



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113491700 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202110752333.X

(22) 申请日 2021.07.02

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113491700 A

(43) 申请公布日 2021.10.12

(66) 本国优先权数据

202010638926.9 2020.07.06 CN

202010639186.0 2020.07.06 CN

202010994928.1 2020.09.21 CN

(73) 专利权人 军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所

地址 130122 吉林省长春市净月开发区柳莺西路666号

专利权人 长春迈灵生物工程有限公司

(72) 发明人 高玉伟 苏忠 李元果 李松

吕朝相 王铁成 钟武 向海洋

周彤 孙伟洋 王雪峰 周博

李恩涛 冯娜 赵永坤 杨松涛

夏咸柱

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038

专利代理师 杜仙

(51) Int. Cl.

A61K 31/549 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

(56) 对比文件

EP 2699572 A1, 2014.02.26

审查员 董秋雁

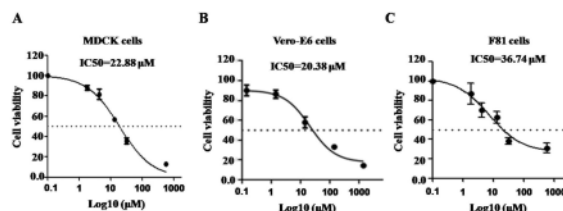
权利要求书1页 说明书18页 附图14页

(54) 发明名称

牛磺罗定在抗病毒中的应用

(57) 摘要

本申请提供了牛磺罗定在抗病毒中的应用。具体地,本申请提供牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐、或含有牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐的组合物在制备抗病毒药物中的用途。研究结果显示,牛磺罗定在细胞水平上能够显著抑制流感病毒和冠状病毒。另外,体内实验证实牛磺罗定对肺脏具有显著的保护作用,能延长流感病毒或SARS-CoV-2病毒感染小鼠的生存时间。表明牛磺罗定可用于流感病毒或冠状病毒引起的肺部疾病的预防和治疗。本申请的研究结果拓展了牛磺罗定的功效范围,为预防或治疗由病毒引起肺部感染药物的研发提供了研究基础和开辟了新方向。



1. 牛磺罗定在制备抗冠状病毒药物中的用途。
2. 权利要求1所述的用途,所述冠状病毒为SARS-CoV-2。
3. 权利要求1或2所述的用途,其中所述药物为注射剂、片剂或胶囊剂。
4. 权利要求1或2所述的用途,其中所述药物为输液剂。
5. 牛磺罗定在制备抗流感病毒药物中的用途。
6. 权利要求5所述的用途,其中所述流感病毒为H3N2。
7. 权利要求5或6所述的用途,其中所述药物中含有药学上可接受的载体。
8. 权利要求7所述的用途,所述载体选自稀释剂、吸收剂、湿润剂、赋型剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、表面活性剂及其任意组合。
9. 权利要求5所述的用途,所述药物中含有PVP-KF-17。
10. 权利要求5所述的用途,其中所述药物为注射剂、喷剂、气雾剂或冲洗剂。
11. 牛磺罗定在制备预防或治疗流感病毒或冠状病毒引起的肺部疾病或感染的药物中的用途,其中所述冠状病毒为SARS-CoV-2。
12. 权利要求11所述的用途,其中所述流感病毒为H3N2。

牛磺罗定在抗病毒中的应用

[0001] 本申请是以CN申请号为202010638926.9,申请日为2020年7月6日、CN申请号为202010639186.0,申请日为2020年7月6日、和CN申请号为202010994928.1,申请日为2020年9月21日的申请为基础,并主张其优先权,该CN申请的公开内容在此作为整体引入本申请中。

技术领域

[0002] 本发明涉及药物治疗领域,具体涉及牛磺罗定在制备抗病毒药物,尤其是制备治疗和/或预防新型冠状病毒或流感病毒感染的药物中的用途。

背景技术

[0003] 冠状病毒(Coronaviruses)是自然界中广泛存在的一大类病毒。在生物学分类中,冠状病毒属于套式病毒目(Nidovirales)、冠状病毒科(Coronaviridae)、冠状病毒属(Coronavirus),是一类具有囊膜、基因组为线性单股正链的RNA病毒,其直径在80-120nm,核酸为非节段单链(+)RNA,长27-31kb。冠状病毒是RNA病毒中具有最长的RNA核酸链的病毒,含有正链RNA特有的重要结构特征:即RNA链5'端有甲基化“帽子”,3'端有PolyA“尾巴”结构。这一结构与真核mRNA非常相似,也是其基因组RNA自身可以发挥翻译模板作用的重要结构基础。

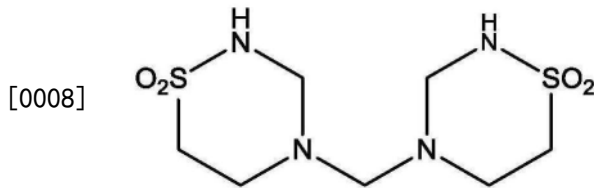
[0004] 冠状病毒可通过呼吸道分泌物排出体外,经口液、喷嚏、接触传染,并通过空气飞沫传播,以此感染脊椎动物和人类,如人、鼠、马、猪、猫、犬、禽类等并引起呼吸系统感染和急性胃肠炎等多种疾病。

[0005] 流感病毒(Influenza viruses)是引起急性呼吸道传染病,从而导致流行性感冒的主要病毒。流感病毒属于正粘病毒科(Orthomyxoviridae),是一种RNA病毒,主要包括A型流感病毒、B型流感病毒和C型流感病毒。A型流感病毒具有较高的变异性,传播性和致病性,极易造成季节性流行病。人类感染流感病毒后会引起重症肺炎,急性呼吸窘迫综合征,败血症伴发休克等,死亡率非常高。目前常用于抗流感病毒的药物主要包括烷胺类药物和神经氨酸酶抑制剂药物。但是,烷胺类药物仅对A型流感病毒有效,并且发现流感病毒会通过基因变异或药物反应等方式,快速地产生对此类抗病毒药物的抗药性。神经氨酸酶抑制剂药物能通过阻止子代病毒释放,从而抑制病毒的复制。然而此类药物的副作用一直是临床应用中的难题,包括出现幻觉,行为异常,听觉和视觉障碍。因此寻找针对流感病毒的多种亚型,开发一类具有普遍适用性的药物具有重要的意义。

[0006] 新型冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2,SARS-CoV-2)是目前已知的可以感染人的第7种冠状病毒,该病毒具有潜伏时间长、传染性强、复制率高以及难以防控等特点。人类感染新型冠状病毒后,其临床表现为发热、乏力、干咳、逐渐出现呼吸困难,严重者表现为急性呼吸窘迫综合征,脓毒症休克,难以纠正的代谢性酸中毒和凝血功能障碍。目前并没有治疗SARS-CoV-2的有效药物,只能够在对症治疗的基础上积极防治并发症的发生。因此开发可预防或者治疗新型冠状病毒的有效药物已刻不容缓,

该类药物的研发也引起了世界各国广大研究者的注意。

[0007] 牛磺罗定(英文名为Taurolidine,化学名为4,4'-亚甲双[四氢-2H-1,2,4-噻二嗪]1,1,1',1'-四氧化物,分子式为 $C_7H_{16}N_4O_4S_2$)是氨基酸牛磺酸的衍生物,其结构如下所示:



[0009] 牛磺罗定具有抗内毒素,抗细菌和抗粘附的特性。在细菌方面,牛磺罗定可与细胞壁、内毒素和外毒素发生化学反应,抑制微生物粘附,起到抗细菌的作用。此外,在抗肿瘤方面,牛磺罗定可通过诱导细胞凋亡、自噬和坏死病来诱导肿瘤细胞的细胞毒性。这些过程涉及的程度可能随肿瘤细胞的类型而变化。直到2020年7月,对牛磺罗定研究报道的国外文献检索约有260余篇,多数研究集中在牛磺罗定对肿瘤相关信号通路作用方面的探索,而在抗病毒活性方面的应用未见有研究报道。

发明内容

[0010] 目前,现有技术对牛磺罗定的药物研究集中于抗肿瘤和除菌方面。而本发明的研究结果显示,牛磺罗定在细胞水平上能够显著抑制流感病毒(例如,H1N1、H3N2或H5N1)和冠状病毒(例如,新型冠状病毒SARS-CoV-2、犬冠状病毒CCV或鼠肝炎病毒MHV)。体内实验证实牛磺罗定对肺脏具有显著的保护作用,能延长流感病毒或冠状病毒感染小鼠的生存时间。以上结果证明牛磺罗定可用于流感病毒或冠状病毒引起的肺部疾病的预防和治疗。因此,本申请的一个目的在于拓宽牛磺罗定的功效范围,提供其在抗病毒方面的应用。

[0011] 在一个方面,本申请提供牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐、或含有牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐的组合物在制备抗病毒药物中的用途。

[0012] 在另一个方面,本申请提供牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐、或含有牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐的组合物在制备抑制病毒在细胞中复制和/或繁殖的药物中的用途。

[0013] 在另一个方面,本申请提供牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐、或含有牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐的组合物在制备预防和/或治疗病毒引起的疾病或感染的药物中的用途。

[0014] 在另一个方面,本申请提供一种抑制病毒感染的方法,其包括对感染了该病毒的细胞、易感染该病毒的细胞或有此需要的受试者施用有效量的牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐、或含有牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐的组合物的步骤。

[0015] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括向所述细胞或受试者施用有效量的抗生素,如红霉素、乙酰螺旋霉素、阿奇霉素等的步骤。在一些实施方案中,所述抗生素不为万古霉素。在一些实施方案中,所述抗生素与所述牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐、或组合物同时、分别或相继施用。

[0016] 在另一个方面,本申请提供一种抑制病毒在细胞中复制和/或繁殖的方法,其包括使所述细胞与有效量的牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐、或含有牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐的组合物接触的步骤。

[0017] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括向所述细胞与有效量的抗生素,如红霉素、乙酰螺旋霉素、阿奇霉素等接触的步骤。在一些实施方案中,所述抗生素不为万古霉素。在一些实施方案中,所述抗生素与所述牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐、或组合物同时、分别或相继施用给所述细胞。

[0018] 在另一个方面,本申请提供一种预防和/或治疗病毒引起的疾病或感染的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐、或含有牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐的组合物步骤。

[0019] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括向所述受试者施用有效量的抗生素,如红霉素、乙酰螺旋霉素、阿奇霉素等的步骤。在一些实施方案中,所述抗生素不为万古霉素。在一些实施方案中,所述抗生素与所述牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐、或组合物同时、分别或相继施用给所述受试者。

[0020] 在一些实施方案中,本文上述任一项中所述病毒为RNA病毒,例如流感病毒、冠状病毒、肝炎病毒或艾滋病毒。在一些实施方案中,所述流感病毒为甲型流感病毒、乙型流感病毒或丙型流感病毒,例如 H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7或H9N2。在一些实施方案中,所述冠状病毒为新型冠状病毒SARS-CoV-2、犬冠状病毒CCV或鼠肝炎病毒MHV。在一些实施方案中,所述冠状病毒为CCV。在一些实施方案中,所述冠状病毒为SARS-CoV-2。在一些实施方案中,所述冠状病毒为MHV。

[0021] 在一些实施方案中,本文上述任一项中所述细胞为哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述哺乳动物选自牛科动物、马科动物、羊科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物、啮齿类动物和灵长类动物。在一些实施方案中,所述哺乳动物为人、猫、鸡、猪或狗。在一些实施方案中,所述细胞为来自人的细胞或者鸡胚细胞。

[0022] 在一些实施方案中,本文上述任一项中所述疾病或感染为肺部疾病。在一些实施方案中,本文上述任一项中所述疾病或感染选自流感、单纯性感染、肺炎包括重症肺炎、急性或严重急性呼吸道感染、低氧性呼吸衰竭、急性呼吸窘迫综合征、脓毒症、脓毒性休克或重症急性呼吸综合征(SARS)、中东呼吸综合征(MERS)和新型冠状病毒肺炎(COVID-19)。在一些实施方案中,所述单纯性感染为发热、咳嗽或咽痛。在一些实施方案中,所述疾病或感染为COVID-19。

[0023] 在一些实施方案中,本文上述任一项中所述组合物中进一步含有抗生素,如红霉素、乙酰螺旋霉素、阿奇霉素等。在一些实施方案中,所述抗生素不为万古霉素。在一些实施方案中,所述组合物中还可含有药学上可接受的载体,例如稀释剂、吸收剂、湿润剂、赋型剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、表面活性剂及其任意组合。在一些实施方案中,所述组合物中含有PVP-KF-17。在一些实施方案中,所述组合物为注射剂、输液剂、片剂、胶囊剂、喷剂、气雾剂或冲洗剂。在一些实施方案中,所述组合物以单位剂量形式存在。在一些实施方案中,所述组合物含1-1000mg(例如,1-800mg,1-500mg,1-200mg,1-100mg,1-50mg,1-20mg,或1-10mg)牛磺罗定或其衍生物、前药、溶剂合物或药学上可接受的盐。

[0024] 在一些实施方案中,所述组合物配方可为:每100ml溶液中含牛磺罗定2g,PVP-KF-17 5g。制备过程为:室温下先将PVP-KF-17溶于水,全溶后,在45℃~50℃的温度中,加入牛磺罗定,搅拌至全溶后,加适量4%氢氧化钠溶液调pH,再加入活性炭适量,保温30分钟,趁热过滤。滤液再经0.25mm滤膜过滤,灌瓶、压盖即得。

[0025] 术语定义

[0026] 在本申请中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所述的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本公开,下面提供相关术语的定义和解释。

[0027] 在本文中,“TRD”是指牛磺罗定。

[0028] 在本文中,所用术语“药学上可接受的盐”包括牛磺罗定的无机或有机酸盐,以及无机或有机碱盐,例如钠盐、钾盐、钙盐、锂盐、葡甲胺盐、盐酸盐,氢溴酸盐,氢碘酸盐,硝酸盐,硫酸盐,硫酸氢盐,磷酸盐,磷酸氢盐,乙酸盐,丙酸盐,丁酸盐,草酸盐,三甲基乙酸盐,己二酸盐,藻酸盐,乳酸盐,柠檬酸盐,酒石酸盐,琥珀酸盐,马来酸盐,富马酸盐,苦味酸盐,天冬氨酸盐,葡糖酸盐,苯甲酸盐,甲磺酸盐,乙磺酸盐,苯磺酸盐,对甲苯磺酸盐或双羟萘酸盐等。

