(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110234757 B
(45)授权公告日 2023.05.16

(21)申请号 201780065721.2

(22)申请日 2017.08.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110234757 A

(43)申请公布日 2019.09.13

(30)优先权数据
10-2016-0107037 2016.08.23 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.04.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2017/009224 2017.08.23

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/038539 KO 2018.03.01

(73)专利权人 韩国生命工学研究院
地址 韩国大田市
专利权人 医药生命融合研究团

(72)发明人 金明姬 李恩暎 金圣勋 李哲浩

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413
专利代理师 王春伟 刘继富

(51)Int.Cl.
C12N 9/00(2006.01)
C12N 15/52(2006.01)
A61K 38/53(2006.01)
A61K 47/64(2006.01)

(56)对比文件
CN 103096909 A,2013.05.08
US 2015064188 A1,2015.03.05
US 7248971 B1,2007.07.24
CN 102858985 A,2013.01.02
WO 2011140266 A2,2011.11.10
Strausberg,R.L.等."EPRS protein [Homo sapiens]".《GenBank Database》.2006, Accession NO. :AAI26276.1.
Zhong Y等."Recent progress in studies of arterivirus- and coronavirus-host interactions".《Viruses》.2012,第4卷(第6期),
文圣梅等."谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶(EPRS)结构与功能的新认识".《军事医学科学院院刊》.2006,(第2期),
Lee, EY等."Infection-specific phosphorylation of glutamyl-prolyl tRNA synthetase induces antiviral immunity". 《NATURE IMMUNOLOGY》.2016,第17卷(第11期),

审查员 刘魏

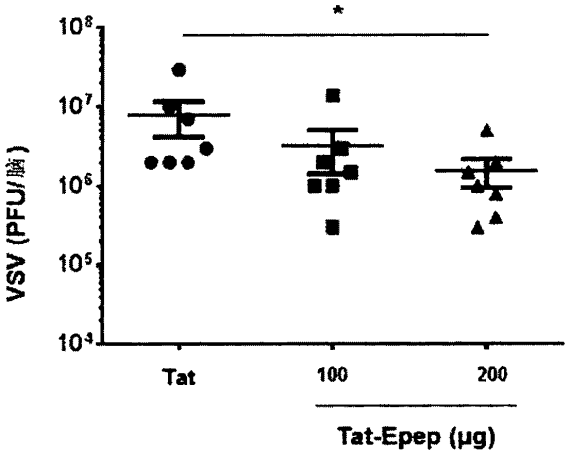
权利要求书1页 说明书29页
序列表23页 附图57页

(54)发明名称

包含EPRS蛋白或其片段的抗RNA病毒组合物

(57)摘要

本发明涉及包含谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶(EPRS)蛋白或其片段的抗RNA病毒组合物、用于预防或治疗RNA病毒感染性疾病的组合物、以及使用该组合物预防或治疗RNA病毒感染性疾病的方法。该包含本发明的EPRS蛋白或其片段的组合物通过结合PCBP2蛋白并激活MAVS信号转导途径而具有抗RNA病毒作用,并因此作为预防或治疗RNA病毒感染性疾病的组合物具有优异的作用。



CN 110234757 B

1.包含EPRS(谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶)蛋白或其片段的组合物用于制备抗RNA病毒的药物的用途,其中EPRS蛋白的片段包含SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述EPRS蛋白的片段包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:63中第1至196位的氨基酸序列、第1至269位的氨基酸序列、第1至457位的氨基酸序列、第1至506位的氨基酸序列、第1至682位的氨基酸序列、第168至506位的氨基酸序列、第168至269位的氨基酸序列和第168至196位的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的用途,其中RNA病毒是选自以下的一种或多于一种:阿马格病毒科病毒、双RNA病毒科病毒、金色病病毒科病毒、囊状噬菌体科病毒、内源RNA病毒科病毒、低毒性病毒科病毒、巨大双RNA病毒科病毒、分体病毒科病毒、小双RNA病毒科病毒、呼肠孤病毒科病毒、整体病毒科病毒、夸德里病毒科病毒、动脉炎病毒科病毒、冠状病毒科病毒、麦索尼病毒科病毒、杆套病毒科病毒、二顺反子病毒科病毒、传染性软化病病毒科病毒、海洋RNA病毒科病毒、小RNA病毒科病毒、伴生豇豆病毒科病毒、甲型线形病毒科病毒、乙型线形病毒科病毒、丙型线形病毒科病毒、芜菁黄花叶病毒科病毒、博尔纳病毒科病毒、丝状病毒科病毒、副黏液病毒科病毒、弹状病毒科病毒、尼亚米病毒科病毒、杯状病毒科病毒、黄病毒科病毒、黄症病毒科病毒、披膜病毒科病毒、肺病毒科病毒、沙粒病毒科病毒、δ病毒和正黏病毒科病毒。

4.根据权利要求1所述的用途,其中EPRS蛋白或其片段在其N-末端、其C-末端或其两个末端还包含细胞穿透肽。

5.根据权利要求4所述的用途,其中所述细胞穿透肽是选自Tat、触足肽、Hph-1、R11、R9、基于信号序列的肽、和两亲性肽中的一种或多于一种。

6.根据权利要求4所述的用途,其中所述细胞穿透肽是选自转运素和VP22中的一种或多于一种。

7.根据权利要求1所述的用途,其中EPRS蛋白或其片段与PCBP2结合以抑制MAVS与PCBP2的结合。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的用途,其中所述组合物用作药物组合物、准药物组合物、化妆品组合物或饲料组合物。

9.根据权利要求1至7中任一项所述的用途,其中抗RNA病毒的药物用于预防或治疗RNA病毒感染性疾病。

10.EPRS蛋白或其片段用于制备抗RNA病毒的药物的用途,其中EPRS蛋白的片段包含SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列。

11.编码ERPS蛋白或其片段的多核苷酸用于制备抗RNA病毒的药物的用途,其中EPRS蛋白的片段包含SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列。

12.包含多核苷酸的载体用于制备抗RNA病毒的药物的用途,其中多核苷酸编码ERPS蛋白或其片段,并且其中EPRS蛋白的片段包含SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列。

13.包含多核苷酸或载体的转化体用于制备抗RNA病毒的药物的用途,其中多核苷酸编码ERPS蛋白或其片段,其中EPRS蛋白的片段包含SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列,并且其中载体包含多核苷酸。

包含EPRS蛋白或其片段的抗RNA病毒组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含EPRS(谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶)蛋白或其片段的抗RNA病毒组合物、用于预防或治疗RNA病毒感染性疾病的组合物、以及使用该组合物预防或治疗RNA病毒感染性疾病的方法。

[0002] 相关技术描述

[0003] 氨酰-tRNA合成酶(ARS)是氨酰化催化的必需酶,并确保高保真蛋白质合成。ARS的催化结构域在三界中都是高度保守的。细胞质ARS在高等真核生物的进化过程中经历了重大变化,包括添加具有独特结构特征的新结构域开关,其既不是酶核心的一部分也不存在于原核同源物中。值得注意的是,这些附加区与广泛的生物学功能相关。因此,ARS已被认为是一类新的调节蛋白,其作用超出了蛋白质合成。高等真核生物中,许多ARS的活性似乎是由其在称为“多tRNA合成酶复合物(MSC)”的细胞质贮库系统中的存在来调节的。MSC在大多数情况下通过附加结构域组装,由8种tRNA合成酶组成,包括谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶(EPRS)和三种ARS相互作用多功能蛋白(AIMP1/p43、AIMP2/p38和AIMP3/p38)(Trends Biochem.Sci,2007,35:158-164)。

[0004] 在应激条件下,包含EPRS、甲硫氨酰-tRNA合成酶(MRS)、赖氨酰-tRNA合成酶(KRS)、AIMP1和AIMP2的几种MSC组分通过翻译后修饰从复合物中释放,以在例如炎症、细胞代谢、血管生成和肿瘤发生等非翻译事件中发挥活性(Trends Biochem.Sci,2009,34:324-331)。磷酸化是决定ARS在细胞中的非翻译功能的关键调节机制。其中的代表性实例涉及EPRS,其是唯一的双功能tRNA合成酶。EPRS包含ERS和PRS,它们通过含有三个WHEP结构域的接头偶联在一起。EPRS被认为位于MSC的外部,这与其对从MSC可诱导释放的敏感性一致。位于EPRS的ERS结构域和PRS结构域之间的残基Ser886和Ser999在被IFN-γ刺激后顺序磷酸化,从而促进其从MSC解离。一旦EPRS脱离MSC,EPRS就与非结构蛋白-1相关蛋白1(NSAP1)、磷酸化核糖体蛋白L13a和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)结合,形成IFN-γ激活的翻译抑制剂(GAIT)复合物。该调节复合物与编码炎性蛋白例如铜蓝蛋白(Cp)的mRNA的不同3′-UTR(非翻译区)结合,从而抑制它们的翻译。该特定功能被认为通过控制响应于感染期间的初始损伤所产生的有害促炎分子的表达而有助于解决慢性炎症。然而,值得注意的是,IFN-γ在感染后期的适应性免疫应答的背景下产生,并且主要由IL-12激活的自然杀伤(NK)细胞或Th1细胞分泌。

[0005] 先天免疫应答是感染早期的第一道防线。抗病毒信号传导是一种必需的细胞过程,其已经进化为对病毒感染产生响应。信号传导主要由RIG-I样受体(RLR)途径激活,其包含检测病毒RNA的关键细胞溶质传感器视黄酸诱导基因I(RIG-I)与黑色素瘤分化相关蛋白5(MDA5)。这些传感器随后与中枢抗病毒信号传导蛋白线粒体抗病毒信号传导蛋白(MAVS)相互作用,MAVS转而分别通过细胞溶质激酶IKK和TBK1激活转录因子NF-κB和IRF3。该级联反应最终导致I型IFN和其他抗病毒分子的诱导(Cell,2006,124:783-801)。这些信号传导途径通过正面和负面调节机制进行精细调控,通过复杂的蛋白质网络控制抗病毒应答。由于RLR途径被病毒RNA激活,导致免疫应答被MAVS激活,因此通过预防MAVS降解可以实现针

对RNA病毒的广谱抗病毒活性。

发明内容

[0006] 技术主题

[0007] 本发明人已经进行了大量努力来开发能够预防或治疗病毒感染的抗病毒组合物，结果发现其中一种MSC组分EPRS蛋白或其片段通过感染特异性修饰保护中枢抗病毒信号蛋白MAVS免受其负调节因子聚(rC)结合蛋白2(PCBP2)的影响，其最终对病毒感染具有预防和治疗作用，从而完成了本发明。

[0008] 技术手段

[0009] 本发明的一个目的是提供一种抗RNA病毒组合物，其包含谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶(EPRS)蛋白或其片段，其中EPRS蛋白的片段包含SEQ ID NO:63中第168位至186位的氨基酸序列。

[0010] 本发明的另一个目的是提供具有抗RNA病毒活性的EPRS蛋白或其片段，其中EPRS蛋白的片段包含SEQ ID NO:63中第168位至186位的氨基酸序列。

[0011] 本发明的另一个目的是提供编码该蛋白质或其片段的多核苷酸。

[0012] 本发明的另一个目的是提供包含该多核苷酸的载体。

[0013] 本发明的另一个目的是提供包含该多核苷酸或该载体的转化体。

[0014] 本发明的另一个目的是提供用于预防或治疗RNA病毒感染性疾病的药物组合物，该药物组合物包含抗RNA病毒组合物。

[0015] 本发明的另一个目的是提供治疗RNA病毒感染性疾病的方法，其包括将抗RNA病毒组合物施用给对象。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种用于预防或改善RNA病毒感染性疾病的准药物(quasi-drug)组合物，该准药物组合物包含抗RNA病毒组合物。

[0017] 本发明的另一个目的是提供一种用于预防或改善RNA病毒感染性疾病的食品组合物，该食品组合物包含抗RNA病毒组合物。

[0018] 本发明的另一个目的是提供一种用于预防或改善RNA病毒感染性疾病的化妆品组合物，该化妆品组合物包含抗RNA病毒组合物。

[0019] 本发明的另一个目的是提供一种用于预防或改善RNA病毒感染性疾病的饲料组合物，该饲料组合物包含抗RNA病毒组合物。

[0020] 本发明的另一个目的是提供一种预防或抑制MAVS蛋白降解的方法，其包括施用抗RNA病毒组合物。

[0021] 发明效果

[0022] 包含本发明的EPRS蛋白或其片段的组合物可以结合PCBP2蛋白以激活MAVS信号传导途径，该信号传导途径对于所有抗RNA病毒活性是至关重要的，因此该组合物具有广谱抗RNA病毒作用，从而作为有效的预防或治疗RNA病毒感染性疾病的组合物。

附图说明

[0023] 图1显示了PR8感染的支气管上皮细胞中MSC基因(变化超过1.5倍)的上调(灰色)或下调(黑色)。

[0024] 图2显示了EPRS诱导的IFN-β启动子激活。对于所选MSC基因的萤光素酶分析，用编码IFN-β启动子的质粒以及编码RIG-1的N-末端结构域(N-RIG-1)的质粒转染293T细胞。Con代表未用N-RIG-I转染的那些。

[0025] 图3显示了在各种病毒感染的细胞系中的EPRS表达。

[0026] 图4显示了EPRS表达的免疫印迹分析。用非靶向对照siRNA(siCon)或siEPRS转染RAW246.7细胞。

[0027] 图5显示了通过荧光显微术(荧光显微镜，上图；相差显微镜，下图)进行的病毒复制分析。用si对照(siCon)或siEPRS转染RAW264.7细胞。

[0028] 图6显示了用PR8-GFP(MOI＝1)或VSV-GFP(MOI＝0.5)感染后24小时的荧光分析和噬斑测定。用si对照(siCon)或siEPRS转染RAW264.7细胞。

[0029] 图7显示了用HSV-GFP感染后的病毒滴度(MOI＝1)。用非靶向对照siRNA(siCon)或siEPRS转染RAW246.7细胞。

[0030] 图8显示了用PR8-GFP、VSV-GFP或HSV-GFP(MOI＝1)感染或用聚肌苷酸-聚胞苷酸(poly(I:C))(80μg)处理的细胞的培养物上清液中的IFN-β水平。用si对照(siCon)或siEPRS转染RAW264.7。

[0031] 图9显示了用PR8-GFP、VSV-GFP或HSV-GFP(MOI＝1)感染或用聚肌苷酸-聚胞苷酸(80μg)处理的细胞的培养物上清液中的IL-6水平。用si对照(siCon)或siEPRS转染RAW264.7。

[0032] 图10显示了用siCon或siEPRS转染36小时后用VSV-GFP(MOI＝0.0001)感染的293T细胞的荧光显微图像。

[0033] 图11显示了用siCon或siEPRS转染36小时后用VSV-GFP(MOI＝0.0001)感染的293T细胞中的细胞复制。

[0034] 图12显示了用siCon或siEPRS转染36小时后用VSV-GFP(MOI＝0.0001)感染的293T细胞中的IFN-β或IL-6分泌水平。

[0035] 图13显示了用PR8-GFP(MOI＝1)感染的细胞中EPRS表达的免疫印迹分析。将非靶向对照shRNA(shCon)或EPRS shRNA(shEPRS)引入RAW264.7细胞，并使用嘌呤霉素进行筛选。

[0036] 图14显示了用PR8-GFP(MOI＝1)感染的细胞的荧光显微图像。将非靶向对照shRNA(shCon)或EPRS shRNA(shEPRS)引入RAW264.7细胞，并使用嘌呤霉素进行筛选。

[0037] 图15显示了用PR8-GFP(MOI＝1)感染的细胞中的PR8滴度。将非靶向对照shRNA(shCon)或EPRS shRNA(shEPRS)引入RAW264.7细胞，并使用嘌呤霉素进行筛选。

[0038] 图16显示了用PR8-GFP(MOI＝1)感染的细胞中的IFN-β或IL-6分泌水平。将非靶向对照shRNA(shCon)或EPRS shRNA(shEPRS)引入RAW264.7细胞，并使用嘌呤霉素进行筛选。

[0039] 图17显示了用VSV-GFP(MOI)感染的稳定EPRS耗尽细胞的荧光显微图像。将非靶向对照shRNA(shCon)或EPRS shRNA(shEPRS)引入RAW264.7细胞，并使用嘌呤霉素进行筛选。

[0040] 图18显示了用VSV-GFP(MOI)感染的稳定EPRS耗尽细胞中的VSV滴度。将非靶向对照shRNA(shCon)或EPRS shRNA(shEPRS)引入RAW264.7细胞，并使用嘌呤霉素进行筛选。

[0041] 图19显示了用VSV-GFP(MOI)感染的稳定EPRS耗尽细胞中的IFN-β或IL-6分泌水平。将非靶向对照shRNA(shCon)或EPRS shRNA(shEPRS)引入RAW264.7细胞，并使用嘌呤霉

素进行筛选。

[0042] 图20显示了IRF3和STAT1的磷酸化或失活以及EPRS和肌动蛋白的表达的免疫印迹分析。在指定时间用PR8-GFP感染表达EPRS特异性shRNA(shEPRS)或对照shRNA(shCon)的RAW264.7细胞。

[0043] 图21显示了EPRS表达的免疫印迹分析。用FLAG标记的空载体(Con)或EPRS-FLAG(EPRS)质粒转染RAW264.7细胞,并使用嘌呤霉素进行筛选。

[0044] 图22显示了PR8-GFP感染的、空载体(Con)或EPRS敲入的RAW264.7细胞的荧光显微镜分析。

[0045] 图23显示了PR8-GFP感染的、空载体(Con)或EPRS敲入的RAW264.7细胞的荧光分析和噬斑测定。

[0046] 图24显示了PR8-GFP感染的、空载体(Con)或EPRS敲入的RAW264.7细胞的IFN-β或IL-6分泌。

[0047] 图25显示了VSV-GFP(MOI＝0.5)感染的EPRS过表达细胞的荧光显微图像。用FLAG标记的空载体(Con)或EPRS-FLAG(EPRS)质粒转染RAW264.7细胞,并使用嘌呤霉素进行筛选。

[0048] 图26显示了VSV-GFP(MOI＝0.5)感染的EPRS过表达细胞中的VSV滴度。用FLAG标记的空载体(Con)或EPRS-FLAG(EPRS)质粒转染RAW264.7细胞,并使用嘌呤霉素筛选。

[0049] 图27显示了VSV-GFP(MOI＝0.5)感染的EPRS过表达细胞中的IFN-β或IL-6分泌水平。用FLAG标记的空载体(Con)或EPRS-FLAG(EPRS)质粒转染RAW264.7细胞,并使用嘌呤霉素进行筛选。

[0050] 图28显示了通过噬斑分析评估的病毒滴度。用VSV-GFP(MOI＝5)和PR8-GFP(MOI＝3)感染EPRS+/+和EPRS+/-小鼠的BMDM。

[0051] 图29显示了病毒感染后12小时或24小时培养物上清液中的IFN-β和IL-6水平。用VSV-GFP(MOI＝5)和PR8-GFP(MOI＝3)感染EPRS+/+和EPRS+/-小鼠的BMDM。

[0052] 图30显示了聚肌苷酸-聚胞苷酸处理后12小时或24小时培养物上清液中的IFN-β和IL-6水平。用聚肌苷酸-聚胞苷酸(40μg)处理EPRS+/+和EPRS+/-小鼠的BMDM。

[0053] 图31显示了BMDM中EPRS表达的免疫印迹分析。用非靶向对照siRNA(siCon)或siEPRS转染BMDM 36小时。

[0054] 图32显示了在感染后12小时和24小时通过噬斑分析评估的病毒滴度。用PR8-GFP(MOI＝3)或VSV-GFP(MOI＝5)感染BMDM。

[0055] 图33显示了在感染后12小时和24小时通过ELISA评估的IFN-β和IL-6水平。用PR8-GFP(MOI＝3)或VSV-GFP(MOI＝5)感染BMDM。

[0056] 图34显示了用40μg聚肌苷酸-聚胞苷酸处理的BMDM培养上清液中的IFN-β和IL-6水平。

[0057] 图35显示了在用VSV-GFP感染后12小时,源自EPRS+/+和EPRS+/-小鼠的BMDM中IFN-β、IL-6和其他IFN相关抗病毒基因的表达。

[0058] 图36显示是否诱导了经病毒感染的细胞中的IFN-β mRNA或IFN相关抗病毒基因表达。用siCon或siEPRS转染RAW264.7细胞36小时,然后用PR8-GFP(MOI＝1)感染12小时。图中显示的基因相对于gapdh的表达进行归一化,并表示为诱导倍数。

[0059] 图37显示了用HSV-GFP感染后细胞培养物上清液中的病毒滴度(通过噬斑分析评估)。用HSV-GFP(MOI＝2)感染源自EPRS+/+和EPRS+/-小鼠的BMDM。

[0060] 图38显示了用HSV-GFP感染后的细胞培养物上清液中的IFN-β或IL-6分泌水平。用HSV-GFP(MOI＝2)感染源自EPRS+/+和EPRS+/-小鼠的BMDM。

[0061] 图39显示了年龄和性别匹配的EPRS+/+(n＝15)和EPRS+/-(n＝14)小鼠在静脉内施用VSV-Indiana(2×10^8pfu/小鼠)后10天的存活率。

[0062] 图40显示了在感染后第5天通过噬斑测定评估的EPRS+/+和EPRS+/-小鼠(n＝6)的脑组织和脾组织中的病毒载量。

[0063] 图41显示了通过VSP转录物(n＝5)的qPCR确定的病毒载量。

[0064] 图42显示了通过噬斑测定评估的病毒载量。从经VSV-GFP(2×10^8pfu/小鼠)感染后12小时的EPRS+/+和EPRS+/-小鼠(n＝8)收集血清,并用于测定。

[0065] 图43显示了通过ELISA测定的IFN-β、IFN-α和IL-6水平。从经VSV-GFP(2×10^8pfu/小鼠)感染后12小时的EPRS+/+和EPRS+/-小鼠(n＝8)收集血清,并用于测定。

[0066] 图44显示了从经VSV-Indiana(i-iii)感染后5天的EPRS+/+和EPRS+/-小鼠(n＝4)脑组织的H&E染色切片获得的神经实质。黑色箭头指示脑实质中的反应性小神经胶质细胞和单核细胞形成的胶质结节,并且箭头指示血管套现象(perivascular cuffing)。观察到侧脑室(LV)的室管膜衬里(红色箭头,iv)的破坏,这是单核细胞大量浸润导致的结果。Con代表非病毒感染的样品。

[0067] 图45显示了在用VSV-Indiana感染后第3天和第5天,用抗VSV-G抗体染色的脑切片(n＝4)的免疫组织化学分析结果。细胞核用DAPI染色。VSV阳性GFP信号用白色箭头表示。Con代表非病毒感染的样品。

[0068] 图46显示了用PR8-GFP(MOI＝3)感染U937细胞或用IFN-γ(500单位/毫升)处理后,用抗EPRS抗体进行内源性免疫共沉淀(CO-IP)随后使用抗KRS和抗AIMP3(MSC组分)抗体以及抗NSAP1和抗GAPDH(GAIT复合物组分)抗体进行免疫印迹分析的结果。

[0069] 图47显示了由病毒感染诱导的EPRS从MSC组分的释放。使用抗EPRS抗体对经PR8-GFP(MOI＝1)感染的RAW264.7细胞的细胞裂解物进行免疫沉淀(IP),然后用抗KRS、抗MRS、抗AIMP3和抗GAPDH抗体进行免疫印迹分析。

[0070] 图48显示了由病毒感染诱导的EPRS从MSC组分的释放。使用抗KRS抗体对经PR8-GFP(MOI＝1)感染的RAW264.7细胞的细胞裂解物进行免疫沉淀,然后用抗EPRS和抗AIMP3抗体进行免疫印迹分析。

[0071] 图49显示了共聚焦显微分析,其用于评估是否检测到内源性EPRS(红色)和KRS(绿色)的共定位。用PR8(MOI＝5)感染细胞6小时或12小时,或用IFN-γ(1000单位/毫升)处理细胞12小时。比例尺,10μm。

[0072] 图50显示了EPRS和KRS的共定位指数。

[0073] 图51显示了在用PR8(MOI＝5)感染6小时或12小时的HeLa细胞中内源性EPRS(红色)和KRS(绿色)表达的共聚焦显微分析,并与用IFN-γ(1000单位/毫升)处理12小时的细胞进行比较。比例尺,10μm(放大图像:2μm)。

[0074] 图52显示了通过Strep沉淀从经PR8-GFP(MOI＝5)感染的293T细胞或未经感染的293T细胞(-)中纯化的Strep-EPRS的银染。EPRS蛋白用*标记。EV为Strep标记的空载体。

[0075] 图53显示了在未经感染(-,上图)的和经PR8感染(PR8,下图)的条件下获得的双电荷EPRS肽EYIPGQPPLSQSSDSpS*PTR(MH+＝2125.93,z＝2+,SEQ ID NO:65)的MS/MS谱。肽包含S886-磷酸化位点(用*标记)。根据质谱法中肽片段化的命名法来标记片段离子。

[0076] 图54显示了在未经感染(-,上图)和经感染(PR8,下图)的条件下通过胰蛋白酶消化衍生自非磷酸化(左)和磷酸化(右)EPRS的双电荷EYIPGQPPLSQSSDSSPTR(MH+＝2044.96,z＝2+,SEQ ID NO:66)肽的提取离子色谱图(XIC)。磷酸化残基用*标记,N.D.表示未检测到。

[0077] 图55显示了在未经感染(-,上图)和经感染(PR8,下图)的条件下通过胰蛋白酶消化衍生自非磷酸化EPRS的双电荷NQGGGLSSSGAGEGQGPK(MH+＝1586.72,z＝2+,SEQ ID NO:67)肽(左)和衍生自磷酸化EPRS的双电荷NQGGGLSS*SGAGEGQGPK(SEQ ID NO:68)肽(右)的XIC(提取离子色谱图)。磷酸化残基用*标记,N.D.表示未检测到。

[0078] 图56显示了三电荷EPRS肽的MS/MS谱,KDPSKNQGGGLSSSGAGEGQGPK[MH+＝2142.02,z＝3+,SEQ ID NO:69;未感染条件(-,左图)]和KDPpS*KNQGGGLSSSGAGEGQGPK[MH+＝2222.99,z＝3+,SEQ ID NO:70;经PR8感染条件(PR8,右图)]。后者包含Ser990-磷酸化位点(用*标记)。

[0079] 图57显示了在未经感染(-,上图)和经PR8感染(PR8,下图)的条件下通过胰蛋白酶消化衍生自非磷酸化(左)和磷酸化(右)EPRS的三电荷KDPSKNQGGGLSSSGAGEGQGPK(MH+＝2142.02,z＝3+,SEQ ID NO:69)肽的XIC(提取离子色谱图)。磷酸化残基用*标记,N.D.表示未检测到。

[0080] 图58显示了在用PR8-GFP感染或用IFN-γ处理的U937细胞中在Ser990处磷酸化的EPRS的免疫印迹分析。

[0081] 图59显示了在用PR8-GFP(MOI＝I)感染的RAW264.7细胞中在Ser990处磷酸化的EPRS的免疫印迹分析。

[0082] 图60显示了在用PR8-GFP(MOI＝5)感染的293T细胞中在Ser990处磷酸化的EPRS的免疫印迹分析。

[0083] 图61显示了在用VSV-GFP(MOI＝0.001)感染的293T细胞中在Ser990处磷酸化的EPRS的免疫印迹分析。

[0084] 图62显示了在用2μg聚肌苷酸-聚胞苷酸转染的细胞中在Ser990处磷酸化的EPRS的免疫印迹分析。

[0085] 图63显示了在用PR8-GFP感染或用IFN-γ处理的U937细胞中在Ser886处磷酸化的EPRS的免疫印迹分析。

[0086] 图64显示了在用PR8-GFP感染或用IFN-γ处理的U937细胞中在Ser999处磷酸化的EPRS的免疫印迹分析。

[0087] 图65显示了用PR8-GFP或VSV-GFP感染的U937细胞中的IFN-γ分泌水平。使用经IFN-γ(1000单位/毫升)处理24小时的细胞作为阳性对照。

[0088] 图66显示了用PR8-GFP或VSV-GFP感染的RAW264.7细胞中的IFN-γ分泌水平。使用经IFN-γ(1000单位/毫升)处理24小时的细胞作为阳性对照。

[0089] 图67显示了用PR8-GFP感染的RAW264.7细胞中Cp表达的免疫印迹分析。

[0090] 图68显示了Ser990磷酸化模拟的EPRS从MSC的释放。用空载体(EV)、Strep-EPRS野

生型(WT)或三种磷酸化模拟形式转染293T细胞，然后用抗KRS、抗AIMP3和抗MRS抗体进行Strep沉淀和免疫印迹分析。

[0091] 图69显示了用N-RIG-1、MDA5、聚肌苷酸-聚胞苷酸或MAVS以及EPRS-FLAG质粒(0ng、50ng、200ng或800ng)转染的293T细胞中的IFN-β启动子激活。

[0092] 图70显示了用TRAF3、TBK1或IRF7以及EPRS-FLAG质粒(0ng、50ng、200ng或800ng)转染的293T细胞中的IFN-β启动子激活。

[0093] 图71显示了用Strep-EPRS质粒转染后24小时随后用PR8-GFP(MOI＝5)感染6小时的从293T细胞纯化的Strep-EPRS复合物的银染。由*标记的蛋白质表示PCBP2(38kDa)。该序列表示通过质谱鉴定的肽。

[0094] 图72显示了通过用抗EPRS抗体进行免疫沉淀并用抗PCBP2抗体进行免疫印迹分析所评估的经PR8感染的RAW264.7细胞中EPRS和PBP2之间的相互作用。

[0095] 图73显示了通过用抗EPRS抗体进行免疫沉淀并用抗PCBP2抗体进行免疫印迹分析所评估的经PR8感染的U937细胞中EPRS和PBP2之间的相互作用。

[0096] 图74显示了用PR8病毒(MOI＝5)感染的HeLa细胞中内源性EPRS(红色)和PCBP2(绿色)表达的共聚焦分析。比例尺，10μm。

[0097] 图75显示了本发明中使用的EPRS及其片段的图示。EPRS是否与PCBP2结合由(+或-)表示。GST为GST样结构域；L为连接子；CD为催化结构域；tRNA为tRNA结合结构域；W为WHEP结构域。

[0098] 图76显示了EPRS或其片段是否与PCBP2相互作用。用空载体(EV)、PCBP2或EPRS质粒转染293T细胞。

[0099] 图77显示了IFN-β启动子激活的萤光素酶报告基因分析。用包含N-RIG-1、IFN-β启动子和TK-Renilla的表达质粒以及EV或指示的EPRS质粒转染293T细胞。

[0100] 图78显示了EPRS或其片段是否与PCBP2相互作用。用空载体(EV)、PCBP2或EPRS质粒转染293T细胞。

[0101] 图79显示了IFN-β启动子激活的萤光素酶报告基因分析。用包含N-RIG-1、IFN-β启动子和TK-Renilla的表达质粒以及EV或指示的EPRS质粒转染293T细胞。

[0102] 图80显示了EPRS或其片段是否与PCBP2相互作用。用空载体(EV)、PCBP2或EPRS质粒转染293T细胞。

[0103] 图81显示了IFN-β启动子激活的萤光素酶报告基因分析。用包含N-RIG-1、IFN-β启动子和TK-Renilla的表达质粒以及EV或指示的EPRS质粒转染293T细胞。

[0104] 图82显示了PCBP2构建体的图示。表示了PCBP2是否与EPRS结合。

[0105] 图83显示了PCBP2 KH1对于与EPRS的相互作用是必需的。通过表达Strep-EPRS和各种形式的GST-PCBP2的293T细胞裂解物的Strep沉淀并随后用抗GST抗体进行免疫印迹分析来检验与PCBP2的相互作用。

[0106] 图84显示了体外沉淀分析EPRS(第1至第732位氨基酸、第1至第196位氨基酸和第1至第168位氨基酸)和PCBP2 KH1(第11至第82位氨基酸)结构域是否直接结合。黑色箭头表示在纯化过程中衍生自EPRS的蛋白质片段。标记条带的N-末端序列被鉴定为EPRS的MRFDD(第234至第238位氨基酸)和MVTFI(第565至第569位氨基酸)序列。红色箭头表示PCBP2 KH1结构域。

[0107] 图85显示了EPRS和PCBP2之间的相互作用。将纯化的His标记的EPRS(第1至第196位氨基酸)与GST融合的PCBP2 KH1(第11至第82位氨基酸)混合。His标签沉淀后,对蛋白质进行SDS-PAGE,随后进行考马斯亮蓝染色。FT代表流过级分。

[0108] 图86显示了EPRS和PCBP2之间的相互作用。将纯化的Hig标记的EPRS(第1至第186位氨基酸)与GST融合的PCBP2 KH1(第11至第82位氨基酸)混合。Hig标签沉淀后,对蛋白质进行SDS-PAGE,随后进行考马斯亮蓝染色。FT代表流过级分。

[0109] 图87显示了PCBP2 KH1结构域和MAVS之间的相互作用。通过用抗FLAG抗体对经MAVS和各种PCBP2质粒转染的293T细胞的裂解物进行免疫共沉淀并随后用抗GST抗体进行免疫印迹分析来证实与PCBP2的相互作用。

[0110] 图88显示了PCBP2 KH1结构域和MAVS之间相互作用的体外沉淀测定。箭头代表MAVS蛋白。

[0111] 图89显示了MAVS和PCBP2之间的相互作用。将纯化的GST融合的MAVS(第460至第540位氨基酸)与His标记的PCBP2 KH1(第11至第82位氨基酸)混合。将蛋白质混合物上样到Ni-NTA琼脂糖珠上,随后用咪唑洗脱缓冲液液洗脱。FT代表流过级分。

[0112] 图90显示了MAVS和PCBP2之间的相互作用。将纯化的GST融合的MAVS(第460至第540位氨基酸)与His标记的PCBP2连接子(第168至第279位氨基酸)混合。将蛋白质混合物上样到Ni-NTA琼脂糖珠上,随后用咪唑洗脱缓冲液液洗脱。FT代表流过级分。

[0113] 图91显示了通过GST沉淀和用抗FLAG或抗Strep抗体的免疫印迹分析所证实的MAVS(第一排)和PCBP2之间或EPRS(第二排)和PCBP2之间的相互作用。用MAVS和PCBP2转染293T细胞,并用不同量的EPRS处理。

[0114] 图92显示了用于评估PCBP2和ITCH(第一排)或PCBP2和EPRS(第二排)之间的相互作用的GST沉淀。

[0115] 图93显示了PCBP2和EPRS或PCBP2和MAVS之间的内源性相互作用。用抗PCBP2抗体从经PR8感染的RAW264.7细胞的细胞裂解物免疫沉淀内源性PCBP2,随后用抗EPRS(第一排)或抗MAVS(第二排)抗体对该内源性PCBP2进行免疫印迹。

[0116] 图94显示了用抗K48Ub抗体对外源性MAVS进行的免疫印迹分析,其中在用MG-132处理293T细胞后,从表达EPRS、PCBP2、ITCH和Ub的各种组合的293T细胞的裂解物中免疫沉淀外源性MAVS。

[0117] 图95显示了用抗K48 Ub抗体对内源性MAVS进行的免疫印迹分析,其中在用MG-132处理293T细胞后,从表达EPRS、PCBP2、ITCH和Ub的各种组合的293T细胞的裂解物中免疫沉淀内源性MAVS。

[0118] 图96显示了用不同浓度的EPRS处理转染PCBP2的293T细胞后外源性MAVS的表达。该图显示了MAVS条带强度,其相对于肌动蛋白的强度归一化。

[0119] 图97显示了用不同浓度的EPRS处理转染PCBP2的293T细胞后内源性MAVS的表达。该图显示了MAVS条带强度,其相对于肌动蛋白的强度归一化。

[0120] 图98显示了用抗Ub抗体通过免疫印迹分析进行的MAVS泛素化的体外测定。将纯化的MAVS蛋白与泛素、E1、E2以及纯化的EPRS、PCBP2和ITCH蛋白的组合一起孵育。

[0121] 图99显示出与细胞穿透Tat融合的EPRS L1(第168至第196位氨基酸)结构域抑制MAVS泛素化。用PCBP2、ITCH或Ub质粒转染293T细胞,并用不同浓度的Tat-Epep(20μM、50μM

和100μM)处理,然后用抗MAVS抗体沉淀内源性MAVS。用抗K48Ub对沉淀物进行免疫印迹。显示了通过将EPRS第168至第196位氨基酸与Tat融合而获得的肽(Tat-Epep)序列。

[0122] 图100显示了用不同浓度的Tat-Epep(20μM、50μM和100μM)处理PCBP2转染的293T细胞后的内源性MAVS水平。该图显示了MAVS蛋白条带强度,其相对于肌动蛋白的强度归一化。

[0123] 图101显示了Tat-Epep以剂量依赖性方式促进经VSV感染的RAW264.7细胞中IFN-β和IL-6的分泌。Con代表用PBS处理的经VSV感染的RAW264.7细胞作为阴性对照组。

[0124] 图102显示了用100μM Tat或Tat-Epe处理的经VSV-GFP感染的RAW264.7细胞的代表性荧光图像。

[0125] 图103显示出Tat-Epep以剂量依赖性方式降低经VSV感染的RAW264.7细胞中的VSV滴度。Con代表用PBS处理的经VSV感染的RAW264.7细胞作为阴性对照。

[0126] 图104显示出Tat-Epep对用HSV-GFP(MOI=1)感染12小时的RAW264.7细胞中的病毒复制没有显著影响。Con代表用PBS处理的经HSV-GFP感染的RAW264.7细胞作为阴性对照。

[0127] 图105显示出Tat-Epep对用HSV-GFP(MOI=1)感染12小时的RAW264.7细胞中的IFN-β分泌没有显著影响。Con代表用PBS处理的经HSV-GFP感染的RAW264.7细胞作为阴性对照。

[0128] 图106显示出Tat-Epep对用HSV-GFP(MOI=1)感染12小时的RAW264.7细胞中的IL-6分泌没有显著影响。Con代表用PBS处理的经HSV-GFP感染的RAW264.7细胞作为阴性对照组。

[0129] 图107显示了用各种浓度的Tat-Epep处理12小时后通过MTS测定评估的RAW264.7细胞的活力。Con表示用溶解性表面活性剂(洋地黄皂苷,30μg/mL)处理的293T细胞作为阳性对照组。

[0130] 图108显示了用Tat-Epep处理12小时或24小时后293T细胞的活力。Con表示用溶解性表面活性剂(洋地黄皂苷,30μg/mL)处理的293T细胞作为阳性对照组。

[0131] 图109显示了在静脉内施用VSV-Indiana(2×10^8pfu/小鼠)后4天,每天腹膜内施用Tat标签(1.05μM/kg)或Tat-Epep(0.53μM/kg或1.05μM/kg)持续3天的小鼠脑组织(n=7)中病毒载量的噬斑测定。

[0132] 图110显示了新Tat-Epep(New Tat-Epep)对VSV病毒的抑制作用。

[0133] 图111显示了通过用Tat-Epep处理经VSV-GFP感染的RAW264.7细胞而减少病毒复制的荧光图像,以及New Tat-Epep对病毒复制的更强抑制作用。

[0134] 图112显示了根据Tat-Epep或New Tat-Epep处理的IFN-β分泌。

[0135] 图113显示了根据Tat-Epep或New Tat-Epep处理的IL-6分泌。

具体实施方式

[0136] 本发明人发现MSC(多tRNA合成酶复合物)组分之一,EPRS(谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶)蛋白或其片段具有抗RNA病毒活性。具体地,本发明的EPRS蛋白或其片段与MAVS竞争结合降解MAVS的PCBP2,从而抑制在抗RNA病毒活性中起关键作用的MAVS的降解。因此,包含蛋白质或其片段的组合物可用于普遍有效地治疗RNA病毒感染性疾病。

[0137] 其具体说明如下。同时,这里公开的每个描述和实施方案可以分别应用于其他描

述和实施方案。也就是说，本文公开的各种元素的所有组合都落入本发明的范围内。此外，本发明的范围不限于下面描述的具体实施方式。

[0138] 为实现上述目的，本发明的一个方面提供了包含EPRS(谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶)蛋白或其片段的抗RNA病毒组合物。具体地，EPRS蛋白的片段可包含SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列，更具体地，氨基酸序列选自SEQ ID NO:63中第1至196位的氨基酸序列、SEQ ID NO:63中第1至269位的氨基酸序列、SEQ ID NO:63中第1至457位的氨基酸序列、SEQ ID NO:63中第1至506位的氨基酸序列、SEQ ID NO:63中第1至682位的氨基酸序列、SEQ ID NO:63中第168至506位的氨基酸序列、SEQ ID NO:63中第168至269位的氨基酸序列和SEQ ID NO:63中第168至196位的氨基酸序列，但不限于此。

[0139] 此外，EPRS蛋白的片段可包含与SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列具有至少80％或更高、90％或更高、95％或更高、97％或更高、或99％或更高同源性的多肽。例如，显然地，只要得到的氨基酸序列具有与由SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列构成的蛋白质相对应的功效，那么具有这种同源性的氨基酸序列，其部分被删除、修饰、置换或添加，也在本发明的范围内。

[0140] 另外，只要该肽具有与由SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列构成的多肽相对应的活性，不排除可能通过在氨基酸序列的上游或下游添加无意义序列而发生的突变、或可能天然发生的突变、或其沉默突变。

