I860281

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I860281 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：107136527 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 10 月 17 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/07 (2006.01)* *A61K31/192 (2006.01)*
A61K31/195 (2006.01) *A61K45/06 (2006.01)*
A61P31/12 (2006.01)

(30)優先權：2017/10/18 美國 62/573,933

(71)申請人：香港商港大科橋有限公司 (香港地區) VERSITECH LIMITED (HK)
香港

(72)發明人：袁 碩峰 YUAN, SHUOFENG (HK) ；陳 福和 CHAN, FUK WOO JASPER (HK) ；朱 軒 CHU, HIN (HK) ；劉 耀南 LAU, JOHNSON YIU-NAM (US) ；袁 國勇 YUEN, KWOK YUNG (HK)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

CN 106572663A1 WO 2005/120479A1
WO 2014/079709A1

審查人員：官速貞

申請專利範圍項數：2 項 圖式數：76 共 104 頁

(54)名稱

廣效型抗病毒治療的組合物及方法

(57)摘要

已經發現 AM580 和其結構相關化合物有助於治療多種 RNA 和 DNA 病毒感染，並且還可降低相關的發炎反應。這種抗病毒活性不依賴於 RAR-α 信號傳導，也不是活化宿主先天免疫反應的結果。AM580 和其結構相關化合物的廣效型抗病毒活性是來自於調節脂肪生成，從而抑制 nSREPBP 來導正被病毒感染的細胞中脂肪生成途徑的失調。

AM580 and structurally related compounds have been found to be useful in treating infection by a wide range of RNA and DNA viruses, and also in reducing associated inflammation. This activity is independent of RAR-α signaling, and is not a result of activation of the host's innate immune response. Broad antiviral activity of AM580 and structurally related compounds is a due to modulation of lipogenesis so as to correct disregulation of this pathway in virus-infected cells, via inhibition of nSREPBP.

指定代表圖：

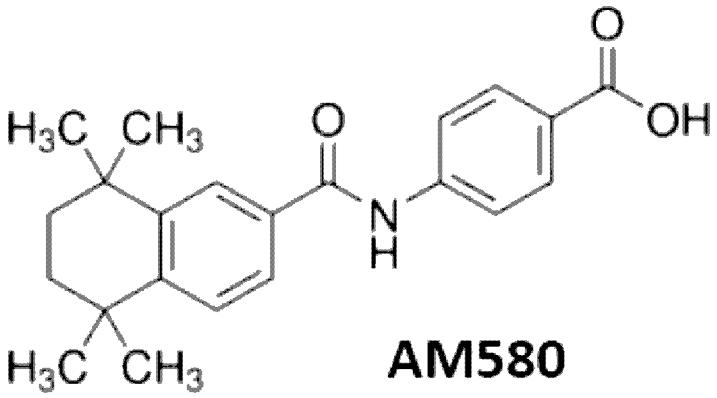
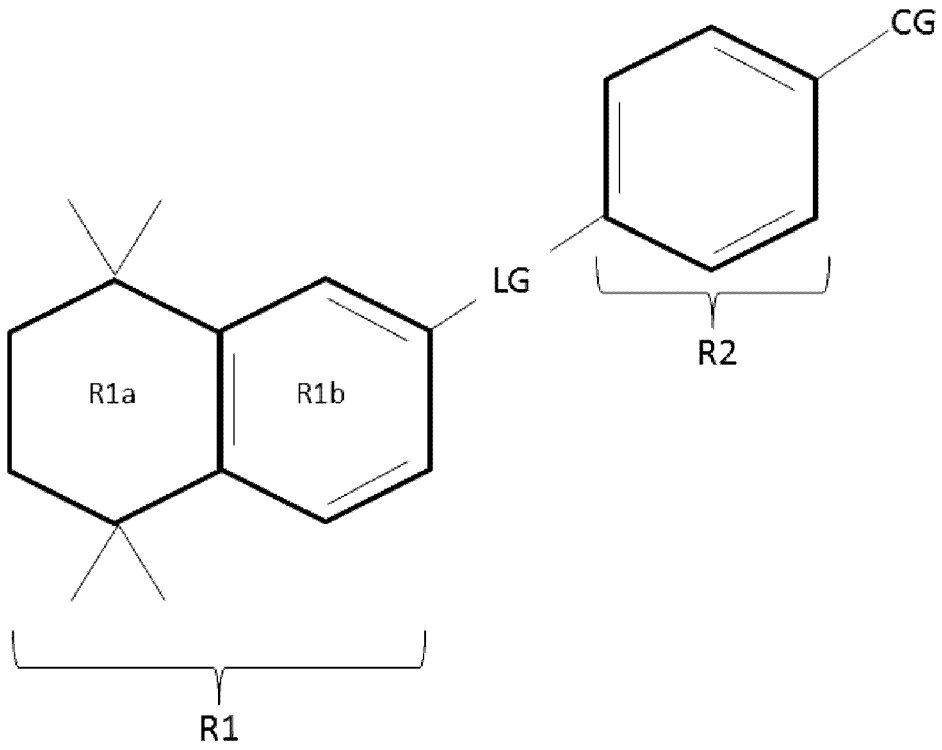


圖 1

特徵化學式：



公告本

I860281

【發明摘要】

【中文發明名稱】廣效型抗病毒治療的組合物及方法

【英文發明名稱】COMPOSITIONS AND METHODS FOR BROAD-SPECTRUM ANTIVIRAL THERAPY

【中文】

已經發現AM580和其結構相關化合物有助於治療多種RNA和DNA病毒感染，並且還可降低相關的發炎反應。這種抗病毒活性不依賴於RAR-α信號傳導，也不是活化宿主先天免疫反應的結果。AM580和其結構相關化合物的廣效型抗病毒活性是來自於調節脂肪生成，從而抑制nSREPBP來導正被病毒感染的細胞中脂肪生成途徑的失調。

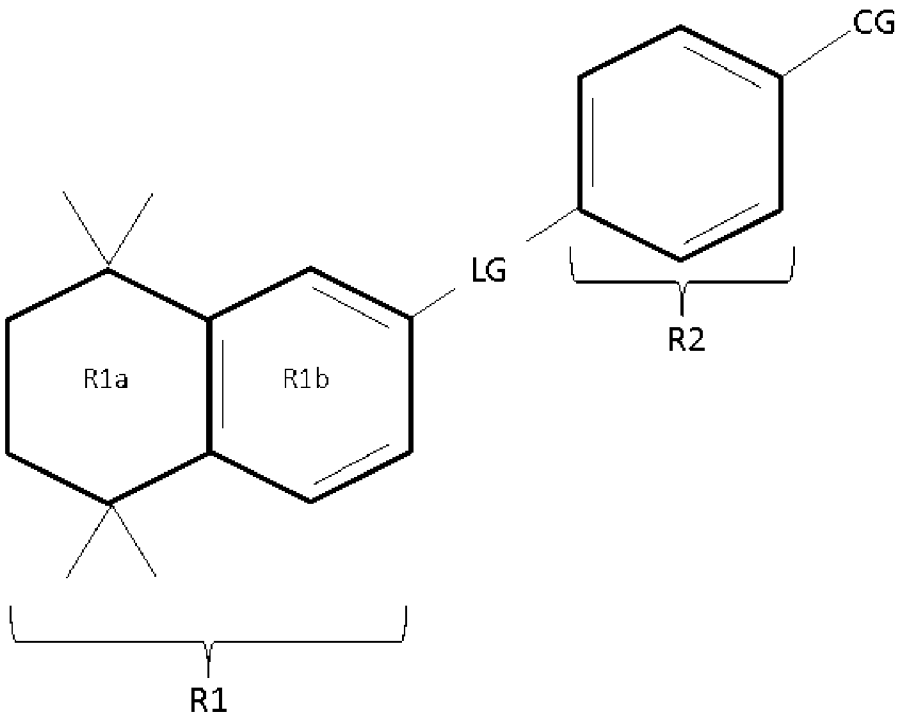
【英文】

AM580 and structurally related compounds have been found to be useful in treating infection by a wide range of RNA and DNA viruses, and also in reducing associated inflammation. This activity is independent of RAR-α signaling, and is not a result of activation of the host's innate immune response. Broad antiviral activity of AM580 and structurally related compounds is a due to modulation of lipogenesis so as to correct disregulation of this pathway in virus-infected cells, via inhibition of nSREPBP.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】廣效型抗病毒治療的組合物及方法

【英文發明名稱】COMPOSITIONS AND METHODS FOR BROAD-SPECTRUM ANTIVIRAL THERAPY

【技術領域】

【0001】本申請案主張於西元 2017 年 10 月 18 日申請之 62／573,933 號之美國臨時案之優先權。這些及所有其他參考的外部材料藉由引用而將其整體併為本文揭露之一部份。當以引用方式併入本文的參考文獻其術語定義或使用與本文的術語定義不一致或是相牴觸時，以本文所提供的定義為準。

【0002】本發明的領域係關於抗病毒治療，特別是關於使用小分子的抗病毒治療。

【先前技術】

【0003】背景描述包括可用於理解本發明的資訊，並非承認本文所提供的任何資訊為先前技術或與目前所請求之發明相關，亦非承認任何被具體或隱含地引用的出版物為先前技術。

【0004】嚴重急性呼吸道症候群（severe acute respiratory syndrome，簡稱 SARS）、A 型流行性流感（pandemic influenza A，即 H1N1）、中東呼吸症候群（Middle East respiratory syndrome，簡稱 MERS）、西部／東部馬腦炎（Western／Eastern equine encephalitis，簡稱 WEE／EEE）、伊波拉病毒感染以及茲卡病毒感染（ZIKV）等流行性病毒疾病分別發生在 2003 年、2009 年、2012 年、2013 年、2014 年及 2016 年。這些傳染病是致命且會傳播的。這些病毒的高毒性及缺乏有效的治療方法持續威脅著全球公共衛生。針對特定病毒來開發特定藥物—所謂傳統的「一病毒一藥（one-bug-one-drug）」—的典範並不足以對付新出現及重新出現的病毒病原體[1]。本文中的所有公開文獻藉由引用納為本文揭露的一部份，如同每個單獨的公開文獻或專利申請案被具體地及單獨地指示藉由引用的方式併入本文中。當併入的參考文獻中術語的定義或用法與本文中提供之術語的定義相違背時，採用本文提供之術語的定義，而不採用該參考文獻中之術語

的定義。開發一系列廣效型抗病毒藥物，以有效控制新型潛在病原體的流行病毒疾病，乃當務之急。這種具有交叉保護（cross-protective）能力的抗病毒藥物能夠在無法快速診斷的情況下迅速用在病毒症候群患者，而盡可能降低潛在流行病或大流行的風險[2]。

【0005】 目前廣效型抗病毒藥劑的開發有兩個主要策略，分別著重在鎖定病毒的感染性以及調節宿主的防禦系統。可以成功降低病毒感染性的候選藥物包括阻斷病毒附著和病毒融合的藥劑（blockers）[3,4]，以及病毒聚合酶抑制劑[5]。然而，由於抗藥性的演變，對病毒單元的特異性限制了這些藥物的長遠應用[6]。此外，I型干擾素（type I interferons，IFN）及IFN誘導的蛋白質會觸發抑制病毒複製的細胞防禦機制。細胞蛋白抑制劑及其相關途徑調節劑會干預病毒的生命週期以抑制其複製適應性（replication fitness）[7,8]。然而，藥物宿主毒性和產生抗性病毒等問題仍有待解決。利巴韋林（Ribavirin）是目前唯一獲得FDA核准的廣效抗病毒治療藥物。然而，這種藥物有許多缺陷（例如，藥物動力學不佳及用藥治療範圍窄（narrow therapeutic windows）），使其無法廣泛適用於臨床環境[9]。

【0006】 病毒為細胞內絕對寄生物（obligatory intracellular parasites）。病毒誘導的脂質代謝重編程（reprogramming）可以顯著影響感染結果，這代表這些過程可以當作廣效型抗病毒治療的目標[10,11]。脂質已長期被認為是病毒和細胞膜的結構元件。動物病毒必須穿過宿主交界（boundaries）才能進出細胞。在套膜病毒（enveloped viruses）中，這個進出細胞的過程是透過感染病毒與細胞膜融合以及新生病毒以出芽方式通過細胞膜而發生。在無套膜病毒中，病毒需要暫時干擾細胞膜（主要是胞內體膜），並將病毒基因組轉移到細胞質中[12]，藉此來進入細胞。在細胞內時，病毒會誘引那些進行基因組複製和組裝的細胞質膜結構和區室。近來的研究指出，脂質是真核生物中的關鍵信號分子，並在細胞內和細胞間傳遞信息[13]。

【0007】 因此，能夠安全又有效治療多種病毒的化合物，仍為現時所需。

【發明內容】

【0008】 本發明提出一種用於治療一病毒感染的化合物，具有通式（1）之

結構，其中 R1 包括一稠環部分（fused ring portion）且 R2 包括一環部分，其中 LG 包括接合 R1 及 R2 的一連接基團，其中 CG 包括一帶電基團，且其中化合物具有一第一活性及一第二活性，第一活性包括降低脂肪生成（lipogenesis）或調節脂質代謝（lipid metabolism），第二活性包括一抗病毒活性。

【0009】本發明更提出一種化合物用於製備一藥物的用途，用於治療一病毒感染，且化合物具有下列通式（1）之結構，其中 R1 包括一稠環部分且 R2 包括一環部分，其中 LG 包括接合 R1 及 R2 的一連接基團，其中 CG 包括一帶電基團，且其中化合物具有一第一活性及一第二活性，第一活性包括降低脂肪生成或調節脂質代謝，第二活性包括一抗病毒活性。

【0010】藉由以下較佳實施例的詳細描述以及附圖將使本發明標的的各種目的、特徵、方面及優點更臻顯著，其中相同的附圖編號表示相同的元件。

【圖式簡單說明】

【0011】圖 1 為 AM580 之化學結構。

【0012】圖 2 為他米巴羅汀（tamibarotene）之化學結構。

【0013】圖 3 描繪了 AM580 作為抗病毒藥物的研究結果，其中顯示了篩檢中東呼吸症候群冠狀病毒抑制劑以及 A 型流感（H1N1）pdm09 病毒抑制劑之最佳病毒感染劑量（MOI conditions）以及時間點。以法匹拉韋（Favipiravir，50 μg／ml）以及雷第思韋（Remdesivir，5 μM）作為陽性控制組。實驗結果係以模擬感染細胞（mock-infected cells）之細胞活性進行標準化。

【0014】圖 4 為一熱圖（heatmap），其顯示出抗中東呼吸症候群冠狀病毒及／或抗流感病毒候選藥物之資料庫篩選（library screening）。其中先以 0.1 病毒感染劑量（MOI）的中東呼吸症候群冠狀病毒感染 Huh7 細胞，並以 0.1 病毒感染劑量的 A 型流感病毒（H1N1）感染 MDCK 細胞，接著在感染後隨即以生物活性脂質化合物（10 μM）或二甲基亞碸（DMSO）載體處理該些細胞。分別在以中東呼吸症候群冠狀病毒感染後 24 小時（24 hours after virus infection，即 24 hpi））以及流感病毒感染後 48 小時測定細胞活性。本實驗係將 DMSO 控制組設定為 0，模擬感染組設定為 1 來對數值進行標準化，並顯示三次獨立篩檢之平均值。

【0015】 圖 5 顯示了如圖 4 所示之抗中東呼吸症候群冠狀病毒抑制劑。

【0016】 圖 6 顯示了如圖 4 所示之抗流感病毒抑制劑。

【0017】 圖 7 為以多週期（multi-cycle）中東呼吸症候群冠狀病毒生長試驗分析 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒能力的分析結果。首先以 0.001 病毒感染劑量的中東呼吸症候群冠狀病毒感染 Huh7 細胞，在感染 1 小時後，以 20 μM 的 AM580 替換 DMEM 中的接種物。以噬斑測定法（plaque assay）在圖所示的不同時間點測定細胞培養上清液中的病毒力價。

【0018】 圖 8 為免疫墨點法分析結果，其顯示 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒的活性。西方墨點法的結果顯示，以 AM580 處理之後，中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白（nucleoprotein，簡稱 NP）的產量降低。在以 1 病毒感染劑量病毒感染後，在指定的時間點收集 Huh7 細胞的裂解產物。本實驗係以 β - 肌動蛋白作為內部對照以及細胞活性的指標。

【0019】 圖 9 為流式細胞術的分析結果，其顯示 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒的活性。以流式細胞術分析中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白陽性的細胞。首先以 0.01 病毒感染劑量的中東呼吸症候群冠狀病毒感染 Huh7 細胞，與 AM580 或 DMSO（控制組）孵育 24 小時後，將細胞分離、固定、透化，並用抗中東呼吸症候群冠狀病毒-核蛋白抗體來染色以進行流式細胞術。圖中顯示的是典型實驗結果。

【0020】 圖 10 為免疫細胞化學染色結果，其顯示 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒的活性。Huh7 細胞的免疫螢光染色中，綠色代表中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白抗原，以及藍色為細胞核。

【0021】 圖 11 為病毒複製分析結果，其顯示 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒的活性。在感染 24 小時後，偵測 A549 細胞（以 0.1 病毒感染劑量感染）、Calu-3 細胞（以 0.1 病毒感染劑量感染）以及 Vero 細胞（以 0.01 病毒感染劑量感染）培養上清液，可得知 AM580 能降低中東呼吸症候群冠狀病毒的複製。

【0022】 圖 12 為病毒複製分析結果，其顯示 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒的活性。在感染 24 小時後，檢測單核細胞衍生的巨噬細胞（簡稱 MDM 細胞，以 0.1 病毒感染劑量感染）以及 THP-1 細胞（以 0.1 病毒感染劑量感染）

後的細胞裂解產物，可得知 AM580 能降低中東呼吸症候群冠狀病毒的複製。

【0023】 圖 13 顯示了被中東呼吸症候群冠狀病毒感染之細胞在有或無以 AM580 處理後，其基因表現分析結果。AM580 降低了在 Huh7 細胞及 MDM 細胞中由中東呼吸症候群冠狀病毒所誘發之促炎細胞因子的上調，圖中顯示了 TNF-α 、IL-1β和 IL-8 等代表性細胞因子標誌物。利用學生 t-檢定來分析僅以中東呼吸症候群冠狀病毒感染以及以中東呼吸症候群冠狀病毒感染再經 AM580 處理的差異。誤差線代表標準差。符號*代表 p 值<0.05。

【0024】 圖 14 顯示 AM580 的抗病毒活性及細胞毒性分析結果。圖中也顯示了 AM580 類似物的結構活性分析結果。上欄顯示了各化合物在不同濃度下（20、5、1.25 及 0 μM）的抗病毒效力，下欄分別簡述其化學結構和生物功能（biological functions）。

【0025】 圖 15 顯示了 AM580 的化學結構，以及所選之對於中東呼吸症候群冠狀病毒感染其 IC_{50}<1 μM 的類似物。

【0026】 圖 16 顯示了 AM580 在類器官（organoids）中的抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性的研究結果。AM580 在人腸類器官（又稱類腸，intestinoid）中展現抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性的能力。此實驗係將先以三重複之方式將中東呼吸症候群冠狀病毒（病毒感染劑量≈0.1）接種於分化的類腸，然後重新包埋在基底膜基質（Matrigel）中並培養在培養液中。在指定的感染後時間點收取類腸、無細胞的基質膠以及培養液，定量其中之病毒量。最後以噬斑測定法來檢測溶解的基質膠及培養液中的病毒力價。

【0027】 圖 17 顯示了 AM580 在類器官（organoids）中的抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性的研究結果。AM580 在人腸類器官（又稱類腸，intestinoid）中展現抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性的能力。此實驗係將先以三重複之方式將中東呼吸症候群冠狀病毒（病毒感染劑量≈0.1）接種於分化的類腸，然後重新包埋在基底膜基質（Matrigel）中並培養在培養液中。在指定的感染後時間點收取類腸、無細胞的基質膠以及培養液，定量其中之病毒產量。最後以即時聚合酶連鎖反應（RT-qPCR）來定量類腸中的絕對病毒量，並用 GAPDH（甘油醛-3-磷酸脫氫酶）mRNA 轉錄物對結果進行標準化。

【0028】 圖 18 顯示了 AM580 在類器官（organoids）中的抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性的研究結果。AM580 在人腸類器官（又稱類腸，intestinoid）中展現抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性的能力。此實驗係將先以三重複之方式將中東呼吸症候群冠狀病毒（病毒感染劑量≈0.1）接種於分化的類腸，然後重新包埋在基底膜基質（Matrigel）中並培養在培養液中。在指定的感染後時間點收取類腸、無細胞的基質膠以及培養液，定量其中之病毒產量。在感染後 24 小時，將以 AM580 (20 μM)或 DMSO (0.1%)處理之類腸進行固定，再以中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白、DAPI 及鬼筆環肽（phalloidin）進行免疫螢光染色，最後將其完整包埋（whole-mounted）並以共聚焦顯微鏡進行 3D 攝影。

【0029】 圖 19 顯示了在肺組織中之 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒能力的免疫細胞化學染色結果，其對經中東呼吸症候群冠狀病毒感染的體外肺組織針對中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白（綠色）進行免疫螢光染色。本實驗先在 37°C 下用每毫升 1×10^8 PFU 之中東呼吸症候群冠狀病毒感染正常的肺組織一小時，或對正常的肺組織進行模擬感染一小時。在感染後 18 小時，將組織固定、進行冷凍保護並冷凍切片。將切片依次染色並用 Carl Zeiss LSM 800 顯微鏡照相。在末端細支氣管的上皮細胞中檢測對核蛋白的免疫反應性（DMSO 組）。AM580（20 μM）之處理顯著地降低了中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白的抗原表現。

【0030】 圖 20 顯示了以動物模型分析 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性的實驗結果。在以 50 PFU 的中東呼吸症候群冠狀病毒感染（challenge）DDP4 轉殖鼠（18 隻／每組）後，施予 DDP4 轉殖鼠 AM580 或 0.1%之 DMSO（安慰劑控制組）兩天。藥物是透過腹膜內途徑施予。接著監測小鼠的存活率或病態跡象 14 天，或是一直監測至小鼠死亡。使用對數－等級（Log-rank，又稱 Mantel-Cox）試驗來分析及比較治療組及控制組之存活率差異，符號**代表 $p<0.01$。

【0031】 圖 21 顯示了以動物模型分析 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性的實驗結果。以存活小鼠之每日體重改變來分析 AM580 的抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性。

【0032】 圖 22 顯示了以動物模型分析 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒

活性的實驗結果。在各組中的 4 隻老鼠於感染後第 2 天和第 4 天實施安樂死，收集其肺組織，並以即時聚合酶連鎖反應來檢測病毒量。結果表示為平均值+標準差。符號**表示與 DMSO 處理組相比其 p 值<0.01（以學生 t 檢驗分析）。

【0033】 圖 23 顯示了以動物模型分析 AM580 抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性的實驗結果，其顯示感染後第 2 天及第 4 天收集的小鼠肺組織中的組織病理學變化。圖中是來自各組肺組織的代表性組織切片，並以蘇木精及伊紅（H&E）染色。

【0034】 圖 24 總結了 AM580 的廣效型抗病毒活性。AM580 對所示病毒展現廣效的抗病毒作用。以噬斑減少測定法來評估 AM580 對中東呼吸症候群冠狀病毒和嚴重急性呼吸系統症候群冠狀病毒（Vero-E6 細胞）、ZIKV（Vero 細胞）、A 型流感病毒（MDCK 細胞）及腸病毒-第 71 型（RD 細胞）的抗病毒活性。以腺病毒-第 5 型（Hep-2 細胞）進行病毒載量減少測定。圖中顯示的是圖示各濃度之組別與沒有化合物的控制組其 PFU 或病毒載量的比較結果（以百分比表示）。

【0035】 圖 25 顯示了 AM580 之抗病毒活性及細胞毒殺的實驗結果。其以噬斑減少法來測定 AM580 對不同病毒的 IC50，但不包含腺病毒-第 5 型病毒（其係使用病毒載量減少法來評估）。

【0036】 圖 26 顯示了 AM580 之抗病毒活性及細胞毒殺的實驗結果。分別評估細胞內的 NAD（P）H-依賴性細胞氧化還原酶（MTT 法）或 ATP 活性（CellTiter-Glo 法）來測定 AM580 在不同細胞株中的 CC_{50}。

【0037】 圖 27 顯示了 AM580 之抗病毒活性及細胞毒殺的實驗結果。圖中顯示了 AM580 對不同病毒之抗病毒治療的選擇性指數（selectivity index）（CC_{50}／IC_{50}）。

【0038】 圖 28 顯示了以動物模型分析 AM580 的廣效型抗病毒活性特性的結果。首先，以 100 PFU 之 A 型流感（H7N9）病毒攻擊 Balb/c 小鼠（18 隻／每組）三天後，再以 AM580、扎那米韋（zanamivir）或 0.1%的 DMSO 來治療這些小鼠。在麻醉後，以鼻內途徑遞送這些藥物。圖中顯示了小鼠存活率。在感染後第 3 天和第 6 天收取小鼠組織樣品。

【0039】 圖 29 顯示了以動物模型分析 AM580 之廣效型抗病毒活性特性的

結果。首先，以 100 PFU 之 A 型流感（H7N9）病毒攻擊 Balb/c 小鼠（18 隻／每組）三天後，再以 AM580、扎那米韋（zanamivir）或 0.1%的 DMSO 來治療這些小鼠。在麻醉後，以鼻內途徑遞送這些藥物。圖中顯示了小鼠的體重變化。在感染後第 3 天和第 6 天收取小鼠組織樣品。

【0040】 圖 30 顯示了以動物模型分析 AM580 之廣效型抗病毒活性特性的結果。首先，以 100 PFU 之 A 型流感（H7N9）病毒攻擊 Balb／c 小鼠（18 隻／每組）三天後，再以 AM580、扎那米韋（zanamivir）或 0.1%之 DMSO 治療這些小鼠。在麻醉後以鼻內途徑遞送這些藥物。圖中顯示了小鼠的肺組織病毒量。在感染後第 3 天和第 6 天收取小鼠組織樣品。

【0041】 圖 31 顯示了在動物模式中對 AM580 之廣效型抗病毒活性之特性分析結果。首先，以 100 PFU 之 A 型流感（H7N9）病毒攻擊 Balb/c 小鼠（18 隻／每組）三天後，再以 AM580、扎那米韋（zanamivir）或 0.1%的 DMSO 來治療這些小鼠。在麻醉後，以鼻內途徑遞送這些藥物。圖中顯示了 H&E 組織病理學的染色結果。在感染後第 3 天和第 6 天收取小鼠組織樣品。

【0042】 圖 32 顯示了 AM580 對 RAR-α 信號傳遞或先天性抗病毒反應影響的實驗結果。首先以 RAR-α 過表現之質體轉染 Huh7 細胞 24 小時，接著再用中東呼吸症候群冠狀病毒感染（0.01 病毒感染劑量）細胞 24 小時。圖中顯示了細胞培養上清液中的病毒量。以西方墨點法來檢測 siRNA 的敲落（knock-down，簡稱 KD）效果，並以 β - 肌動蛋白作為內部對照，來比較野生型（mock 組）以及預處理組（siRNA 敲落或外源基因過表現）之間的差異。

【0043】 圖 33 顯示了 AM580 對 RAR-α 信號傳遞或先天性抗病毒反應影響的實驗結果。首先以 RAR-α 過表現之質體轉染 Huh7 細胞 24 小時，接著再用中東呼吸症候群冠狀病毒感染（0.01 病毒感染劑量）細胞 24 小時。圖中顯示了細胞培養上清液中的病毒量。以西方墨點法來檢測 RAR-α 之過表現，並以 β - 肌動蛋白作為內部對照，來比較野生型（mock 組）以及預處理組（siRNA 敲落或外源基因過表現）之間的差異。

【0044】 圖 34 為 AM580 對 RAR-α 信號傳遞或先天性抗病毒反應影響的實驗結果。由實驗結果來看，合併使用 RAR-α 拮抗劑及 AM580 並不會降低抗

病毒活性。

【0045】圖 35 為 AM580 對 RAR-α信號傳遞或先天性抗病毒反應影響的實驗結果。圖中顯示經基因修改之細胞其螢光素酶檢測法的檢測結果，經基因修改之細胞攜帶編碼有螢光素酶標記的報告構建體（luciferase-labeled reporting constructs）的基因。由螢光素酶檢測法的結果顯示，AM580 並不會抑制啟動子（例如 TK、CMV 及 SV40）的轉活化。

【0046】圖 36 為 AM580 對 RAR-α信號傳遞或先天性抗病毒反應影響的實驗結果。以雙螢光素酶檢測法來評估所示報告基因的表現。IFN-β（100 單位／ml）係作為陽性控制組，用於測量 IFN-β-螢光素酶及 ISRE-螢光素酶的活性。在螢光素酶的測定結果中，AM580（20μM）及 DMSO（0.5%）的濃度是一致的。檢測結果係以二個獨立實驗的平均值+SD 來表示。

【0047】圖 37 為 AM580 對 RAR-α信號傳遞或先天性抗病毒反應影響的實驗結果。AM580 在受中東呼吸症候群冠狀病毒感染之野生型或 RIG-I 缺乏型細胞中，展現出類似的抗病毒活性趨勢。

【0048】圖 38 為 AM580 對中東呼吸症候群冠狀病毒進入及內吞影響的實驗結果。首先，以 AM580（20μM）以及中東呼吸症候群冠狀病毒（2 病毒感染劑量）的混合物處理 Huh7 細胞兩小時，接著密集洗滌，並使細胞從培養盤上分離（dissociation）下來，再以流式細胞術分析中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白陽性細胞。

【0049】圖 39 顯示了 AM580 對 SREBP 依賴性脂質生物合成（lipid biosynthesis）影響的實驗結果。在用 AM580 處理之後，對中東呼吸症候群感染細胞進行脂質體學分析。圖中顯示了根據所列脂質的階層分群分析。每個條棒代表一種脂質，且係以藍色（代表程度較低）至紅色（代表程度較高）表示其經標準化的平均強度，再根據脂質的強度作出圖式上方的樹狀圖。

【0050】圖 40 顯示了如圖 39 所示之 LysoPE（lysophosphatidylethanolamine）（18：0／0：0）代謝物的峰高。利用單因子變異數分析（one-way ANOVA test）來檢驗組間差異。***代表 $p < 0.001$，**代表 $p < 0.01$，*代表 $p < 0.05$。

【0051】圖 41 顯示了如圖 39 所示之 LysoPE（16：0／0：0）代謝物的峰高。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異。***代表 p <0.001，**代表 p <0.01，*代表 p <0.05。

【0052】圖 42 顯示了如圖 39 所示之 LysoPE（16：1／0：0）代謝物的峰高。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異。***代表 p <0.001，**代表 p <0.01，*代表 p <0.05。

【0053】圖 43 顯示了如圖 39 所示之 LysoPE（18：1／0：0）代謝物的峰高。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異。***代表 p <0.001，**代表 p <0.01，*代表 p <0.05。

【0054】圖 44 顯示了如圖 39 所示之 PE（phosphatidylethanolamine）（P-18：0／0：0）代謝物的峰高。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異。***代表 p <0.001，**代表 p <0.01，*代表 p <0.05。

【0055】圖 45 顯示了如圖 39 所示之 Lyso-PC（lysophosphatidylcholine）（0：0／16：1）代謝物的峰高。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異。***代表 p <0.001，**代表 p <0.01，*代表 p <0.05。

【0056】圖 46 顯示了如圖 39 所示之 Lyso-PC（16：1／0：0）代謝物的峰高。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異。***代表 p <0.001，**代表 p <0.01，*代表 p <0.05。

【0057】圖 47 顯示了如圖 39 所示之 PC（18：1／20：1）代謝物的峰高。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異。***代表 p<0.001，**代表 p <0.01，*代表 p <0.05。

【0058】圖 48 顯示了如圖 39 所示之 PC（20：1／18：3）代謝物的峰高。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異。***代表 p <0.001，**代表 p <0.01，*代表 p <0.05。

【0059】圖 49 顯示了如圖 39 所示之 PE（38：4）代謝物的峰高。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異。***代表 p <0.001，**代表 p <0.01，*代表 p <0.05。

【0060】圖 50 顯示了如圖 39 所示之 PE（38：5）代謝物的峰高。利用單

因子變異數分析來檢驗組間差異。***代表 p <0.001，**代表 p <0.01，*代表 p <0.05。

【0061】圖 51 顯示了 AM580 對 SREBP 依賴性脂質生物合成（lipid biosynthesis）影響的實驗結果。AM580 降低了細胞脂滴（lipid droplets，簡稱 LDs）之水平。在實驗中，在培養皿中存有 0.1%的 DMSO 或 20μM 之 AM580 的情況下，以 0.01 病毒感染劑量的中東呼吸症候群冠狀病毒來感染 Huh7 細胞 24 小時，或對 Huh7 細胞模擬感染 24 小時。接著固定細胞，並以 DAPI 及 BODIPY 493／503 染色。

【0062】圖 52 顯示了 AM580 對 SREBP 依賴性脂質生物合成的影響。AM580 降低了細胞膽固醇之水平。將 Huh7 細胞固定，並以能夠專一性地結合游離膽固醇的非律平（filipin，藍色）進行染色。

【0063】圖 53 顯示了以中東呼吸症候群冠狀病毒感染的細胞有或無經過 AM580 處理後其基因表現。以即時聚合酶連鎖反應來分析脂肪酸合成途徑中多個基因的表現。利用學生 t-檢定來統計中東呼吸症候群冠狀病毒組以及經過 AM580 處理之中東呼吸症候群冠狀病毒組之間的差異。誤差線代表標準差。*代表 p 值<0.05。

【0064】圖 54 顯示了以中東呼吸症候群冠狀病毒感染的細胞有或無經過 AM580 處理後其基因表現。以即時聚合酶連鎖反應來分析膽固醇合成途徑中多個基因的表現。利用學生 t-檢定來統計中東呼吸症候群冠狀病毒組以及經過 AM580 處理之中東呼吸症候群冠狀病毒組之間的差異。誤差線代表標準差。*代表 p 值<0.05。

【0065】圖 55 顯示了 siRNA 敲落（siRNA knockdown）對病毒複製之影響的研究結果。以 siRNA 進行的 SREBP1 或 SREBP2 敲落降低了中東呼吸症候群冠狀病毒的複製。實驗中先用 75nM 之 SREBP1、SREBP2 或 scramble 控制組 siRNA 連續轉染 Huh7 細胞兩天。以西方墨點法來評估敲落的效率。以 0.01 病毒感染劑量的中東呼吸症候群冠狀病毒感染經 siRNA 處理的細胞。在感染後 24 小時，利用 qPCR 分析來評估細胞培養上清液中的病毒載量。符號*表示與 siRNA 控制組相比，p<0.05。

【0066】 圖 56 顯示了 AM580 以及過度誘發 n-SREBP 對病毒複製的結果。在 AM580 存在下，過量誘發內源性 n-SREBP1 或 n-SREBP2 會拯救（rescue）中東呼吸症候群冠狀病毒複製。在此實驗中，首先將 Huh7 細胞孵育在含有 5% LPDS 及 10 μM 美伐他汀（mevastatin）的培養液中 16 小時，使 Huh7 細胞之固醇被耗盡—亦即使細胞處於飢餓（starvation）狀態。收取細胞並將其裂解以製備核破片（nuclear fractions），然後以西方墨點法分別檢測 n-SREBP1 及 n-SREBP2。飢餓的細胞是在指定的病毒感染劑量下以中東呼吸症候群冠狀病毒進行感染，並用 AM580（10 μM）處理 24 小時。使用 qPCR 分析定量細胞培養上清液中的病毒載量。使用學生 t-檢定來分析有或無進行細胞飢餓處理的各組間差異。

【0067】 圖 57 顯示了 n-SREBP 修飾抑制劑對於病毒複製的影響的研究結果。n-SREBP 修飾抑制劑 PF 429242 及樺木醇（betulin）展現出抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性。在此實驗中，先以中東呼吸症候群冠狀病毒感染 Huh7 細胞，並用指定濃度的化合物處理。24 小時後，通過 qPCR 來分析上清液中的病毒載量。符號*表示與 0 μM 組比較，p 值<0.05。

【0068】 圖 58 顯示了 AM580 對於 n-SREBP 與 SRE 結合的影響。AM580 阻礙了 n-SREBP1 與 SRE 結合。此實驗先將含有 SRE 對 SREBP1 有專一性的雙股 DNA（dsDNA）序列固定在 96 孔板的孔中。將 Huh7 核萃取物與作為陽性對照組的競爭 dsDNA、樺木醇（50 μM）或 AM580（20 μM）一起加入。根據製造商的說明書來檢測已結合的 SREBP-1。符號*表示與沒有加入藥物的模擬對照組比較時，p<0.05。

【0069】 圖 59 顯示了 AM580 對於 n-SREBP 與 SRE 結合的影響。SREBP2 的 DNA 結合能力測定結果，顯示 AM580 以劑量依賴性的方式抑制 SRE 與 SREBP2 結合。

【0070】 圖 60 顯示了 AM580 對於 n-SREBP 與 SRE 結合的影響。在此實驗中，將經 SRE 固定的孔與指定濃度的 AM580 一起孵育 2 小時，並在加入核萃取物前密集洗滌。或者，先將 AM580 與等量的核萃取物一起預孵育 2 小時，然後再加入檢測孔中。結果發現 AM580 會與 n-SREBP1 結合，而不是與 SRE 結合。

【0071】圖 61 顯示了 AM580 的分子嵌合（molecular docking）的研究結果。AM580 被預測會佔據 SREBP1 和 SREBP2 的 SRE 識別位點。圖中顯示的是 3D 分子嵌合分析結果。SREBP 上的潛在相互作用表面為紅色，而 AM580 以棒狀及網格之形式表示。圖式的下方顯示了人類和小鼠之 SREBP1 和 SREBP2 的 DNA 結合部位的部分序列比對。AM580 結合的關鍵殘基 Tyr335 係以方框特別表示，且這個關鍵殘基 Tyr335 為完全保守。

【0072】圖 62 顯示了 AM580 的分子嵌合研究結果。嵌合分析結果預測出 SREBP1 上會與 AM580 產生相互作用的關鍵胺基酸殘基。

【0073】圖 63 顯示了 n-SREBP1 之突變對 AM580 結合的結果。首先將截短的（truncated）n-SREBP1（野生型）及其突變質體構建體 Y335R 轉染至 HEK293T 細胞 48 小時，接著進行核萃取並測量 DNA 結合強度。用學生 t 檢驗分析野生型組和 Y335R 組之間的差異。*代表 $P<0.05$。分析結果發現 Tyr335 對 n-SREBP1 結合活性至關重要。

【0074】圖 64 顯示了 AM580 類似物的抗病毒活性實驗結果。化學修飾的化合物 AM580，疊氮基-AM580（azido-AM580，一種經化學修飾的 AM580 化合物）在經中東呼吸症候群冠狀病毒感染的 Vero 細胞和 Huh7 細胞中展現出類似的抗病毒效力。

【0075】圖 65 顯示了以 AM580 類似物處理的細胞螢光照片。先用疊氮基-AM580（20 μM）處理 Huh7 細胞 6 小時，將細胞固定、透化並用 DyLight™ 488-膦、DAPI 及鬼筆環肽（phalloidin）進行免疫螢光染色以進行共聚焦攝影。由於缺乏磷化氫專一性的疊氮基，因此將 AM580 作為控制組。

【0076】圖 66 顯示了 AM580 衍生的光親和探針（AM580-derived photoaffinity probe，AM580dp）的結構，其顯示出具有特定功能的指定基團位置。疊氮基-AM580 係藉由疊氮基-PEG5-胺與 AM580 之間的反應所產生。藉由加入三官能交聯劑（2-{N2-[Nα-苯甲醯基苯甲醯胺基-N6-6-生物素醯胺基己醯基]離胺酸醯胺基}乙基-2'-(N磺基琥珀醯亞胺基羧基)乙基二硫化物鈉鹽，2-{N2-[Nα-benzoylbenzoicamido-N6-6-biotinamidocaproyl]lysinylamido}ethyl-2’ -(N sulfosuccinimidylcarboxy) ethyl disulfide sodium salt，Santacruz）與甲基 4-[2-[2-

（2-胺基乙氧基）乙氧基]乙基胺基甲醯基]-2-二苯基膦基-苯甲酸酯（methyl 4-[2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethylcarbamoyl]-2-diphenylphosphanyl-benzoate），然後再加入疊氮基-AM580 來合成 AM580dp。

【0077】圖 67 顯示了使用如圖 66 中所示的 AM580 類似物所進行的親和力結合實驗結果。首先將 AM580dp 固定在鏈親和素小珠（streptavidin beads）上，並與經野生型或 Y335R 構築體轉染的細胞其裂解產物一起孵育。在 UV 曝照下活化交聯（點擊化學反應，click chemistry）之後，藉由其生物素標籤下拉（pulled down）已結合 AM580dp 的蛋白質複合物。使用抗-flag 及 n-SREBP1 專一性抗體，透過西方墨點法來檢測 n-SREBP1，RAR-α 是當作下拉分子中的陽性對照蛋白，而疊氮基-AM580 當作陰性對照，來排除非專一性的結合。

【0078】圖 68 顯示了經 AM580 處理後轉錄活化的研究結果。攜有 HMGCS-啟動子-螢光素酶報導構築體及 FAS-啟動子-螢光素酶報導構築體的細胞與藥物接觸後，會喪失螢光素酶活性，這代表 AM580 抑制了 HMGCS 和 FAS 的轉錄活化。

【0079】圖 69 為一示意圖，其顯示了 n-SREBP 的修飾過程、下游途徑、已知受影響的病毒家族以及用於研究 AM580 對脂肪生成酶影響的控制抑制劑。

【0080】圖 70 顯示了經 AM580 處理對脂肪生成及病毒複製影響的實驗結果。此研究在無（白色長條）或有（灰色長條）補充外源性棕櫚酸酯（exogenous palmitate，100 μM）下，用 DMSO（0.1%）或 C75（10 μM）或 AM580（20 μM）處理已感染中東呼吸症候群冠狀病毒的 Huh7 細胞（0.01 病毒感染劑量）。圖中顯示了感染後 24 小時的病毒產量。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異，結果發現外源性棕櫚酸酯會拯救經過 AM580 處理的細胞中其中東呼吸症候群冠狀病毒複製量。

【0081】圖 71 顯示了 AM580 處理對脂肪生成及病毒複製影響的實驗結果。此研究在無（白色長條）或有（紅色長條）補充外源性棕櫚酸酯（100 μM）下，用 DMSO（0.1%）或 C75（10 μM）或 AM580（20 μM）處理已感染 A 型流感病毒（H1N1，0.001 病毒感染劑量）的 MDCK 細胞。圖中顯示了感染後 24 小時的病毒產量。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異，結果發現外源性棕櫚

酸酯會拯救經過 AM580 處理的細胞中其 A 型流感病毒（H1N1）複製量。

【0082】圖 72 顯示了 AM580 處理對脂肪生成及病毒複製影響的實驗結果。此研究在無（白色長條）或有（藍色長條）補充外源性棕櫚酸酯（100 μM）下，用 DMSO（0.1%）或 C75（10 μM）或 AM580（20 μM）處理已感染腸病毒-71 型（0.001 病毒感染劑量）的 RD 細胞。圖中顯示了感染後 24 小時的病毒產量。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異，結果發現外源性棕櫚酸酯會拯救經過 AM580 處理的細胞中其腸病毒-71 型病毒複製量。

【0083】圖 73 顯示了 AM580 處理對脂肪生成及病毒複製影響的實驗結果。此研究在無（白色長條）或有（灰色長條）補充外源性棕櫚酸酯（100 μM）下，用 DMSO（0.1%）或 C75（10 μM）或 AM580（20 μM）處理已感染人類腺病毒-第 5 型（0.01 病毒感染劑量）的 HEp-2 細胞。圖中顯示了感染後 24 小時的病毒產量。利用單因子變異數分析來檢驗組間差異。結果發現外源性棕櫚酸酯會拯救經過 AM580 處理的細胞中其人類腺病毒-第 5 型複製量。