[0029] 在本文中,“衍生物”是指牛磺罗定中的氢原子或其它原子团被取代而衍生出的磺胺类化合物,其具有相当于牛磺罗定10%以上生物学活性。例如,对牛磺罗定分子中的两个硫氧基团进行简单的替换或对其增减基团-NH-和-CH₂-带来的结构的改变所形成的类似化合物。

[0030] 在本文中,“前药”是指根据牛磺罗定化学结构加以改造获得的具有新的物理、化学和生物学性质的衍生物,其本身不显示原药(即牛磺罗定)的药理作用,在体内转化为原药而发挥作用。

[0031] 牛磺罗定可以溶剂合物(优选水合物)的形式存在,其包含作为牛磺罗定晶体的结构要素的极性溶剂,特别是水、甲醇或乙醇。极性溶剂特别是水的量可以化学计量比或非化学计量比存在。应理解的是,在治疗本申请所述的疾病或感染中使用的牛磺罗定的任何溶剂合物尽管可能提供不同的性质(包括药代动力学性质),但是一旦吸收至受试者中,会得到牛磺罗定,使得牛磺罗定的使用分别涵盖牛磺罗定的任何溶剂合物的使用。

[0032] 在本文中,术语“治疗有效量”或“预防有效量”是指在合理的医学判断范围内,足以治疗或预防患者疾病但足够低地避免严重副作用(在合理的利益/风险比)的量。化合物的治疗有效量将根据所选择的具体化合物(例如考虑化合物的效力、有效性和半衰期)、所选择的给药途径、所治疗的疾病、所治疗的疾病的严重性、所治疗的患者的年龄、大小、体重和身体疾病、所治疗的患者的医疗史、治疗持续时间、并行疗法的性质、所需的治疗效果等因素发生变化,但仍可以由本领域技术人员常规确定。

[0033] 另外,针对不同患者的特定使用剂量和使用方法决定于诸多因素,包括患者的年龄,体重,性别,自然健康状况,营养状况,药物的活性强度,服用时间,代谢速率,病症的严重程度以及诊治医师的主观判断。这里优选使用剂量介于0.001-1000mg/kg体重/天。

[0034] 发明的有益效果

[0035] 本申请提供了牛磺罗定在抗病毒方面的应用。使用Vero-E6、MDCK、A549、Huh7等

细胞作为牛磺罗定对抗病毒作用的细胞模型,通过将病毒接种于细胞,根据细胞病变状态收获病毒液,并测定牛磺罗定对病毒的抑制效果。结果显示,牛磺罗定在细胞水平上能够显著抑制流感病毒(例如,H1N1、H3N2或H5N1)和冠状病毒(例如,新型冠状病毒SARS-CoV-2、犬冠状病毒CCV或鼠肝炎病毒HMV)。另外,体内实验证实牛磺罗定对肺脏具有显著的保护作用,能延长流感病毒或SARS-CoV-2病毒感染小鼠的生存时间。表明牛磺罗定可用于流感病毒或冠状病毒引起的肺部疾病的预防和治疗。拓展了牛磺罗定的功效范围,为预防或治疗由病毒引起肺部感染药物的研发提供了研究基础和开辟了新方向。

附图说明

[0036] 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解,构成本申请的一部分,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0037] 图1:牛磺罗定对MDCK、Vero-E6、F81细胞的敏感性检测结果。

[0038] 图2:14 μ M牛磺罗定对H3N2亚型流感病毒抑制作用。

[0039] 图3:TRD对H1N1亚型流感病毒抑制作用。其中,图3A:用流感病毒株H1N1-UI182(MOI=0.1)感染A549细胞后,分别用DMSO和TRD处理细胞12小时,并绘制剂量反应曲线。图3B:将TRD的浓度转换为对数,将病毒滴度转换为百分比后,半对数拟合曲线计算EC₅₀值。图3C:在用溶剂DMSO和不同TRD浓度处理24小时后,通过MTT测量A549细胞的敏感性。图3D:在指定的MOI下用H1N1-UI182感染后,将细胞用溶剂DMSO和TRD处理12小时,并将奥司他韦(OSTA)用作对照。细胞核用DAPI染色,并通过核vNP染色(比例尺10 μ m)检测感染的细胞。图3E:定量NP阳性核的数目。图3F:A549细胞中NP的总蛋白表达水平。使用 β -肌动蛋白作为对照,通过蛋白质印迹分析全细胞提取物。图3G:NP表达水平的定量。数据代表平均值 \pm SD, n=3次独立实验。相对于对照,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0040] 图4:TRD对不同流感病毒亚型抑制作用。其中,图4A-D:用流感病毒株H1N1-UI182,H1N1-PR8,H3N2和H5N1毒株感染A549细胞12小时后,用DMSO和TRD处理细胞24小时,并测定病毒滴度。图4E-H:用流感病毒株H1N1-UI182,H1N1-PR8,H3N2和H5N1毒株感染MDCK细胞后,用DMSO和TRD处理细胞24小时,并测定病毒滴度。OSTA作为阳性对照药物。菌株的病毒滴度表示为Log₁₀TCID₅₀。数据表示平均值 \pm SD,并且通过ANOVA分析评估统计学显著性,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0041] 图5:15 μ M和30 μ M牛磺罗定对伪狂犬病毒抑制作用。

[0042] 图6:15 μ M和30 μ M牛磺罗定对细小病毒抑制作用。

[0043] 图7:TRD抑制SARS-CoV-2在细胞中的复制。其中,图7A:病毒致病力的检测。图7B:用新型冠状病毒SARS-CoV-2(MOI=0.1)感染Vero-E6细胞后,分别用DMSO和TRD处理细胞24小时,并绘制剂量反应曲线。图7C:在用溶剂DMSO和不同TRD浓度处理24小时后,通过MTT测量Vero-E6细胞的敏感性。图7D:分别用新型冠状病毒SARS-CoV-2(100TCID₅₀)和(200TCID₅₀)感染Vero-E6细胞后,用DMSO和TRD处理细胞24小时,并测定病毒滴度。图7E:Vero-E6细胞中NP的总蛋白表达水平。使用 β -actin作为对照,通过蛋白质印迹分析全细胞提取物。图7F:NP表达水平的定量。数据代表平均值 \pm SD, n=3次独立实验。相对于对照,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0044] 图8:TRD的抗SARS-CoV-2活性。其中,图8A,C:用光学显微镜对Vero-E6和Huh7细胞

成像以检测典型的SARS-CoV-2诱导的细胞溶解作用。图8B,D:通过RT-qPCR对细胞上清液中的病毒产量进行定量。数据代表平均值±SD,n=3次独立实验。相对于对照,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0045] 图9:TRD的抗SARS-CoV-2活性。其中,图9A,C:在指定的MOI下用SARS-CoV-2感染后,分别将Vero-E6(左)和Huh7(右)细胞用溶剂DMSO和不同剂量的TRD处理24小时,并将细胞核用DAPI染色,并通过病毒核NP染色(比例尺10μm)检测感染的细胞。图9B,D:定量NP阳性核的数目。数据代表平均值±SD,n=3次独立实验。相对于对照,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0046] 图10:体内TRD治疗后,流感病毒感染的进展受到限制。其中,图10A:将小鼠分为空白对照组(Control,▲),病毒对照组(Virus,◆)和TRD治疗组(TRD,■)。相对于感染H1N1-UI182后的天数绘制的累积体重变化。图10B:存活曲线绘制了感染H1N1-UI182后小鼠存活率的变化。图10C,D:在用H1N1-UI182感染后的第3和第5天测量小鼠肺组织中的病毒滴度。图10E:在5天时小鼠肺组织中NP的总蛋白表达水平。使用β-肌动蛋白作为对照,通过蛋白质印迹分析全细胞提取物。图10F:NP表达水平的定量。数据表示平均值±SD,并且通过ANOVA分析评估统计学显著性,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0047] 图11:TRD治疗限制了小鼠感染不同流感病毒亚型的过程。其中,图11A:将小鼠分为空白对照组(Control,◆),病毒对照组(Virus,■)和TRD治疗组(TRD,▲)。累积重量变化与感染H3N2后的天数作图。图11B:存活曲线绘制了感染H3N2后小鼠存活率的变化。图11C,D:在感染H3N2后的第3和第5天测量小鼠肺组织中的病毒滴度。图11E:相对于感染H5N1后的天数绘制的体重累积变化。图11F:存活曲线绘制了感染H5N1后小鼠存活率的变化。图11G,H:在感染H5N1后的第3天和第5天测量小鼠肺组织中的病毒滴度。数据表示平均值±SD,并且通过ANOVA分析评估统计学显著性,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0048] 图12:TRD对肺部的保护作用。其中,图12A,B:在H1N1-UI182病毒感染第3天和第5天后,检测药物对BALB-C小鼠肺组织的保护作用。图12C,D:在H3N2病毒感染后第3天和第5天测量药物对BALB-C小鼠肺组织的保护作用。图12E,F:在H5N1病毒感染后第3天和第5天测量药物对BALB-C小鼠肺组织的保护作用。数据表示平均值±SD,并且通过ANOVA分析评估统计学显著性,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0049] 图13:TRD改善肺部损伤程度。分别在对照组,病毒组和TRD治疗组的小鼠的肺组织上进行HE染色,显示不同组的代表性照片,左(H1N1-UI182),中(H3N2),右(H5N1)。

[0050] 图14:TRD改善SARS-CoV-2感染鼠的体重和存活率。其中,图14A:将BALB-C雌性小鼠分为对照组(Control,◆),病毒对照组(Virus,■)和TRD治疗组(TRD,▲)。累计重量变化与感染SARS-CoV-2后的天数作图。图14B:病毒感染BALB-C小鼠的存活率曲线。图14C:将C57BL小鼠分为对照组(Control,◆),病毒对照组(Virus,■)和TRD治疗组(TRD,▲)。累计重量变化与感染病毒后的天数作图。图14D:存活曲线绘制了病毒感染后C57BL小鼠的存活率。数据代表平均值±SD,n=3次独立实验。相对于对照,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0051] 图15:TRD改善SARS-CoV-2感染鼠的预后。其中,图15A:在感染SARS-CoV-2后的第3和第5天测量BALB-C小鼠不同组别肺组织中的病毒RNA产量。图15B:在病毒感染后第3天和第5天测量药物对BALB-C小鼠肺组织的保护作用。图15C:在病毒感染后的第3和第5天测

量C57BL小鼠肺组织中的病毒滴度。图15D:在病毒感染后第3天和第5天测量药物对C57BL小鼠肺组织的保护作用。数据代表平均值±SD, n=3次独立实验。相对于对照,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0052] 图16:TRD在SARS-CoV-2感染后对白细胞的影响。其中,图16A, B:在病毒感染后第3天和第5天确定BALB-C小鼠血清中免疫细胞的百分比。图16C, D:在病毒感染后第3天和第5天确定C57BL小鼠血清中免疫细胞的百分比。数据表示平均值±SD,并且通过ANOVA分析评估统计学显著性,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0053] 图17:TRD在SARS-CoV-2感染后对宿主血小板的影响。其中,图17A, B:在病毒感染后第3天和第5天测量药物对BALB-C小鼠血清中的血小板数目。图17C, D:在病毒感染后第3天和第5天测量药物对C57BL小鼠血清中的血小板数目。数据表示平均值±SD,并且通过ANOVA分析评估统计学显著性,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0054] 图18:TRD改善SARS-CoV-2对小鼠肺组织病变的恶性程度。其中图18A:病理分析流程。图18B:分别对不同组别的小鼠肺组织进行取样并拍照。黑色箭头(→)指示严重的组织病变。

[0055] 图19:TRD改善SARS-CoV-2对小鼠肺脏、肝脏、脾脏和肾脏组织病变的恶性程度。分别在对照组,病毒组和TRD治疗组的小鼠肺脏、肝脏、脾脏和肾脏组织上进行HE染色,显示不同组的代表性照片。黑色箭头(→)指示严重的组织出血。

[0056] 图20:TRD抑制病毒感染后ACE2的组织病理学表达。感染 SARS-CoV-2病毒后,分别在对照组,病毒组和TRD治疗组的小鼠 (BALB-C和C57BL) 肺组织上进行免疫组化检测,显示不同组的代表性照片(左),并且通过定量分析计算NP阳性表达细胞的百分比(右)。红色箭头(→)表示NP阳性细胞。数据表示平均值±SD,并且通过ANOVA 分析评估统计学显著性,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

具体实施方式

[0057] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。以下对至少一个示例性实施例的描述实际上仅仅是说明性的,绝不作为对本发明及其应用或使用的任何限制。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0058] 实施例中使用的BALB/c和C57BL/6N小鼠、牛磺罗定均为市售产品,其中牛磺罗定由长春迈灵生物工程有限公司提供,Vero-E6、MDCK、A549、Huh7细胞和流感病毒来源于军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所,SARS-CoV-2病毒来源于北京分离株,保存于军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所。

[0059] 实施例1牛磺罗定对细胞安全性的影响

[0060] MDCK、Vero-E6、F81细胞于液氮中储存,取出并将其复苏,连续传三代,待细胞长势良好后用于实验研究。将MDCK、Vero-E6、F81细胞分别接种于96孔板,每孔细胞数量为 1×10^5 ,于37°C,5% CO₂恒温细胞孵育箱中培养过夜。待细胞密度在60-70%时加入含不同浓度的牛磺罗定(起始浓度4mg/ml,以10倍梯度将待测药物进行倍比稀释,共10个浓度)的2% FBS DMEM维持液100μL/孔,每个浓度测4个复孔。另设立空白细胞对照和PBS对照,进行4个

重复,继续培养,每天显微镜下观察细胞状态。加药第2天,加入10 μ L MTT 溶液(5mg/ml),37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件孵育1小时,测定OD₅₇₀值。利用Graphpad Prism 8.0软件对数据进行分析,并计算药物对以上三种细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)。

[0061] 检测结果见图1,可以发现牛磺罗定对MDCK细胞(A)的IC₅₀值为22.88 μ M,Vero-E6细胞(B)的IC₅₀值为20.38 μ M,F81细胞(C)的IC₅₀值为36.74 μ M。

