶活检测荧光底物^[12,17]。当无酶的作用时, 底物上荧光淬灭基团 Dnp 与荧光基团 MCA 作用, 使不发荧光, 当存在酶的作用时, 底物于 QS 之间被剪切开, MCA 游离并能在 320nm 的激发光下发射波长为 405nm 的荧光。荧光值通过 Fluoroskan Ascent 荧光读数仪检测, 反应温度为 30℃。通过优化缓冲液 pH、盐离子浓度、计算 EC₅₀ 与 Km, 以确定体系中缓冲液成分、蛋白浓度和底物浓度。

1.3.2 抑制剂的筛选方法 用 95% 的 DMSO 溶解底物和待筛选化合物, 储液浓度为 0.8mmol/L、100mmol/L。酶缓冲液稀释蛋白至浓度为 2.5μmol/L。96 孔板中分别加入 97μl 蛋白溶液和 1μl 化合物储液, 对照组加入等体积 95% 的 DMSO 溶液, 30℃ 孵育 10min 后加入 2μl 底物储液混匀 5s, 立即检测, 并计算抑制率 (Inhibition

ratio, I_r)。96 孔板中分别加入 97 μL 蛋白溶液,后加入 2 μL 底物储液混匀 5s,立即检测,反应平衡后加入 1 μL 化合物储液,对照组加入等体积 95% 的 DMSO,再次检测,计算淬灭率 (Quenching ratio, Q_r)。抑制率与淬灭率计算公式可表示为: $I_r = 1 - \frac{V_i}{V_0} \times 100\%$; $Q_r = \frac{Q_1 - Q_2}{Q_1} \times 100\%$ (V_0 :对照组反应初速度; V_i :测定组反应初速度; Q_1 :对照组最大信号值; Q_2 :测定组最大信号值)。

将 $I_r > 80\%$ 、 $Q_r < 20\%$ 的化合物储液进行梯度稀释,按上述方法再次测定,以抑制率为纵坐标,化合物浓度对数值为横坐标拟合求得 IC_{50} 值。

2 结 果

2.1 NSP5 的表达与纯化

通过亲和和层析、离子交换等步骤,纯化后目的蛋白的浓度约为 25mg/ml, SDS-PAGE 及 Western blot 检测结果如图 2。图中于 34kDa 处可见清晰条带,无明显非目的蛋白混杂,蛋白提纯效果较好,可用于后续药物筛选体系的建立。

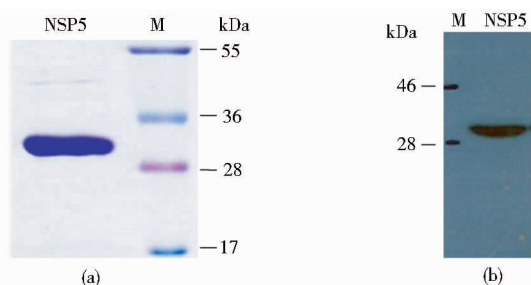


图 2 SDS-PAGE 分析 (a) 及 Western blot 检测 (b)

Fig. 1 SDS-PAGE (a) and Western blot (b)

M: Protein marker; NSP5: Purified target protein

2.2 药物筛选体系的建立

2.2.1 缓冲液及 pH 对酶活性的影响 将目的蛋白溶解于不同 pH 的缓冲液中,加入底物检测后计算酶促反应初速度。根据酶促反应初速度与缓冲液 pH 作图 (图 3),可知在 0.1mol/L PBS (0.1mol/L KH_2PO_4 , 0.1mol/L Na_2HPO_4 , pH 7.2) 中,反应初速度最高,酶的活性最好。

2.2.2 离子强度对酶活性的影响 将目的蛋白溶解于含有不同浓度 NaCl 的缓冲液中,加入底物检测后计算酶促反应初速度。根据酶促反应初速度与 NaCl 浓度作图 (图 4),可知,反应体系中 NaCl 浓度为 0 mmol/L 时,反应初速度最高,酶的活性最好。采用相同方法检测 KCl、 MgCl_2 ,发现其浓度的增加或降低对酶活性无明