【0084】圖 74 顯示 AM580 處理對形成雙膜囊泡（簡稱 DMVs）的影響。先以中東呼吸症候群冠狀病毒感染 Vero 細胞，並在有或無 AM580 的情況下孵育 18 小時。接著用戊二醛固定細胞沉澱物（cell pellet），並經處理以進行電子顯微鏡觀查。未經處理的病毒感染細胞其細胞核周圍出現成群的雙膜囊泡（紅色方框），以 AM580（20 μM）處理的細胞則未見雙膜囊泡。所示的每張代表性影像是從兩個獨立的實驗中擷取超過 30 個圖像中所選出。由此結果可知 AM580 會抑制雙膜囊泡形成。

【0085】圖 75 顯示了 AM580 處理對於棕櫚酸酯化作用的實驗結果。先以來自 A 型流感（H1N1）病毒的 HA 質體轉染 A549 細胞。接著在轉染後 5 小時，以 DMSO（0.1%）或 5 μM2-BP（陽性對照抑制劑）或 20 μM 的 AM580 處理，並在 24 小時後收取細胞裂解物。使用西方墨點法分析不同組別的 HA 總量（輸入）和棕櫚酸酯化的 HA。以 β-肌動蛋白作為內部對照。由結果可知，AM580 會減少病毒蛋白的棕櫚酸酯化。

【0086】圖 76 顯示了 2-BP 對病毒複製的影響的實驗結果。先以 0.001 病毒感染劑量的 A 流感病毒（H1N1）感染 MDCK 細胞，並以所示的無毒性濃度

的化合物處理。在感染 24 小時後，藉由標準噬斑測定來分析上清液中的病毒力價。由結果可看出，2-BP 減少 A 流感病毒（H1N1）的複製，2-BP 還減少了 Huh7 細胞中中東呼吸症候群冠狀病毒的複製。符號**表示與 0 μM 相比， $p<0.01$。所有數據均是代表兩次獨立實驗的平均值與標準差。

【實施方式】

【0087】 以下的描述包括可用於理解本發明的資訊。其並非承認本文提供的任何資訊為先前技術或與目前所請求之發明相關，亦非承認任何被具體或隱含地引用的出版物是先前技術。

【0088】 本發明的主題提供了裝置、系統和方法，其中利用干擾脂肪生成的小分子在體外和體內展現廣效型抗病毒活性。發明人已發現調節細胞脂質代謝來干擾病毒增殖可以做為抗病毒治療的廣效型方法。不希望受理論束縛，發明人認為擾亂脂肪生成和／或脂質代謝，能減少和／或降低病毒適應性（virus fitness）。透過藥理學篩選可以從生物活性的脂質資料庫尋找出有潛力的抗病毒抑制劑。舉例而言，AM580（被稱為類視黃醇衍生物，參見圖 1）經發現在體外和體內展現出有效且廣效的的抗病毒活性。結構-活性分析（structure-activity analyses）進一步證實了他米巴羅汀（AM580 的類似物，圖 2，可以有效的抑制中東呼吸症候群冠狀病毒的複製。這些化合物可以與其他調節脂質代謝的化合物和／或抗病毒化合物一起使用。

【0089】 藉由以下較佳實施例的詳細描述以及附圖將使本發明標的的各種目的、特徵、方面及優點更臻顯著。以下的討論提供本發明主題的許多示例實施例。雖然每個實施例代表本發明元件的單一組合，但本發明標的被認為是包括所公開元件的所有可能組合。因此，即使不是明確地被揭露，如果一個實施例包括元件 A、B 及 C，且第二個實施例包括元件 B 及 D，則本發明標的也被認為是包括 A、B、C 或 D 的其他剩餘組合。

【0090】 在一些實施例中，用於描述及要求保護本發明的某些實施態樣表示成分量、性質（如濃度，反應條件等）的數字，應被理解為在一些情況下被術語「約」所修飾。因此，在一些實施例中，本說明書及其所附權利要求中提出的數值參數是近似值，其可以根據特定實施例所試圖獲得的期望特性而改變。在一

些實施例中，應該根據所記載的有效位數並應用一般的數值簡化技術來解釋數值參數。儘管闡述本發明的一些實施例的寬泛範圍的數值範圍及數值參數是近似值，但是在具體實例中所提出的數值則是盡可能地精確記載。在本發明的一些實施例中所呈現的數值可能包含某些誤差，其係由存在於其各自試驗測量中的標準偏差所必然導致。

【0091】 除非上下文另外明確指出，用於本文中以及隨後的權利要求中，的術語「一」（a、an）及「該」（the）的含義包括複數形式。而且，除非上下文另外明確指出，用於本文描述中的術語「在...中」（in），的含義包括「在...中」（in）及「在...上」（on）。

【0092】 本發明中數值範圍的敘述僅意在作為一一指稱各個落在該範圍內的單獨數值的簡寫方法。除非另有說明，在範圍內的每個單獨數值皆被納為本說明書揭露之一部分，如同其於本文中一一被指稱。除非另有說明或者與上下文明顯矛盾，本發明所述的所有方法可以以任何適合的順序進行。在本發明某些實施例中使用的任何和所有範例或示範性語詞（例如「舉例來說」）僅旨在更清楚的說明本發明，並非限制本發明所要求的保護範圍。說明書中的任何語詞不應解釋為未見於申請專利範圍中但為實施本發明的必要元素。

【0093】 本文所揭露之替代元件或實施例之群組不應解釋為本發明之限制。每個群組成員可被單獨地提及和要求保護，或者係以與該群組內其他成員或本文中其他元件任意結合的方式被提及和要求保護。基於便利性及／或專利性的理由，群組中之一個或多個成員可以納入在群組中或自群組中刪除。 當發生任何前述之納入或刪除的情況時，說明書應被視為包括修改後之群組，從而滿足所附之申請專利範圍中使用的所有馬庫西式群組之書面說明要件。

【0094】 在一些實施例中，廣效型抗病毒化合物可以是類視黃醇或類視黃醇的衍生物。適當的類視黃醇衍生物包括 AM580、他米巴羅汀和／或貝沙羅汀。該化合物可以用口服、胃腸外投予、注射、輸注和／或透過黏膜吸收等方式來提供。其劑型可以為溶液、懸浮液、注射劑、丸劑、錠劑、膠囊和／或栓劑的形式。在一些實施例中，藥物還可包括醫藥上可接受的載體和／或另一種醫藥活性化合物。這種醫藥活性化合物可以是另一種抗病毒化合物，例如利巴韋林。在其他

實施例中，醫藥活性化合物可具有抵抗病毒感染症狀或後遺症的活性，例如消炎藥，止吐藥，止痛藥和／或抗生素。

【0095】 當本發明概念的類視黃醇衍生物與其他一或多種醫藥活性化合物合併使用時，能觀察到協同（即大於加成）效應。舉例而言，當合併使用有效IC50當量的AM580與洛匹那韋來抵抗中東呼吸症候群冠狀病毒時，若其分率抑制濃度指數（Fractional Inhibitory Concentration index，FICI）小於0.5時，則代表存在協同效應。

合併比例	IC50當量[a]		FICI[b]
AM580：Lopinavir	AM580	洛匹那韋	
10:1	0.21	0.05	0.26*
5:1	0.39	0.07	0.46*
1:1	012	0.12	0.24*
1:5	0.09	0.34	0.43*
1:10	0.07	0.39	0.46*

[a] IC_{50}當量（濃度）是將藥物合併使用時的IC_{50}除以藥物單獨使用時的IC_{50}而算出的標準化濃度。

[b] FICI是各組別中A580和洛匹那韋IC_{50}當量濃度的總和。

* FICI < 0.50 代表有顯著的協同效應。

表 1

【0096】 本發明構思的另一個實施例是治療病毒感染的方法，該方法係藉由投予降低脂肪生成和／或干擾或以其他方式調節脂質代謝的化合物，和／或使用這樣的化合物來配製廣效型（即一種以上的病毒株或物種）抗病毒活性的藥物來完成。適用的病毒可包括中東呼吸症候群-冠狀病毒、嚴重急性呼吸道症候群-冠狀病毒、茲卡病毒，A型流感病毒（例如，A型流感（H1N1）pdm09、A型流感病毒（H5N1）和A型流感病毒（H7N9））、人類腺病毒（例如人類腺病毒5）及腸病毒（如腸病毒-第71型）。在一些實施例中，化合物可以是類視黃醇

或類視黃醇的衍生物。合適的類視黃醇衍生物包括 AM580、他米巴羅汀和／或貝沙羅汀。該化合物可以用口服、胃腸外投予、注射、輸注和／或透過黏膜吸收等方式投予。劑型可以為溶液、懸浮液、注射劑、丸劑、錠劑、膠囊和／或栓劑的形式。在一些實施例中，藥物還可包括醫藥上可接受的載體和／或另一種醫藥活性化合物。這種醫藥活性化合物可以是另一種抗病毒化合物，例如利巴韋林。在其他實施例中，醫藥活性化合物可具有抵抗病毒感染症狀或後遺症的活性，例如消炎藥，止吐藥，止痛藥和／或抗生素。

【0097】 在這樣的實施例中，該方法可以包括給藥方案，其以有效減少或控制病毒感染的劑量和頻率來提供製劑。這樣的給藥方案可以提供減少脂肪生成和／或干擾或以其他方式調節脂質代謝的化合物，其量為每劑量 1 μg／kg 體重至 100mg ／ kg 體重。這樣的給藥方案可以持續輸注的方式給藥，或者可以定期給藥。合適的定期給藥方案可以在每 4 小時一次至每週一次或更長的頻率範圍內提供製劑。

【0098】 應當理解的是，所揭露的技術具有許多有利的技術效果，包括提供廣效型抗病毒化合物，其可以減少特定病毒株的檢測需求，並縮短後續對有效治療的延遲。

【0099】 在本發明構思的一個實施例中，減少脂肪生成和／或干擾或以其他方式調節脂質代謝的化合物至少為製劑的一部分，該製劑具有廣效型（即多於一種病毒株或物種）抗病毒活性。適用的病毒可包括中東呼吸症候群- 冠狀病毒、嚴重急性呼吸道症候群-冠狀病毒、茲卡病毒，A 型流感病毒（例如，A 型流感（H1N1）pdm09、A 型流感病毒（H5N1）和 A 型流感病毒（H7N9））、人類腺病毒（例如人類腺病毒 5）及腸病毒（如腸病毒-第 71 型）。在一些實施例中，化合物可以是類視黃醇或類視黃醇的衍生物。合適的類視黃醇衍生物包括 AM580、他米巴羅汀和／或貝沙羅汀。

【0100】 為了測試抗病毒化合物，發明人研究出細胞活性比色法，其對篩選可抑制中東呼吸症候群冠狀病毒和／或 A 型流感（H1N1）pdm09 病毒感染所產生的細胞病變效應（cytopathic effect，簡稱 CPE）的化合物有最佳化。為了盡可能地區分藥物處理組和未處理組之間的細胞活性，本文測試多種感染劑量

（MOI）和活性測試時間點的組合。以高病毒感染劑量進行病毒感染，可能影響抗病毒活性並縮短藥物篩選的空窗期。另一方面，低病毒感染劑量則可能需要多輪的病毒複製時間才能區分藥物功效，這反而會導致藥物因細胞代謝而降解。實驗採用 Huh7 和 MDCK 細胞，因為這些細胞可以分別穩定地維持中東呼吸症候群冠狀病毒和 A 型流感病毒的複製。由於 GS5734（雷第思韋，Remdesivir）和 T-705（法匹拉韋，Favipiravir）分別對冠狀病毒[20]及 A 型流感病毒[21]有顯著的抗病毒效力，因此將它們作為陽性對照抑制劑。將 0.1 病毒感染劑量及感染後 24 小時之時間點（hpi）訂定為適合進行抗中東呼吸症候群冠狀病毒篩選之劑量及時間點組合，而抗流感抑制劑之篩選的劑量及時間點組合被訂定為 0.01 病毒感染劑量及 48hpi（參見圖 3）。基於最佳化的條件，對含有 189 種生物活性脂質的資料庫進行初步篩選，接著進行劑量依賴性分析，以驗證候選化合物，並區分其優先順序（參見圖 4）。

【0101】值得注意的是，化合物 AM580 會保護細胞，使其免受中東呼吸症候群冠狀病毒和 A 型流感（H1N1）pdm09 病毒之感染。芳香烴受體（aryl hydrocarbon receptor，簡稱 AhR）促效劑 FICZ 和細胞凋亡調節傳信子 C16 神經醯胺特異性地保護 MDCK 細胞免受 A 型流感（H1N1）pdm 病毒之感染，而具有抗發炎效果的脂質代謝產物 25-羥基維生素 D3（25-Hydroxyvitamin D3）會保護 Huh7 細胞免受中東呼吸症候群冠狀病毒感染（參見圖 5 和 6）。已確認 AM580 對兩種病毒都展現出細胞保護作用，選定 AM580 以進行後續特性分析。

【0102】以中東呼吸症候群冠狀病毒感染作為實驗模型，發明人分析了 AM580 在細胞培養物中的抗病毒活性。進行多循環病毒生長試驗以繪製在 AM580 存在或不存在的情況下其病毒的複製動力學圖譜。在感染後 18、24、36、42 及 48 小時（“hpi”）的指定時間點，與 DMSO 陰性對照組相比，AM580 處理使細胞上清液中的病毒力價降低了 >3 log（參見圖 7）。特別的是，在整個實驗過程中，AM580 組中的感染性斑塊形成單位（plaque-forming units，簡稱 PFU）被限制在基線水平，這代表 AM580 在感染的初期就高效地抑制了中東呼吸症候群冠狀病毒。此外，從西方墨點法的結果看出，在添加 AM580 後，中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白（NP）的表現量明顯降低，特別是在感染後 9 小時有明顯

降低（參見圖 8）。

【0103】 在 AM580 處理後，以流式細胞術來確定感染中東呼吸症候群冠狀病毒的細胞百分比。實驗首先用 0.01 病毒感染劑量的中東呼吸症候群冠狀病毒來感染 Huh7 細胞，並在添加或不添加 20 μM AM580 的情況下孵育 24 小時。如圖 9 所示，中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白陽性細胞從 65%（DMSO 組）下降至 5.38%（AM580 組），代表 AM580 有效地阻斷了後代病毒的產生。對以中東呼吸症候群冠狀病毒感染的 Huh7 細胞進行中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白的免疫螢光染色結果可看出，在 AM580 處理後，病毒感染幾乎完全地受到抑制（參見圖 10），這也證實了流式細胞的分析結果。

【0104】 此外，研究還發現 AM580 會減少多種細胞類型中的中東呼吸症候群冠狀病毒複製，包括肺（A549 和 Calu-3）、腎（Vero-E6）及免疫細胞（THP-1 和人類原代單核細胞-衍生的巨噬細胞（monocyte-derived macrophages，MDMs），參見圖 11 和 12）。研究還發現 AM580 會抑制 Huh7 細胞和 MDM 細胞中病毒誘發的促炎細胞因子活化（參見圖 13）。總體而言，AM580 在細胞培養環境中會展現出抗中東呼吸症候群活性與細胞保護作用以及抑制病毒複製及抗發炎反應。

【0105】 為了篩選具有提高生物利用度及抗病毒效力的 AM580 類似物，測試了十三種與 AM580 結構相似的化合物其抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性。結果發現，他米巴羅汀和貝沙羅汀的抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性與 AM580 相當，他米巴羅汀和貝沙羅汀的 IC50 分別為 320±26nM 和 875±15nM（參見圖 14）。應當理解的是，這三種化合物之結構高度相似，且這三種化合物在橋接基（bridging group）的一側有四氫化萘基團，而在另一側有苯甲酸基團（參見圖 15）。這三種化合物之間的明顯差異在於連接四氫化萘及苯甲酸基團的中央橋接基團。具體而言，AM580 和他米巴羅汀都用醯胺鍵連接，只是方向相反。而貝沙羅汀在這個位置有乙烯。不希望受理論束縛，發明人認為這些分子中的四氫化萘和苯甲酸基團在對抗病毒效力中可能扮演重要和／或關鍵的角色。

【0106】 透過三維培養的人類器官已經本質上使人類傳染病的研究更加進步[22]。發明人已經建立了人類腸道類器官（類腸）中的中東呼吸症候群冠狀

病毒感染和複製動力學模型並分析其結果，在人類腸道類器官中含有人類腸道中的大部分類型的上皮細胞，以模擬體內環境的形態和功能特性[23]。發明人評估了 AM580 在此人類類器官系統中的抗病毒效力。在接種 0.1 病毒感染劑量的中東呼吸症候群冠狀病毒後，類腸在基底膜基質（Matrigel）及上清液中的感染病毒力價穩定地增加（即分別在感染後 24 小時及感染後 48 小時增加約 3 $\log_{10}$ 和 4 $\log_{10}$），並在類腸中檢測到大量的病毒複製情況（參見圖 16 和 17）。AM580 處理會顯著地（$p < 0.05$）減少細胞內及細胞外的中東呼吸症候群冠狀病毒複製。在感染後 48 小時，在經 AM580（20μM）處理的類腸培養上清液中並未檢測到 PFU，且相對於 DMSO 處理的類腸控制組，AM580 處理組（20μM）的病毒力價減少約 6 $\log_{10}$PFU ／ ml（參見圖 16）。此外，經 AM580 處理的類腸，其形態保持完整，沒有表現出在 DMSO 處理的類腸控制組中所出現的被中東呼吸症候群冠狀病毒誘發的 CPE（參見圖 18）。與 DMSO 處理的類腸控制組相比，經 AM580 處理的類腸中病毒核蛋白的表現明顯降低，證實了類腸中 AM580 對中東呼吸症候群冠狀病毒的抑制作用（參見圖 18）。另外，由體外人類肺器官培養模式可見，AM580 處理會導致末端細支氣管上皮細胞中的中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白其表現明顯降低（參見圖 19）。很明顯的是，AM580 強烈地抑制人類肺內和肺外組織中中東呼吸症候群冠狀病毒的病毒複製。

【0107】 為了評估 AM580 在體內的抗病毒活性，發明人欲確認在以人類 DPP4（hDPP4）-轉殖小鼠所建立的小鼠模式中，藥物化合物是否會保護小鼠免受中東呼吸症候群冠狀病毒及 A 型流感病毒的致命攻擊[23]。如圖 20 所示，在用 50 PFU 的中東呼吸症候群冠狀病毒攻擊的 hDPP4-轉殖小鼠中，以腹膜內方式注射 AM580 3 天後，10 隻小鼠皆全數存活（100%），而注射 PBS 的組別僅有 3／10（30%）的小鼠存活（$p < 0.01$）。經 AM580 處理的小鼠其平均體重也普遍高於 DMSO 處理的控制小鼠的平均體重（參見圖 21）。

【0108】 在攻擊後第 2 天和第 4 天對每組中的四隻小鼠實施安樂死，以對其進行病毒學和組織學分析。在兩個時間點，與 DMSO 處理的控制小鼠相比，經 AM580 處理的小鼠在其肺組織中的病毒 RNA 含量顯著（$p < 0.01$）較低。類似地，在攻擊後第 4 天，經 AM580 處理的小鼠其腦組織的病毒 RNA 含量幾乎

檢測不到，並且比 DMSO 處理的對照組的病毒 RNA 含量低 4-log_{10}（參見圖 22）。組織病理學檢查可看出，相對於 DMSO 處理的對照組小鼠，經 AM580 處理的小鼠其肺組織中的肺泡損傷和間質炎性浸潤情況有顯著改善（參見圖 23）。總之，這些結果證明 AM580 會抑制體內中東呼吸症候群冠狀病毒複製和病毒相關病理學，以有效地保護 hDPP4 轉殖小鼠免受中東呼吸症候群冠狀病毒的致死攻擊。

【0109】 發明人還分析了 AM580 對其他病毒病原體的抗病毒作用，包括 RNA 病毒（例如嚴重急性呼吸系統症候群冠狀病毒、茲卡病毒（ZIKV）、流感病毒（例如 A 型流感（H1N1）pdm009 病毒）和腸道病毒（如腸道病毒-A71（EV-A71））及 DNA 病毒（例如人腺病毒 5 型（腺病毒-第 5 型））。令人驚訝的是，AM580 在奈莫耳至微莫耳濃度範圍內，會以劑量依賴性方式來抑制所有這些各種病毒的複製（參見圖 24 和 25）。甲基噻唑四唑（MTT）及 CellTiter-Glo 測定的分析結果可看出 AM580 在不同的細胞株（包括源自人類及非人類來源的細胞株）中的細胞毒性類似（約 100μM 至 200μM，參見圖 26）。重要的是，AM580 的選擇性指數對所測試的病毒，特別是中東呼吸症候群冠狀病毒（507）、嚴重急性呼吸系統症候群冠狀病毒（114）及 A 型流感（H1N1）pdm09 病毒（159）來說剛好夠高，其因此使臨床上的使用有理想的安全區間（參見圖 27）。整體而言，已發現 AM580 有針對 RNA 和 DNA 病毒的廣效型抗病毒活性，以及適當的醫藥特性。

【0110】 本發明還使用野生型 Balb／c 小鼠模型來評估 AM580 對高致病性 A 型流感（H7N9）病毒的抗病毒活性，該病毒是比 A 型流感病毒（H1N1）pdm09 更具毒性的一種亞型。在被 100 PFU 的 A 型流感（H7N9）病毒攻擊的小鼠中，相較於 DMSO 處理的對照組小鼠（0／10，0%），經 AM580 處理的小鼠其存活率顯著更高（6／10，60%，參見圖 28，$p < 0.01$）。從攻擊後第 8 天開始，經 AM580 處理的小鼠其平均體重逐漸回升（參見圖 29）。經 AM580 處理的小鼠其肺組織中的平均病毒 RNA 量顯著低於 DMSO 處理的對照組小鼠肺組織中的平均病毒 RNA 量（參見圖 30，$p < 0.01$）。組織病理學檢查結果顯示，AM580 處理改善了與病毒相關的肺炎性浸潤和支氣管肺炎（參見圖 31）。顯然，AM580 對高毒性／致死性 A 型流感（H7N9）病毒攻擊展現出顯著的體內保護作用。

【0111】AM580 已知是選擇性視黃酸受體-α（retinoic acid receptor-α，RAR-α）促效劑。令人驚訝的是，發明人發現 AM580 的抗病毒活性不依賴於 RAR-α信號傳導的活化或宿主先天抗病毒反應的活化。為了檢測 AM580 的抗病毒活性依賴於 RAR-α信號傳導途徑活化的程度，本實驗進行功能喪失和功能獲得測定（loss-of-function and gain-of-function assays）。不論是以 RAR-α基因沉默（參見圖 32）來下調途徑或過度表現 RAR-α受體（參見圖 33），均未顯著影響中東呼吸症候群冠狀病毒複製。將下游 RAR-α拮抗劑 ER50891 與 AM580 一起使用也不會降低 AM580 的抗病毒效力（參見圖 34）。這些結果代表 AM580 的抗病毒活性不依賴於 RAR-α信號傳導途徑。然而，RAR-α是核受體，透過報導基因螢光酶分析也排除了 AM580 作為 pan-轉錄抑制劑的可能性，在前述報導基因螢光酶分析中包括了 CMV、TK 和 SV40 啟動子（參見圖 35）。

【0112】為了闡明 AM580 的廣效抗病毒活性並確定宿主先天免疫反應被藥物所修飾的程度，發明人開發了由 IFN-β啟動子（IFNβ-螢光酶）或 IFN-刺激的反應單元（ISRE-螢光酶）所驅動的報導構築體（參見圖 36）。這些結果指出，AM580 的抗病毒活性不太可能與宿主先天免疫反應的活化有關，且並沒有信號放大的作用。這個結果被 AM580 在 RIG-I 敲除（knockout）及野生型 A549 細胞中展現出相似抗病毒活性的觀察結果所支持（參見圖 37）。整體來說，這些實驗數據證明，AM580 的廣效型抗病毒活性不是透過活化 RAR-α信號途徑或宿主的先天免疫反應所引起。

【0113】為了確定 AM580 的抗病毒機制，發明人利用藥物添加時間試驗（time-of-drug-addition assay）來證明藥物化合物不會干擾中東呼吸症候群冠狀病毒的附著或內化（參見圖 38）。不希望受理論束縛，發明人認為藥物化合物可以中斷中東呼吸症候群冠狀病毒生命週期中的進入後（post-entry）步驟。為了分析 AM580 如何影響細胞內病毒-宿主的相互作用，發明人在有或無化合物的情況下對經中東呼吸症候群冠狀病毒感染的細胞進行了全基因表現研究。在經中東呼吸症候群冠狀病毒感染的 Calu-3 細胞中，許多基因被上調（n=2061）或下調（n=1626）。值得注意的是，AM580 處理組和模擬感染組中的基因表現譜是相似的。

【0114】發明人還對在經 AM580 處理及 DMSO 處理的細胞中有顯著差異表現的基因進行途徑富集分析（pathway enrichment analysis），並列出了富集評分> 2.0 的兩組具最大差異的基因群（gene cluster）（參見表 1）。

富集群 1 (分數，5.99)	計數	*P 值*
阿茲海默症	50	2.73×10^{-8}
非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD)	44	4.10×10^{-7}
氧化磷酸化	39	1.77×10^{-6}
亨廷頓氏病	49	5.46×10^{-6}
帕金森氏病	39	9.80×10^{-6}
富集群 2 (分數，2.53)	計數	*P 值*
離胺酸降解	19	6.37×10^{-5}
脂肪酸降解	16	3.12×10^{-4}
色胺酸代謝	15	3.61×10^{-4}
丁酸代謝	10	5.89×10^{-3}
脂肪酸代謝	14	7.59×10^{-3}
纈胺酸、亮胺酸及異亮胺酸降解	12	3.86×10^{-2}

對 AM580 處理和未處理樣本中的差異表現基因進行途徑富集和群分析（cluster analyses）

表 1

【0115】每個基因群中得分最高的途徑分別與阿茲海默症及賴離胺酸降解相關。至於在此之後的排序，在用 AM580 處理的中東呼吸症候群冠狀病毒感染的細胞中，在功能上與脂肪酸代謝、脂肪酸降解及非酒精性脂肪肝病（NAFLD）相關基因的表現有顯著的降低。整體而言，不希望受理論束縛，發明人認為 AM580 可以重編程由病毒複製所引發的脂質代謝情況。值得注意的是，膽固醇及磷酸肌醇途徑的失調與阿茲海默症的澱粉樣蛋白形成有高度相關[24]，而生酮必需胺基酸（如離胺酸）會調節脂質合成途徑[25]。

【0116】為了進一步研究 AM580 對中東呼吸症候群冠狀病毒所誘發的脂質恆定的擾動，發明人在有或無 AM580 的情況下對被中東呼吸症候群冠狀病毒感染的 Calu-3 細胞進行未標記的脂質體學分析（參見圖 39）。在感染後 24 小時後分離脂質。分析 11 種脂質類型中陽性模式（positive mode）下的 308 個脂質特徵及陰性模式（negative mode）下的 199 個脂質特徵的豐度。在去除重複的脂

質特徵後，進行數據處理和統計分析。當與模擬感染組和被中東呼吸症候群冠狀病毒感染再以 DMSO 處理的對照組細胞相比時，被中東呼吸症候群冠狀病毒感染再以 AM580 處理的細胞中其細胞脂質體出現許多變化。有十二種內源性脂質出現顯著的變化（參見圖 40 至 50，$p < 0.05$）。所有分析出的脂質均屬甘油磷脂類。甘油磷脂（GPs）是構成哺乳動物細胞膜的主要脂質類別。以結構來說，GP 進一步分為四個子類別，包括兩種溶血磷脂（lysophospholipids，簡稱 LysoPLs）—溶血磷脂醯膽鹼（lysophosphatidylcholine，簡稱 LysoPC）和溶血磷脂醯乙醇胺（lysophosphatidylethanolamine，簡稱 LysoPE）—和兩種磷脂（PL）—磷脂醯膽鹼（phosphatidylcholine，簡稱 PC）和磷脂醯乙醇胺（phosphatidylethanolamine，簡稱 PE）。為了分析變化趨勢，發明人基於不同脂質的豐度進行了階層分群分析。在感染後 24 小時後，與模擬感染的控制組相比，中東呼吸症候群冠狀病毒之感染使 LysoPL 被下調（LysoPC 和 LysoPE）並使 PL（PC 和 PE）被上調（參見圖 39）。AM580 對病毒誘發的脂質恆定擾動產生拮抗作用，並展現出與模擬感染控制組相似的脂質體（參見圖 40 至 50）。

【0117】 兩種協同酶—磷脂酶 A2（PLA2）和溶血磷脂醯基轉移酶（LPCAT）—平衡了藍氏循環（Lands' cycle）中 LysoPLs 和 PLs 的轉換[26]。PLA2 專一性地水解 PL 中 sn-2 位置上的酯鍵，以形成 LysoPL。隨後，脂質再生酶 LPCAT 將醯基基團從醯基-CoA 轉移至 LysoPLs 以再生磷脂，從而完成去醯化／再醯化循環。中東呼吸症候群冠狀病毒複製有利於 PL 的形成而非 LysoPL 形成（參見圖 40 至 50）。與脂質體學數據一致，與 AM580 處理組或模擬感染控制組相比，中東呼吸症候群冠狀病毒感染會顯著抑制（$p < 0.05$）一系列的 PLA2s（包括 PLA2G4A、PLA2G10、PLA2G12A、PLA2G16 和 PLA2R1）的基因表現。整體而言，這些結果代表中東呼吸症候群冠狀病毒感染透過藍氏循環的去醯化和再醯化來擾亂了由細胞磷脂酶所調節的脂質恆定。發明人認為這些是病毒為有利於自身複製和存活所誘發的變化。

【0118】 為了分析脂質代謝變化，發明人使用免疫螢光來觀察在有或無 AM580 的情況下，被中東呼吸症候群冠狀病毒感染的 Huh7 細胞內其細胞脂滴（LD）和膽固醇的分佈型態，並使用即時聚合酶連鎖反應來測量 mRNA 表現的

變化。如圖 51 和圖 52 所示，中東呼吸症候群冠狀病毒的感染顯著增加 LD 和膽固醇的累積，而添加 AM580 則顯著降低 LD 和膽固醇的產生。此外，本文對參與脂肪酸代謝的 18 個關鍵催化基因的表現進行了分析，包括脂肪酸重新合成和攝取途徑（ACC、FAS、ADRP），脂肪酸氧化途徑（CPT1a、HADH α、UCP2、ACOX、BOX、CYP2E1、CYP4A11 及 PPARα），抗氧化途徑（SOD、過氧化氫酶、GSS）和三酸甘油酯合成和催化途徑（DGAT1、PPARγ、HSL）。與經 DMSO 處理的感染對照組相比，在 AM580 處理的被感染細胞中，17 個基因中有 13 個基因（76.5%）其 mRNA 表現顯著降低（參見圖 53）。

【0119】類似地，透過 AM580 處理降低了膽固醇合成途徑中 12 個被測量的基因中的 10 個（83.3%）的 mRNA 表現，例如 HMGCR、HMG-CoA 合酶（HMGCS）和 SCD（參見圖 54）。這些發現不僅代表脂肪酸和膽固醇合成是中東呼吸症候群冠狀病毒生命週期的重要角色（在中東呼吸症候群冠狀病毒感染期間，主要生物合成酶—乙醯輔酶 A 羧化酶（ACC）、脂肪酸合成酶（FAS）及 HMGCS 的顯著增加可證明此點），也代表以及 AM580 及其類似物可以藉由影響病毒複製的一或多個步驟，來抑制脂質合成。不希望受理論束縛，發明人認為中東呼吸症候群冠狀病毒感染所提高的代謝需求使脂質生物合成途徑被上調，而 AM580 可能對這種重新編程產生拮抗效應，且導致病毒複製減少。

【0120】SREBP-1 和 SREBP-2 是控制膽固醇、脂肪酸和三酸甘油酯的生物合成的主要轉錄因子[27]。為了分析 SERSBP 在中東呼吸症候群冠狀病毒複製期間的角色，發明人比較了野生型（模擬感染處理）和預處理（敲落 SREBPs 或使 SREBPs 過度表現）細胞之間的中東呼吸症候群冠狀病毒生長情況。值得注意的是，轉染以 SREBP-1 或 SREBP-2 為目標的 siRNA 會減少 SREBP 前體（pre-SREBPs）的產生，導致中東呼吸症候群冠狀病毒複製顯著的減少（參見圖 56，$p < 0.05$）。這代表 SREBP 對於中東呼吸症候群冠狀病毒複製是必需的。

【0121】脂質生物合成基因的轉活化需要切割 SREBP 前體以釋放核形式（n-SREBP）；這個過程受固醇調節[28]。為了誘發這種成熟形式的 SREBP 來模擬病毒感染期間脂質生物合成的過度活化，首先將 Huh7 細胞與 5%脂蛋白缺乏血清（LPDS）和 10 μM 美伐他汀一起孵育過夜，使 Huh7 細胞耗盡固醇。使細

胞飢餓會富集內源性 n-SREBP1 和 n-SREBP2（參見圖 56）。然而，增加的 n-SREBP 會使 10 μM 的 AM580 其抗病毒效力在被 0.1 或 1 病毒感染劑量的中東呼吸症候群冠狀病毒感染時降低約 1 $\log_{10}$ 單位。這代表 SREBPs 在中東呼吸症候群冠狀病毒複製過程中有促進作用以及 AM580 和相關化合物對所涉及的 n-SREBP 有抑制作用。

【0122】 SREBP 的成熟係藉由 SREBP 與 SREBP 切割活化蛋白（SCAP）結合以及位點-1 蛋白酶（S1P）和位點-2 蛋白酶（S2P）的依序切割所誘發。發明人認為，阻斷 SREBPs 的成熟可能對抗病毒治療有效。為此，發明人分析樺木醇（一種 SCAP 抑制劑）和 PF429242（一種 S1P 抑制劑）的抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性。發現這兩種化合物均以劑量依賴性方式降低中東呼吸症候群冠狀病毒複製，當以 50μM 處理被中東呼吸症候群冠狀病毒感染的 Huh7 細胞時，病毒力價降低約 1 $\log_{10}$PFU／ml（參見圖 57）。發明人認為這些結果代表 SREBP 在中東呼吸症候群冠狀病毒誘發的代謝重編程中扮演重要和／或不可或缺的角色。另外，n-SREBP 的修整過程可以提供藥物可修飾的目標分子，以抑制病毒複製。

【0123】 增加 n-SREBP 會使 AM580 的抗病毒效力減弱，這個觀察結果使發明人推測 AM580 和相關化合物可透過與 n-SREBP 結合而發揮作用（參見圖 56）。核 SREBP 與基因啟動子上的 SRE 結合，藉此上調一系列脂肪生成酶的基因表現，這些基因啟動子例如為 HMGCS、HMG-CoA 還原酶、FAS、ACC 和角鯊烯合成酶[29]。為了確定 AM580 和相關化合物是否可以中斷這種相互作用，本文分析了 n-SREBPs 的 DNA 結合活性。先將包括 SREBP1 或 SREBP2 結合元件的特定雙股 DNA（dsDNA）序列固定在測試孔上，然後在有或無候選抑制劑的情況下分析從核所萃取到的 SREBP1 或 SREBP2 的結合程度。令人驚訝的是，AM580 抑制 n-SREBP1 和 n-SREBP2 與其相應的 SRE 結合（參見圖 58 和 59）。

【0124】 發明人還研究了 AM580 抑制 n-SREBP 結合的機制。為了確定 AM580 是否以 n-SREBP 或 SRE 為目標，發明人將藥物化合物（1）在添加 n-SREBP 之前與固定的 dsDNA 預孵育，或（2）在與 dsDNA 結合之前，與 n-SREBP 預孵育。以 n-SREBP1 作為實例，發現 AM580 是與 n-SREBP1 結合而不是與 SRE

結合，並且發現其以劑量依賴性方式抑制 n-SREBP1 的 DNA 結合活性（參見圖 60）。

【0125】 為了預測 AM580 可能與其進行相互作用的潛在胺基酸殘基，發明人使用已發表的 SREBP1 和 SREBP2 晶體結構進行分子對接分析（molecular docking analysis）[30,31]。預測 AM580 會與殘基 Tyr335 產生交互作用（參見圖 61 和 62），殘基 Tyr335 係位在 DNA 結合結構域內，並影響 SRE 識別[30]。應當理解的是，SREBP1 和 SREBP2 的 SRE 識別位點在人和小鼠間為高度保守（參見圖 61），這個現象可以解釋發明人在各種細胞株、人類器官、離體組織和小鼠模式中所觀察到的抗病毒活性皆為一致。不希望受理論束縛，發明人認為 AM580 藉由阻斷 SRE 識別位點來抑制 SREBP 的 DNA 結合活性。

【0126】 為了確定 Tyr335 是否為 AM580 和 SREBP 產生交互作用的位點（或至少為交互作用位點的一部分），發明人進行定點誘變以構建 Y335R 突變的 n-SREBP1，並評估野生型和 Y335R 突變的 n-SREBP1 與 AM580 或 SRE 的結合親和力。當 Tyr335 被精胺酸取代時，n-SREBP1 的 DNA 結合活性顯著減弱（參見圖 63，$p < 0.01$）。這代表 n-SREBP1 中的 Tyr335 可能對結合 AM580 至關重要。為了比較 AM580 對野生型和 Y335R 突變的 n-SREBP1 的結合親和力，本文合成了源自 AM580 的探針（AM580dp）。在合成 AM580dp 之前，發明人將含有疊氮基團的連接臂引入 AM580 的羧酸基團以產生疊氮基-AM580，疊氮基-AM580 係用於後續添加具有特定和／或額外探測功能的化學基團。與 AM580 類似，本文發現疊氮基-AM580 會抑制 Huh7 和 Vero 細胞中的中東呼吸症候群冠狀病毒複製（參見圖 64）。使用對疊氮基有反應性的綠色螢光染料，會發現疊氮基-AM580 主要位在宿主細胞的細胞核中，這與先前的結論—AM580 會以脂肪生成轉活化事件為目標一是一致的（參見圖 65）。AM580dp 含有光親和基團和生物素標籤（參見圖 66）。

【0127】 為了捕獲結合的目標，將 AM580dp 以其生物素基團固定在鏈黴抗生物素蛋白綴合的瓊脂（streptavidin-conjugated agarose）上後，再分別與外源表現的野生型和 Y335R n-SREBP1 一起孵育。以點擊化學（click chemistry）的概念為基礎，在以紫外線照射來活化 AM580dp 中的非專一性交聯基團後，將蛋

白質-AM580dp 複合物固定，並透過生物素標籤純化將它們一起下拉。以西方墨點法分析時，用野生型和 Y335R 突變的 n-SREBP1 使等量的 RAR-α 沉澱，代表 AM580dp 能發揮生物功能（參見圖 67）。相較於野生型的 n-SREBP1，野生型組中有顯著更多的 n-SREBP1 被拉出，代表 AM580 與野生型的 n-SREBP1 之間的結合親和力比 AM580 與 Y335R 突變的 n-SREBP1 之間的結合親和力還要高很多（參見圖 67）。不希望受理論束縛，發明人認為 AM580 至少部分是因為透過與殘基 Tyr335 的相互作用而靶向 n-SREBP1。

【0128】 SREBP 透過控制脂肪生成途徑中的酶（例如 HMGCS 和 FAS）的表現來控制脂質恆定。為了確定 AM580 是否能抑制 SREBP 依賴性轉錄性活化，本文製備了兩種報導構築體—HMGCS-啟動子-螢光素酶及 FAS-啟動子-螢光素酶。前者包括倉鼠 HMGCS 啟動子序列（-324／-225）[32]，而後者包括 FAS 啟動子[33]。AM580 以濃度依賴性的方式抑制報導基因的活性，代表脂質生成酶（如 HMGCS 和 FAS）在轉錄層面被阻斷（參見圖 68）。為了證實 AM580 的抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性與脂質生物合成降低之間的相關性，發明人分析脂肪酸重新生物合成途徑的最終產物—棕櫚酸鈉—回復 AM580 抗病毒活性的能力（參見圖 69）。在這些研究中，將已知的 FAS 抑制劑（C75）作為陽性對照。值得注意的是，C75 和 AM580 都出現抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性（圖 70）。添加棕櫚酸鈉不影響以 DMSO 處理的被中東呼吸症候群冠狀病毒感染其細胞中的病毒產量，但是會使以 AM580 或 C75 處理的被中東呼吸症候群冠狀病毒感染其細胞中的病毒產量增加（參見圖 70，$p < 0.05$）。這代表 AM580 至少部分地透過破壞脂肪酸合成來抑制中東呼吸症候群冠狀病毒複製。

【0129】 發明人還研究了脂肪酸合成是否與會被 AM580 抑制的其他病毒複製有密切關係。為此，使用 A 型流感（H1N1）pdm09 病毒（負股 RNA 病毒）、EV-A71（無套膜 RNA 病毒）和腺病毒-第 5 型（DNA 病毒）的進行複製補救試驗（參見圖 71 至 73）。添加 100 μM 棕櫚酸鈉會顯著（$p < 0.05$）拯救這些病毒的複製量。其中，A 型 H1N1 流感病毒 pdm09 病毒對脂肪酸合成的依賴性最高（$p < 0.01$）。整體而言，這些數據代表 AM580 及其類似物的廣效型抗病毒活性至少部分與重編程脂質代謝通量的能力有關。

【0130】已知正鏈 RNA 病毒會在細胞內膜上複製它們的基因組。在中東呼吸症候群冠狀病毒的情況下，雙膜囊泡（double-membrane vesicle，DMV）和其他複製性細胞器（replicative organelle，RO）為病毒複製／轉錄複合物（replication/transcription complexe，RTC）提供錨定支架。為了確定這些病毒誘發的囊泡是否可以作為 AM580 和類似化合物阻斷脂肪酸合成的專一性目標，發明人將中東呼吸症候群冠狀病毒誘發的雙膜囊泡作為研究代表對象。透過電子顯微鏡，可以在被中東呼吸症候群冠狀病毒感染的細胞中輕易檢測到核周圍的雙膜囊泡群（圖 74 之左欄）。相反地，在用 AM580 處理後沒有注意到雙膜囊泡（圖 74 之右欄）。不希望受理論束縛，發明人認為 AM580 和相關化合物可以至少部分地通過阻止雙膜囊泡的形成來抑制病毒複製。

【0131】負鏈病毒（例如 A 型流感病毒）採用一種截然不同的基因組複製和轉錄機制，其不依賴於細胞內膜。棕櫚酸酯具有幾種生物功能，包括棕櫚酸酯化。棕櫚酸酯化是指脂肪酸於轉譯後附著，其調節蛋白質功能和蛋白質定位[34]。在 A 型流感病毒中，研究的最徹底的病毒棕櫚酸酯化蛋白為表面醣蛋白血凝素（HA）[35]。在有或無經過 AM580 處理情況下，分析棕櫚酸酯化的程度，以確定阻斷脂肪酸的合成是否會阻礙流感病毒 HA 蛋白的棕櫚酸酯化，並因此阻止病毒生命週期的轉譯後過程。過度表現 HA 蛋白的 A549 細胞與 AM580、載劑／控制（DMSO）或陽性對照抑制劑 2-BP 一起培養，其中抑制劑 2-BP 係藉由抑制棕櫚醯基轉移酶（palmitoyl acyl transferase）專一性地阻止棕櫚酸酯化[36]。於硫醇基上有棕櫚酸酯化的 HA 蛋白（S-palmitoylated HA protein）係透過樹脂輔助的捕獲法所純化。在不同處理組之間的 HA 蛋白總量的沒有顯著差異，代表 2-BP 和 AM580 對蛋白質合成沒有影響（參見圖 75）。

【0132】在添加 2-BP 和 AM580 後，棕櫚酸酯化-HA 的偵測到的量降低，代表病毒蛋白被棕櫚酸酯化程度降低。與 DMSO 處理的控制組相比，在病毒進入後添加 2-BP 會使 A 型流感（H1N1）pdm09 病毒在上清液中的力價降低 1 $\log_{10}$／ml（參見圖 76）。不希望受理論束縛，發明人認為 AM580 阻斷 SREBP 依賴性途徑，以阻止病毒棕櫚酸酯化並減少 A 型流感（H1N1）pdm09 病毒複製。令人驚訝的是，2-BP 還以劑量依賴性方式抑制中東呼吸症候群冠狀病毒的複製（參