[0062] 实施例2牛磺罗定抑制流感病毒感染力的检测结果

[0063] MDCK细胞于液氮中储存,取出并将其复苏,连续传三代,待细胞长势良好后用于实验研究。将保存的H3N2流感病毒株放置于冰上缓慢融化,接种于单层MDCK细胞(不超过24小时),继续培养至72-96小时,根据细胞病变状态收获病毒液。并测定其含量,以TCID₅₀/100 μ l为计算单位。

[0064] 药物与上面获得的H3N2亚型流感病毒液混合后接入细胞。将长势良好的MDCK细胞以胰酶消化后计算细胞含量,接种于96孔板,每孔细胞数量为1 \times 10⁵。在接种12小时内且细胞处于单层状态时进行药物作用的研究。接种病毒含量为100TCID₅₀的H3N2亚型流感病毒与牛磺罗定(14 μ M)混合后,室温作用10分钟后接种于铺好的96孔板中。另设立空白细胞对照和病毒对照进行3个重复。将接种后的细胞板放置于37 $^{\circ}$ C,5%的CO₂培养箱中继续培养72小时后观察细胞病变,计算细胞增殖率。

[0065] 计算公式为:细胞的相对增殖率(P%): $P\% = OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

[0066] 观察结果见图2。可以发现,剂量为14 μ M牛磺罗定在细胞水平上对流感病毒具有显著的抑制作用。检测结果表明化合物牛磺罗定能够明显抑制流感引起的细胞病变,该结果提示牛磺罗定能够抑制流感病毒的感染。

[0067] 实施例3牛磺罗定抑制流感病毒在细胞中的繁殖

[0068] 一.实验材料

[0069] 1.1细胞:人肺癌细胞A549和非洲绿猴肾细胞MDCK,来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0070] 1.2毒株:H1N1-UI182、H1N1-PR8、H3N2和H5N1病毒,来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0071] 1.3试剂:DMEM,0.25%胰蛋白酶,FBS,PBS(pH=7.0);

[0072] 1.4仪器耗材:移液器及配套吸头,1.5mL离心管,冰盒,制冰机,生物安全柜,二氧化碳培养箱。

[0073] 二、实验方法

[0074] 2.1细胞培养:将A549和MDCK复苏,连续传三代,待细胞长势良好后用于实验研究;

[0075] 2.2病毒培养:将保存的病毒液置冰上缓慢融化后接种于单层MDCK(不超过24小时),继续培养至72-96小时,根据细胞病变状态收获病毒液。并测定病毒含量,以TCID₅₀/100 μ L为计算单位。

[0076] 2.3牛磺罗定毒性检测

[0077] 通过MTT测定法(Promega)测定细胞毒性。传代细胞在培养24小时后,将细胞接种在96孔板中(每孔4000个细胞),进行培养。根据制造商的说明,使用MTT测定法检测细胞的敏感性。简单地,将10 μ l的MTT溶液添加到每个孔中,并且在孵育4小时之后测定每孔的OD₅₇₀值,并记录。

[0078] 2.4牛磺罗定抑制作用

[0079] 药物与病毒混合同时接入细胞:将长势良好的细胞(A549和MDCK)以胰酶消化后计算细胞含量,接种于96孔板,每孔 10^5 个细胞,接种12小时内且单层状态进行药物作用的研究。接种病毒含量为100个TCID₅₀的H1N1-UI182、H1N1-PR8、H3N2和H5N1病毒与牛磺罗定(20 μ g/mL)混合后立刻接种于铺好的6孔板中。另设立空白细胞对照和牛磺罗定细胞毒性对照,进行3个重复;将接种后的细胞板置37 $^{\circ}$ C,CO₂培养箱中,继续培养,并观察细胞病变。

[0080] 2.5免疫荧光检测

[0081] 将MDCK细胞进行固定(3.7%的PFA),随后对其进行细胞打孔处理(2%的Triton-100)。在一抗孵育前,先用2%的BSA对其进行封闭。随后在对细胞核染色前,先与二抗结合孵育。最后将细胞置于荧光显微镜下观察。

[0082] 三、实验结果

[0083] 我们在MDCK细胞中观察了流感病毒感染后药物剂量与感染结局之间的相关性。

[0084] 用流感病毒株H1N1-UI182(MOI=0.1)感染MDCK细胞后,分别用DMSO和TRD处理细胞12小时,并绘制剂量反应曲线。TRD显示出有效的抗流感病毒活性,并抑制了流感病毒H1N1-UI182菌株的滴度(图3A)。将TRD的浓度转换为对数,将病毒滴度转换为百分比后,半对数拟合曲线计算EC50值。在低剂量时观察到50%有效浓度(EC50值),而高剂量TRD能够将流感病毒传播率降低至94%(图3B)。

[0085] 接下来,为了证实TRD对细胞毒性的作用,进行了MTT实验。在用溶剂DMSO和不同TRD浓度处理24小时后,测量A549细胞的敏感性。我们观察到细胞生长与TRD剂量之间呈负相关(图3C)。因此,我们选择毒性较低的浓度(50 μ g/mL)作为后续研究。为了进一步探讨TRD的潜在抗病毒作用,我们选择了奥司他韦(OSTA)作为阳性对照,这是一种通常用于治疗病毒感染的药物。为了检查TRD抗病毒作用是否是流感病毒感染的早期步骤,我们进行了单周期感染测定。在指定的MOI下用H1N1-UI182感染后,将细胞分别用溶剂DMSO、TRD和OSTA处理12小时。细胞核用DAPI染色,并通过核vNP染色(比例尺10 μ m)检测感染的细胞。病毒核蛋白(NP)的核外观被量化为成功感染的细胞(图3D)。正如预期的那样,OSTA对流感病毒具有显著的抑制作用,而经DMSO处理的对照细胞中38%的MDCK核为NP阳性,TRD处理后NP阳性细胞的百分比显著降低至21%(图3E)。随后,使用 β -肌动蛋白作为对照,通过蛋白质印迹分析全细胞提取物,也显示了相同的结果(图3F,G)。

[0086] 为了进一步探索TRD的抗病毒潜力,我们使用了不同的流感病毒亚型感染不同的细胞,包括H1N1-UI182,H1N1-PR8,H3N2和H5N1毒株以及A549和MDCK细胞。用流感病毒株H1N1-UI182,H1N1-PR8,H3N2和H5N1毒株感染A549细胞12小时后,用DMSO和TRD(20 μ g/mL)处理细胞24小时,并测定病毒滴度。OSTA作为阳性对照药物。菌株的病毒滴度表示为Log₁₀TCID₅₀。数据表示平均值 \pm SD,并且通过ANOVA分析评估统计学显著性,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。结果表明,TRD给药在A549细胞中显著地降低了病毒的滴度(图4A-D)。同样,用流感病毒株H1N1-UI182,H1N1-PR8,H3N2和H5N1毒株感染MDCK细胞后,用DMSO和TRD处理细胞24小时,并测定病毒滴度。OSTA作为阳性对照药物。菌株的病毒滴度表示为Log₁₀TCID₅₀。数据表示平均值 \pm SD,并且通过ANOVA分析评估统计学显著性,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。结果表明,TRD给药在MDCK细胞中同样也显著降低了病毒的滴度(图4E-H)。

[0087] 四结果判定

[0088] 牛磺罗定具有广谱的抗流感病毒作用,可用流感病毒的预防和治疗。

[0089] 实施例4牛磺罗定抑制伪狂犬病毒感染力的检测结果

[0090] 病毒:伪狂犬病毒为具有囊膜的DNA病毒,病毒粒子直径 150nm-180nm。

[0091] MDCK细胞于液氮中储存,取出并将其复苏,连续传三代,待细胞长势良好后用于实验研究。将保存具有囊膜的病毒伪狂犬株放置于冰上缓慢融化,接种于单层MDCK细胞(不超过24小时),继续培养至72-96小时,根据细胞病变状态收获病毒液。并测定其含量,以TCID₅₀/100μl为计算单位。

[0092] 药物与上述获得的伪狂犬病毒液混合后接入细胞。将长势良好的MDCK细胞以胰酶消化后计算细胞含量,接种于96孔板,每孔细胞量为 1×10^5 。在接种12小时内且细胞处于单层状态时进行药物作用的研究。接种病毒含量为100TCID₅₀的伪狂犬病毒分别与15μM牛磺罗定、30μM牛磺罗定混合后,室温作用10分钟后接种于铺好的96孔板中。另设立空白细胞对照和病毒对照,进行3个重复。将接种后的细胞板放置于37℃,5%的CO₂培养箱中继续培养72小时后观察细胞病变,计算细胞增殖率。

[0093] 计算公式为:细胞的相对增殖率(P%): $P\% = OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

[0094] 观察结果见图5。可以发现,含量为15μM和30μM牛磺罗定在细胞水平上对伪狂犬病毒无抑制作用。检测结果表明含量为15μM和 30μM牛磺罗定化合物不能抑制伪狂犬病毒引起的细胞病变,该结果提示牛磺罗定不能抑制伪狂犬病毒的感染。

[0095] 实施例5牛磺罗定抑制细小病毒感染力的检测结果

[0096] 病毒:细小病毒为无囊膜的DNA病毒,病毒粒子直径18-26nm。

[0097] F81细胞于液氮中储存,取出并将其复苏,连续传三代,待细胞长势良好后用于实验研究。将保存细小病毒株放置于冰上缓慢融化,接种于单层F81细胞(不超过24小时),继续培养至72-96小时,根据细胞病变状态收获病毒液。并测定其含量,以TCID₅₀/100μl为计算单位。

[0098] 药物与上述获得的细小病毒液混合后接入细胞。将长势良好的 F81细胞以胰酶消化后计算细胞含量,接种于96孔板,每孔细胞量为 1×10^5 。在接种12小时内且细胞处于单层状态时进行药物作用的研究。接种病毒含量为100TCID₅₀的细小病毒分别与15μM牛磺罗定、30μM 牛磺罗定混合后,室温作用10分钟后接种于铺好的96孔板中。另设立空白细胞对照和病毒对照,进行3个重复。将接种后的细胞板放置于37℃,5%的CO₂培养箱中继续培养72小时后观察细胞病变,计算细胞增殖率。

[0099] 计算公式为:

[0100] 细胞的相对增殖率(P%): $P\% = OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}} \times 100\%$

[0101] 观察结果见图6。可以发现,含量为15μM和30μM牛磺罗定在细胞水平上对细小病毒无抑制作用。检测结果表明含量为15μM和 30μM牛磺罗定化合物不能抑制细小病毒引起的细胞病变,该结果提示牛磺罗定不能抑制细小病毒的感染。

[0102] 实施例6牛磺罗定对犬冠状病毒CCV的抑制实验

[0103] 一.实验材料:

[0104] 1.1细胞:猫肾细胞系F81,来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0105] 1.2毒株:犬冠状病毒,来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0106] 1.3试剂:DMEM,0.25%胰蛋白酶,FBS,PBS (pH=7.0);

[0107] 1.4仪器耗材:移液器及配套吸头,1.5mL离心管,冰盒,制冰机,生物安全柜,二氧化碳培养箱。

[0108] 二、实验方法:

[0109] 2.1细胞培养:将猫肾细胞系F81复苏,连续传三代,待细胞长势良好后用于实验研究;

[0110] 2.2病毒培养:将保存的病毒液置冰上缓慢融化后接种于单层猫肾细胞系F81(不超过24小时),继续培养至72-96小时,根据细胞病变状态收获病毒液。并测定病毒含量,以TCID₅₀/100μL为计算单位。

[0111] 2.3牛磺罗定抑制作用

[0112] 药物与病毒混合同时接入细胞:将长势良好的猫肾细胞系F81以胰酶消化后计算细胞含量,接种于96孔板,每孔10⁵个细胞,接种12小时内且单层状态进行药物作用的研究。接种病毒含量为200个TCID₅₀的 HCoV-229E病毒与牛磺罗定(20μg/mL的牛磺罗定溶液、药物剂量分别为50μL、25μL、12.5μL、7.5μL、3.75μL)混合后立刻接种于铺好的6孔板中。另设立空白细胞对照和牛磺罗定细胞毒性对照,进行3个重复;

[0113] 将接种后的细胞板置37℃,CO₂培养箱中,继续培养,并观察细胞病变。

[0114] 三、实验结果

[0115] 按照以上实验方法,在37℃,CO₂培养箱中72小时观察细胞状态,镜下观察,以50μL、25μL药物为接种剂量组细胞状态良好,未出现细胞病变。12.5μL、7.5μL、3.75μL均出现不同程度的细胞病变,以3.75μL为接种剂量组与200TCID₅₀引起的细胞病变无差异。

[0116] 四、结果判定

[0117] 根据上述实验结果,判定以接种剂量50μL、25μL药物时可以完全抑制200TCID₅₀,以接种剂量12.5μL、7.5μL不能完全抑制200TCID₅₀病毒感染细胞,以接种剂量3.75μL不能抑制200TCID₅₀病毒感染细胞。

[0118] 实施例7牛磺罗定对鼠肝炎病毒HMV的抑制实验

[0119] 一、实验材料:

[0120] 1.1细胞:L929(小鼠成纤维细胞),来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0121] 1.2毒株:鼠肝炎病毒,来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0122] 1.3试剂:DMEM,0.25%胰蛋白酶,FBS,PBS (pH=7.0);

[0123] 1.4仪器耗材:移液器及配套吸头,1.5mL离心管,冰盒,制冰机,生物安全柜,二氧化碳培养箱。

[0124] 二、实验方法:

[0125] 2.1细胞培养:将L929细胞复苏,连续传三代,待细胞长势良好后用于实验研究;

[0126] 2.2病毒培养:将保存的病毒液置冰上缓慢融化后接种于单层L929细胞(不超过24小时),继续培养至72-96小时,根据细胞病变状态收获病毒液。并测定病毒含量,以TCID₅₀/100μL为计算单位。

[0127] 2.3牛磺罗定抑制作用

[0128] 药物与病毒混合同时接入细胞:将长势良好的L929细胞以胰酶消化后计算细胞含量,接种于96孔板,每孔10⁵个细胞,接种12小时内且单层状态进行药物作用的研究。接种病

毒含量为200个TCID₅₀的鼠肝炎病毒与牛磺罗定(20μg/mL的牛磺罗定溶液、药物剂量分别为50μL、25μL、12.5μL、7.5μL、3.75μL)混合后立刻接种于铺好的96孔板中。另设立空白细胞对照和牛磺罗定细胞毒性对照,进行3个重复;