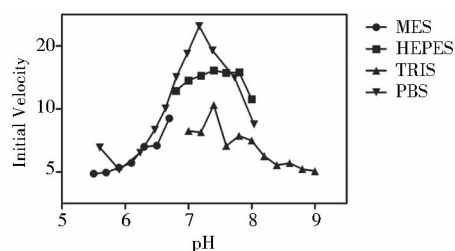


图 3 缓冲液及 pH 对酶活性的影响

Fig. 3 Effect of buffer and pH on enzyme activity

显影响。

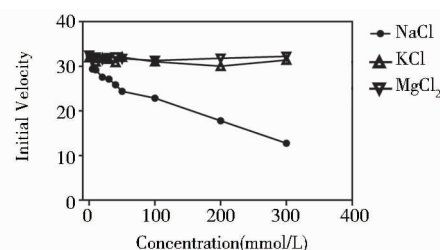


图 4 离子强度对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of ionic strength on enzyme activity

2.2.3 蛋白浓度的确定 固定底物浓度为 80 $\mu\text{mol/L}$, 蛋白浓度从 20 $\mu\text{mol/L}$ 进行梯度稀释,共 8 个梯度,检测后根据最大荧光值与酶浓度对数值作图 (图 5),计算 EC_{80} 值约为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

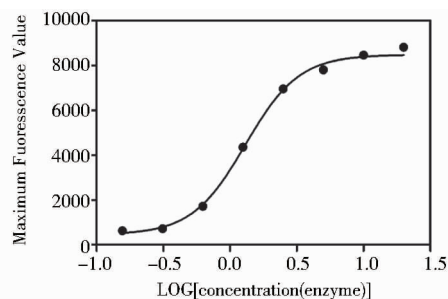


图 5 EC_{80} 的测定

Fig. 5 Determination of EC_{80}

2.2.4 K_m 的测定 固定蛋白浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 底物浓度从 80 $\mu\text{mol/L}$ 进行梯度稀释,共 8 个梯度,检测后由米氏方程计算 K_m 值约为 16 $\mu\text{mol/L}$ (图 6)。

2.2.5 药物筛选体系的评定 以 MERS-CoV 主蛋白酶为靶点建立的药物筛选体系为:反应体系中酶的浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$,底物浓度为 16 $\mu\text{mol/L}$,酶促反应缓冲液为 0.1mol/L PBS (0.1mol/L KH_2PO_4 , 0.1mol/L Na_2HPO_4 , pH 7.2)。通过计算 Z 因子对建立的药物筛

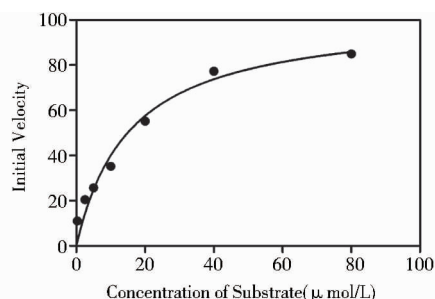


图6 Km的测定

Fig. 6 Determination of Km

选体系进行评定。

Z 因子计算公式可表示为: $Z\text{-factor} = 1 - \frac{3 \times (\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$ (σ :标准差; μ :平均值; p :信号; n :背景)。

表1 NSP5 抑制剂的测定

Table 1 Determination of NSP5 inhibitors

序号	编号	抑制率(%)	淬灭率(%)	IC ₅₀ (μmol/L)
1	MDCCCL001515	96.64	8.24	8.51 ± 1.01
2	MDCCCL001524	97.52	4.51	5.86 ± 0.56
3	MDCCCL001525	99.29	19.95	1.22 ± 0.13
4	MDCCCL002226	98.79	3.33	2.77 ± 0.41
5	MDCCCL002228	99.09	12.75	0.64 ± 0.04
6	MDCCCL002330	99.12	6.39	0.43 ± 0.03