見圖 76），代表病毒的棕櫚酸酯化可能是另一種重要的廣效型抗病毒目標。

【0133】病毒依賴於其細胞宿主的代謝網路來為自身的複製提供能量和構築單元。AM580 及相關化合物在體外和體內抑制 SREBP 相關途徑來展現顯著抗病毒功效，代表宿主脂質代謝的重編程對病毒生命週期的各方面來說至關重要，並且重要的是，證明這些步驟易受影響，且可做為醫藥上抗病毒治療可針對的分子目標。發明人已發現，SREBP 在協調病毒誘發的脂質過度誘導中是不可缺少的（參見圖 55），因而影響雙膜囊泡的生物合成（參見圖 74）和轉譯後蛋白質的棕櫚酸酯化（參見圖 75）。在病毒感染的情況下，AM580 使膽固醇和脂肪酸生物合成過程中的基因被下調，並降低細胞脂質的含量，以限制病毒複製（參見圖 52 和 53）。在 SREBPs 蛋白進行水解之前，SREBP 前體最初被合成為內質網跨膜蛋白[19]。當固醇量低時，SCAP 將 SREBP 從內質網護送到高基氏體，其中 SREBP 被蛋白酶 S1P 和 S2P 依次切割，釋放出 n-SREBP 並使其被運輸至細胞核以轉活化基因表現。然而，當細胞固醇量高時，膽固醇或氧固醇會刺激 SCAP 和胰島素誘發的基因 1 蛋白（INSIG1）之間的結合，導致 SCAP-SREBP 複合物滯留在內質網，從而減少 n-SREBP，並降低脂質代謝相關基因的表現。發明人已經利用圖式說明，AM580 透過阻斷 n-SREBPs 和 SRE 之間的結合來轉錄性抑制多種脂肪生成酶（參見圖 59 和圖 61）。以早期事件為目標，Tang 及其研究團隊確認樺木醇會促使 SREBP 滯留於內質網（ER-retention），藉此抑制 SREBPs[28]。實際上，樺木醇和 S1P 活性抑制劑均會抑制病毒複製（參見圖 57）。整體而言，發明人已確認 SREBPs 的蛋白水解可以是廣效型抗病毒藥物的目標。

【0134】受 SREBP 調控且參與細胞脂質代謝的脂肪生成酶，在宿主與病毒間產生的相互作用扮演重要角色[37]，這與發明人的發現一致。實際上，C75 對 FAS 的藥理學抑制作用降低了黃病毒[38]和牛痘病毒[39]的複製。發明人將 C75 作為陽性對照，證明外加棕櫚酸可以部分回復 AM580 對各種病毒的抑制（如中東呼吸症候群病毒、流感病毒等套膜病毒、EV-A71 等無套膜病毒、RNA 病毒，或腺病毒-第 5 型等 DNA 病毒）程度（見圖 71 至 74）。這些研究結果代表脂質生物合成（特別是脂肪酸重新合成）對於病毒複製的最佳化和／或最大化是不可或缺的。這也解釋了 AM580 在不同細胞株、小鼠模型、人類器官和離體模

型中觀察到的廣效型抗病毒效力（參見圖 7 至圖 12、圖 15 至圖 22、圖 24 和圖 27 至圖 31）。發明人認為，在 AM580 進行轉錄去活化後，沉默除 FAS 之外的脂肪生成酶也可導致病毒複製降低（參見圖 69）。如上所示，棕櫚酸酯化抑制劑（2-BP）展現出針對 A 型流感（H1N1）病毒和中東呼吸症候群冠狀病毒的抗病毒活性，代表病毒蛋白棕櫚酸酯化是廣效型抗病毒藥的另一種醫藥上可針對的宿主分子目標（參見圖 44）。棕櫚酸酯化作為一種筏定位信號，是一種常見和保守的生物過程，且對病毒組裝及出芽過程來說是必要的。有文獻提及前述現象與人類病原體相關的重要案例包括表面醣蛋白，例如 A 型流感病毒的 HA 蛋白、B 型流感病毒的 NB 蛋白、麻疹病毒的融合（F）蛋白、絲狀病毒和逆轉錄病毒（包括 HIV）的醣蛋白[34]。蛋白質的棕櫚酸酯化也會調節細胞蛋白質的功能。因此，在開發棕櫚酸酯化抑制劑作為抗病毒治療劑之前，重要的是權衡預期的功效與副作用。DHHC 蛋白家族的發現則為前路指引出一個方向[40]。DHHC 蛋白以不同受質專一性的形式來催化棕櫚酸酯化，代表這些蛋白可能有望成為藥物靶標，因為阻斷這些蛋白可能會抑制病毒複製，但不會損害細胞蛋白的醯化[41]。

【0135】 令人驚訝的是，AM580 的抗病毒活性不依賴於 RAR-α 途徑（參見圖 32 至圖 34）。AM580 的結構-活性分析促使本文對 AM580 進行適當修飾而產生出疊氮基-AM580 和 AM580dp，藉此分別實現了 AM580 在細胞中分佈的可視化（參見圖 65）和以 AM580 作為直接結合目標的 SREBP 下拉（參見圖 68）。將 SREBP1 或 SREBP 2 敲除後並沒有出現與 AM580 相似的抗病毒效力水平（參見圖 55），這可能是由於若 SREBP1 和 SREBP2 中的任一個受損時，SREBP1 和 SREBP2 可以相互補償[42]。儘管已有研究報導了 AM580 在小鼠模型中的致畸作用[43]，但預期的治療益處超過了這種副作用的風險，特別是考慮到動物實驗中以 AM580 治療短暫 3 天的效果。還有研究在探尋具有與 AM580 相當效力和良好生物利用度的類似物時，發現了他米巴羅汀，其是一種用於治療急性前骨髓細胞白血病的口服活性類視黃醇[44]。應當理解的是，他米巴羅汀具有已知且全面的安全性資訊，並且是日本的市售產品。由於他米巴羅汀已通過臨床耐受性檢測，發明人認為 AM580 和／或相關化合物可被修飾成安全且廣效的抗病毒治療

劑，且特別是因為 AM580 僅在病毒感染所引發增加的脂質需求爆發期間展現活性。

【0136】 實施例

【0137】 細胞和病毒：人類胚腎（HEK293T）細胞、人類肺癌（A549）細胞、人類肝癌（Huh7）細胞、人類橫紋肌肉瘤（RD）細胞、人類上皮第 2 型（HEp-2）細胞、人類肺腺癌（Calu-3）細胞、人類白血病（THP-1）單核細胞、馬丁達比犬腎（Madin-Darby canine kidney，簡稱 MDCK）細胞、非洲綠猴腎（Vero）細胞和 Vero-E6 細胞係從 ATCC 獲得，並根據供應商／製造商的建議培養在培養液中。根據香港大學機構審查委員會核准的方案，從香港紅十字會輸血服務中心收集的健康成人血液樣本中分離出人類周邊血液單核細胞衍生的巨噬細胞（MDMs）。根據發明人先前描述的習知方案[45]進行單核細胞製備和分化。將所有細胞株培養在 37℃，5%CO_2 中。藉由 Plasmo Test（InvivoGen）測定，確認研究中使用的所有細胞都沒有受黴漿菌污染。在病毒感染後，將感染的細胞維持在含有或不含有化合物的無胎牛血清培養液中。將 A 型流感病毒（菌株：A／Hong Kong／415742／2009（H1N1）pdm09）在 MDCK 細胞中培養。將中東呼吸症候群冠狀病毒（HCoV-EMC／2012）和嚴重急性呼吸系統症候群冠狀病毒（GZ50）在 Vero-E6 細胞中繁殖。將 ZIKV（波多黎各菌株 PRVABC59）的臨床分離物在 Vero 細胞中擴增。將腸道病毒 A71 型（SZ／HK08-5）在 RD 細胞中培養。將人類腺病毒-第 5 型的臨床分離株在 A549 細胞中繁殖。以兩種小鼠適應的病毒株，即 A／Anhui／1／2013（H7N9）和中東呼吸症候群冠狀病毒（HCoV-EMC／2012）進行體內抗病毒測試。如先前發明人所描述方法再稍作修改[46]，藉由噬斑形成單位測定（噬斑測定）和／或 50%組織培養感染劑量（$TCID_{50}$）測定法，評估所有培養病毒的力價。將所有病毒原液以等量分裝，保存在-80℃。如發明人的先前描述，所有使用活病毒的實驗均以生物安全 2 級或 3 級設施進行[47]。

【0138】 化學試劑和抗體：AM580 購自 Cayman Chemical（密西根州，美國），除非另有說明，其他化學抑制劑係購自 Sigma-Aldrich（密蘇里州，美國）。中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白係用發明人先前描述的豚鼠抗中東呼吸症候群

冠狀病毒核蛋白血清進行檢測[48]。抗人類 RAR-α（Abcam）、SREBP1（Santa Cruz）、SREBP2（Santa Cruz）、n-SREBP1（Novus Biological）、n-SREBP-2（Novus Biological）、Flag-tag（Sigma）的初級抗體，係分別自前述廠商購得並用於相關實驗。將 Alexa Fluor 488 山羊抗 pg IgG（H＋L）抗體（Invitrogen）作為免疫螢光染色的次級抗體。將 4',6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI，Sigma）和鬼筆環肽-Atto 647N（Sigma）分別用於核和細胞膜的染色。Silencer Select 人類 SREBP1 siRNA、Silencer Select 人類 SREBP2 siRNA 及 Silencer Select siRNA 陰性對照係從 Life Technologies 購得。將螢光中性脂質染料，即 4,4-二氟-1,3,5,7,8-五甲基-4-硼-3a,4a-二氮雜-s-並二苯並（4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene，BODIPY 493／503，Invitrogen）對脂滴（LDs）進行染色，而將非律平Ⅲ（開曼化學）用於細胞內膽固醇顯像。將磷化氫活化的螢光染料 DyLight™ 488-膦（Invitrogen）用於專一性標記和檢測經疊氮化物標記的分子（即疊氮基-AM580）。

【0139】質體：FAS 啟動子螢光素酶為 Bruce Spiegelman 博士所贈（Addgene 質體＃8890），含有 HMG-CoA 合酶啟動子的 pSynSRE-T-螢光素酶（Addgene 質體＃60444）、pcDNA3.1-2×FLAG-SREBP-2（Addgene 質體＃26807）、pcDNA3.1-2×FLAG-SREBP-1c（Addgene 質體＃26802）為 Timothy Osborne 博士所贈。螢光素酶構建體 IFNβ-螢光素酶和 ISRE-螢光素酶係由 Dong-yan JIN 博士（香港大學）所提供。

【0140】初級篩選：購買含有 189 種生物活性脂質的化合物庫（Cayman Chemical，Michigan，美國）來進行篩選。化合物庫中收集了包括前列腺素、受體激動劑和拮抗劑，以及神經醯胺衍生物，其是 G 蛋白偶聯受體篩選和常規藥理學篩選的理想選擇。以略微修改發明人先前描述的方式[49]來進行基於 MTT 的 CPE 抑制測定。為了要鑑定抗中東呼吸症候群冠狀病毒抑制劑，以 0.1 病毒感染劑量（MOI）的中東呼吸症候群冠狀病毒對 96 孔培養盤中長滿的（confluent）Huh7 細胞進行感染（4×10^4 細胞／孔，三重複）。病毒吸收 1 小時後，移除接種物（inoculum），然後添加含有藥物的培養液（10 μM）。二十四小時後，在孔中添加 10 μl 的 5mg／ml MTT 溶液（Sigma）。如上述方式孵育單層細胞 4 小

時。最後，添加 100 μl 含有 0.01M HCl 的 10% SDS，並在 37℃、5% CO_2 下進一步孵育過夜。於 570nm 波長下進行測量並以 640nm 做為參考波長來分析活性。為了篩選抗流感病毒抑制劑，以 0.01 病毒感染劑量的流感病毒 A（H1N1）pdm09 病毒來感染 MDCK 細胞，而在感染後 48 小時（hpi）評估細胞存活率。其他程序均與上述相同。接下來，使用斑塊減少試驗（PRA）進行劑量-反應分析[50]，以評估初次病毒攻擊的體外抗病毒效力，其中對各個化合物進行序列稀釋（10、5、2.5、1.25 和 0.625 μM）並測試對中東呼吸症候群冠狀病毒或 A 型流感（H1N1）病毒的抑制效果。

【0141】 選擇性指數：每種化合物的選擇性指數（SI）是以 50%細胞毒性濃度（CC 50）除與 50%抑制濃度（IC 50）的比率所算出。CC50 值係根據製造商的方案，用 MTT 測定法（Invitrogen）和 CellTiter-Glo 測定法（Promega）所測定，而 IC50 係根據所述的噬斑減少測定法或病毒載量減少測定法所求出[51]。CC50 和 IC50 均是使用 GraphPad Prism 6 進行計算。

【0142】 流式細胞分析法：為了對細胞內進行染色，以含有 10mM EDTA 的 PBS 來分離細胞，以 4%多聚甲醛固定，並用 0.1%Triton X-100 的 PBS 進行透化。流式細胞術的免疫染色操作是按照發明人先前描述的標準程序進行[52]。流式細胞術係使用 BD FACSCanto II 流式細胞儀（BD Biosciences）來進行，數據係使用 FlowJo vX（Tree Star）來分析。

【0143】 動物實驗：將人類二肽基肽酶 4（DPP4）轉殖 C57BL／6 小鼠和 BALB／c 雌性小鼠培養在生物安全性第 3 級培養箱中，並提供標準顆粒飼料和水供其自由食用。所有實驗方案均經香港大學動物倫理委員會批准，並按照生物安全性第 3 級動物設施的標準操作程序進行。依據發明人先前描述的方式，將中東呼吸症候群冠狀病毒和流感病毒 A（H7N9）分別在 DDP4 小鼠模式[23]和 BALB／c 小鼠模式[47]中測試。為了檢查 AM580 的抗中東呼吸症候群冠狀病毒活性，總共評估了 36 隻小鼠（18 隻小鼠／組）。將小鼠麻醉後，以鼻內方式（i.n.）對小鼠接種 20μL 含有 50 PFU 中東呼吸症候群冠狀病毒的病毒懸浮液。在病毒攻擊 6 小時後，以腹腔（i.p.）注射進行治療。一組小鼠係以經腹腔方式注射 200 μL 的 AM580，持續 3 天（12.5 毫克／公斤／天）。第二組小鼠係以腹腔方式

注射 200 μL 含有 0.1%DMSO 的 PBS，作為未經處理的對照組。監測動物存活和病態跡象 14 天或直至死亡。在攻擊後的第 2 天和第 4 天分別隨機將每組中的四隻小鼠安樂死。如發明人先前所述，收集小鼠肺部和腦部，用於病毒力價測定和 H&E 組織病理學分析[47]。為了評估體內 AM580 的抗流感效力，以鼻內方式（i.n.）對 BALB／c 小鼠（18 隻小鼠／組）接種 20 μL 的病毒懸浮液（即 100 PFU 的 A 型流感（H7N9）病毒）。在病毒攻擊 6 小時後，以鼻內（i.p.）注射進行治療。一組小鼠係以經鼻內方式注射 20 μL 的 AM580（1 毫克／公斤／天）。第二組小鼠係以鼻內方式注射 20 μL 的扎那米韋，作為陽性對照組。第三組小鼠係以鼻內方式注射含有 0.1%DMSO 的 PBS，作為未經處理的對照組。每天兩次對小鼠鼻內注射 AM580、扎那米韋或 PBS，持續 3 天（總共 6 個劑量／小鼠）。監測動物存活和病態訊號 14 天或直至死亡。在病毒攻擊後的第 3 天和第 6 天分別收集肺組織（4 隻小鼠／組），用於病毒力價測定和 H&E 組織病理學分析。

【0144】 人體器官組織培養和病毒感染實驗：根據香港大學／醫院管理局港島西聯網的機構審查委員會批准的方案，從接受手術切除的患者獲得正常小腸。接著，以發明人在別處描述的方式[23]培養腸道類器官並使其分化，以進行中東呼吸症候群冠狀病毒感染。使用 10^5 PFU 的中東呼吸症候群冠狀病毒的接種物來感染一滴類腸（含有 50 至 100 個類腸），估計的病毒感染劑量為 0.1。除去接種物後，用 PBS 漂洗接種病毒的類腸，然後重新包埋在基底膜基質（Matrigel）中，並培養在 48 孔板中，培養液是有添加或無添加 AM580（20 μM）。在指定的時間點，收穫類腸用於定量細胞內病毒載量，將無細胞基質膠和培養液合併以滴定細胞外上清液中的病毒。

【0145】 離體肺組織培養和病毒感染實驗：離體肺組織培養和病毒感染實驗係由香港大學機構審查委員會／醫院管理局港島西聯網所核准。從接受肺手術切除的患者獲得新鮮的正常肺組織。病毒感染和後續免疫螢光染色的實驗條件係如發明人先前所述的方式進行[45]。簡而言之，將肺組織切成 $2mm^3$ 的立方體，隨後在 37℃下用 2×10^8 PFU／ml 的中東呼吸症候群冠狀病毒接種物感染或進行模擬感染 1 小時。接種後，將組織塊培養在補充有 10%人類血清和青黴素／鏈黴素的 DMEM／F12 培養液中，再進行固定及冷凍切片。

【0146】轉錄組分析：對 Calu-3 細胞進行模擬感染或用病毒感染劑量為 2 的中東呼吸症候群冠狀病毒進行感染，並將其孵育在含有（或缺乏）AM580（20 μM）的 DMEM 培養液中。在感染 24 小時後，收集各組（n = 3）的總 RNA。使用 RNA-Seq 技術分析中東呼吸症候群冠狀病毒感染和 AM580 處理後的基因表現改變[53]。定序庫是由北京基因組學研究所（BGI）所構建和測序，在篩除低質量序列後，平均產生 23,977,722 個乾淨序列（clean read）。透過 HISAT [54]／Bowtie2[55]將乾淨序列映射到參考基因組。將經過或未經過 AM580 處理的中東呼吸症候群病毒感染樣品中表現不同的基因傳送至 DAVID 伺服器，以進行途徑富集和群分析。

【0147】脂質體分析：對 Calu-3 細胞進行模擬感染或用病毒感染劑量為 2 的中東呼吸症候群冠狀病毒進行感染，並將其孵育在含有（或缺乏）AM580（20 μM）的 DMEM 培養液中。分別在感染後 8 小時和感染後 24 小時後收集細胞並萃取細胞脂質。藉由噬斑測定確認病毒感染性的去活性。根據已發表的論文[56]，但稍作修改，來製備樣品。簡言之，添加 150mM 的冰碳酸氫銨淬熄緩衝液來分離細胞，然後將其轉移到抗氯仿管中。在管中添加 2 毫升的氯仿／甲醇（v／v 2：1），接著加以震盪，並在 4℃下以 4500rpm 離心 10 分鐘。將底部相收集到玻璃小瓶中，並以真空濃縮器乾燥，以儲存在-80℃下。在 LC-MS 分析時，先將乾燥的樣品以 300μl 氯仿／甲醇（v／ v 2：1）重新溶解，並使用與 Synapt G2-HDMS 質譜儀系統（Waters Corp.，MA，美國）連接的 Acquity UPLC 系統對其分析。色層分析法是以 Waters ACQUITY BEH C18 管柱（1.7μm，2.1×100mm，內徑 1.7mm, Waters, Milford, MA, 美國）來進行。流動相係由（A）0.1%乙酸水溶液和（B）乙腈所組成。分離是以 0.4ml／min 的流速及以下梯度程序所進行：0.5%的 B（第 0 至第 1.5 分鐘）、0.5 至 8%的 B（第 1.5 至第 2 分鐘）、8 至 35%的 B（第 2 至 2 第 7 分鐘）、35 至 70%的 B（第 7 至第 13 分鐘）、70 至 99.5%的 B（第 13 至第 29 分鐘）、99.5%的 B（第 29 至 36 分鐘）。從陽性模式和陰性模式獲得質譜數據。將亮胺酸-腦啡肽（leucine encephalin）作為所有實驗的鎖定質量（lock mass）。使用 20 至 40 eV 的碰撞能量進行碎裂（fragmentation），以對重要代謝物進行推定分析和結構描述。

【0148】電子顯微鏡檢查：以電子顯微鏡來觀察由中東呼吸症候群冠狀病毒感染所誘導的雙膜載體（DMV）。首先將 Vero 細胞培養 6 孔盤中。用病毒感染劑量為 3（或模擬感染）的中東呼吸症候群冠狀病毒感染 1 小時後，用含有 20μM AM580 或 0.1%DMSO（作為控制）的新鮮培養液替換細胞培養液。12 小時後，除去細胞培養液。用 PBS 洗滌細胞，用胰蛋白酶消化，並用 4%甲醛固定，以進一步處理和對比染色（counterstaining）[57]。此些圖像是在香港大學的電子顯微鏡所中獲得的。

【0149】分子嵌合：從蛋白質數據庫數據庫取得 SREBP1（PDB 代碼：1AM9）和 SREBP2（PDB 代碼：1UKL）的晶體結構。以 Pymol 得到 SREBP1 二聚體和 SREBP2 二聚體的資訊。利用 I-TASSER 伺服器[58]模擬 SREBP2 中殘缺的殘基。使用 Maestro 中的蛋白質製備嚮導模組（Protein Preparation Wizard module）[59]建構蛋白質模型。從 PubChem 數據庫[60]下載 AM580 的 3D 構形檔。使用 Leadfinder 1.81 版以超準確方法進行嵌合模擬[61]。

【0150】化學合成：疊氮基-AM580 係用來將細胞內的 AM580 可視化，而 AM580dp 係被設計和合成以進行 AM580 結合目標的下拉研究。

【0151】為了合成疊氮基-AM580，先將 20mg 的 AM580 與溶解在二甲基甲醯胺（DMF）中的疊氮基-PEG5-胺（3.14 ml，10mg／ml，Conju-Probe，LLC）混合。接著，添加 1-[雙（二甲基胺基）亞甲基]-1H-1,2,3-三唑並[4,5-b]吡啶-3-氧化六氟磷酸鹽（1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate，HATU）、50μl 的 N,N-二異丙基乙胺（N,N-diisopropylethylamine，DIPEA）和 2.46ml 的二氯甲烷（DCM）至最終體積為 5.7ml。在室溫下震盪以進行反應。孵育隔夜後，將反應混合物凍乾以除去溶劑。藉由 HPLC 純化疊氮基-AM580，並藉由質譜法（MS）檢測 m／z 640。藉由核磁共振（NMR）對最終產量進行定量。

【0152】為了合成 AM580dp，將純化的疊氮基-AM580 連接至胺反應性三官能交聯劑（2-{N2-[Nα-苯甲醯基苯甲醯胺基-N6-6-生物素醯胺基己醯基]苄基醯胺基}乙基-2'-（N-磺基琥珀醯亞胺基羧基）乙基二硫化物鈉鹽（(2-{N2-[Nα-Benzoylbenzoicamido-N6-6-biotinamidocaproyl]lysinylamido}ethyl-2′-(N-

sulfosuccinimidylcarboxy)ethyl Disulfide Sodium Salt，Santa Cruz），其是一種生物素-UV 活化的-NHS 酯化合物，在此稱化合物 A。這種三官能交聯劑含有 NHS-酯頭端基團（NHS-ester head group）、一個生物素頭端，以及一個 UV 活化二苯甲酮基團；NHS-酯頭端基團用於連接另一個交聯劑膦化合物 4-[2-[2-（2-胺基乙氧基）乙氧基]乙基胺基甲醯基]-2-二苯基磷醯基-苯甲酸甲酯（methyl 4-[2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethylcarbamoyl]-2-diphenylphosphanyl-benzoate，Shinsei Chemical Company Ltd.，化合物 B）的胺尾端；其生物素頭端用於使鏈黴抗生物素蛋白樹脂結合在另一端；UV 活化二苯甲酮基團則用於與 AM580 的目標結合蛋白產生交聯。具體來說，將 1mg 的化合物 A 與 30 μl、74.8mM 的化合物 B（溶於 DMSO-d6）混合在 DMF 中，至最終體積為 1ml。化合物 A 與化合物 B 的莫耳比為 1：2。反應係在 40℃、1400rpm 的震盪下進行。再將過量的疊氮基-AM580 添加至混合物中，透過施陶丁格連接反應（Staudinger ligation reaction）以與膦基團產生交聯。然後將反應產物與鏈黴抗生物素蛋白瓊脂樹脂（Pierce）一起孵育，以獲得 AM580dp 產物。

【0153】 本領域技術人員應當明瞭，在不脫離本發明概念的情況下，除了前述已記載的實施例之外，可能存在其他更多的修改形式。因此，任何未脫離本發明之精神與範疇，而對其進行之等效修改或變更，均應包含於後附之申請專利範圍中。此外，在解釋說明書及請求項時，所有技術用語應以與上下文一致之最廣的可能方式進行解釋。特別是用語「包含」及「包括」，應解釋為其係以非排他性的形式指稱元件、成分或步驟，其係表示所指稱之元件、成分或步驟可與其他未被明確提及的元件、成分或步驟一起存在、使用或結合。凡是說明書或申請專利範圍中提及某物係選自由 A、B、C...及 N 所組成的群組中的至少一者時，該敘述應被解釋為僅需要群組中一個元件存在即可，而非必須要有 A 加 N、或 B 加 N 等等。

【0154】 參考文獻

1. Peiris, J.S., et al., Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet, 2003. 361(9366): p. 1319-25.

2. Chan, J.F., et al., Middle East respiratory syndrome coronavirus: another

zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. Clin Microbiol Rev, 2015. 28(2): p. 465-522.

3. Yuen, K.Y., et al., Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet, 1998. 351(9101): p. 467-71.

4. To, K.K., et al., The emergence of influenza A H7N9 in human beings 16 years after influenza A H5N1: a tale of two cities. Lancet Infect Dis, 2013. 13(9): p. 809-21.

5. De Clercq, E., Strategies in the design of antiviral drugs. Nat Rev Drug Discov, 2002. 1(1): p. 13-25.

6. Zumla, A., et al., Coronaviruses - drug discovery and therapeutic options. Nat Rev Drug Discov, 2016. 15(5): p. 327-47.

7. Simmons, G., et al., Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(33): p. 11876-81.

8. Kaletsky, R.L., G. Simmons, and P. Bates, Proteolysis of the Ebola virus glycoproteins enhances virus binding and infectivity. J Virol, 2007. 81(24): p. 13378-84.

9. Warren, T.K., et al., Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. Nature, 2014. 508(7496): p. 402-5.

10. Zhu, J.D., et al., Broad-spectrum antiviral agents. Front Microbiol, 2015. 6: p. 517.

11. Burke, J.D., L.C. Platanias, and E.N. Fish, Beta interferon regulation of glucose metabolism is PI3K/Akt dependent and important for antiviral activity against coxsackievirus B3. J Virol, 2014. 88(6): p. 3485-95.

12. Thakur, C.S., et al., Small-molecule activators of RNase L with broad-spectrum antiviral activity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(23): p. 9585-90.

13. Graci, J.D. and C.E. Cameron, Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. Rev Med Virol, 2006. 16(1): p. 37-48.

14. Goodwin, C.M., S. Xu, and J. Munger, Stealing the Keys to the Kitchen: Viral Manipulation of the Host Cell Metabolic Network. Trends Microbiol, 2015. 23(12): p. 789-98.

15. Tam, V.C., et al., Lipidomic profiling of influenza infection identifies mediators that induce and resolve inflammation. Cell, 2013. 154(1): p. 213-27.

16. Dimitrov, D.S., Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. Nat Rev Microbiol, 2004. 2(2): p. 109-22.

17. Altan-Bonnet, N., Lipid Tales of Viral Replication and Transmission. Trends Cell Biol, 2017. 27(3): p. 201-213.

18. Lorizate, M. and H.G. Krausslich, Role of lipids in virus replication. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. 3(10): p. a004820.

19. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest, 2002. 109(9): p. 1125-31.

20. Sheahan, T.P., et al., Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. Sci Transl Med, 2017. 9(396).

21. Furuta, Y., et al., Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. Antiviral Res, 2013. 100(2): p. 446-54.

22. Qian, X., et al., Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. Cell, 2016. 165(5): p. 1238-1254.

23. Zhou, J., et al., Human intestinal tract serves as an alternative infection route for Middle East respiratory syndrome coronavirus. Sci Adv, 2017. 3(11): p. eaao4966.

24. Di Paolo, G. and T.W. Kim, Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. Nat Rev Neurosci, 2011. 12(5): p. 284-96.

25. Noguchi, Y., et al., Ketogenic essential amino acids modulate lipid

synthetic pathways and prevent hepatic steatosis in mice. PLoS One, 2010. 5(8): p. e12057.

26. Lands, W.E., Stories about acyl chains. Biochim Biophys Acta, 2000. 1483(1): p. 1-14.

27. Goldstein, J.L., R.A. DeBose-Boyd, and M.S. Brown, Protein sensors for membrane sterols. Cell, 2006. 124(1): p. 35-46.

28. Tang, J.J., et al., Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. Cell Metab, 2011. 13(1): p. 44-56.

29. Magana, M.M. and T.F. Osborne, Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. J Biol Chem, 1996. 271(51): p. 32689-94.

30. Parraga, A., et al., Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 A resolution. Structure, 1998. 6(5): p. 661-72.

31. Lee, S.J., et al., The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. Science, 2003. 302(5650): p. 1571-5.

32. Dooley, K.A., S. Millinder, and T.F. Osborne, Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y. J Biol Chem, 1998. 273(3): p. 1349-56.

33. Kim, J.B., et al., Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. J Clin Invest, 1998. 101(1): p. 1-9.

34. Veit, M., Palmitoylation of virus proteins. Biol Cell, 2012. 104(9): p. 493-515.

35. Veit, M., M.V. Serebryakova, and L.V. Kordyukova, Palmitoylation of influenza virus proteins. Biochem Soc Trans, 2013. 41(1): p. 50-5.

36. Webb, Y., L. Hermida-Matsumoto, and M.D. Resh, Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. J Biol Chem, 2000. 275(1): p. 261-70.

37. Munger, J., et al., Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. Nat Biotechnol, 2008. 26(10): p. 1179-86.

38. Heaton, N.S., et al., Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(40): p. 17345-50.

39. Greseth, M.D. and P. Traktman, De novo fatty acid biosynthesis contributes significantly to establishment of a bioenergetically favorable environment for vaccinia virus infection. PLoS Pathog, 2014. 10(3): p. e1004021.

40. Mitchell, D.A., et al., Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. J Lipid Res, 2006. 47(6): p. 1118-27.

41. Veit, M. and S. Siche, S-acylation of influenza virus proteins: Are enzymes for fatty acid attachment promising drug targets? Vaccine, 2015. 33(49): p. 7002-7.

42. Shimano, H., et al., Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. J Clin Invest, 1997. 100(8): p. 2115-24.

43. Arafa, H.M., et al., Selective agonists of retinoic acid receptors: comparative toxicokinetics and embryonic exposure. Arch Toxicol, 2000. 73(10-11): p. 547-56.

44. Miwako, I. and H. Kagechika, Tamibarotene. Drugs Today (Barc), 2007. 43(8): p. 563-8.

45. Zhou, J., et al., Active replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus and aberrant induction of inflammatory cytokines and chemokines

in human macrophages: implications for pathogenesis. J Infect Dis, 2014. 209(9): p. 1331-42.

46. Kao, R.Y., et al., Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target. Nat Biotechnol, 2010. 28(6): p. 600-5.

47. Zheng, B.J., et al., Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1 virus. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(23): p. 8091-6.

48. Chu, H., et al., Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Efficiently Infects Human Primary T Lymphocytes and Activates the Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Pathways. J Infect Dis, 2016. 213(6): p. 904-14.

49. Chan, J.F., et al., Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor. Antiviral Res, 2017. 141: p. 29-37.

50. Yuan, S., et al., A novel small-molecule compound disrupts influenza A virus PB2 cap-binding and inhibits viral replication. J Antimicrob Chemother, 2016.

51. Yuan, S., et al., Identification of a small-molecule inhibitor of influenza virus via disrupting the subunits interaction of the viral polymerase. Antiviral Res, 2016. 125: p. 34-42.

52. Chan, C.M., et al., Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 5 Is an Important Surface Attachment Factor That Facilitates Entry of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. J Virol, 2016. 90(20): p. 9114-27.

53. Mortazavi, A., et al., Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods, 2008. 5(7): p. 621-8.

54. Kim, D., B. Langmead, and S.L. Salzberg, HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nat Methods, 2015. 12(4): p. 357-60.

55. Langmead, B., et al., Ultrafast and memory-efficient alignment of short

DNA sequences to the human genome. Genome Biol, 2009. 10(3): p. R25.

56. Burnum-Johnson, K.E., et al., MPLEx: a method for simultaneous pathogen inactivation and extraction of samples for multi-omics profiling. Analyst, 2017. 142(3): p. 442-448.

57. de Wilde, A.H., et al., MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon-alpha treatment. J Gen Virol, 2013. 94(Pt 8): p. 1749-60.

58. Yang, J., et al., The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nat Methods, 2015. 12(1): p. 7-8.

59. Sastry, G.M., et al., Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. J Comput Aided Mol Des, 2013. 27(3): p. 221-34.

60. Kim, S., et al., PubChem Substance and Compound databases. Nucleic Acids Res, 2016. 44(D1): p. D1202-13.

61. Stroganov, O.V., et al., Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening. J Chem Inf Model, 2008. 48(12): p. 2371-85.

【符號說明】無。

【序列表】

<110> 香港商鎧耀黃病毒醫療（香港）有限公司及香港商港大科橋有限公司

<120> 廣效型抗病毒治療的組合物及方法

<130> I143-18009TW

<150> US 62/573933

<151> 2017/10/18

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Glu Lys Arg Thr Ala His Asn Ala Ile Glu Lys Arg Tyr Arg Ser
1 5 10 15

Ser Ile Asn Asp Lys Ile Ile Glu Leu Lys Asp Leu Val Val Gly Thr
20 25 30

Glu Ala Lys Leu Asn Lys Ser Ala Val Leu Arg Lys Ala Ile Asp Tyr
35 40 45

Ile Arg Phe Leu Gln His Ser Asn Gln Lys Leu Lys Gln Glu Asn Leu
50 55 60

Ser Leu Arg Thr Ala Val His Lys Ser Lys Ser Leu Lys Asp Leu Val
65 70 75 80

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種化合物用於製備一藥物的用途，該藥物係用於治療一病毒感染，

其中該化合物係AM580，且

其中病毒選自於由中東呼吸症候群-冠狀病毒、嚴重急性呼吸道症候群-冠狀病毒、茲卡病毒、A型流感病毒、人類腺病毒及腸病毒所組成之群組。

【第2項】如申請專利範圍第1項所述的用途，其中病毒選自於由A型流感病毒H1N1 pdm09、A型流感病毒H5N1、A型流感病毒H7N9、人類腺病毒5及腸病毒-第71型所組成之群組。

【發明圖式】

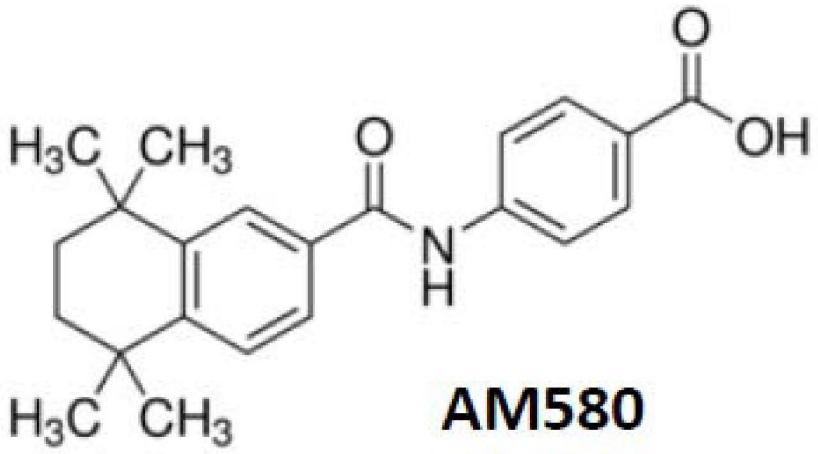


圖 1

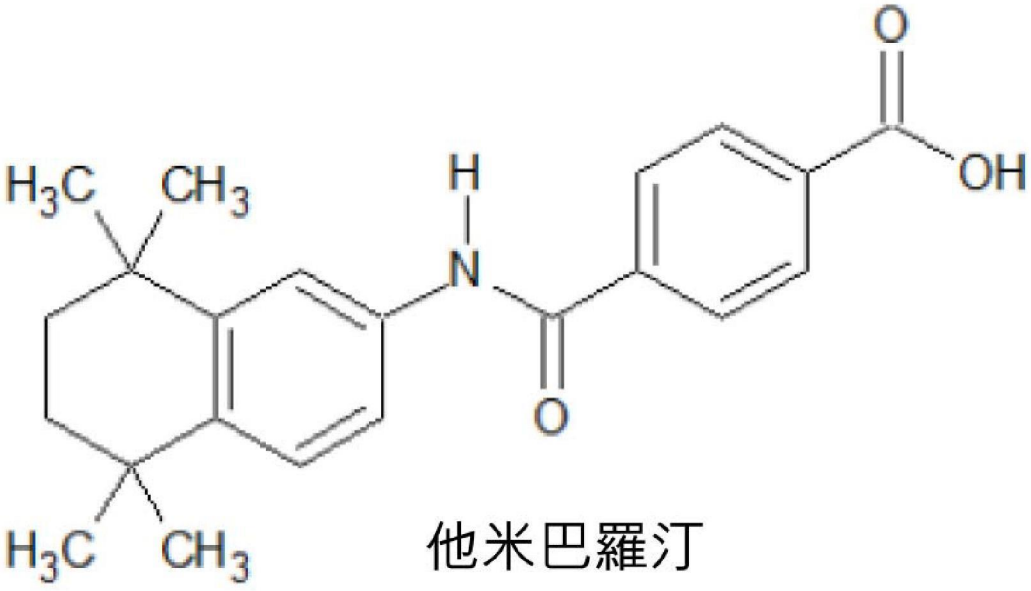


圖 2

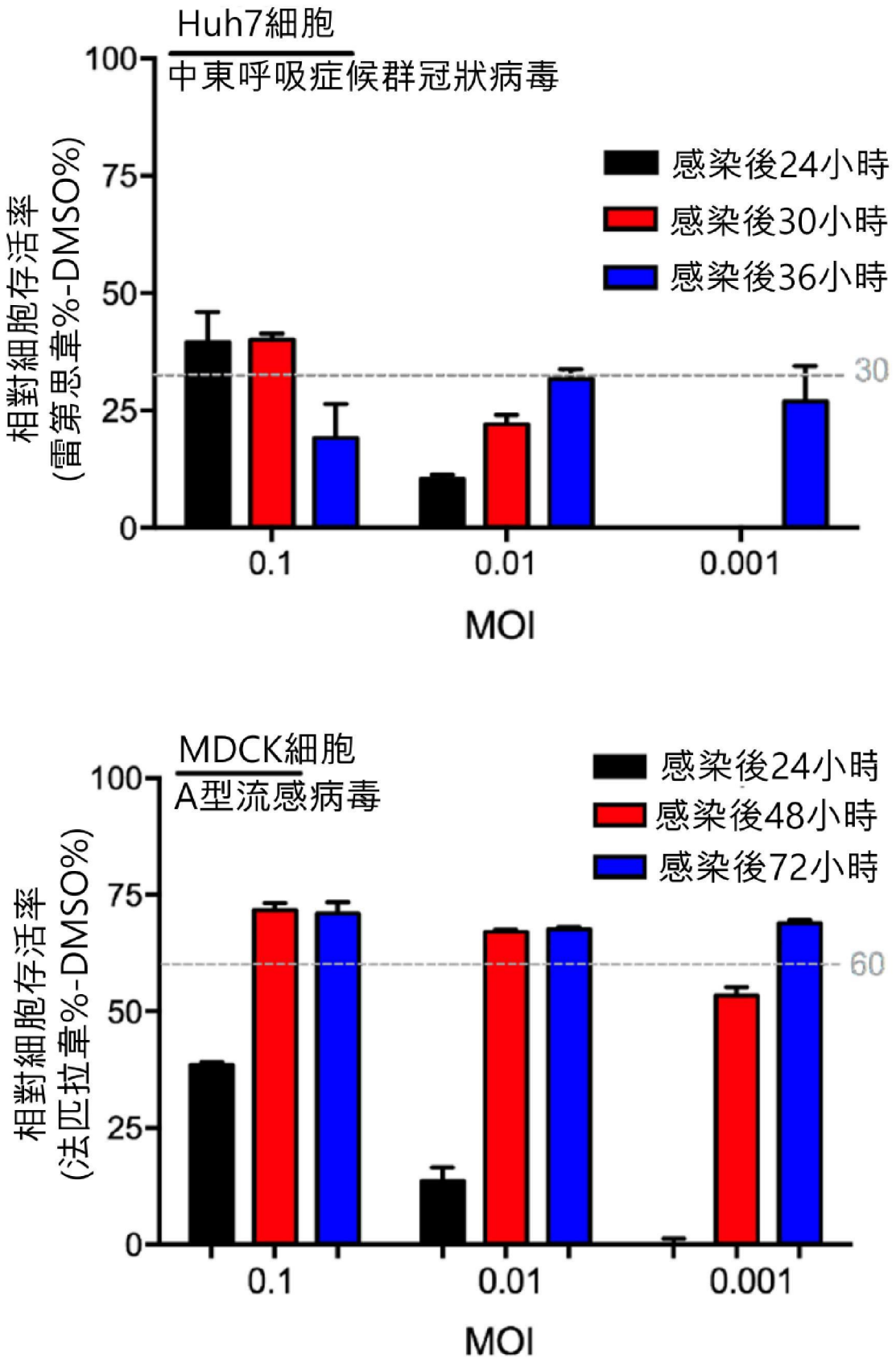

Huh7細胞
中東呼吸症候群冠狀病毒
相對細胞存活率
(雷第思韋%-DMSO%)
100
75
50
25
0
30
感染後24小時
感染後30小時
感染後36小時
0.1
0.01
0.001
MOI
MDCK細胞
A型流感病毒
相對細胞存活率
(法匹拉韋%-DMSO%)
100
75
50
25
0
60
感染後24小時
感染後48小時
感染後72小時
0.1
0.01
0.001
MOI