[0129] 将接种后的细胞板置37℃,CO₂培养箱中,继续培养,并观察细胞病变。

[0130] 三、实验结果

[0131] 按照以上实验方法,在37℃,CO₂培养箱中72小时观察细胞状态,镜下观察,以50μL、25μL药物为接种剂量组细胞状态良好,未出现细胞病变。12.5μL、7.5μL、3.75μL均出现不同程度的细胞病变,以3.75μL为接种剂量组与200TCID₅₀引起的细胞病变无差异。

[0132] 四、结果判定

[0133] 根据上述实验结果,判定以接种剂量50μL、25μL药物时可以完全抑制200TCID₅₀,以接种剂量12.5μL、7.5μL不能完全抑制200TCID₅₀病毒感染细胞,以接种剂量3.75μL不能抑制200TCID₅₀病毒感染细胞。

[0134] 实施例8牛磺罗定对冠状病毒SARS-CoV-2的抑制

[0135] 一、实验材料:

[0136] 1.1细胞:Vero-E6、Huh7细胞,来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0137] 1.2毒株:SARS-CoV-2病毒,来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0138] 1.3试剂:DMEM培养基,0.25%胰蛋白酶,FBS,PBS(pH=7.0);

[0139] 1.4仪器耗材:移液器及配套吸头,1.5mL离心管,冰盒,制冰机,生物安全柜,二氧化碳培养箱。

[0140] 二、实验方法:

[0141] 2.1细胞培养将Vero-E6、Huh7细胞复苏,连续传三代,待细胞长势良好后用于实验研究;

[0142] 2.2病毒培养将保存的病毒液置冰上缓慢融化后接种于单层Vero-E6细胞(不超过24小时),继续培养至72-96小时,根据细胞病变状态收获病毒液。并测定病毒含量,以TCID₅₀/100μL为计算单位。

[0143] 2.3牛磺罗定抑制作用

[0144] 药物与病毒混合同时接入细胞:将长势良好的Vero-E6细胞以胰酶消化后计算细胞含量,接种于96孔板,每孔10⁵个细胞,接种12小时内且单层状态进行药物作用的研究。接种病毒含量为200个TCID₅₀的SARS-CoV-2病毒与牛磺罗定(20μg/mL的牛磺罗定溶液、药物剂量分别为50μL、25μL、12.5μL、7.5μL、3.75μL)混合后,接种于铺好的96孔板中。另设立空白细胞对照和牛磺罗定细胞毒性对照,进行3个重复;将接种后的细胞板置37℃,CO₂培养箱中,继续培养,并观察细胞病变。

[0145] 2.4牛磺罗定抑制SARS-CoV-2在Vero-E6和Huh7细胞中的病毒载量

[0146] 药物与病毒混合同时接入细胞:将长势良好的Vero-E6和Huh7细胞以胰酶消化后计算细胞含量,接种于六孔板,每孔10⁶个细胞,接种12小时内且单层状态进行药物作用的研究。接种病毒含量为100个TCID₅₀的SARS-CoV-2病毒与牛磺罗定混合后,接种于铺好的六孔板中,2%的牛磺罗定溶液、药物剂量为50μL、25μL。另设立空白细胞对照和病毒对照,进行6个重复;将接种后的细胞板置37℃,CO₂培养箱中,继续培养24h后收集全细胞中的病毒RNA(包括上清液),测定病毒载量。

[0147] 2.5牛磺罗定抑制SARS-CoV-2在Vero-E6和Huh7细胞中的复制

[0148] 药物与病毒混合同时接入细胞:将长势良好的Vero-E6和、Huh7细胞以胰酶消化后计算细胞含量,接种于12孔板,每孔 10^6 个细胞,接种 12小时内且单层状态进行药物作用的研究。接种病毒含量为100个 $TCID_{50}$ 的SARS-CoV-2病毒与牛磺罗定(20 μ g/mL的牛磺罗定溶液、药物剂量分别为50 μ L、25 μ L)混合后,接种于铺好的12孔板中。另设立病毒对照孔(DMSO处理),将接种后的细胞板置37 $^{\circ}$ C,CO₂培养箱中,继续培养24h后,使用 β -actin作为对照,通过蛋白质印迹分析全细胞提取物。测定病毒NP蛋白的阳性表达。

[0149] 三、实验结果

[0150] 为进一步探究TRD对SARS-CoV-2的抗病毒效应,我们在Vero-E6 细胞上进行了病毒接种实验。病毒扩增结果显示,SARS-CoV-2在低感染复数(MOI=0.05)和高感染复数(MOI=0.1)在感染细胞48小时后,均表现出极好的致病能力,表明两个MOI的病毒产生都非常相似(图 7A)。因此,在以下实验中,我们使用的MOI为0.05。

[0151] 值得注意的是,SARS-CoV-2的致病能与TRD剂量之间呈负相关,即随着药物剂量的增加,病毒对细胞的致病力逐渐减弱。用新型冠状病毒SARS-CoV-2(MOI=0.1)感染Vero-E6细胞后,分别用DMSO和 TRD处理细胞24小时,并绘制剂量反应曲线(图7B)。考虑到药物对细胞生长的影响,实施MTT实验。在用溶剂DMSO和不同TRD浓度处理24小时后,通过MTT测量Vero-E6细胞的敏感性。结果显示药物剂量即使在100 μ g/mL时,细胞生长也无明显变化(图7C)。分别用新型冠状病毒SARS-CoV-2(100 $TCID_{50}$)和(200 $TCID_{50}$)感染Vero-E6 细胞后,用DMSO和TRD处理细胞24小时,并测定病毒滴度。的确,不管是100 $TCID_{50}$ 还是200 $TCID_{50}$ 的病毒,TRD均显示出极好的抗病毒作用(图7D)。

[0152] 随后,我们选择了毒性更低的剂量(50 μ g/mL)作为后续研究。重要的是,TRD的给药能显著抑制病毒核蛋白(NP)在细胞中的表达,这种抑制作用与药物剂量之间呈现正相关(图7E,F)。由于在病毒体中每个RNA分子都有许多NP拷贝,因此在不同剂量下均可检测到恒定的免疫反应条带,这可能反映了给药开始时存在的病毒蛋白掩盖了在治疗中观察到的剂量依赖性抑制作用。

[0153] 接下来,我们评估了TRD潜在的抗SARS-CoV-2的作用。Vero E6 细胞感染了分离自中国武汉的SARS-CoV-2原始菌株,6小时后,它们在没有TRD的情况下或以TRD低剂量(25 μ g/mL)和高剂量(50 μ g/mL)的浓度进行培养。与对照组相比,SARS-CoV-2促进了Vero-E6细胞的溶解作用,然而这种现象被给药TRD所抑制,并且在高剂量下仅能检测到有限的细胞病变作用(图8A,C)。通过定量Vero-E6细胞培养上清液中的病毒RNA拷贝数,结果证实了TRD对病毒颗粒的产生具有显著的抑制作用,与未处理的感染细胞相比,在低剂量时降低了近2倍,在高剂量时降低了约15000倍(图8B,D)。

[0154] 此外,对SARS-CoV-2的核蛋白(NP)荧光标记证实,TRD引起显著抑制NP的积累(图9A,C)。在DMSO处理的对照Vero-E6细胞中,低剂量时约57%的细胞为NP阳性,而高剂量时NP阳性细胞则显著减少了约8.5%(图9B)。而在Hu7细胞中,低剂量时约60%的细胞为NP阳性,而高剂量时NP阳性细胞则显著减少了约12%(图9D)。这表明TRD给药显著地抑制了SARS-CoV-2对细胞的致病作用,并且这种抑制作用与药物剂量之间呈现正相关。

[0155] 四结果判定

[0156] 牛磺罗定在细胞水平上对SARS-CoV-2具有显著的抑制作用。检测结果表明化合物

牛磺罗定能够明显抑制SARS-CoV-2引起的细胞病变,可用于SARS-CoV-2的预防和治疗药物的研发。

[0157] 考虑到TRD在细胞培养模型中显示出显著的抗病毒作用,因此我们将重点转移至动物模型上,以进一步评估该药物的治疗特性。

[0158] 实施例9牛磺罗定的给药抵抗流感病毒致死性感染

[0159] 一、实验材料

[0160] 1.1实验动物: BALB/c小鼠,来源于北京维通利华实验动物技术有限公司;

[0161] 1.2毒株: H1N1-UI182、H3N2、H5N1病毒,来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0162] 1.3仪器耗材: 移液器及配套吸头, 1.5mL离心管, 冰盒, 制冰机, 生物安全柜, 二氧化碳培养箱。

[0163] 二、实验方法

[0164] 2.1将流感病毒(H1N1-UI182、H3N2、H5N1)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。观察并记录小鼠生存状况和体重变化。

[0165] 2.2牛磺罗定抑制作用

[0166] 将流感病毒(H1N1-UI182、H3N2、H5N1)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。并分别在接毒后第三天和第五天取小鼠肺组织,观察牛磺罗定对流感病毒引起的小鼠肺指数的影响。

[0167] 2.3牛磺罗定抑制肺部病毒载量

[0168] 将流感病毒(H1N1-UI182、H3N2、H5N1)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。并分别在药物治疗后第三天和第五天取小鼠肺组织,测定其病毒载量。

[0169] 三、实验结果

[0170] 对于不同物种之间的额外极化处理剂量,我们采用异位测量法和基于物种转换因子的逐因子剂量法。我们发现,存活率的提高与UI182感染治疗期间体重减轻的多少有关(图10A,B)。此外,我们在H3N2(图11A,B)和H5N1(图11E,F)中也发现了类似的结果。

[0171] 为了进一步研究流感病毒感染后,TRD治疗对宿主的保护作用,我们调查了感染UI182菌株3天和5天后肺组织中的病毒滴度。我们的结果表明,经TRD处理后,病毒的滴度显著性降低(图10C,D)。在感染H3N2(图11C,D)或H5N1(图11G,H)菌株后,这种效果仍然存在。蛋白免疫印迹结果也证实,TRD的给药显著抑制了病毒在小鼠肺部组织中的复制(图10E,F)。这些结果表明TRD治疗导致流感病毒感染期间存活率显著提高并且死亡率急剧下降。

[0172] 四结果判定

[0173] 与对照组相比,流感病毒接种的小鼠体重明显下降。与病毒对照组相比,药物处理组小鼠的体重下降趋势明显放缓,小鼠的生存时间明显延长。检测结果表明化合物牛磺罗定能延长流感病毒感染小鼠的生存时间,可用于流感病毒的预防和治疗。

[0174] 实施例10牛磺罗定对流感病毒在小鼠体内致病性的影响

[0175] 一、实验材料

[0176] 1.1实验动物: BALB/c小鼠,来源于北京维通利华实验动物技术有限公司;

[0177] 1.2毒株:H1N1-UI182、H3N2、H5N1病毒,来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0178] 1.3仪器耗材:移液器及配套吸头,1.5mL离心管,冰盒,制冰机,生物安全柜,二氧化碳培养箱。

[0179] 二、实验方法

[0180] 2.1将流感病毒(H1N1-UI182、H3N2、H5N1)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。

[0181] 2.2牛磺罗定抑制作用

[0182] 将流感病毒(H1N1-UI182、H3N2、H5N1)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。并分别在接毒后第三天和第五天取小鼠肺组织,观察牛磺罗定对流感病毒引起的小鼠肺指数的影响。计算公式为:肺指数=(小鼠肺组织的重量÷小鼠体重)×100%。

[0183] 2.3牛磺罗定改善流感病毒对小鼠肺部造成的损伤

[0184] 将流感病毒(H1N1-UI182、H3N2、H5N1)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。并分别在药物治疗后第五天取小鼠肺组织固定,检测组织病理变化。

[0185] 三实验结果

[0186] 肺总量指数(Lung index)的高低可作为判断限制性肺部疾病严重程度的重要指标。因此,我们分析了TRD给药前和给药后对小鼠肺总量指数的影响,分别包括第三天和第五天。我们发现流感病毒感染导致肺总量指数的上升,而药物处理显著降低了H1N1-UI182(图12A,B)、H3N2(图12C,D)和H5N1(图12E,F)毒株感染3天和5天后的肺总量指数。这些结果表明,TRD的给药对小鼠肺组织具有积极的保护作用。

[0187] 此外,药物治疗可以显著改善流感病毒对小鼠肺部的损伤(图13)。这些观察结果清楚地表明,在体外观察到的抗病毒作用实际上是在体内发生的,并且至少抗菌药物TRD在治疗室内空气病毒感染方面具有潜在的抗病毒效果。

[0188] 四结果判定

[0189] 与对照相比,牛磺罗定给药后对小鼠肺脏具有显著的保护作用,并且可改善流感病毒对肺部组织造成的病理损伤,可用于流感病毒的预防和治疗。

[0190] 实施例11牛磺罗定的给药对SARS-CoV-2模型鼠预后的影响

[0191] 一、实验材料:

[0192] 1.1实验动物:BALB/c和C57BL/6N小鼠,来源于北京维通利华实验动物技术有限公司;

[0193] 1.2毒株:SARS-CoV-2(C57MA14株),来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0194] 1.3仪器耗材:移液器及配套吸头,1.5mL离心管,冰盒,制冰机,生物安全柜,二氧化碳培养箱。

[0195] 二、实验方法:

[0196] 2.1将新型冠状病毒(C57MA14)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。观察并记录小鼠生存状况和体重变化。

[0197] 2.2牛磺罗定抑制作用

[0198] 新型冠状病毒(C57MA14株)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。并分别在接毒后第三天和第五天取小鼠肺组织,观察牛磺罗定对SARS-CoV-2引起的小鼠肺指数的影响。计算公式为:肺指数=(小鼠肺组织的重量÷小鼠体重)×100%。

[0199] 2.3牛磺罗定改善流感病毒对小鼠肺部造成的损伤

[0200] 将流感病毒(H1N1-UI182、H3N2、H5N1)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。并分别在药物治疗后第五天取小鼠肺组织固定,检测组织病理变化。