[0141] 如本文所用，术语“同源性”是指与给定氨基酸序列或核苷酸序列的匹配程度，并且同源性可以表示为百分比。在本说明书中，具有与给定氨基酸序列或核苷酸序列相同或相似的活性的同源序列表示为“％同源性”。例如，可以使用用以计算诸如得分、同一性和相似性的参数的标准软件例如BLAST 2.0，或者通过在限定的严格条件下经由Southern杂交实验比较序列来确认％同源性，并且可以通过本领域技术人员熟知的并且本领域技术人员已知的方法来确定待确定的合适的杂交条件(e.g.，J.Sambrook等人，Molecular Cloning，A Laboratory Manual，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory press，Cold Spring Harbor，New York，1989；F.M.Ausubel等人，Current Protocols in Molecular Biology，John Wiley&Sons，Inc.，New York)。

[0142] 如本文所用，术语“RNA病毒”是指使用RNA作为其遗传物质的所有病毒。例如，RNA病毒可以是阿马格病毒科(Amalgaviridae)病毒、双RNA病毒科(Birnaviridae)病毒、金色病病毒科(Chrysoviridae)病毒、囊状噬菌体科(Cystoviridae)病毒、内源RNA病毒科(Endornaviridae)病毒、低毒性病毒科(Hypoviridae)病毒、巨大双RNA病毒科(Megabirnaviridae)病毒、分体病毒科(Partitiviridae)病毒、小双RNA病毒科(Picobirnaviridae)病毒、呼肠孤病毒科(Reoviridae)病毒、整体病毒科(Totiviridae)病毒、夸德里病毒科(Quadriviridae)病毒、动脉炎病毒科(Arteriviridae)病毒、冠状病毒科(Coronaviridae)病毒、麦索尼病毒科(Mesoniviridae)病毒、杆套病毒科(Roniviridae)病毒、二顺反子病毒科(Dicistroviridae)病毒、传染性软化病病毒科(Iflaviridae)病毒、海洋RNA病毒科(Marnaviridae)病毒、小RNA病毒科(Picornaviridae)病毒、伴生豇豆病毒科(Secoviridae)病毒、甲型线形病毒科(Alphaflexiviridae)病毒、乙型线形病毒科(Betaflexiviridae)病毒、丙型线形病毒科(Gammaflexiviridae)病毒、芜菁黄花叶病毒科(Tymoviridae)病毒、博尔纳病毒科(Bornaviridae)病毒、丝状病毒科(Filoviridae)病毒、

副黏液病毒科(Paramyxoviridae)病毒、弹状病毒科(Rhabdoviridae)病毒、尼亚米病毒科(Nyamiviridae)病毒、杯状病毒科(Caliciviridae)病毒、黄病毒科(Flaviviridae)病毒、黄症病毒科(Luteoviridae)病毒、披膜病毒科(Togaviridae)病毒、肺病毒科(Pneumoviridae)病毒、沙粒病毒科(Arenaviridae)病毒、δ病毒(Deltavirus)或正黏病毒科(Orthomyxoviridae)病毒,但不限于此。

[0143] 本发明的EPRS蛋白或其片段与PCBP2结合以阻断PCBP2和MAVS之间的结合,从而对MAVS降解具有抑制作用。因此,未降解的MAVS可通过激活其信号传导途径来激活针对病毒感染的先天免疫应答。

[0144] 如本文所用,术语"EPRS(谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶)蛋白"是ARS(氨酰基-tRNA合成酶)之一,并且是称为"MSC(多-tRNA合成酶复合物)"的细胞质贮库系统的一个组分,并且已知参与蛋白质合成。然而,没有关于EPRS的抗病毒活性的报道。

[0145] 关于EPRS蛋白或编码其的基因的信息可以从已知的数据库获得,例如NCBI的GenBank(National Center for Biotechnology Information),例如,EPRS蛋白可以具有SEQ ID NO:63的氨基酸序列,但不限于此。

[0146] 如本文所用,术语"MAVS(线粒体抗病毒信号传导蛋白)"是指参与通过在识别RNA病毒后经激活的RIG-1和MDA5而产生各种抗病毒细胞因子的关键信号传导蛋白。已知不存在MAVS会增加对RNA病毒感染的易感性。本发明的EPRS蛋白或其片段可以阻断MAVS降解以激活其信号传导途径,因此,包含EPRS蛋白或其片段的组合物可以诱导针对所有RNA病毒的抗病毒活性。

[0147] 在本发明的一个具体实施方案中,EPRS敲低的细胞在经PR8和VSV感染后显示出病毒复制增加(图5和图6),并且在病毒感染或用作为模拟病毒基因的聚肌苷酸-聚胞苷酸处理后抗病毒细胞因子的产生减少(图8和图9)。相反,EPRS过表达的细胞在经PR8和VSV感染后显示出显著更少的病毒复制和更多的IFN-β和IL-6产生(图22至图27)。此外,在病毒感染后,与EPRS+/+小鼠相比,EPRS+/-小鼠在血清中显示出更高的病毒滴度和更低水平的IFN-β、IFN-α和IL-6(图40至图43),从而证明EPRS可以正向调节针对RNA病毒的先天免疫应答。

[0148] 在本发明的另一个具体实施方案中,使用许多不同大小的EPRS片段来检查参与调节免疫应答的EPRS区域,结果发现EPRS L1区域(SEQ ID NO:63中第168至196位的氨基酸),更具体地是SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列,对于EPRS的抗病毒活性是必需的(图75至图81)。因此,可以看出,由于包含SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列的EPRS蛋白或其片段具有抗RNA病毒活性,它可以有效地用作抗RNA病毒组合物。

[0149] EPRS蛋白或其片段可在与细胞穿透肽进一步融合后使用,以增加细胞通透性。也就是说,EPRS蛋白或其片段可以在其N-末端、其C-末端或其两个末端进一步包含细胞穿透肽。在这方面,可以在EPRS蛋白或其片段与细胞穿透肽之间进一步添加连接子,这可以由本领域技术人员适当地进行。

[0150] 如本文所用,术语"细胞穿透肽"是指促进细胞摄入/摄取各种物质(例如纳米颗粒、化合物、DNA、蛋白质等)的短肽。具体地,细胞穿透肽可以是Tat、触足肽(Antennapedia)、转运素(Transportan)、VP22、Hph-1、R11(R9)、基于信号序列的肽、或两亲性肽,但不限于此。细胞穿透肽可以由本领域技术人员适当选择,只要它能够促进本发明的EPRS蛋白或其片段的细胞间转运。此外,EPRS蛋白或其片段可以在本领域技术人员根据所

使用的细胞穿透肽的种类进行适当修饰后使用。即，本发明的EPRS蛋白或其片段不限于本发明中提出的氨基酸序列，氨基酸序列可以在本领域技术人员显而易见的范围内以适合应用于细胞穿透肽的形式进行添加/置换/去除。

[0151] 在本发明的一个具体实施方案中，检测了通过融合HIV-1 Tat蛋白转导结构域(SEQ ID NO:60)与EPRS L1肽(SEQ ID NO:63中第168至196位)而获得的融合肽(Tat-Epep:SEQ ID NO:61)的抗病毒活性(图99至图109)，结果证实，Tat-Epep通过促进MAVS稳定性和I型IFN产生并显著降低病毒感染小鼠脑组织中的病毒滴度，在体外和体内显示出了优异的抗RNA病毒活性。

[0152] 在本发明的另一个具体实施方案中，证实了与Tat-Epep相比，通过融合HIV-1 Tat蛋白转导结构域(SEQ ID NO:60)与EPRS L1肽片段(SEQ ID NO:63中第168至186位)而获得的融合肽(New Tat-Epep:SEQ ID NO:64)显著降低了病毒感染小鼠脑组织中的病毒滴度并促进抗病毒细胞因子IFN-β和IL-6的分泌(图110至图113)。

[0153] 此外，为了增加细胞通透性，本发明的EPRS蛋白或其片段可以与本领域已知的能够将蛋白质递送到细胞中或提升递送效率试剂一起使用。例如，试剂可以是Chariot(活性基序，目录号30025)等，但不特别限于此，只要它能够将本发明的EPRS蛋白或其片段递送至细胞即可。

[0154] 本发明的抗RNA病毒组合物可以用作药物组合物、准药物组合物、食品组合物、化妆品组合物或饲料组合物，但不限于此。

[0155] 本发明的另一个方面是提供具有抗RNA病毒活性的EPRS蛋白或其片段，其中EPRS蛋白的片段包含SEQ ID NO:63中第168至186位的氨基酸序列。

[0156] 本发明的另一方面提供了编码该蛋白质或其片段的多核苷酸。

[0157] 本发明的另一个方面提供了包含该多核苷酸的载体。

[0158] 本发明的另一个方面提供了包含该多核苷酸或载体的转化体。

[0159] 具有抗RNA病毒活性的EPRS蛋白或其片段与上述相同。

[0160] 多核苷酸可以是编码本发明的EPRS蛋白或其片段的核苷酸序列，或与其具有至少80％或更高、90％或者更高、95％或更高、97％或更高、或99％或更高的同源性的核苷酸序列。只要由其翻译的多肽(即，蛋白质或其片段)显示出与本发明的EPRS蛋白或其片段相对应的功效，则通过在核苷酸序列的5′和/或3′末端添加无意义序列或通过部分序列的缺失、修饰或置换获得的那些也可以包括在本发明的范围内。多核苷酸可以与已知的启动子序列可操作地连接用于以表达组件的形式使用，或者多核苷酸可以以包含其的载体的形式使用。多核苷酸、表达组件或载体的制备可以通过本领域技术人员已知的方法适当地进行。对启动子或载体的种类没有特别限制，可以根据目的由本领域技术人员对其进行适当选择。此外，转化体可以在通过用多核苷酸、表达组件或载体转化宿主细胞将其制备后使用。作为转化方法，也可以使用已知方法而不受本领域技术的限制。转化体是意图在其中表达本发明的EPRS蛋白或其片段的对象，转化体可以是微生物、植物、动物或除人以外的动物，但不限于此。

[0161] 为了出于各种目的应用/产生EPRS蛋白或其片段，本领域技术人员可以制备包含编码其的多核苷酸的载体或包含该载体的转化体。例如，多核苷酸或载体可以直接用于治疗RNA病毒感染性疾病，或者能够通过包含多核苷酸或载体而表达EPRS蛋白或其片段的转

化体可以用于产生蛋白质或其片段或用于治疗目的，但不限于此。

[0162] 本发明的另一个方面是提供用于预防或治疗RNA病毒感染性疾病的药物组合物，该药物组合物包含抗RNA病毒组合物。

[0163] 抗RNA病毒组合物与上述相同。

[0164] 如本文所用，术语“RNA病毒感染性疾病”是指由RNA病毒感染引起的可能发生在宿主中的所有疾病。预期本发明的EPRS蛋白或其片段对上述疾病具有预防和/或治疗作用。例如，RNA病毒感染性疾病可以是选自以下的一种或多于一种疾病：流感、急性脊髓前角灰质炎、无菌性脑膜炎、手足口病、疱疹性咽峡炎、急性出血性结膜炎、流行性胸膜痛、心包炎、心肌炎、婴儿白痢、风疹、先天性风疹综合征、黄热病、登革热、登革出血热、流行性乙型脑炎、单纯疱疹病毒性脑炎、流行性腮腺炎、麻疹、狂犬病、马尔堡病、埃博拉出血热、肾综合征出血热、汉坦病毒肺综合征(HPS)、刚果克里米亚出血热、艾滋病(获得性免疫缺陷病)、成人T细胞白血病、HTLV-1相关性脊髓病、HTLV-1葡萄膜炎和拉沙热，但不限于此。由RNA病毒引起的所有疾病和症状也包括在本发明的范围内。

[0165] 如本文所用，术语“预防”是指通过施用本发明的组合物抑制或延迟RNA病毒感染性疾病发作的所有行为，术语“治疗”是指通过施用本发明的组合物使RNA病毒感染性疾病的症状好转或有利地改变的所有行为。

[0166] 通过将本发明的EPRS蛋白或其片段与PCBP2蛋白质结合，进而通过激活MAVS信号传导，可以实现预防或治疗RNA病毒感染性疾病。因此，包含本发明的EPRS蛋白或其片段的组合物可具有上述抗RNA病毒活性，从而有效地用作预防或治疗RNA病毒感染性疾病的组合物。

[0167] 本发明的药物组合物还可包含通常用于制备药物组合物的适当的载剂、赋形剂或稀释剂。包含药学上可接受的载剂的组合物可以是各种经口或胃肠外制剂，特别是胃肠外制剂，但不限于此。制剂可以使用常用的稀释剂或赋形剂制备，例如填充剂、增量剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等。用于经口给药的固体制剂可包含片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂等。这种固体制剂可以通过将一种或多于一种化合物与至少一种赋形剂混合来制备，所述赋形剂例如为淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等。除了简单的赋形剂外，还可以使用润滑剂例如硬脂酸镁或滑石。用于经口给药的液体制剂可包括混悬剂、口服液、乳剂、糖浆等，除了常用的简单稀释剂例如水和液体石蜡外，还可以使用各种赋形剂，例如保湿剂、甜味剂、芳香剂、防腐剂等。用于胃肠外给药的制剂可包括无菌水溶液、非水溶剂、混悬剂、乳剂、冻干制剂、栓剂等。非水溶剂和混悬剂的实例可包括丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油、可注射酯例如油酸乙酯等。栓剂基质的实例可包括半合成脂肪酸酯(witepsol)、聚乙二醇(macrogol)、吐温61、可可脂、甘油三月桂酸酯、甘油明胶等。

[0168] 此外，本发明的药物组合物可包括但不限于选自以下的任何一种制剂：片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、混悬剂、口服液、乳剂、糖浆剂、无菌水溶液、非水溶剂、混悬剂、乳剂、冻干制剂和栓剂。

[0169] 本发明的药物组合物可以以药学有效量施用。

[0170] 如本文所用，术语“给药”或“施用”是指通过任何合适的方法将本发明的药物组合物引入对象中，并且给药途径可以包括通过各种途径施用，包括经口或胃肠外途径，只要该药物组合物可以到达期望的组织。具体地，药物组合物可以通过胃肠外途径施用，但不限于

此。

[0171] 根据目的或必要性，可以根据本领域常用的方法、给药途径和给药剂量将药物组合物适当地施用至对象。给药途径的实例可包括经口、胃肠外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内途径，并且胃肠外给药可包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内和皮下给药。此外，可以根据本领域已知的方法选择适当的给药剂量和给药频率，并且可以通过例如待治疗的症状、给药途径、性别、健康状况、饮食、个体的年龄和体重以及疾病严重程度的各种因素适当地确定实际施用的本发明的药物组合物的剂量和给药频率。

[0172] 如本文所用，术语“药学有效量”是指足以在适用于医学治疗的合理收益/风险比下抑制或减轻血管通透性增加的量，并且有效剂量的水平可以根据包括对象的种类、严重程度、年龄、性别、药物活性、药物敏感性、给药时间、给药途径、排泄率、治疗持续时间、同时使用的药物、以及医学领域中公知的其他因素在内的因素来确定。本发明的组合物可以单独施用或与其他治疗剂联合施用，并与现有的治疗制剂依次或同时施用。然后，药物组合物可以单剂量或多剂量施用。考虑到上述所有要素，重要的是施用可以获得最大效果而不引起副作用的最小量，并且这可以由本领域普通技术人员容易地确定。

[0173] 本发明的又一方面提供预防或治疗RNA病毒感染性疾病的方法，其包括将抗RNA病毒组合物施用于对象。

[0174] 抗RNA病毒组合物和RNA病毒感染性疾病的预防或治疗与上述相同。

[0175] 如本文所用，术语“对象”是指已经患有或有风险患有本发明的RNA病毒感染性疾病的包括人在内的所有动物。此外，对象可以指除人以外的动物，但不限于此。通过向对象施用本发明的抗RNA病毒组合物，可以预防或治疗RNA病毒感染性疾病。

[0176] 本发明的又一方面提供了用于预防或改善RNA病毒感染性疾病的准药物组合物，该准药物组合物包含抗RNA病毒组合物。

[0177] 抗RNA病毒组合物、RNA病毒感染性疾病、以及预防与上述相同。

[0178] 如本文所用，术语“改善”是指通过施用根据本发明的组合物，RNA病毒感染性疾病已经好转或有利地改变的所有行为。

[0179] 如本文所用，术语“准药物”是指用于医疗护理、缓解、治疗或预防人或动物疾病的纤维、橡胶制品或类似产品；对人体影响不大或不直接作用于人体的非器具、非机械或类似产品；或用于灭菌、杀虫剂和类似用途以防止感染的制品，准药物可指用于诊断、医疗护理、缓解、治疗或预防人或动物疾病的产品，不包括器具、机械和设备；或用于对人或动物的结构或功能施加药理作用的除器具、机械或设备以外的产品。准药物可以是特定的皮肤外用剂和个人卫生产品，但不限于此。

[0180] 当将本发明的抗RNA病毒组合物加入到准药物组合物中以预防或改善RNA病毒感染性疾病时，抗RNA病毒组合物可以原样加入或与其它准药物组分联合使用。可以根据常规方法适当地使用抗RNA病毒组合物。根据使用目的，可以适当地确定活性成分的混合量。

[0181] 可以将皮肤外用剂制备成，例如但不特定限于，软膏、洗剂、喷雾剂、贴剂、霜剂、粉剂、混悬剂、凝胶剂或凝胶形式。个人卫生产品可以是，但不特定限于，特别是肥皂、化妆品、湿纸巾、纸巾、洗发水、护肤霜、面霜、牙膏、唇膏、防晒露或沐浴啫喱。此外，本发明的准药物组合物的其他实例可包括消毒清洁剂、淋浴泡沫、湿纸巾、洗涤皂、洗手液和软膏。

[0182] 本发明的又一方面提供了用于预防或改善RNA病毒感染性疾病的食品组合物，该

食品组合物包含抗RNA病毒组合物。

[0183] 抗RNA病毒组合物、RNA病毒感染性疾病、预防、和改善与上述相同。

[0184] 如本文所用，术语“食品”可以包括肉类、香肠、面包、巧克力、糖果、小吃、甜食、比萨、拉面、其他面条、口香糖、包括冰淇淋在内的乳制品、各种汤、饮料、茶、饮品、酒精饮料、多种维生素复合物、保健功能食品、保健食品等等，并且可以包括在通常含义内被认为是食品的所有食品。

[0185] 术语“保健功能食品”与特殊保健用食品(FoSHU)是相同的术语，是指具有较高药效和医疗效果的食品，其经过加工以有效发挥调节功能并提供营养。这里，术语“功能”是指其用于控制与人体的结构和功能有关的营养物的目的或用于获得有益于保健的效果例如生理效果的目的。与普通食品相比，保健食品是指具有积极维持或促进健康的效果的食品，并且保健补充食品是指旨在用于增强健康状况的食品。在某些情况下，保健功能食品、保健食品和保健补充食品可以互换使用。

[0186] 具体地，保健功能食品是指通过将本发明的抗RNA病毒组合物加入食品材料例如饮料、茶、香料、口香糖、糖果等中所制备的食品，或被制备成胶囊剂、散剂、混悬剂等的食品，并且保健功能食品是指食用时对健康产生特定影响的食品。与一般药物不同，食品组合物包含食品作为原料，因此，其具有不会在长时间服用时可能发生副作用的优点。

[0187] 本发明的食品可以通过本领域常用的方法制备，并且可以通过添加本领域中通常添加的原料和成分来制备。此外，食品组合物可以制备成各种类型的制剂而没有限制，只要它作为食品制剂是可接受的即可。

[0188] 食品组合物还可以包含生理上可接受的载剂，并且载剂的种类没有特别限制，可以使用任何载剂，只要它是本领域通用的即可。

[0189] 此外，食物组合物还可以包含通常用于改善食物组合物中的能够改善气味、味道、外观等的附加成分。例如，食品组合物可包含维生素A、维生素C、维生素D、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6或维生素B12、烟酸、生物素、叶酸、泛酸等。此外，食品组合物可包含矿物质，例如锌(Zn)、铁(Fe)、钙(Ca)、铬(Cr)、镁(Mg)、锰(Mn)、铜(Cu)、铬(Cr)等;以及氨基酸，例如赖氨酸、色氨酸、半胱氨酸、缬氨酸等。

[0190] 此外，食品组合物可包含食品添加剂，例如防腐剂(山梨酸钾、苯甲酸钠、水杨酸、脱氢醋酸钠等)、消毒剂(漂白粉、高级漂白粉、次氯酸钠等)、抗氧化剂(丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)等)、着色剂(焦油染料等)、固色剂(亚硝酸钠等)、漂白剂(亚硫酸钠)、调味料(谷氨酸钠(MSG)等)、甜味剂(甘素、环己胺磺酸盐、糖精、钠等)、香精(香草醛、内酯等)、溶胀剂(明矾、D-酒石酸氢钾等)、强化剂、乳化剂、增稠剂(带粘性的浆糊)、成膜剂、胶基剂、消泡剂、溶剂、改良剂等。可以根据食品类型选择和使用适量的添加剂。

[0191] 本发明的又一方面提供了用于预防或改善RNA病毒感染性疾病的化妆品组合物，该化妆品组合物包含抗RNA病毒组合物。

[0192] 抗RNA病毒组合物、RNA病毒感染性疾病、预防、和改善与上述相同。

[0193] 化妆品组合物的制剂可以是溶液、外用软膏、霜剂、泡沫、营养液、柔肤化妆水、香水、面膜、柔肤水、乳液、隔离霜、精华、皂、洁肤浴露、沐浴露、防晒霜、防晒油、混悬剂、乳状液、膏剂、凝胶、化妆水、粉剂、皂、含表面活性剂的洁肤液、油、粉状粉底、乳状粉底、蜡状粉底、贴剂或喷雾剂，但不限于此。

[0194] 本发明的化妆品组合物还可包含一种或多于一种在普通皮肤化妆品中混合的化妆上可接受的载剂。可以混合常用组分，例如，油、水、表面活性剂、保湿剂、低级醇、增稠剂、螯合剂、无机盐、颜料、抗氧化剂、杀菌剂、防腐剂、香料等，但不限于此。

[0195] 化妆上可接受的载剂可以根据化妆品组合物的制剂而变化。

[0196] 当制剂是软膏、膏剂、霜剂或凝胶，可以使用动物油、植物油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅、膨润土、二氧化硅、滑石或锌氧化物作为载剂成分，但不限于此。它们可以单独使用，也可以以两种或多于两种混合使用。

[0197] 当制剂是粉剂或喷雾剂时，可以使用乳糖、滑石、二氧化硅、氢氧化铝、硅酸钙、聚酰胺粉末等作为载剂成分。特别地，当制剂是喷雾剂时，它可另外包含推进剂，例如氯氟烃、丙烷/丁烷或二甲醚，但不限于此。它们可以单独使用，也可以以两种或多于两种混合使用。

[0198] 当制剂是溶液或乳状液时，可以使用溶剂、增溶剂、破乳剂等作为载剂成分。例如，可以使用水、乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇油等，特别地，可以使用棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油、芝麻油、甘油脂肪族酯、聚乙二醇或山梨糖醇酐脂肪酸酯，但不限于此。它们可以单独使用，也可以以两种或多于两种混合使用。

[0199] 当制剂是混悬剂时，可以使用液体稀释剂如水、乙醇或丙二醇，助悬剂例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇酯和聚氧乙烯山梨糖醇酐酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂、黄蓍胶等作为载剂成分，但不限于此。它们可以单独使用，也可以以两种或多于两种混合使用。

[0200] 当本发明的制剂是皂时，可以使用脂肪酸的碱金属盐、脂肪酸的半酯盐、脂肪酸蛋白质水解物、羟乙基磺酸盐、羊毛脂衍生物、脂肪醇、植物油、甘油、糖等作为载剂成分，但不限于此。它们可以单独使用，也可以以两种或多于两种混合使用。

[0201] 本发明的又一方面提供了用于预防或改善RNA病毒感染性疾病的饲料组合物，该饲料组合物包含抗RNA病毒组合物。

[0202] 抗RNA病毒组合物、RNA病毒感染性疾病、预防、和改善与上述相同。

[0203] 如本文所用，“饲料”是指任何天然或人工饮食、膳食等，或旨在或适于被动物食用、摄取或消化的此类膳食的组分。包含抗RNA病毒组合物作为活性成分的饲料可以制备成本领域已知的各种类型的饲料，并且可以优选包含浓缩饲料、大体积饲料和/或专用饲料。

[0204] 本发明的另一个方面是提供一种预防或抑制MAVS蛋白降解的方法，其包括施用抗RNA病毒组合物。

[0205] 抗RNA病毒组合物与上述相同。

[0206] 实施方式

[0207] 在下文中，将参考实施例以更详细地描述本发明。然而，这些实施例仅用于说明目的，并且本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0208] 实施例1:细胞培养和转染

[0209] 将HEK293T细胞、HeLa细胞、MDCK细胞、Vero细胞和RAW264.7细胞在含有10％FBS(胎牛血清，Gibco-BRL)和1％青霉素-链霉素(Gibco-BRL)的DMEM中培养。U937细胞在含有10％FBS和1％青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基(Gibco-BRL)中生长。所有细胞均获自ATCC(美国模式菌种收集中心)。

[0210] 从5周龄至6周龄小鼠中分离骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)，并用氯化铵钾(ACK)裂解缓冲液(Gibco-BRL)裂解红细胞。然后将BMDM在含有10％FBS、10％L929细胞CM(条件培养基)和GM-CSF(R&D Systems)的DMEM中培养。每2天用新鲜的完全培养基替换该培养基。细胞在第7天用于实验。

[0211] 通过用shRNA(由南加州大学的Jae U.Jung博士友情提供)处理并用2μg/mL嘌呤霉素筛选至少2周来建立其中EPRS被敲低的稳定的RAW264.7细胞。

[0212] 通过用相应的DNA构建体转染来建立稳定表达pIRES或pIRES-EPRS-FLAG的RAW264.7细胞，并将该细胞保持在含有1μg/mL嘌呤霉素的DMEM中。

[0213] 使用X-tremeGENE HP DNA转染试剂(Roche)，用DNA质粒构建体转染HEK293T细胞。用核转染子(Lonza，Cologne AG，Germany)转染U937细胞、RAW264.7细胞和BMDM细胞，并立即将细胞在Opti-MEM培养基(Gibco-BRL)中培养6小时，随后在含有10％FBS的完全培养基中培养24小时。

[0214] 实施例2：小鼠和病毒感染

[0215] C57BL/6EPRS^{tm1b}杂合的基因敲除小鼠获自Phenogenomics多伦多中心(Ontario，Canada)，并在22±2℃的12小时光照/黑暗循环下维持在特定的无病原体设备中并可自由获取食物和水。使用以下引物通过PCR对后代进行基因分型：

[0216] A：5’-TACTGTGCTGAATGAAAAGTGCC-3’(SEQ ID NO:1)，

[0217] B：5’-GGTAGAAGTGCTAAGTAGGATGAGG-3’(SEQ ID NO:2)(相对于218bp野生型条带具有特异性)，

[0218] C：5’-CCATTACCAGTTGGTCTGGTGTC-3’(SEQ ID NO:3)，和

[0219] D：5’-TGCCTGTGACCACCAATAAGAAAGCC-3’(SEQ ID NO:4)(相对于462bp突变条带具有特异性)。

[0220] 通过CO_2窒息使所有小鼠安乐死。所有动物实验均经韩国生物科学和生物技术研究所的机构动物使用和护理委员会批准，并根据实验动物护理和使用指南(由美国国立卫生研究院出版)进行。

[0221] 对于病毒感染实验，通过静脉注射至尾静脉中，用VSV-Indiana(2×10^8pfu/小鼠)或VSV-GFP(2×10^8pfu/小鼠)感染6周龄至7周龄小鼠。

[0222] 实施例3：试剂和抗体

[0223] 以下一抗用于免疫印迹和免疫荧光实验：抗EPRS(ab31531)、抗MRS(ab50793)、抗KRS(ab186196)、抗PCBP2(ab110200)、抗铜蓝蛋白(ab135649)和抗VSV-G(ab1874)(Abcam)；抗MAVS(人特异性的；3993，啮齿动物特异性的；4983)、抗L13a(2765)、抗IRF3(4302)、抗磷酸化的IRF3(4947)、抗STAT1(9172)、抗磷酸化的STAT1(7649)和抗肌动蛋白-HRP(12620)(Cell Signaling Technology)；抗NSAP1(AV40641)、抗GAPDH(G9545)和抗FLAG(F3165)(Sigma)；抗Ub(sc-8017)、抗GFP(sc-9996)和抗GST(sc-459)(Santa Cruz Biotechnology)；抗AIMP3(NMS-01-0002，Neomics，Seoul，Korea)；抗V5-HRP(46-0708，Invitrogen)；抗K48连接的聚泛素链(05-1307，Millipore)；抗Strep-HRP(2-1509-001，IBA，德国)。

[0224] 使用^{983}DGQRKDP(p)SKNQGGG^{996}肽(SEQ ID NO:5)(AbClon，Seoul，韩国)产生针对Ser990的亲和纯化的兔多克隆磷酸盐特异性抗体。磷酸盐特异性Ser886和Ser999抗体由

Paul L.Fox博士(Lerner Research Institute,Cleveland Clinic,CLV,美国)提供。在免疫印迹中使用山羊抗小鼠(7076)或山羊抗兔(7074)IgG-HRP(Cell Signaling Technology)作为二抗。在免疫荧光实验中使用Alexa488缀合的抗小鼠IgG(A11059,Invitrogen)和Alexa594缀合的抗兔IgG(A11037,Invitrogen)作为二抗。使用的其他试剂和材料包括MG-132(Sigma)、嘌呤霉素(Gibco-BRL)、聚肌苷酸-聚胞苷酸(InvivoGen)、IFN-γ(R&D Systems)、洋地黄皂苷(Sigma)、蛋白A/G PLUS-琼脂糖(sc-2003,Santa Cruz Biotechnology)、谷胱甘肽琼脂糖凝胶4FF(Glutathione Sepharose 4 Fast Flow,17-5132-01,GE Healthcare)、抗FLAG M2亲和凝胶(A2220,Sigma)、Strep-Tactin Sepharose(2-1201-002,IBA)、Ni-NTA琼脂糖(30230,Qiagen)、GFP-trap(gta-20,ChromoTek,德国)和Superdex 200 10/300 GL柱(GE Healthcare)。

[0225] 实施例4:质粒构建

[0226] 通过缀合FLAG标签、Strep标签、His标签或GFP标签产生EPRS构建体。具体地,通过PCR扩增含有每个结构域的EPRS片段,并亚克隆到含有GFP标签、Strep标签、His标签或FLAG标签的载体中。使用QuikChange定点诱变试剂盒(Stratagene,Amsterdam,Netherlands)通过PCR制备EPRS的磷酸模拟突变体(S886D、S990D、S999D、S886D/S990D和S886D/S999D)。用于定点诱变的PCR引物列于下表1中。

[0227] 表1

[0228]

qPCR 引物		
基因	正向	反向
hEPRS	CTTCTCAAGGGGAAG (SEQ ID NO:6)	CTGCTTTTCAGATTT (SEQ ID NO:7)
mEPRS	AAGCGGAAAAGGCTCCTAAG (SEQ ID NO:8)	CCCAGTCTTTTCTTTATACTCAGCTT (SEQ ID NO:9)
IFN-α	CTTGAAGGACAGACATGACTTTGGA (SEQ ID NO:10)	GGATGGTTTCAGCCTTTTGGA (SEQ ID NO:11)
IFN-β	TCCAAGAAAGGACGAACATTCG (SEQ ID NO:12)	TGCGGACATCTCCCAACGTCA (SEQ ID NO:13)
ADAR1	CCAAAGACACTTCCTCTC (SEQ ID NO:14)	CAGTGTGGTGGTTGTACT (SEQ ID NO:15)
MX1	ACAAGCACAGGAAACCGTATCAG (SEQ ID NO:16)	AGGCAGTTTGGACCATCTTAGTG (SEQ ID NO:17)
OAS1	GAGGCGGTTGGCTGAAGAGG (SEQ ID NO:18)	GAGGAAGGCTGGCTGTGATTGG (SEQ ID NO:19)
OAS1β	TTGATGTGCTGCCAGCCTAT (SEQ ID NO:20)	TGAGGCGCTTCAGCTTGGTT (SEQ ID NO:21)
PKR	GCCAGATGCACGGAGTAGCC (SEQ ID NO:22)	GAAAACTTGGCCAAATCCACC (SEQ ID NO:23)
PML	CCTGCGCTGACTGACATCTACT (SEQ ID NO:24)	TGCAACACAGAGGCTGGC (SEQ ID NO:25)
P56	CCCACGCTATACCATCTACC (SEQ ID NO:26)	CTGAGGCTGCTGCTATCC (SEQ ID NO:27)
ISG15	CAATGGCCTGGGACCTAAA (SEQ ID NO:28)	CTTCTTCAGTTCTGACACCGTCAT (SEQ ID NO:29)
ISG20	AGAGATCACGGACTACAGAA (SEQ ID NO:30)	TCTGTGGACGTGTCATAGAT (SEQ ID NO:31)
ISG56	AGAGAACAGCTACCACCTTT (SEQ ID NO:32)	TGGACCTGCTCTGAGATTCT (SEQ ID NO:33)
GAPDH	TGACCACAGTCCATGCCAT (SEQ ID NO:34)	GACGGACACATTGGGGGTAG (SEQ ID NO:35)

[0229]

VSV-G	CAAGTCAAAATGCCCAA GAGTCACA (SEQ ID NO:36)	TTTCCTTGCATTGTTCTA CAGATGG (SEQ ID NO:37)
用于定点诱变的PCR引物		
EPRS S886D	CCCCCATTATCTCAAAGT TCGGATTCAGACCCAACC AGAAATT (SEQ ID NO:38)	AATTTCTGGTTGGGTCT GAATCCGAACTTTGAGA TAATGGGGG (SEQ ID NO: 39)
EPRS S990D	CACACAAAGGAAAGACC CTGATAAAAACCAAGGA GGTGGG (SEQ ID NO:40)	CCCACCTCCTTGGTTTTT ATCAGGGTCTTTCCTTTG TGTG (SEQ ID NO:41)
EPRS S999D	TCTAAAAACCAAGGAGG TGGGCTCTCAGATAGTGG AGCAGGAGA (SEQ ID NO: 42)	TCTCCTGCTCCACTATCT GAGAGCCCACCTCCTTG GTTTTTAGA (SEQ ID NO: 43)
EPRS S990A	GCCAAAGGAAAGACCCT GCTAAAAACCAAGGAGG T (SEQ ID NO:44)	ACCTCCTTGGTTTTTAGC AGGGTCTTTCCTTTGGC (SEQ ID NO:45)
EPRS R201L	GAGATGGGAAAGGTTAC CGTCTTATTTCCTCCAGA GGCCAGTGG (SEQ ID NO: 46)	CCACTGGCCTCTGGAGG AAATAAGACGGTAACCT TTCCCATCTC (SEQ ID NO: 47)
EPRS R395L	GAAGGTGTTACACATGCC CTGTTAACAGAATACCAT GACAG (SEQ ID NO:48)	CTGTCATGGTATTCTGTT GTTAACAGGGCATGTGT AACACCTTC (SEQ ID NO: 49)
EPRS S434A/K435L	CTCAACAACACAGTGCTA GCGCTGAGAAAACTCAC ATGGTTTG (SEQ ID NO:50)	CAAACCATGTGAGTTTT CTCAGCGCTAGCACTGT GTTGTTGAG (SEQ ID NO: 51)
EPRS R1152L	GTGGTGCAATGTGGTGCT TTGGGAATTCAAGCATC (SEQ ID NO:52)	GATGCTTGAATTCCCAA AGCACCACATTGCACCA C (SEQ ID NO:53)
siRNA 序列		
hEPRS	CUAAUUCCUCAGCAAGUAU (SEQ ID NO:54)	
mEPRS	CAAAGUCAUCAUCAAACAC (SEQ ID NO:55)	

[0230]

mMAVS 1	UUGCUGAGGACAAGACCUAUA (SEQ ID NO:56)
mMAVS 2	CAGAGGAGAAUGAGUAUUC (SEQ ID NO:57)
sgRNA 序列	
sgEPRS 1	GAATTCTATACTTCGCTACTTGG (SEQ ID NO:58)
sgEPRS 2	GCTAGAGTTGCAACTACAGCTGG (SEQ ID NO:59)

[0231] 还制备了FLAG标记、Strep标记、His标记或GST标记的全长和截短的PCBP2。将MAVS克隆到含有FLAG标签、GST标签或Strep标签的载体中。用于萤光素酶报告基因分析的这些载体由Jae U.Jung博士(南加州大学)提供。

[0232] 实施例5:RNA-Seq分析

[0233] 原代正常人支气管上皮(NHBE)细胞购自ScienCell Research Laboratories,并且用先前已知的方法使其分化。用A/PR/8/34流感病毒(MOI＝1)感染单层NHBE细胞8小时或24小时。使用RNeasy RNA提取Mini-Kit(Qiagen)从感染的细胞中分离总RNA,并通过琼脂糖凝胶电泳确认经分离的RNA的质量。

[0234] 使用TruSeq RNA样品制备试剂盒v2(Illumina)制备测序文库。具体地,将使用聚T寡聚物附着的磁珠从总RNA衍生的mRNA片段化并转化为cDNA。将衔接子连接到cDNA上,通过PCR进行扩增。使用Hiseq-2000(Illumina)进行配对末端测序(101×2)。每种条件一式两份进行测序。来自智人(Homo sapiens)的参考基因组序列数据获自加州大学圣克鲁兹分校基因组浏览器网关(装配ID:hg19)。使用SAMtools(v.1.1.19)以及Bowtie2(v.2.1.0)的Bowtie2构建组件构建参考基因组索引。使用Tophat2(v.2.0)将读取映射到参考基因组。使用Cufflinks(v.2.2.1)计算46895个RefSeq(UCSC hg19)基因模型的每个基因的rpkm数(每百万映射读取的每千碱基读取)。使用Mev(v.4.9.0)构建热图。使用R(v.3.1.0)和PYTHON(v.2.7.6)进行统计分析和图构建。本发明中描述的RNA-Seq数据已经以读取码GSE75699保藏在NCBI的GEO(Gene Expression Omnibus)中。

[0235] 实施例6:萤光素酶分析

[0236] 用含有萤光素酶报告基因质粒、海肾萤光素酶内部对照载体(phRL-TK;Promega)和每种质粒的混合物转染HEK293T细胞。使用光度计(Promega)和双萤光素酶报告基因分析系统(Promega)在转染后24小时进行报告基因测定。数据表示为相对于海肾萤光素酶活性进行归一化的相对萤火虫萤光素酶活性。测量仅表达报告基因和海肾质粒的细胞中的启动子活性作为对照(Con)。

[0237] 实施例7:RNA干扰

[0238] 根据制造商的方案,使用TransIT-TKO转染试剂(Mirus)用双链siRNA转染细胞。表1中提供了EPRS特异性siRNA的序列。非靶向siRNA用作对照。在暴露于病毒之前,将细胞与siRNA或对照一起孵育36小时至48小时。

[0239] 实施例8:病毒复制测定

[0240] 在含有1%FBS的培养基中用病毒感染细胞2小时。通过用完全培养基替换上述培养基来除去过量的病毒。使用标准噬斑测定法在MDCK细胞(PR8-GFP)或Vero细胞(VSV-GFP或HSV-GFP)中测定病毒滴度。当滴定存在于小鼠组织中的病毒时,将冻融组织提取物的组

织匀浆用于噬斑计数。使用GloMax®Multi-Microplate Multimode Reader(Promega)的荧光模块来测量GFP标记的病毒的复制。使用配有20×1.4NA Plan-Apochromat物镜的Nikon eclipse Ti显微镜获取图像。

[0241] 实施例9:ELISA

[0242] 通过经感染的细胞培养物上清液或小鼠血清的ELISA来测量细胞因子浓度。根据制造商的说明书使用以下ELISA试剂盒:小鼠或人IL-6(BD Biosciences)、IFN-α和IFN-β(PBL干扰素源)和IFN-γ(KOMA,韩国)。

[0243] 实施例10:定量实时PCR

[0244] 使用RNeasy RNA提取Mini-Kit(Qiagen)从细胞和鼠组织中提取总RNA。使用Enzynomix试剂盒(Enzynomix)合成cDNA,并使用基因特异性引物组(Bioneer,Daejeon,Korea)和SYBR Green PCR Master Mix(Roche)进行定量PCR。使用Rotor-Gene Q仪器(Qiagen)根据制造商的说明书进行实时PCR。相对于gapdh表达进行数据归一化。使用A-ACT方法计算相对表达。所用引物的序列列于表1中。

[0245] 实施例11:免疫印迹分析和免疫沉淀分析

[0246] 对于免疫印迹分析,用含有蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂混合物(Roche)的RIPA缓冲液(20mM Tris-HCl,pH 7.4,150mM NaCl,1%NP-40和1mM EDTA)裂解细胞。将全细胞裂解物(50μg至100μg)进行SDS-PAGE,然后用各自的抗体进行免疫印迹。