圖 3

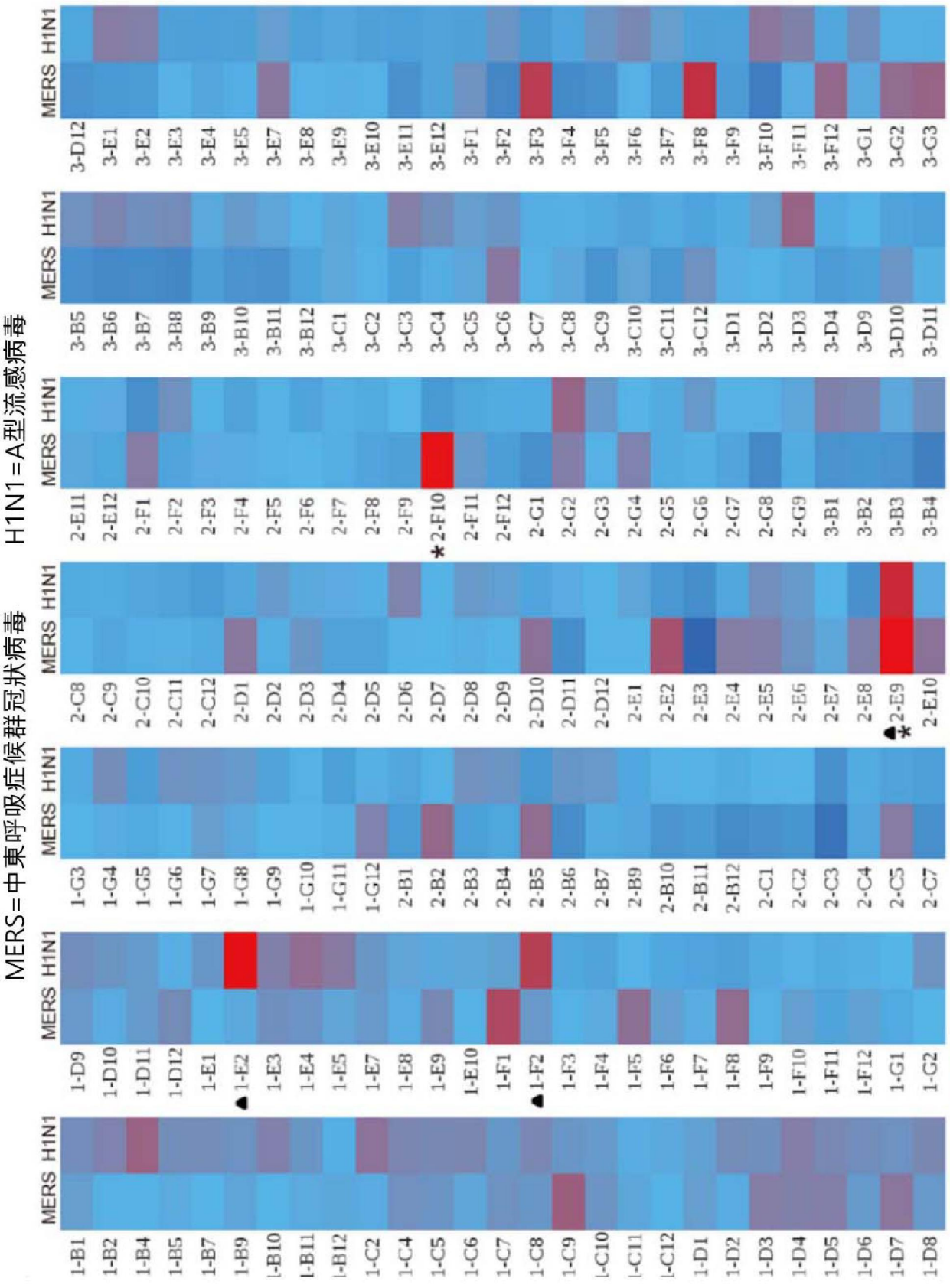

MERS=中東呼吸症候群冠狀病毒
H1N1=A型流感病毒
MERS H1N1
1-B1 1-B2 1-B4 1-B5 1-B7 1-B9 1-B10 1-B11 1-B12 1-C2 1-C4 1-C5 1-C6 1-C7 1-C8 1-C9 1-C10 1-C11 1-C12 1-D1 1-D2 1-D3 1-D4 1-D5 1-D6 1-D7 1-D8
1-D9 1-D10 1-D11 1-D12 1-E1 1-E2 1-E3 1-E4 1-E5 1-E7 1-E8 1-E9 1-E10 1-F1 1-F2 1-F3 1-F4 1-F5 1-F6 1-F7 1-F8 1-F9 1-F10 1-F11 1-F12 1-G1 1-G2
1-G3 1-G4 1-G5 1-G6 1-G7 1-G8 1-G9 1-G10 1-G11 1-G12 2-B1 2-B2 2-B3 2-B4 2-B5 2-B6 2-B7 2-B9 2-B10 2-B11 2-B12 2-C1 2-C2 2-C3 2-C4 2-C5 2-C7
2-C8 2-C9 2-C10 2-C11 2-C12 2-D1 2-D2 2-D3 2-D4 2-D5 2-D6 2-D7 2-D8 2-D9 2-D10 2-D11 2-D12 2-E1 2-E2 2-E3 2-E4 2-E5 2-E6 2-E7 2-E8 2-E9 2-E10
2-E11 2-E12 2-F1 2-F2 2-F3 2-F4 2-F5 2-F6 2-F7 2-F8 2-F9 2-F10 2-F11 2-F12 2-G1 2-G2 2-G3 2-G4 2-G5 2-G6 2-G7 2-G8 2-G9 3-B1 3-B2 3-B3 3-B4
3-B5 3-B6 3-B7 3-B8 3-B9 3-B10 3-B11 3-B12 3-C1 3-C2 3-C3 3-C4 3-C5 3-C6 3-C7 3-C8 3-C9 3-C10 3-C11 3-C12 3-D1 3-D2 3-D3 3-D4 3-D9 3-D10 3-D11
3-D12 3-E1 3-E2 3-E3 3-E4 3-E5 3-E7 3-E8 3-E9 3-E10 3-E11 3-E12 3-F1 3-F2 3-F3 3-F4 3-F5 3-F6 3-F7 3-F8 3-F9 3-F10 3-F11 3-F12 3-G1 3-G2 3-G3
1
0
-1

圖 4

鑑定之抗中東呼吸症候群抑制劑

ID	名稱
2-E9	AM580
2-F10	25-羥基維生素D3

圖 5

鑑定之抗流感抑制劑

ID	名稱
1-E2	FICZ
1-F2	C16神經醯胺
2-E9	AM580

圖 6

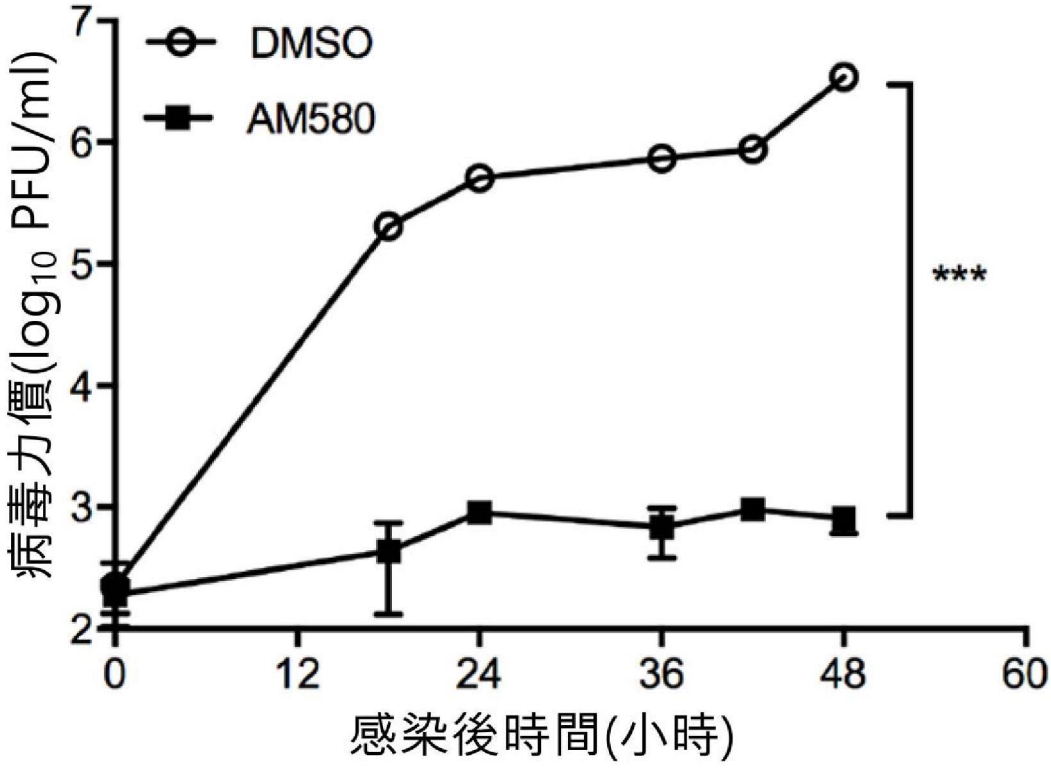


圖 7

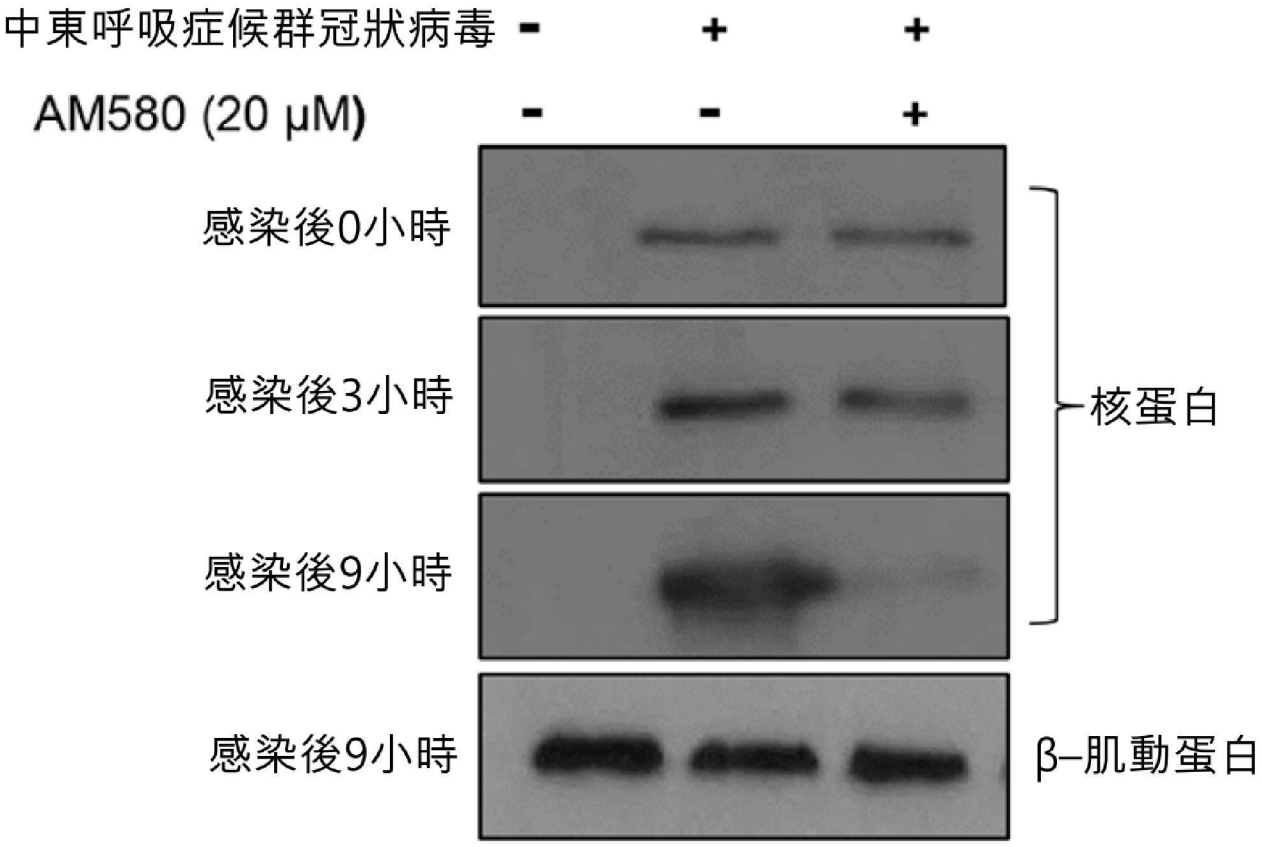

中東呼吸症候群冠狀病毒 - + +
AM580 (20 μM) - - +
感染後0小時
感染後3小時
感染後9小時
核蛋白
感染後9小時
β–肌動蛋白

圖 8

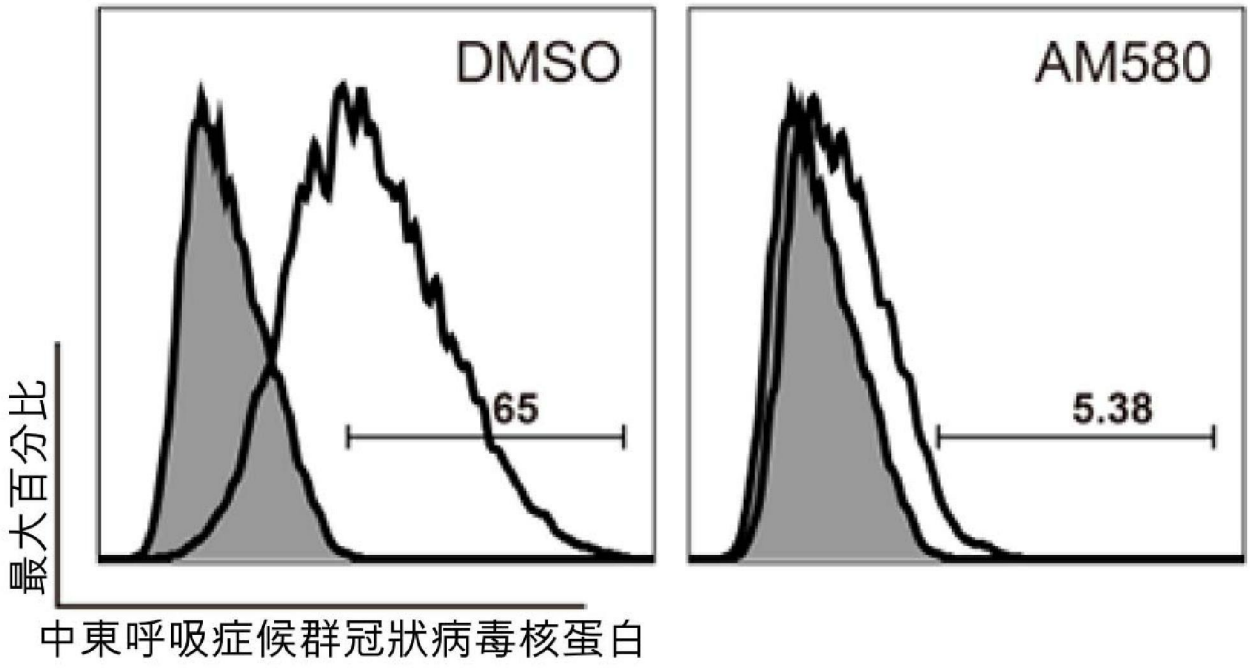

DMSO
AM580
65
5.38
最大百分比
中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白

圖 9

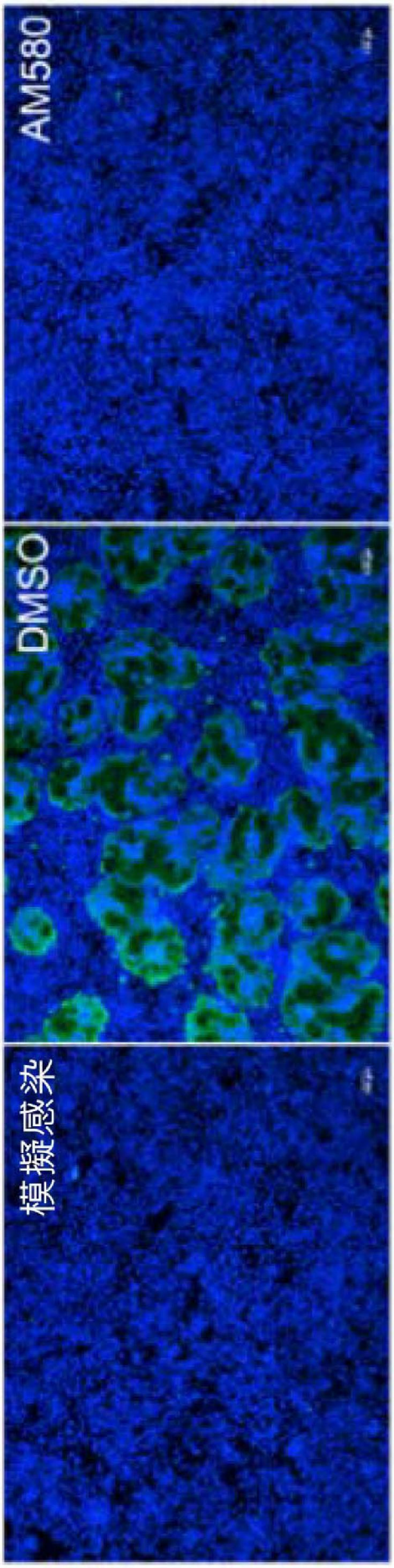


圖 10

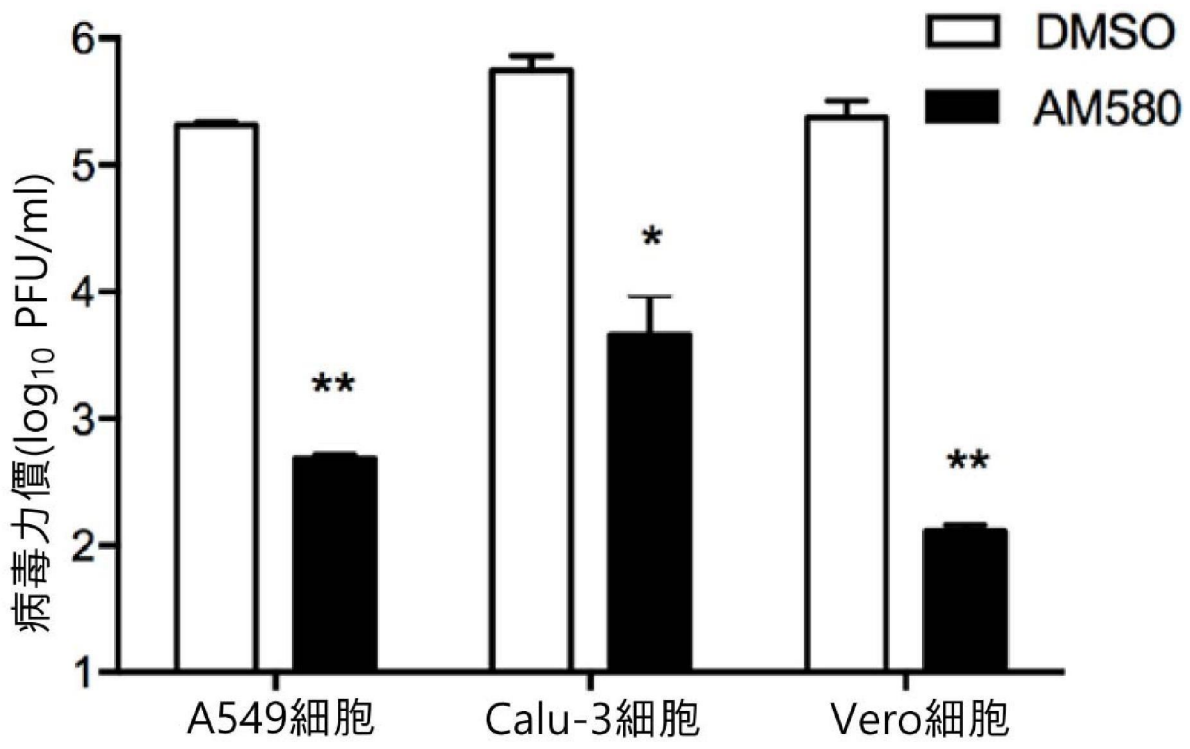

DMSO
AM580
病毒力價(log10 PFU/ml)
6
5
4
3
2
1
*
**
**
A549細胞
Calu-3細胞
Vero細胞

圖 11

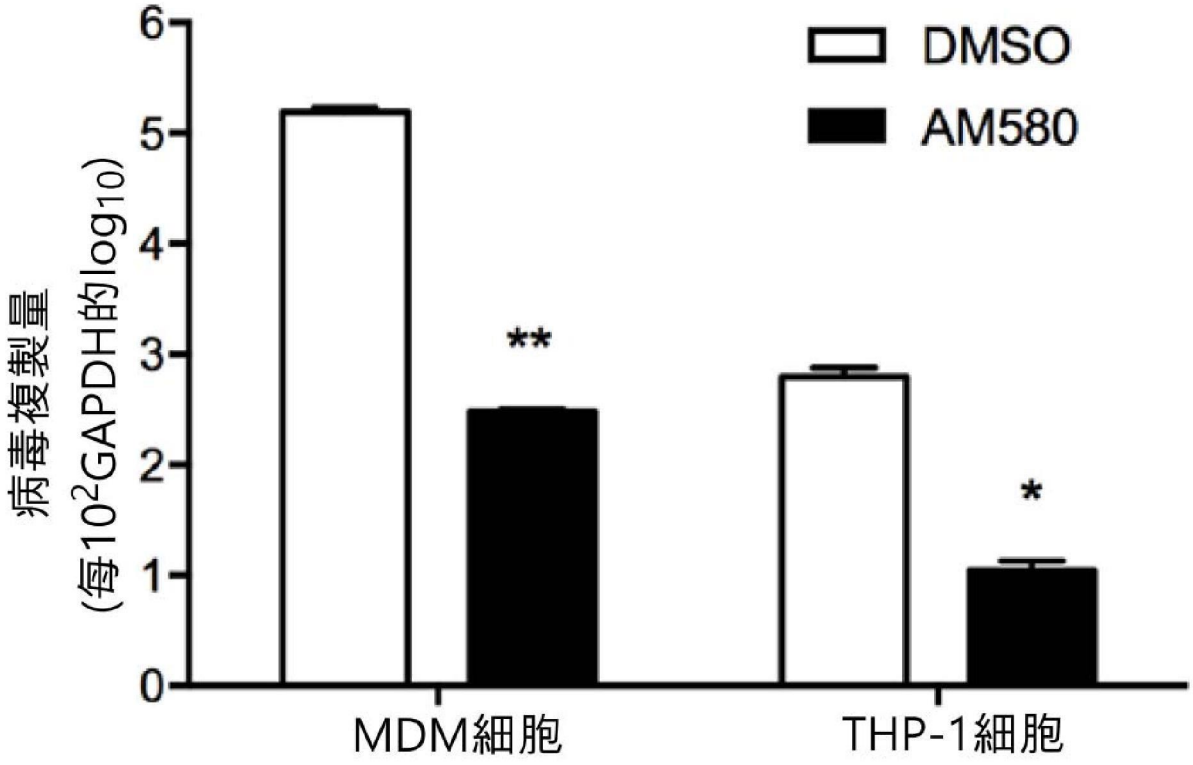

DMSO
AM580
病毒複製量
(每10²GAPDH的log10)
6
5
4
3
2
1
0
**
*
MDM細胞
THP-1細胞

圖 12

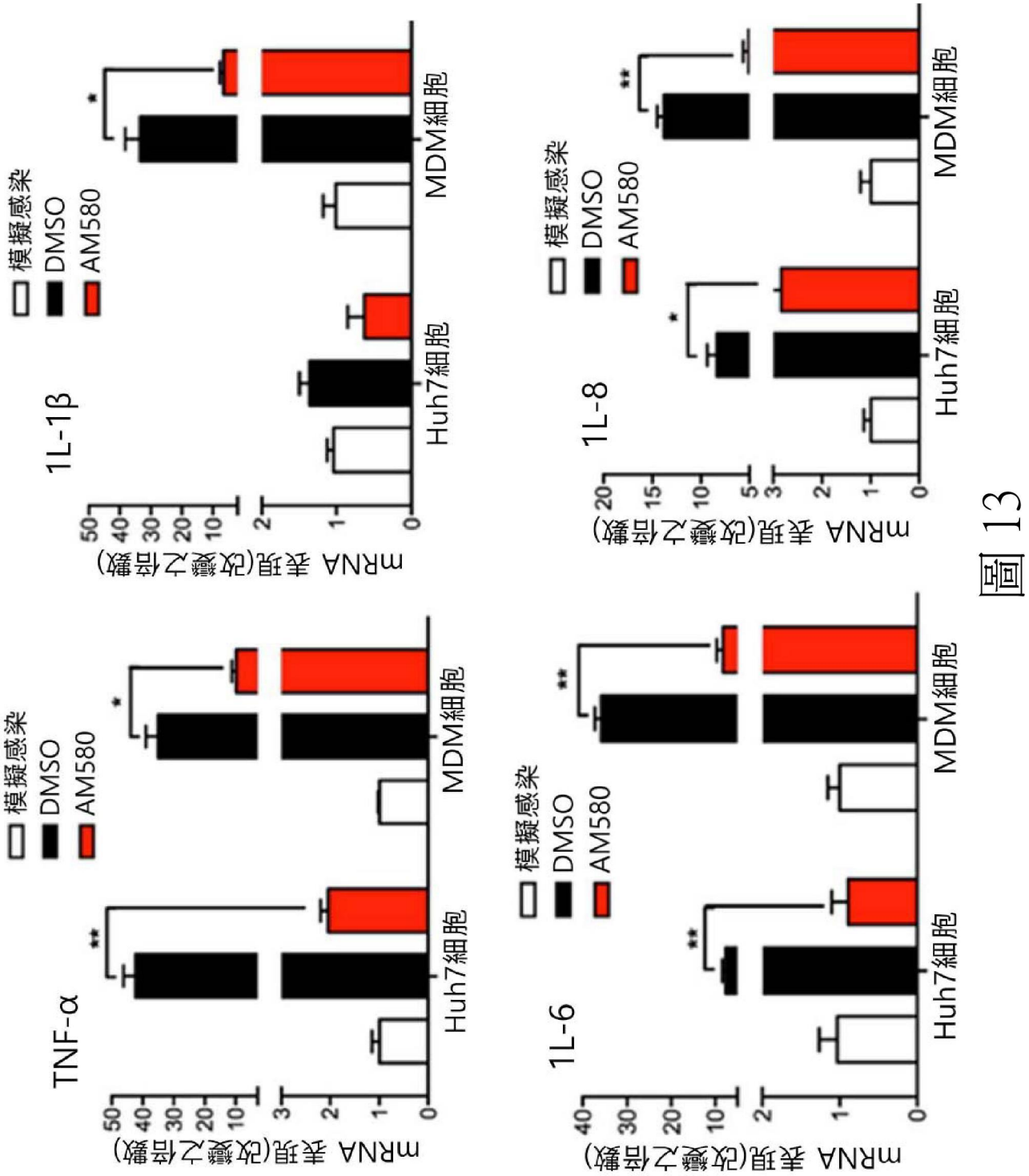


圖 13

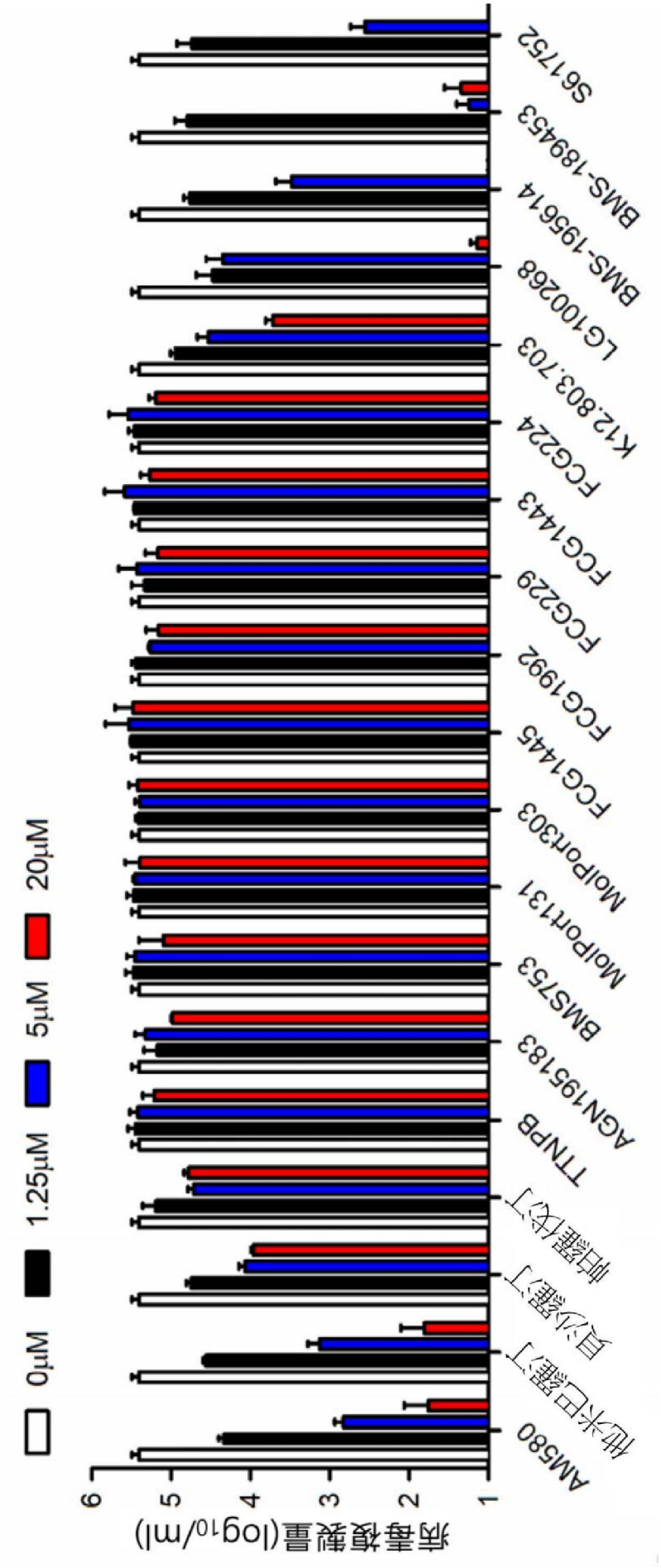

病毒複製量(log10/ml)
1
2
3
4
5
6
0μM
1.25μM
5μM
20μM
AM580
他米巴羅汀
貝沙羅汀
帕羅伐汀
TTNPB
AGN195183
BMS753
MoIPort131
MoIPort303
FCG1445
FCG1992
FCG229
FCG1443
FCG224
K12.803.703
LG100268
BMS-195614
BMS-189453
S61752

圖 14

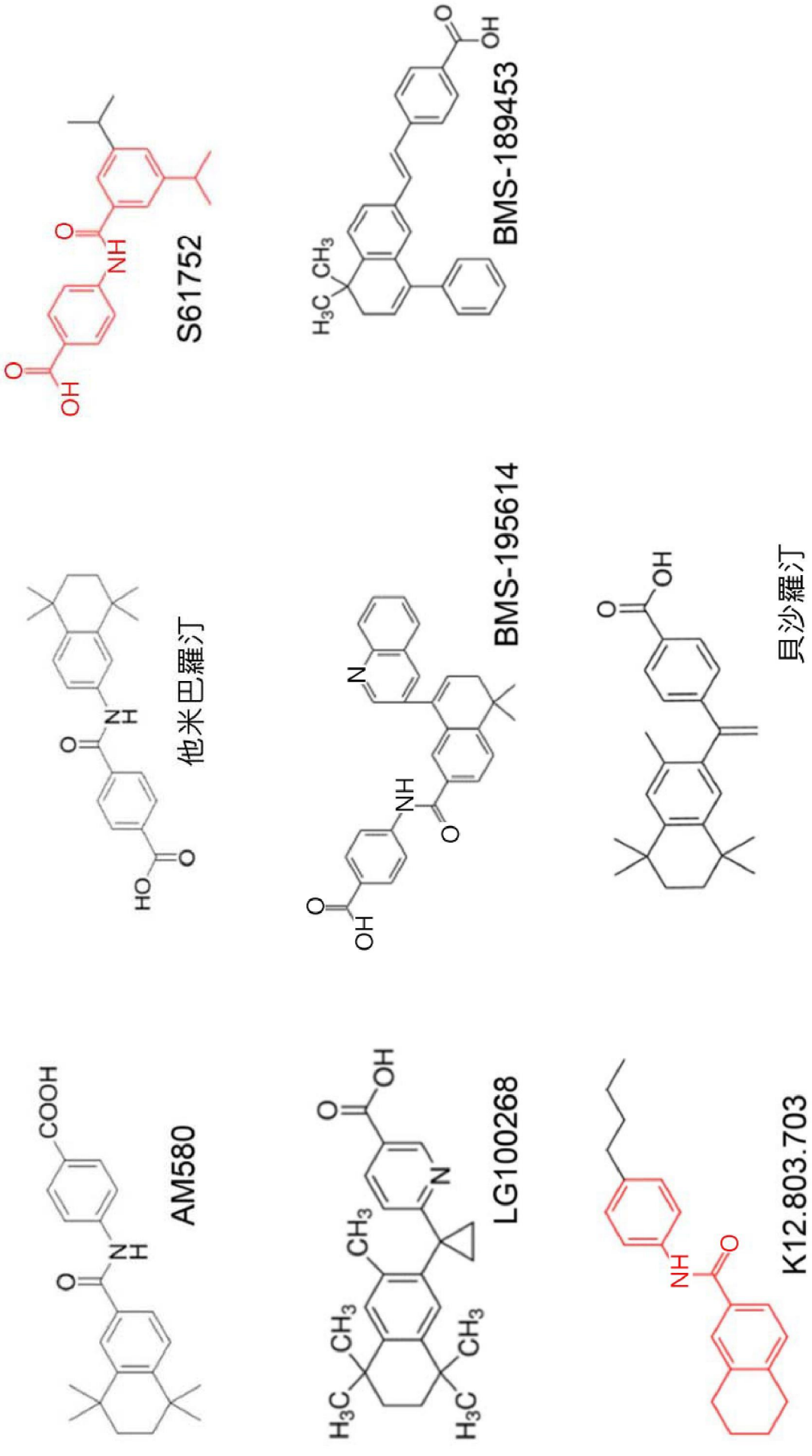

S61752
BMS-189453
他米巴羅汀
BMS-195614
貝沙羅汀
AM580
LG100268
K12.803.703

圖 15

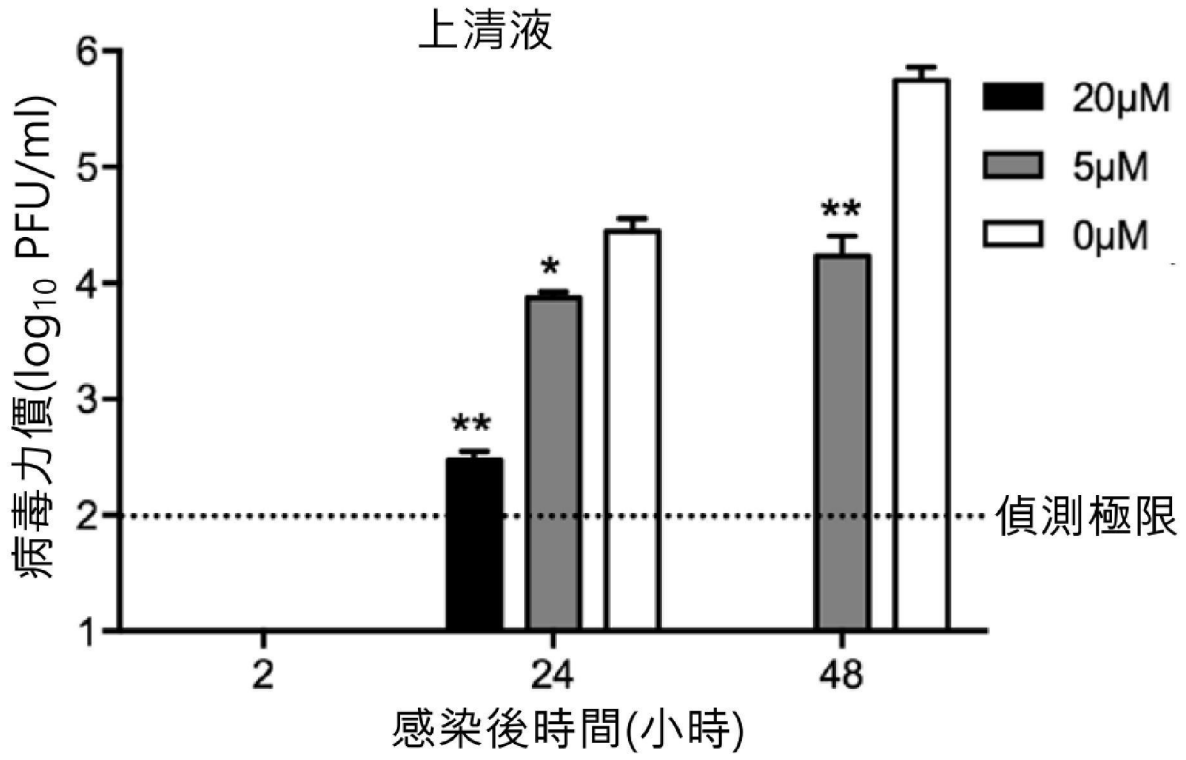

上清液
病毒力價(log10 PFU/ml)
6
5
4
3
2
1
20μM
5μM
0μM
**
*
**
偵測極限
2
24
48
感染後時間(小時)

圖 16

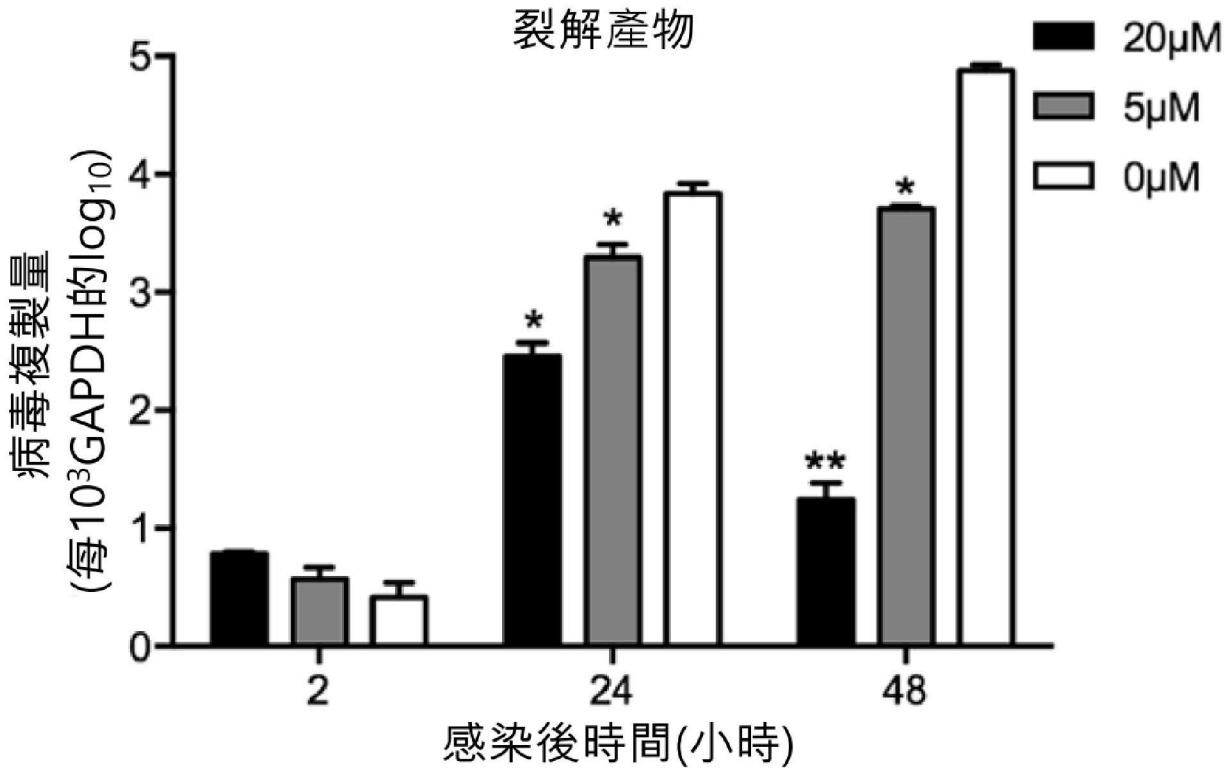

裂解產物
病毒複製量
(每10³GAPDH的log10)
5
4
3
2
1
0
20μM
5μM
0μM
*
*
*
**
2
24
48
感染後時間(小時)