[0201] 三实验结果

[0202] 本课题组在前期已成功构建出SARS-CoV-2动物感染模型,包括恒河猴,食蟹猴,小鼠,金黄地鼠,犬,猫,穿山甲等。先前的结果表明,在体外TRD对SARS-CoV-2具有极好的抑制效果。为了进一步评估TRD在体内的抗病毒作用,小鼠感染模型被实施(包括BALB-C雌性小鼠和C57BL雄性小鼠)。通过采用异位测量法和基于物种转换因子的逐因子剂量法对模式动物进行注射性给药。实验结果显示,在病毒感染后第2天,小鼠体重开始下降,在第3天,小鼠发生死亡,第7天死亡率达100%(图14)。以上结果表明,SARS-CoV-2毒株可诱导小鼠的致死性感染。重要的是,无论是BALB-C小鼠(图14A)还是C57BL小鼠(图14C),TRD的给药抑制了病毒鼠体重的降低。此外,TRD的给药显著地保护了SARS-CoV-2感染期间对小鼠的致死性,BALB-C小鼠的保护率为92.31%(图14B),C57BL小鼠为84.62%(图14D)。

[0203] 为了探究TRD抗病毒效应与时间之间的关联,我们分别在给药后第三天和第五天对感染小鼠进行取样分析。通过定量小鼠肺组织中的病毒RNA拷贝数,结果证实了药物处理对病毒颗粒的产生具有显著的抑制作用(图15A,C)。值得注意的是,在SARS-CoV-2感染后,TRD的给药对肺组织具有极好的保护作用(图15B,D)。通常,病毒感染会导致宿主自身免疫防御的发生,这也就很好解释了在病毒感染后第6天肺部组织中病毒RNA产量低于感染后第4天的产量。但即使如此,TRD的给药对病毒在肺部的产量依然具有明显地抑制作用。

[0204] 四结果判定

[0205] 与对照组相比,SARS-CoV-2接种的小鼠体重明显下降。药物处理可保护小鼠体重的下降,并且可以延长小鼠的生存时间。检测结果表明化合物牛磺罗定能降低小鼠肺部病毒RNA拷贝数,以及改善SARS-CoV-2小鼠的生存时间,可用于新型冠状病毒的预防和治疗。

[0206] 实施例12牛磺罗定改善了SARS-CoV-2对小鼠的感染预后

[0207] 一、实验材料:

[0208] 1.1实验动物: BALB/c和C57BL/6N小鼠,来源于北京维通利华实验动物技术有限公司;

[0209] 1.2毒株: SARS-CoV-2(C57MA14株),来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0210] 1.3仪器耗材: 移液器及配套吸头,1.5mL离心管,冰盒,制冰机,生物安全柜,二氧化碳培养箱。

[0211] 二、实验方法:

[0212] 2.1将新型冠状病毒(C57MA14株)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。

[0213] 2.2牛磺罗定抑制作用

[0214] 新型冠状病毒(C57MA14株)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。并分别在接毒后第三天和第五天取小鼠血液,对白细胞总数进行计数。

[0215] 三实验结果

[0216] 接下来,我们继续评估了TRD对SARS-CoV-2感染后临床结局的影响。与预期结果一致,我们发现在药物治疗BALB-C小鼠后第3天(图16A)和第5天(图16B),血清中淋巴细胞的百分比增加,中性粒细胞的百分比减少。这种现象同样存在于在C57BL小鼠中(图16C,D)。

[0217] 此外,我们的结果还表明,SARS-CoV-2感染后导致宿主血清中血小板数两急剧增加。然而,药物治疗BALB-C小鼠3天和5天后,血清中血小板数量显著减少(图17A,B)。重要的是,在C57BL小鼠中,我们也得到了同样的结果(图17C,D)。这些发现证明在用TRD治疗后,由致病性新型冠状病毒产生了显著的生物学表型。

[0218] 四结果判定

[0219] 与未给药组相比,牛磺罗定的给药可显著增加小鼠淋巴细胞和单核细胞的数量,并且可显著降低病毒感染后中性粒细胞和血小板总数,提示,牛磺罗定具有缓解和改善新型冠状病毒感染的总体预后水平。

[0220] 实施例13牛磺罗定改善了SARS-CoV-2对小鼠肺组织的损伤一、实验材料:

[0221] 1.1实验动物: BALB/c和C57BL/6N小鼠,来源于北京维通利华实验动物技术有限公司;

[0222] 1.2毒株: SARS-CoV-2(C57MA14株),来源于军事兽医研究所病毒学研究室;

[0223] 1.3仪器耗材: 移液器及配套吸头,1.5mL离心管,冰盒,制冰机,生物安全柜,二氧化碳培养箱。

[0224] 二、实验方法:

[0225] 2.1将新型冠状病毒(C57MA14)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。

[0226] 2.2牛磺罗定改善新型冠状病毒对小鼠肺部造成的损伤

[0227] 将流感病毒(H1N1-UI182、H3N2、H5N1)接种于病毒对照组和药物治疗组小鼠,并采取不同方式每天早晚,分别持续给予药物治疗组小鼠药物处理,100uL/次(2mg)。并分别在药物治疗后第五天取小鼠肺组织固定,检测组织病理变化。

[0228] 三实验结果

[0229] 先前的结果表明,TRD的给药可保护SARS-CoV-2对肺部组织的作用,并改善病毒感染的临床结局。为进一步确定TRD在SARS-CoV-2诱导的肺部损伤中的作用,我们对BALB-C和C57BL小鼠进行滴鼻接种病毒,24小时后给予TRD药物处理,并在给药后第三天和第五天对其肺部组织进行采集(图18A)。结果显示,病毒感染后导致肺部组织内部大面积充血,造成了严重的病理症状。重要的是,这种现象被TRD的给药所逆转(图18B)。

[0230] 为进一步确定TRD在改善或治疗SARS-CoV-2诱导的宿主组织(包括肺脏、肝脏、脾脏和肾脏)损伤中的作用,我们对BALB-C和C57BL小鼠进行滴鼻接种病毒,24小时后给予TRD药物处理,并在给药后第七天对其肺脏、肝脏、脾脏和肾脏进行采集。HE染色结果显示,病毒感染后导致肺脏、肝脏、脾脏和肾脏内部大面积充血,造成了严重的病理症状。重要的是,在给予TRD治疗后,该现象被显著地逆转(图19)。此外,病理分析表明,病毒感染导致组

织内部出血(黑色箭头表示)。

[0231] 为更深入的探究药物治疗前后组织病理表达变化,我们检测了 BALB-C和C57BL小鼠肺脏、肝脏、脾脏和肾脏中SARS-CoV-2核蛋白 NP的表达变化。在SARS-CoV-2感染后,小鼠肺脏、肝脏、脾脏和肾脏中NP表达的阳性细胞百分比显著增加。值得注意的是,上述现象被给予TRD治疗后所抑制(图20)。这表明,TRD的给药有效地抑制了病毒在组织中的进一步复制,并且以此来改善SARS-CoV-2对宿主组织造成的病理损伤。

[0232] 四结果判定

[0233] 牛磺罗定可显著改善新型冠状病毒感染小鼠的肺、肝、脾、肾组织病理损伤,并且可降低上述组织中病毒载量,提示该药物具有预防和治疗新型冠状病毒感染的作用。

[0234] 综合以上结果,牛磺罗定对流感病毒和新型冠状病毒或同类RNA 病毒具有非常有效的抑制作用,并且能延长流感病毒和新型冠状病毒感染小鼠的生存时间以及改善病毒对小鼠肺部的致病作用,表明牛磺罗定可用于该类病毒的预防和相关治疗药物的研发。

[0235] 除本文中描述的那些外,根据前述描述,本发明的各种修改对本领域技术人员而言会是显而易见的。这样的修改也意图落入所附权利要求书的范围内。本申请中所引用的各参考文献(包括所有专利、专利申请、期刊文章、书籍及任何其它公开)均以其整体援引加入本文。