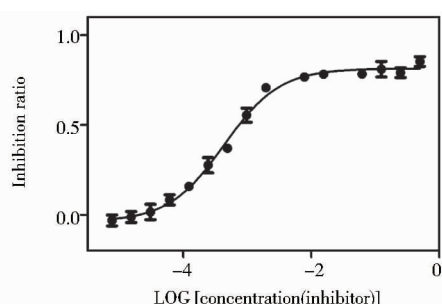


图7 MDCCCL002330 的抑制曲线

Fig. 7 Inhibition curve of MDCCCL002330

IC₅₀ = (0.43 ± 0.03) μmol/L; R² = 0.98206

3 讨论

药物筛选技术作为一项现代药物开发过程中检验及获取活性成分的一个关键步骤,其实质就是采用规范性的操作从大量化合物中筛选出对某一特定作用靶点具有理化活性的化合物的过程,具有灵敏、快速、高效等特点。目前药物筛选技术已成为寻找新药的主要途径之一,因此建立适合的药物筛选体系具有重要

意义。当 $0.7 \leq Z < 1$ 时,表示信噪比较大,数据平行性较好,药物筛选体系较为理想。

本研究中 Z 因子为 0.96 > 0.7,由此可确定建立的药物筛选体系较为理想,数据平行性较好,适用于抑制剂的筛选。

2.3 NSP5 抑制剂的筛选结果

应用建立的药物筛选体系对实验室化合物库 700 种化合物进行初步筛选,从中筛选出 $Ir > 80\%$ 、 $Qr < 20\%$ 的化合物共 6 种,分别为 MDCCCL001515、MDCCCL001524、MDCCCL001525、MDCCCL002226、MDCCCL002228、MDCCCL002330,并测得 IC₅₀ 值,详见表 1。其中 MDCCCL002330 的 IC₅₀ 值最低,为 (0.43 ± 0.03) μmol/L (图 7)。

意义。

MERS-CoV 的主蛋白酶在病毒的整个生活史中起关键调控作用,在病毒转录、复制过程中承担不可或缺的功能,是重要的药物设计靶点。本研究利用原核表达系统,大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达重组 MERS-CoV 主蛋白酶 NSP5,以 NSP5 为靶点,通过优化反应条件及确定酶与底物浓度,建立药物筛选体系,通过测定 Z 因子 ($Z\text{-factor} = 0.96 > 0.7$) 对体系进行评估可知建立的药物筛选体系较为理想,适用于抑制剂的筛选。运用建立的药物筛选体系筛选实验室化合物库中 700 种化合物,其中 MDCCCL001515、MDCCCL001524、MDCCCL001525、MDCCCL002226、MDCCCL002228 以及 MDCCCL002330 对 NSP5 活性具有很高的抑制作用,并测得这些化合物的 IC₅₀ 值,以 MDCCCL002330 的 IC₅₀ 值最低,抑制效果最好。

筛选体系的建立、应用以及先导化合物的发现为药物设计提供了结构基础,以利用后续的复合体结构研究来进一步揭示 MERS-CoV 主蛋白酶的底物识别催化机制,并以先导化合物为基础进行结构修饰,开发新

型抗 MERS-CoV 药物。目前针对 MERS-CoV 主蛋白酶抑制剂的筛选以及主蛋白酶与抑制剂的共晶试验还在进行中,由于先导化合物的发现具有随机性,我们还将结合计算机模拟筛选技术来加快这一进程。同时我们还将对筛选得到的先导化合物进一步合理优化,以得到药效好、药学性质稳定的药物。