圖 17

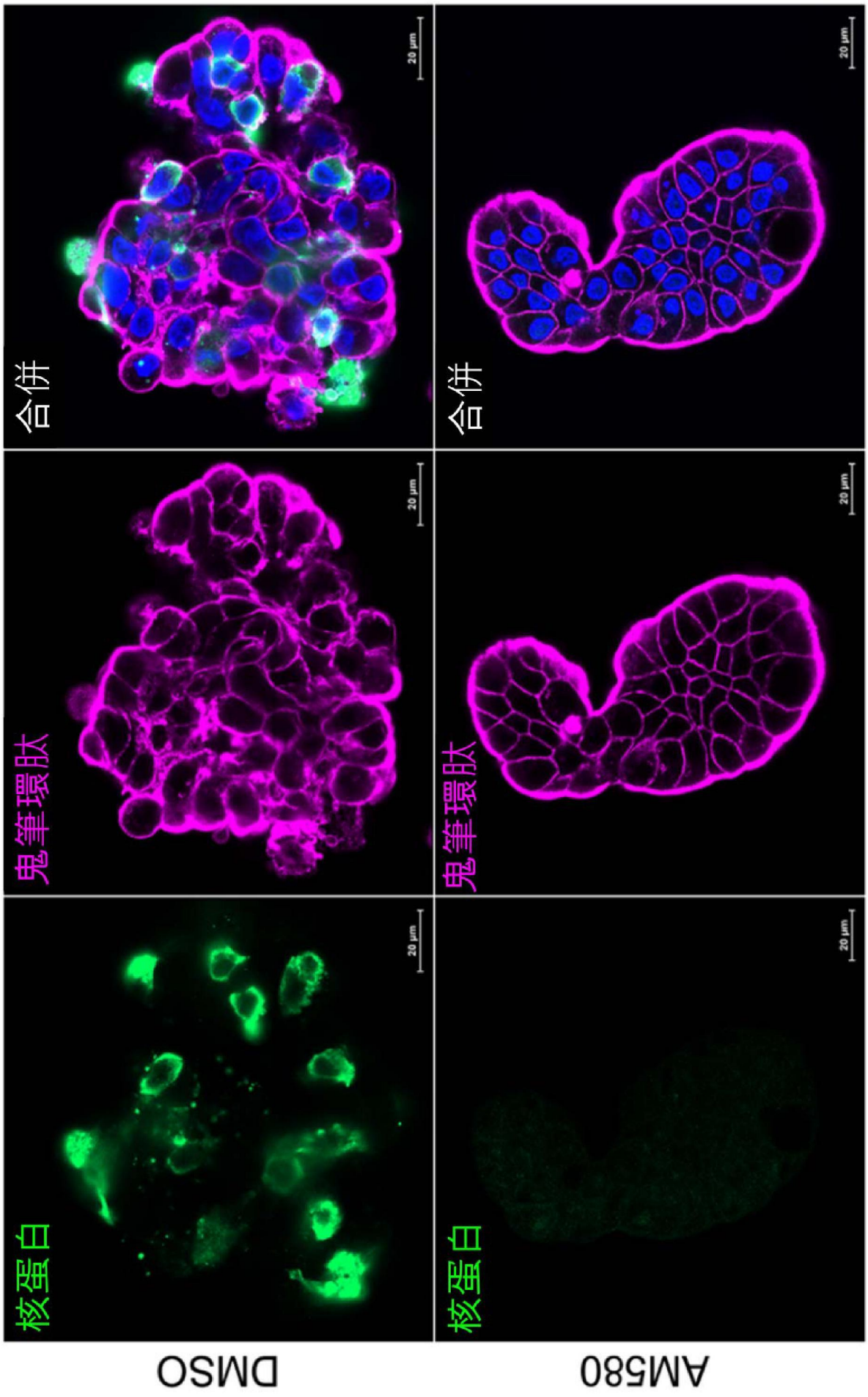


圖 18

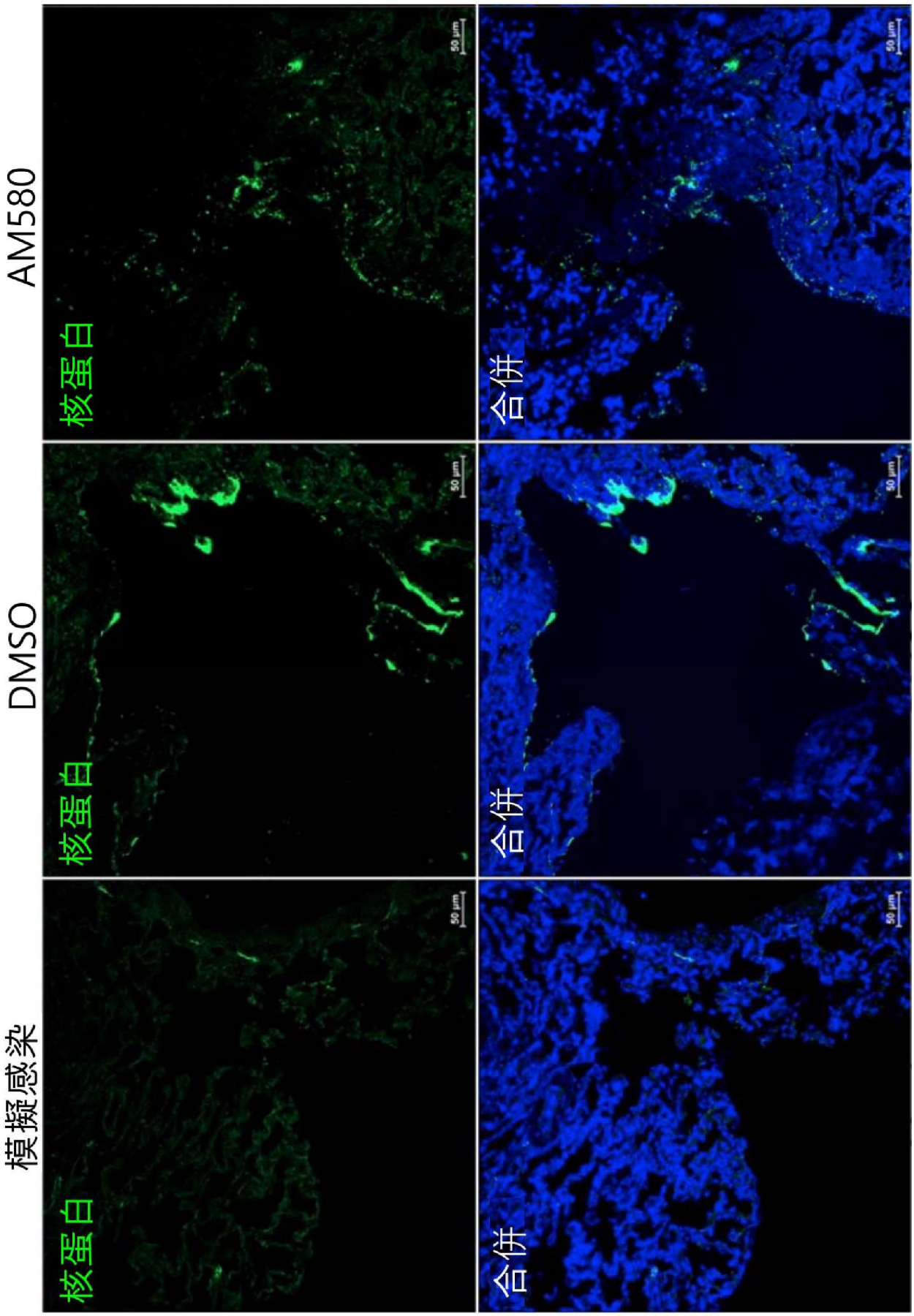


圖 19

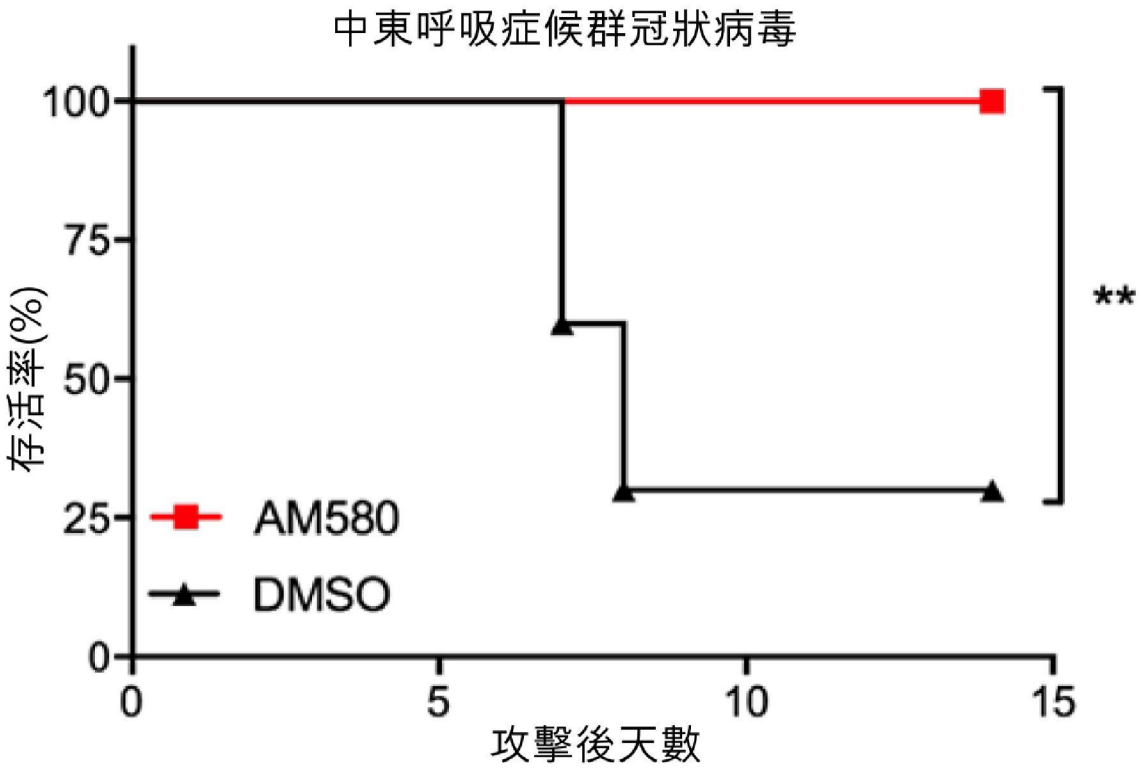

中東呼吸症候群冠狀病毒
100
75
50
25
0
存活率(%)
AM580
DMSO
**
0
5
10
15
攻擊後天數

圖 20

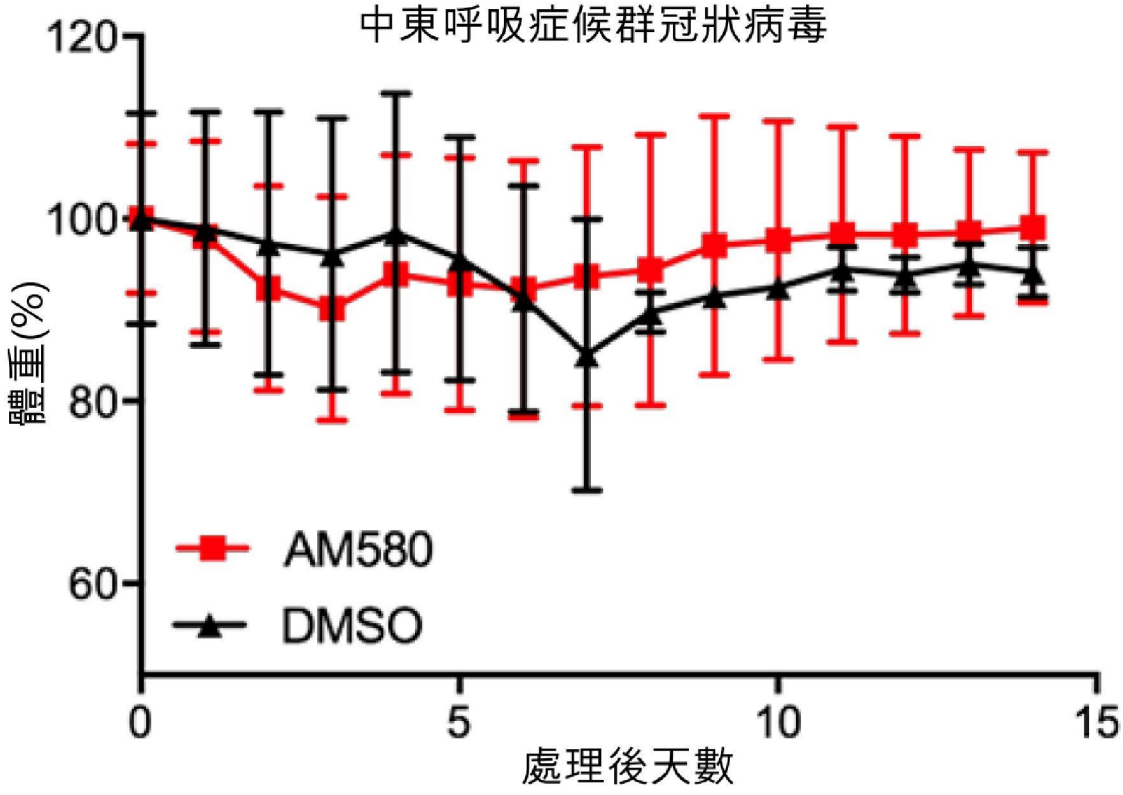

中東呼吸症候群冠狀病毒
120
100
80
60
體重(%)
AM580
DMSO
0
5
10
15
處理後天數

圖 21

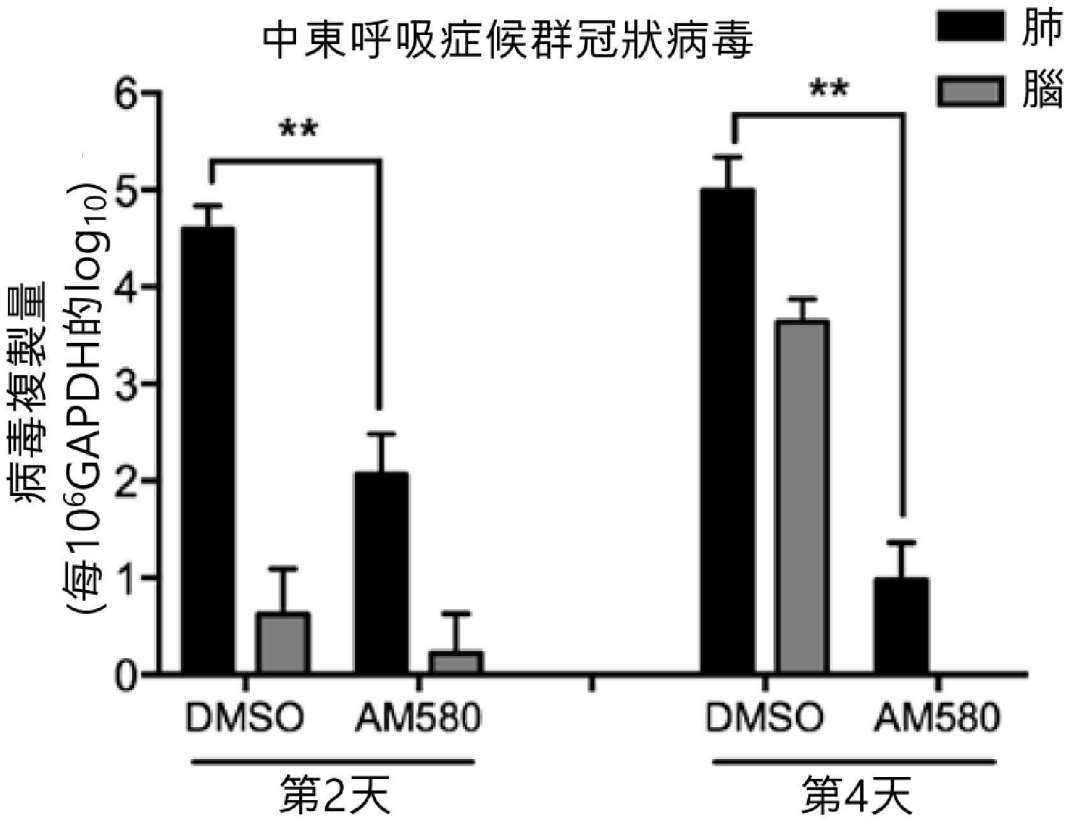

中東呼吸症候群冠狀病毒
肺
腦
病毒複製量
(每10^6GAPDH的log10)
6
5
4
3
2
1
0
**
**
DMSO
AM580
DMSO
AM580
第2天
第4天

圖 22

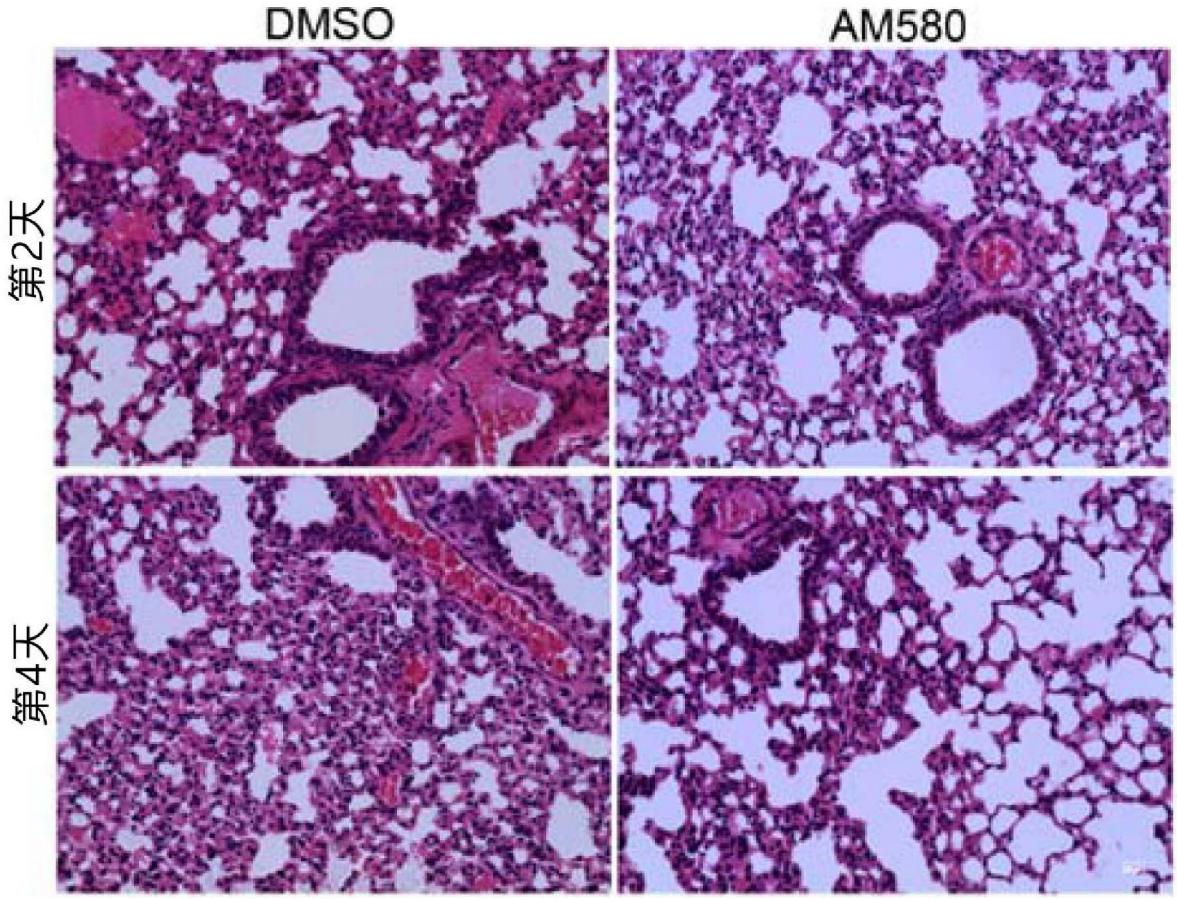

DMSO
AM580
第2天
第4天

圖 23

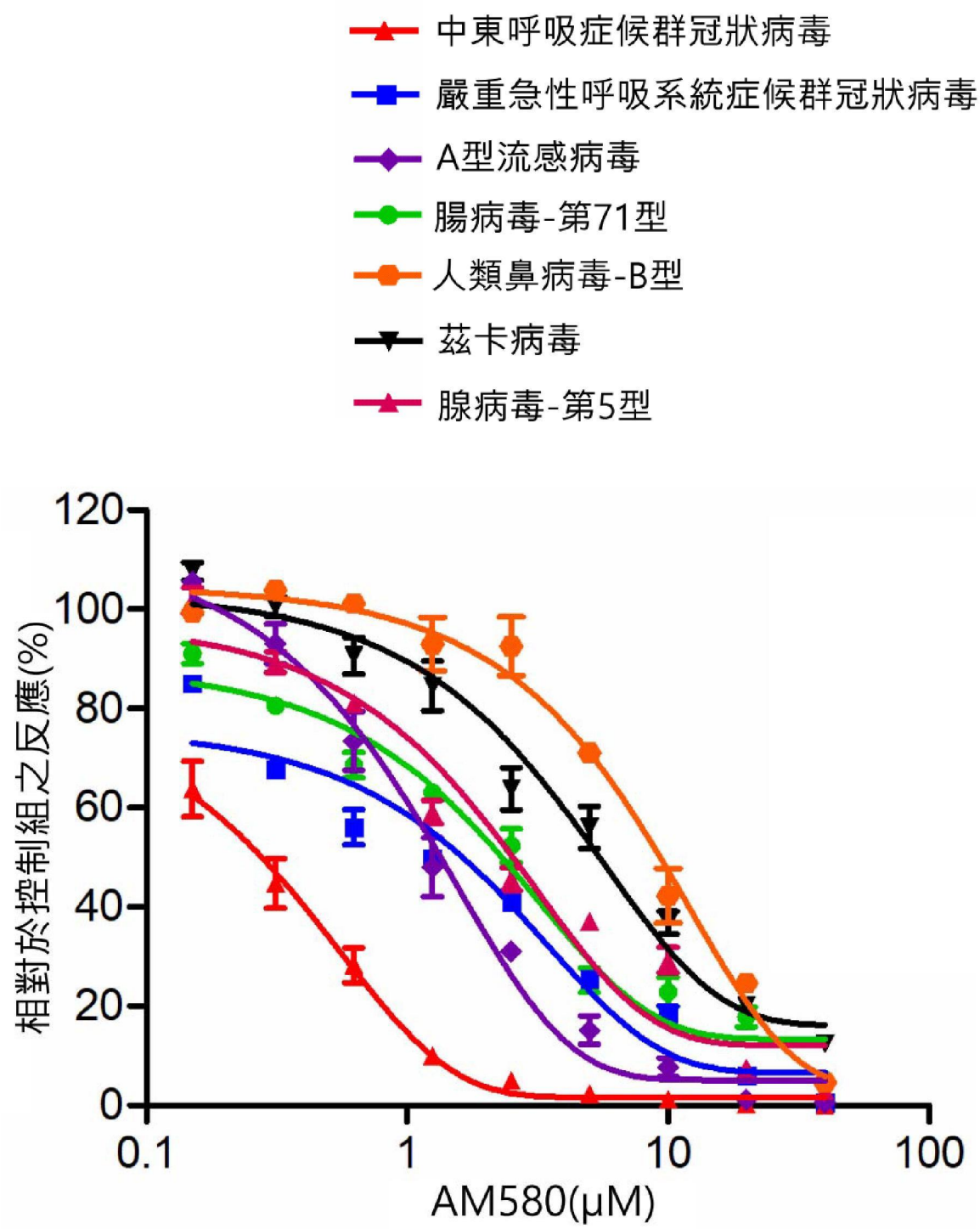

中東呼吸症候群冠狀病毒
嚴重急性呼吸系統症候群冠狀病毒
A型流感病毒
腸病毒-第71型
人類鼻病毒-B型
茲卡病毒
腺病毒-第5型
相對於控制組之反應(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
AM580(μM)

圖 24

AM580之抗病毒活性

病毒科別	病毒	IC_{50} (μM)
冠狀病毒	中東呼吸症候群冠狀病毒(HCoV-EMC/2012)	0.25 ± 0.03
	嚴重急性呼吸系統症候群冠狀病毒(GZ50)	1.11 ± 0.83
微小核糖核酸病毒科	腸病毒-第71型(SZ/HK05)	2.19 ± 1.35
	人類鼻病毒-B型	9.35 ± 2.46
黃病毒科	茲卡病毒(PRVABC59)	5.70 ± 1.08
正黏液病毒科	A型流感病毒(H1N1)pdm09	1.34 ± 1.07
腺病毒	腺病毒-第5型(臨床分離)	1.51 ± 0.37 *

圖 25

AM580之細胞毒殺

細胞株	CC_{50} (μM) MTT 法	CC_{50} (μM) CellTiter-Glo 法
Huh7細胞	118.1 ± 1.1	106.2 ± 3.1
HEp-2細胞	132.6± 1.2	152.6± 6.5
RD細胞	127.6 ± 3.2	117.4 ± 2.1
HEK293T細胞	115.7 ± 3.2	192.1 ± 6.3
Vero細胞	126.7 ± 1.7	135.4 ± 2.9
MDCK細胞	212.8 ± 12.3	142.8 ± 4.1

圖 26

病毒科別	病毒	選擇性指數 (CC_{50}/IC_{50})
冠狀病毒	中東呼吸症候群冠狀病毒(HCoV-EMC/2012)	507
	嚴重急性呼吸系統症候群冠狀病毒(GZ50)	114
微小核糖核酸病毒科	腸病毒-第71型(SZ/HK05)	58
	人類鼻病毒-B型(臨床分離)	14
黃病毒科	茲卡病毒(PRVABC59)	22
正黏液病毒科	A型流感病毒(H1N1)pdm09	159
腺病毒	腺病毒-第5型(臨床分離)	51

圖 27

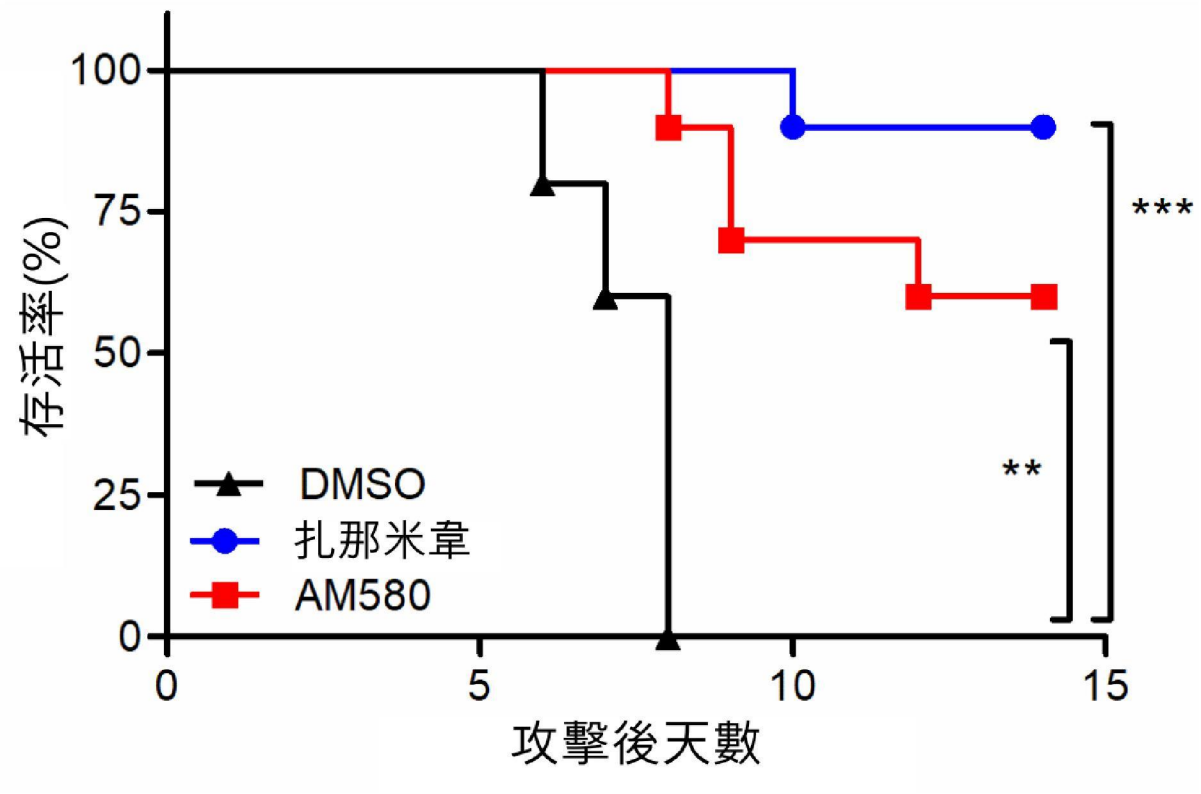

100
75
50
25
0
存活率(%)
DMSO
扎那米韋
AM580
***
**
0
5
10
15
攻擊後天數

圖 28

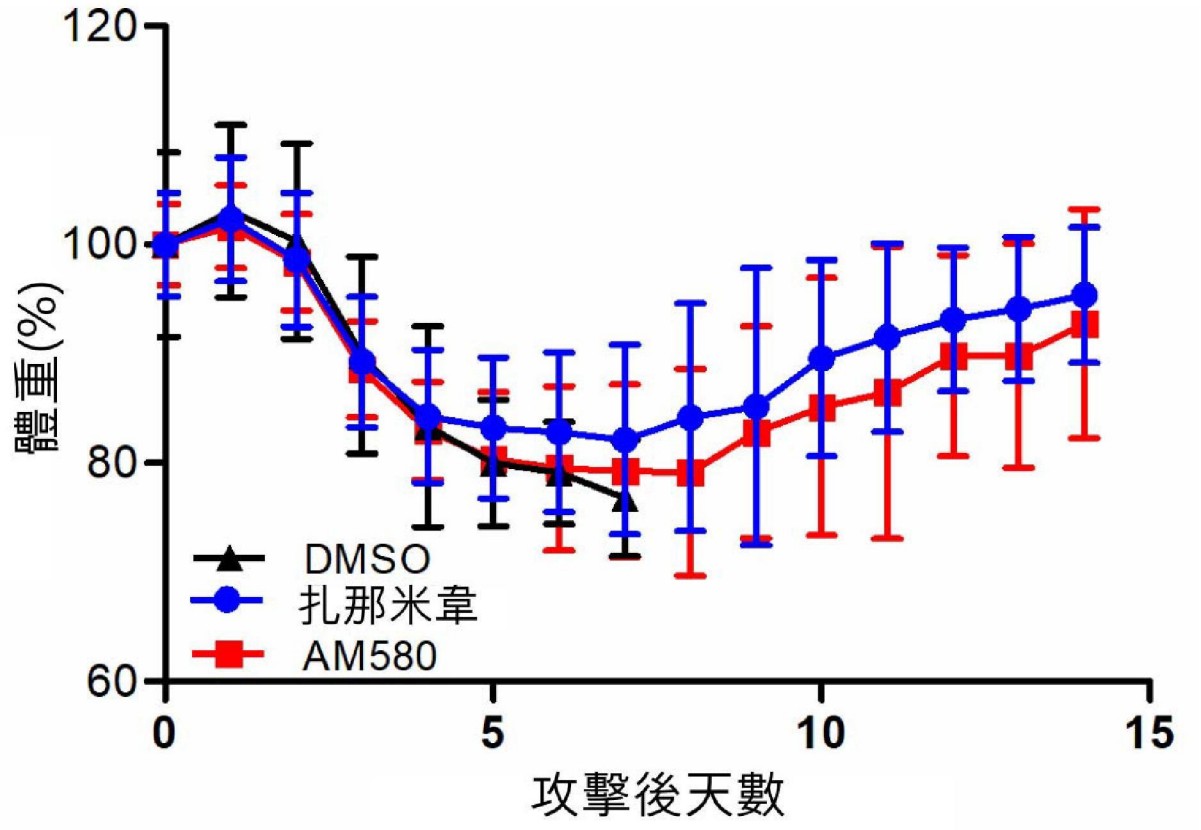

120
100
80
60
體重(%)
DMSO
扎那米韋
AM580
0
5
10
15
攻擊後天數

圖 29

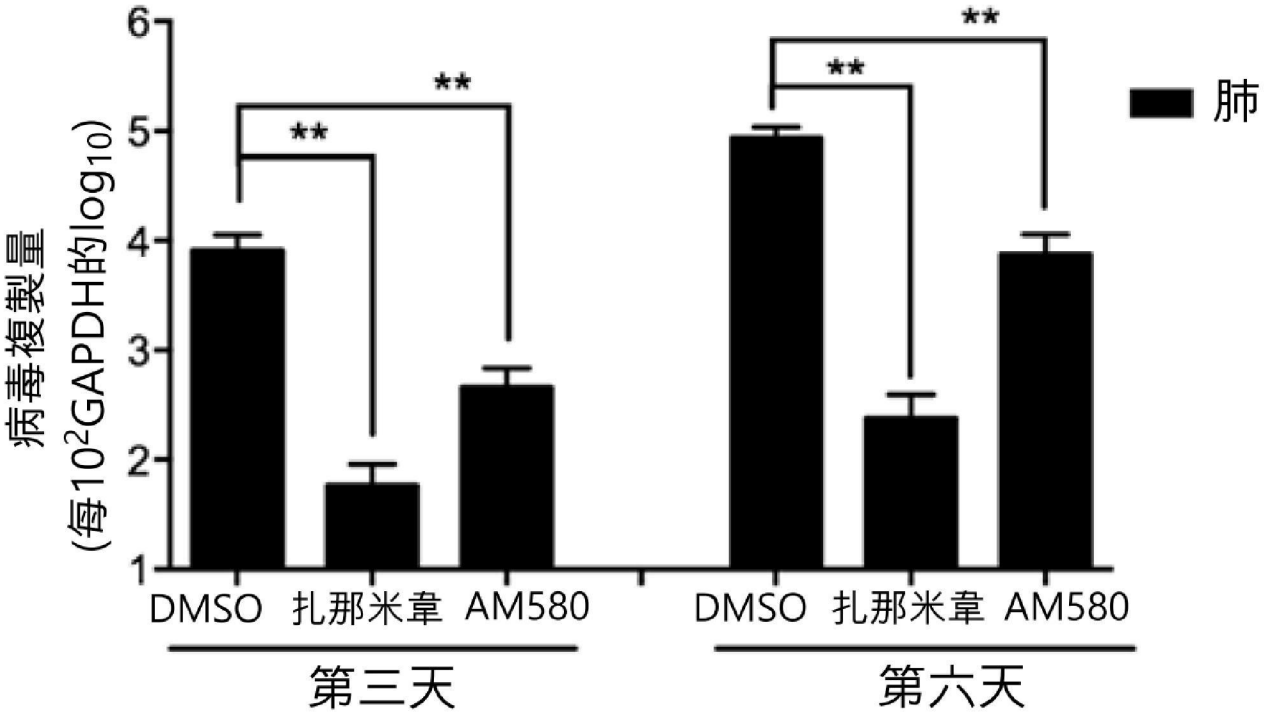

病毒複製量
(每10²GAPDH的log10)
6
5
4
3
2
1
**
**
**
**
肺
DMSO
扎那米韋
AM580
DMSO
扎那米韋
AM580
第三天
第六天

圖 30

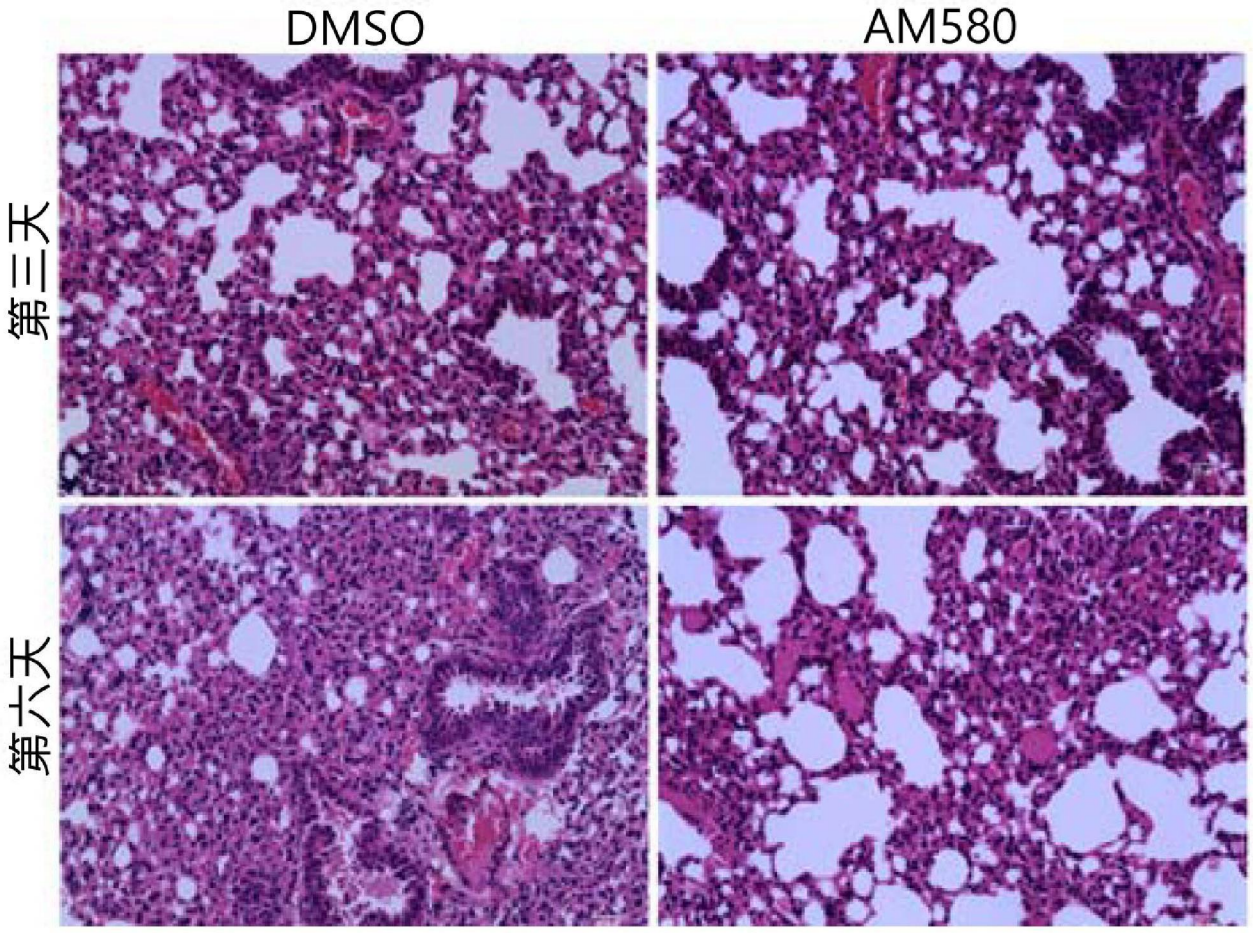

DMSO
AM580
第三天
第六天

圖 31

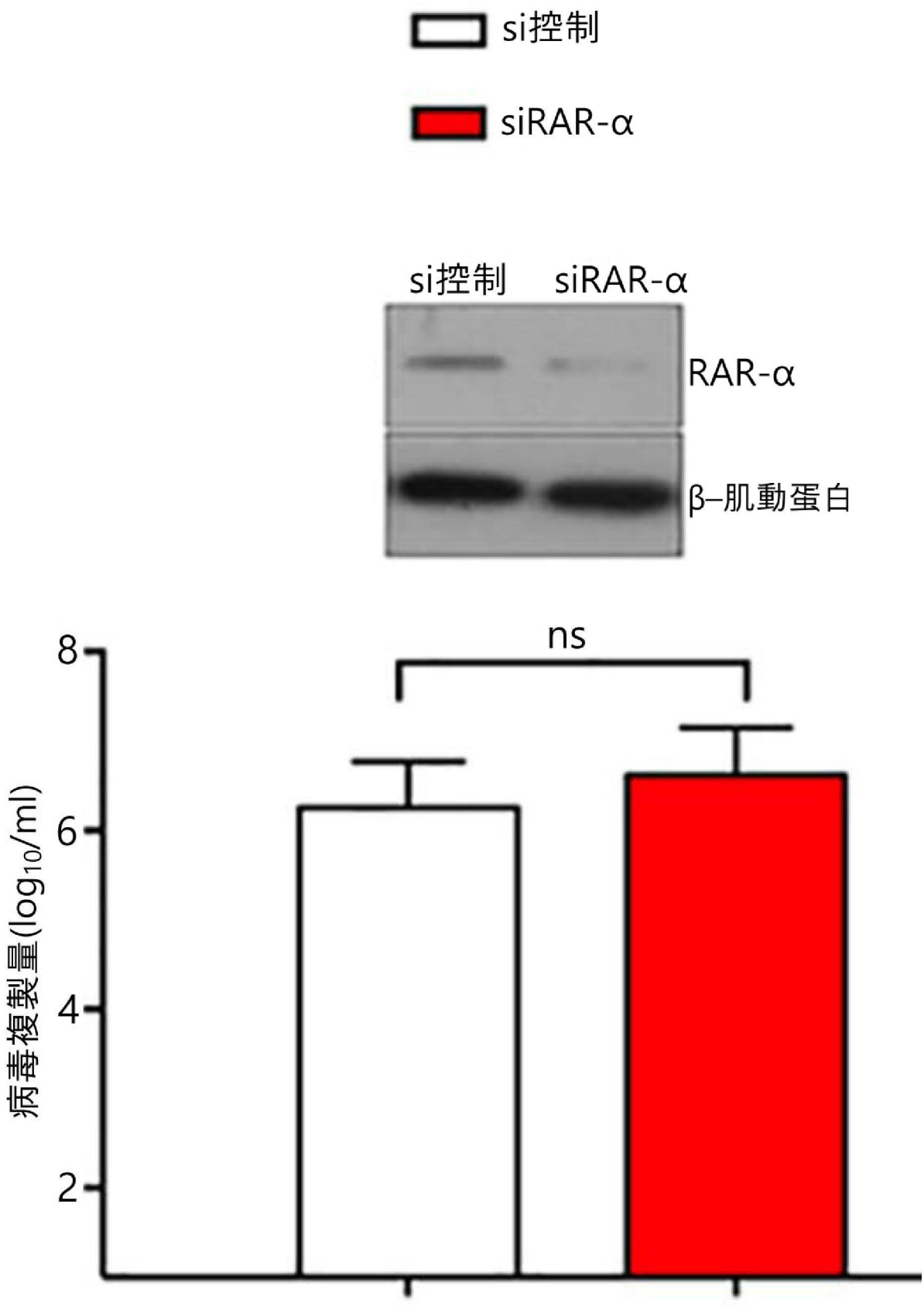


圖 32

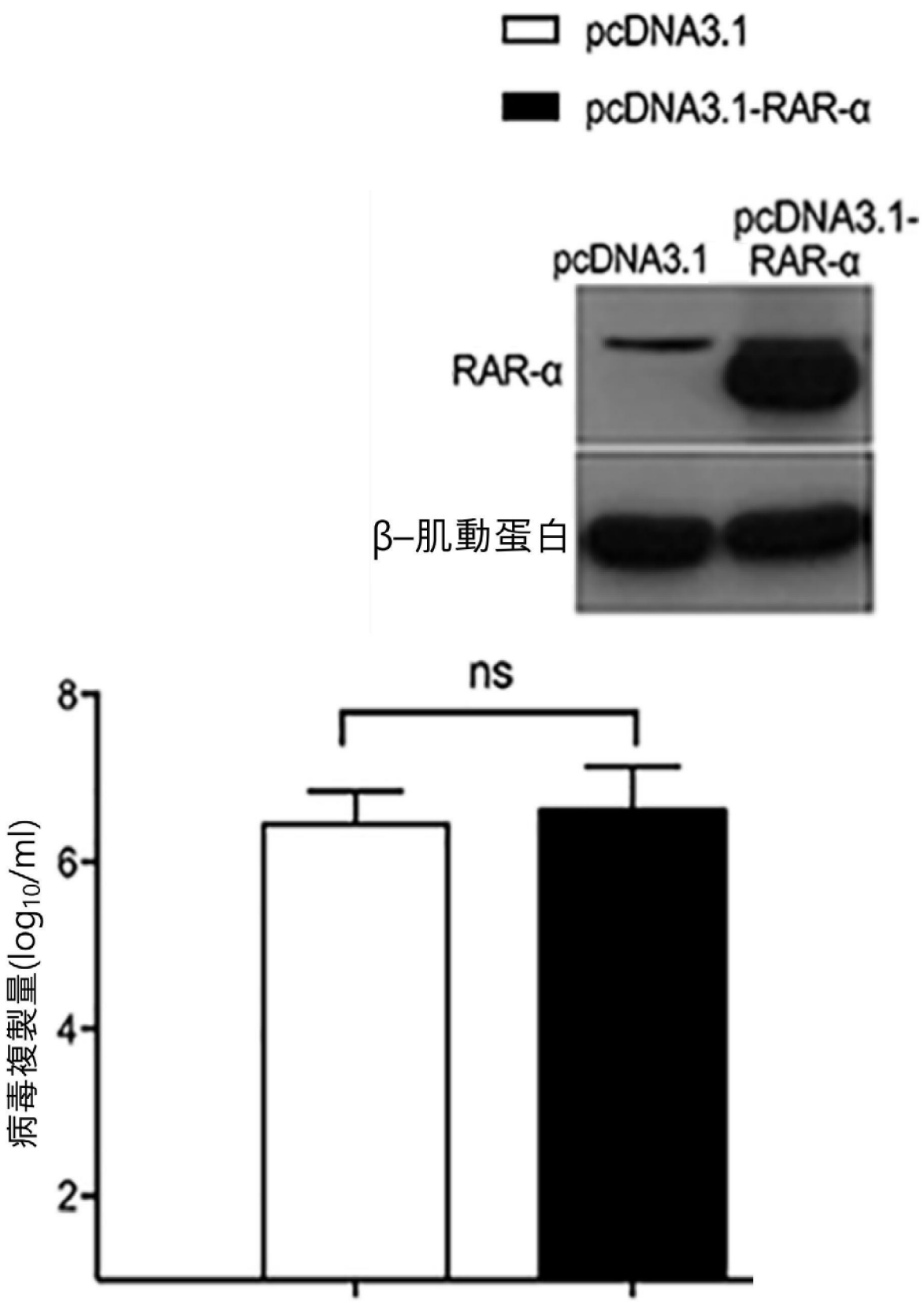

pcDNA3.1
pcDNA3.1-RAR-α
pcDNA3.1
pcDNA3.1-RAR-α
RAR-α
β–肌動蛋白
ns
病毒複製量(log10/ml)
8
6
4
2

圖 33

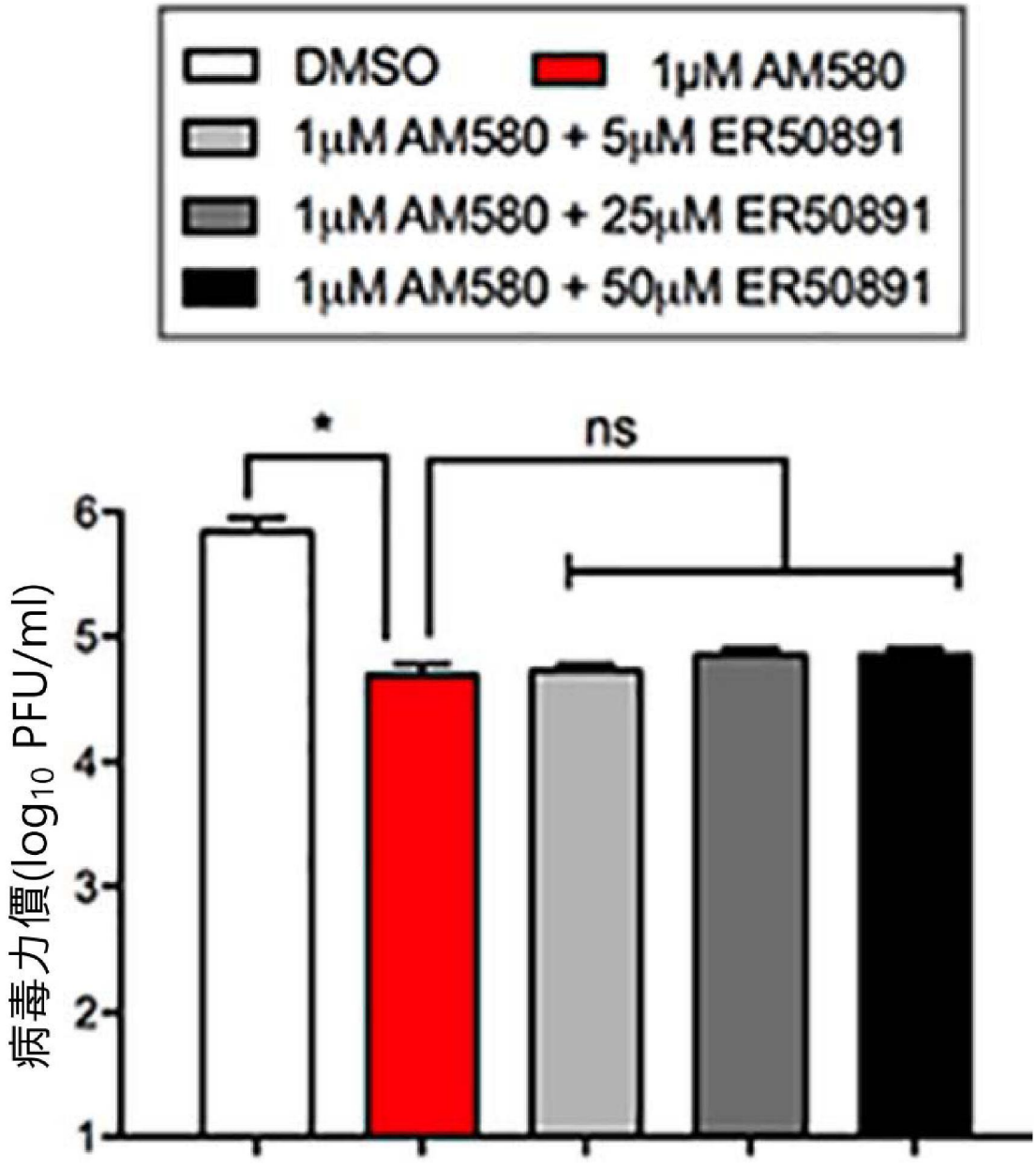

DMSO
1μM AM580
1μM AM580 + 5μM ER50891
1μM AM580 + 25μM ER50891
1μM AM580 + 50μM ER50891
*
ns
病毒力價(log10 PFU/ml)
6
5
4
3
2
1