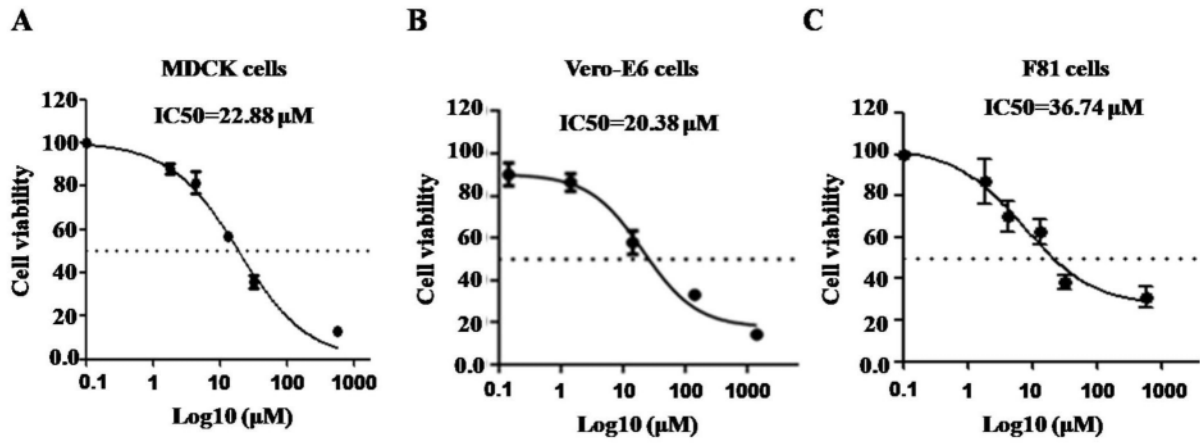


图1

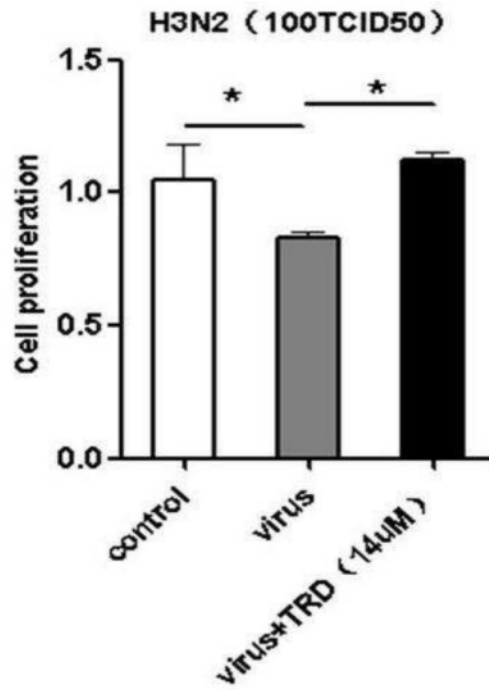


图2

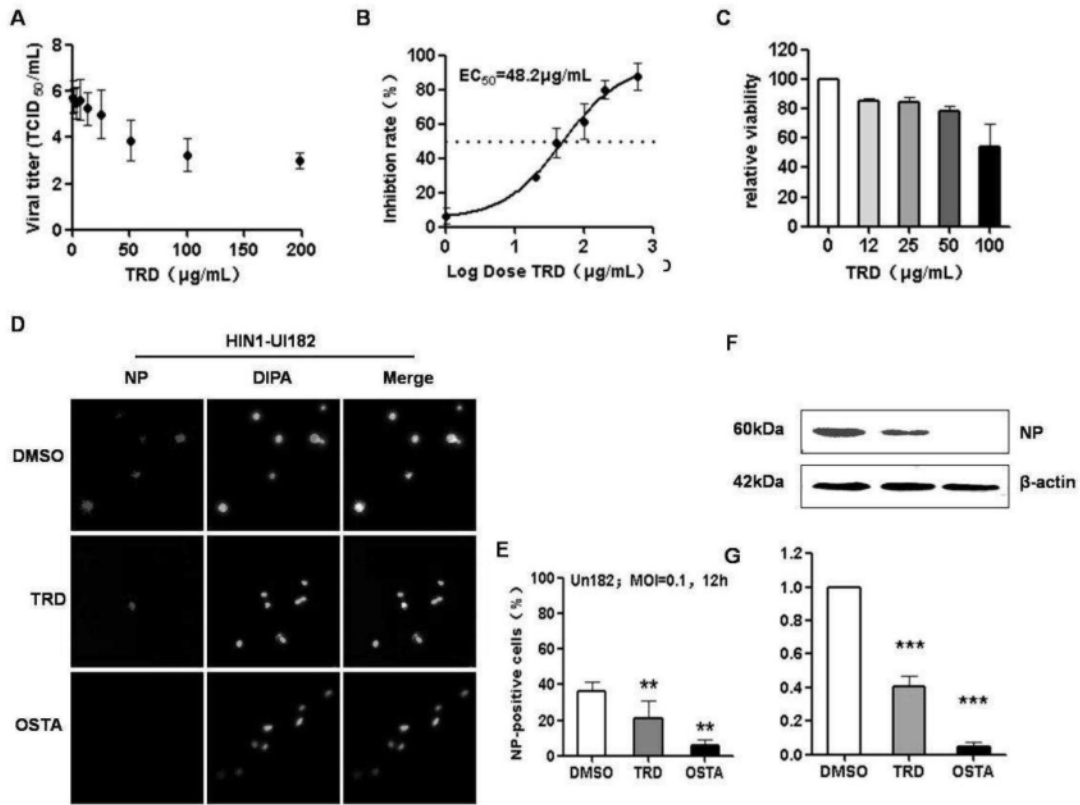


图3

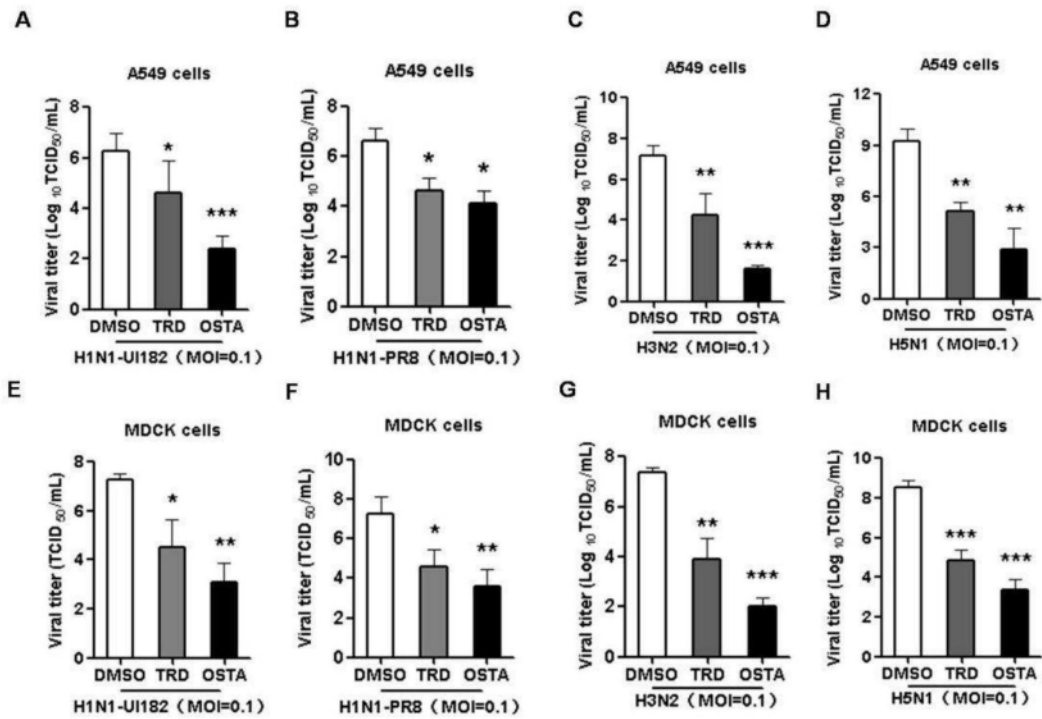


图4

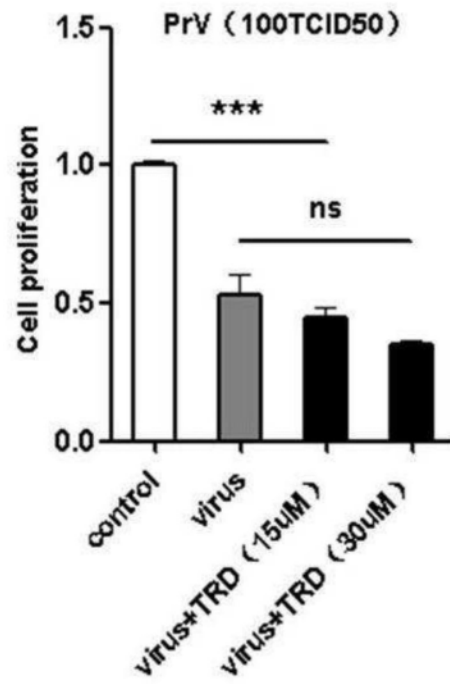


图5

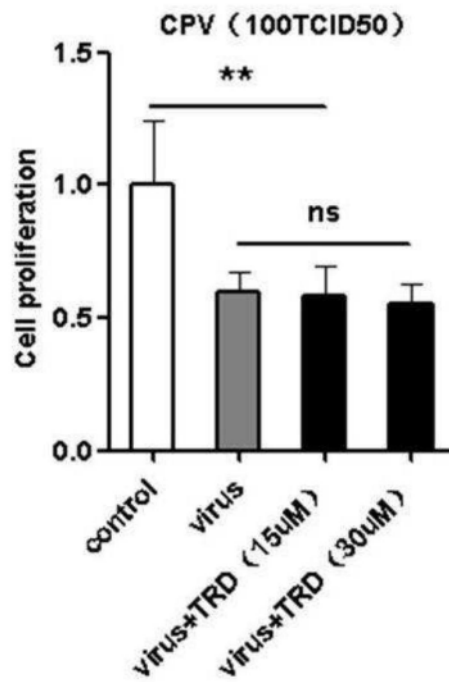


图6

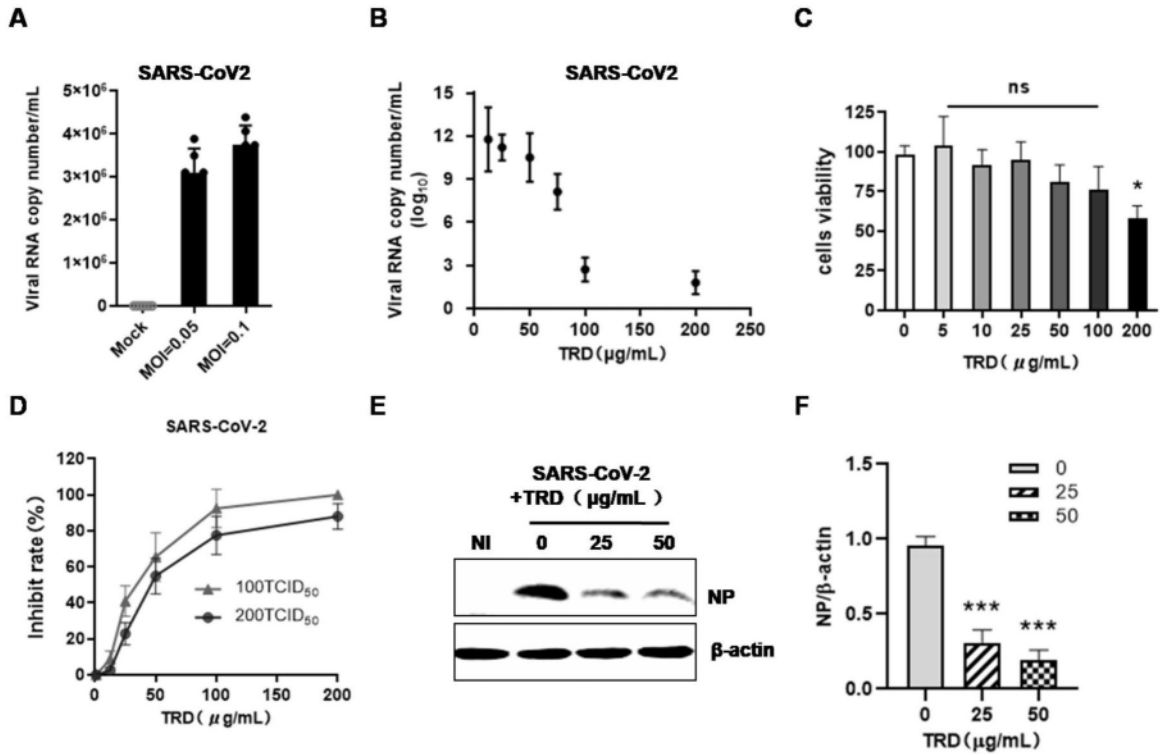