[0247] 为了检测磷酸化蛋白质,在含有蛋白酶抑制剂混合物的磷酸酶抑制剂提取缓冲液(Millipore)中于4℃下制备细胞裂解物。

[0248] 对于免疫沉淀,通过与蛋白A珠在4℃孵育1小时来预清除细胞裂解物。将预清除的细胞裂解物在4℃下与各抗体一起孵育过夜,然后与30μL蛋白A/GPLUS-琼脂糖珠在4℃孵育3小时至4小时。然后收集免疫沉淀物并用裂解缓冲液洗涤5次,然后进行免疫印迹分析。

[0249] 实施例12:蛋白质纯化和尺寸排阻色谱

[0250] 将表达六聚组氨酸(His)标记的EPRS(第1至第732位氨基酸、第1至第196位氨基酸和第1至第168位氨基酸)、His标记的PCBP2(第11至第82位氨基酸和第168至第279位氨基酸)、GST融合的PCBP2(第11至第82位氨基酸)或GST融合的MAVS(第460至第540位氨基酸)蛋白的质粒转化到大肠杆菌BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL细胞中,并通过用0.5mM IPTG在18℃处理18小时来诱导表达。将细胞悬浮于缓冲液A(50mM Tris-HCl、pH7.5和150mM NaCl)中并通过在冰上超声处理来进行裂解。然后,将细胞裂解物在25000g、4℃下离心1小时。将含有Hig标记的EPRS结构域或PCBP2结构域的上清液上样到Ni-NTA琼脂糖柱上,用缓冲液A洗涤,并用250mM咪唑洗脱。将含有GST融合的PCBP2或MAVS结构域的上清液上样到谷胱甘肽琼脂糖凝胶4B柱上,用缓冲液A洗涤,并用10mM还原型谷胱甘肽洗脱。然后将纯化的蛋白质用缓冲液A透析并储存在-80℃直至使用。使用Superdex 200 10/300 GL柱在4℃下通过尺寸排阻色谱法检查纯化的EPRS(第1至第732位氨基酸)。使用醇脱氢酶(150kDa)和白蛋白(66kDa)作为分子量标准。通过SDS-PAGE分析所有洗脱的蛋白质,然后用考马斯亮蓝染色。

[0251] 实施例13:体内下拉(pull-down)分析

[0252] 将纯化的Hig标记的EPRS结构域(10μM)和GST融合的PCBP2结构域(20μM)在结合缓冲液(50mM Tris-HCl、pH 7.5和300mM NaCl)中混合。另外,将纯化的GST融合的MAVS(10μM)与Hig标记的PCBP2结构域(5μM)在结合缓冲液中混合。然后将这些蛋白质混合物与50μL

Ni-NTA琼脂糖珠在4℃下孵育1小时。用洗涤缓冲液(50mM Tris-HCl、pH 7.5、300mM NaCl和10mM咪唑)洗涤后,用洗脱缓冲液(50mM Tris-HCl、pH 7.5、300mM NaCl和250mM咪唑)洗脱结合的蛋白质。将样品上样到4%至12%SDS-PAGE凝胶上,通过考马斯蓝染色观察蛋白质条带。

[0253] 实施例14:组织学分析

[0254] 将脑样品在4%多聚甲醛中固定,在石蜡中包埋,并切成4μm厚的切片。然后将切片用二甲苯脱蜡并用H&E染色。

[0255] 为了检测VSV,用二甲苯将脑切片脱蜡,并通过在柠檬酸盐缓冲液(pH6.5)中进行微波处理来进行抗原修复。用VSV-G抗体(兔,1:200)染色后,将切片与Alexa488缀合的抗兔IgG(1:250)一起孵育,然后进行DAPI染色。

[0256] 用尼康激光扫描共聚焦显微镜(C2plus,Tokyo,日本)捕获荧光图像,并使用NIS-Elements软件(Nikon)处理。

[0257] 实施例15:共聚焦显微术

[0258] 将HeLa细胞接种到8孔板(Labtek)中。病毒感染后,将感染的细胞在室温下在4%多聚甲醛中固定20分钟。为了获得MSC复合物的清晰图像,将细胞与25μg/mL的洋地黄皂苷在冰上孵育10分钟。在-20℃下用100%甲醇透化20分钟后,在室温下用含有2%BSA的PBS封闭细胞1小时。然后用PBS-T(含有0.05%Tween-20的PBS)洗涤细胞三次,并在4℃下与适当的一抗孵育过夜。再洗涤三次后,将细胞在室温下与适当的二抗一起孵育1小时。然后将细胞在室温下用DAPI另外染色10分钟,用PBS-T洗涤三次,并安置在封固溶液中。在尼康激光扫描共聚焦显微镜(C2plus)下获取图像,并使用NIS-Elements软件进行分析。使用软件工具计算基于皮尔逊相关系数的共定位指数。

[0259] 实施例16:质谱鉴定EPRS磷酸化位点和相互作用物组

[0260] 用Strep-EPRS质粒构建体转染HEK293T细胞24小时,然后用PR8-GFP(MOI=5)感染6小时。在含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合物(Roche)的裂解缓冲液(20mM Tris-HCl、pH 8.0,150mM NaCl、0.5%NP-40和1mM EDTA)中收获经感染的细胞,并在4℃下与Strep-Tactin Superflow高容量树脂(IBA)一起孵育过夜。用裂解缓冲液洗涤树脂五次,用洗脱缓冲液(100mM Tris-HCl、pH 8.0、150mM NaCl、1mM EDTA和2.5mM脱硫生物素)洗脱结合的蛋白质。将最终洗脱的级分在Amicon Ultra-4(10K MWCO)离心装置(Millipore)中浓缩。然后用SDS-PAGE和银染法对样品进行分析。切下染色的蛋白质条带并进行凝胶内胰蛋白酶消化。回收经胰蛋白酶消化的肽并将其注入至与Eksigent MDLC系统连接的反相Magic 18aq(5μm,200Å,Michrom BioResources)柱(15cm×75μm,内部包装)中。用含有5%至40%乙腈的40分钟线性梯度的酸化水(0.1%甲酸)以300nL/分钟的流速洗脱肽。将HPLC系统与LTQ XL-Orbitrap质谱仪(Thermo Scientific)连接。

[0261] 获得全扫描MS光谱(300-2000m/z),分辨率为100000,用于前体选择和肽电荷状态测定。电离参数来源如下:喷雾电压,1.9kV;毛细管温度,250℃。

[0262] 使用以下选项获得来自MS1扫描的电荷态≥2的最强离子的MS/MS谱:隔离宽度,2.0m/z;归一化碰撞能量,35%;和动态排阻持续时间,30秒。使用Proteome Discoverer 1.4(Thermo Scientific)中的SEQUEST算法和MASCOT搜索引擎(v.2.3.01;Matrix Science)搜索原始数据。使用以下参数搜索人Uniprot数据库(2013.07发布):全胰蛋白酶

肽切割特异性、不完全酶解位点数目(missed cleavage)为2、脲基甲基半胱氨酸的固定修饰(+57.021Da)、经氧化的甲硫氨酸的可变修饰(+15.995Da)、以及磷酸化丝氨酸、磷酸化苏氨酸和磷酸化酪氨酸(+79.9799Da)。

[0263] 实施例17:体内和体外泛素化测定

[0264] 用MAVS-FLAG质粒、ITCH-V5质粒、GST-PCBP2质粒和Strep-EPRS质粒的不同组合转染HEK293T细胞。24小时后,将细胞用10μM MG-132处理6小时,然后用RIPA缓冲液裂解,并用抗FLAG亲和凝胶在4℃下免疫沉淀6小时。为了检测内源性MAVS泛素化,将细胞裂解物与抗MAVS抗体一起孵育过夜,然后与蛋白A/G PLUS-琼脂糖珠在4℃孵育3小时。用裂解缓冲液洗涤免疫复合物五次,并在SDS样品缓冲液中煮沸10分钟。使用抗Ub或抗K48抗体分析泛素化。对于体外泛素化测定,从经每种质粒转染的HEK293T细胞的裂解物中沉淀Strep-MAVS蛋白、Strep-PCBP2蛋白和Strep-EPRS蛋白。通过将裂解物与抗V5抗体一起孵育,然后与蛋白A/G PLUS-琼脂糖珠孵育来制备Itch-V5蛋白。将纯化的蛋白质与来自UbcH5b(Boston Biochem)的泛素、E1和E2在含有Mg^{2+}-ATP的反应缓冲液中于37℃孵育1小时。通过煮沸来终止反应,然后加入含有1mM DTT的SDS样品缓冲液维持10分钟。用抗Ub抗体检测泛素化。

[0265] 实施例18:肽设计与合成

[0266] 将EPRS L1(第168至196位氨基酸)与细胞穿透性HIV-1 TAT肽(第47至57位氨基酸,YGRKKRRQRRR;SEQ ID NO:60)融合。然后合成融合肽(Tat-Epep)并通过反相HPLC(AbClon)纯化至≥93%。Tat-Epep序列是YGRKKRRQRRR-GG-DVSTTKARVAPEKKQDVGKFVELPGAEMG(SEQ ID NO:61)。包含YGRKKRRQRRR序列(SEQ ID NO:60)的TAT用作对照肽。将冻干的肽在-80℃下储存于干燥剂中并且在使用前将其溶解在PBS中。

[0267] 实施例19:细胞毒性测定

[0268] 将HEK293T或RAW264.7细胞接种于96孔板(每孔10000个)中,然后用Tat-Epep(20μM至200μM)处理0至24小时。使用MTS[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑盐](Promega)在比色测定中测定细胞毒性。将20μL MTS在37℃下加入各孔中维持1小时。使用自动酶标仪(BioTek)记录490nm处的光密度。从每个样品读数中减去630nm处的背景吸光度。

[0269] 实施例20:使用设计肽的动物实验

[0270] C57BL/6小鼠(雌性,7周龄)购自Koatech(Pyeongtaek,韩国),并通过静脉内注射VSV Indiana(2×10^8pfu/小鼠)进行感染。24小时后,每天向小鼠腹膜内施用Tat-Epep(2.5mg/kg[0.53μM/kg]或5mg/kg[1.05μM/kg]),施用3天。Tat PTD肽(1.65mg/kg[1.05μM/kg])用作对照。在第4天,从小鼠收获脑组织。使用TissueLyser(Qiagen)立即将收获的样品匀一化,并通过上述方法测定病毒滴度。

[0271] 实施例21:统计学分析

[0272] 使用Prism(Version 6.0,GraphPad Software)进行统计学分析。根据需要,使用学生非配对t检验、对数秩检验或非参数Mann-Whitney检验分析数据。使用Kolmogorov-Smirnov检验评估数据的正态性。除非另有说明,数据表示为平均值±标准偏差,并且所有实验独立地重复至少三次。根据分析,认为*<0.05、**<0.01或***<0.001的P值是显著的。

[0273] 实验例1:EPRS(谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶)的抗病毒能力

[0274] 氨酰-tRNA合成酶(ARS)在多种非翻译细胞过程中具有重要作用,但关于它们在病毒感染期间的作用的信息有限。因此,本发明人使用RNA测序进行全基因组表达谱分析,以评估编码MSC(多tRNA合成酶复合物)组分的基因在感染甲型流感病毒的人支气管上皮细胞中的表达模式。由此,观察到这些基因的异质表达和时间变动,这表明基因可能在对病毒感染的反应中起作用(图1)。

[0275] 然后,本发明人检查了可能引发抗病毒反应的MSC蛋白,并发现EPRS(谷氨酰-脯氨酰-tRNA合成酶)诱导了显著的IFN-β启动子活性(图2)。此外,在感染病毒的不同细胞系中逐渐诱导EPRS mRNA的表达(图3)。当使用siRNA敲低RAW264.7细胞中的EPRS(图4)时,RNA病毒(PR8甲型流感病毒和水疱性口炎病毒(VSV))的复制增加(图5和图6),但单纯疱疹病毒(HSV)(DNA病毒)的复制不受影响(图7)。EPRS敲低的细胞在病毒感染或用合成的dsRNA聚肌苷酸-聚胞苷酸处理后显示出抗病毒细胞因子(IFN-β和IL-6)产生的显著减弱(图8和图9)。然而,HSV没有显著改变细胞因子诱导(图8和图9)。EPRS敲低的HEK293T细胞系(图10至图12)和用shRNA稳定转染以敲低EPRS的RAW264.7细胞系(图13至图19)获得类似的结果。此外,在EPRS敲低的细胞中,IFN相关信号传导分子IRF3和STAT1的活化显著降低(图20)。相反,稳定过表达EPRS的RAW264.7细胞(图21)在用PR8(图22至图24)或VSV(图25至图27)感染后显示出显著更少的病毒复制和更多的IFN-β和IL-6产生。

[0276] 总的来说,这些数据表明EPRS正向调节抗病毒先天免疫应答,特别是那些针对RNA病毒的应答。

[0277] 实验例2:EPRS对抗病毒感染的体内防御

[0278] 本发明人使用杂合EPRS+/-小鼠来研究EPRS在抗病毒免疫应答中的生理作用,因为EPRS的纯合缺失在断奶前阶段是致命的。当检测从用PR8或VSV感染的野生型(WT,EPRS+/+)小鼠和EPRS+/-小鼠中分离的BMDM(骨髓衍生的巨噬细胞)时,EPRS+/-BMDM中的病毒滴度远高于WT BMDM中的病毒滴度(图28)。与该观察结果一致,由EPRS+/-BMDM产生的IFN-β和IL-6的浓度显著低于对病毒感染(图29)和用聚(I:C)处理(图30)均产生响应的EPRS+/+细胞所产生的浓度。从使用siRNA转染的EPRS敲低的BMDM获得了类似的结果(图31至图34)。此外,在VSV感染的EPRS+/-BMDM中的IFN-β水平、抗病毒IFN相关基因表达和炎症相关基因表达比在VSV感染的EPRS+/+细胞中低得多(图35)。

[0279] EPRS敲低的RAW264.7细胞中抗病毒基因的诱导在PR8感染后也比在对照细胞中低得多(图36)。相反,在病毒复制或细胞因子分泌方面,HSV感染的EPRS+/+和EPRS+/-BMDM之间没有实质差异(图37和图38)。

[0280] 接下来,向EPRS+/+和EPRS+/-小鼠静脉内施用VSV Indiana病毒株,并且每天监测它们的存活。发现有43%的EPRS+/-小鼠(6/14)但只有7%的EPRS+/+小鼠(1/15)在感染后6天内死亡(图39)。为了研究小鼠组织中的病毒载量,在病毒感染后第5天对小鼠的脑和脾进行取样和分析。EPRS+/-小鼠的脑和脾中的病毒滴度显著高于EPRS+/+小鼠的病毒滴度(图40和图41),这表明EPRS+/-小鼠对VSV感染更敏感。

[0281] 接下来,为了进一步评估EPRS在免疫应答中的功能重要性,向EPRS+/+小鼠和EPRS+/-小鼠静脉内施用重组VSV-GFP,并在感染后12小时测量血清样品中的病毒载量和抗病毒细胞因子水平。结果,病毒血症更严重(图42)并且血清中IFN-β、IFN-α和IL-6的水平更低(图43)。

[0282] 最后，在感染后0至5天收集脑组织样品，并评估由VSV诱导的组织学特征。经H&E(苏木精-伊红)染色的来自EPRS+/-小鼠的脑切片显示出比来自EPRS+/+小鼠的切片更大的炎性细胞浸润(特别是侧脑室区周围)(图44)。此外，用抗VSV-G抗体染色的切片脑组织的免疫组织化学分析证实在炎症周围的部位存在感染的病毒，并且EPRS+/-小鼠中的病毒清除慢于EPRS+/+小鼠中的病毒清除(图45)。

[0283] 总之，这些结果表明EPRS参与了针对病毒感染的小鼠细胞内先天免疫应答。

[0284] 实验例3:EPRS抗病毒活性的感染特异性修饰

[0285] 先前研究的结果已经报道，翻译后修饰例如磷酸化是从MSC释放ARS并随后与下游效应分子相互作用、以及激活非经典功能的关键驱动因素。例如，EPRS在Ser886和Ser999处的IFN-γ依赖性顺序磷酸化诱导从MSC释放EPRS以形成GAIT复合物。为了评估病毒感染后的EPRS功能，本发明人用PR8感染人巨噬细胞样U937细胞，该细胞是主要用于在IFN-γ活化的情况下研究EPRS的细胞类型。结果，在病毒感染后EPRS与KRS和AIMP3的相互作用显著降低，这表明EPRS从MSC解离(图46)。使用抗NSAP1抗体的免疫印迹分析揭示了EPRS在24小时处与NSAP1弱结合，NSAP1是通过Ser886处的磷酸化直接结合EPRS的前GAIT复合物的组分。然而，EPRS不结合GAPDH，GAPDH是需要EPRS在Ser999处磷酸化以形成功能性复合物的GAIT复合物的组分(图46)。

[0286] 接下来，通过用抗EPRS或抗KRS抗体对经PR8感染的RAW264.7巨噬细胞裂解物进行免疫共沉淀(co-IP)来进一步证实EPRS从MSC释放是否由病毒诱导(图47和图48)。共聚焦显微镜分析还显示EPRS与KRS共定位，但在病毒感染后共定位程度降低(图49至图51)。这些结果表明存在与EPRS激活相关的独特的病毒特异性机制。

[0287] 为了研究EPRS活化的机制及其在抗病毒反应中的作用，本发明人接下来使用基于质谱的蛋白质组学方法来鉴定在HEK293T细胞中异位表达的Strep标记的EPRS中的特异性翻译后修饰(图52)。在未感染和感染的细胞中均检测到Ser886的磷酸化，而在所有条件下Ser999(其在IFN-γ刺激后被磷酸化)未被修饰(图53至图55)。出乎意料的是，病毒感染诱导了EPRS在Ser990处的磷酸化(图56和图57)。为了证实该发现，通过使用磷酸化肽^{983}DGQRKDP(p)SKNQGGG^{996}(SEQ ID NO:62)作为抗原制备针对该位点的兔多克隆抗体。用PR8感染U937细胞后，EPRS在Ser990处的磷酸化逐渐增加(图58)。相反，IFN-γ处理不诱导Ser990的磷酸化(图58)。用其他病毒或合成RNA处理的细胞获得了类似的结果(图59至图62)。

[0288] 本发明人还在未感染细胞中检测到少量Ser886磷酸化，该磷酸化在PR8感染后增加，但该增加少于IFN-γ刺激后观察到的增加(图63)。病毒感染不诱导Ser999的磷酸化，而IFN-γ刺激明显诱导Ser999的磷酸化(图64)。此外，病毒感染不影响IFN-γ的分泌或对作为GAIT复合物靶标的Cp的表达的抑制(图65至图67)。使用异位表达的EPRS磷酸模拟物的先前研究结果表明，Ser886和Ser999的磷酸化诱导了从MSC释放EPRS。特别地，strep标记的EPRS单磷酸化S990D不与MSC组分、KRS、AIMP3和MRS相互作用，这表明了从MSC的可诱导释放(图68)。

[0289] 总之，这些结果表明病毒诱导的EPRS在Ser990处的磷酸化诱导其从MSC释放，以执行不同于其在IFN-γ激活的GAIT翻译沉默途径中所起作用的功能。

[0290] 实验例4:EPRS与PCBP2的相互作用

[0291] 在病毒进入细胞后，细胞内传感器RIG-I被激活。然后RIG-I与MAVS相互作用以触发信号级联反应，最终导致I型IFN的产生。对该信号级联的分析揭示出EPRS以剂量依赖性方式增加ILIG启动子的RIG-I、MDA5、聚肌苷酸-聚胞苷酸和MAVS介导的活性(图69)。然而，在TRAF3、TBK1或IRF7的存在下未观察到IFN-β启动子的实质活化(图70)。这些结果表明EPRS是I型IFN途径的正向调节物，并且作用于MAVS的下游和TRF3信号传导轴的上游。

[0292] 为了鉴定在病毒感染期间调节MAVS信号传导的EPRS相互作用分子，使用来自经PR8感染的细胞的Strep-EPRS特异性复合物进行蛋白质组学分析(图71)。结果，发现存在MSC蛋白但不存在GAIT蛋白(NSAP、GAPDH和L13a)。特别地，EPRS与PCBP2相互作用，已知PCBP2在病毒感染后引发MAVS的泛素化和降解。内源性免疫共沉淀分析证实了病毒诱导的RAW264.7细胞和U937细胞中EPRS与PCBP2的相互作用，并且两种蛋白质之间的相互作用随时间而增加(图72和图73)。此外，与先前研究的结果一致，在病毒感染后，PCBP2从细胞核易位至细胞质，在细胞质中PCBP2与EPRS共定位(图74)。

[0293] 接下来，为了鉴定负责与PCBP2相互作用的EPRS区域，制备含有各种EPRS结构域的质粒构建体(图75)。全长EPRS的氨基酸序列是由SEQ ID NO:63表示的1512个氨基酸的序列。然后，进行免疫共沉淀以评估每个EPRS区域与PCBP2之间的相互作用。结果表明，含有GST样结构域和连接子区域L1(第1至第196位氨基酸)的EPRS的N-末端结构域对于与PCBP2的相互作用是至关重要的，并且该区域诱导与由全长EPRS诱导的IFN-β启动子激活相当的IFN-β启动子激活。然而，单独的GST样结构域(第1至第168位氨基酸)不诱导抗病毒活性(图75至图79)。这些结果表明，GST样结构域和ERS之间的L1区(第168至第196位氨基酸)对于与PCBP2的相互作用和抗病毒反应都是必需的。本发明人证实，L1缺失的突变体不与PCBP2相互作用并且显示激活IFN-β的能力降低，这表明L1区(第168至第196位氨基酸)和含有L1区的片段(第168至第269位氨基酸)具有抗病毒作用(图80和图81)。

[0294] 另一方面，本发明人发现PCBP2的N-末端KH1结构域(第1至第81位氨基酸)而非连接子区域足以结合EPRS(图82和图83)。体外沉淀测定显示，PCBP2 KH1特异性地与EPRS的GST和L1区域相互作用，但不与单独的GST样结构域(第1至第168位氨基酸)相互作用(图84至图86)。总之，这些数据表明Ser990-磷酸化驱动的EPRS从MSC的释放促进了EPRS与PCBP2的相互作用并可能调节MAVS信号传导。

[0295] 实验例5:EPRS保护MAVS免受PCBP2介导的泛素化的作用

[0296] 据报道，PCBP2在病毒感染后被诱导，并且它与MAVS相互作用，导致MAVS的泛素化以进行蛋白酶体降解。因此，本发明人假设EPRS可通过阻断PCBP2介导的泛素化来保护MAVS。当重新评估PCBP2与MAVS的相互作用时，发现MAVS特异性地与PCBP2 KH1结构域相互作用，所述结构域是结合EPRS的结构域(图87至图90)。EPRS和MAVS靶向相同的KH1结构域表明EPRS可能与MAVS竞争，从而阻止MAVS与PCBP2的相互作用。

[0297] 实际上，在EPRS存在下，PCBP2和MAVS之间的相互作用显著降低(图91)。然而，EPRS没有破坏PCBP2与ITCH E3连接酶的结合(图92)，这表明EPRS特异性地与MAVS竞争结合PCBP2 KH1。这些结果通过内源性相互作用测定得到证实，其显示在用PR8感染后，PCBP2与MAVS的结合逐渐减少，而其与EPRS的相互作用显著增加。这些结果表明EPRS起到抵抗经感染细胞中PCBP2与MAVS的内源性结合的作用(图93)。

[0298] PCBP2通过募集ITCHE3来加速泛素(Ub)介导的MAVS降解。因此，本发明人发现，在

293T细胞中外源性表达的MAVS-FLAG被ITCH泛素化，并且在加入PCBP2后反应显著增加(图94)。然而，EPRS的添加以剂量依赖性方式抑制了PCBP2介导的MAVS泛素化(图94)。同样地，PCBP2极大地增强了MAVS的内源性泛素化，但是在EPRS存在下显著减弱了MAVS的内源性泛素化(图95)。与泛素化测定的结果一致，外源性MAVS(图96)和内源性MAVS(图97)都被PCBP2降解，但是通过添加EPRS而得以挽救该降解。

[0299] 最后，用纯化的EPRS重建的无细胞系统的分析揭示了非常少的PCBP2介导的MAVS泛素化(图98)。因此，EPRS特异性阻断了PCBP2介导的MAVS负向调控，从而维持了强抗病毒免疫应答。

[0300] 实验例6:EPRS衍生肽的抗病毒活性

[0301] 实验例6-1:Tat-Epep的体外和体内抗病毒活性

[0302] 迄今为止，本发明人已经发现EPRS在抗病毒免疫应答中抑制了PCBP2介导的MAVS降解，特别地，EPRS L1区域(第168至第196位氨基酸)对于与PCBP2相互作用是必需的并且负责促进抗病毒I型IFN信号传导。本发明人接下来通过将HIV-1 Tat蛋白转导结构域与EPRS L1区融合来设计细胞穿透肽(下文称为“Tat-Epep”，SEQ ID NO:61)，并评估其对抗病毒活性的影响。Tat-Epep削弱了PCBP2介导的MAVS内源性泛素化(图99)并恢复了MAVS的细胞表达(图100)。Tat-Epep还在RAW264.7细胞中以剂量依赖性方式增加病毒感染细胞中IFN-β和IL-6的产生(图101)并降低VSV复制(图102和图103)。然而，Tat-Epep在感染HSV的RAW264.7细胞中没有显示出显著的抗病毒活性(图104至图106)，这表明Tat-Epep对RNA病毒感染具有特异性。Tat-Epep对测试浓度下的RAW264.7细胞或293T细胞的存活率没有影响，这表明减少的病毒滴度不是肽介导的细胞毒性的结果(图107和图108)。这些结果表明Tat-Epep可能是一种可促进MAVS稳定性和I型IFN产生的潜在的抗RNA病毒剂。

[0303] 为了进一步检查Tat-Epep在体内的抗病毒作用，本发明人向小鼠静脉内施用VSV-Indiana病毒株。注射后，每天向小鼠腹膜内施用Tat或Tat-Epep，持续3天。结果发现，与Tat标签处理的小鼠相比，Tat-Epep处理的小鼠显示出脑组织中病毒滴度的显著降低(图109)。这些数据也表明Tat-Epep可以有效作为潜在的抗RNA病毒剂。

[0304] 实验例6-2:New Tat-Epep的体外和体内抗病毒活性

[0305] 本发明人通过将Tat-Epep的EPRS L1肽区限制为21mer(第166至第186位氨基酸)来制备新肽(下文称为“New Tat-Epep”)。New Tat-Epep的氨基酸序列为YGRKKRRQRRR-GG-KWDVSTTKARVAPEKKQDVGK(SEQ ID NO:64)。以与实施例6-1相同的方式，用New Tat-Epep处理静脉注射VSV的小鼠(TAT-对照组:100μg，7只小鼠;New Tat-Epep:200μg，3只小鼠)。结果，与Tat-Epep一样，发现New Tat-Epep降低小鼠脑中的VSV病毒滴度(图110)。此外，当用New Tat-Epep处理VSV-GAP病毒感染的RAW264.7细胞时，与Tat-Epep相比，New Tat-Epep诱导抗病毒细胞因子IFN-β和IL-6的分泌增加2倍至3倍(图111至图113)。这些结果证明New Tat-Epep也可有效地作为抗RNA病毒剂。

[0306] 相应地，可以看出，在EPRS L1(第168至第196位氨基酸)中只有缺失了第187至第196位氨基酸的第168至第186位氨基酸片段具有优异的抗RNA病毒活性。

[0307] 基于以上描述，本领域技术人员将理解，本发明可以以不同的具体形式实现，而不改变其技术精神或本质特征。因此，应该理解的是，上述实施方案在所有方面不是限制性的，而是说明性的。本发明的范围由所附权利要求限定，而不是由前面的描述限定，因此，落

在权利要求的范围内的所有变化和修改或这些保护范围的等同物旨在被权利要求所包含。

<110> 韩国生命工学研究院
医药生命融合研究团

<120> 包含EPRS蛋白或其片段的抗RNA病毒组合物

<130> OPA17126-PCT

<150> KR 10-2016-0107037
<151> 2016-08-23

<160> 70

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> WT-特异性引物-1

<400> 1
tactgtgctg aatgaaaagt gcc 23

<210> 2
[0001] <211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> WT-特异性引物-2

<400> 2
ggtagaagtg ctaagtagga tgagg 25

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 突变体-特异性引物-1

<400> 3
ccattaccag ttggtctggt gtc 23

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 突变体-特异性引物-2

<400> 4
tgcctgtgac caccaataag aaagcc 26

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> ser990抗原

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> 磷酸化,

<400> 5
Asp Gly Gln Arg Lys Asp Pro Ser Lys Asn Gln Gly Gly Gly
1 5 10

[0002]

<210> 6
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> hEPRS引物F

<400> 6
cttctcaagg ggaag 15

<210> 7
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> hEPRS引物R

<400> 7
ctgcttttca gattt 15

<210> 8
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> mEPRS引物F

<400> 8
aagcggaaaa ggctcctaag 20

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> mEPRS引物R

<400> 9
cccagtcttt tctttatact cagctt 26

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

[0003]

<220>
<223> IFN-a引物F

<400> 10
cttgaaggac agacatgact ttgga 25

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> IFN-a引物R

<400> 11
ggatggtttc agccttttgg a 21

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> IFN-b引物F

<400> 12
tccaagaaag gacgaacatt cg 22

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> IFN-b引物R

<400> 13
tgcggacatc tcccaacgtc a 21

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> ADAR1引物F

[0004]

<400> 14
ccaaagacac ttcctctc 18

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> ADAR1引物R

<400> 15
cagtgtggtg gttgtact 18

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> MX1引物F

<400> 16
acaagcacag gaaaccgtat cag 23

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> MX1引物R

<400> 17
aggcagtttg gaccatctta gtg 23

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> OAS1引物F

<400> 18
gaggcggttg gctgaagagg 20

[0005]

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> OAS1引物R

<400> 19
gaggaaggct ggctgtgatt gg 22

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> OAS1b引物F

<400> 20
ttgatgtgct gccagcctat 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> OAS1b引物R

<400> 21
tgaggcgctt cagcttggtt 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> PKR引物F

<400> 22
gccagatgca cggagtagcc 20

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

[0006] <220>
<223> PKR引物R

<400> 23
gaaaacttgg ccaaatccac c 21

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> PML引物F

<400> 24
cctgcgctga ctgacatcta ct 22

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> PML引物R

<400> 25
tgcaacacag aggctggc 18

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> P56引物F

<400> 26
cccacgctat accatctacc 20

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> P56引物R

<400> 27
ctgaggctgc tgctatcc 18

[0007]

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> ISG15引物F

<400> 28
caatggcctg ggacctaaa 19

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> ISG15引物R

<400> 29
cttcttcagt tctgacaccg tcat 24

<210> 30

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> ISG20引物F

<400> 30
agagatcacg gactacagaa 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> ISG20引物R

<400> 31
tctgtggacg tgtcatagat 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
[0008] <213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> ISG56引物F

<400> 32
agagaacagc taccaccttt 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> ISG56引物R

<400> 33
tggacctgct ctgagattct 20

<210> 34
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>

<223> GAPDH引物F

<400> 34
tgaccacagt ccatgccat 19

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> GAPDH引物R

<400> 35
gacggacaca ttgggggtag 20

<210> 36
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> VSV-G引物F

[0009]

<400> 36
caagtcaaaa tgcccaagag tcaca 25

<210> 37
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> VSV-G引物R

<400> 37
tttccttgca ttgttctaca gatgg 25

<210> 38
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS S886D引物F

<400> 38
cccccattat ctcaaagttc ggattcagac ccaaccagaa att 43

<210> 39
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS S886D引物R

<400> 39
aatttctggt tgggtctgaa tccgaacttt gagataatgg ggg 43

<210> 40
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS S990D引物F

<400> 40
cacacaaagg aaagaccctg ataaaaacca aggaggtggg 40

[0010]

<210> 41
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS S990D引物R

<400> 41
cccacctcct tggtttttat cagggtcttt cctttgtgtg 40

<210> 42
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS S999D引物F

<400> 42
tctaaaaacc aaggaggtgg gctctcagat agtggagcag gaga 44

<210> 43
<211> 44
<212> DNA

<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS S999D引物R

<400> 43
tctcctgctc cactatctga gagcccacct ccttggtttt taga 44

<210> 44
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS S990A引物F

<400> 44
gccaaaggaa agaccctgct aaaaaccaag gaggt 35

<210> 45
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

[0011]

<220>
<223> EPRS S990A引物R

<400> 45
acctccttgg tttttagcag ggtctttcct ttggc 35

<210> 46
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS R201L引物F

<400> 46
gagatgggaa aggttaccgt cttatttcct ccagaggcca gtgg 44

<210> 47
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS R201L引物R

<400> 47
ccactggcct ctggaggaaa taagacggta acctttccca tctc 44

<210> 48
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS R395L引物F

<400> 48
gaaggtgtta cacatgccct gttaacagaa taccatgaca g 41

<210> 49
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS R395L引物R

[0012]
<400> 49
ctgtcatggt attctgttgt taacagggca tgtgtaacac cttc 44

<210> 50
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS S434A/K435L引物F

<400> 50
ctcaacaaca cagtgctagc gctgagaaaa ctcacatggt ttg 43

<210> 51
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS S434A/K435L引物R

<400> 51
caaaccatgt gagttttctc agcgctagca ctgtgttgtt gag 43

<210> 52
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS R1152L引物F

<400> 52
gtggtgcaat gtggtgcttt gggaattcaa gcatc 35

<210> 53
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS R1152L引物R

<400> 53
gatgcttgaa ttcccaaagc accacattgc accac 35

[0013]

<210> 54
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> hEPRS siRNA

<400> 54
cuaauuccuc agcaaguau 19

<210> 55
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> mEPRS siRNA

<400> 55
caaagucauc aucaaacac 19

<210> 56
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> mMAVS 1 siRNA

<400> 56
uugcugagga caagaccuau a 21

<210> 57
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> mMAVS 2 siRNA

<400> 57
cagaggagaa ugaguauuc 19

<210> 58
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> sgEPRS 1

[0014]

<400> 58
gaattctata cttcgctact tgg 23

<210> 59
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> sgEPRS 2

<400> 59
gctagagttg caactacagc tgg 23

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HIV-1 TAT肽

<400> 60

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 61
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> Tat-Epep

<400> 61
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Asp Val Ser
1 5 10 15

Thr Thr Lys Ala Arg Val Ala Pro Glu Lys Lys Gln Asp Val Gly Lys
20 25 30

Phe Val Glu Leu Pro Gly Ala Glu Met Gly
35 40

[0015]

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> ser990抗原

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> 磷酸化,

<400> 62
Asp Gly Gln Arg Lys Asp Pro Ser Lys Asn Gln Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 63
<211> 1512
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> EPRS全长

<400> 63
Met Ala Thr Leu Ser Leu Thr Val Asn Ser Gly Asp Pro Pro Leu Gly
1 5 10 15

Ala Leu Leu Ala Val Glu His Val Lys Asp Asp Val Ser Ile Ser Val
20 25 30

Glu Glu Gly Lys Glu Asn Ile Leu His Val Ser Glu Asn Val Ile Phe
35 40 45

Thr Asp Val Asn Ser Ile Leu Arg Tyr Leu Ala Arg Val Ala Thr Thr
50 55 60

Ala Gly Leu Tyr Gly Ser Asn Leu Met Glu His Thr Glu Ile Asp His
65 70 75 80

Trp Leu Glu Phe Ser Ala Thr Lys Leu Ser Ser Cys Asp Ser Phe Thr
85 90 95

Ser Thr Ile Asn Glu Leu Asn His Cys Leu Ser Leu Arg Thr Tyr Leu
100 105 110

Val Gly Asn Ser Leu Ser Leu Ala Asp Leu Cys Val Trp Ala Thr Leu
115 120 125

Lys Gly Asn Ala Ala Trp Gln Glu Gln Leu Lys Gln Lys Lys Ala Pro
130 135 140

Val His Val Lys Arg Trp Phe Gly Phe Leu Glu Ala Gln Gln Ala Phe
145 150 155 160

[0016]

Gln Ser Val Gly Thr Lys Trp Asp Val Ser Thr Thr Lys Ala Arg Val
165 170 175

Ala Pro Glu Lys Lys Gln Asp Val Gly Lys Phe Val Glu Leu Pro Gly
180 185 190

Ala Glu Met Gly Lys Val Thr Val Arg Phe Pro Pro Glu Ala Ser Gly
195 200 205

Tyr Leu His Ile Gly His Ala Lys Ala Ala Leu Leu Asn Gln His Tyr
210 215 220

Gln Val Asn Phe Lys Gly Lys Leu Ile Met Arg Phe Asp Asp Thr Asn
225 230 235 240

Pro Glu Lys Glu Lys Glu Asp Phe Glu Lys Val Ile Leu Glu Asp Val
245 250 255

Ala Met Leu His Ile Lys Pro Asp Gln Phe Thr Tyr Thr Ser Asp His
260 265 270

Phe Glu Thr Ile Met Lys Tyr Ala Glu Lys Leu Ile Gln Glu Gly Lys
275 280 285

Ala Tyr Val Asp Asp Thr Pro Ala Glu Gln Met Lys Ala Glu Arg Glu
290 295 300

Gln Arg Ile Asp Ser Lys His Arg Lys Asn Pro Ile Glu Lys Asn Leu
305 310 315 320

Gln Met Trp Glu Glu Met Lys Lys Gly Ser Gln Phe Gly Gln Ser Cys
325 330 335

Cys Leu Arg Ala Lys Ile Asp Met Ser Ser Asn Asn Gly Cys Met Arg
340 345 350

Asp Pro Thr Leu Tyr Arg Cys Lys Ile Gln Pro His Pro Arg Thr Gly
355 360 365

Asn Lys Tyr Asn Val Tyr Pro Thr Tyr Asp Phe Ala Cys Pro Ile Val
370 375 380

Asp Ser Ile Glu Gly Val Thr His Ala Leu Arg Thr Thr Glu Tyr His
385 390 395 400

Asp Arg Asp Glu Gln Phe Tyr Trp Ile Ile Glu Ala Leu Gly Ile Arg
405 410 415

Lys Pro Tyr Ile Trp Glu Tyr Ser Arg Leu Asn Leu Asn Asn Thr Val
420 425 430

Leu Ser Lys Arg Lys Leu Thr Trp Phe Val Asn Glu Gly Leu Val Asp
435 440 445

Gly Trp Asp Asp Pro Arg Phe Pro Thr Val Arg Gly Val Leu Arg Arg
450 455 460

[0017] Gly Met Thr Val Glu Gly Leu Lys Gln Phe Ile Ala Ala Gln Gly Ser
465 470 475 480

Ser Arg Ser Val Val Asn Met Glu Trp Asp Lys Ile Trp Ala Phe Asn
485 490 495

Lys Lys Val Ile Asp Pro Val Ala Pro Arg Tyr Val Ala Leu Leu Lys
500 505 510

Lys Glu Val Ile Pro Val Asn Val Pro Glu Ala Gln Glu Glu Met Lys
515 520 525

Glu Val Ala Lys His Pro Lys Asn Pro Glu Val Gly Leu Lys Pro Val
530 535 540

Trp Tyr Ser Pro Lys Val Phe Ile Glu Gly Ala Asp Ala Glu Thr Phe
545 550 555 560

Ser Glu Gly Glu Met Val Thr Phe Ile Asn Trp Gly Asn Leu Asn Ile
565 570 575

Thr Lys Ile His Lys Asn Ala Asp Gly Lys Ile Ile Ser Leu Asp Ala
580 585 590

Lys Leu Asn Leu Glu Asn Lys Asp Tyr Lys Lys Thr Thr Lys Val Thr
595 600 605

Trp Leu Ala Glu Thr Thr His Ala Leu Pro Ile Pro Val Ile Cys Val
610 615 620

Thr Tyr Glu His Leu Ile Thr Lys Pro Val Leu Gly Lys Asp Glu Asp
625 630 635 640

Phe Lys Gln Tyr Val Asn Lys Asn Ser Lys His Glu Glu Leu Met Leu
645 650 655

Gly Asp Pro Cys Leu Lys Asp Leu Lys Lys Gly Asp Ile Ile Gln Leu
660 665 670

Gln Arg Arg Gly Phe Phe Ile Cys Asp Gln Pro Tyr Glu Pro Val Ser
675 680 685

Pro Tyr Ser Cys Lys Glu Ala Pro Cys Val Leu Ile Tyr Ile Pro Asp
690 695 700

Gly His Thr Lys Glu Met Pro Thr Ser Gly Ser Lys Glu Lys Thr Lys
705 710 715 720

Val Glu Ala Thr Lys Asn Glu Thr Ser Ala Pro Phe Lys Glu Arg Pro
725 730 735

Thr Pro Ser Leu Asn Asn Asn Cys Thr Thr Ser Glu Asp Ser Leu Val
740 745 750

Leu Tyr Asn Arg Val Ala Val Gln Gly Asp Val Val Arg Glu Leu Lys
755 760 765

[0018] Ala Lys Lys Ala Pro Lys Glu Asp Val Asp Ala Ala Val Lys Gln Leu
770 775 780

Leu Ser Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Glu Lys Thr Gly Gln Glu Tyr Lys
785 790 795 800