圖 34

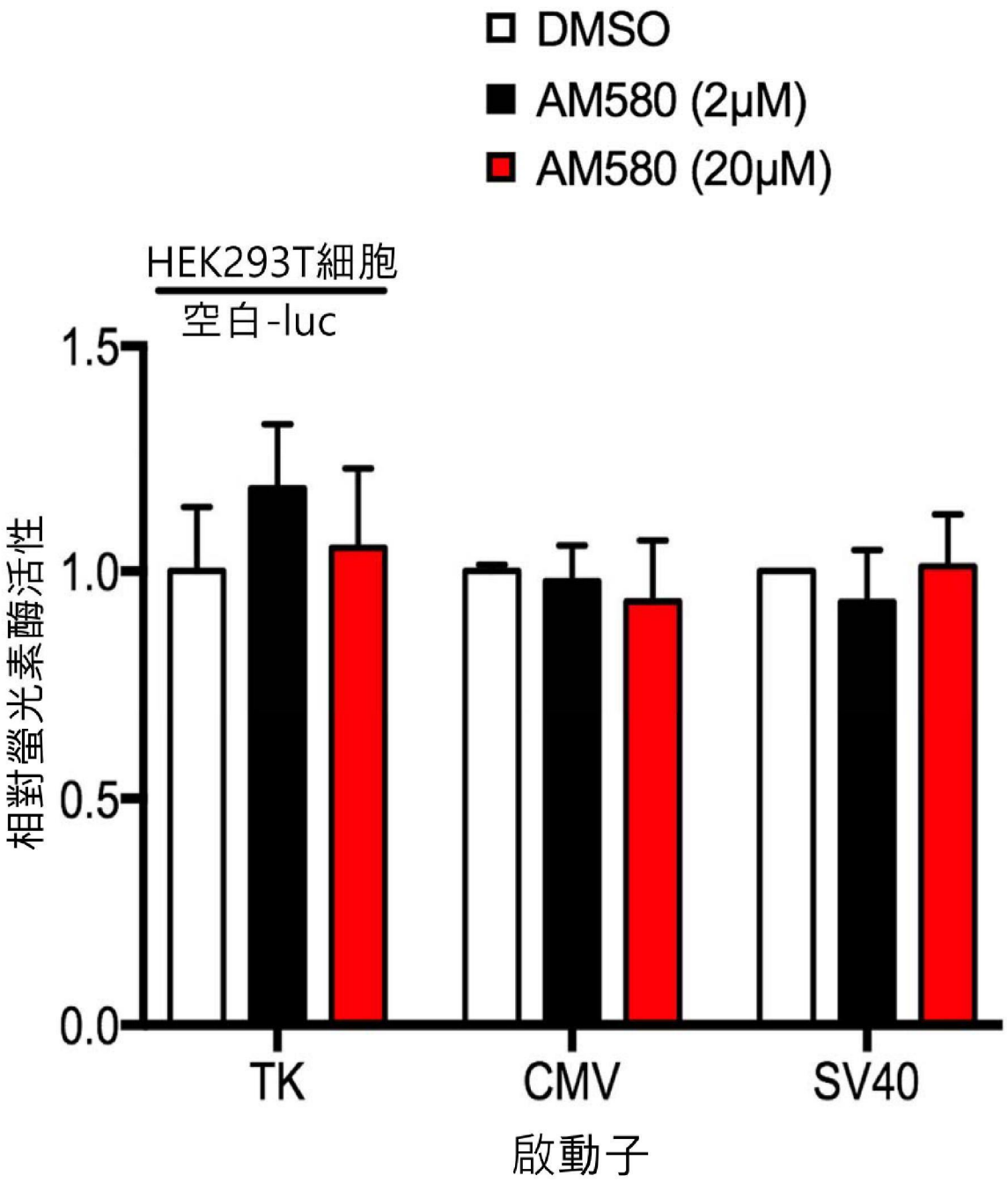

DMSO
AM580 (2μM)
AM580 (20μM)
HEK293T細胞
空白-luc
相對螢光素酶活性
1.5
1.0
0.5
0.0
TK
CMV
SV40
啟動子

圖 35

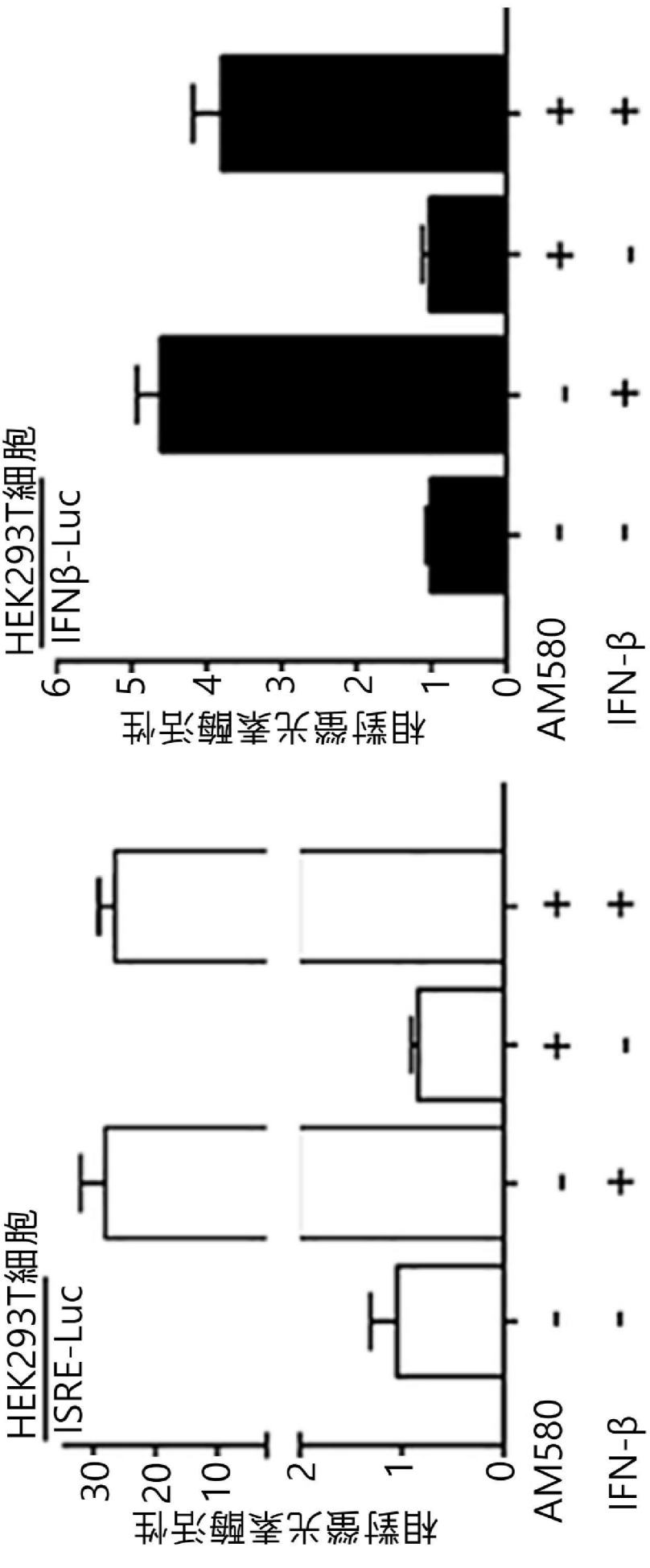

HEK293T細胞
IFNβ-Luc
相對螢光素酶活性
0
1
2
3
4
5
6
AM580
IFN-β
HEK293T細胞
ISRE-Luc
相對螢光素酶活性
0
1
2
10
20
30
AM580
IFN-β

圖 36

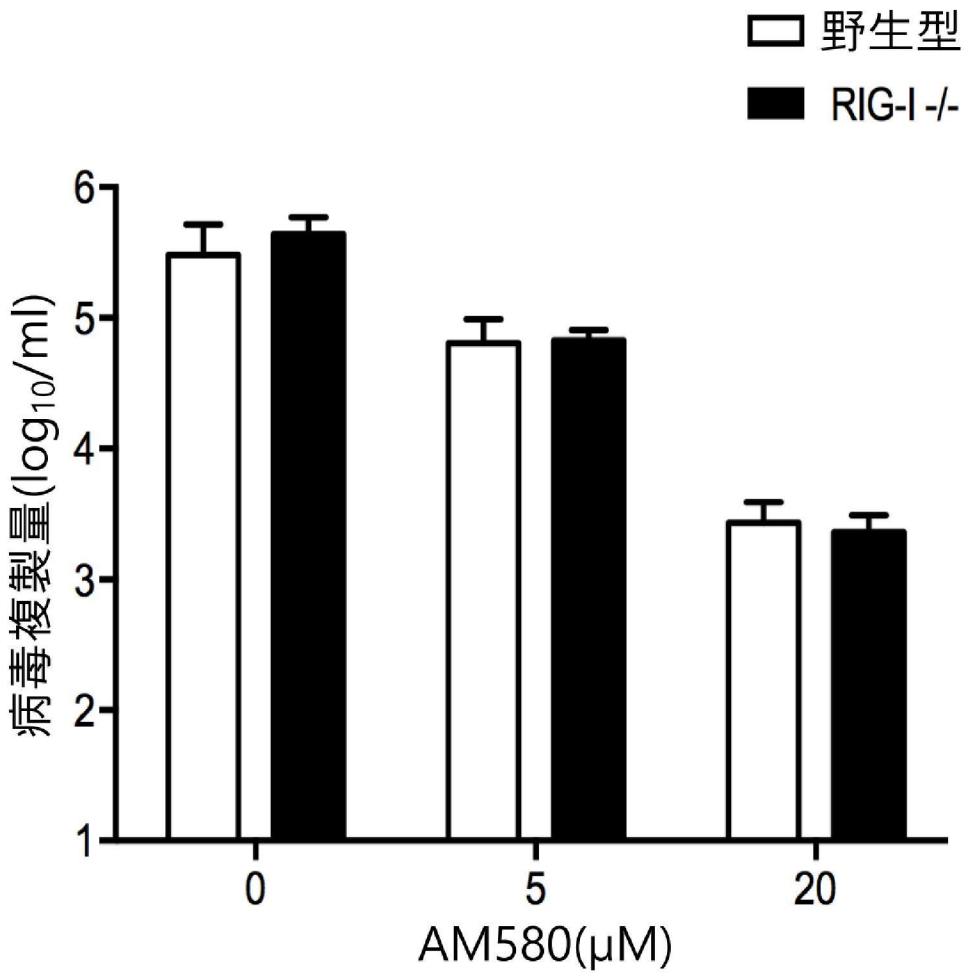

野生型
RIG-I -/-
病毒複製量(log10/ml)
6
5
4
3
2
1
0
5
20
AM580(μM)

圖 37

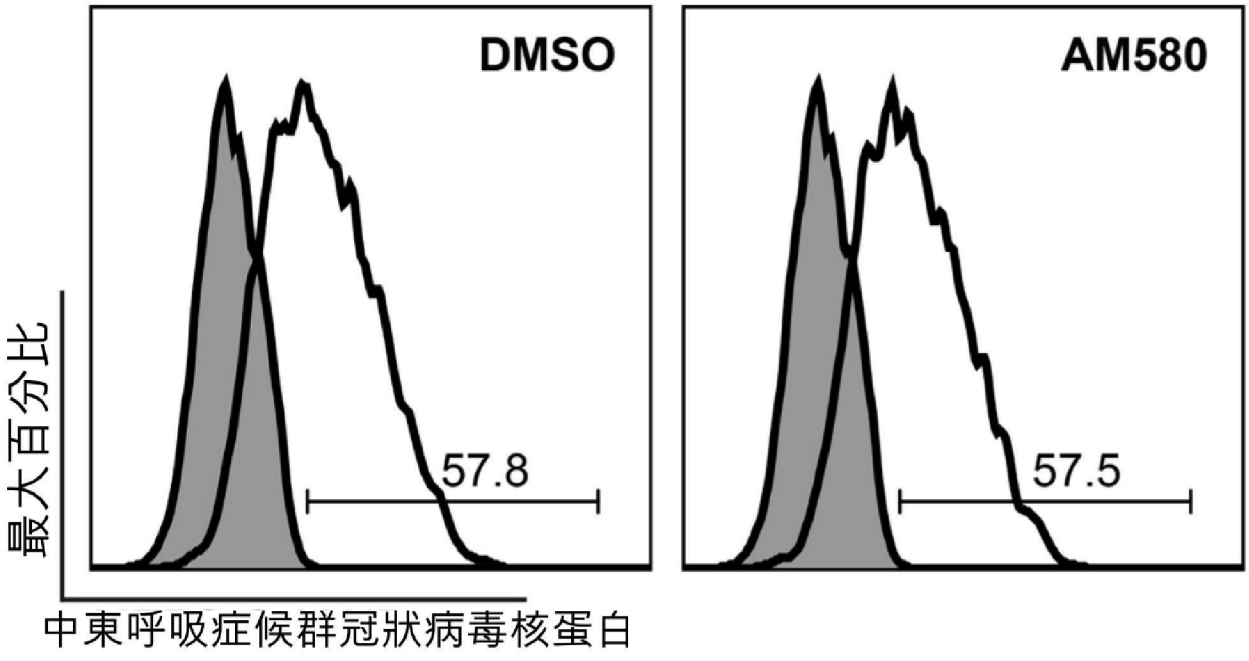

DMSO
AM580
57.8
57.5
最大百分比
中東呼吸症候群冠狀病毒核蛋白

圖 38

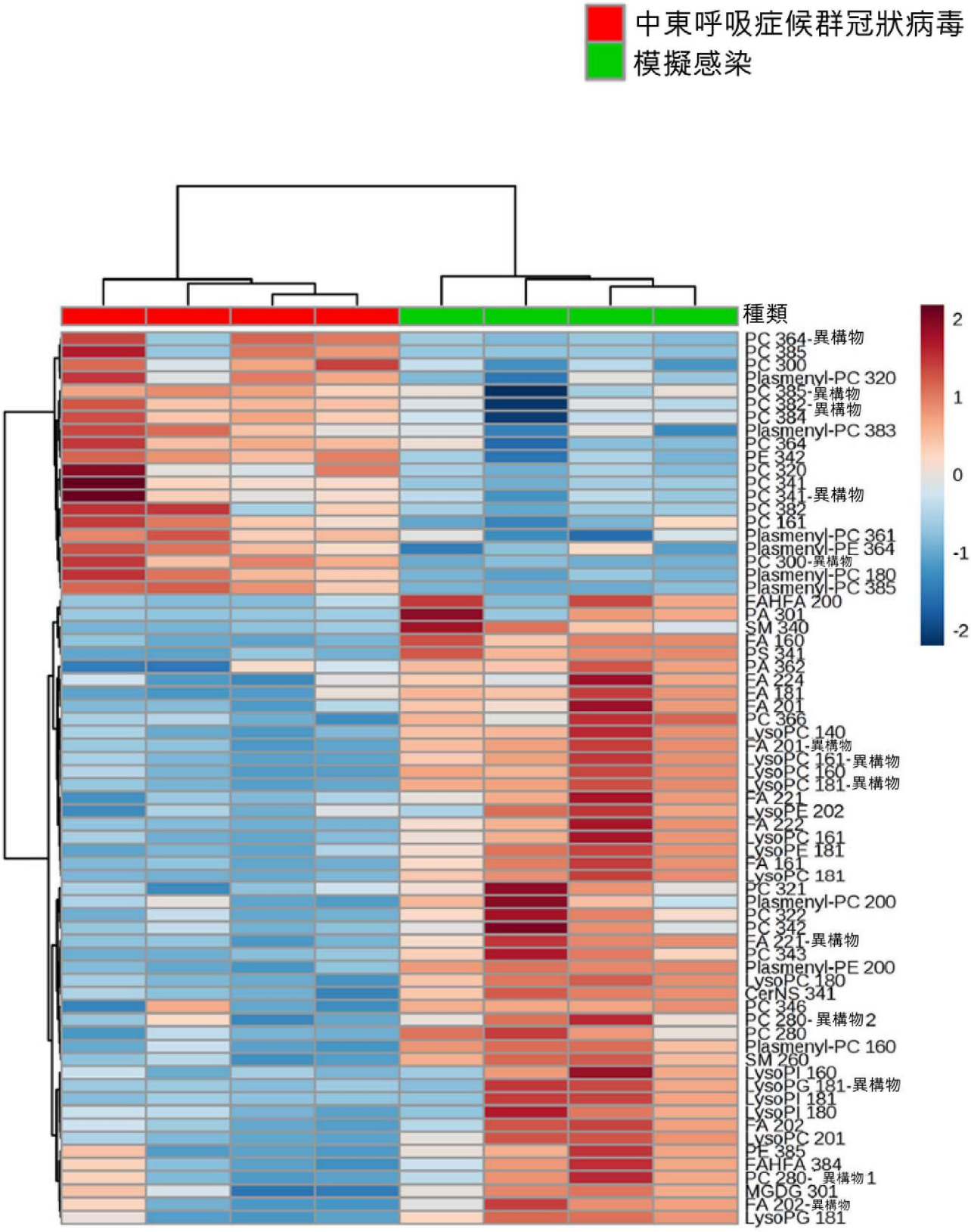

中東呼吸症候群冠狀病毒
模擬感染
種類
2
1
0
-1
-2
PC 364-異構物
PC 385
PC 300
Plasmenyl-PC 320
PC 385-異構物
PC 382-異構物
PC 384
Plasmenyl-PC 383
PC 364
PE 342
PC 320
PC 341
PC 341-異構物
PC 382
PC 161
Plasmenyl-PC 361
Plasmenyl-PE 364
PC 300-異構物
Plasmenyl-PC 180
Plasmenyl-PC 385
FAHFA 200
PA 301
SM 340
FA 160
PS 341
PA 362
FA 224
FA 181
FA 201
PC 366
LysoPC 140
FA 201-異構物
LysoPC 161-異構物
LysoPC 160
LysoPC 181-異構物
FA 221
LysoPE 202
FA 222
LysoPC 161
LysoPE 181
FA 161
LysoPC 181
PC 321
Plasmenyl-PC 200
PC 322
PC 342
FA 221-異構物
PC 343
Plasmenyl-PE 200
LysoPC 180
CerNS 341
PC 346
PC 280-異構物2
PC 280
Plasmenyl-PC 160
SM 260
LysoPI 160
LysoPG 181-異構物
LysoPI 181
LysoPI 180
FA 202
LysoPC 201
PE 385
FAHFA 384
PC 280-異構物1
MGDG 301
FA 202-異構物
LysoPG 181

圖 39

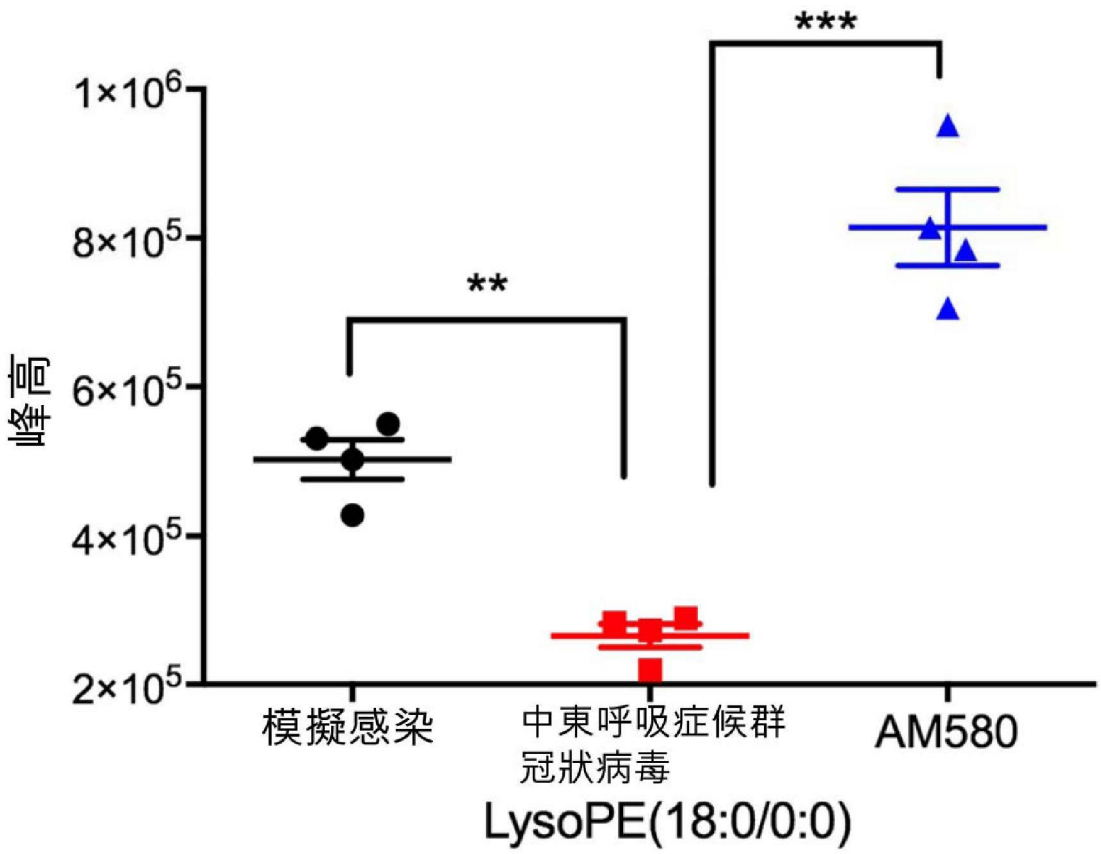

***
**
1×10^6
8×10^5
6×10^5
4×10^5
2×10^5
峰高
模擬感染
中東呼吸症候群
冠狀病毒
AM580
LysoPE(18:0/0:0)

圖 40

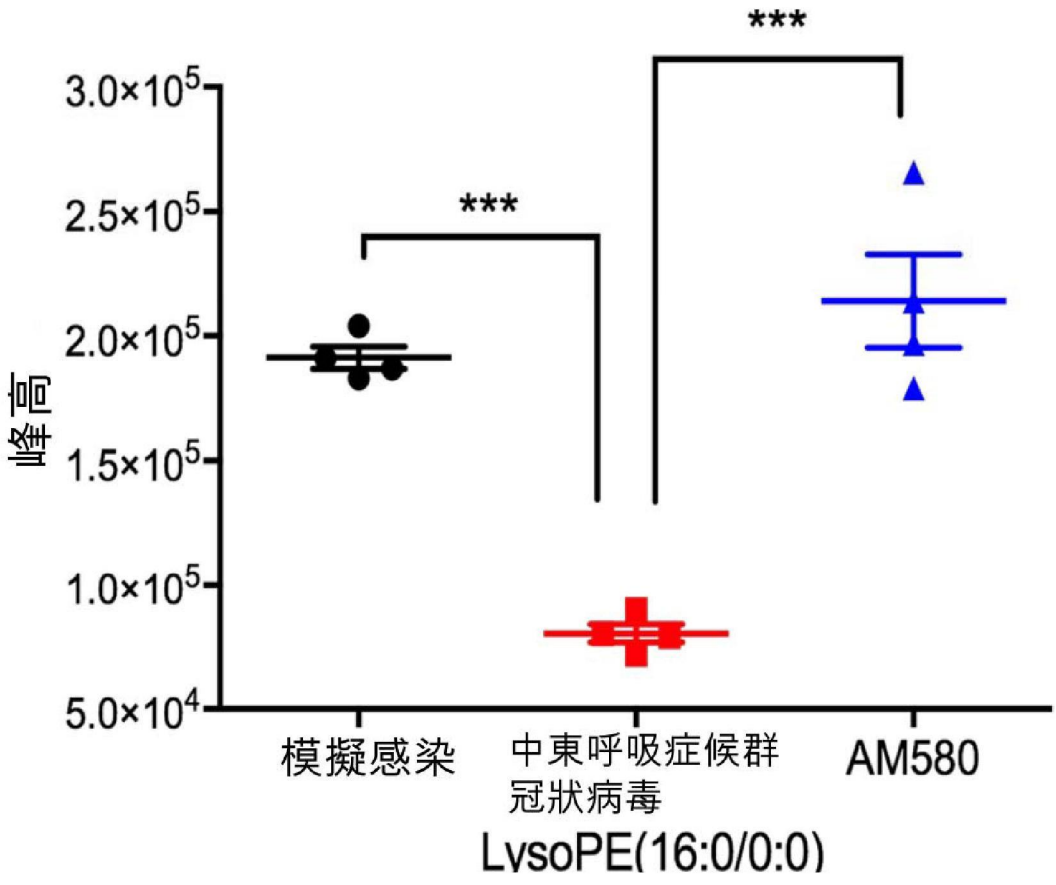

***
***
3.0×10^5
2.5×10^5
2.0×10^5
1.5×10^5
1.0×10^5
5.0×10^4
峰高
模擬感染
中東呼吸症候群
冠狀病毒
AM580
LysoPE(16:0/0:0)

圖 41

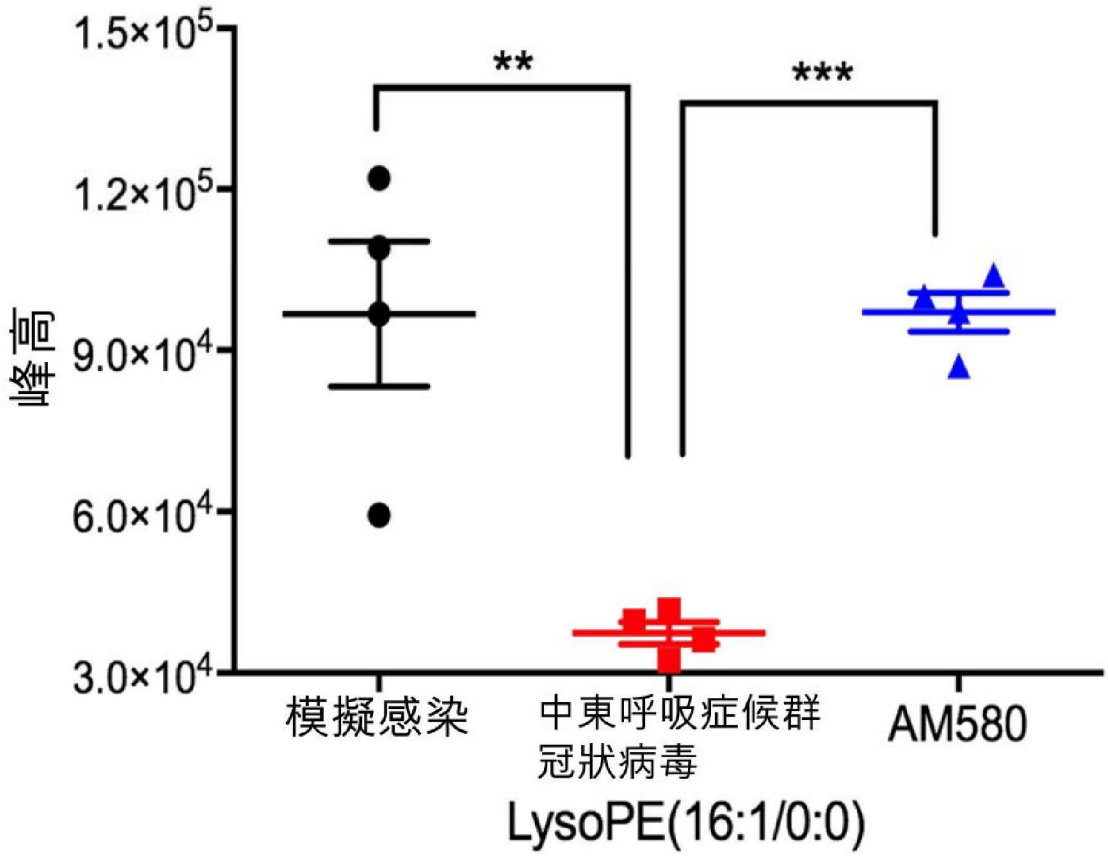

1.5×10^5
1.2×10^5
9.0×10^4
6.0×10^4
3.0×10^4
峰高
**
***
模擬感染
中東呼吸症候群冠狀病毒
AM580
LysoPE(16:1/0:0)

圖 42

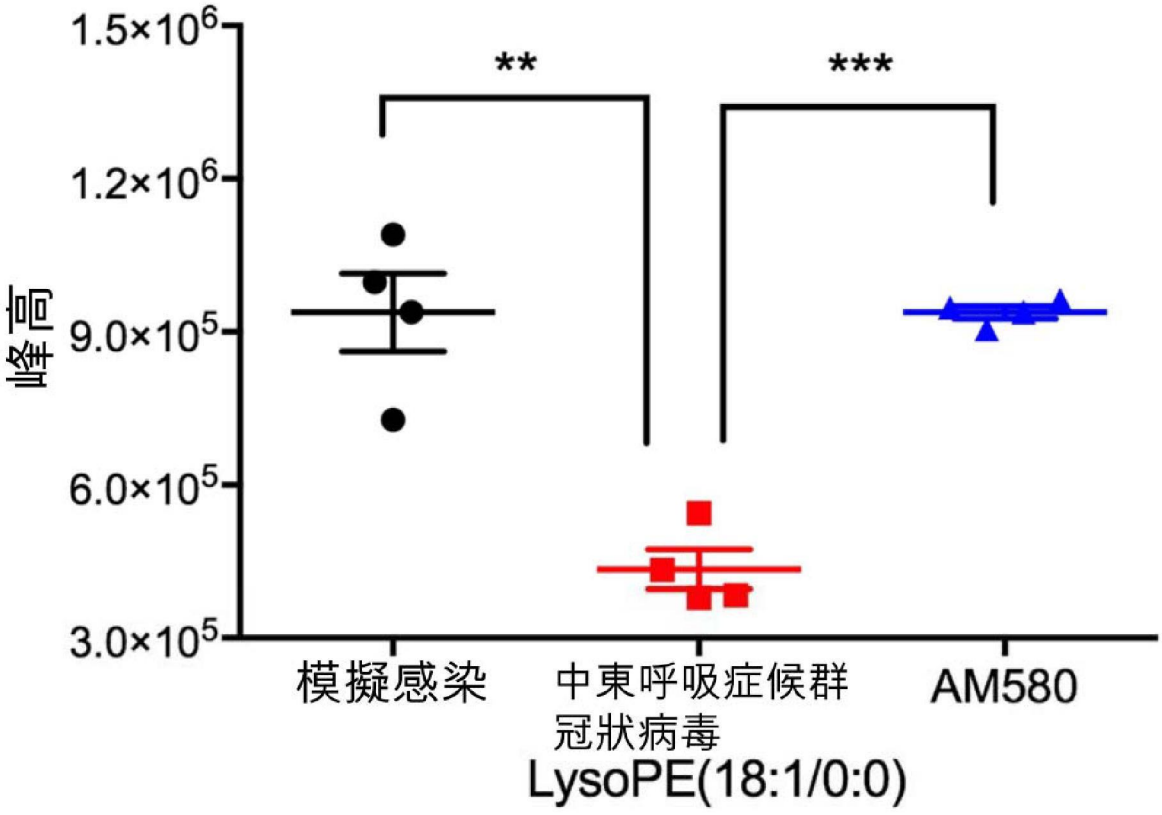

1.5×10^6
1.2×10^6
9.0×10^5
6.0×10^5
3.0×10^5
峰高
**
***
模擬感染
中東呼吸症候群冠狀病毒
AM580
LysoPE(18:1/0:0)

圖 43

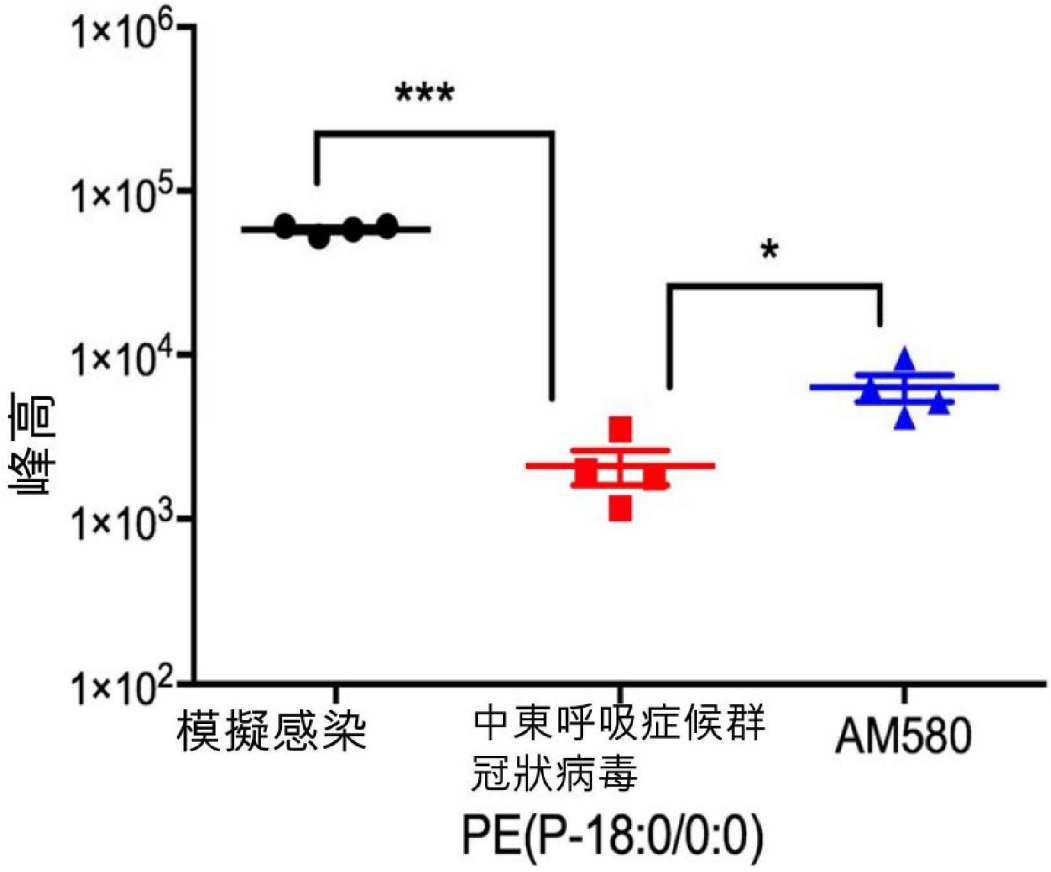

1×10^6
1×10^5
1×10^4
1×10^3
1×10^2
豐富
***
*
模擬感染
中東呼吸症候群冠狀病毒
AM580
PE(P-18:0/0:0)

圖 44

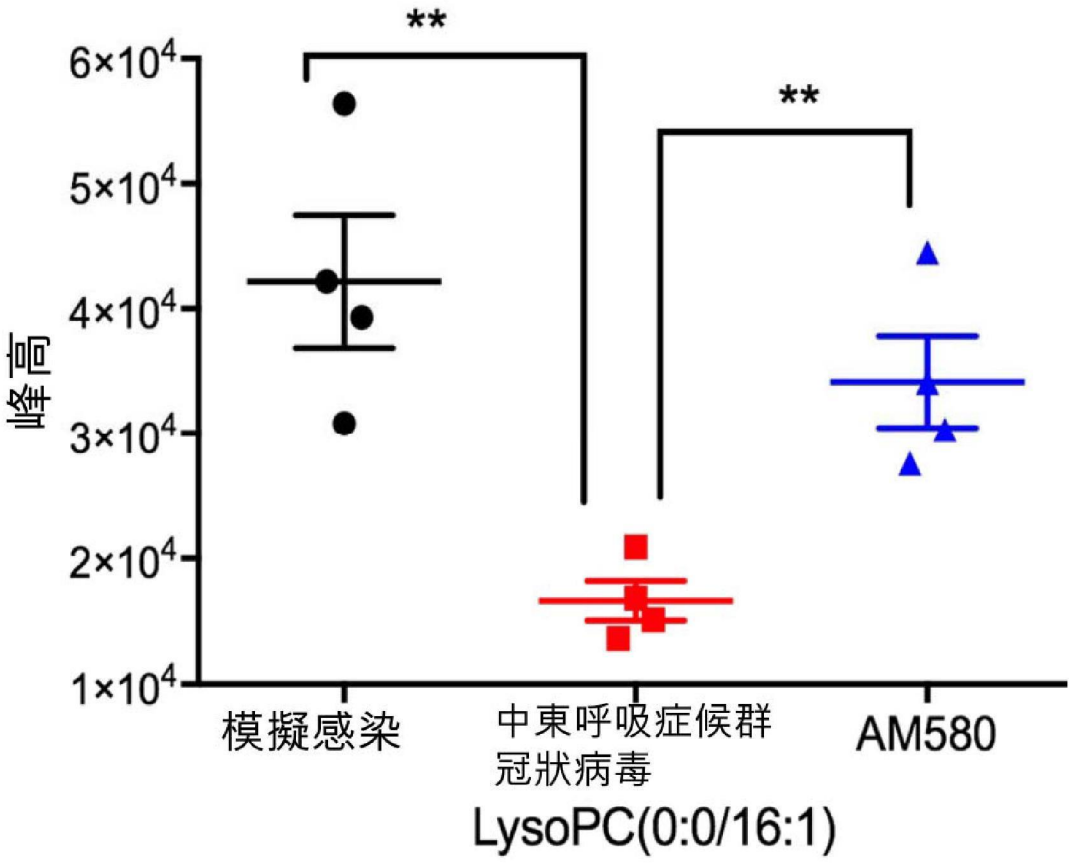

6×10^4
5×10^4
4×10^4
3×10^4
2×10^4
1×10^4
豐富
**
**
模擬感染
中東呼吸症候群冠狀病毒
AM580
LysoPC(0:0/16:1)

圖 45

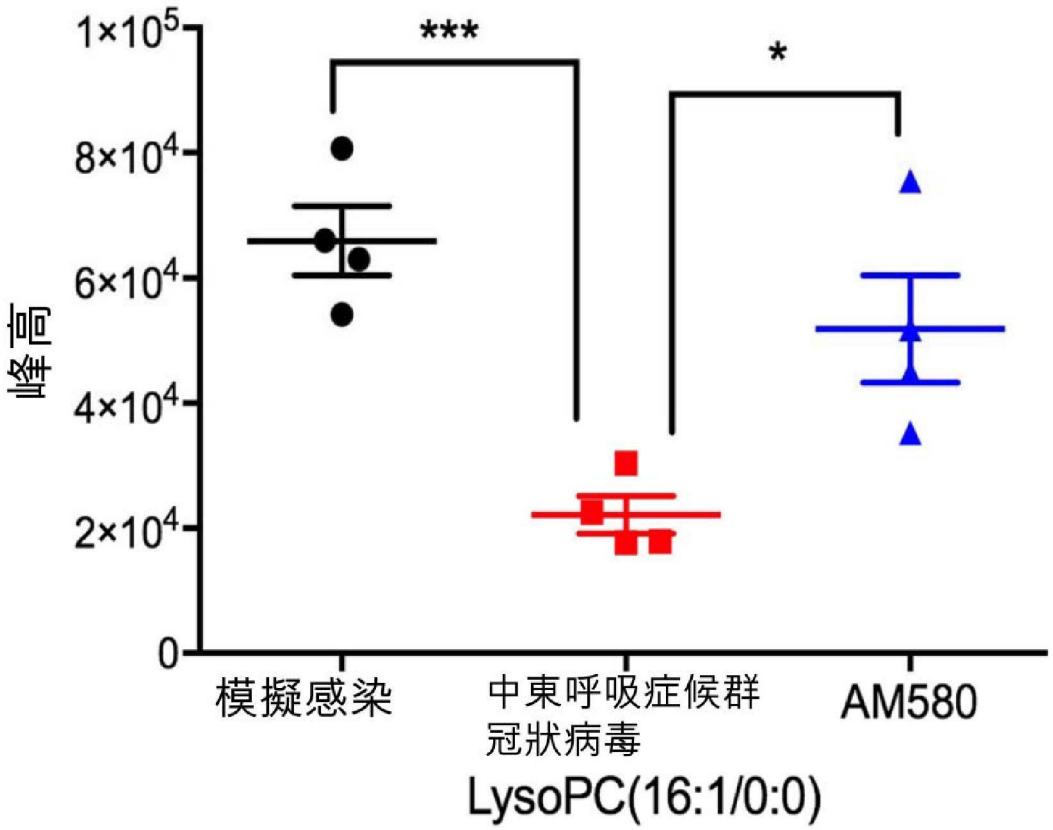

1×10^5
8×10^4
6×10^4
4×10^4
2×10^4
0
峰高
***
*
模擬感染
中東呼吸症候群
冠狀病毒
AM580
LysoPC(16:1/0:0)

圖 46

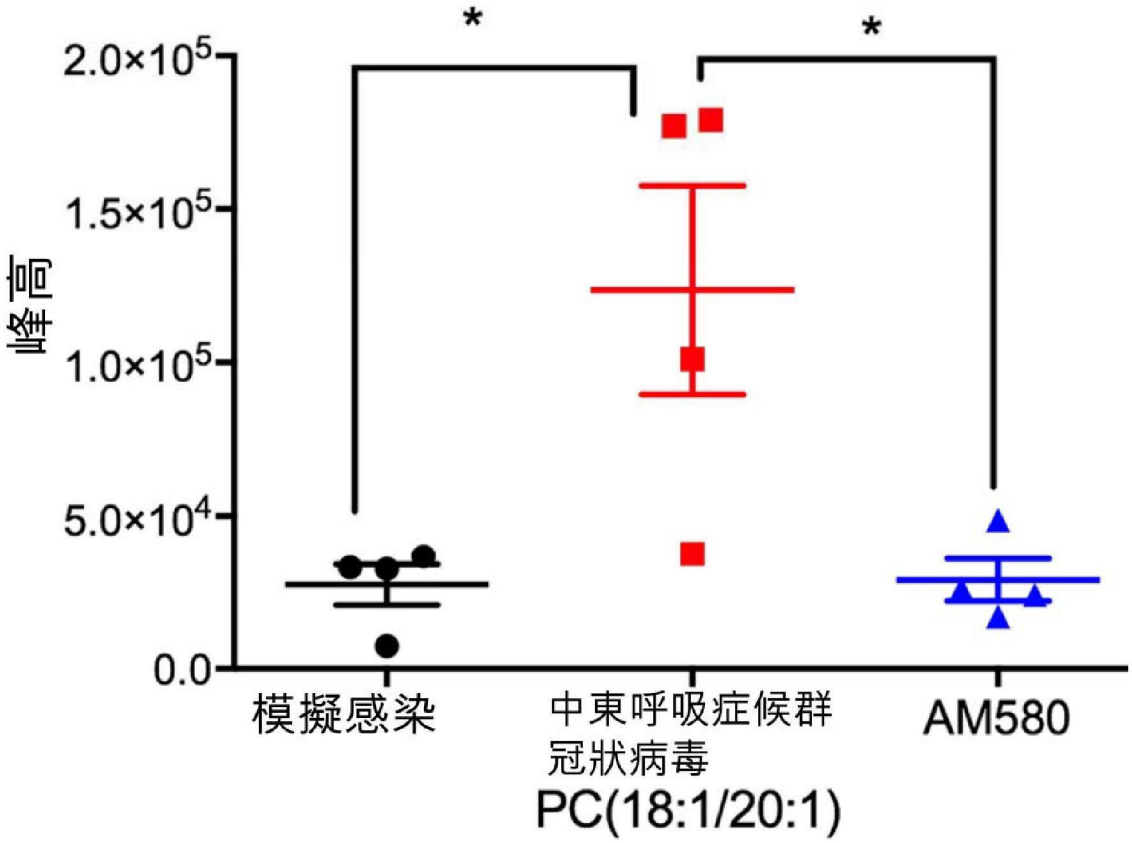

2.0×10^5
1.5×10^5
1.0×10^5
5.0×10^4
0.0
峰高
*
*
模擬感染
中東呼吸症候群
冠狀病毒
AM580
PC(18:1/20:1)