图7

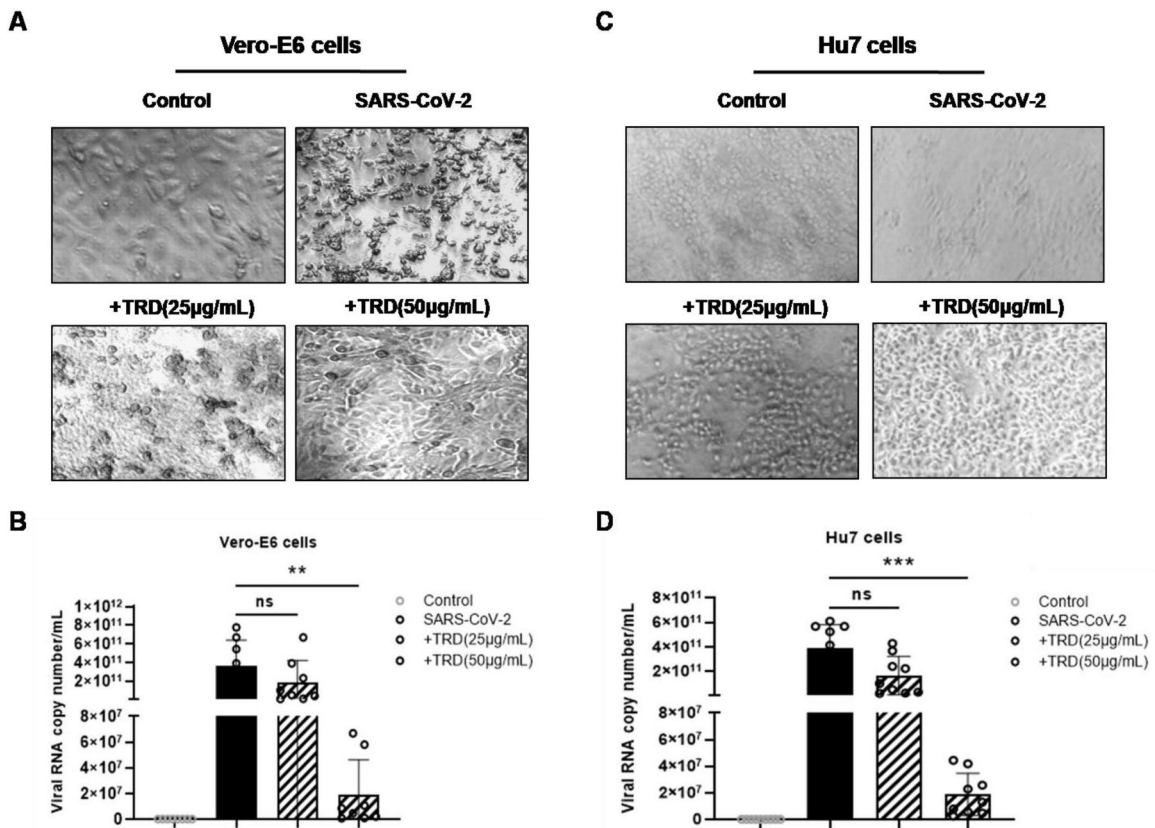


图8

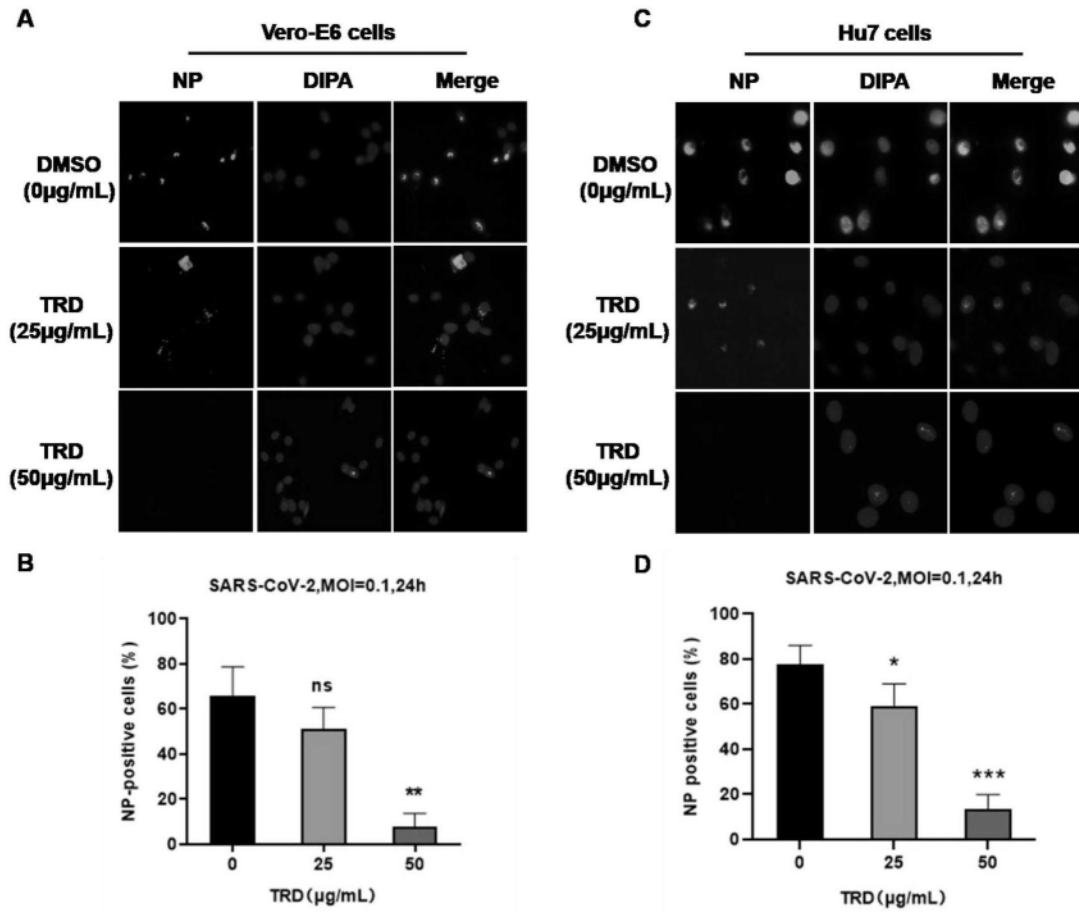


图9

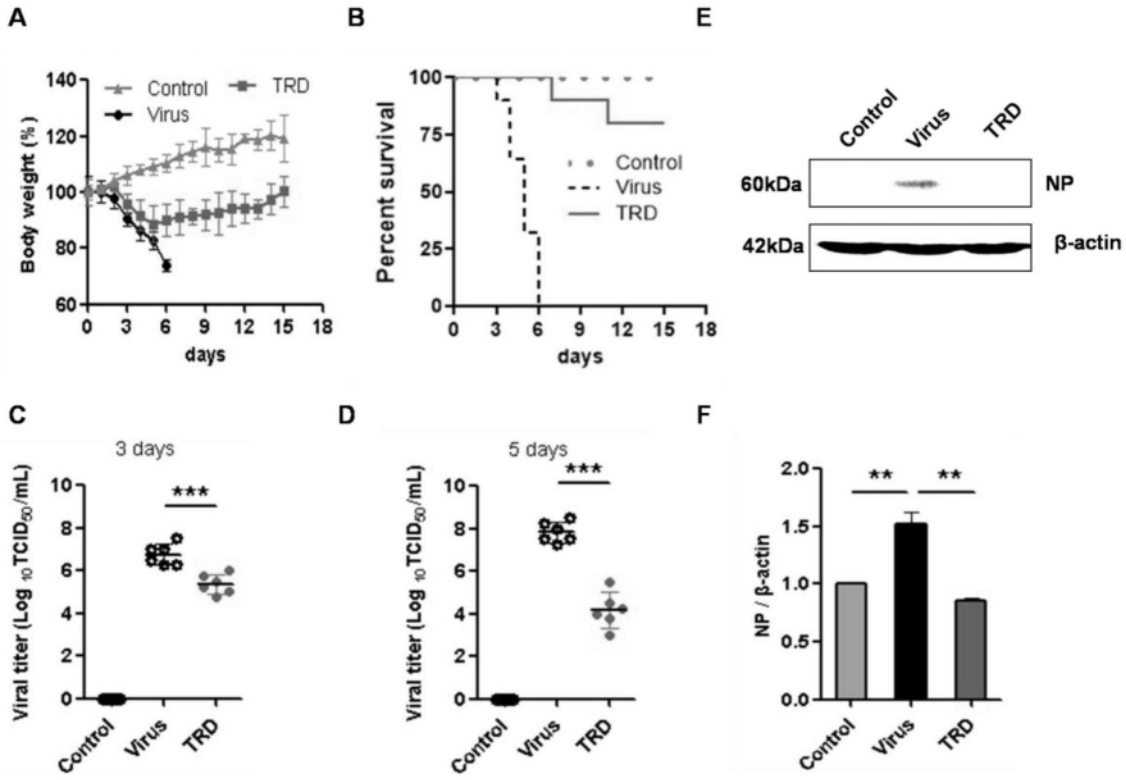


图10

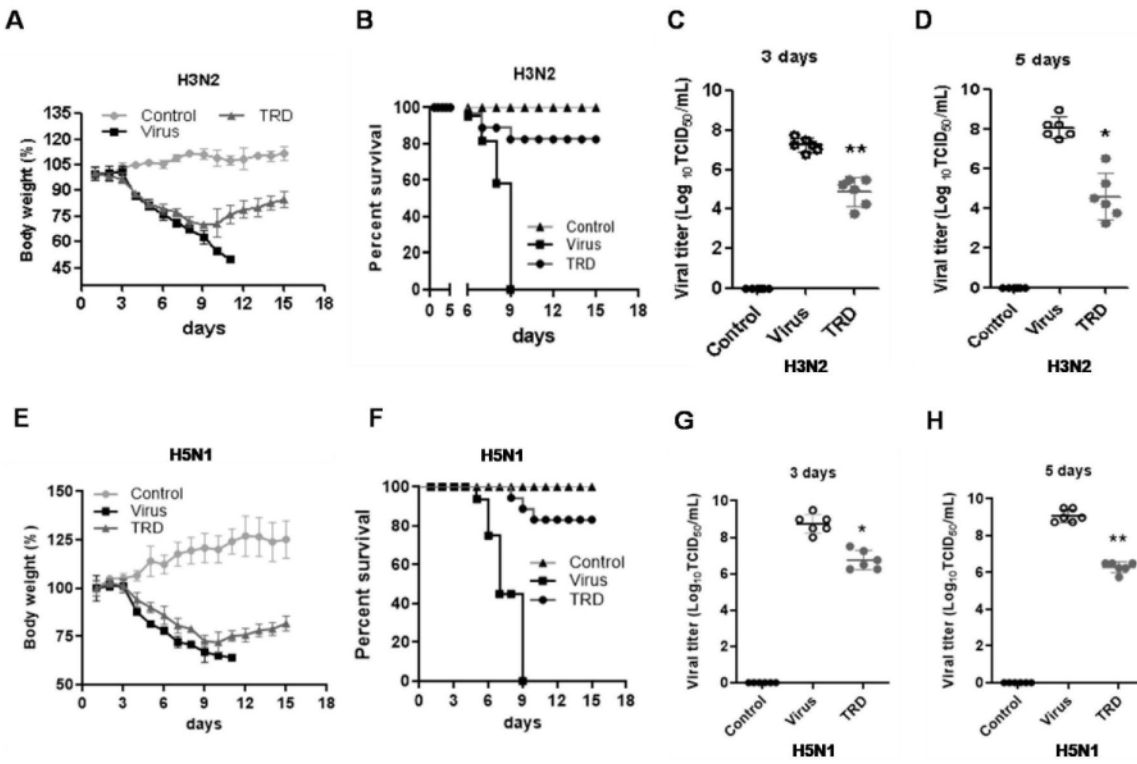


图11

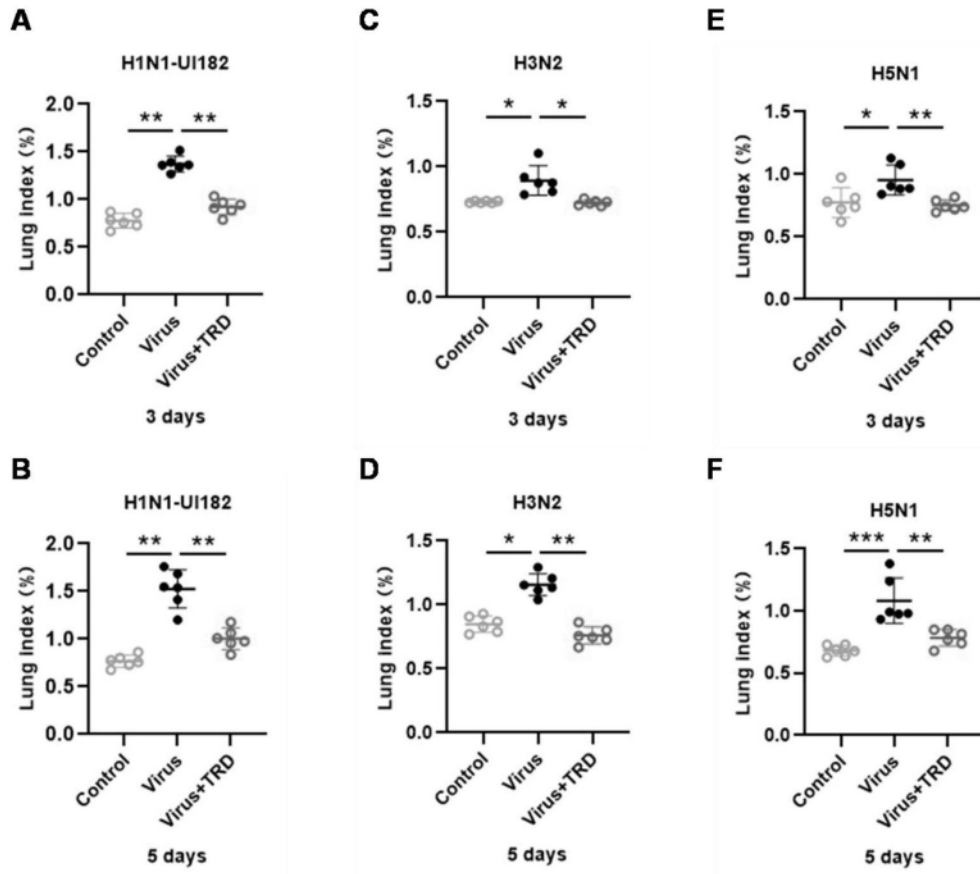


图12

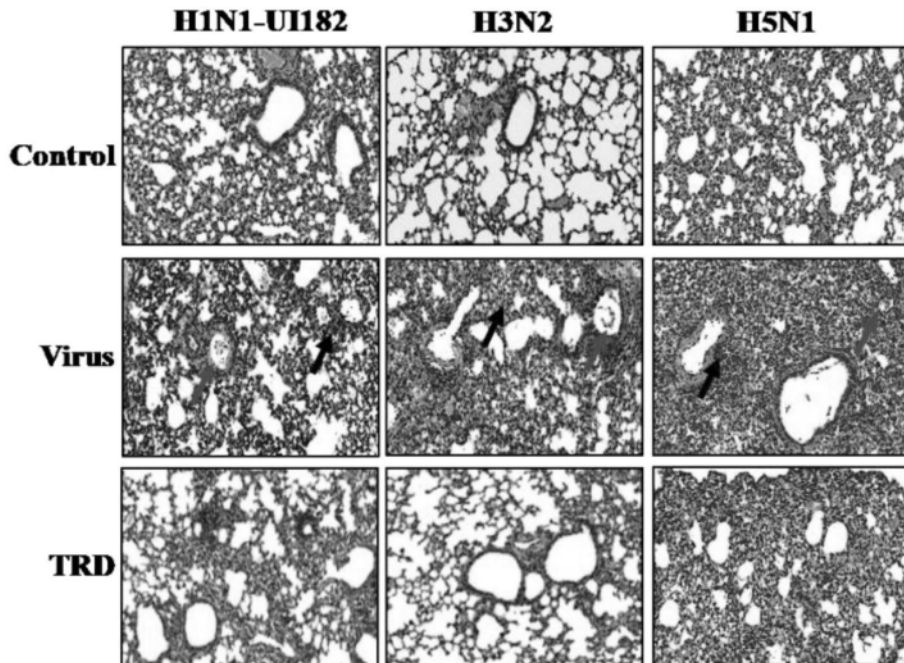


图13