Pro Gly Asn Pro Pro Ala Glu Ile Gly Gln Asn Ile Ser Ser Asn Ser
805 810 815

Ser Ala Ser Ile Leu Glu Ser Lys Ser Leu Tyr Asp Glu Val Ala Ala
820 825 830

Gln Gly Glu Val Val Arg Lys Leu Lys Ala Glu Lys Ser Pro Lys Ala
835 840 845

Lys Ile Asn Glu Ala Val Glu Cys Leu Leu Ser Leu Lys Ala Gln Tyr
850 855 860

Lys Glu Lys Thr Gly Lys Glu Tyr Ile Pro Gly Gln Pro Pro Leu Ser
865 870 875 880

Gln Ser Ser Asp Ser Ser Pro Thr Arg Asn Ser Glu Pro Ala Gly Leu
885 890 895

Glu Thr Pro Glu Ala Lys Val Leu Phe Asp Lys Val Ala Ser Gln Gly
900 905 910

Glu Val Val Arg Lys Leu Lys Thr Glu Lys Ala Pro Lys Asp Gln Val
915 920 925

Asp Ile Ala Val Gln Glu Leu Leu Gln Leu Lys Ala Gln Tyr Lys Ser
930 935 940

Leu Ile Gly Val Glu Tyr Lys Pro Val Ser Ala Thr Gly Ala Glu Asp
945 950 955 960

Lys Asp Lys Lys Lys Lys Glu Lys Glu Asn Lys Ser Glu Lys Gln Asn
965 970 975

Lys Pro Gln Lys Gln Asn Asp Gly Gln Arg Lys Asp Pro Ser Lys Asn
980 985 990

Gln Gly Gly Gly Leu Ser Ser Ser Gly Ala Gly Glu Gly Gln Gly Pro
995 1000 1005

Lys Lys Gln Thr Arg Leu Gly Leu Glu Ala Lys Lys Glu Glu Asn Leu
1010 1015 1020

Ala Asp Trp Tyr Ser Gln Val Ile Thr Lys Ser Glu Met Ile Glu Tyr
1025 1030 1035 1040

His Asp Ile Ser Gly Cys Tyr Ile Leu Arg Pro Trp Ala Tyr Ala Ile
1045 1050 1055

Trp Glu Ala Ile Lys Asp Phe Phe Asp Ala Glu Ile Lys Lys Leu Gly
1060 1065 1070

[0019] Val Glu Asn Cys Tyr Phe Pro Met Phe Val Ser Gln Ser Ala Leu Glu
1075 1080 1085

Lys Glu Lys Thr His Val Ala Asp Phe Ala Pro Glu Val Ala Trp Val
1090 1095 1100

Thr Arg Ser Gly Lys Thr Glu Leu Ala Glu Pro Ile Ala Ile Arg Pro
1105 1110 1115 1120

Thr Ser Glu Thr Val Met Tyr Pro Ala Tyr Ala Lys Trp Val Gln Ser
1125 1130 1135

His Arg Asp Leu Pro Ile Lys Leu Asn Gln Trp Cys Asn Val Val Arg
1140 1145 1150

Trp Glu Phe Lys His Pro Gln Pro Phe Leu Arg Thr Arg Glu Phe Leu
1155 1160 1165

Trp Gln Glu Gly His Ser Ala Phe Ala Thr Met Glu Glu Ala Ala Glu
1170 1175 1180

Glu Val Leu Gln Ile Leu Asp Leu Tyr Ala Gln Val Tyr Glu Glu Leu
1185 1190 1195 1200

Leu Ala Ile Pro Val Val Lys Gly Arg Lys Thr Glu Lys Glu Lys Phe
1205 1210 1215

Ala Gly Gly Asp Tyr Thr Thr Thr Ile Glu Ala Phe Ile Ser Ala Ser
1220 1225 1230

Gly Arg Ala Ile Gln Gly Gly Thr Ser His His Leu Gly Gln Asn Phe
1235 1240 1245

Ser Lys Met Phe Glu Ile Val Phe Glu Asp Pro Lys Ile Pro Gly Glu
1250 1255 1260

Lys Gln Phe Ala Tyr Gln Asn Ser Trp Gly Leu Thr Thr Arg Thr Ile
1265 1270 1275 1280

Gly Val Met Thr Met Val His Gly Asp Asn Met Gly Leu Val Leu Pro
1285 1290 1295

Pro Arg Val Ala Cys Val Gln Val Val Ile Ile Pro Cys Gly Ile Thr
1300 1305 1310

Asn Ala Leu Ser Glu Glu Asp Lys Glu Ala Leu Ile Ala Lys Cys Asn
1315 1320 1325

Asp Tyr Arg Arg Arg Leu Leu Ser Val Asn Ile Arg Val Arg Ala Asp
1330 1335 1340

Leu Arg Asp Asn Tyr Ser Pro Gly Trp Lys Phe Asn His Trp Glu Leu
1345 1350 1355 1360

Lys Gly Val Pro Ile Arg Leu Glu Val Gly Pro Arg Asp Met Lys Ser
1365 1370 1375

[0020] Cys Gln Phe Val Ala Val Arg Arg Asp Thr Gly Glu Lys Leu Thr Val
1380 1385 1390

Ala Glu Asn Glu Ala Glu Thr Lys Leu Gln Ala Ile Leu Glu Asp Ile
1395 1400 1405

Gln Val Thr Leu Phe Thr Arg Ala Ser Glu Asp Leu Lys Thr His Met
1410 1415 1420

Val Val Ala Asn Thr Met Glu Asp Phe Gln Lys Ile Leu Asp Ser Gly
1425 1430 1435 1440

Lys Ile Val Gln Ile Pro Phe Cys Gly Glu Ile Asp Cys Glu Asp Trp
1445 1450 1455

Ile Lys Lys Thr Thr Ala Arg Asp Gln Asp Leu Glu Pro Gly Ala Pro
1460 1465 1470

Ser Met Gly Ala Lys Ser Leu Cys Ile Pro Phe Lys Pro Leu Cys Glu
1475 1480 1485

Leu Gln Pro Gly Ala Lys Cys Val Cys Gly Lys Asn Pro Ala Lys Tyr
1490 1495 1500

Tyr Thr Leu Phe Gly Arg Ser Tyr
1505 1510

<210> 64
<211> 34

<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> New Tat-Epep

<400> 64
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Lys Trp Asp
1 5 10 15

Val Ser Thr Thr Lys Ala Arg Val Ala Pro Glu Lys Lys Gln Asp Val
20 25 30

Gly Lys

<210> 65
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 2+ EPRS肽

[0021] <220>
<221> MOD_RES
<222> (16)
<223> 磷酸化,

<400> 65
Glu Tyr Ile Pro Gly Gln Pro Pro Leu Ser Gln Ser Ser Asp Ser Ser
1 5 10 15

Pro Thr Arg

<210> 66
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 2+ EPRS肽

<400> 66
Glu Tyr Ile Pro Gly Gln Pro Pro Leu Ser Gln Ser Ser Asp Ser Ser
1 5 10 15

Pro Thr Arg

<210> 67
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 2+ EPRS肽

<400> 67
Asn Gln Gly Gly Gly Leu Ser Ser Ser Gly Ala Gly Glu Gly Gln Gly
1 5 10 15

Pro Lys

<210> 68
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 2+ EPRS肽

<220>
[0022] <221> MOD_RES
<222> (8)
<223> 磷酸化,

<400> 68
Asn Gln Gly Gly Gly Leu Ser Ser Ser Gly Ala Gly Glu Gly Gln Gly
1 5 10 15

Pro Lys

<210> 69
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 3+ EPRS肽

<400> 69
Lys Asp Pro Ser Lys Asn Gln Gly Gly Gly Leu Ser Ser Ser Gly Ala
1 5 10 15

Gly Glu Gly Gln Gly Pro Lys
20

<210> 70
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> 3+ EPRS肽

<220>
[0023] <221> MOD_RES
<222> (4)
<223> 磷酸化，

<400> 70
Lys Asp Pro Ser Lys Asn Gln Gly Gly Gly Leu Ser Ser Ser Gly Ala
1 5 10 15

Gly Glu Gly Gln Gly Pro Lys
20

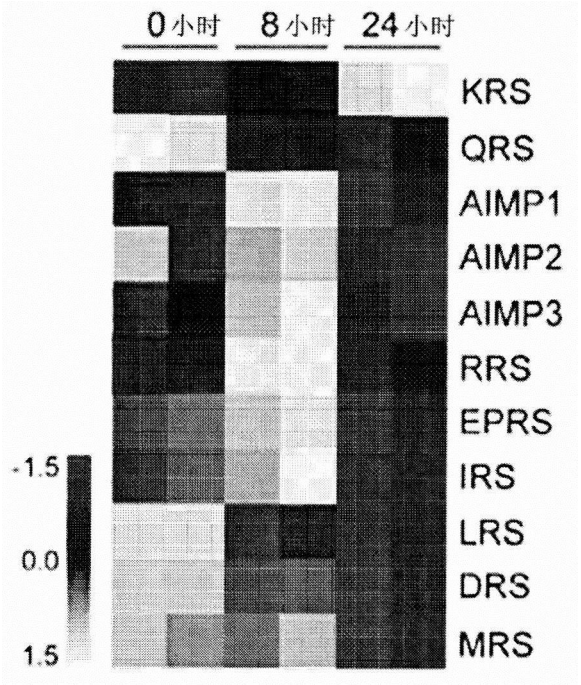

0小时
8小时
24小时
KRS
QRS
AIMP1
AIMP2
AIMP3
RRS
EPRS
IRS
LRS
DRS
MRS
-1.5
0.0
1.5

图1

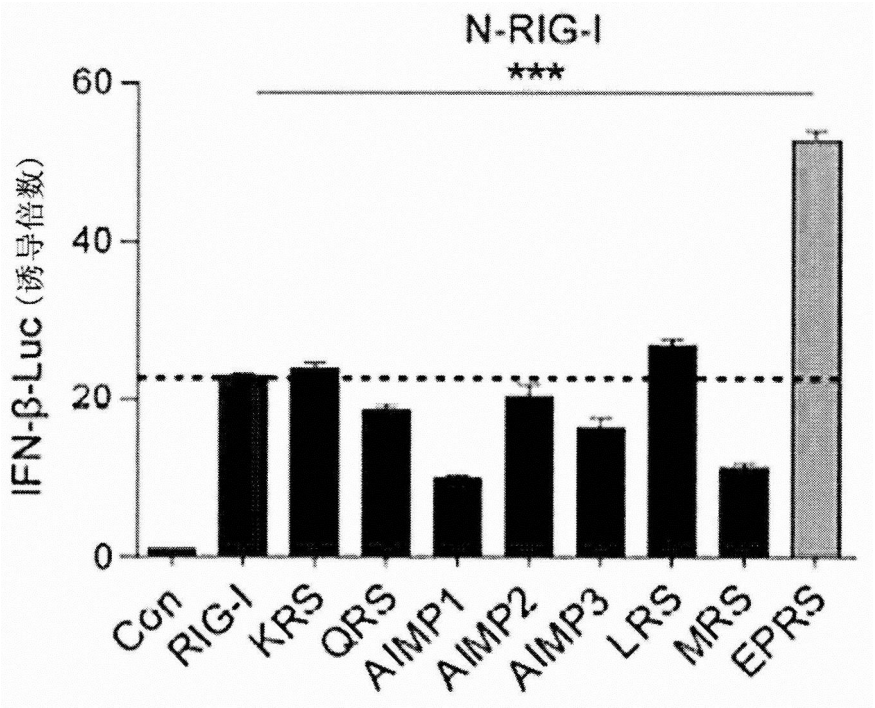

N-RIG-I
***
IFN-β-Luc (诱导倍数)
60
40
20
0
Con
RIG-I
KRS
QRS
AIMP1
AIMP2
AIMP3
LRS
MRS
EPRS

图2

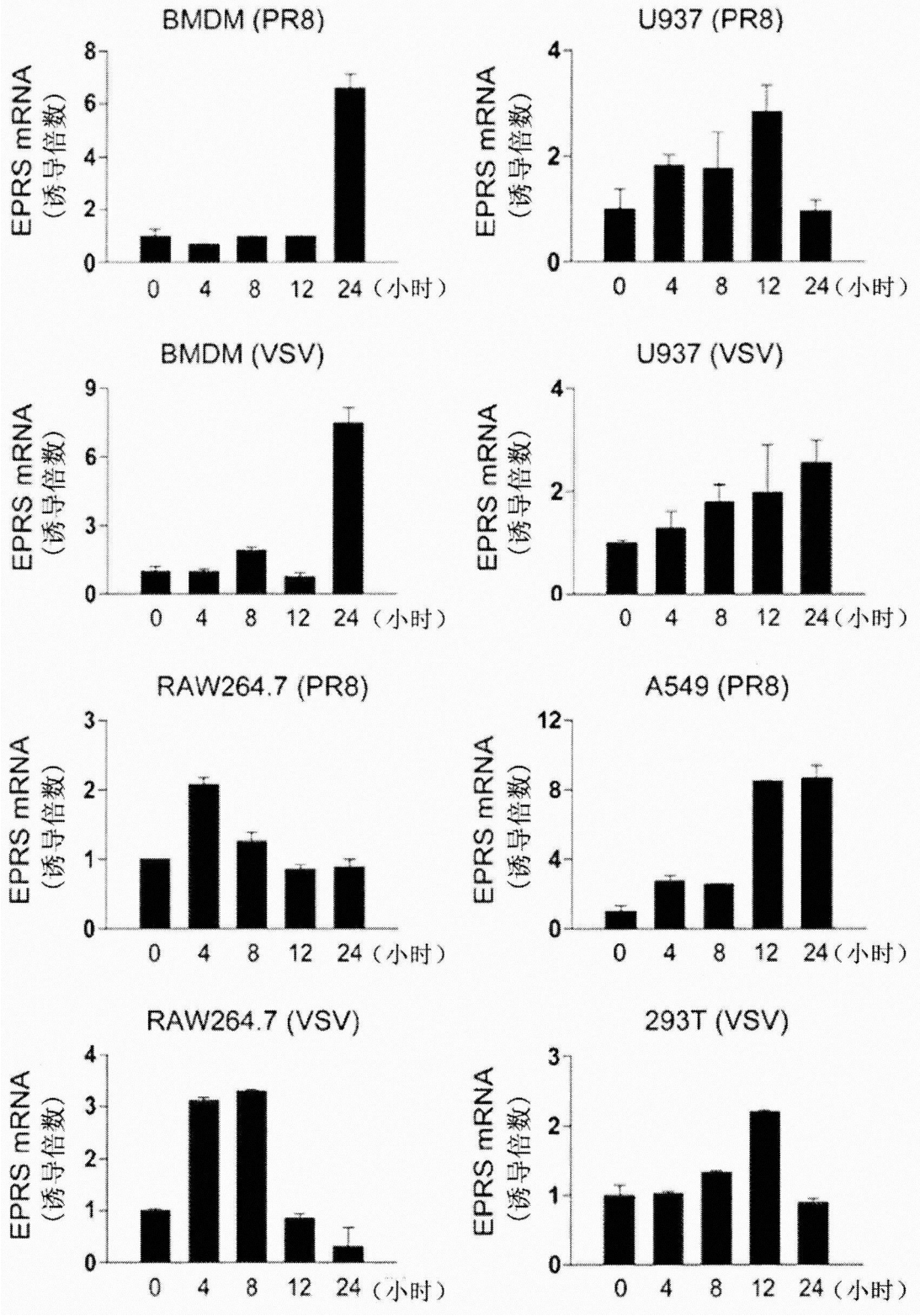

BMDM (PR8)
U937 (PR8)
BMDM (VSV)
U937 (VSV)
RAW264.7 (PR8)
A549 (PR8)
RAW264.7 (VSV)
293T (VSV)
EPRS mRNA
(诱导倍数)
0 4 8 12 24 (小时)

图3

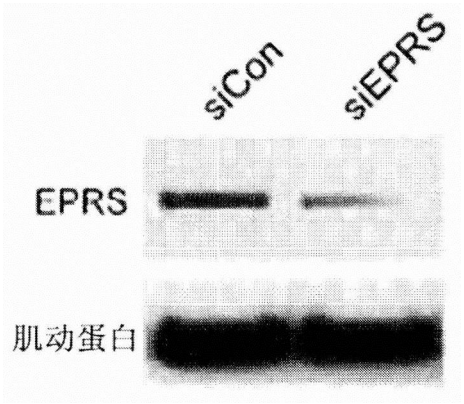


图4

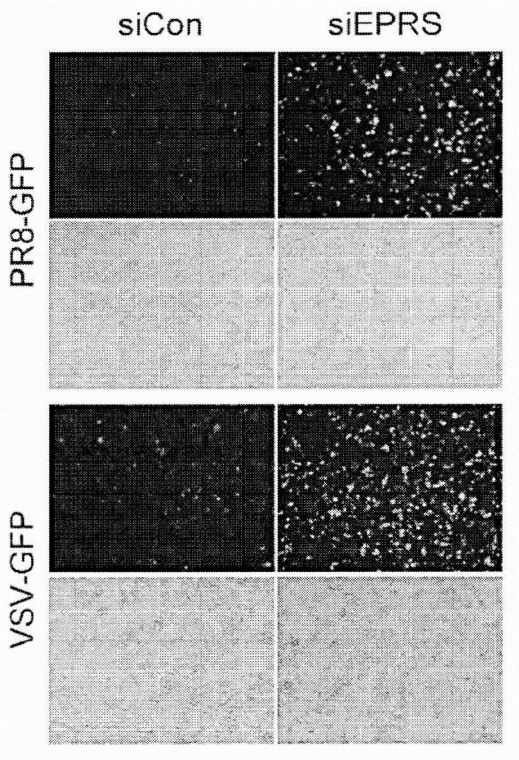


图5

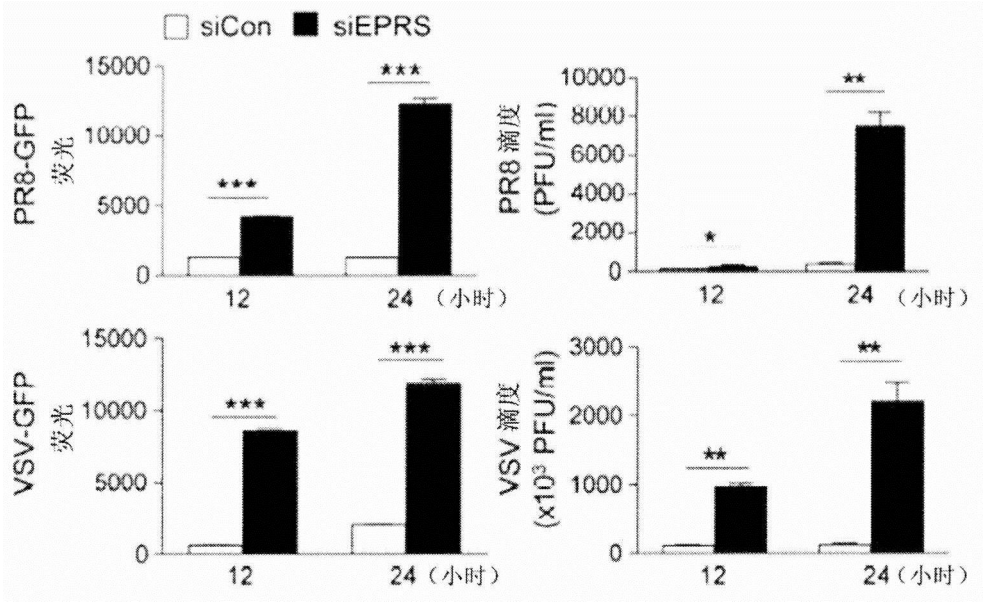

siCon
siEPRS
PR8-GFP 荧光
15000
10000
5000
0
12
24 （小时）
PR8 滴度 (PFU/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
VSV-GFP 荧光
VSV 滴度 (x10³ PFU/ml)
3000
2000
1000

图6

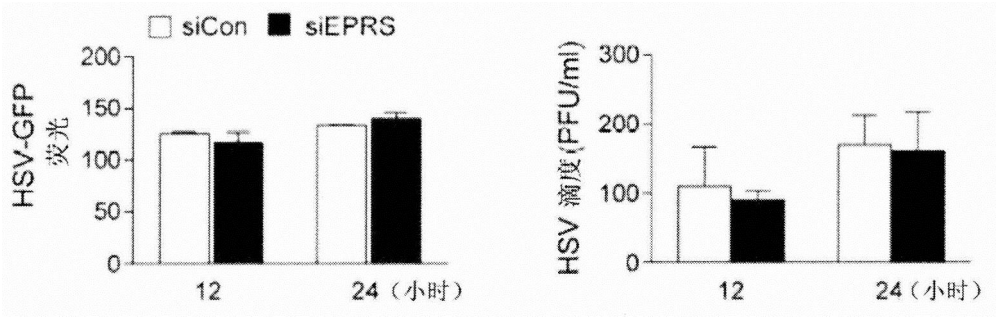

siCon
siEPRS
HSV-GFP 荧光
200
150
100
50
0
12
24（小时）
HSV 滴度(PFU/ml)
300
200
100

图7

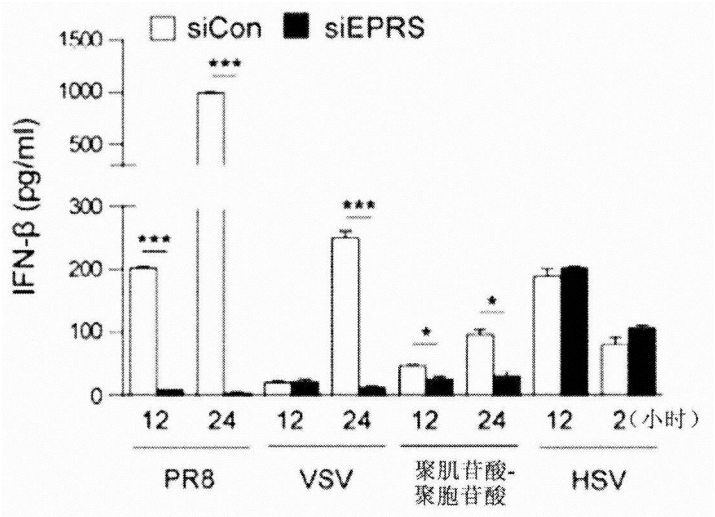

siCon
siEPRS
IFN-β (pg/ml)
1500
1000
500
300
200
100
0
12
24
2（小时）
PR8
VSV
聚肌苷酸-聚胞苷酸
HSV

图8

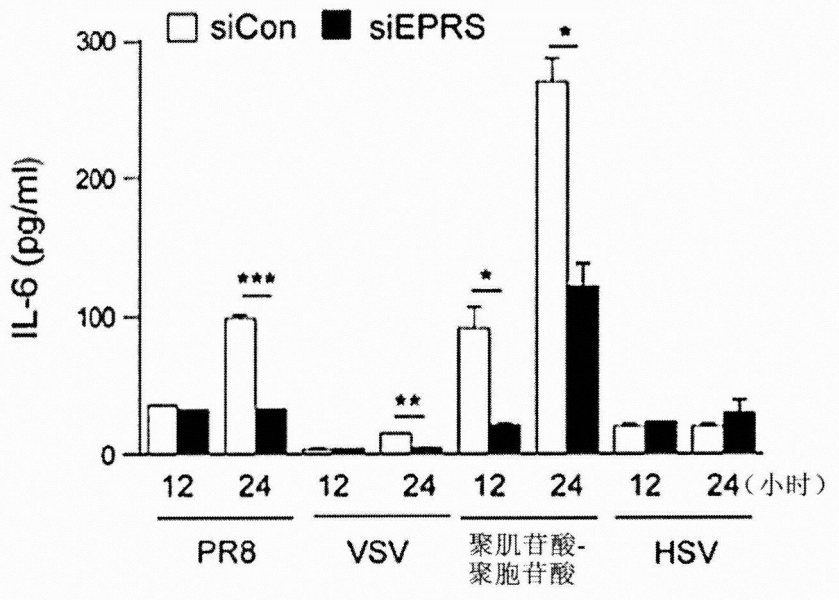

siCon
siEPRS
IL-6 (pg/ml)
300
200
100
0
***
**
*
*
12
24
12
24
12
24
12
24（小时）
PR8
VSV
聚肌苷酸-聚胞苷酸
HSV

图9

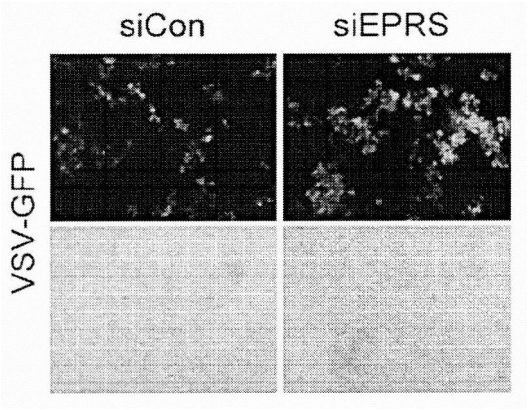

siCon
siEPRS
VSV-GFP

图10

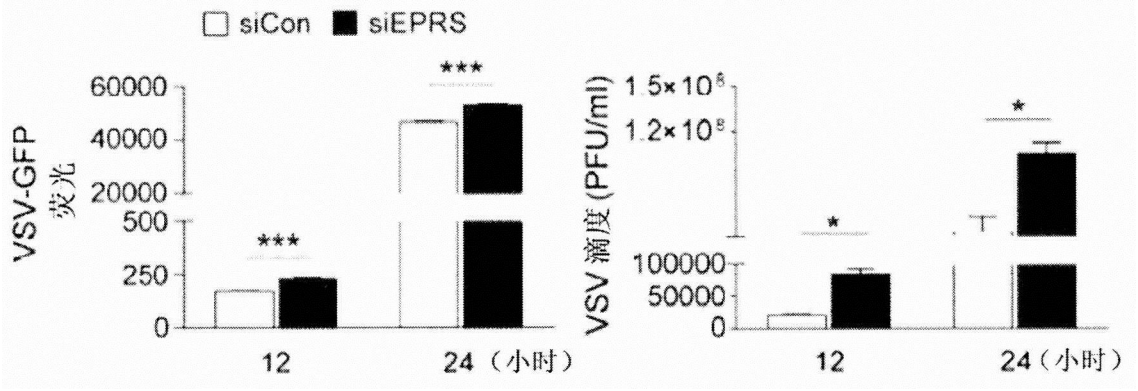

siCon
siEPRS
VSV-GFP 荧光
60000
40000
20000
500
250
0
***
***
12
24（小时）
VSV 滴度 (PFU/ml)
1.5×10⁶
1.2×10⁶
100000
50000
0
*
*
12
24（小时）

图11

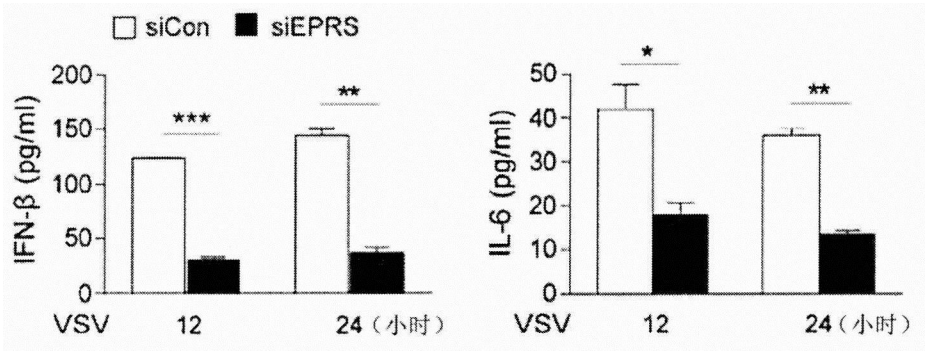


图12

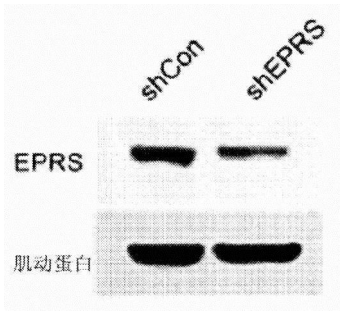


图13

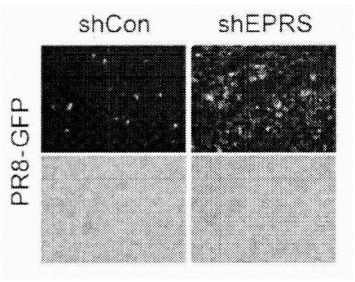


图14

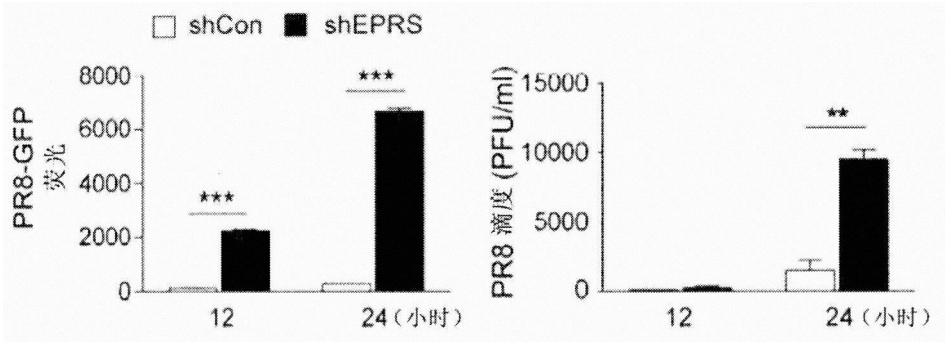


图15

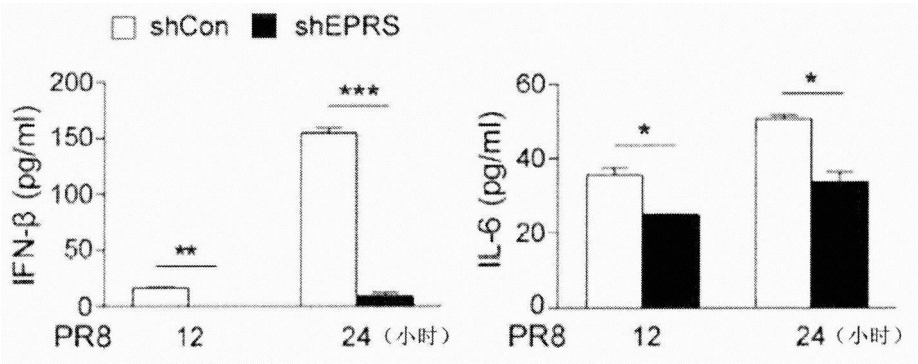

shCon
shEPRS
IFN-β (pg/ml)
200
150
100
50
0
**
***
PR8
12
24（小时）
IL-6 (pg/ml)
60
40
20
0
*
*
PR8
12
24（小时）

图16

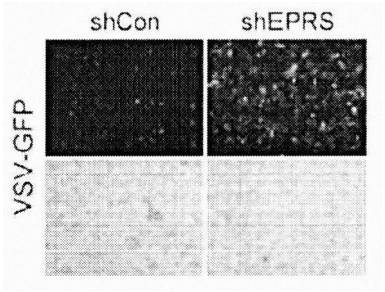

shCon
shEPRS
VSV-GFP

图17

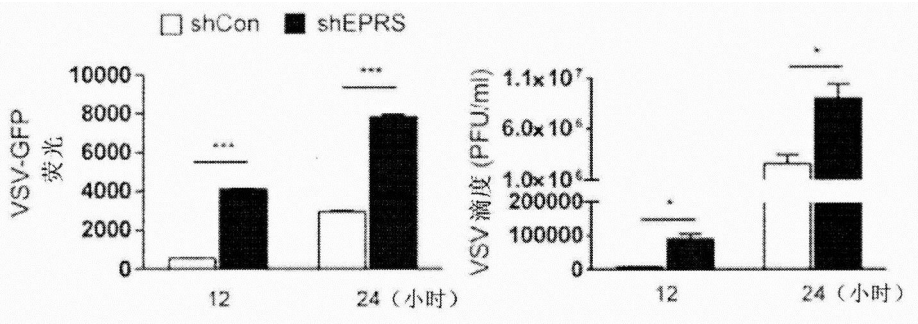

shCon
shEPRS
VSV-GFP 荧光
10000
8000
6000
4000
2000
0
***
***
12
24（小时）
VSV 滴度 (PFU/ml)
1.1×10⁷
6.0×10⁶
1.0×10⁶
200000
100000
0
*
*
12
24（小时）

图18

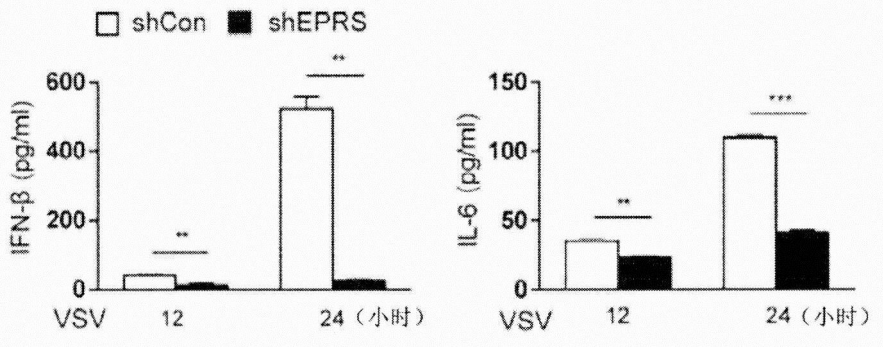

shCon
shEPRS
IFN-β (pg/ml)
600
400
200
0
VSV
12
24（小时）
IL-6 (pg/ml)
150
100
50
0
VSV
12
24（小时）

图19

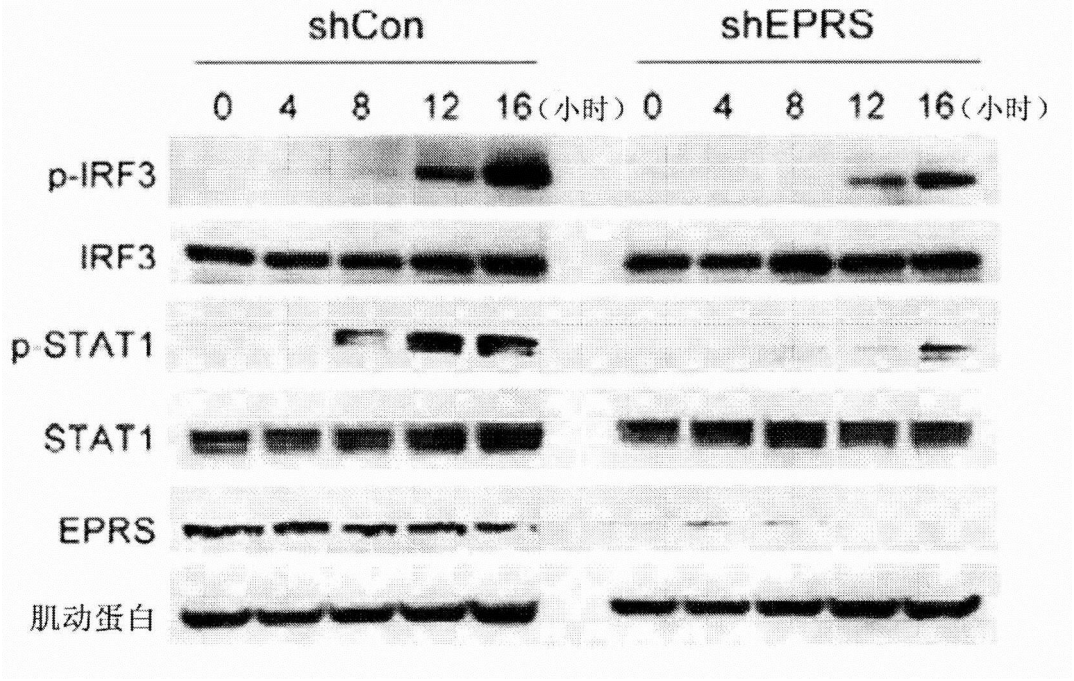

shCon
shEPRS
0 4 8 12 16（小时）
0 4 8 12 16（小时）
p-IRF3
IRF3
p STAT1
STAT1
EPRS
肌动蛋白

图20

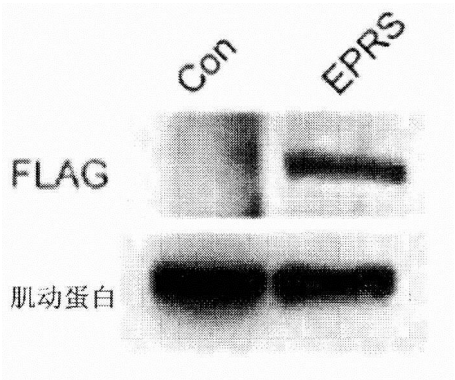

Con
EPRS
FLAG
肌动蛋白

图21

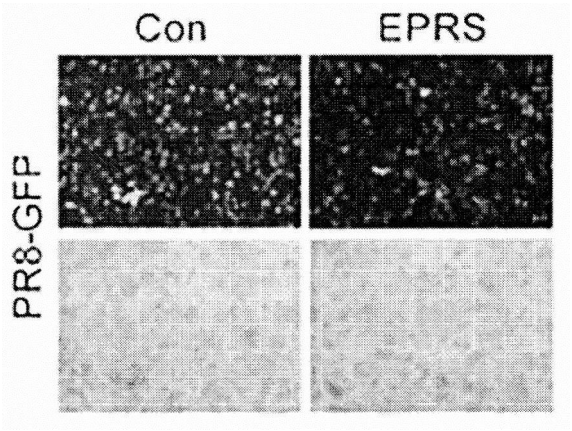

Con
EPRS
PR8-GFP

图22

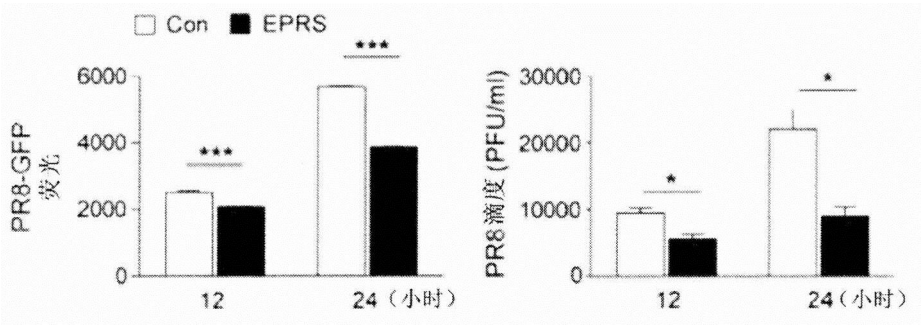

Con
EPRS
PR8-GFP 荧光
6000
4000
2000
0
12
24（小时）
PR8滴度 (PFU/ml)
30000
20000
10000
0
12
24（小时）

图23

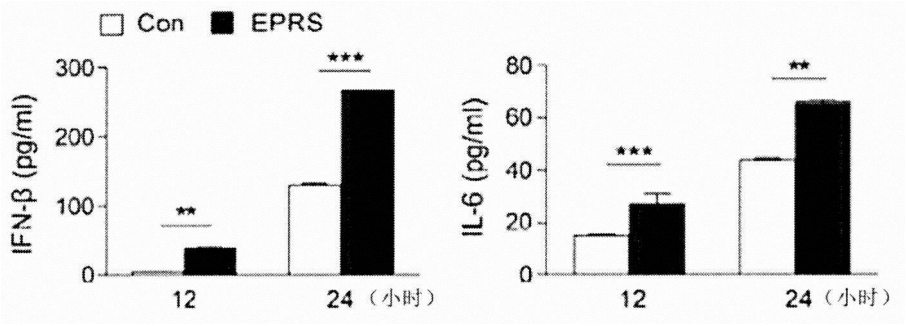

Con
EPRS
IFN-β (pg/ml)
300
200
100
0
12
24（小时）
IL-6 (pg/ml)
80
60
40
20
0
12
24（小时）

图24

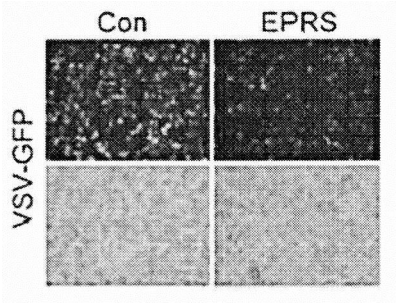

Con
EPRS
VSV-GFP

图25

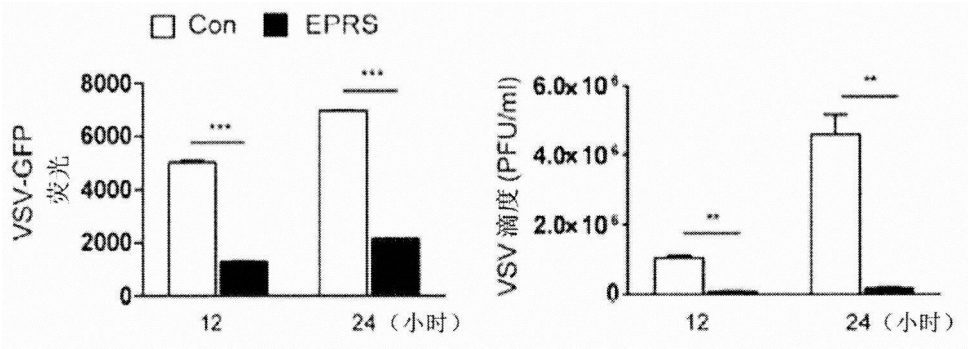

Con
EPRS
VSV-GFP
荧光
8000
6000
4000
2000
0
***
***
12
24（小时）
VSV 滴度 (PFU/ml)
6.0x10⁶
4.0x10⁶
2.0x10⁶
0
**
**
12
24（小时）