圖 47

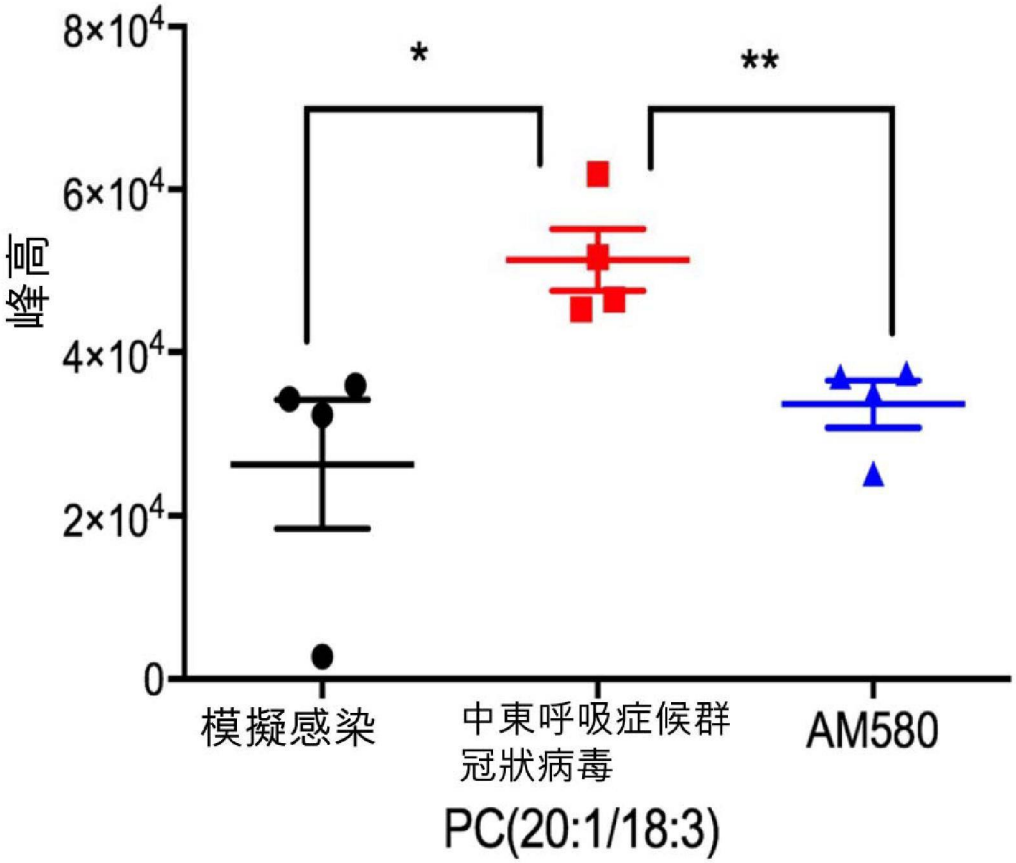

8×10^4
6×10^4
4×10^4
2×10^4
0
峰高
*
**
模擬感染
中東呼吸症候群
冠狀病毒
AM580
PC(20:1/18:3)

圖 48

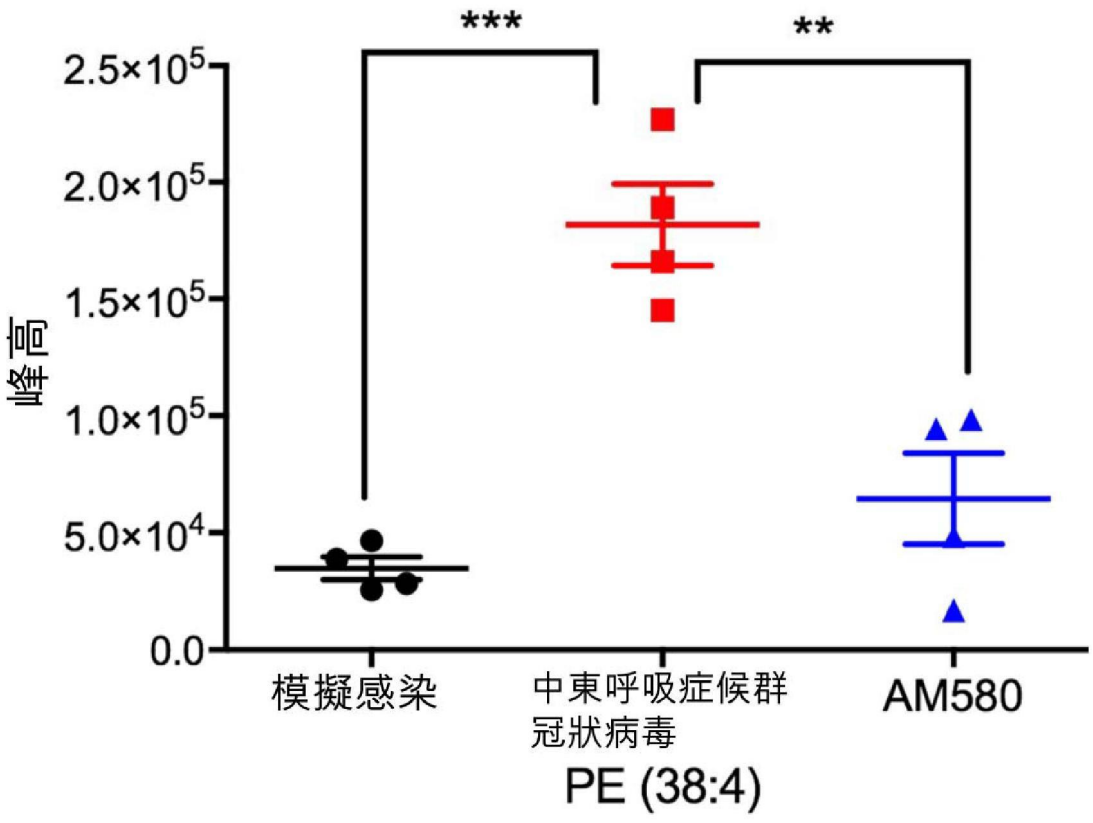

2.5×10^5
2.0×10^5
1.5×10^5
1.0×10^5
5.0×10^4
0.0
峰高
***
**
模擬感染
中東呼吸症候群
冠狀病毒
AM580
PE (38:4)

圖 49

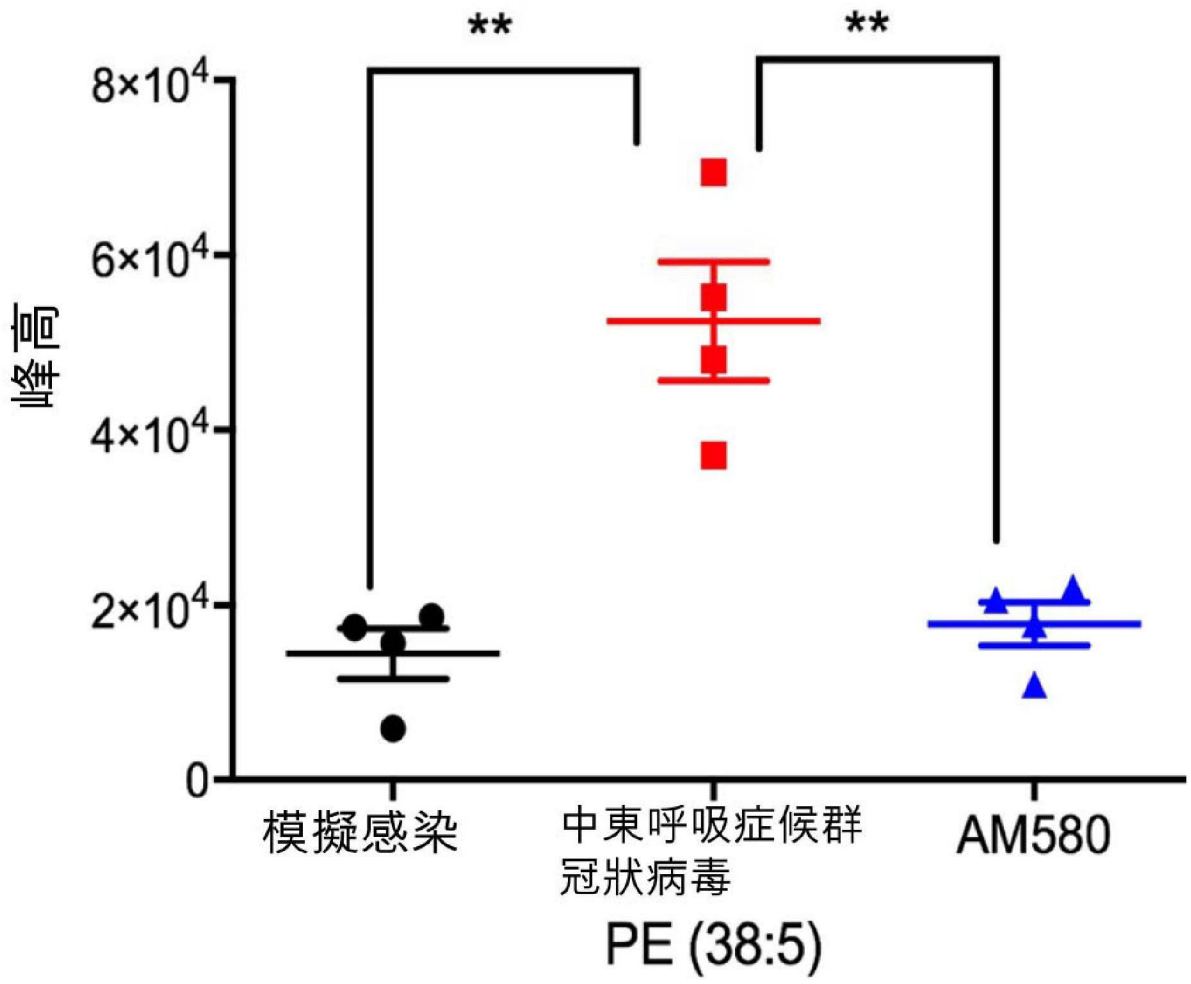


圖 50

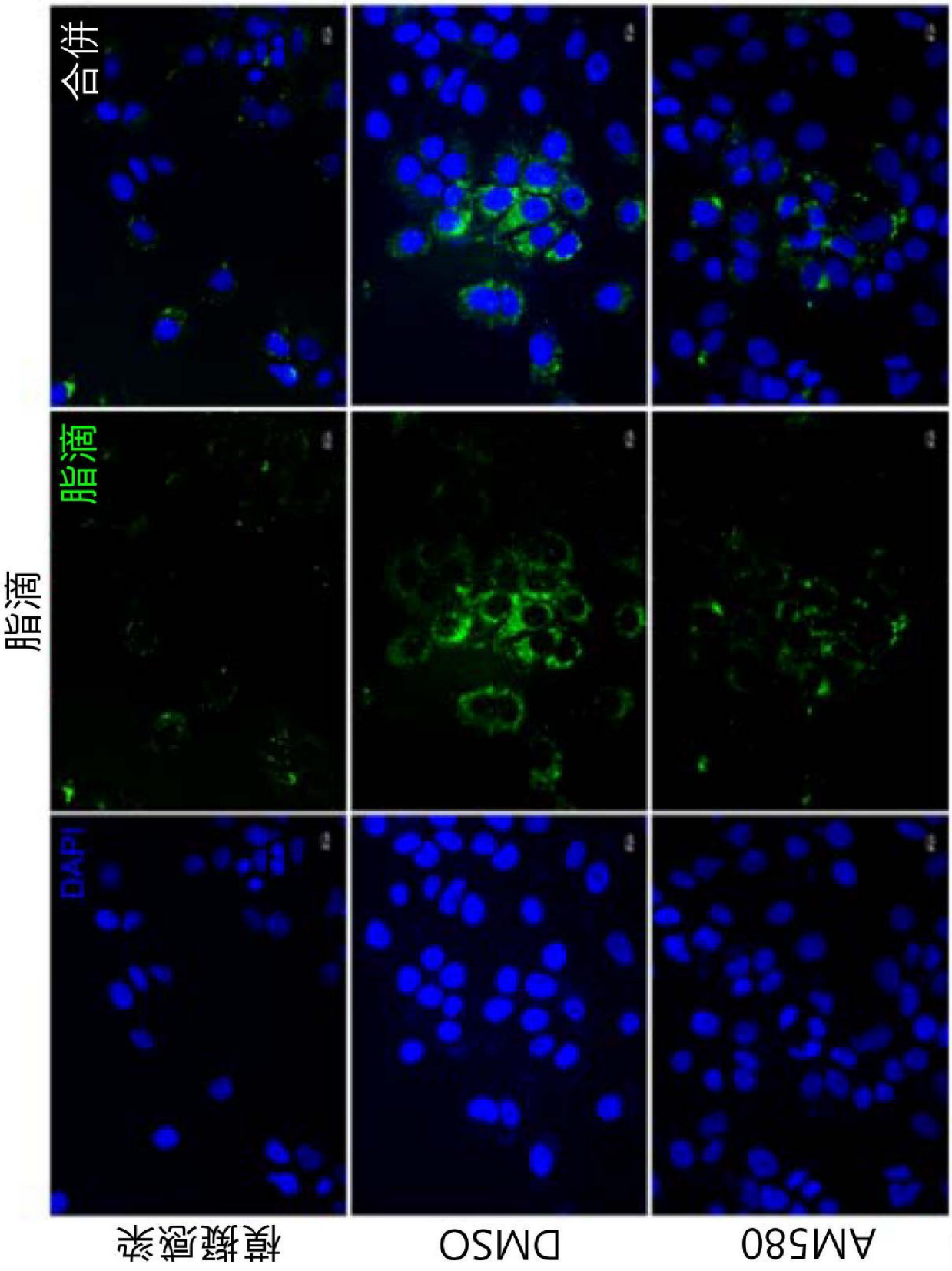


圖 51

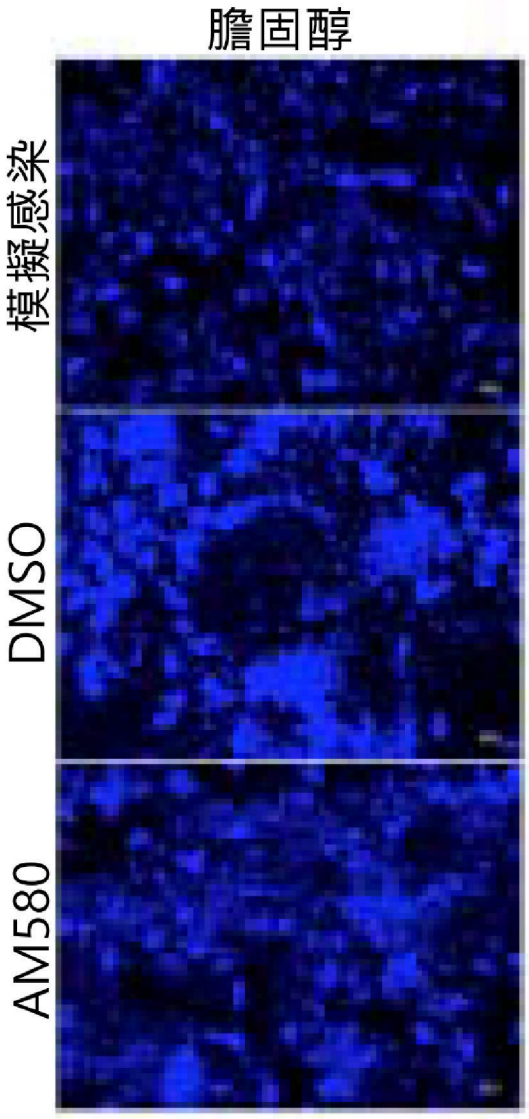


圖 52

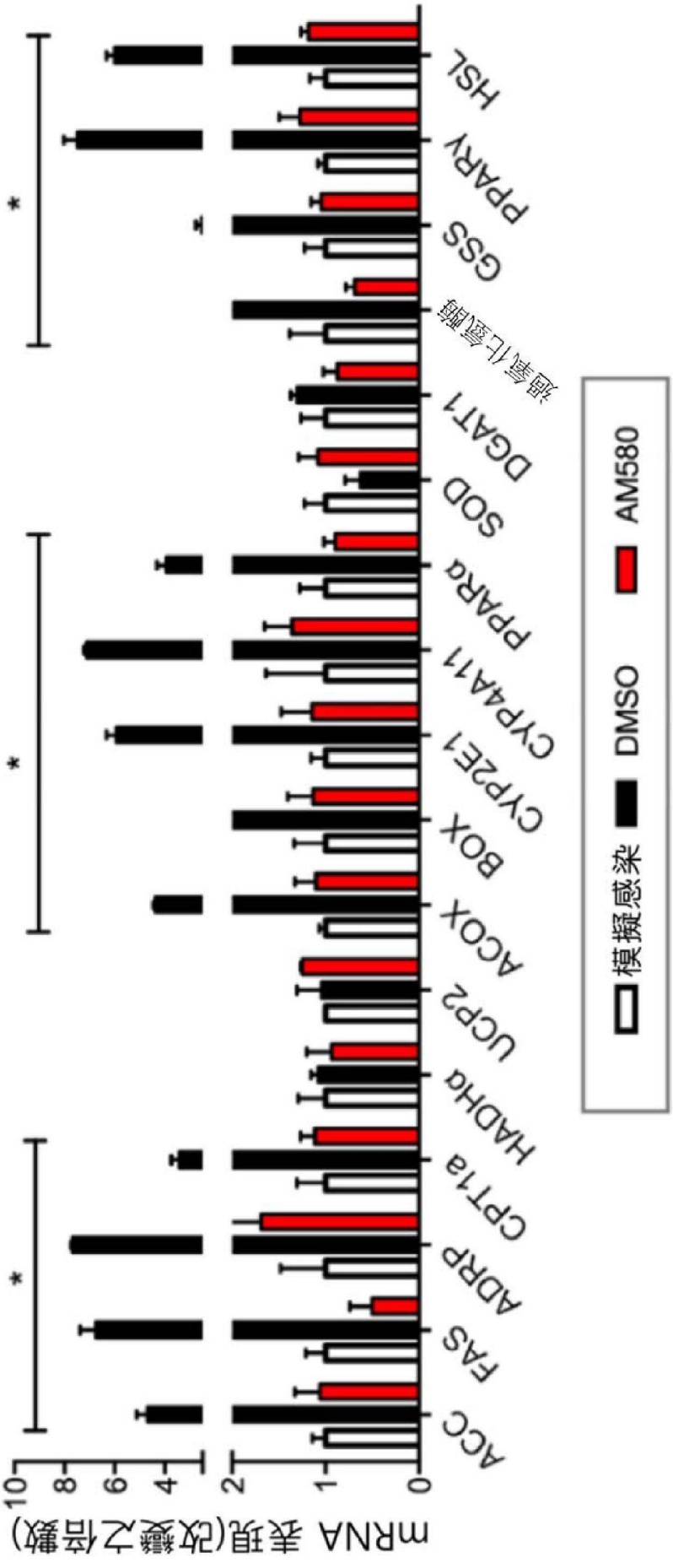

mRNA 表現(改變之倍數)
10
8
6
4
2
1
0
ACC
FAS
ADRP
CPT1a
HADHa
UCP2
ACOX
BOX
CYP2E1
CYP4A11
PPARα
SOD
DGAT1
過氧化氫酶
GSS
PPARγ
HSL
模擬感染
DMSO
AM580
*
*
*
*

圖 53

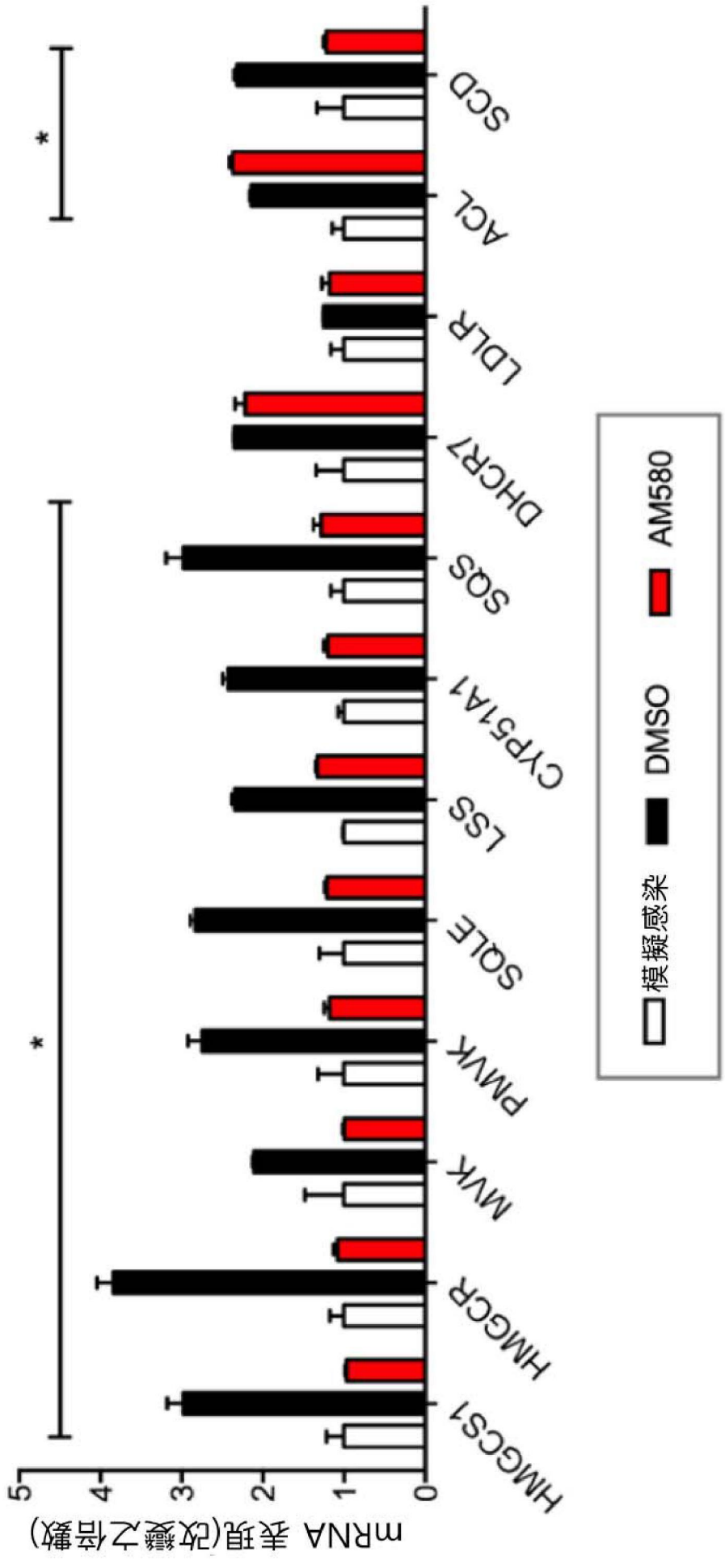

mRNA 表現(改變之倍數)
0
1
2
3
4
5
HMGCS1
HMGCR
MVK
PMVK
SQLE
LSS
CYP51A1
SQS
DHCR7
LDLR
ACL
SCD
*
*
模擬感染
DMSO
AM580

圖 54

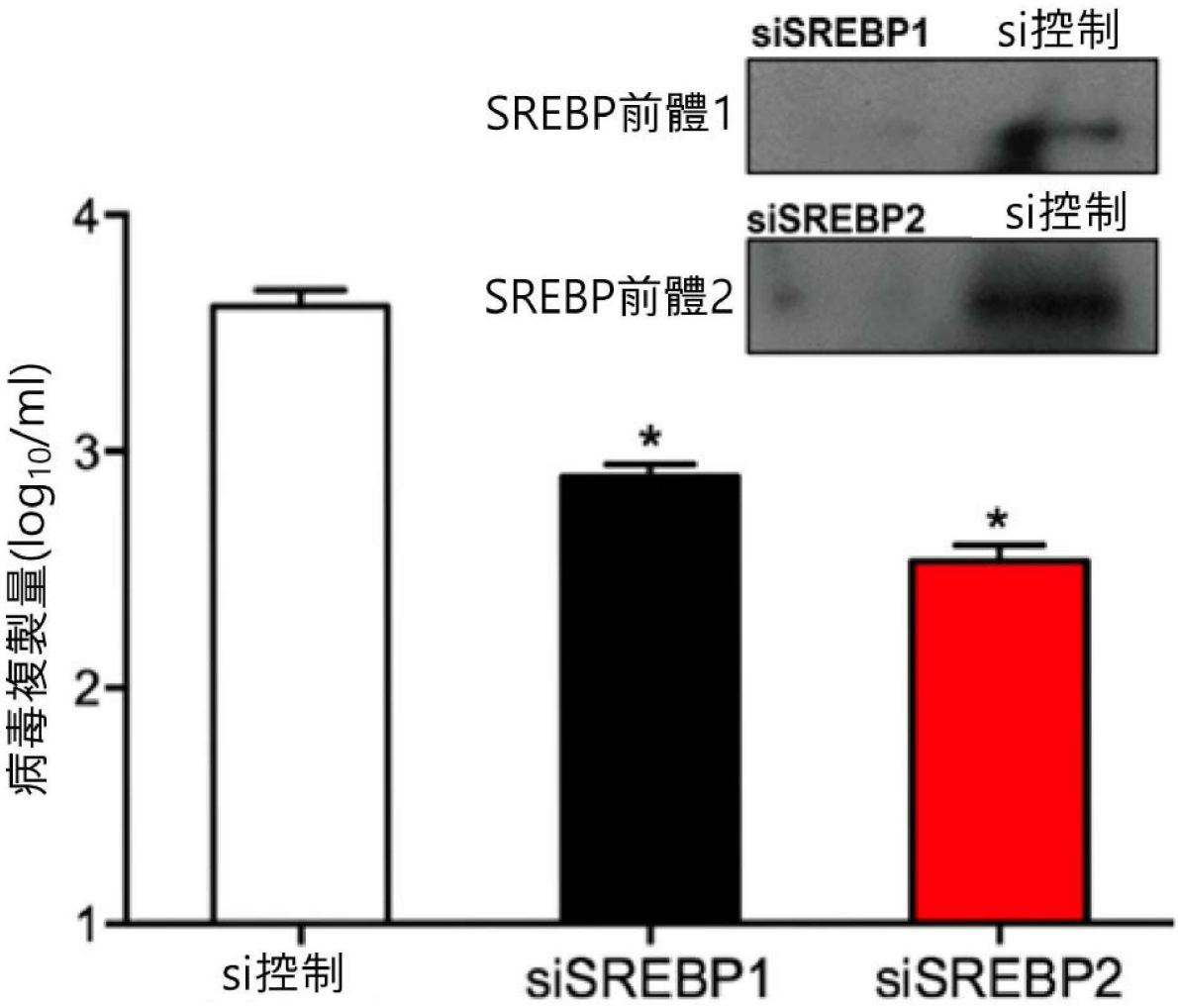

siSREBP1
si控制
SREBP前體1
siSREBP2
si控制
SREBP前體2
病毒複製量(log10/ml)
4
3
2
1
*
*
si控制
siSREBP1
siSREBP2

圖 55

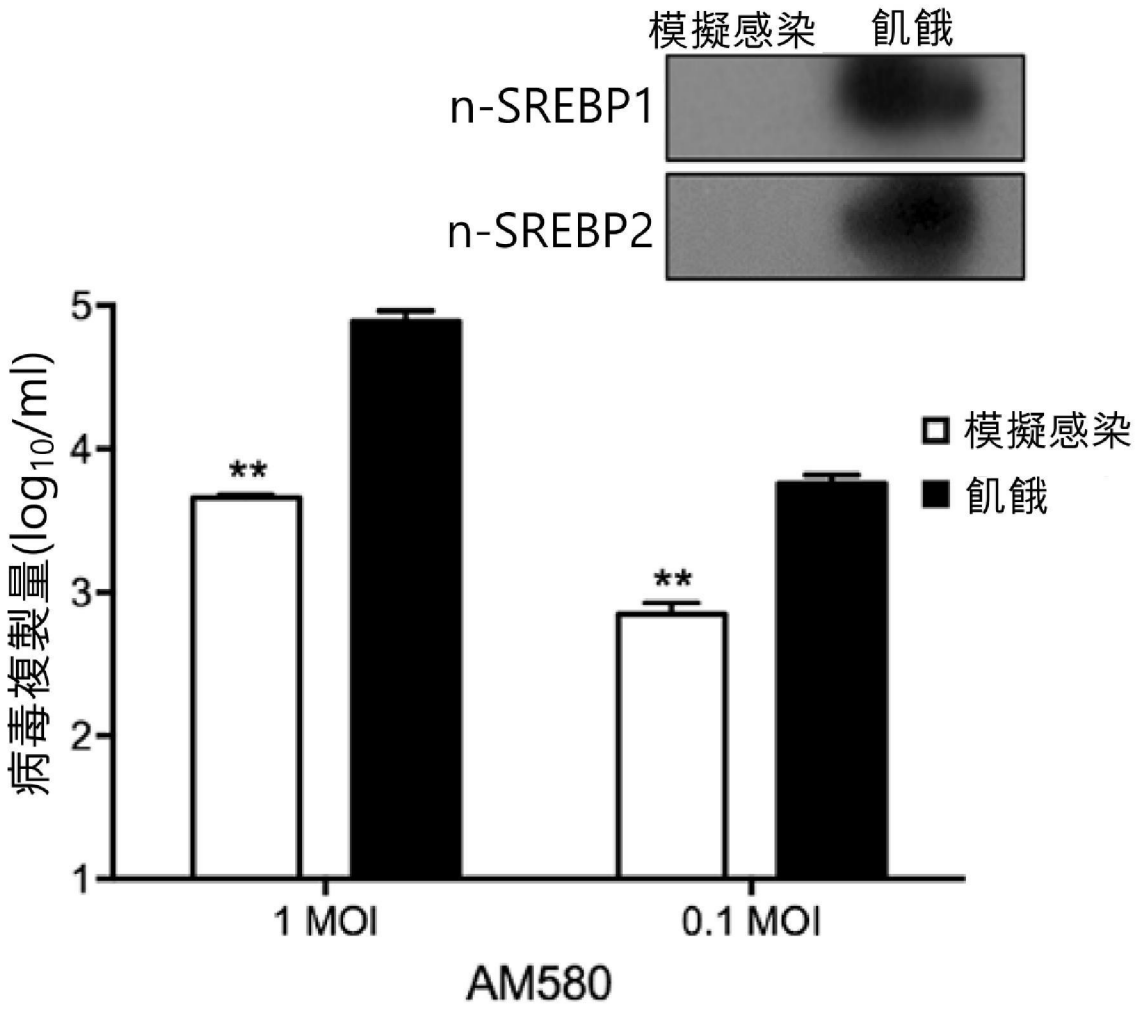

模擬感染
飢餓
n-SREBP1
n-SREBP2
病毒複製量(log10/ml)
5
4
3
2
1
**
**
模擬感染
飢餓
1 MOI
0.1 MOI
AM580

圖 56

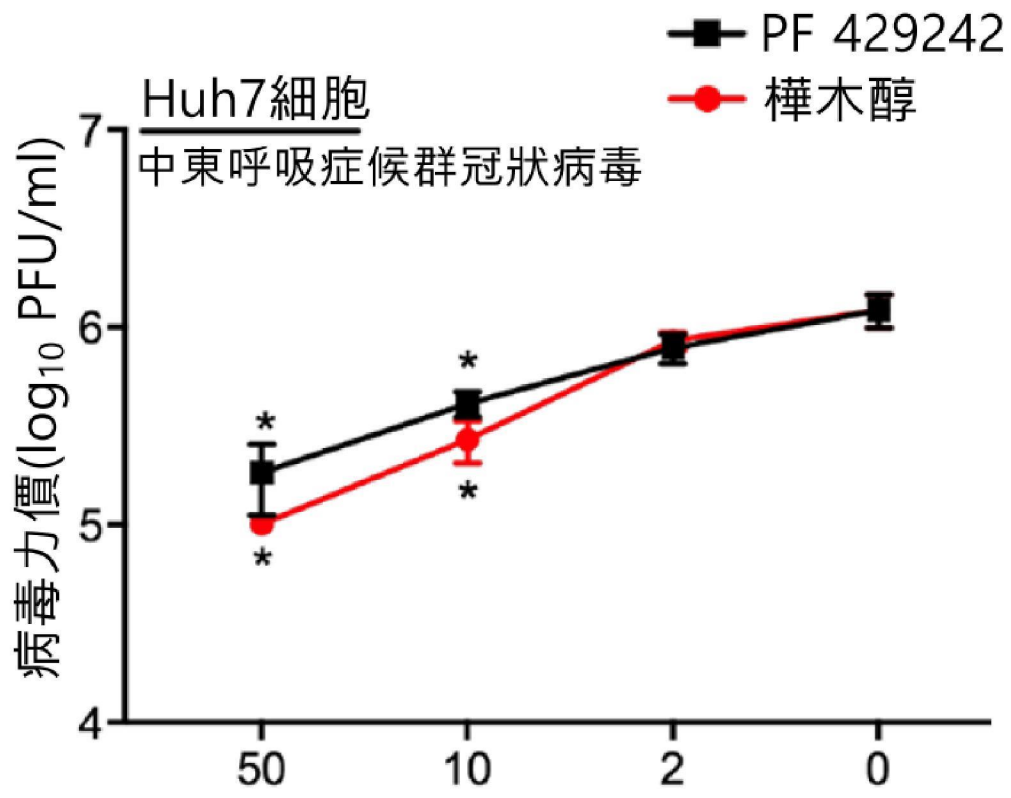

PF 429242
樺木醇
Huh7細胞
中東呼吸症候群冠狀病毒
病毒力價(log10 PFU/ml)
7
6
5
4
50
10
2
0
*
*
*
*

圖 57

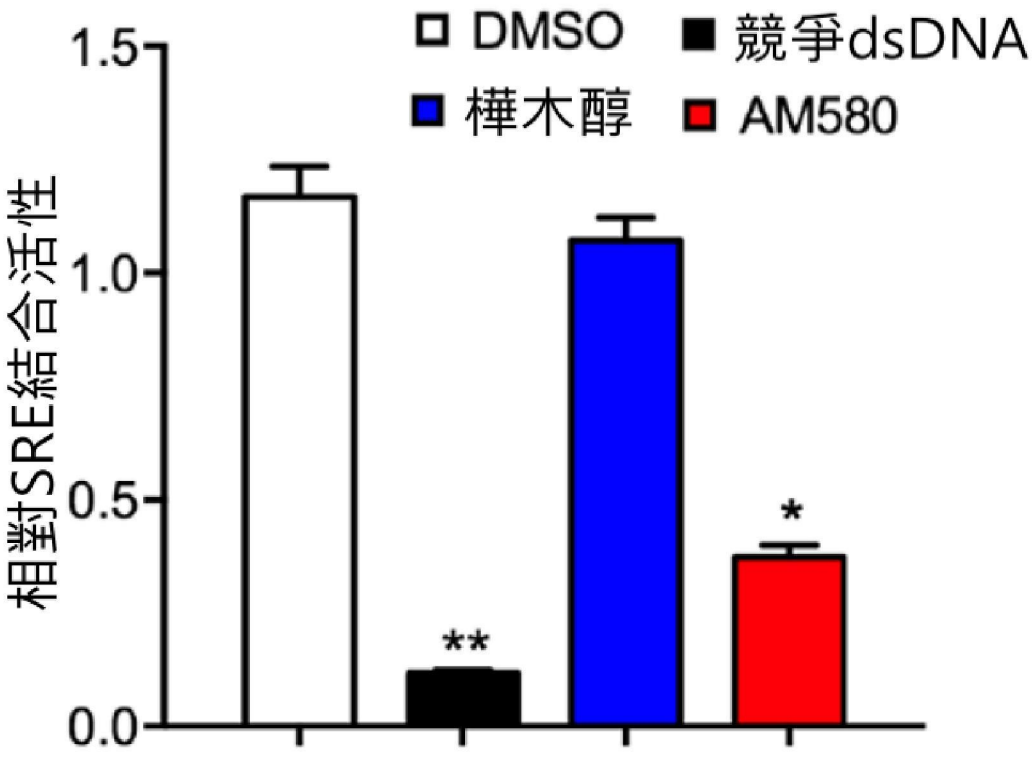

DMSO
競爭dsDNA
樺木醇
AM580
相對SRE結合活性
1.5
1.0
0.5
0.0
**
*

圖 58

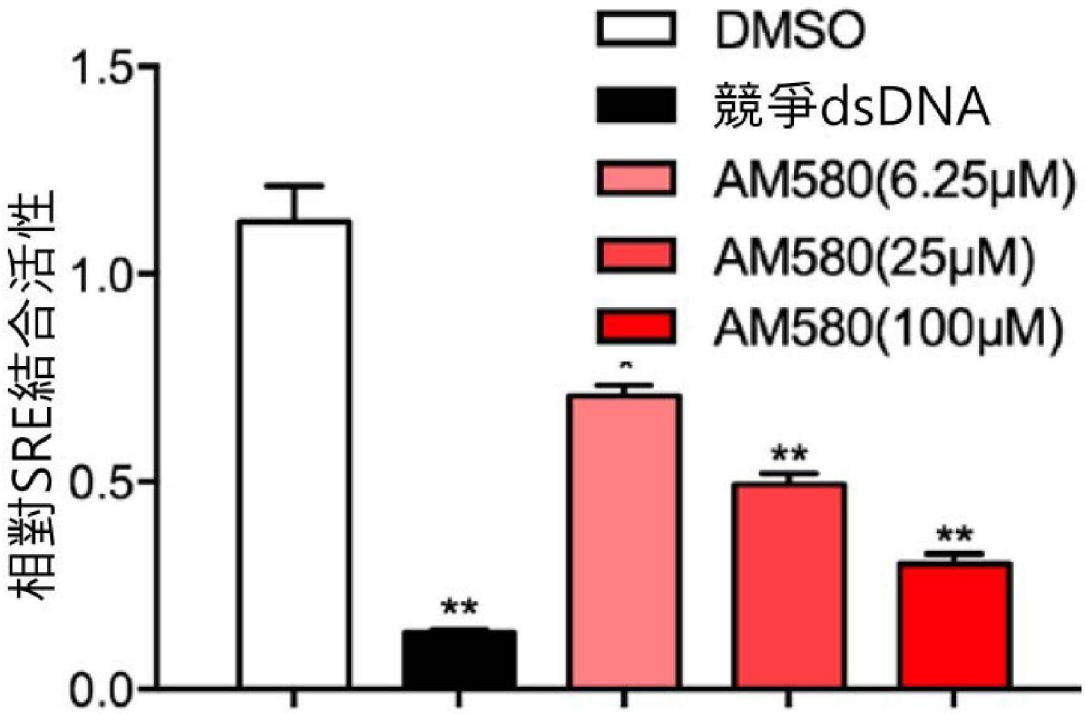

DMSO
競爭dsDNA
AM580(6.25μM)
AM580(25μM)
AM580(100μM)
相對SRE結合活性
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
**

圖 59

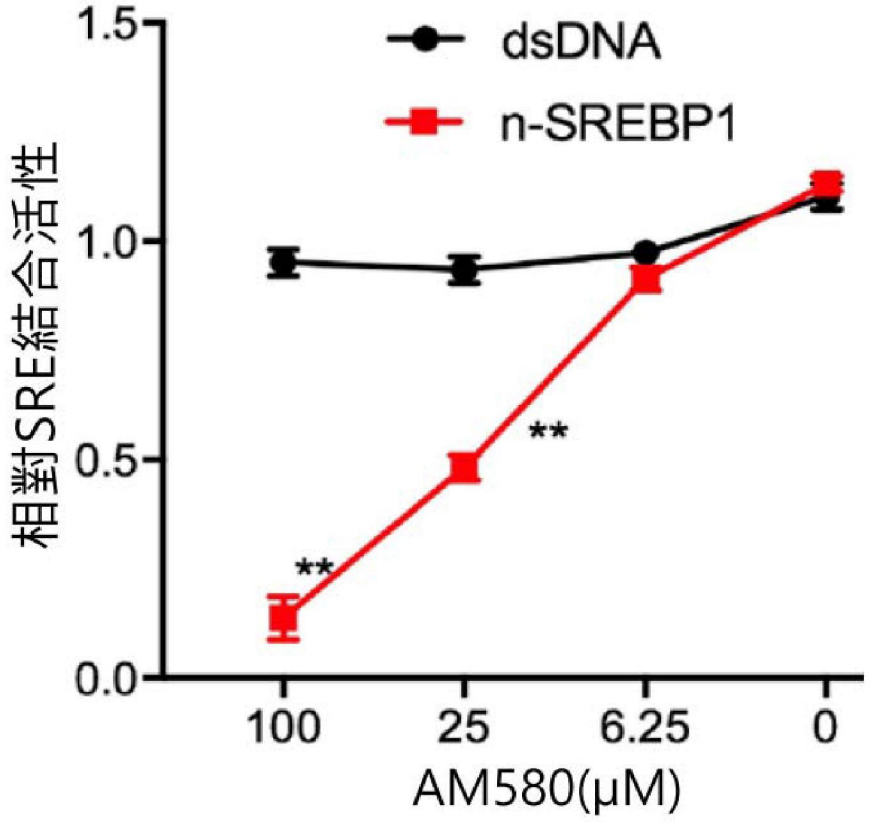

dsDNA
n-SREBP1
相對SRE結合活性
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
100
25
6.25
0
AM580(μM)