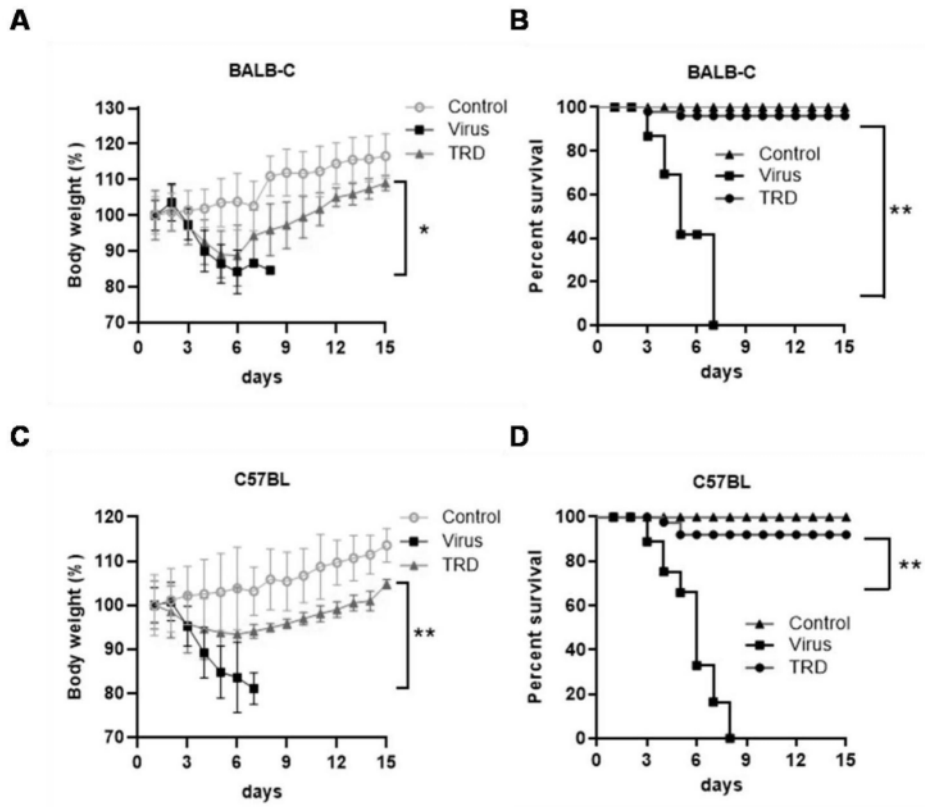


图14

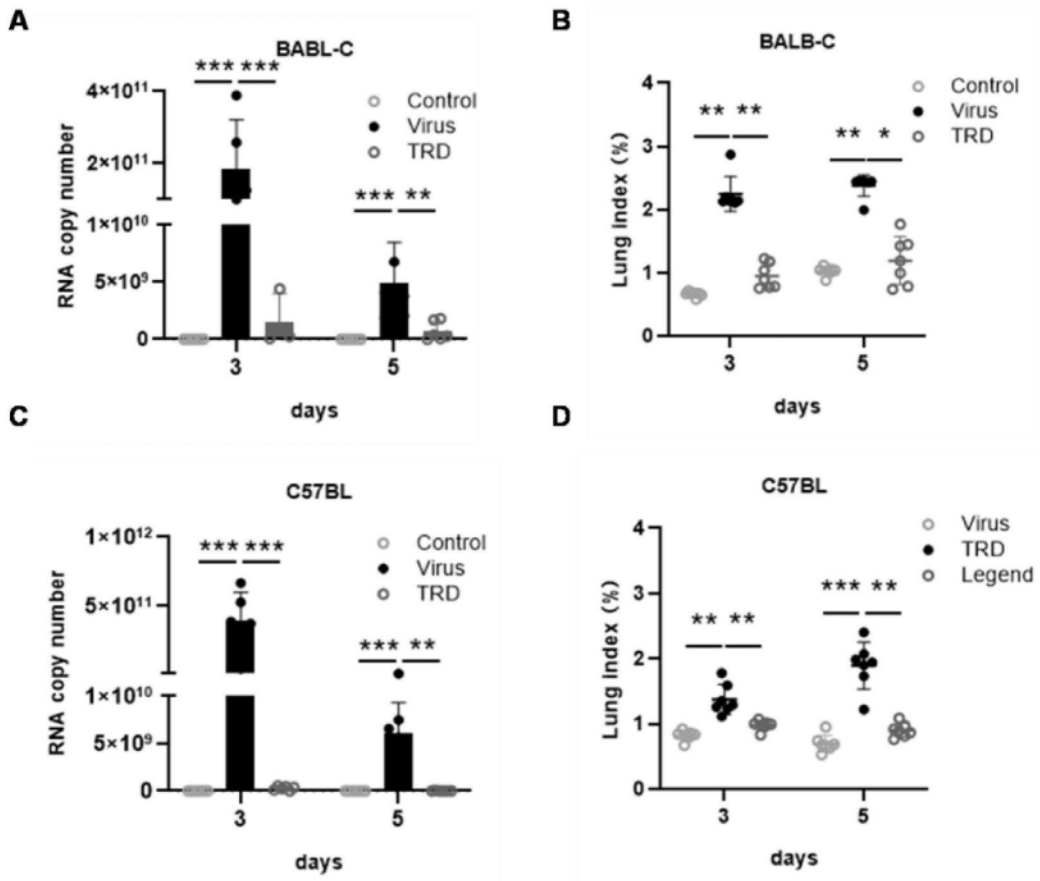


图15

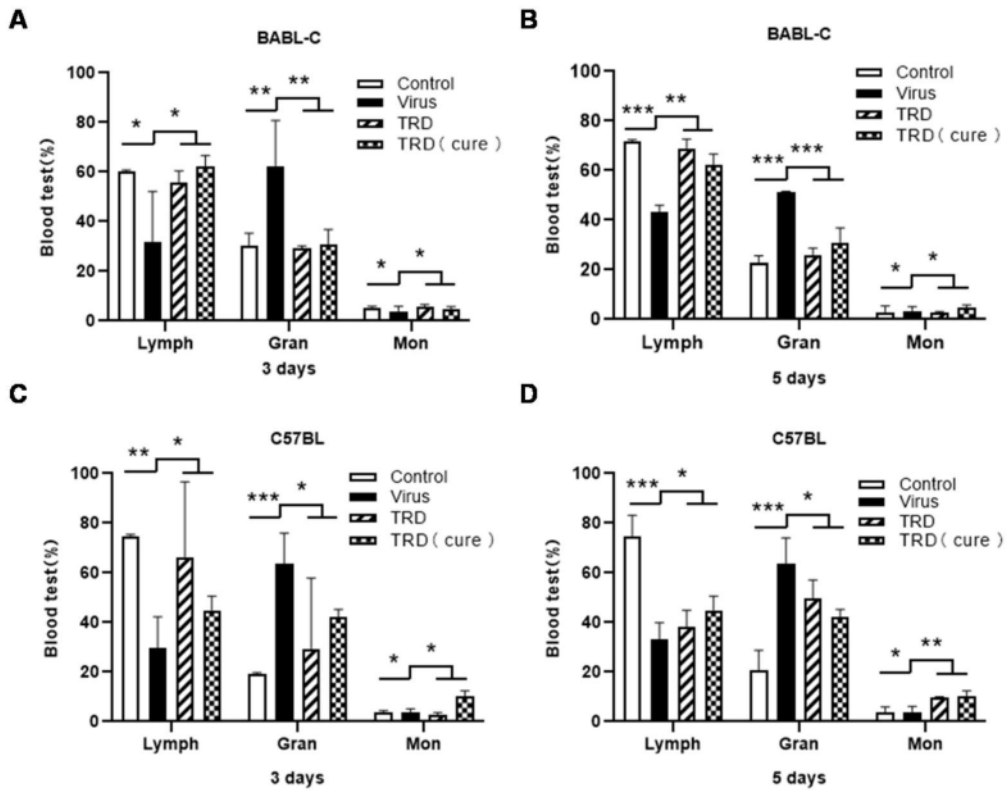


图16

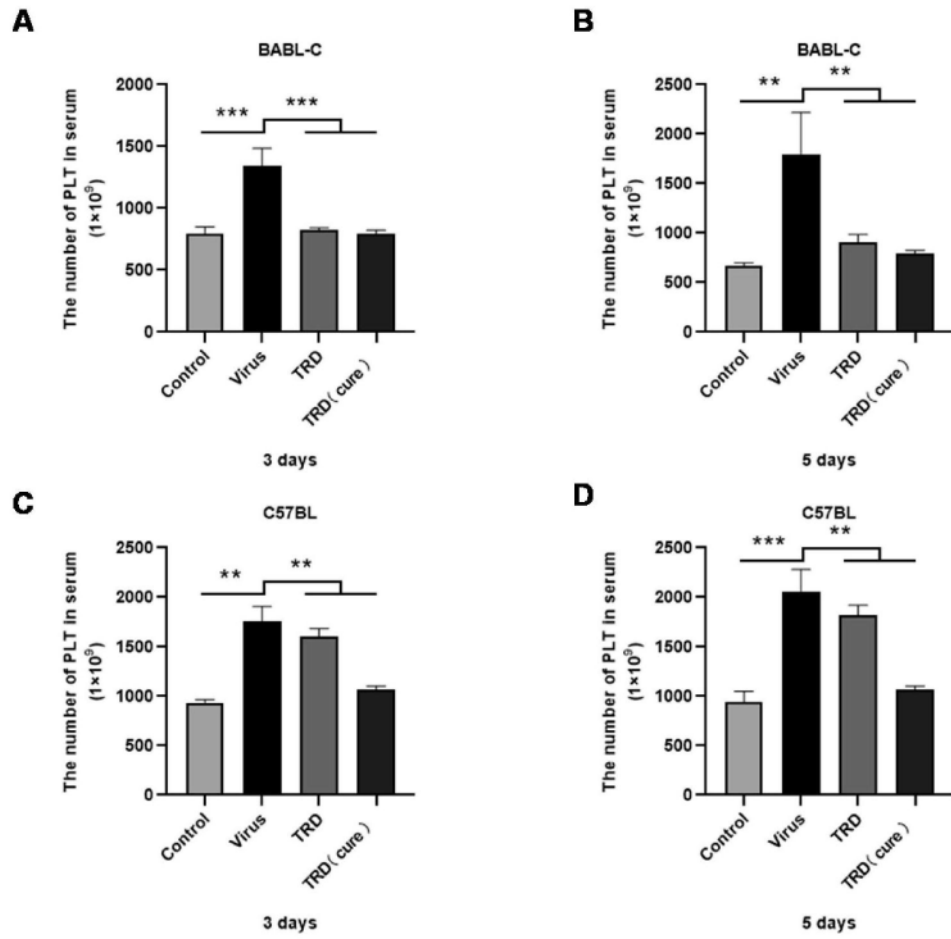


图17

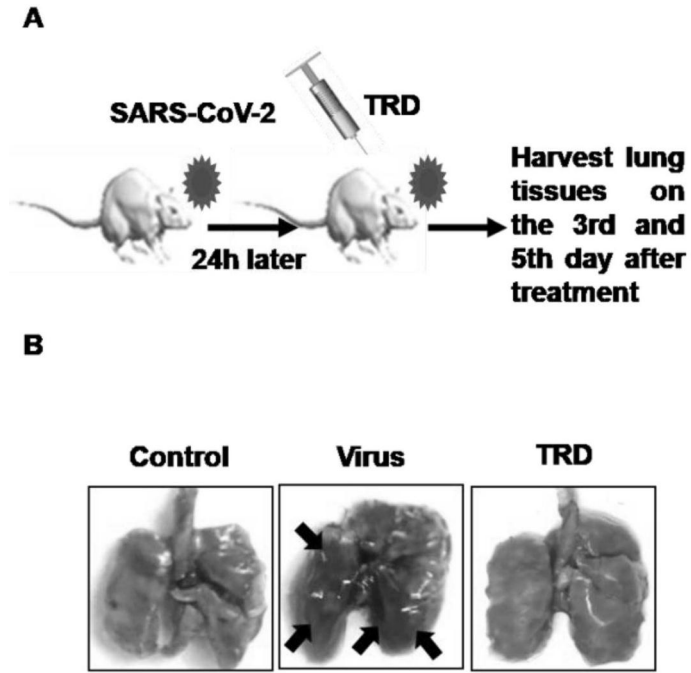


图18

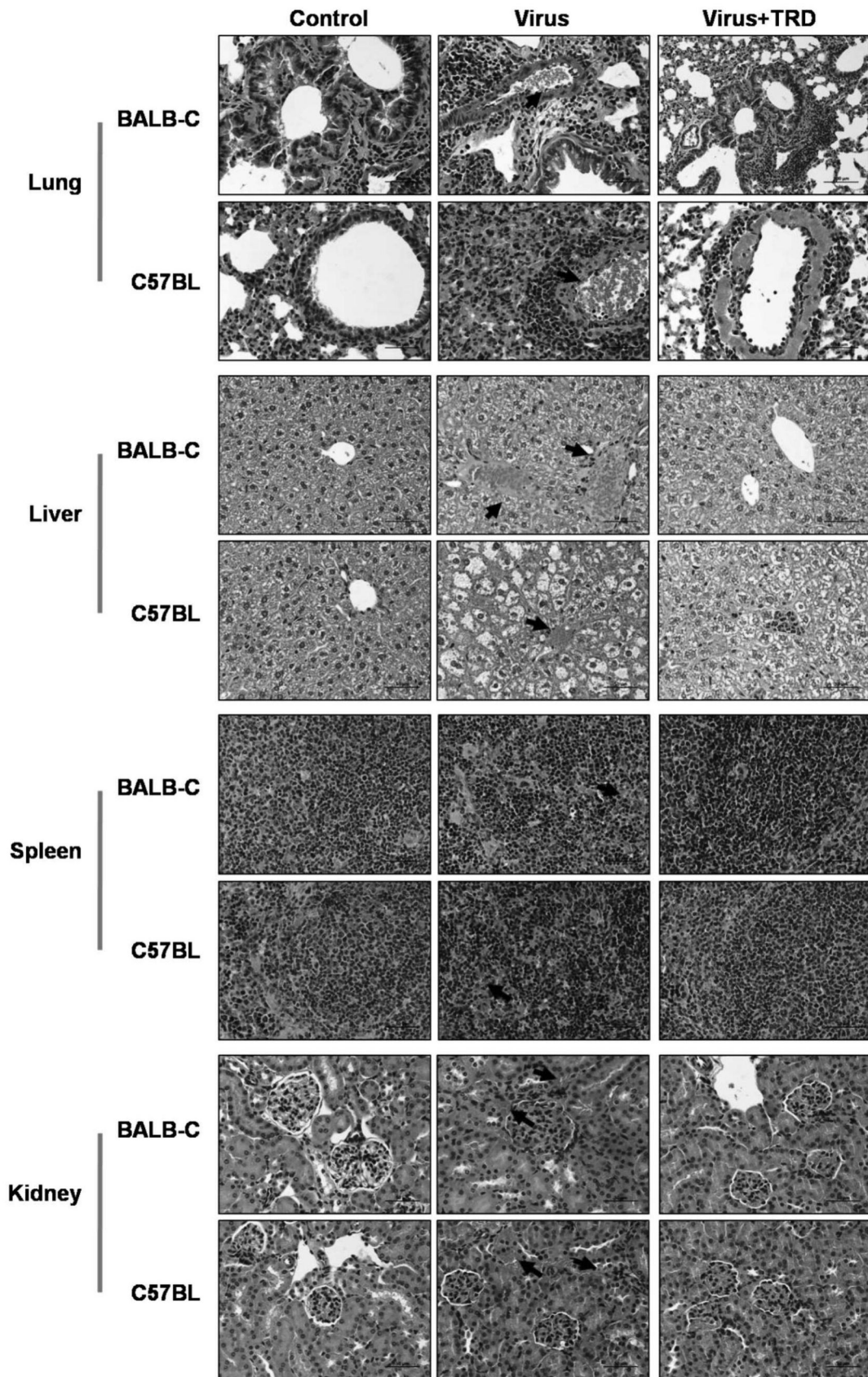


图19

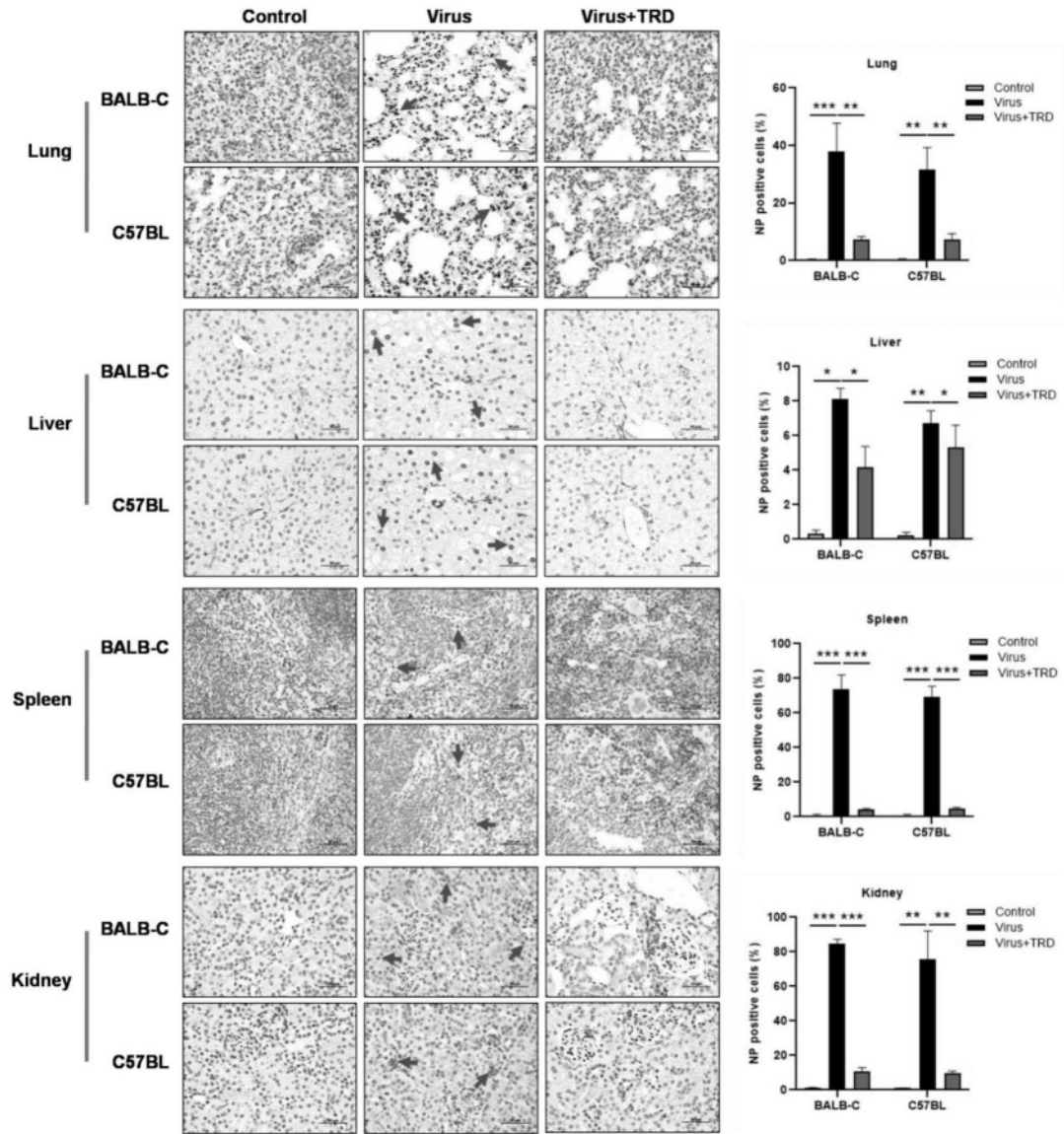


图20