图26

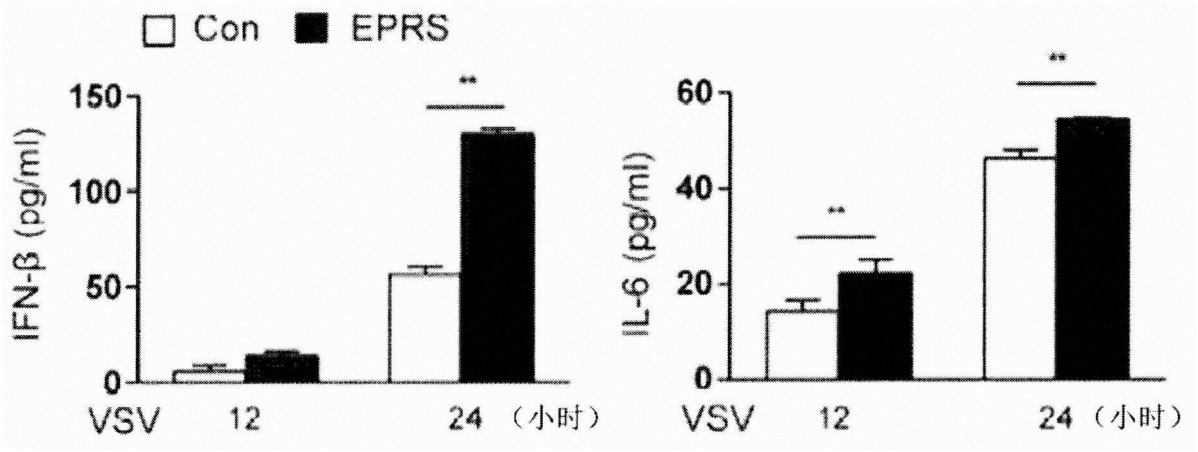

Con
EPRS
IFN-β (pg/ml)
150
100
50
0
**
VSV
12
24（小时）
IL-6 (pg/ml)
60
40
20
0
**
**
VSV
12
24（小时）

图27

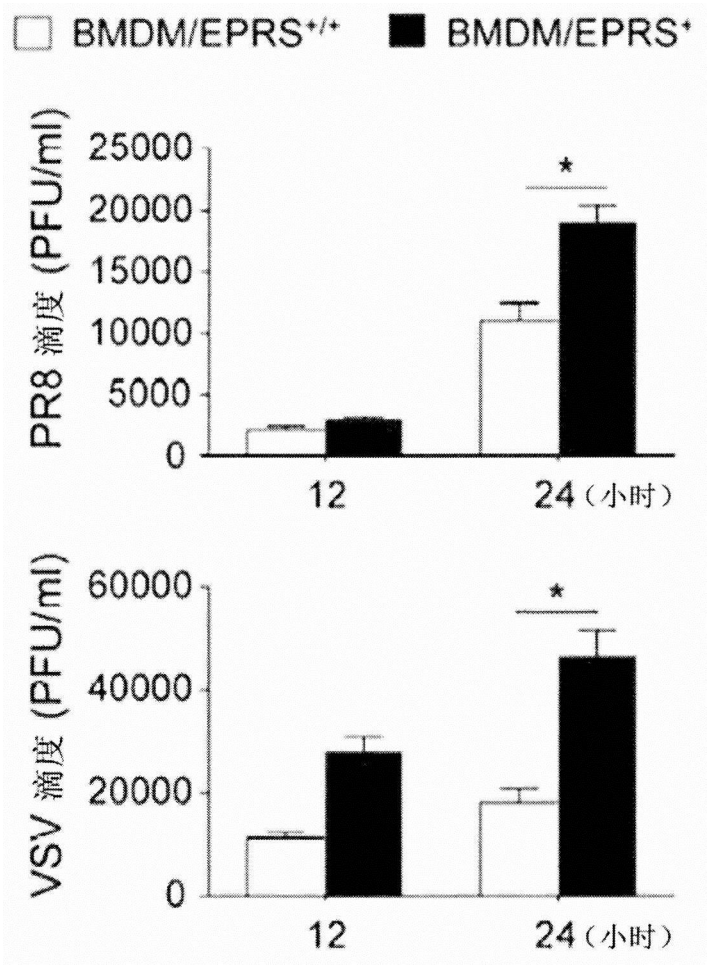

BMDM/EPRS+/+
BMDM/EPRS+
PR8 滴度 (PFU/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
12
24（小时）
*
VSV 滴度 (PFU/ml)
60000
40000
20000
0
12
24（小时）
*

图28

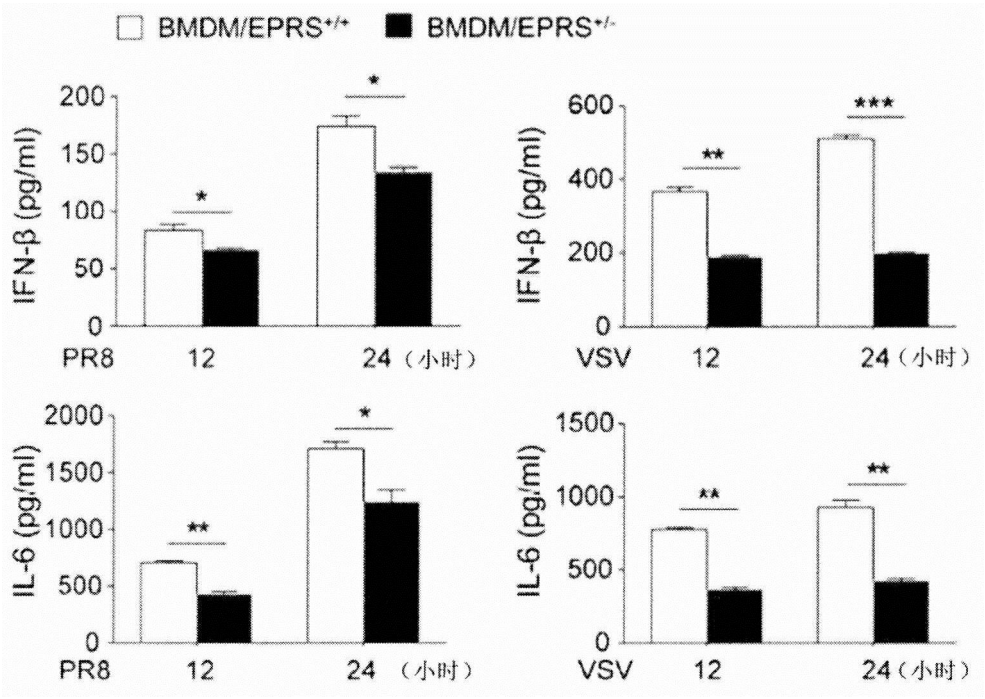

BMDM/EPRS+/+
BMDM/EPRS+/-
IFN-β (pg/ml)
IL-6 (pg/ml)
PR8
VSV
12
24（小时）

图29

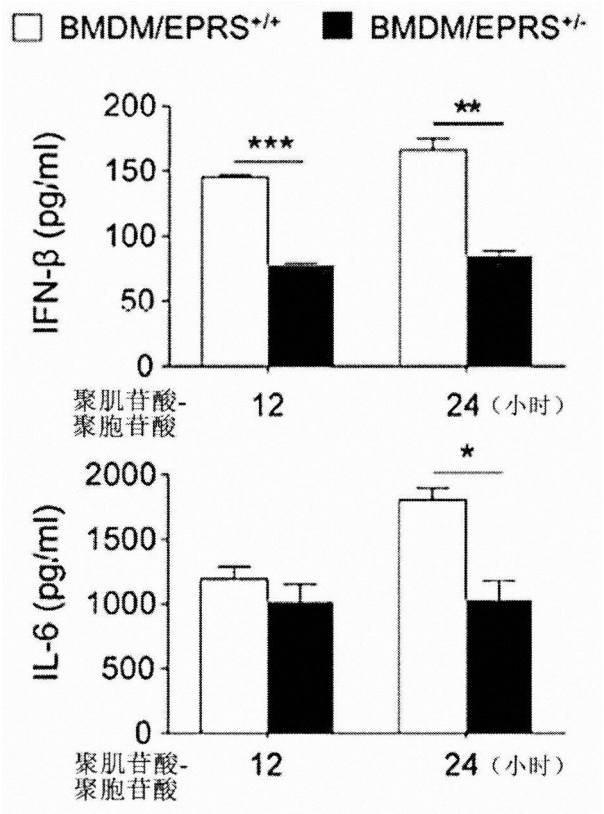

BMDM/EPRS+/+
BMDM/EPRS+/-
IFN-β (pg/ml)
IL-6 (pg/ml)
聚肌苷酸-聚胞苷酸
12
24（小时）

图30

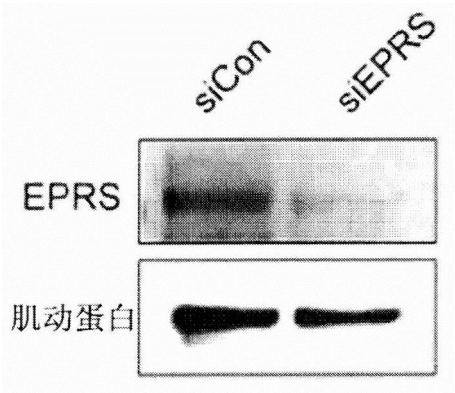

siCon
siEPRS
EPRS
肌动蛋白

图31

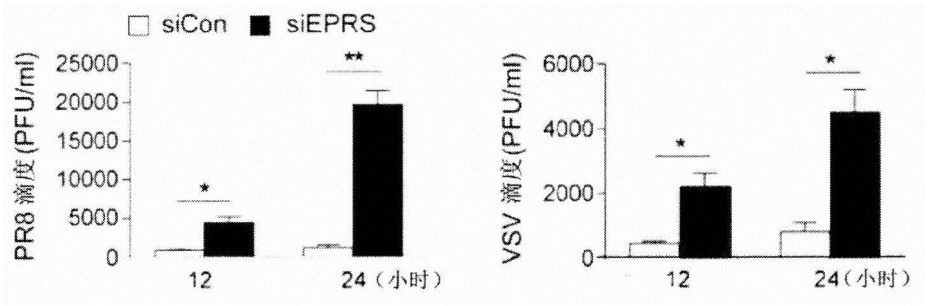

siCon
siEPRS
PR8 滴度(PFU/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
12
24（小时）
VSV 滴度(PFU/ml)
6000
4000
2000
0
12
24（小时）

图32

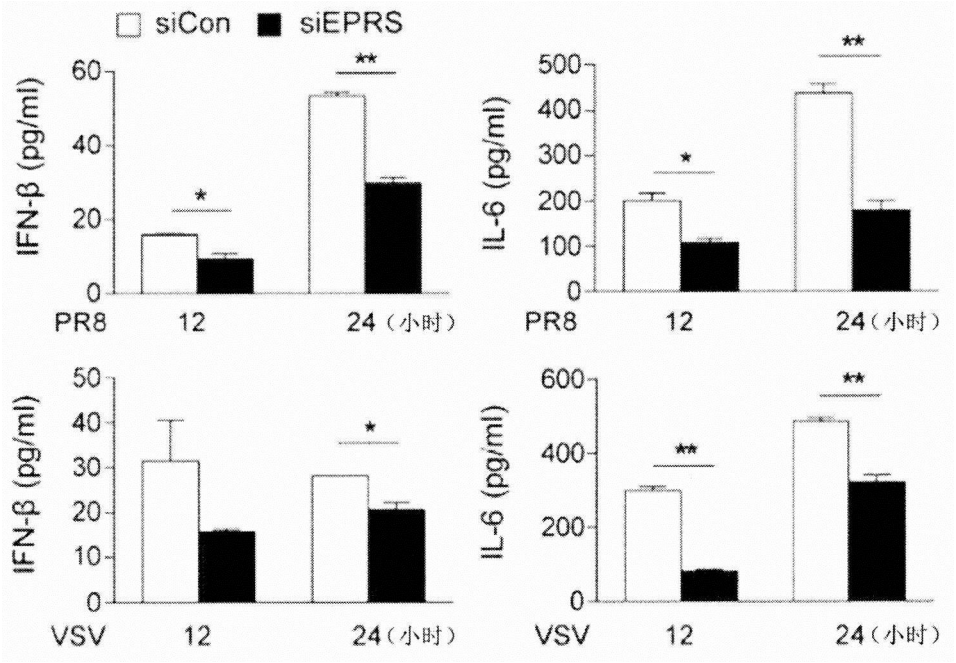

siCon
siEPRS
IFN-β (pg/ml)
PR8
12
24（小时）
IL-6 (pg/ml)
PR8
12
24（小时）
IFN-β (pg/ml)
VSV
12
24（小时）
IL-6 (pg/ml)
VSV
12
24（小时）

图33

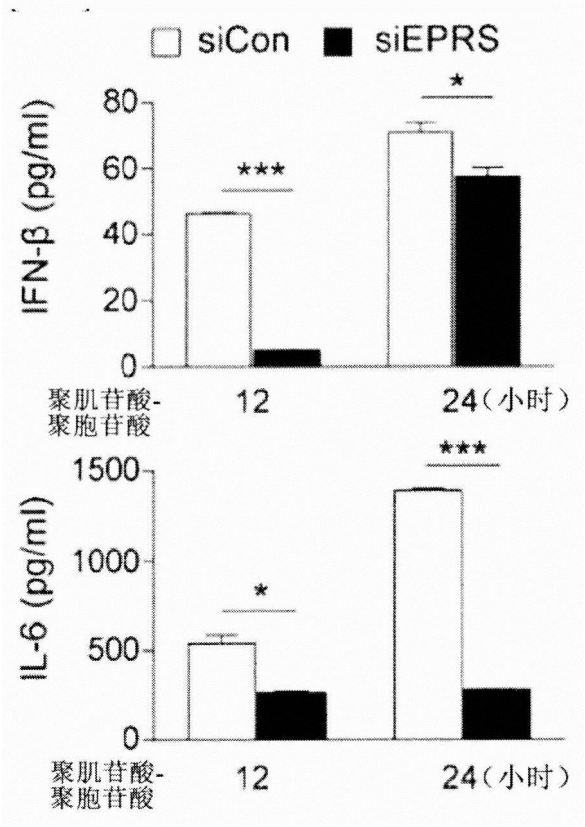

siCon
siEPRS
IFN-β (pg/ml)
80
60
40
20
0
***
*
聚肌苷酸-聚胞苷酸
12
24（小时）
IL-6 (pg/ml)
1500
1000
500
0
*
***
聚肌苷酸-聚胞苷酸
12
24（小时）

图34

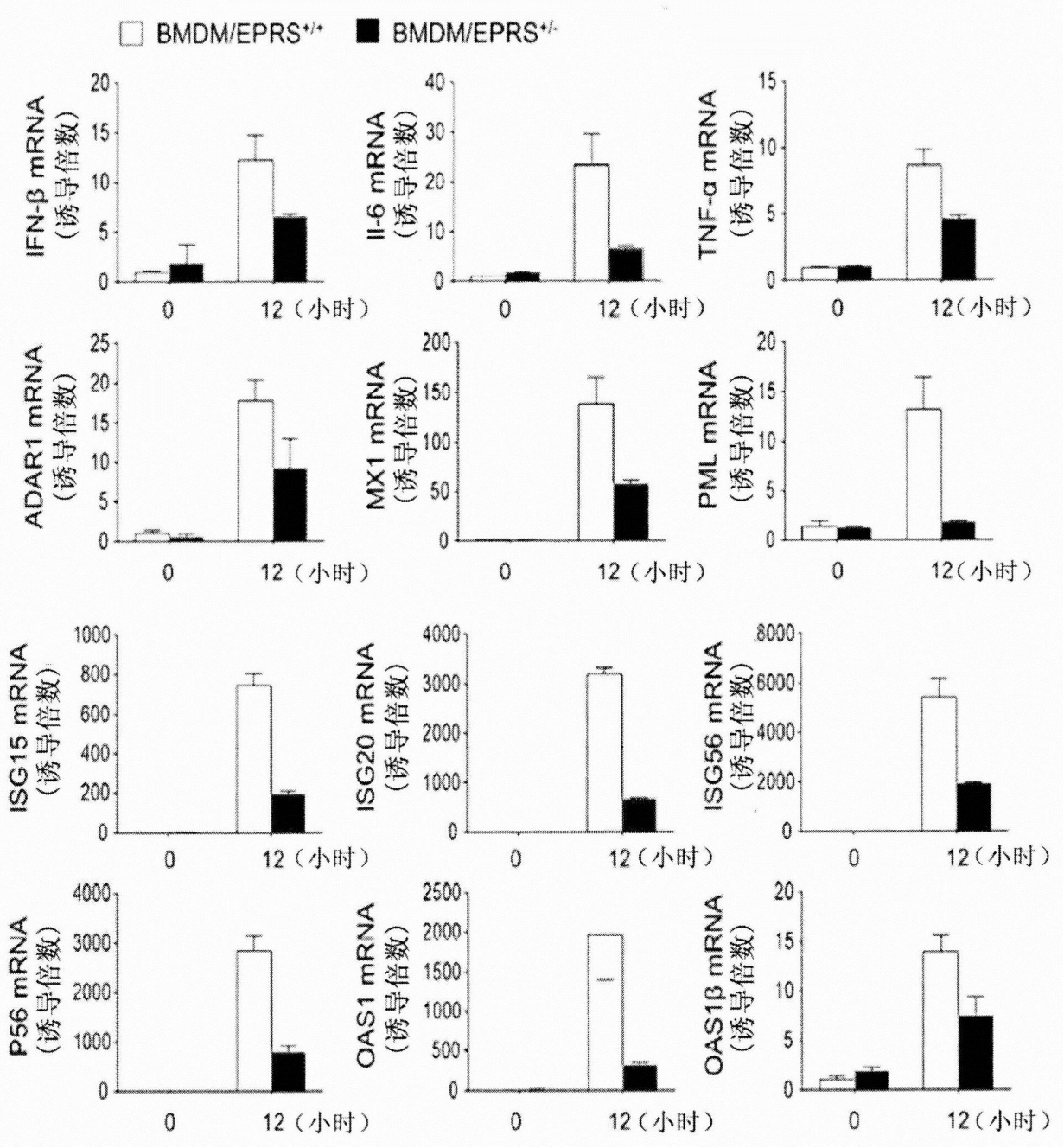

BMDM/EPRS+/+
BMDM/EPRS+/-
IFN-β mRNA (诱导倍数)
Il-6 mRNA (诱导倍数)
TNF-α mRNA (诱导倍数)
ADAR1 mRNA (诱导倍数)
MX1 mRNA (诱导倍数)
PML mRNA (诱导倍数)
ISG15 mRNA (诱导倍数)
ISG20 mRNA (诱导倍数)
ISG56 mRNA (诱导倍数)
P56 mRNA (诱导倍数)
OAS1 mRNA (诱导倍数)
OAS1β mRNA (诱导倍数)
0
12（小时）
12(小时)

图35

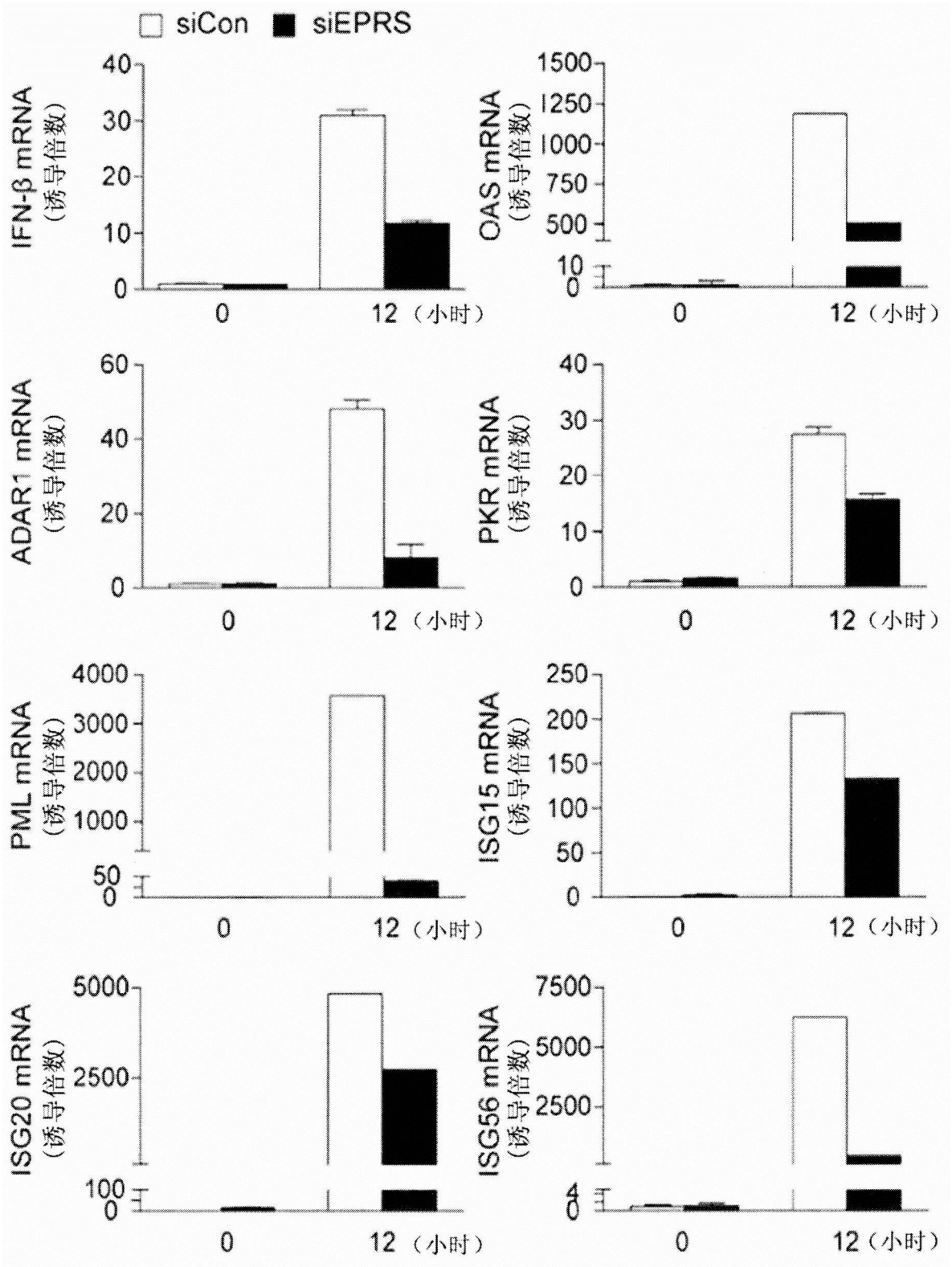

siCon
siEPRS
IFN-β mRNA (诱导倍数)
OAS mRNA (诱导倍数)
ADAR1 mRNA (诱导倍数)
PKR mRNA (诱导倍数)
PML mRNA (诱导倍数)
ISG15 mRNA (诱导倍数)
ISG20 mRNA (诱导倍数)
ISG56 mRNA (诱导倍数)
0
12 (小时)

图36

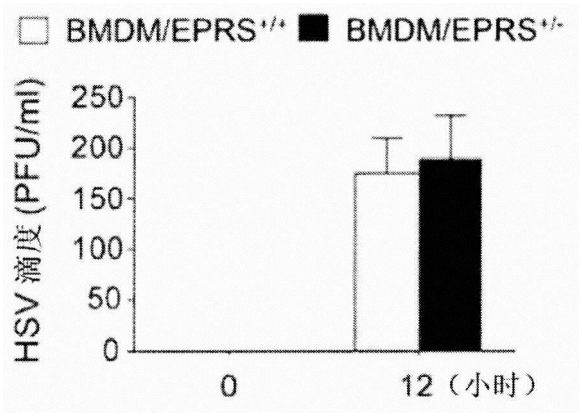

BMDM/EPRS+/+
BMDM/EPRS+/-
HSV 滴度 (PFU/ml)
250
200
150
100
50
0
0
12（小时）

图37

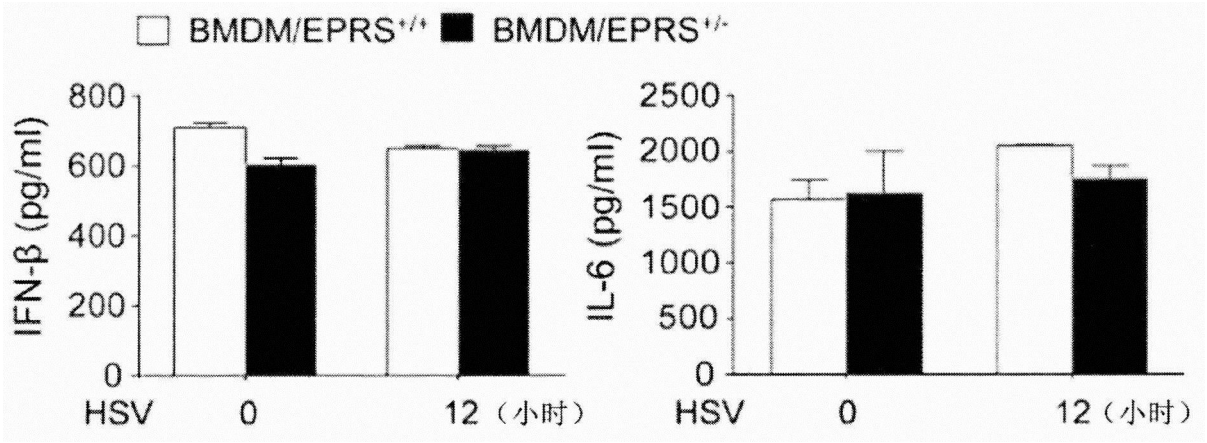

BMDM/EPRS+/+
BMDM/EPRS+/-
IFN-β (pg/ml)
800
600
400
200
0
HSV
0
12（小时）
IL-6 (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
HSV
0
12（小时）

图38

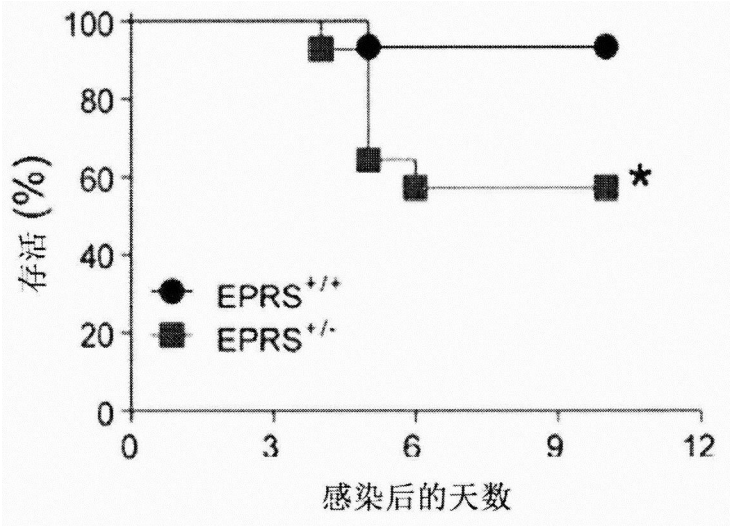

100
80
60
40
20
0
存活 (%)
EPRS+/+
EPRS+/-
*
0
3
6
9
12
感染后的天数

图39

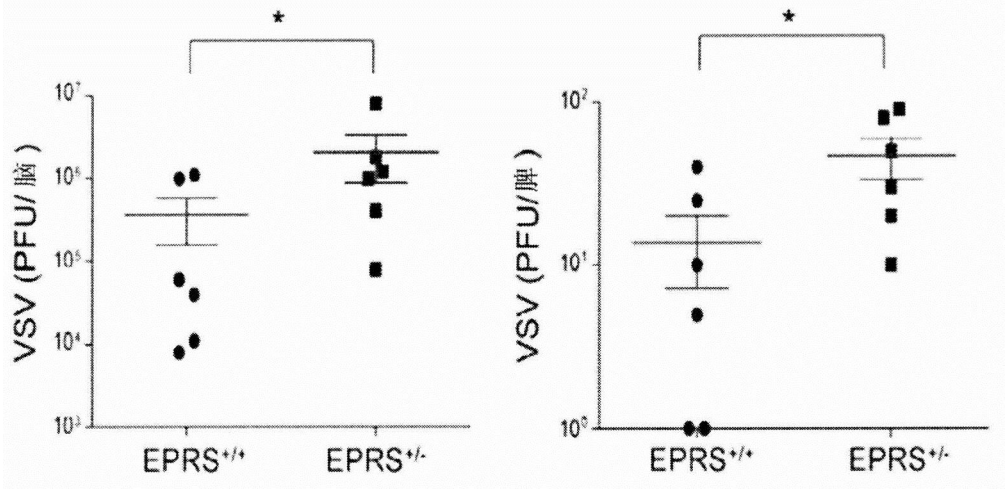

*
*
VSV (PFU/脑)
VSV (PFU/脾)
EPRS+/+
EPRS+/-
EPRS+/+
EPRS+/-

图40

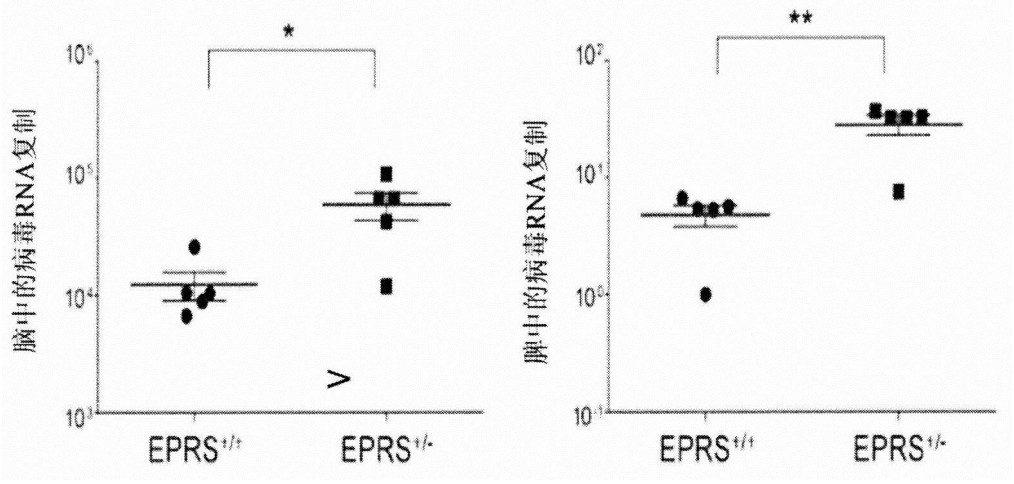

*
**
脑中的病毒RNA复制
脾中的病毒RNA复制
EPRS+/+
EPRS+/-
EPRS+/+
EPRS+/-

图41

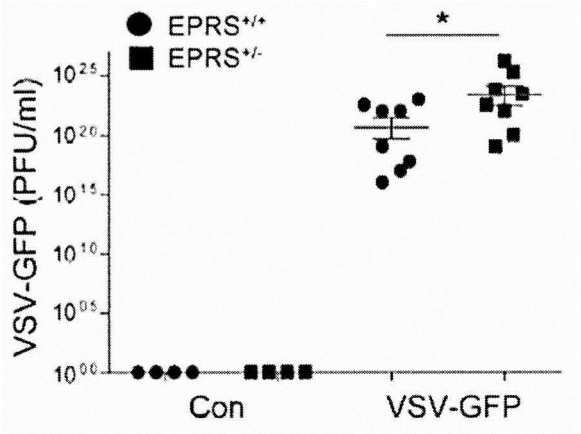

EPRS+/+
EPRS+/-
*
VSV-GFP (PFU/ml)
Con
VSV-GFP

图42

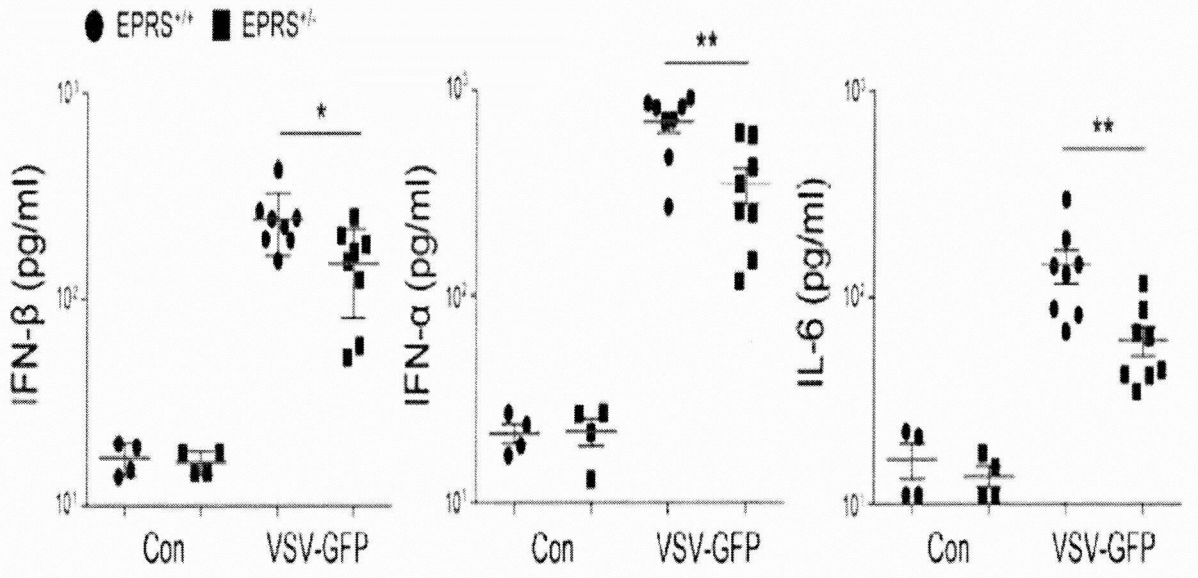

EPRS+/+
EPRS+/-
IFN-β (pg/ml)
IFN-α (pg/ml)
IL-6 (pg/ml)
*
**
**
Con
VSV-GFP
Con
VSV-GFP
Con
VSV-GFP