圖 60

圖 61

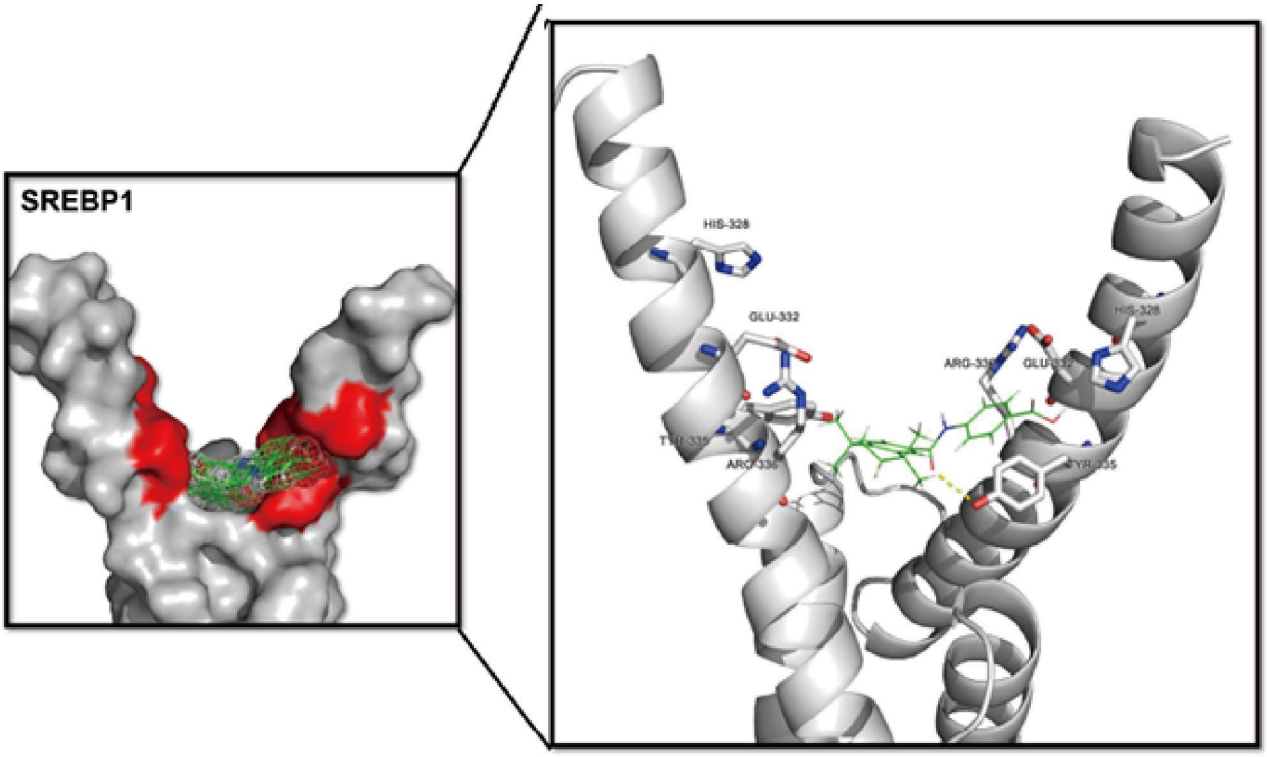

SREBP1
HIS-328
GLU-332
ARG-335
GLU-336
HIS-328
TYR-325

圖 62

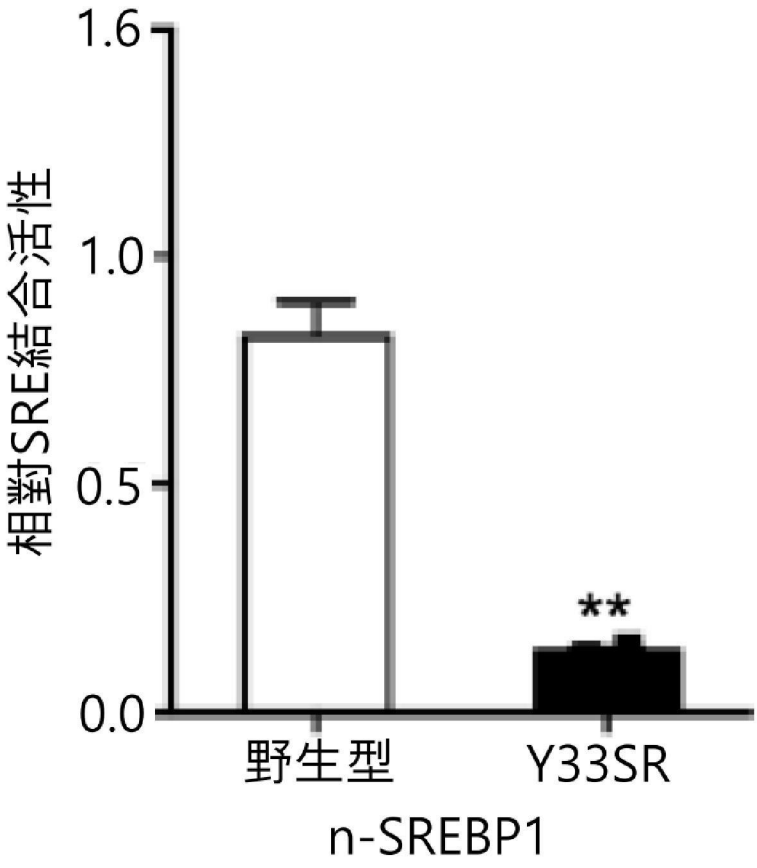

1.6
1.0
0.5
0.0
相對SRE結合活性
**
野生型
Y33SR
n-SREBP1

圖 63

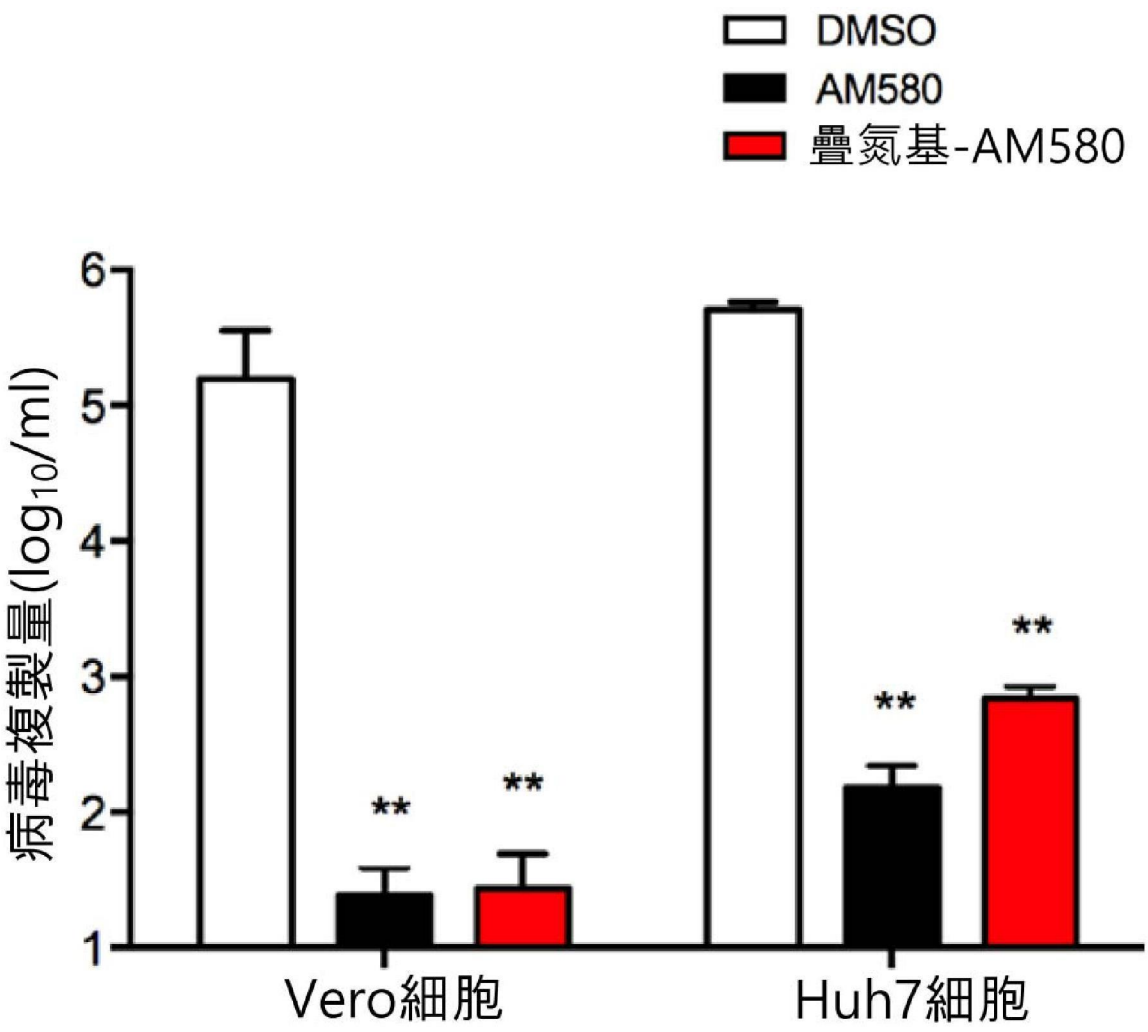


圖 64

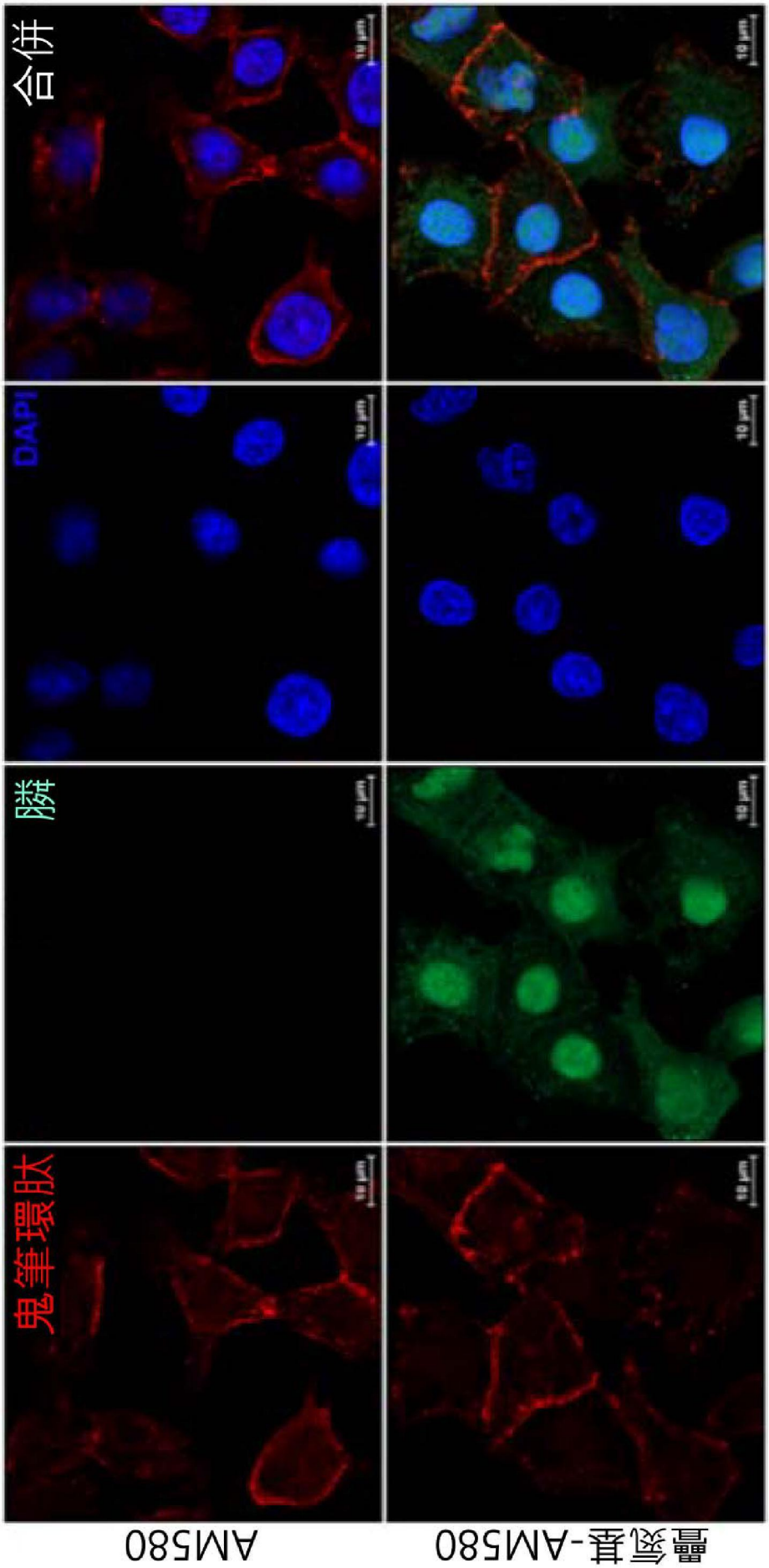


圖 65

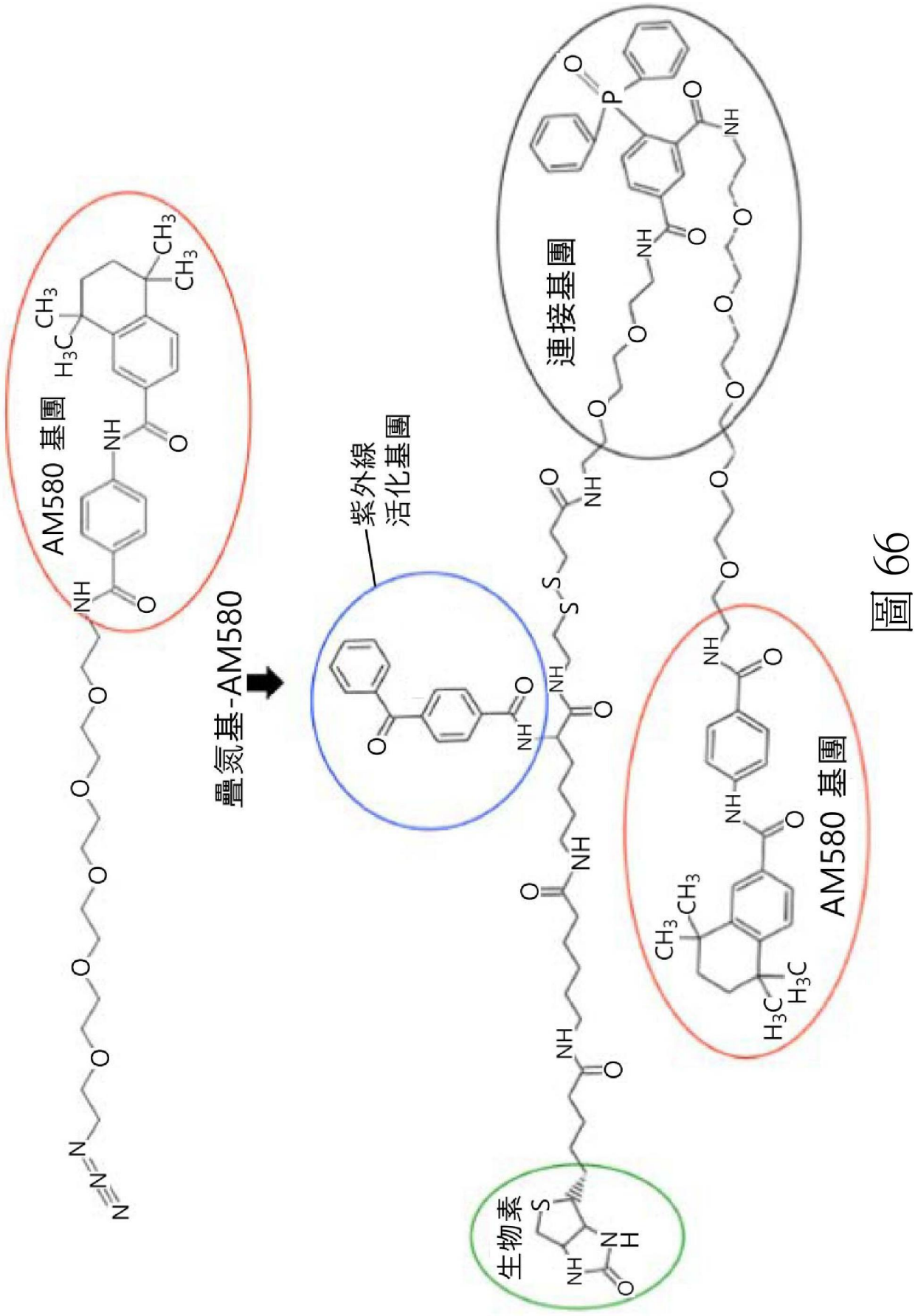


圖 66

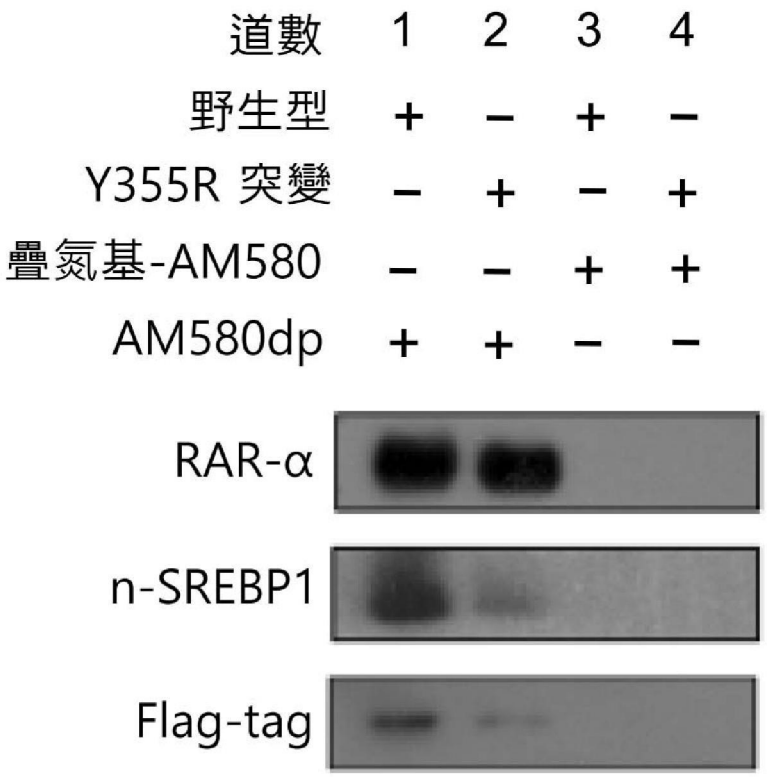

道數 1 2 3 4
野生型 + − + −
Y355R 突變 − + − +
疊氮基-AM580 − − + +
AM580dp + + − −
RAR-α
n-SREBP1
Flag-tag

圖 67

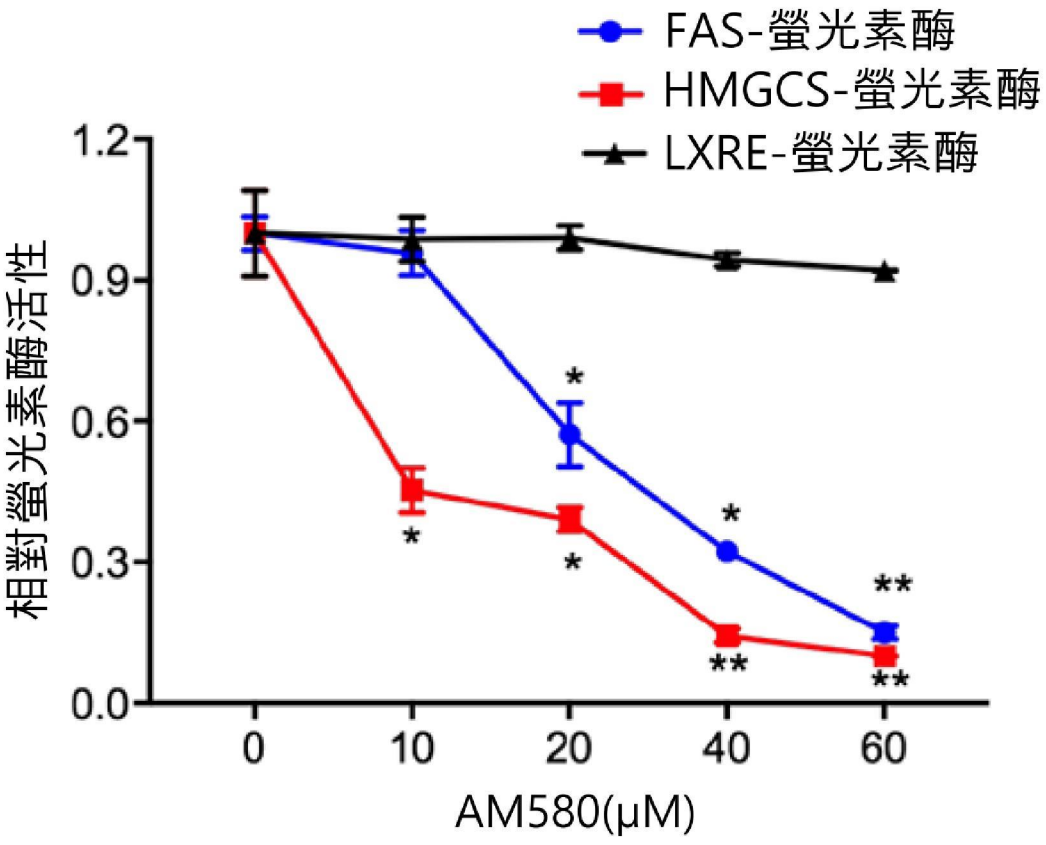

FAS-螢光素酶
HMGCS-螢光素酶
LXRE-螢光素酶
相對螢光素酶活性
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
0
10
20
40
60
AM580(μM)
*
*
*
*
**
**

圖 68

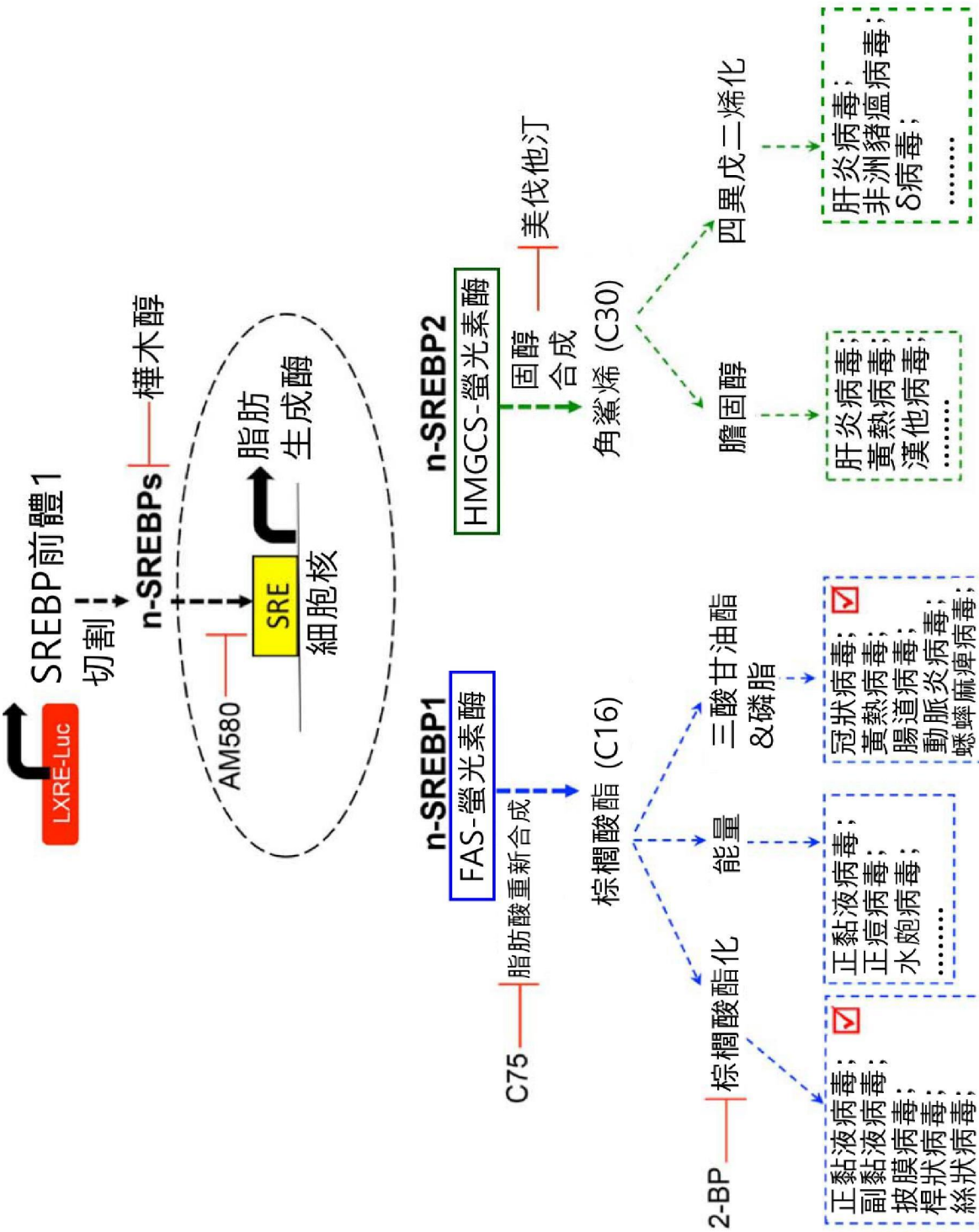
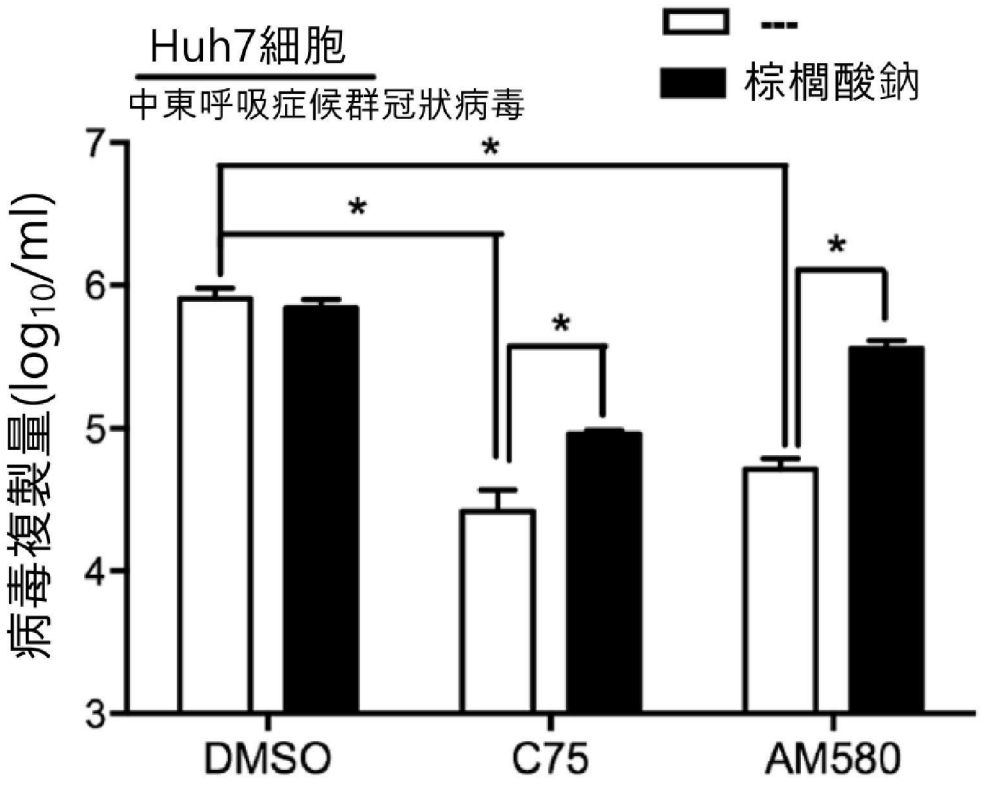
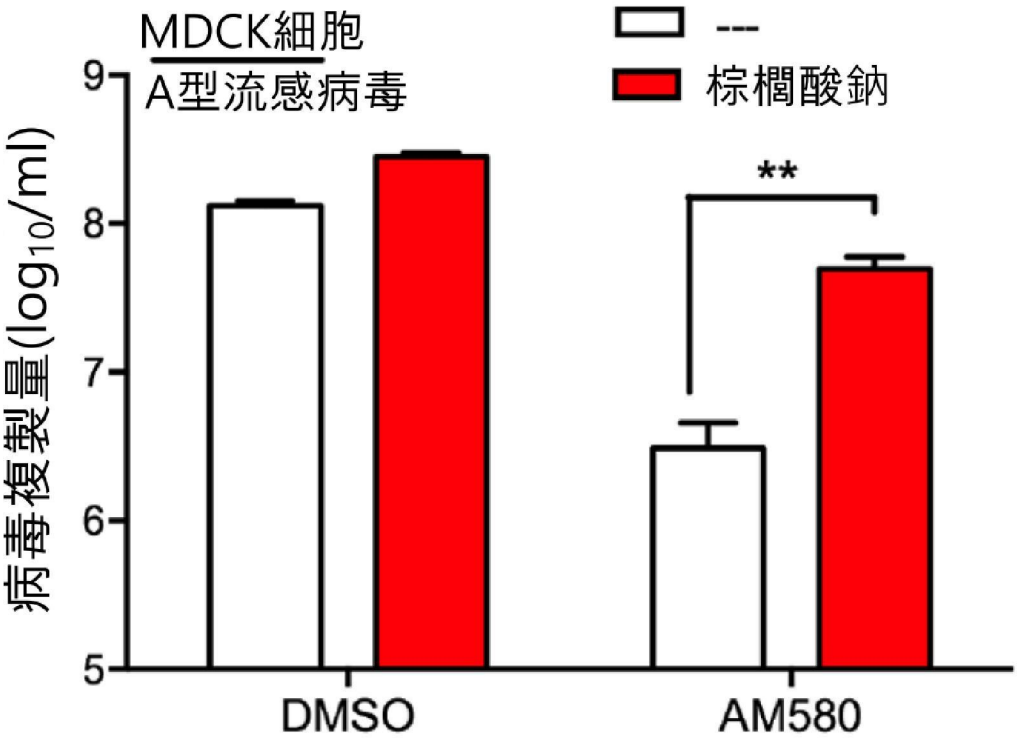

SREBP前體1
切割
n-SREBPs
樺木醇
LXRE-Luc
AM580
SRE
細胞核
脂肪
生成酶
n-SREBP2
HMGCS-螢光素酶
固醇
合成
美伐他汀
角鯊烯 (C30)
四異戊二烯化
膽固醇
肝炎病毒;
黃熱病毒;
漢他病毒;
.....
肝炎病毒;
非洲豬瘟病毒;
δ病毒;
.....
n-SREBP1
FAS-螢光素酶
脂肪酸重新合成
C75
棕櫚酸酯 (C16)
三酸甘油酯
&磷脂
能量
棕櫚酸酯化
2-BP
冠狀病毒;
黃熱病毒;
腸道病毒;
動脈炎病毒;
蟋蟀麻痺病毒;
肝炎病毒;
.....
其他(+)型
RNA病毒
正黏液病毒;
正痘病毒;
水皰病毒;
.....
正黏液病毒;
副黏液病毒;
披膜病毒;
桿狀病毒;
絲狀病毒;
冠狀病毒;
反轉錄病毒;
皰疹病毒;
.....

圖 69


Huh7細胞
中東呼吸症候群冠狀病毒

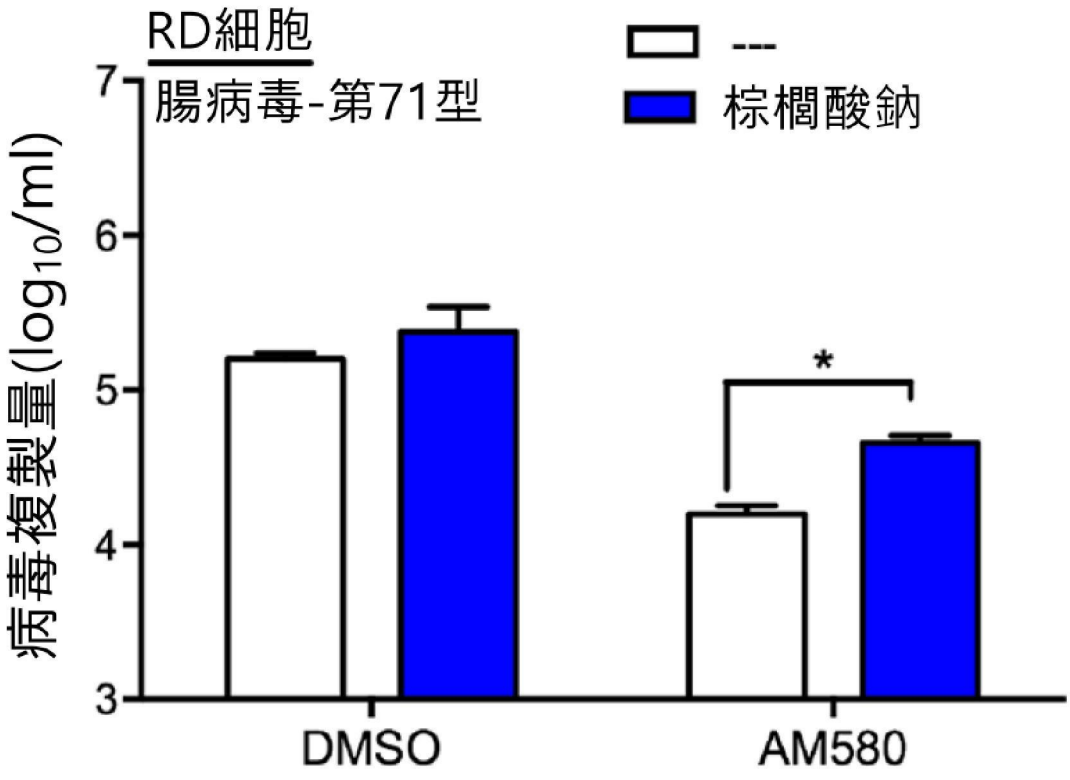
棕櫚酸鈉
病毒複製量(log10/ml)
7
6
5
4
3
*
*
*
*
DMSO
C75
AM580

圖 70


MDCK細胞
A型流感病毒

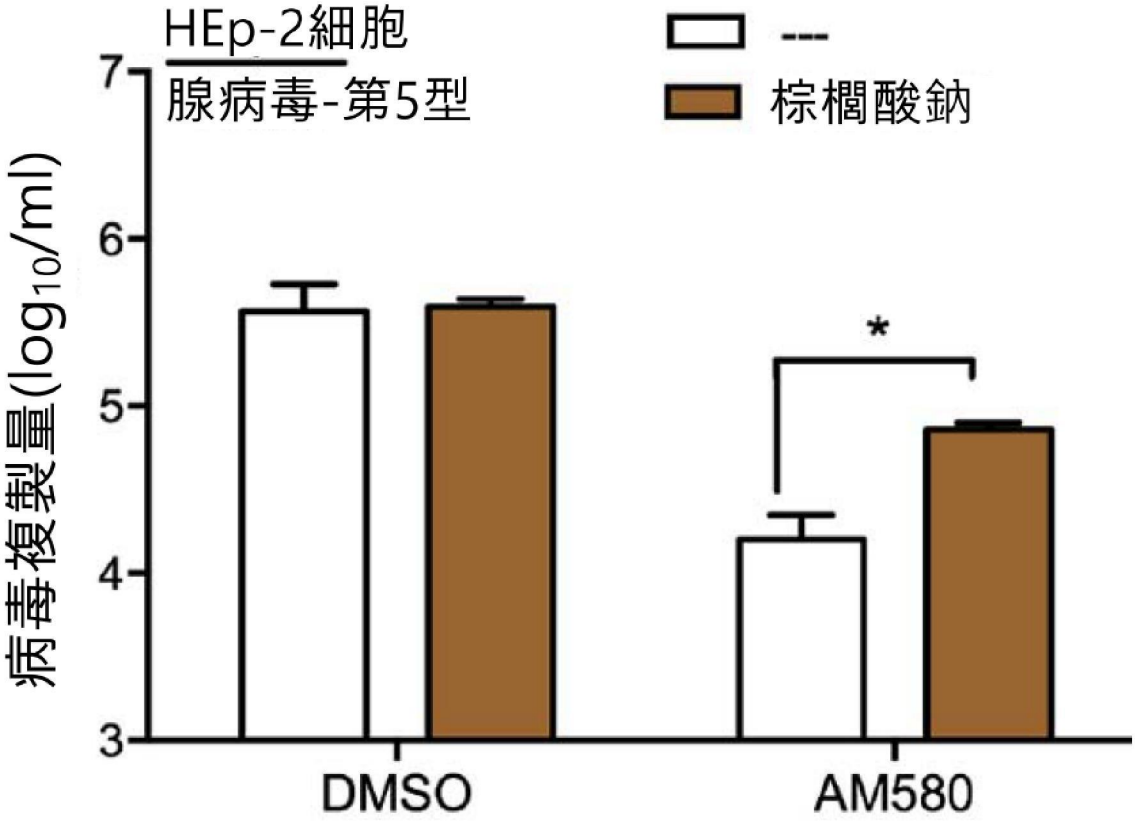
棕櫚酸鈉
病毒複製量(log10/ml)
9
8
7
6
5
**
DMSO
AM580

圖 71


RD細胞
腸病毒-第71型

棕櫚酸鈉
病毒複製量(log10/ml)
7
6
5
4
3
*
DMSO
AM580

圖 72


HEp-2細胞
腺病毒-第5型

棕櫚酸鈉
病毒複製量(log10/ml)
7
6
5
4
3
*
DMSO
AM580

圖 73

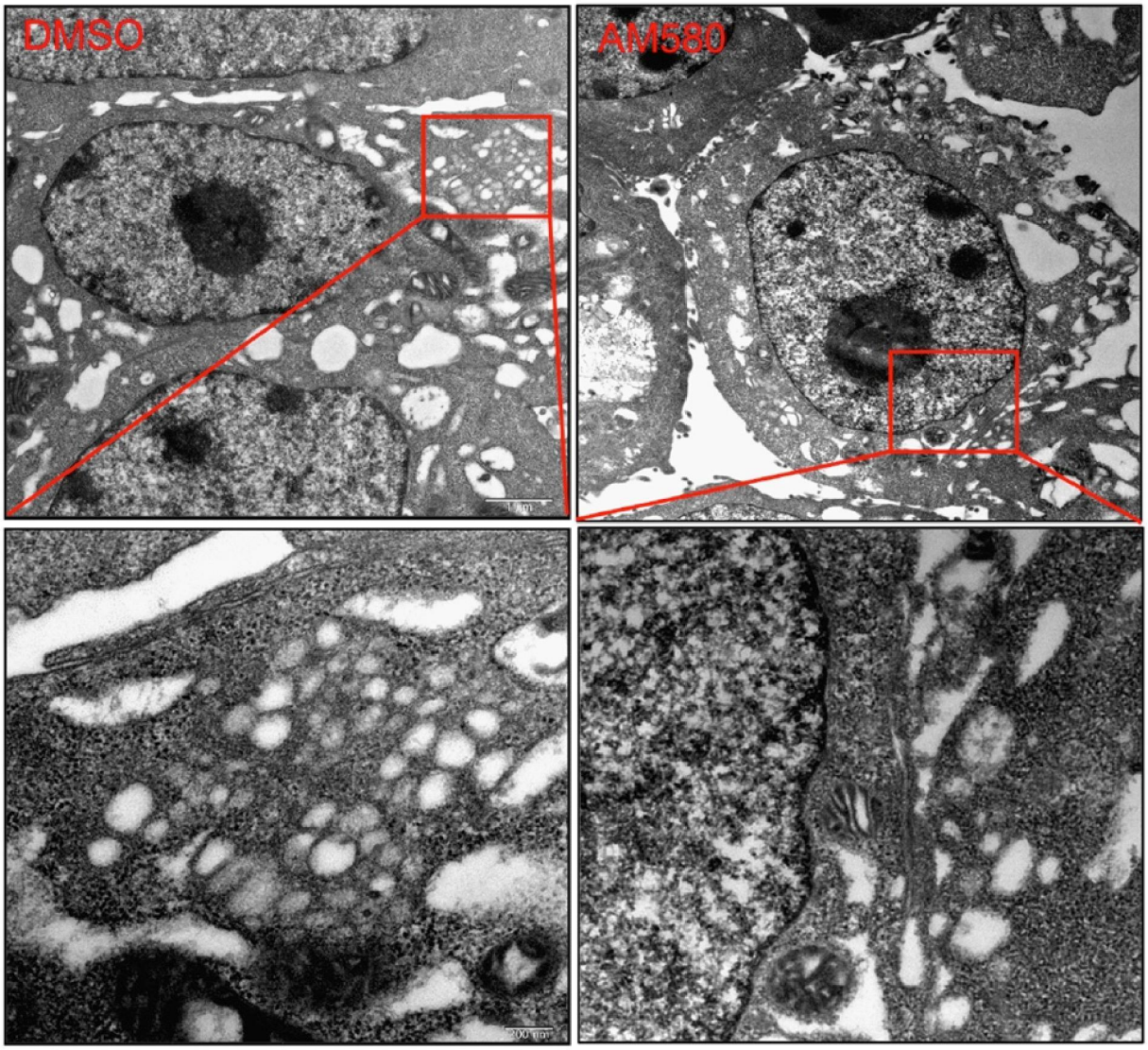


圖 74

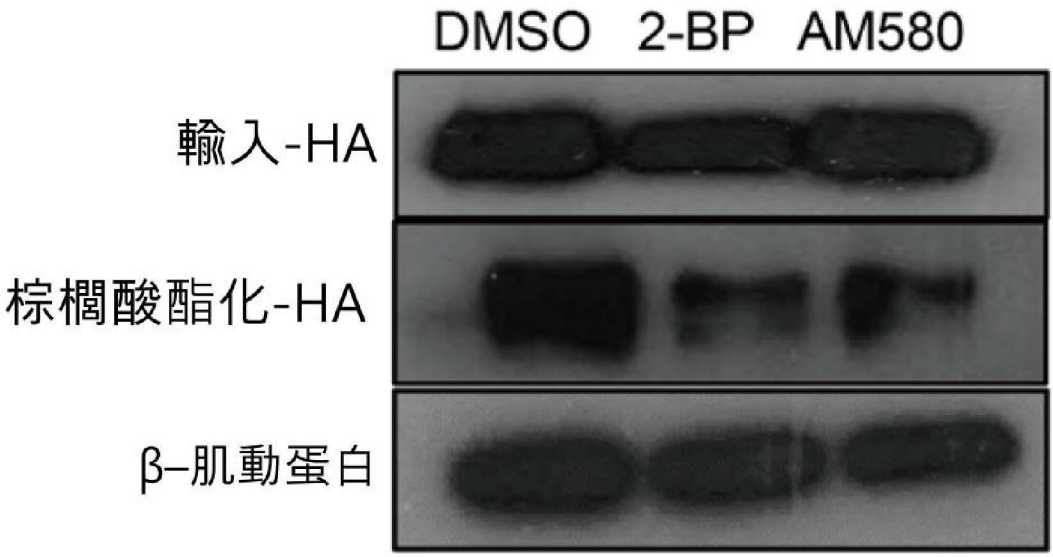

DMSO
2-BP
AM580
輸入-HA
棕櫚酸酯化-HA
β–肌動蛋白

圖 75

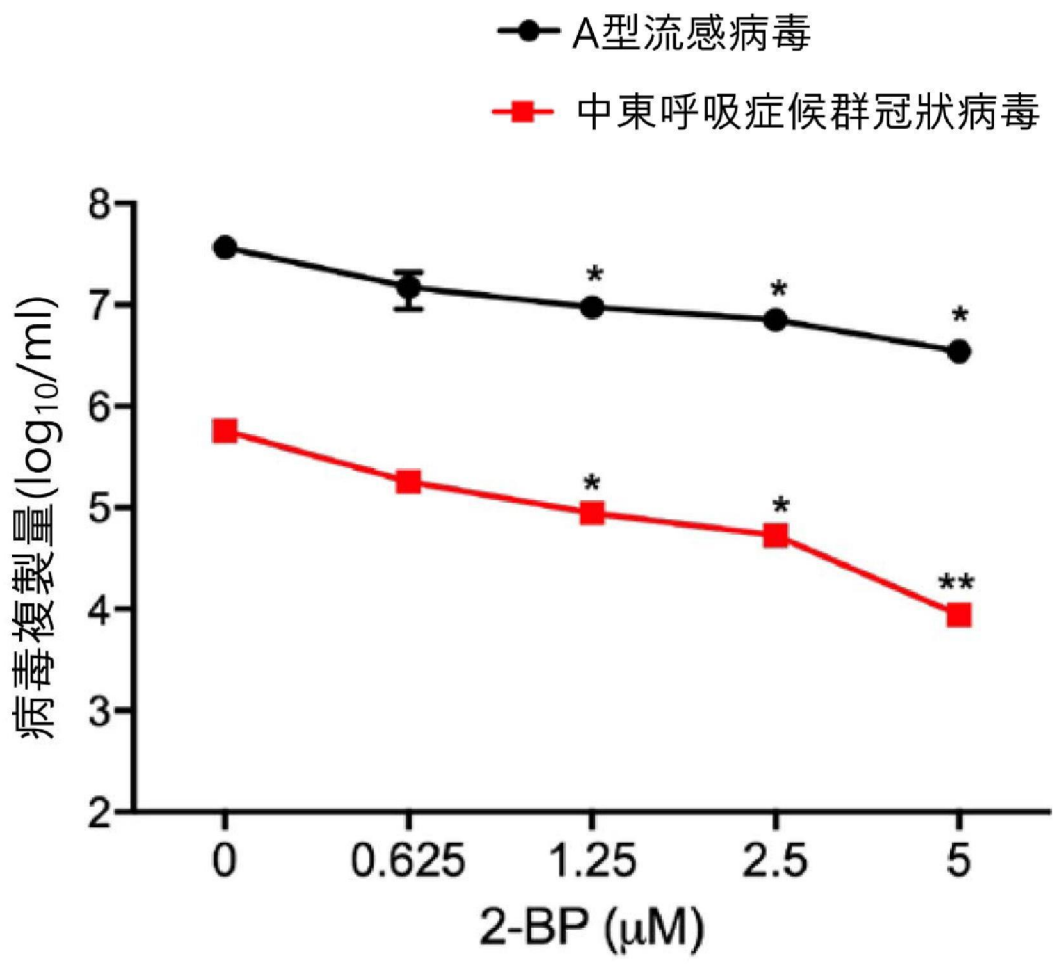

A型流感病毒
中東呼吸症候群冠狀病毒
病毒複製量(log10/ml)
8
7
6
5
4
3
2
*
*
*
*
*
**
0
0.625
1.25
2.5
5
2-BP (μM)

圖 76