参考文献

- [1] Zaki A M, van Boheemen S, Bestebroer T M, et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*, 2012, 367(19):1814-1820.
- [2] Bermingham A, Chand M A, Brown C S, et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill*, 2012, 17(40):20290.
- [3] World Health Organization. Novel coronavirus infection-update. http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/update_20130813/en/index.html.
- [4] Raoul J de Groot, Susan C Baker, Ralph S Baric, et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the coronavirus study group. *Journal of Virology*, 2013, 87(14):7790-7792.
- [5] van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, et al. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio*, 2012, 3(6):e00473-12.
- [6] Lu G, Liu D. SARS-like virus in the Middle East: a truly bat-related coronavirus causing human diseases. *Protein Cell*, 2012, 3(11):803-805.
- [7] Memish A Ziad, Nischay Mishra, Kevin J, et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bats, Saudi Arabia. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, (in press).
- [8] Reusken C B, Haagmans B L, Müller M A, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralizing serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *The Lancet Infect Diseases*, 2013, (in press).
- [9] Raj V S, Mou H, Smits S L, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 2013, 495(7440):251-254.
- [10] Lu G, Hu Y, Wang Q, et al. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature*, 2013, 500(7461):227-231.
- [11] Yang H, Bartlam M, Rao Z. Drug design targeting the main protease, the Achilles' heel of coronaviruses. *Curr Pharm Des*. 2006, 12(35):4573-4590.
- [12] Ren Z, Yan L, Zhang N, et al. The newly emerged SARS-like coronavirus HCoV-EMC also has an "Achilles' heel": current effective inhibitor targeting a 3C-like protease. *Protein Cell*. 2013, 4(4):248-250.
- [13] Ziebuhr J, Heussipp G, Siddell S G. Biosynthesis, purification and characterization of the human coronavirus 229E 3C-like proteinase. *J Virol*, 1997, 71(5):3992-3997.
- [14] Barnard D L, Kumaki Y. Recent developments in anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus chemotherapy. *Future Virol*, 2011, 6(5):615-631.
- [15] Thanigaimalai P, Konno S, Yamamoto T, et al. Development of potent dipeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors with novel P3 scaffolds: Design, synthesis, biological evaluation, and docking studies. *Eur J Med Chem*, 2013, (in press).
- [16] Zhao Q, Weber E, Yang H. Recent developments on coronavirus main protease/3C like protease inhibitors. *Recent Pat Antiinfect Drug Discovery*, 2013, 8(2):150-156.
- [17] Blanchard J E, Elowe N H, Huitema C, et al. High-throughput screening identifies inhibitors of the SARS coronavirus main proteinase. *Chem Biol*, 2004, 11(10):1445-1453.

Establishment and Application of a System for Drug Screening Targeting MERS-CoV Main Proteinase

ZHANG Ning^{1,3} Pan Li^{1,3} NIU Guo-jun³ WANG Wen-ming⁴ ZHOU Hong-gang² YANG Cheng^{2,3}

(1 College of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2 College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300457, China)

(3 Tianjin International Joint Academy of Biomedicine Co. Ltd., Tianjin 300457, China)

(4 College of Life Sciences, Nankai University; Tianjin 300457, China)

Abstract Objective: Targeting MERS-CoV main proteinase NSP5, a new system for drug screening was established for inhibitors screening by using fluorescence resonance energy transfer (FRET). Methods: Target protein was obtained using prokaryotic expression system and technologies of gene recombination, protein-expression and purification. Proteinase activity of target protein was examined by FRET assays. Finally, a system for drug screening was established and optimized before abundant compounds screening. Results: Using the drug screening system, eight compounds with high inhibition ratio were selected. Notably, the IC₅₀ of MDCCCL002330 is minimal, namely 0.43 μmol/L. Conclusion: The established system targeting MERS-CoV main proteinase NSP5 is suitable for inhibitors screening, which can be used to promote research and development of lead compounds.

Key words NSP5 Inhibitors High Throughput Screening MERS-CoV