图43

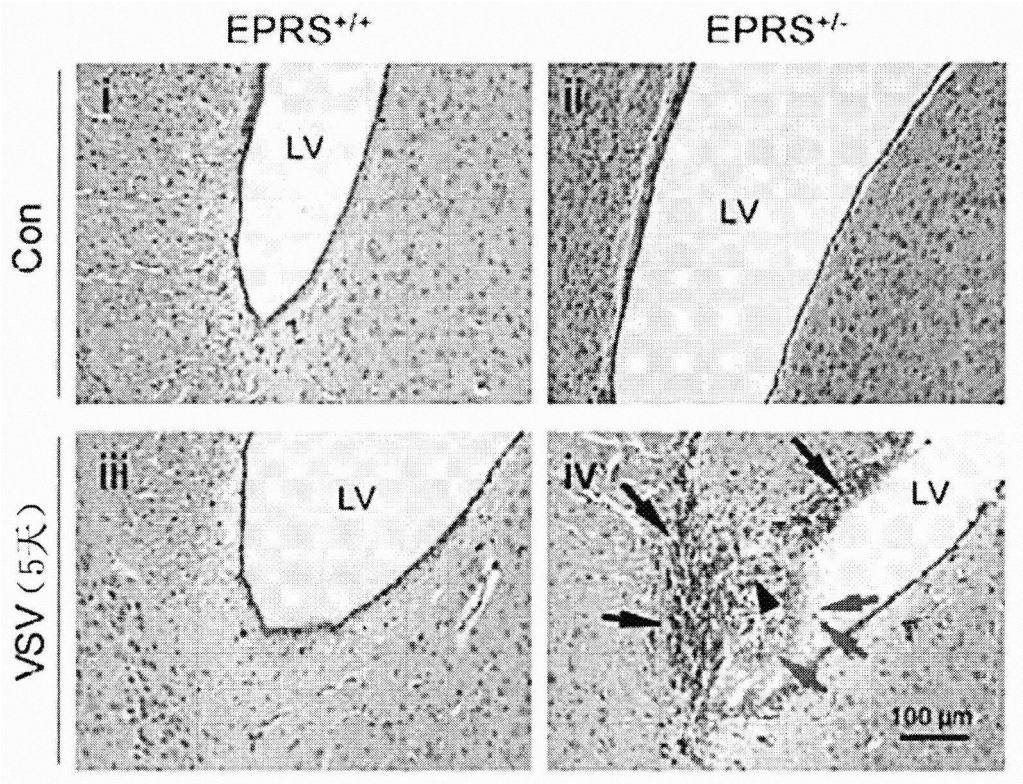

EPRS+/+
EPRS+/-
Con
VSV（5天）
i
ii
iii
iv
LV
LV
LV
LV
100 μm

图44

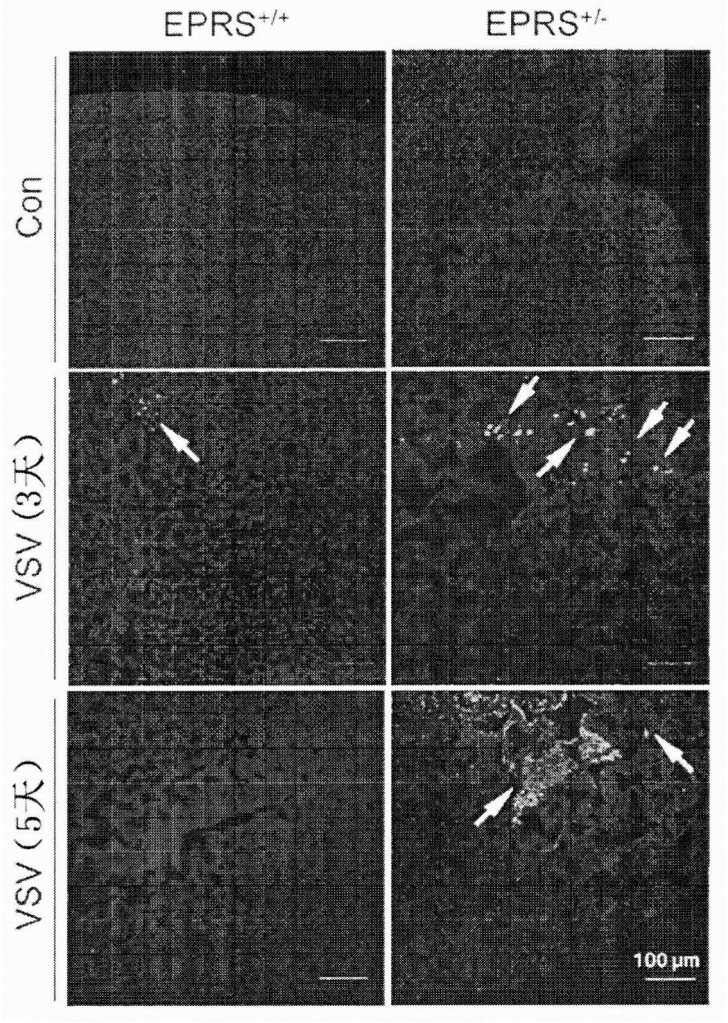


图45

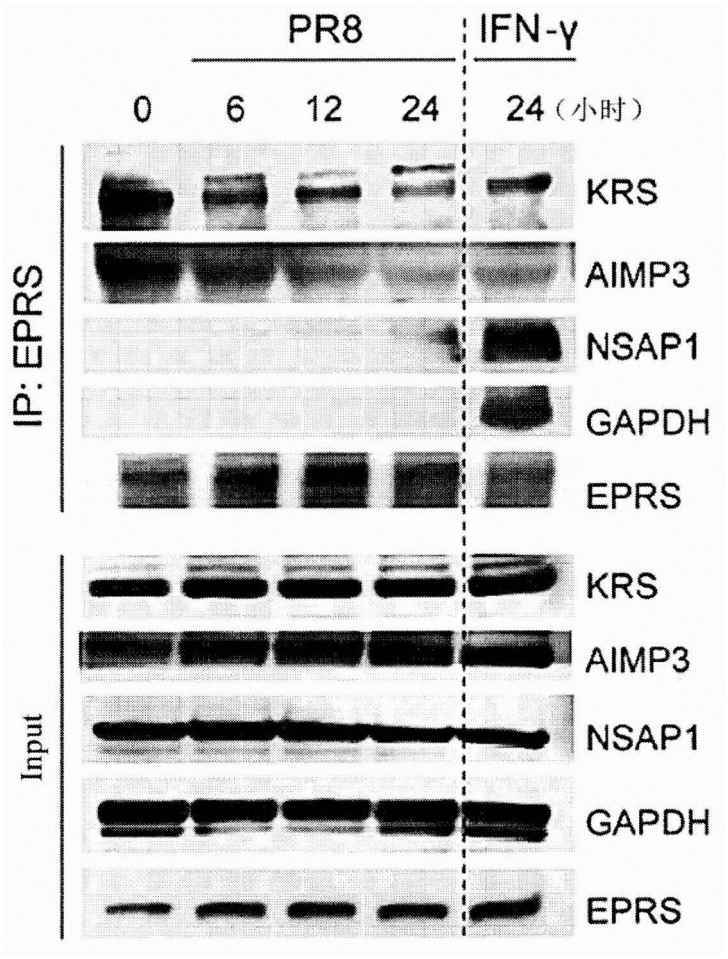

PR8
IFN-γ
0
6
12
24
24（小时）
IP: EPRS
KRS
AIMP3
NSAP1
GAPDH
EPRS
Input
KRS
AIMP3
NSAP1
GAPDH
EPRS

图46

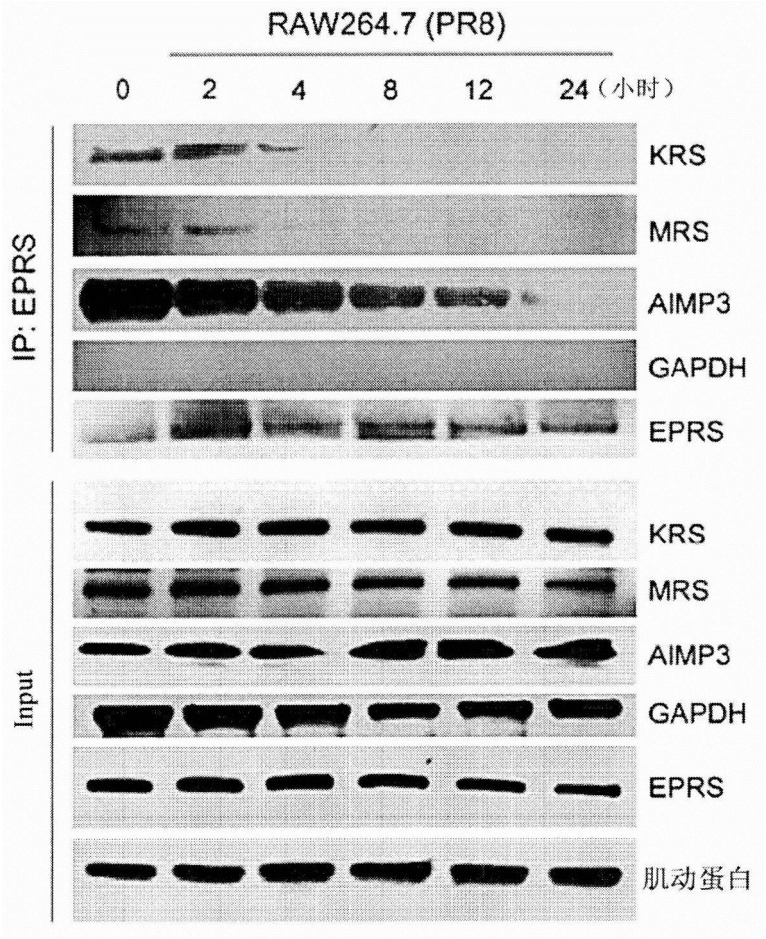

RAW264.7 (PR8)
0
2
4
8
12
24（小时）
IP: EPRS
KRS
MRS
AIMP3
GAPDH
EPRS
Input
KRS
MRS
AIMP3
GAPDH
EPRS
肌动蛋白

图47

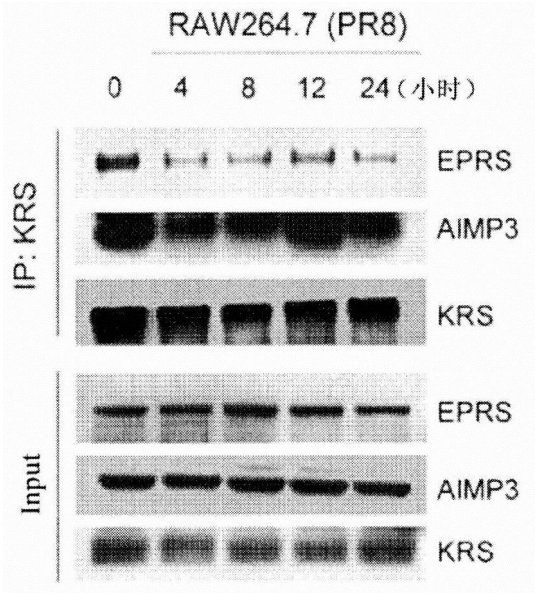

RAW264.7 (PR8)
0
4
8
12
24（小时）
IP: KRS
EPRS
AIMP3
KRS
Input
EPRS
AIMP3
KRS

图48

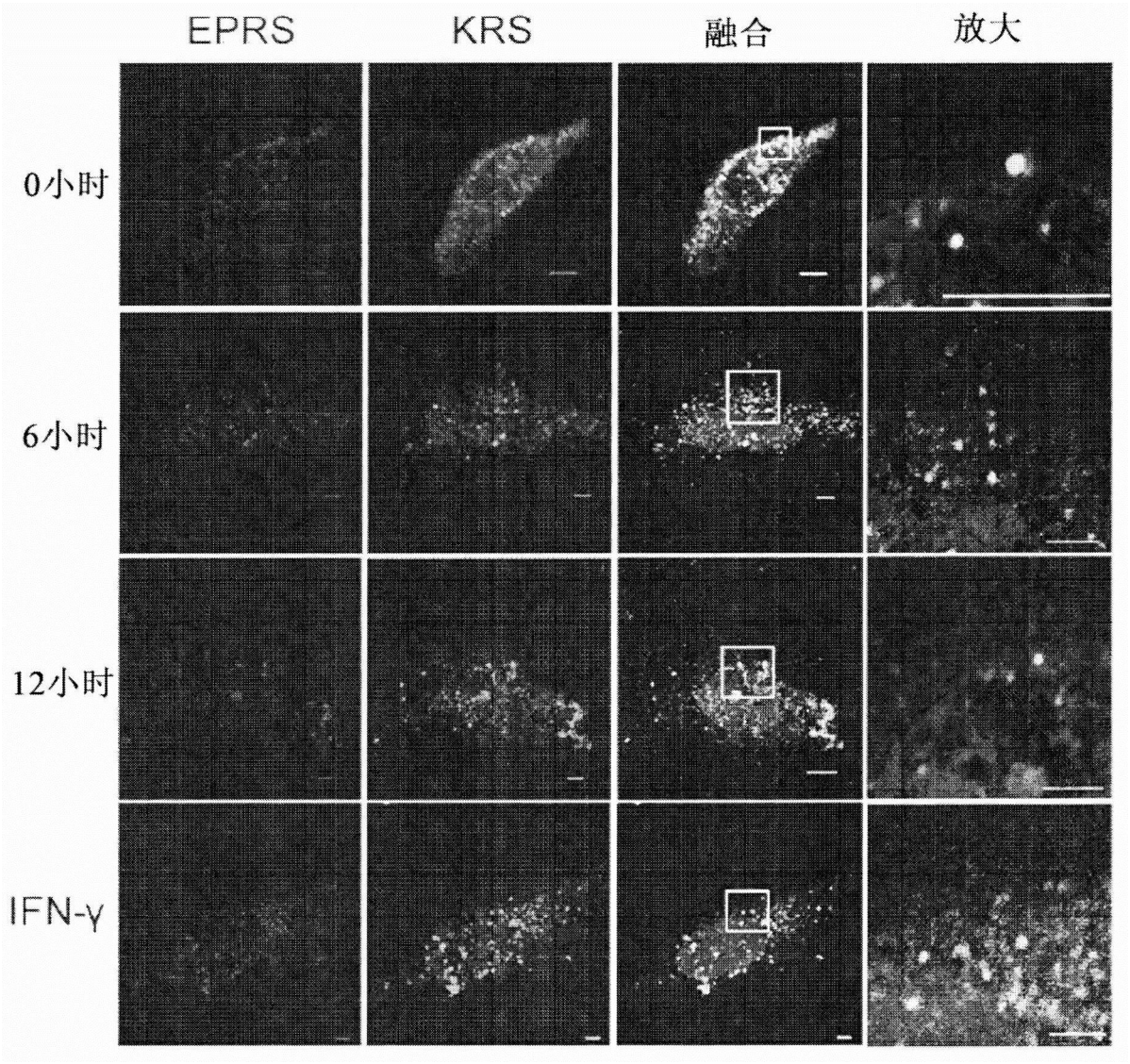

EPRS
KRS
融合
放大
0小时
6小时
12小时
IFN-γ

图49

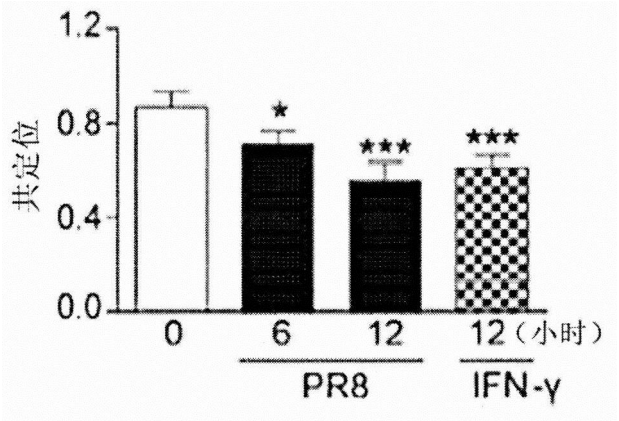

1.2
0.8
0.4
0.0
共定位
*
***
***
0
6
12
12（小时）
PR8
IFN-γ

图50

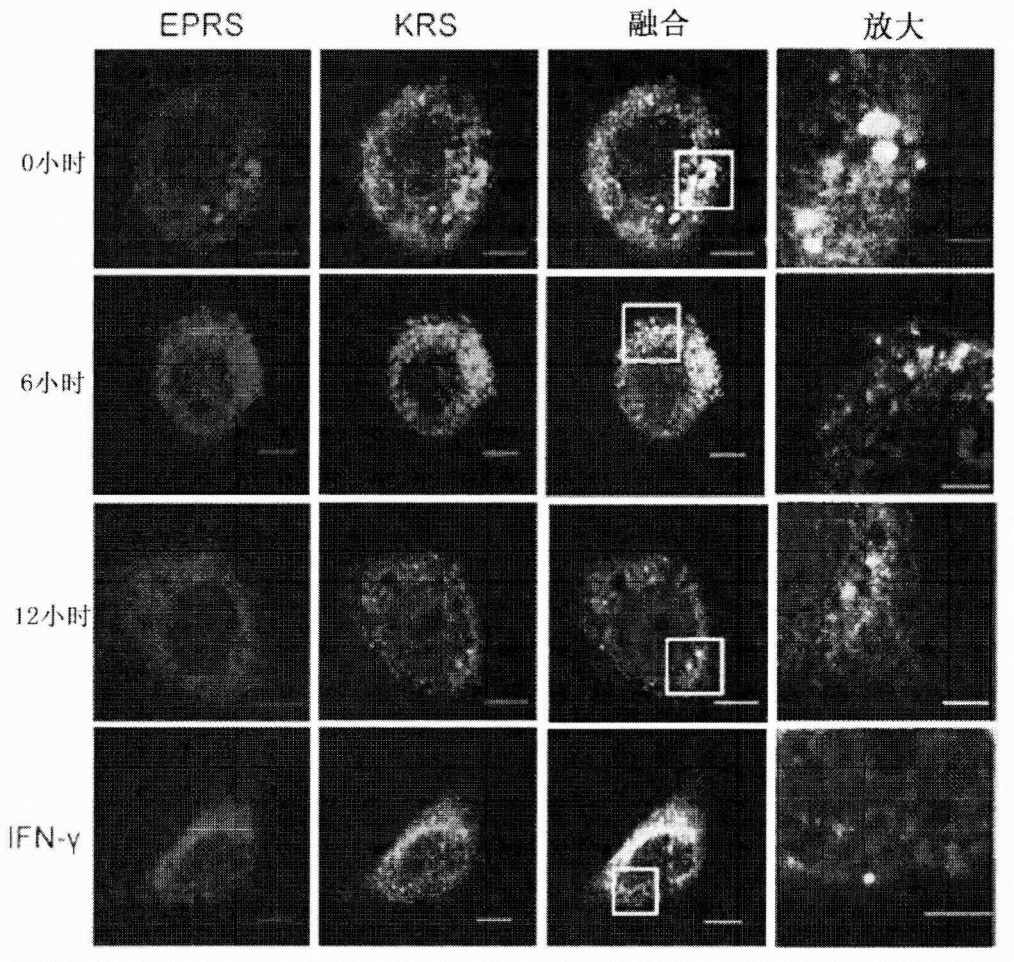

EPRS
KRS
融合
放大
0小时
6小时
12小时
IFN-γ

图51

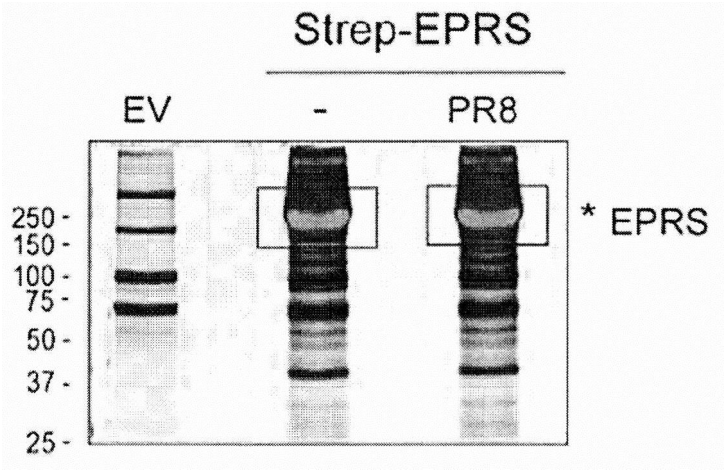

Strep-EPRS
EV
-
PR8
250 -
150 -
100 -
75 -
50 -
37 -
25 -
* EPRS

图52

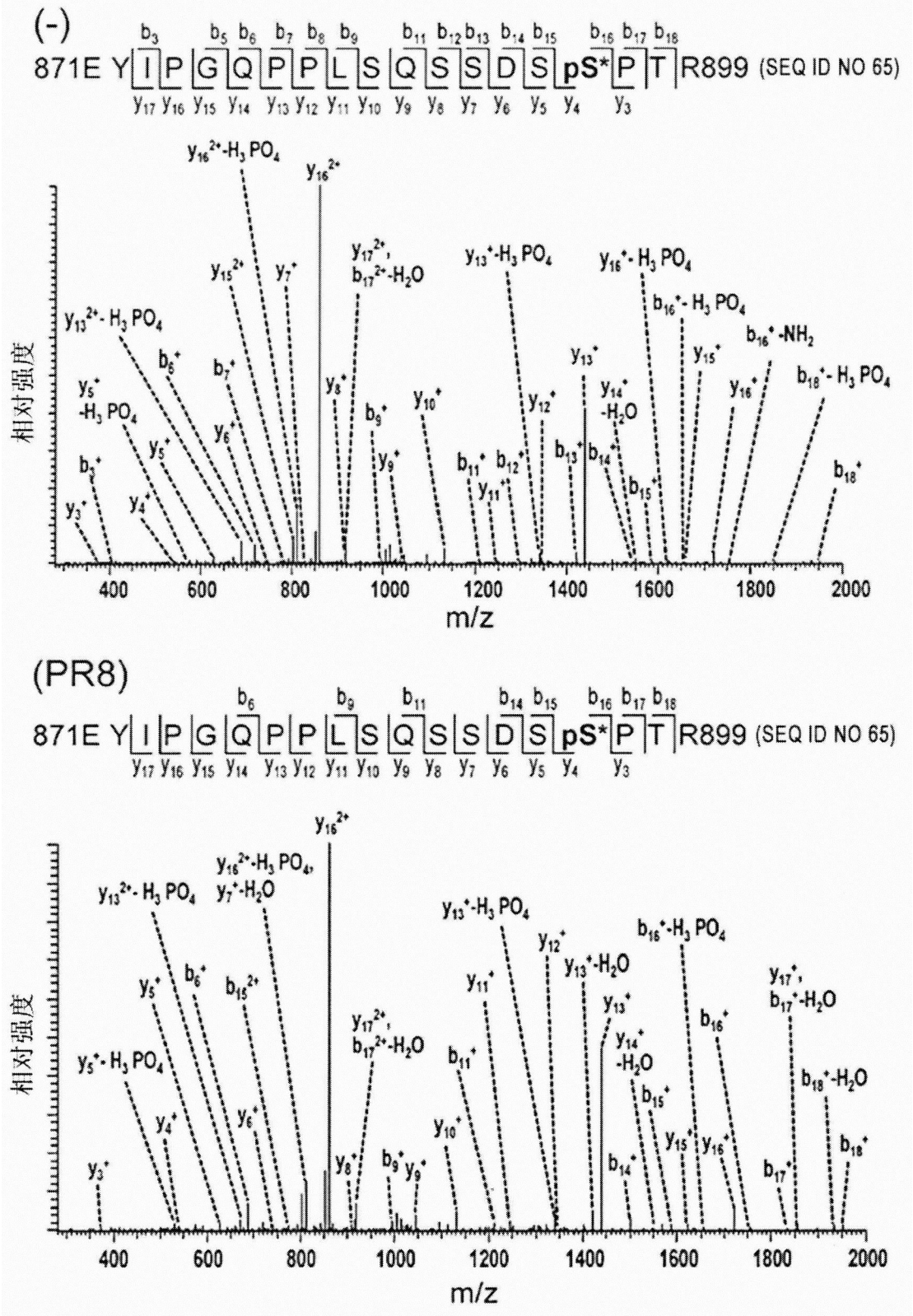

(-)
871E YIPGQPPLSQSSDSpS*PTR899 (SEQ ID NO 65)
相对强度
m/z
(PR8)
871E YIPGQPPLSQSSDSpS*PTR899 (SEQ ID NO 65)
相对强度
m/z

图53

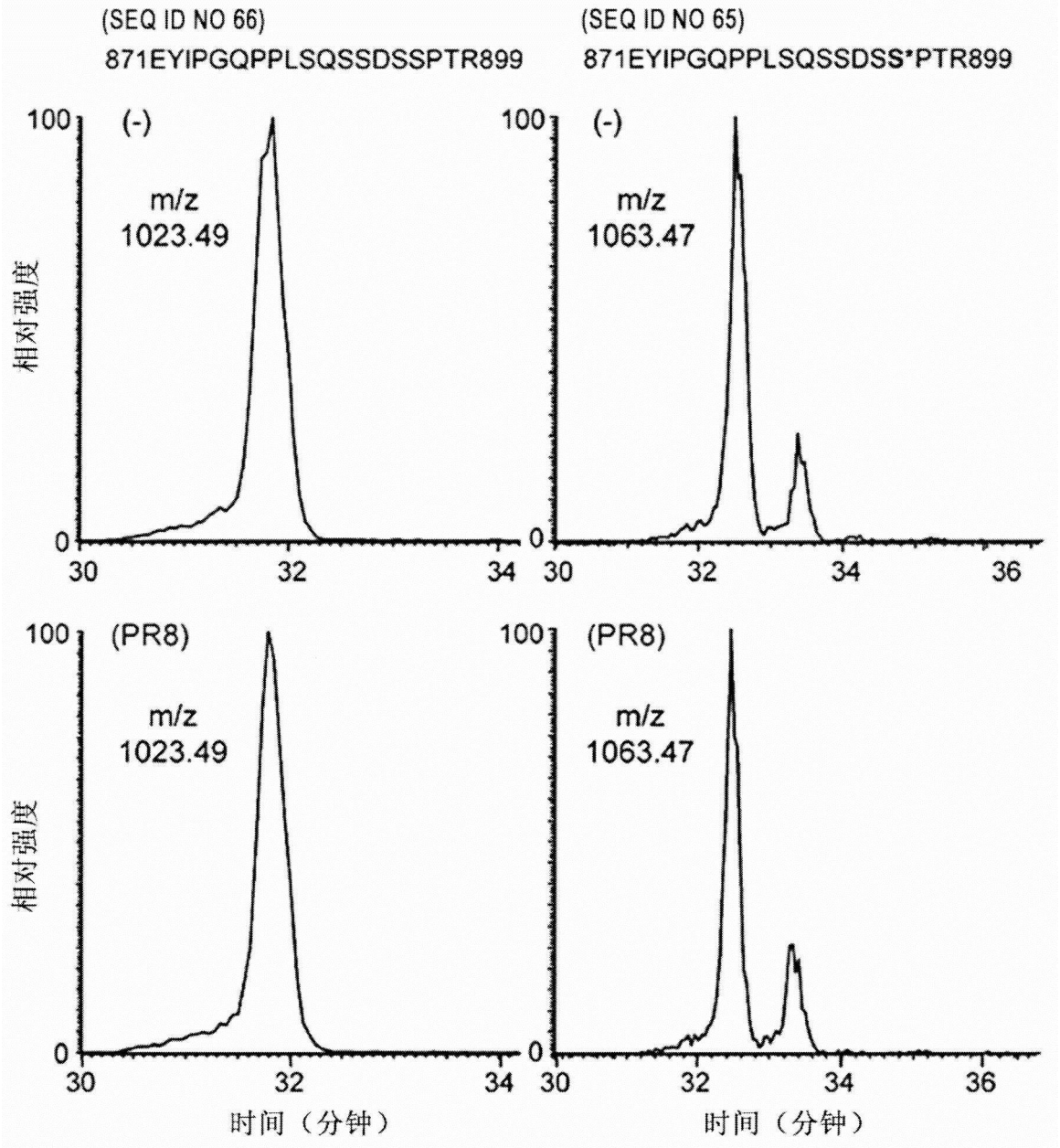

(SEQ ID NO 66)
871EYIPGQPPLSQSSDSSPTR899
(SEQ ID NO 65)
871EYIPGQPPLSQSSDSS*PTR899
100
(-)
m/z
1023.49
100
(-)
m/z
1063.47
相对强度
0
30
32
34
36
100
(PR8)
m/z
1023.49
100
(PR8)
m/z
1063.47
相对强度
时间（分钟）
时间（分钟）

图54

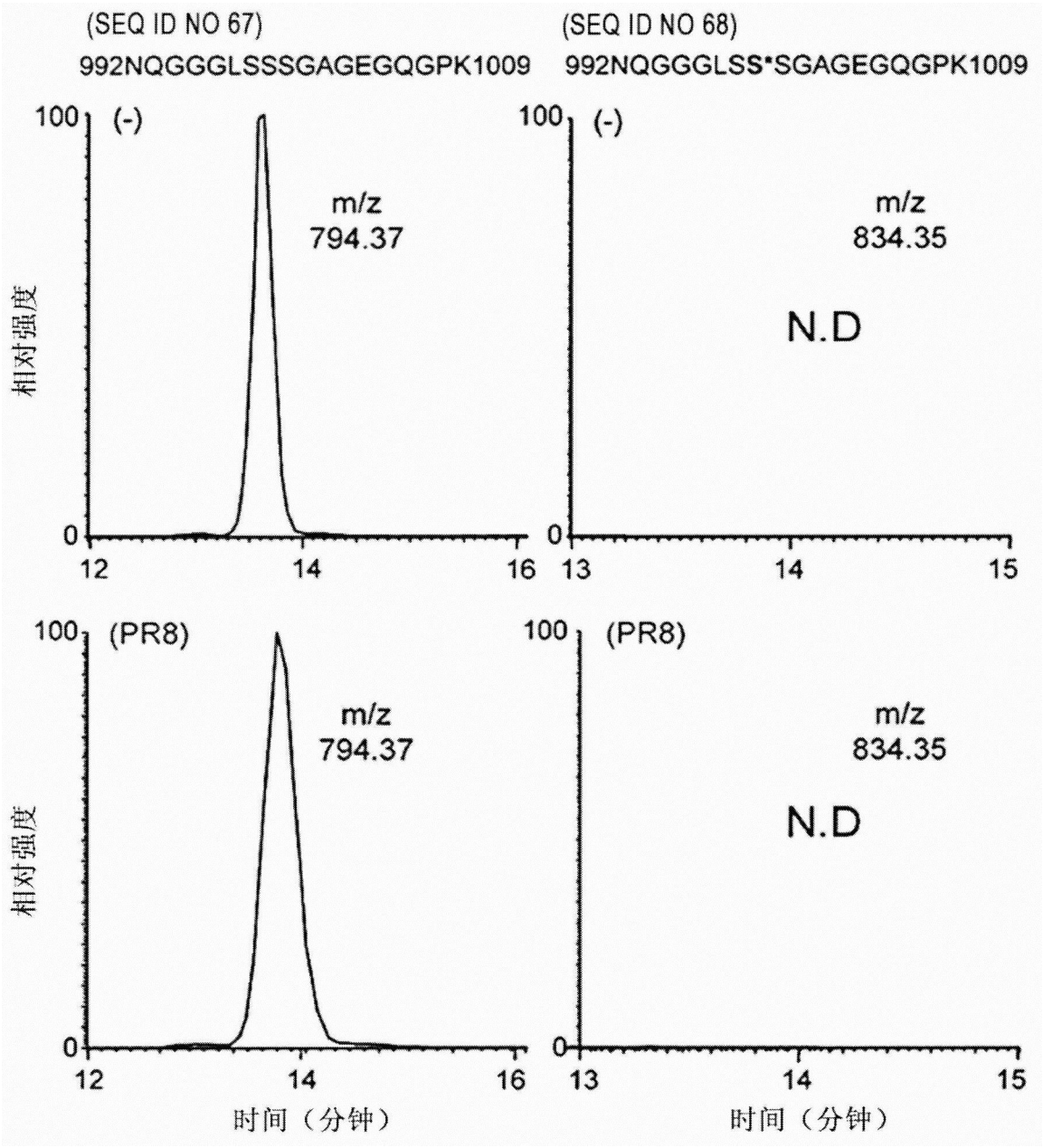

(SEQ ID NO 67)
992NQGGGLSSSGAGEGQGPK1009
(SEQ ID NO 68)
992NQGGGLSS*SGAGEGQGPK1009
100
(-)
m/z
794.37
m/z
834.35
N.D
0
12
14
16
13
15
相对强度
(PR8)
时间（分钟）

图55

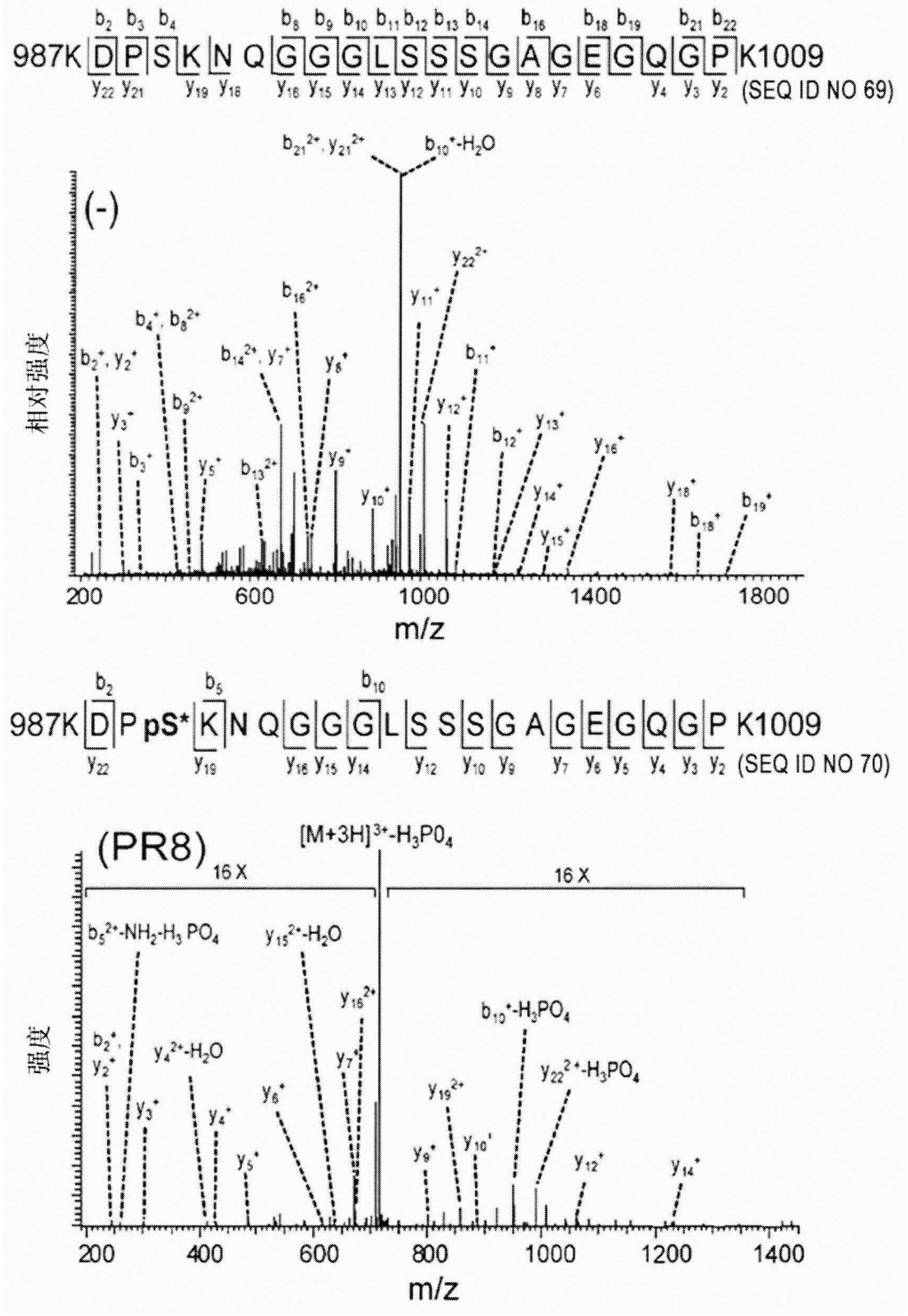

987K DPSKNQGGGLSSSGAGEGQGPK1009 (SEQ ID NO 69)
(-)
相对强度
m/z
987K DP pS* KNQGGGLSSSGAGEGQGPK1009 (SEQ ID NO 70)
(PR8)
16 X
16 X
[M+3H]3+-H3P04
强度
m/z

图56

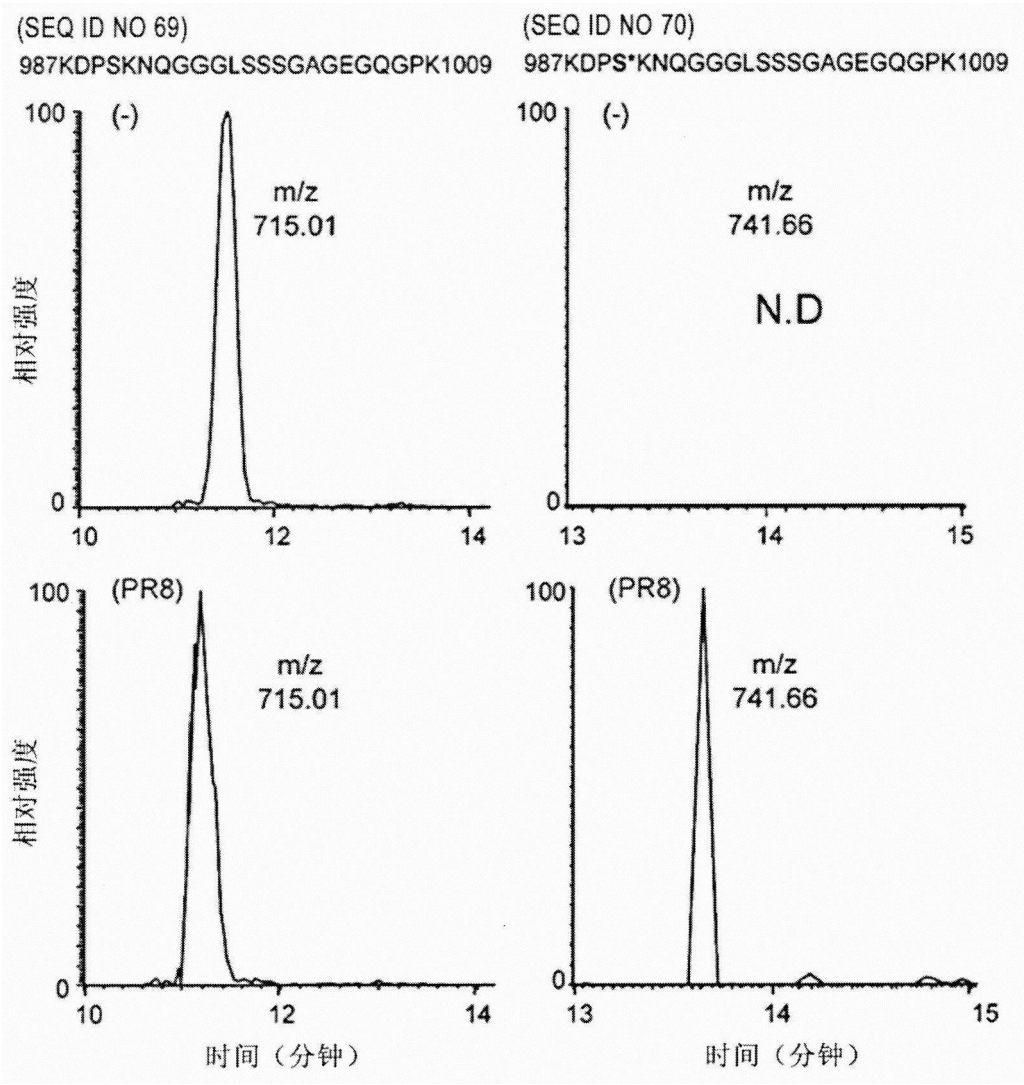

(SEQ ID NO 69)
987KDPSKNQGGGLSSSGAGEGQGPK1009
(SEQ ID NO 70)
987KDPS*KNQGGGLSSSGAGEGQGPK1009
100
(-)
m/z
715.01
m/z
741.66
N.D
相对强度
0
10
12
14
13
14
15
(PR8)
m/z
715.01
m/z
741.66
时间（分钟）
时间（分钟）

图57

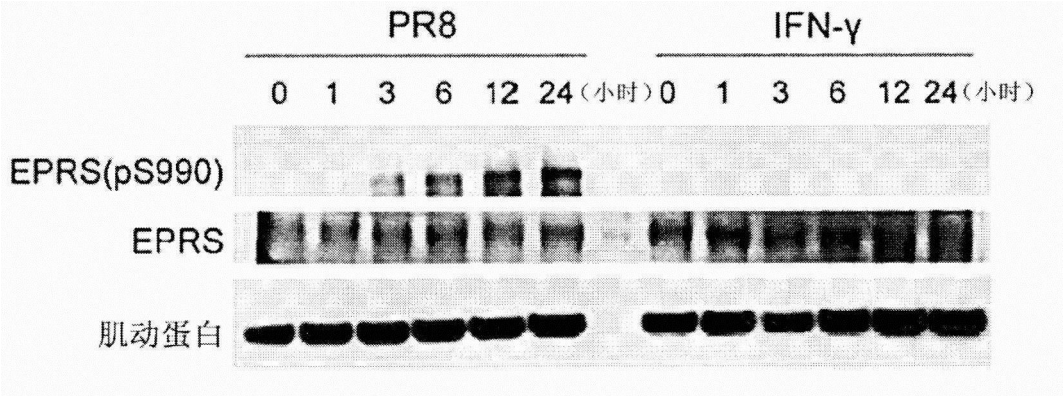

PR8
IFN-γ
0 1 3 6 12 24（小时）
0 1 3 6 12 24（小时）
EPRS(pS990)
EPRS
肌动蛋白

图58

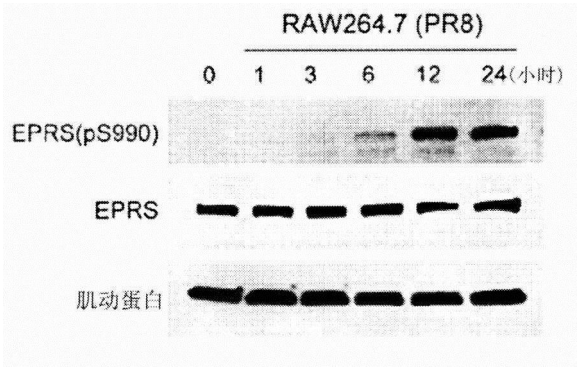

RAW264.7 (PR8)
0 1 3 6 12 24(小时)
EPRS(pS990)
EPRS
肌动蛋白

图59

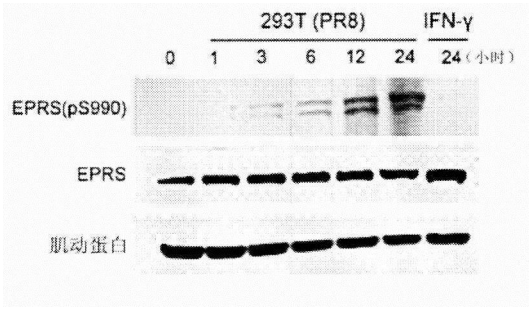

293T (PR8)
IFN-γ
0 1 3 6 12 24 24(小时)
EPRS(pS990)
EPRS
肌动蛋白

图60

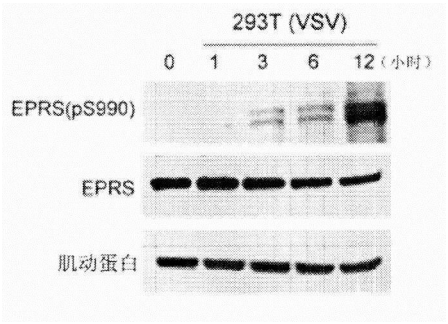

293T (VSV)
0 1 3 6 12(小时)
EPRS(pS990)
EPRS
肌动蛋白

图61

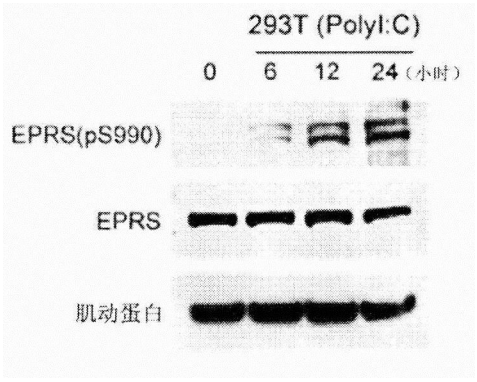

293T (Polyl:C)
0 6 12 24（小时）
EPRS(pS990)
EPRS
肌动蛋白

图62

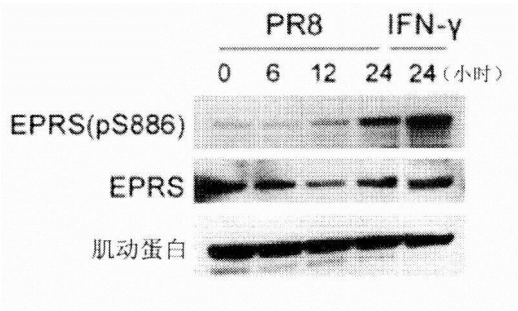

PR8 IFN-γ
0 6 12 24 24（小时）
EPRS(pS886)
EPRS
肌动蛋白

图63

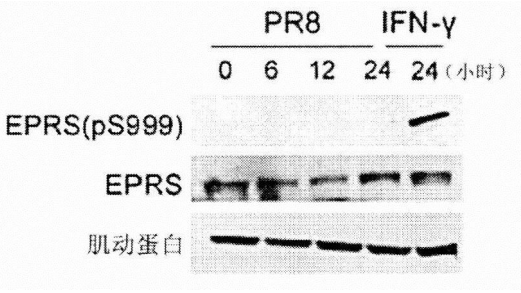

PR8 IFN-γ
0 6 12 24 24（小时）
EPRS(pS999)
EPRS
肌动蛋白

图64

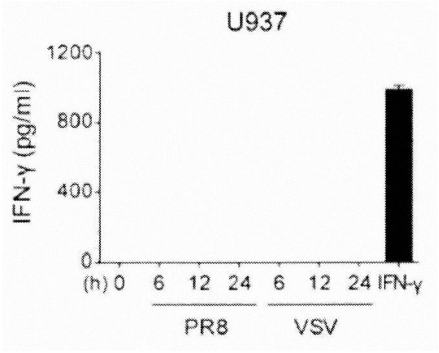

U937
IFN-γ (pg/ml)
1200
800
400
0
(h) 0 6 12 24 6 12 24 IFN-γ
PR8
VSV

图65

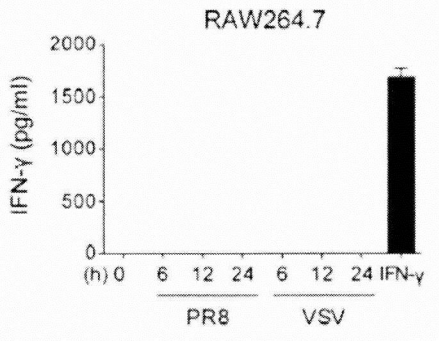

RAW264.7
IFN-γ (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
(h) 0 6 12 24 6 12 24 IFN-γ
PR8
VSV

图66

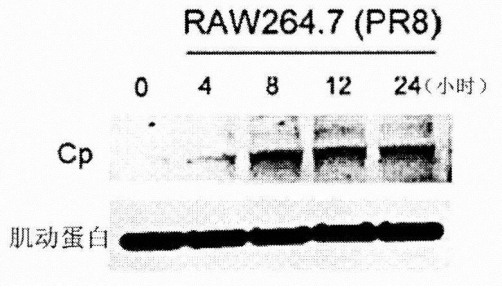

RAW264.7 (PR8)
0 4 8 12 24(小时)
Cp
肌动蛋白

图67

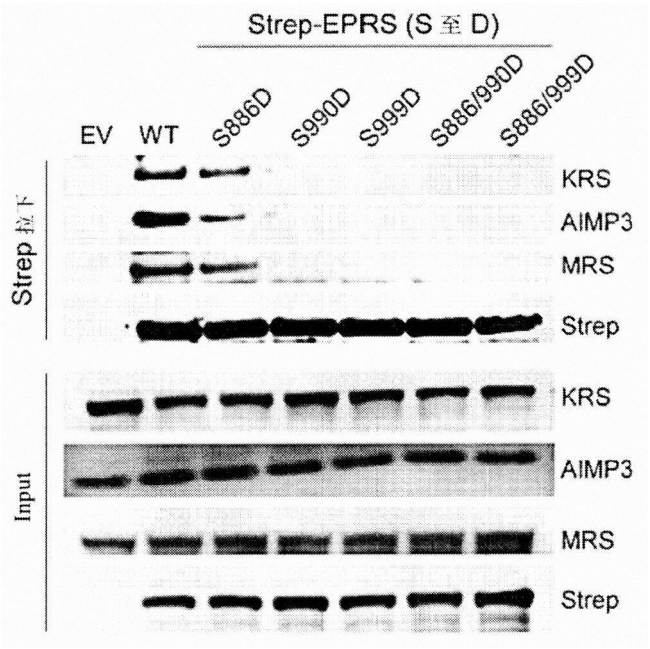

Strep-EPRS (S至D)
EV
WT
S886D
S990D
S999D
S886/990D
S886/999D
Strep拉下
KRS
AIMP3
MRS
Strep
Input
KRS
AIMP3
MRS
Strep

图68

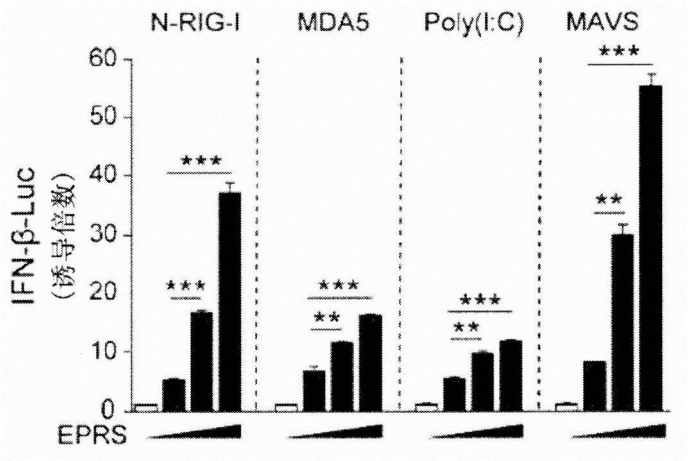

N-RIG-I
MDA5
Poly(I:C)
MAVS
IFN-β-Luc
(诱导倍数)
60
50
40
30
20
10
0
EPRS
***
**

图69

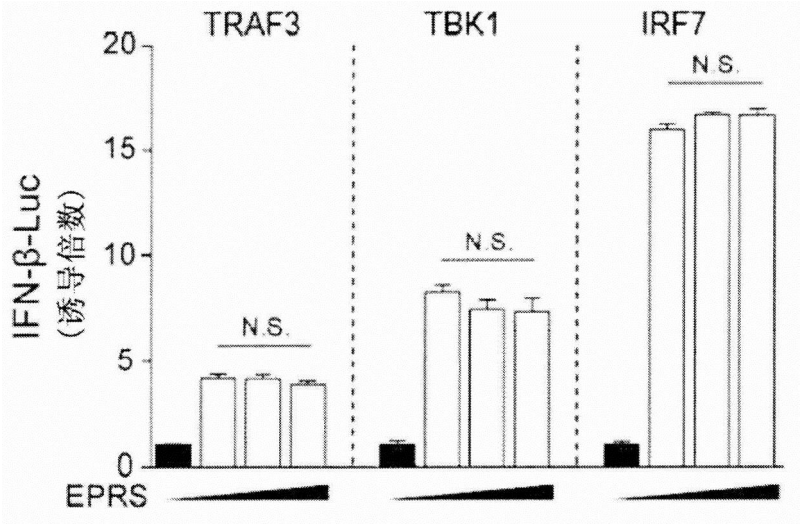

TRAF3
TBK1
IRF7
N.S.
N.S.
N.S.
IFN-β-Luc
(诱导倍数)
20
15
10
5
0
EPRS

图70

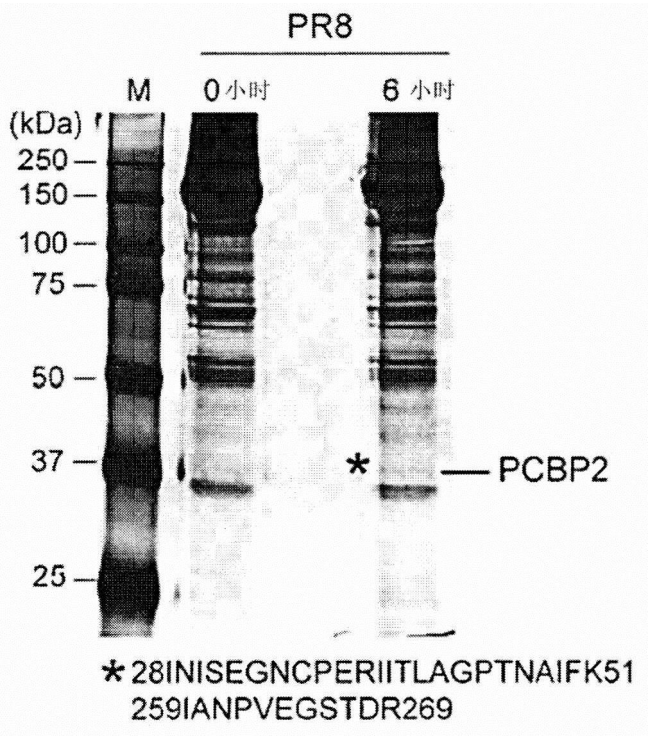

PR8
M
0小时
6小时
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
*
PCBP2
*28INISEGNCPERIITLAGPTNAIFK51
259IANPVEGSTDR269

图71

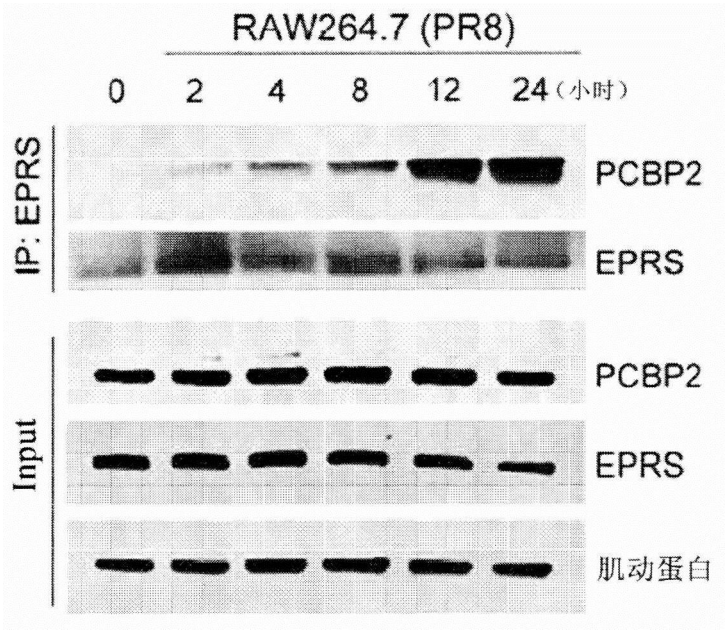

RAW264.7 (PR8)
0
2
4
8
12
24（小时）
IP: EPRS
PCBP2
EPRS
Input
PCBP2
EPRS
肌动蛋白

图72

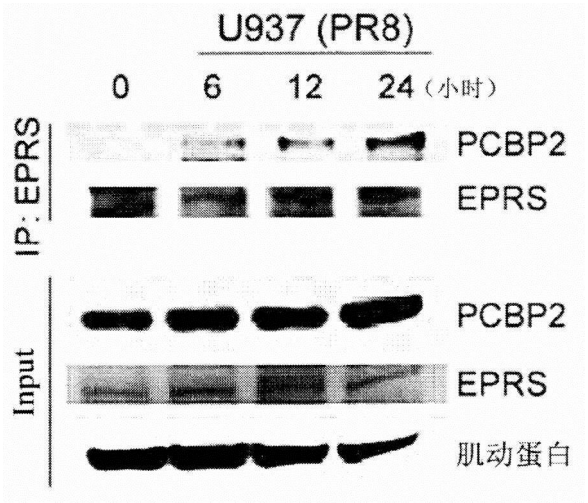

U937 (PR8)
0
6
12
24（小时）
IP: EPRS
PCBP2
EPRS
Input
PCBP2
EPRS
肌动蛋白

图73

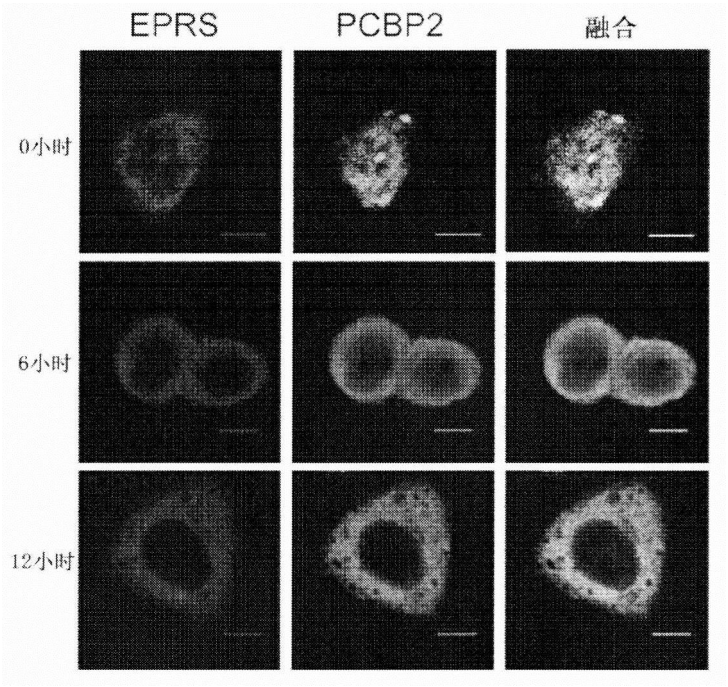

EPRS
PCBP2
融合
0小时
6小时
12小时

图74

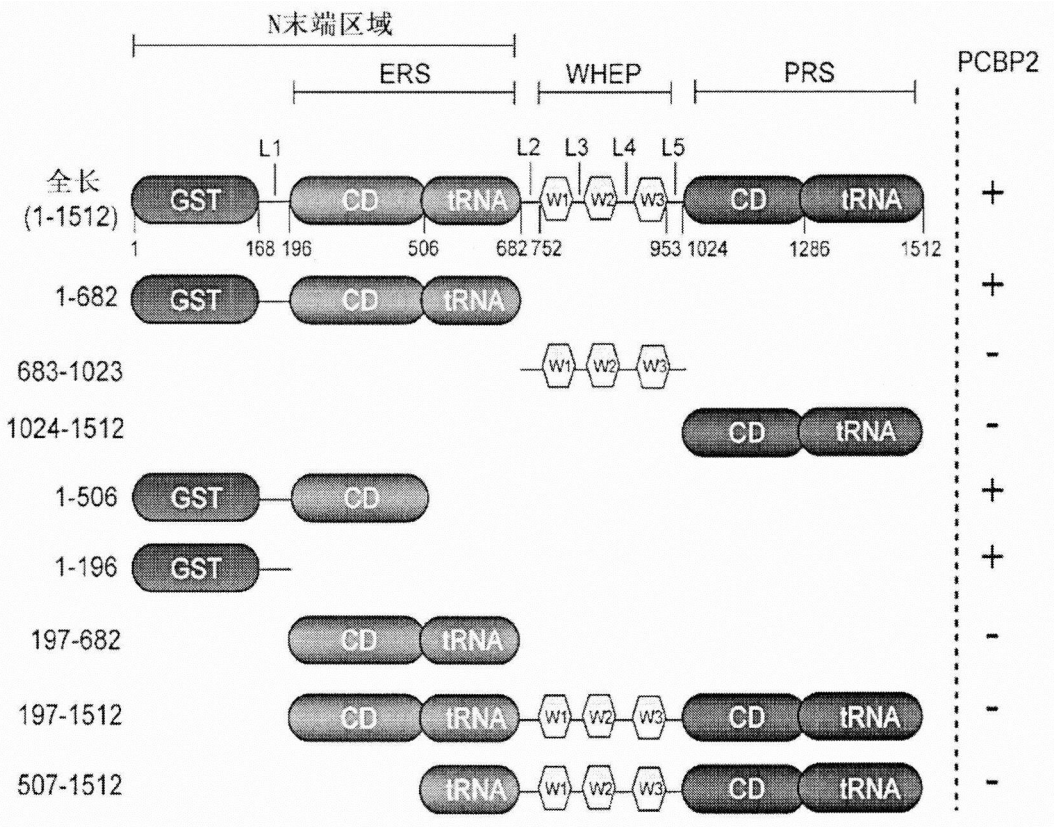

N末端区域
ERS
WHEP
PRS
PCBP2
L1
L2
L3
L4
L5
全长
(1-1512)
GST
CD
tRNA
W1
W2
W3
1
168
196
506
682
752
953
1024
1286
1512
1-682
683-1023
1024-1512
1-506
1-196
197-682
197-1512
507-1512
+
-

图75

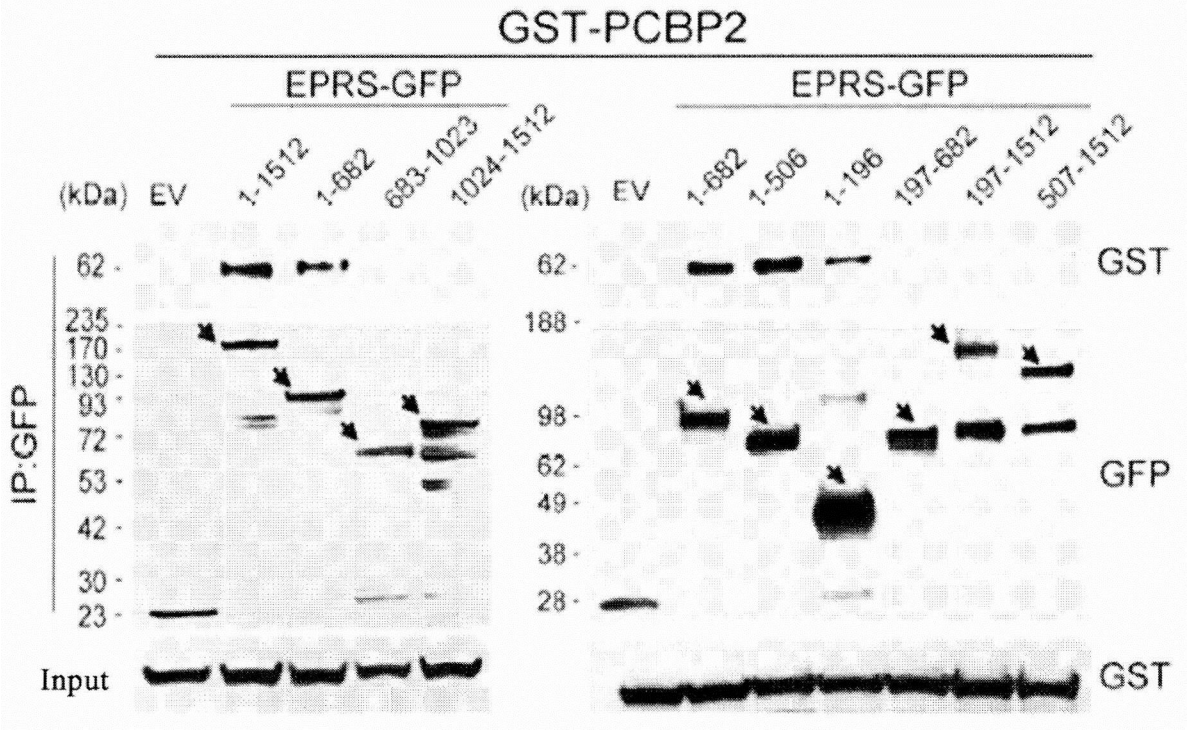

GST-PCBP2
EPRS-GFP
EPRS-GFP
(kDa) EV
1-1512
1-682
683-1023
1024-1512
(kDa) EV
1-682
1-506
1-196
197-682
197-1512
507-1512
IP:GFP
62
235
170
130
93
72
53
42
30
23
62
188
98
62
49
38
28
GST
GFP
Input
GST

图76

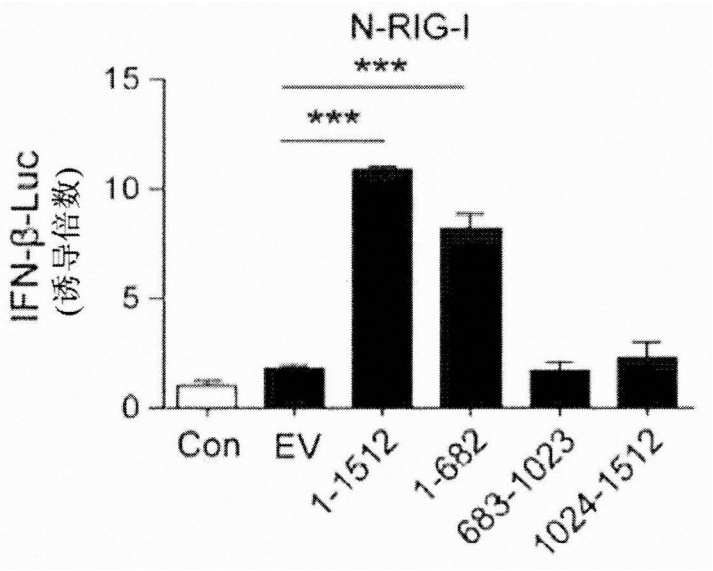

N-RIG-I
***
***
IFN-β-Luc
(诱导倍数)
15
10
5
0
Con
EV
1-1512
1-682
683-1023
1024-1512

图77

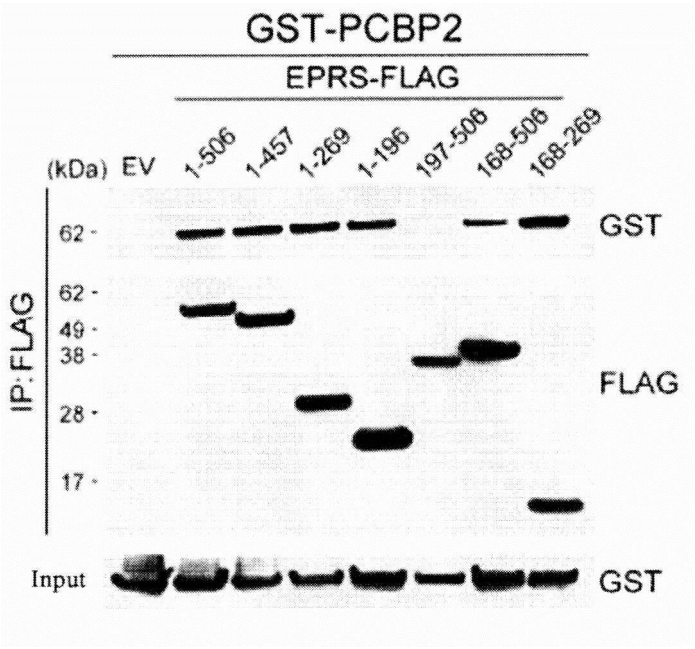

GST-PCBP2
EPRS-FLAG
(kDa) EV
1-506
1-457
1-269
1-196
197-506
168-506
168-269
62
62
49
38
28
17
IP:FLAG
GST
FLAG
Input
GST

图78

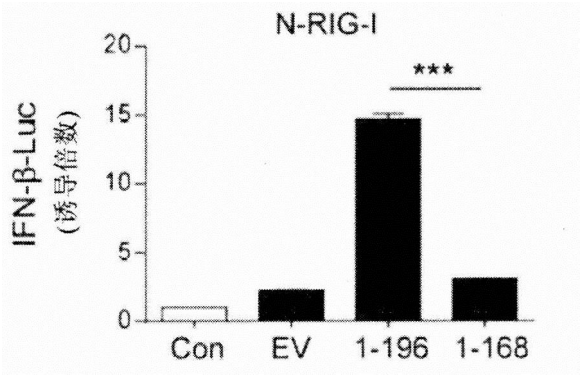

N-RIG-I
***
IFN-β-Luc
(诱导倍数)
20
15
10
5
0
Con
EV
1-196
1-168

图79

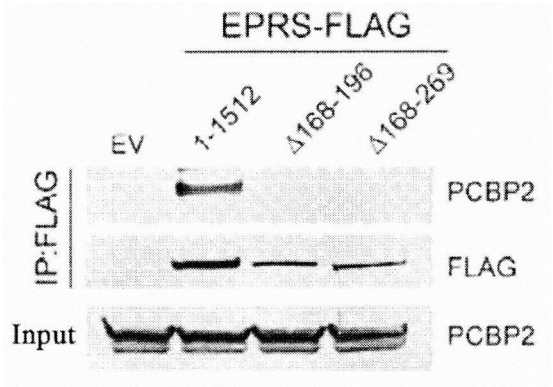

EPRS-FLAG
EV
1-1512
Δ168-196
Δ168-269
IP:FLAG
PCBP2
FLAG
Input
PCBP2

图80

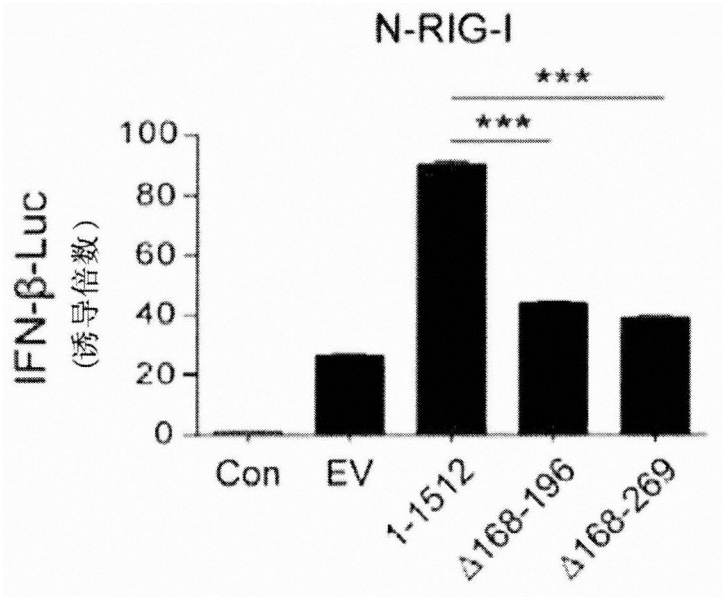

N-RIG-I
***
***
IFN-β-Luc
(诱导倍数)
100
80
60
40
20
0
Con
EV
1-1512
Δ168-196
Δ168-269

图81

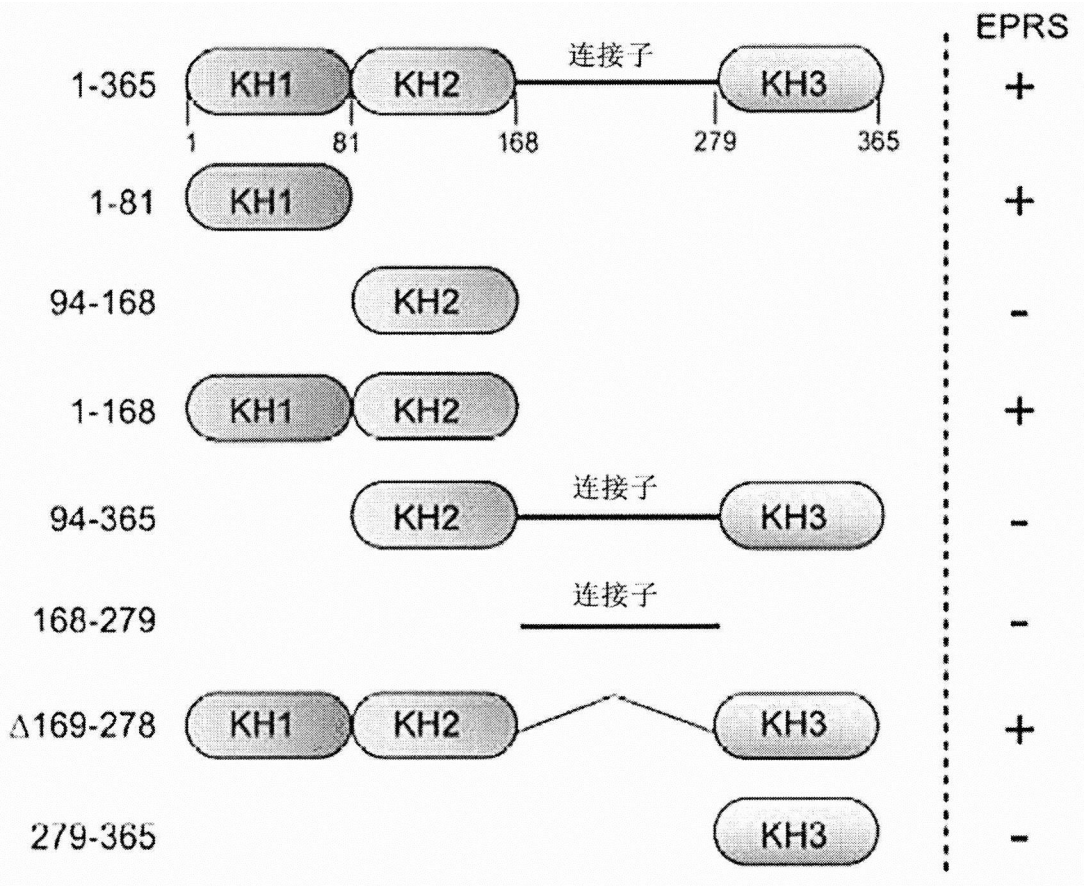

EPRS
1-365
KH1
KH2
连接子
KH3
1
81
168
279
365
+
1-81
KH1
+
94-168
KH2
-
1-168
KH1
KH2
+
94-365
KH2
连接子
KH3
-
168-279
连接子
-
Δ169-278
KH1
KH2
KH3
+
279-365
KH3
-

图82

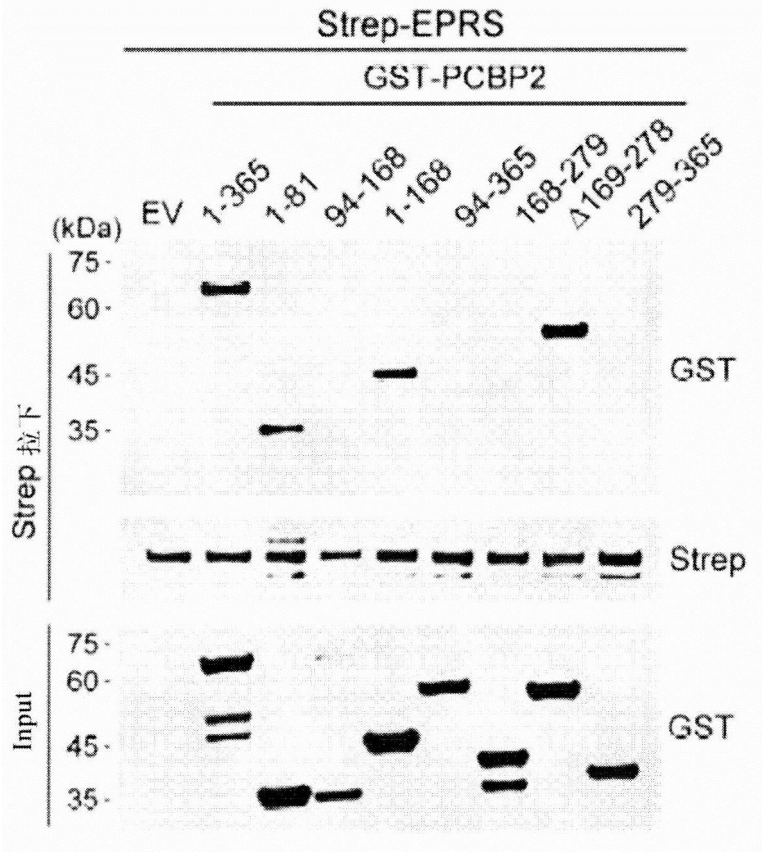

Strep-EPRS
GST-PCBP2
EV
1-365
1-81
94-168
1-168
94-365
168-279
Δ169-278
279-365
(kDa)
75
60
45
35
GST
Strep
Strep 拉下
Input
75
60
45
35
GST

图83

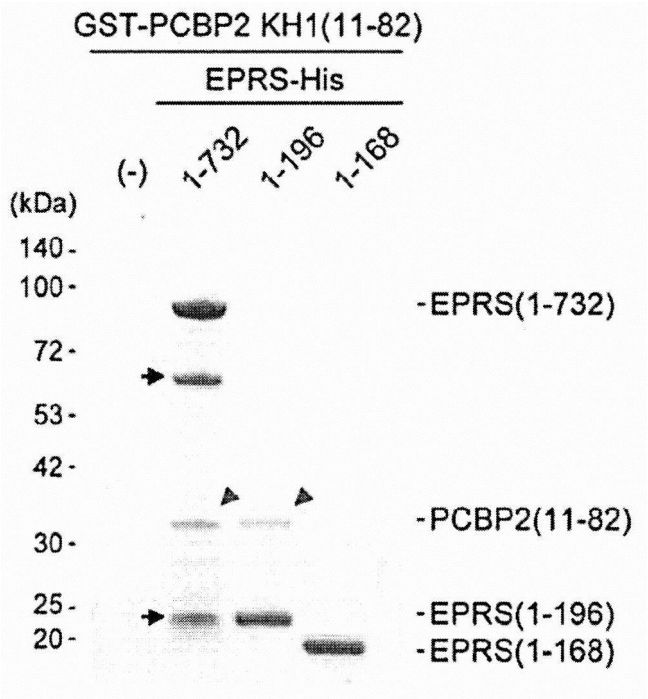

GST-PCBP2 KH1(11-82)
EPRS-His
(-)
1-732
1-196
1-168
(kDa)
140
100
72
53
42
30
25
20
-EPRS(1-732)
-PCBP2(11-82)
-EPRS(1-196)
-EPRS(1-168)

图84

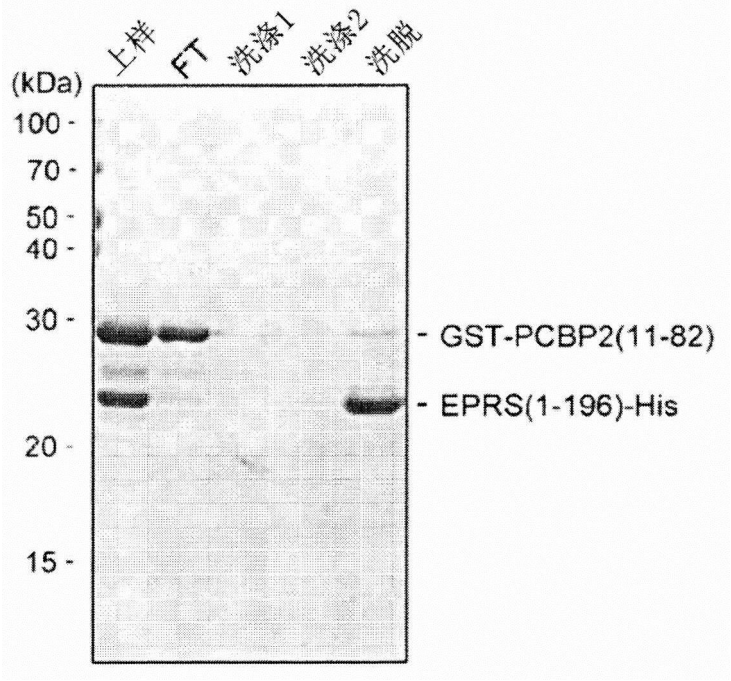

上样
FT
洗涤1
洗涤2
洗脱
(kDa)
100
70
50
40
30
20
15
GST-PCBP2(11-82)
EPRS(1-196)-His

图85

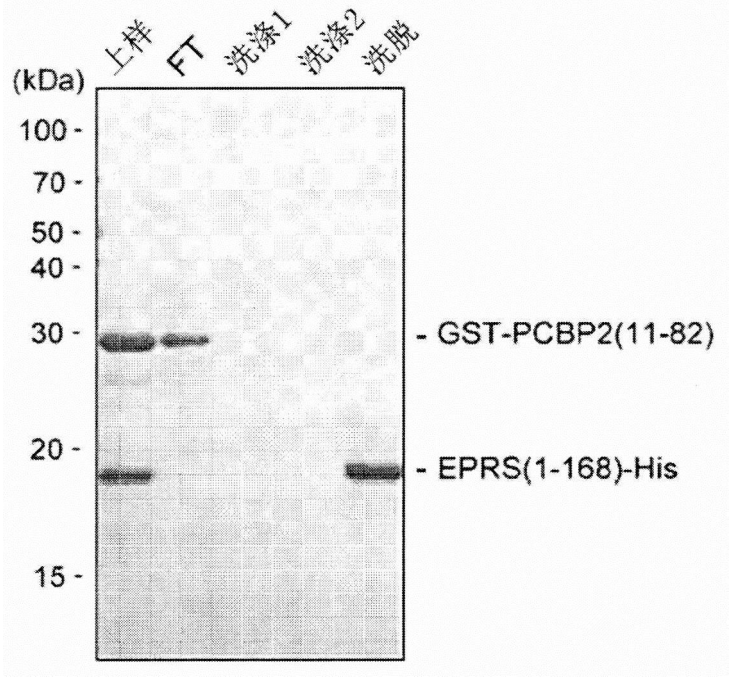

上样
FT
洗涤1
洗涤2
洗脱
(kDa)
100
70
50
40
30
20
15
GST-PCBP2(11-82)
EPRS(1-168)-His

图86

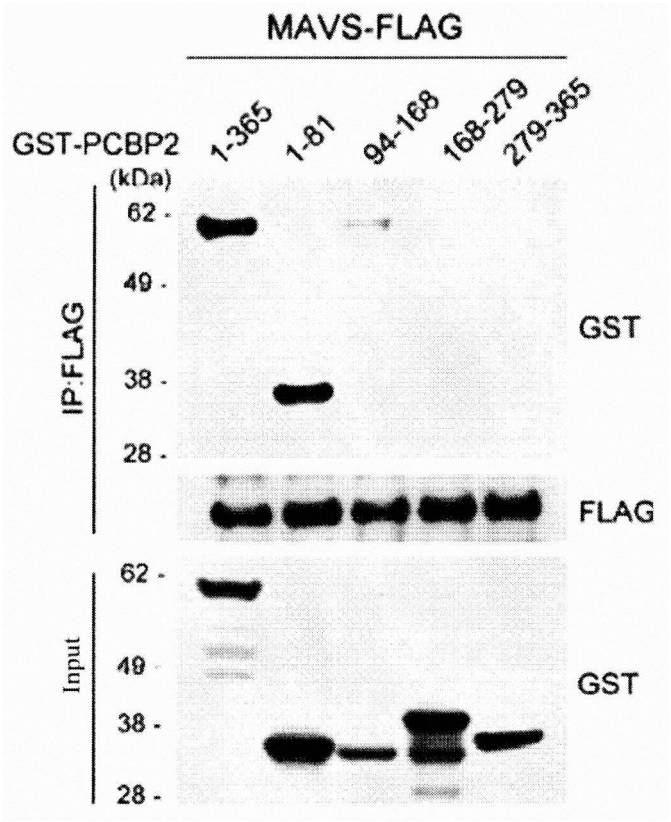

MAVS-FLAG
GST-PCBP2
1-365
1-81
94-168
168-279
279-365
(kDa)
62
49
38
28
IP:FLAG
GST
FLAG
62
49
38
28
Input
GST

图87

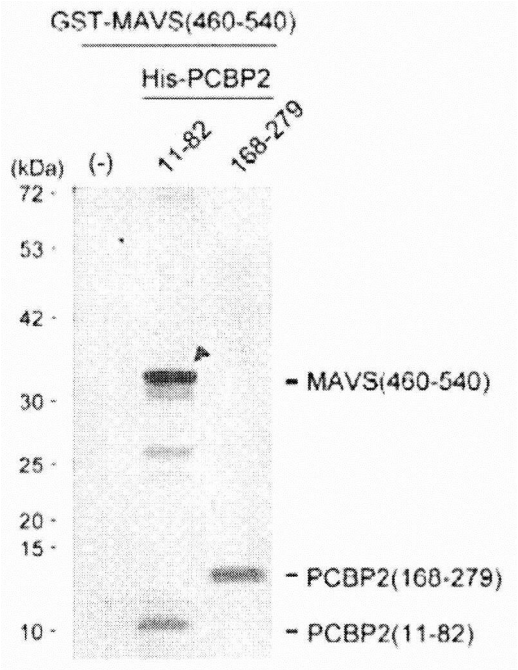

GST-MAVS(460-540)
His-PCBP2
(kDa)
(-)
11-82
168-279
72
53
42
30
25
20
15
10
MAVS(460-540)
PCBP2(168-279)
PCBP2(11-82)

图88

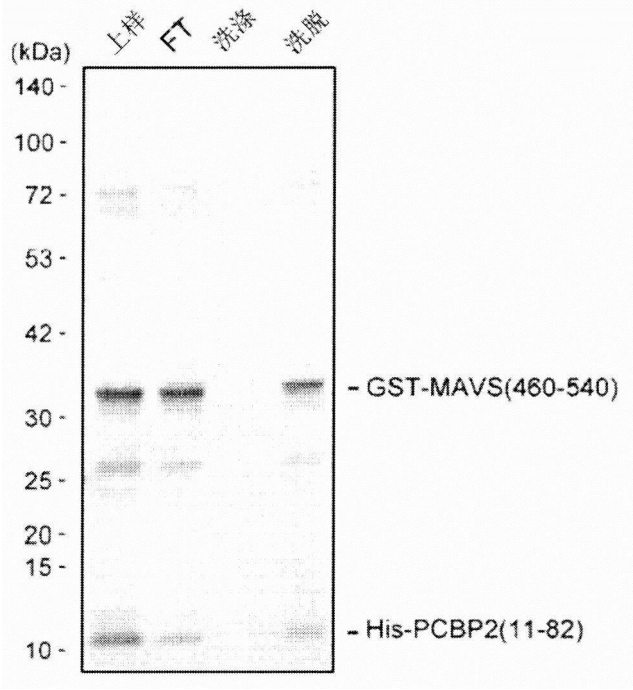

(kDa)
上样
FT
洗涤
洗脱
140
100
72
53
42
30
25
20
15
10
GST-MAVS(460-540)
His-PCBP2(11-82)

图89

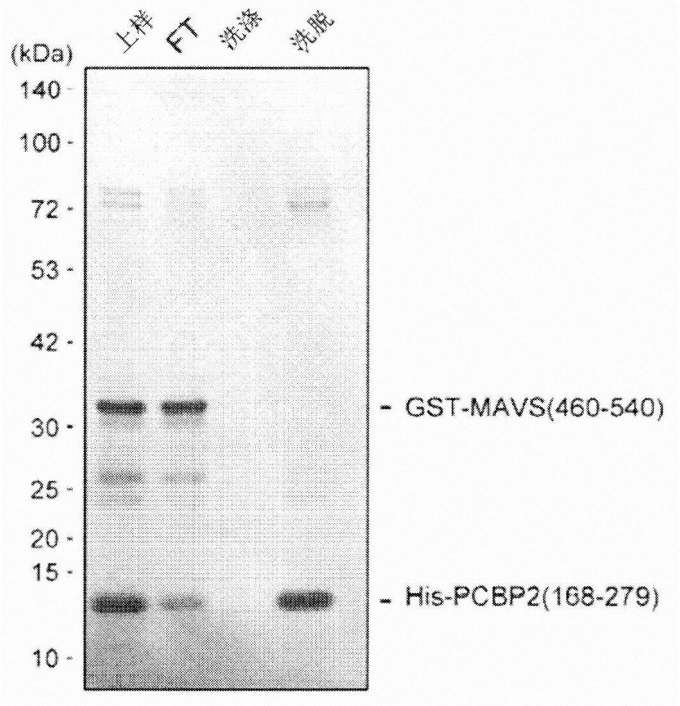

(kDa)
上样
FT
洗涤
洗脱
140
100
72
53
42
30
25
20
15
10
GST-MAVS(460-540)
His-PCBP2(168-279)

图90

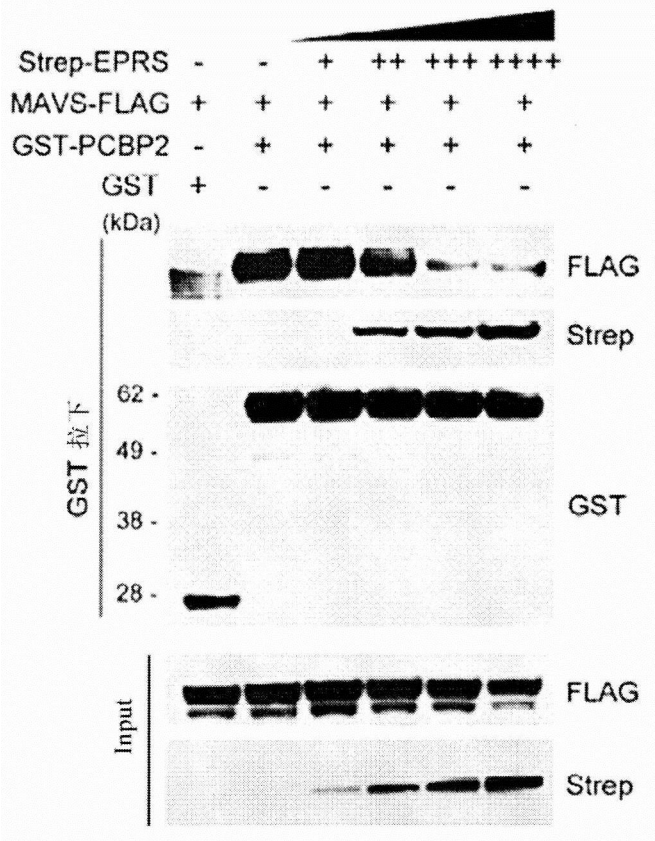

Strep-EPRS - - + ++ +++ ++++
MAVS-FLAG + + + + + +
GST-PCBP2 - + + + + +
GST + - - - - -
(kDa)
GST 拉下
62
49
38
28
FLAG
Strep
GST
Input
FLAG
Strep

图91

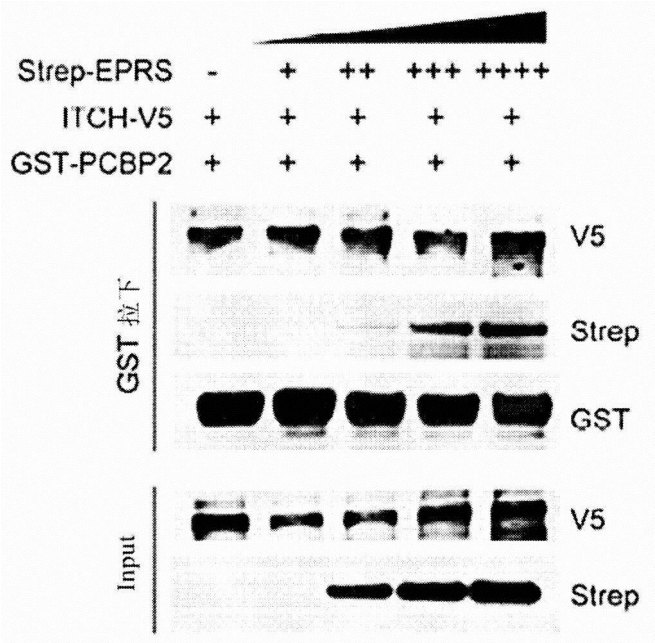

Strep-EPRS - + ++ +++ ++++
ITCH-V5 + + + + +
GST-PCBP2 + + + + +
GST 拉下
V5
Strep
GST
Input
V5
Strep

图92

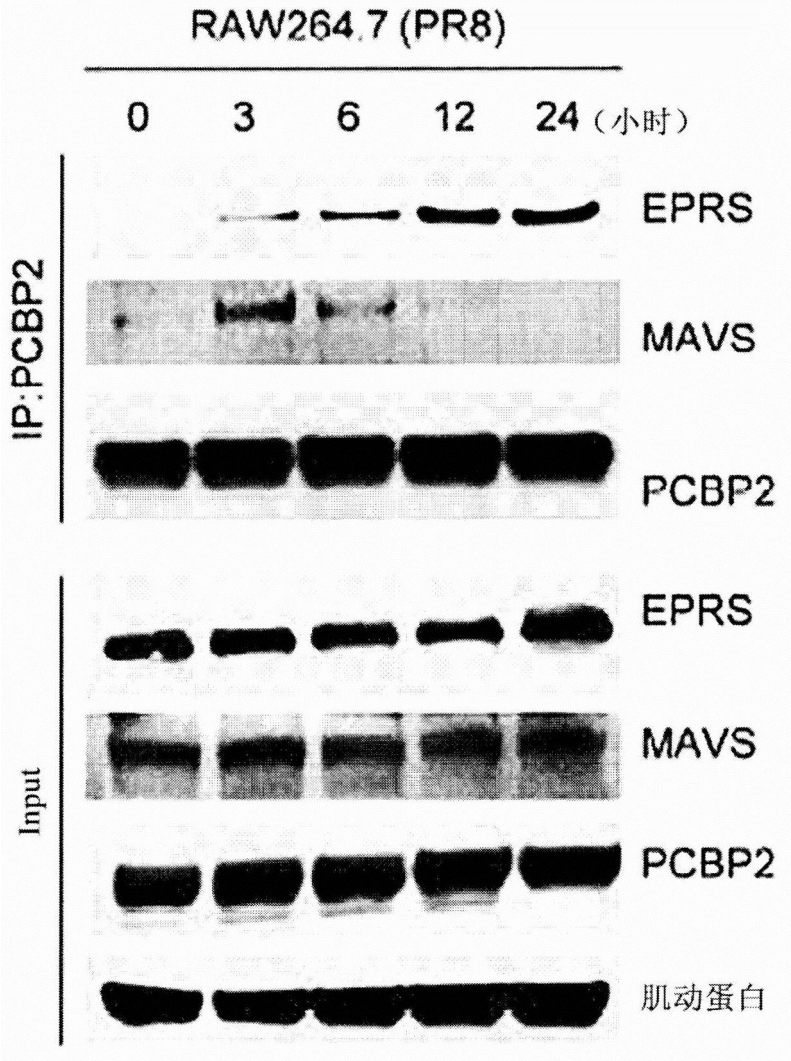

RAW264.7 (PR8)
0
3
6
12
24（小时）
IP:PCBP2
EPRS
MAVS
PCBP2
Input
EPRS
MAVS
PCBP2
肌动蛋白

图93

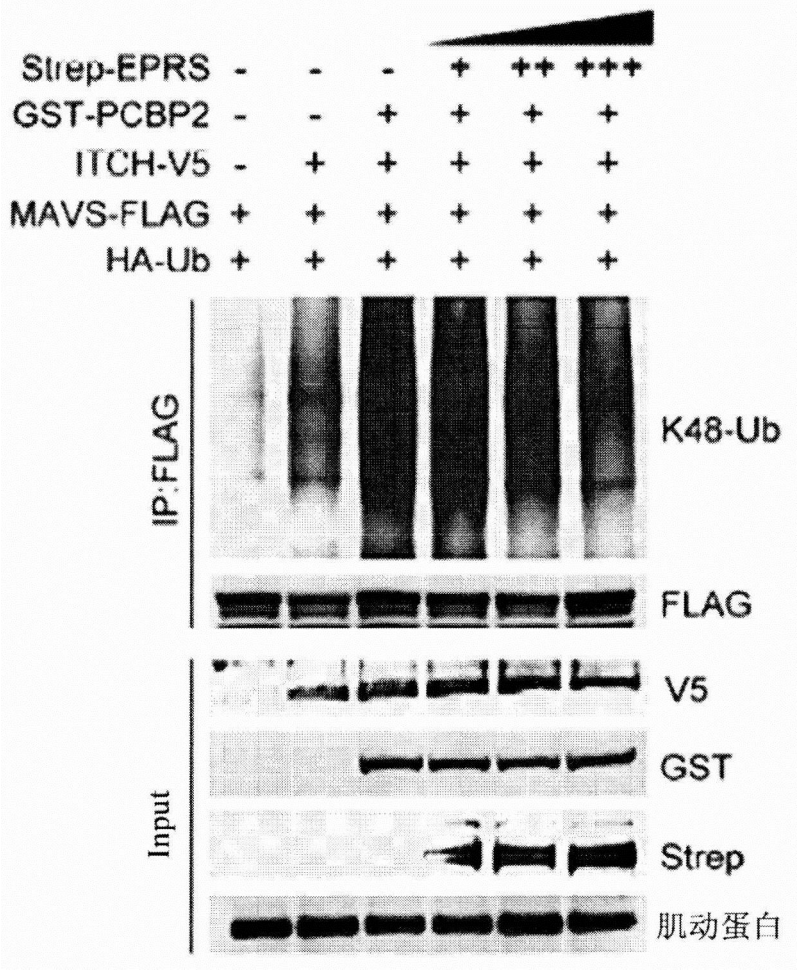

Strep-EPRS - - - + ++ +++
GST-PCBP2 - - + + + +
ITCH-V5 - + + + + +
MAVS-FLAG + + + + + +
HA-Ub + + + + + +
IP:FLAG
K48-Ub
FLAG
Input
V5
GST
Strep
肌动蛋白

图94

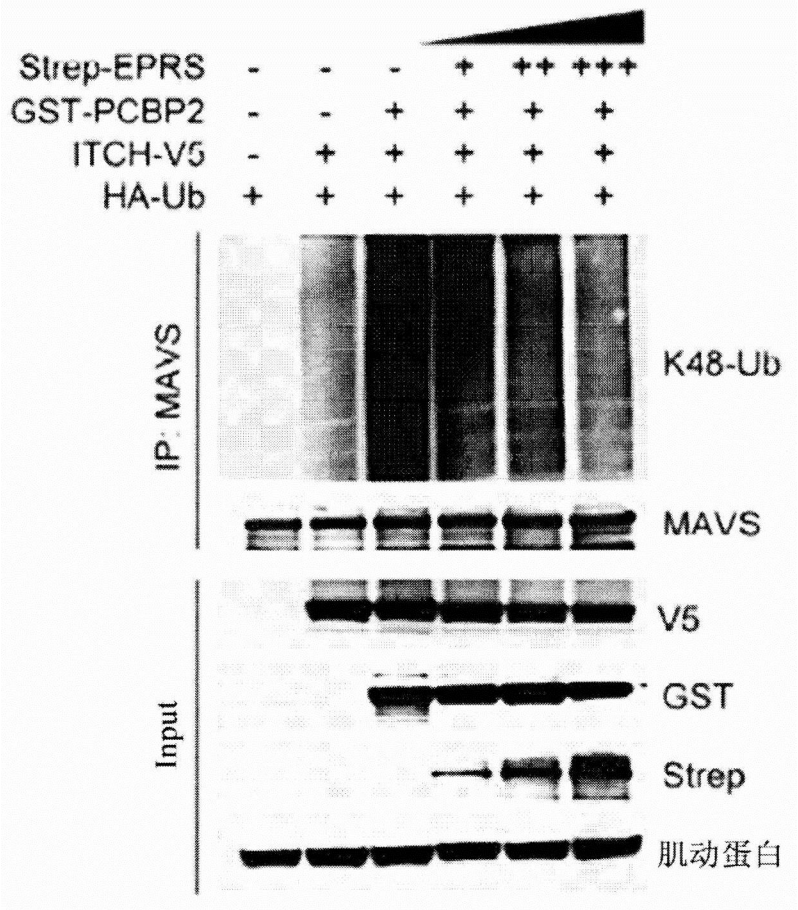

Strep-EPRS - - - + ++ +++
GST-PCBP2 - - + + + +
ITCH-V5 - + + + + +
HA-Ub + + + + + +
IP: MAVS
K48-Ub
MAVS
Input
V5
GST
Strep
肌动蛋白

图95

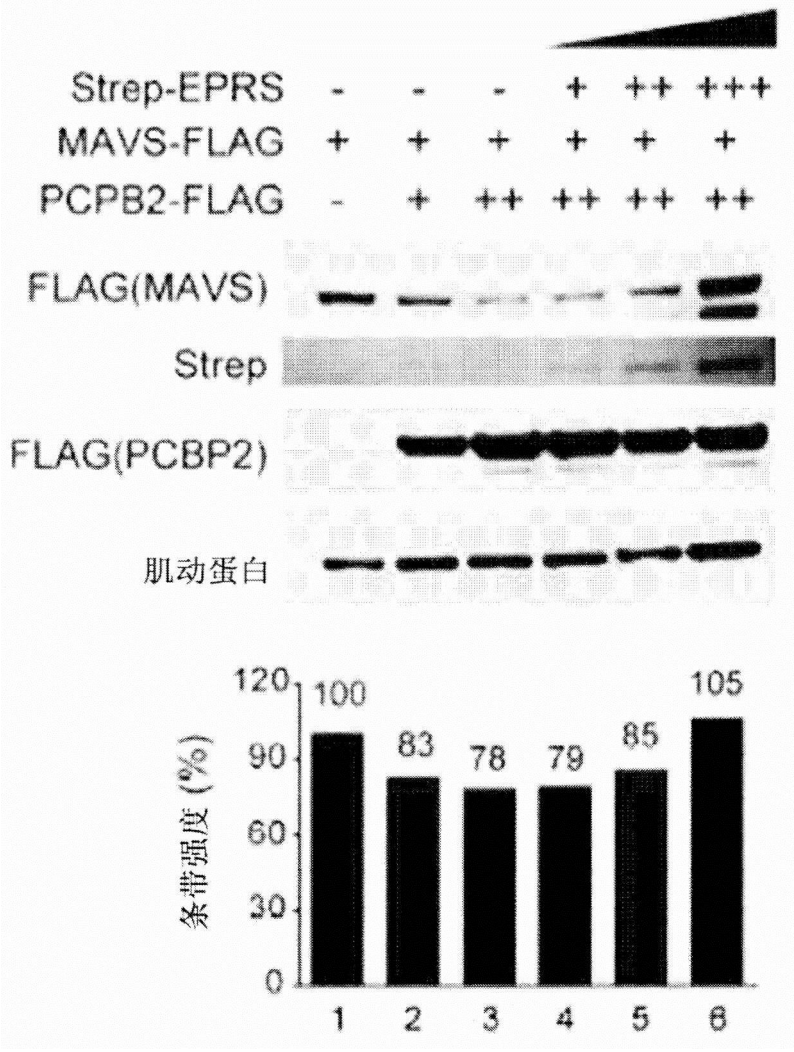

Strep-EPRS - - - + ++ +++
MAVS-FLAG + + + + + +
PCPB2-FLAG - + ++ ++ ++ ++
FLAG(MAVS)
Strep
FLAG(PCBP2)
肌动蛋白
条带强度 (%)
120
90
60
30
0
100
83
78
79
85
105
1 2 3 4 5 6

图96

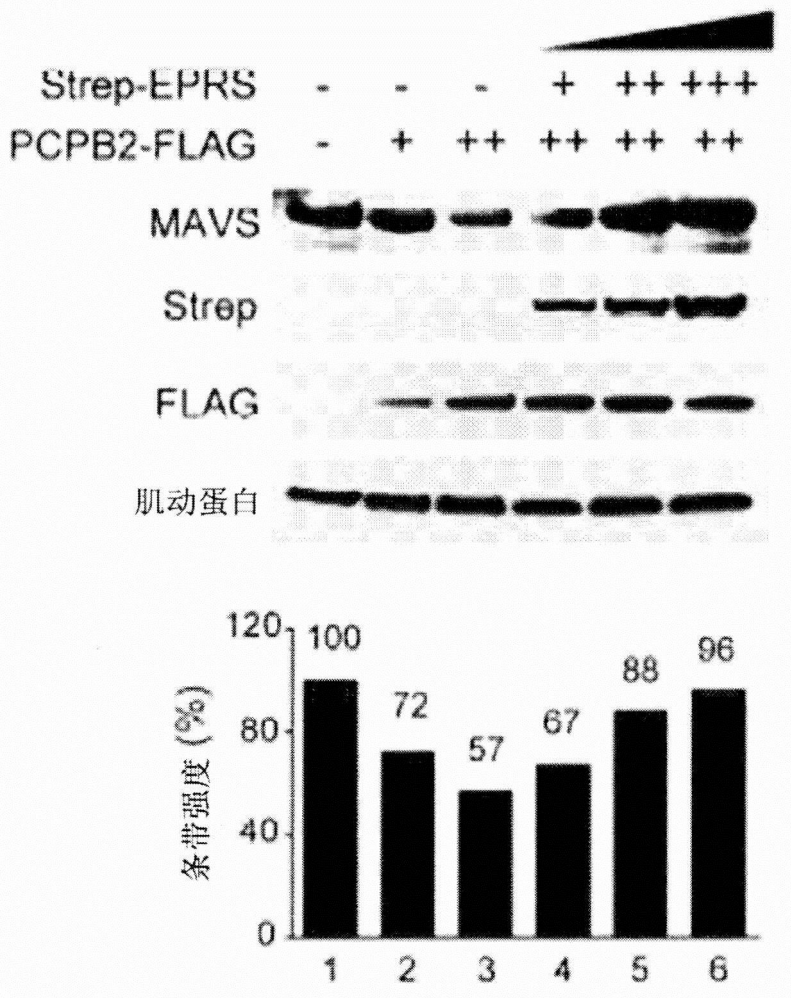

Strep-EPRS - - - + ++ +++
PCPB2-FLAG - + ++ ++ ++ ++
MAVS
Strep
FLAG
肌动蛋白
条带强度(%)
120
80
40
0
100
72
57
67
88
96
1 2 3 4 5 6

图97

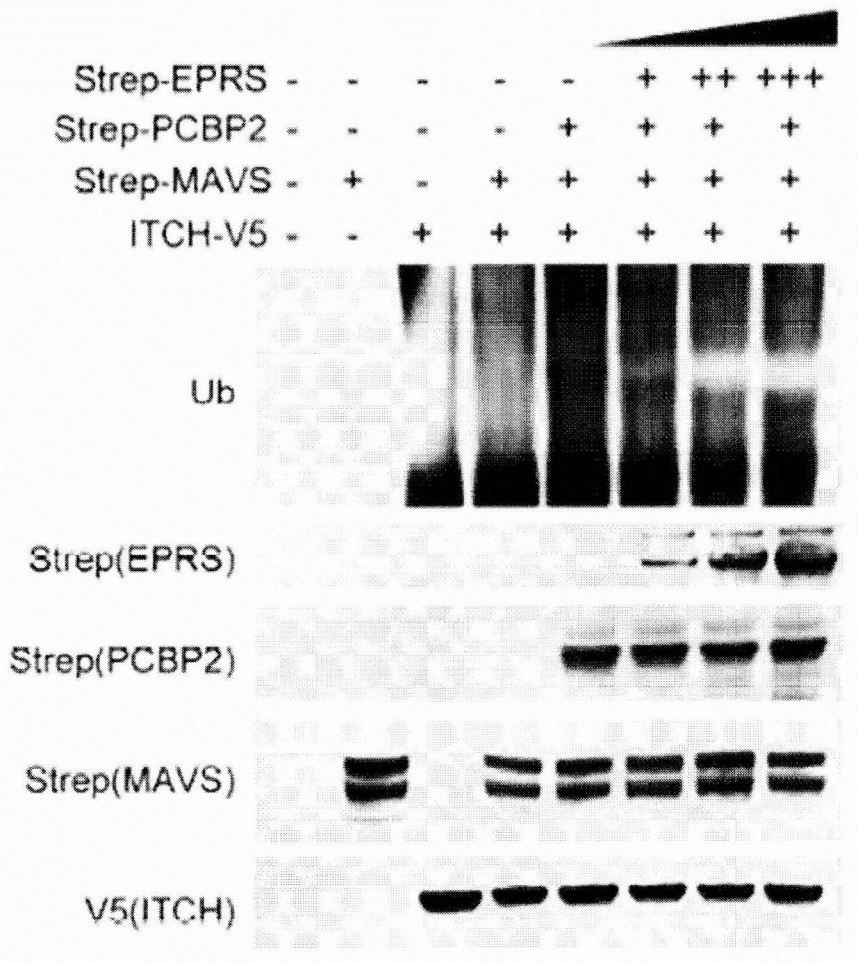
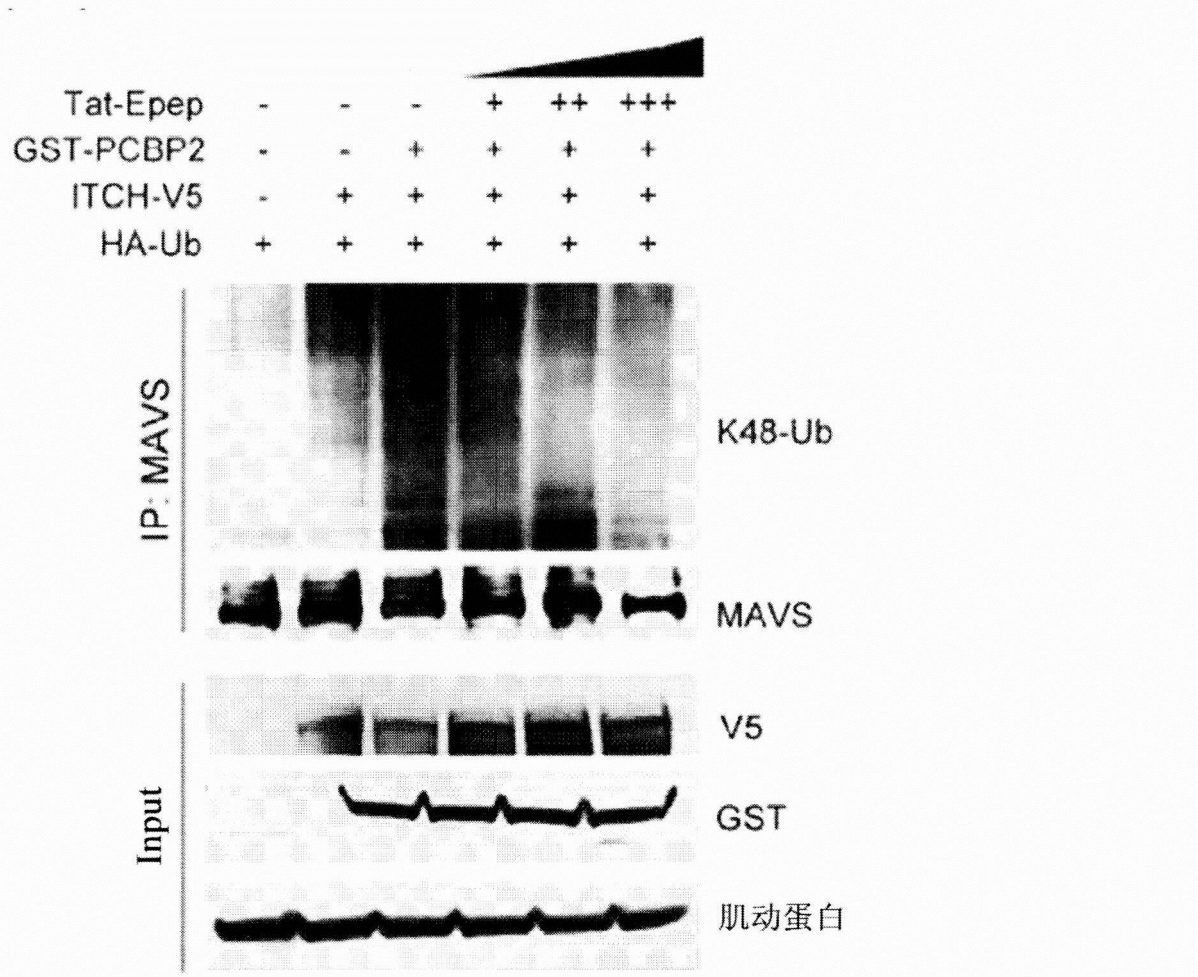

Strep-EPRS - - - - - + ++ +++
Strep-PCBP2 - - - - + + + +
Strep-MAVS - + - + + + + +
ITCH-V5 - - + + + + + +
Ub
Strep(EPRS)
Strep(PCBP2)
Strep(MAVS)
V5(ITCH)

图98



(SEQ ID NO:60)

Tat: YGRKKRRQRRR

(SEQ ID NO:61)

Tat-Epep: YGRKKRRQRRR-GG-DVSTTKARVAPEKKQDVGKFVELPGAEMG

168 190

图99

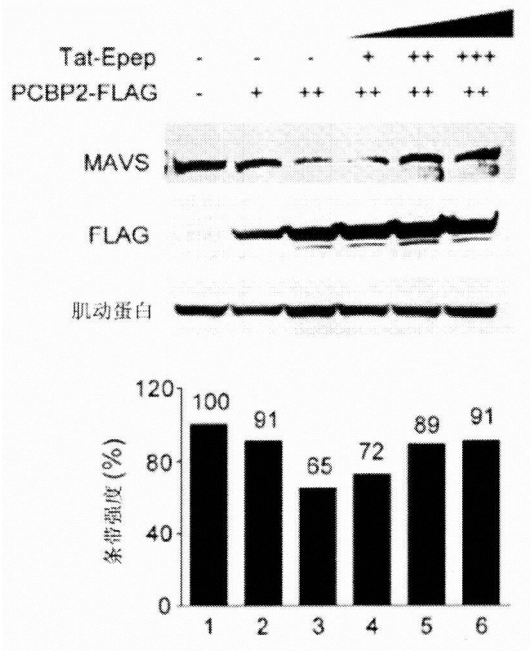


图100

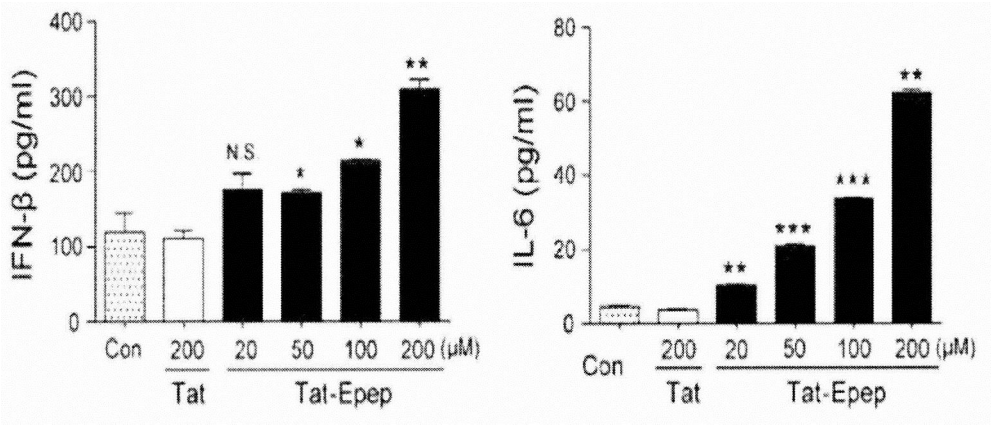


图101

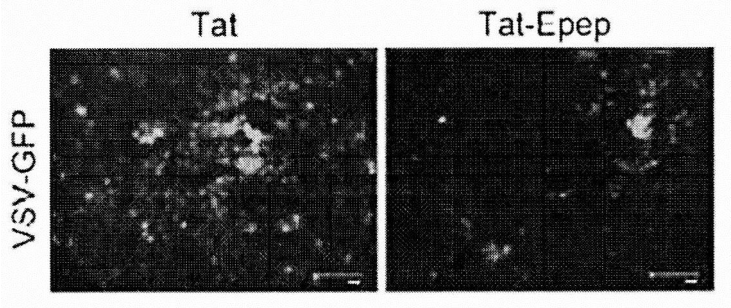


图102

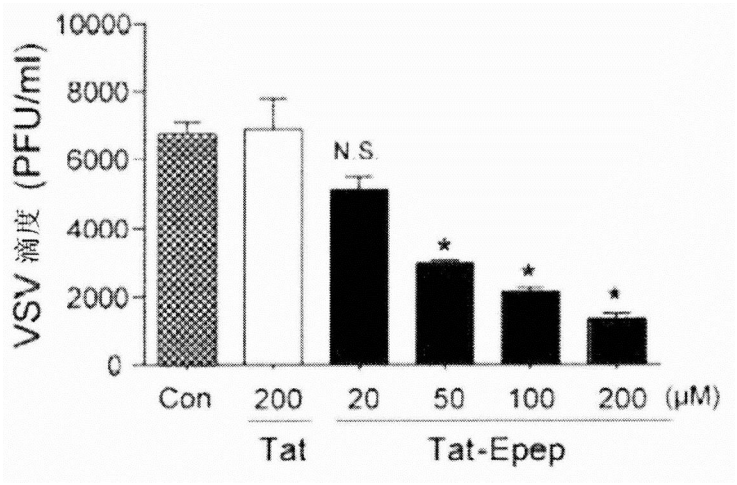


图103

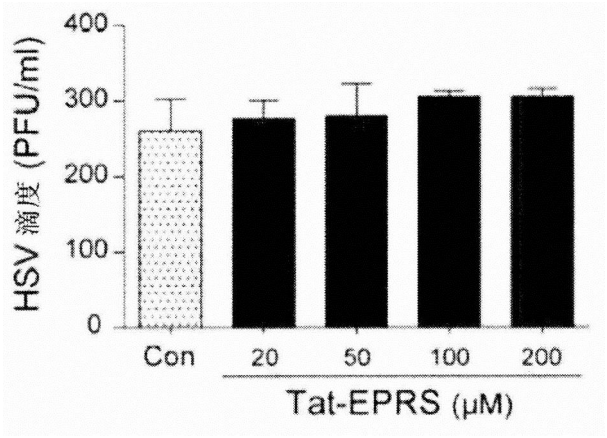


图104

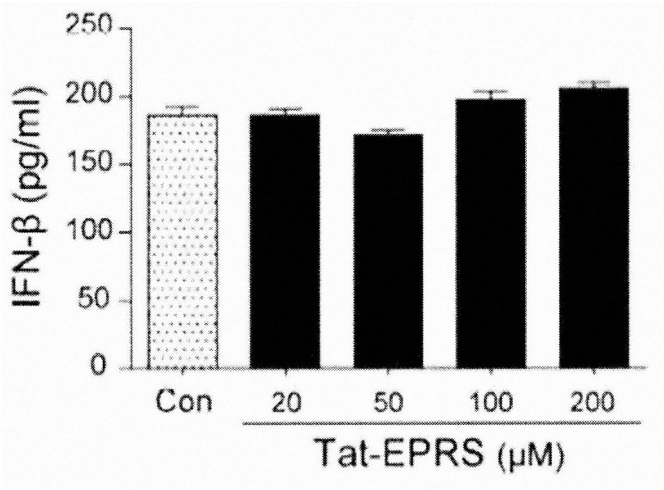


图105

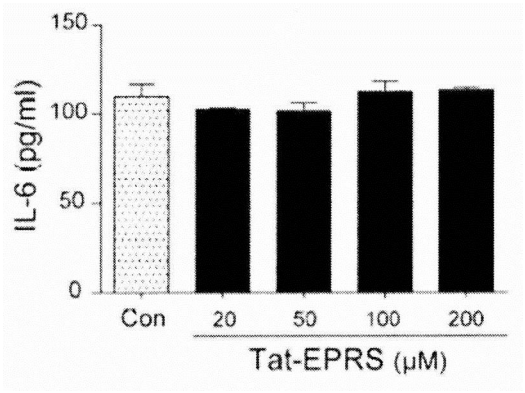


图106

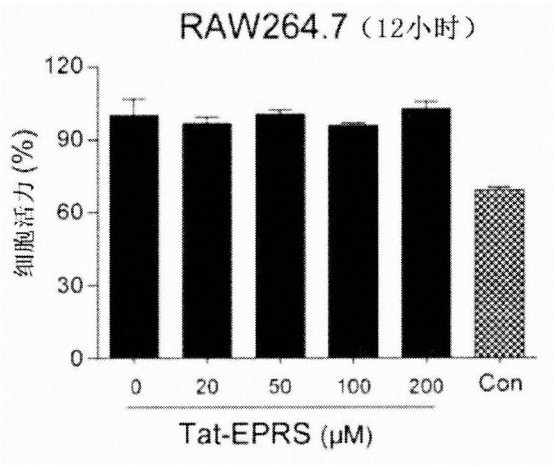


图107

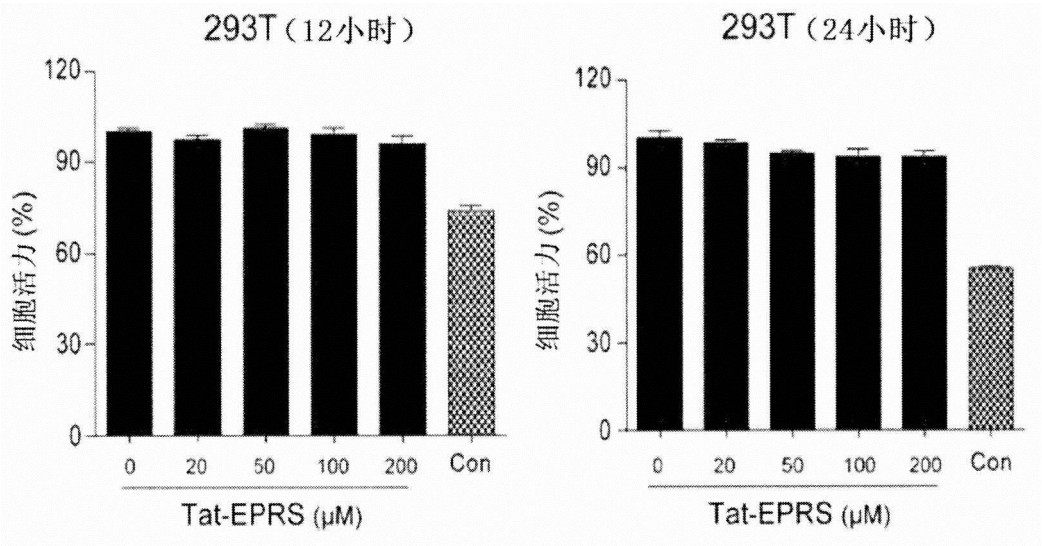


图108

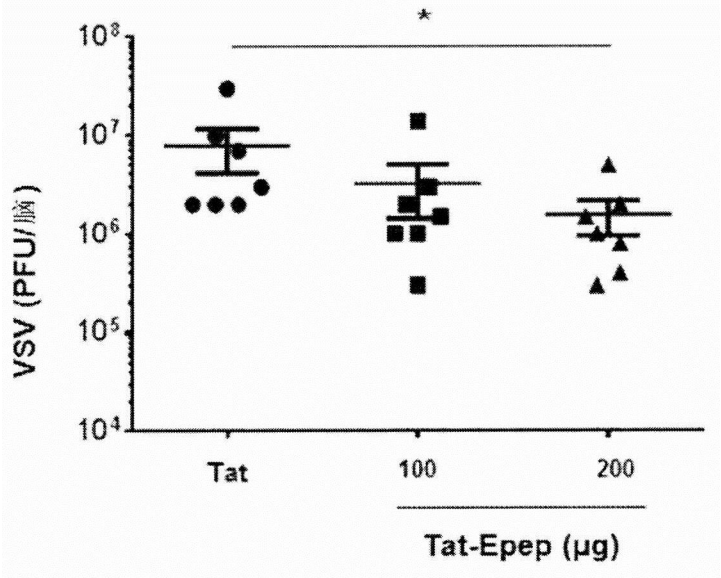

*
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
VSV (PFU/脑)
Tat
100
200
Tat-Epep (μg)

图109

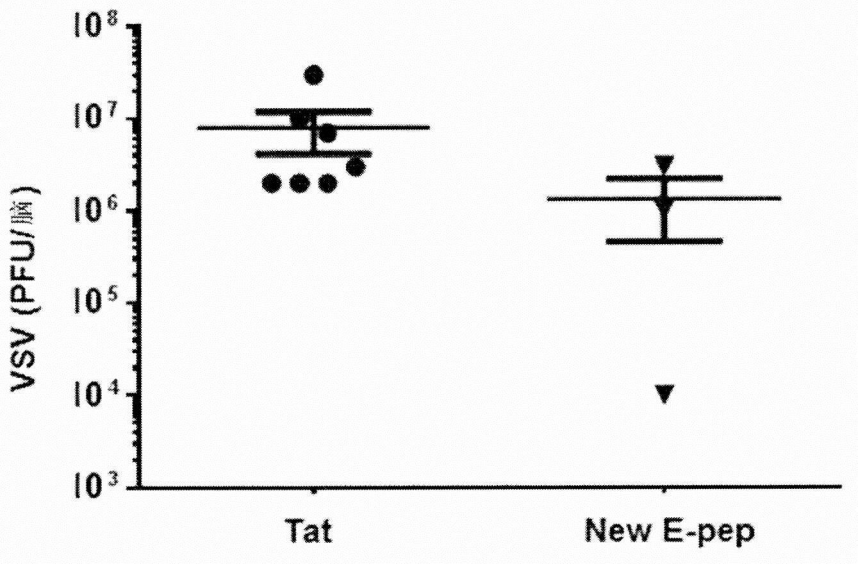

10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
VSV (PFU/脑)
Tat
New E-pep

图110

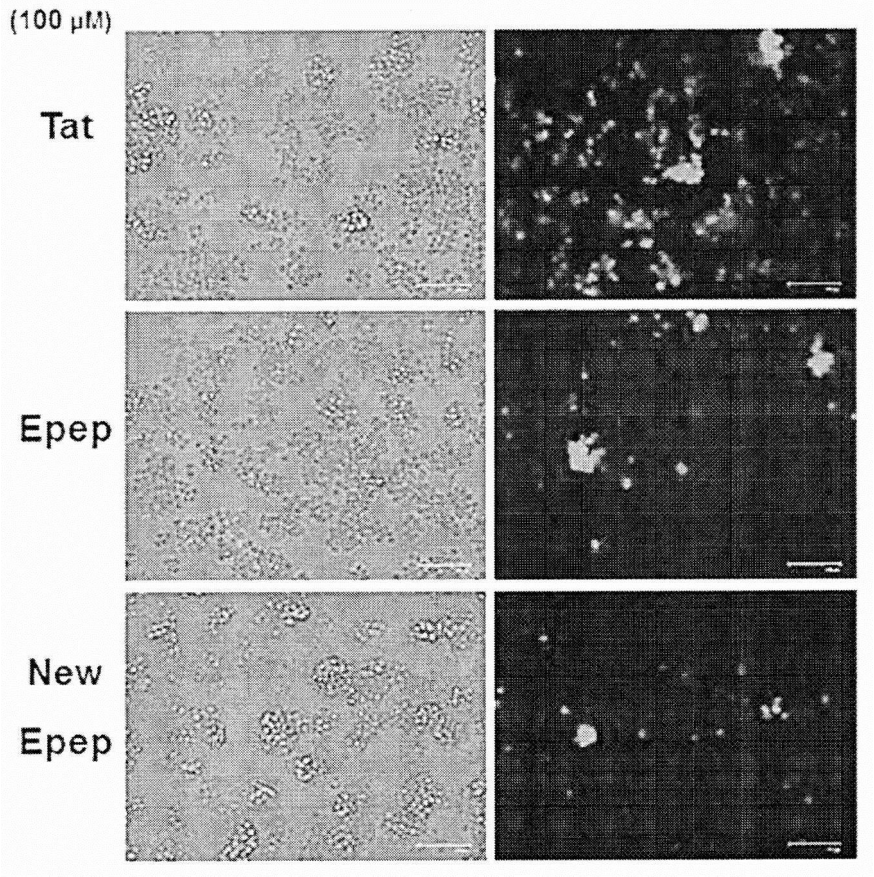

(100 μM)
Tat
Epep
New
Epep

图111

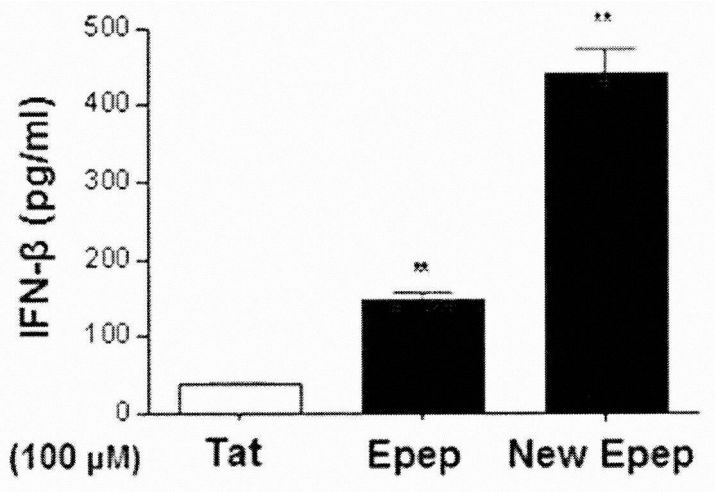

IFN-β (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
**
**
(100 μM)
Tat
Epep
New Epep

图112

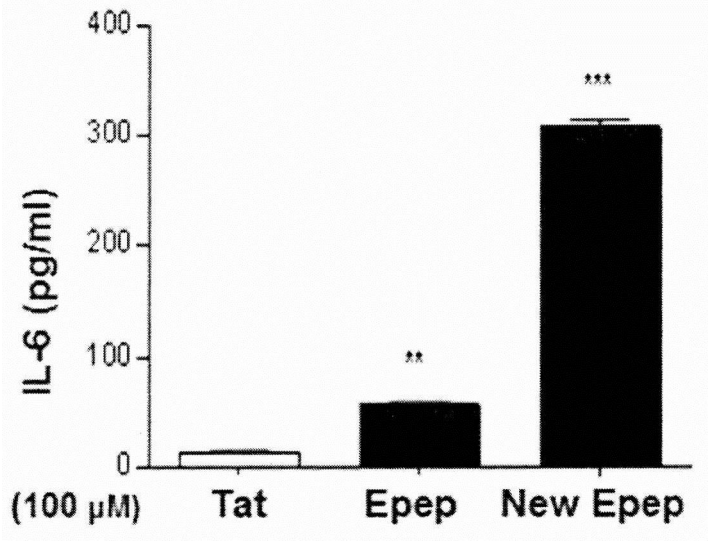


图113