



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111886008 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 31

(21) 申请号 201880080271.9
 (22) 申请日 2018.10.16
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111886008 A
 (43) 申请公布日 2020.11.03
 (30) 优先权数据
 62/573,933 2017.10.18 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.06.12
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2018/056138 2018.10.16
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/079339 EN 2019.04.25
 (73) 专利权人 港大科桥有限公司
 地址 中国香港数码港道100号数码港第4期
 405A室
 (72) 发明人 袁硕峰 陈福和 朱轩 刘耀南
 袁国勇
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
 司 72001
 专利代理师 黄希贵

(51) Int.Cl.
 A61K 31/195 (2006.01)
 A61K 31/07 (2006.01)
 A61K 31/192 (2006.01)
 A61K 45/06 (2006.01)
 A61P 31/12 (2006.01)
 (56) 对比文件
 US 2006151574 A1,2006.07.13
 US 2017007672 A1,2017.01.12
 WO 2014079709 A1,2014.05.30
 WO 2005120479 A1,2005.12.22
 Harry D Dawson et.al..The Retinoic Acid Receptor- α mediates human T-cell activation and Th2 cytokine and chemokine production.《BMC Immunology》.2008,第9卷(第16期),1-14.
 Bao Ngoc Nguyen等.Retinoid derivative Tp80 exhibits anti-hepatitis C virus activity through restoration of GI-GPx expression.《Journal of Medical Virology》.2017,第89卷(第7期),第1-29页.

审查员 尹瑶菲

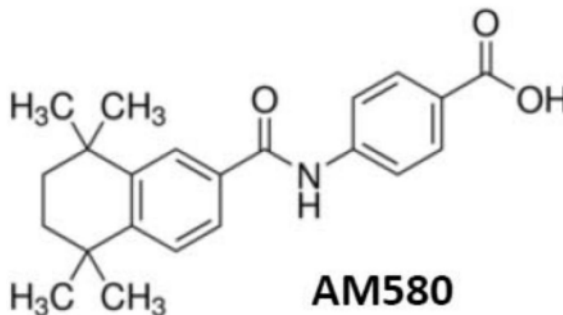
权利要求书1页 说明书26页
序列表1页 附图45页

(54) 发明名称

用于抗MERS-冠状病毒治疗的组合物和方法

(57) 摘要

已经发现AM580和结构相关的化合物可用于治疗广泛范围的RNA和DNA病毒的感染,并且还可用于减轻相关的炎症。这种活性与RAR- α 信号传导无关,并且不是宿主固有免疫反应激活的结果。AM580和结构相关的化合物的广泛的抗病毒活性是由于脂肪生成的调节,以经由抑制nSREBP来纠正病毒感染的细胞中该途径的失调。



1. 化合物在用于制备治疗MERS-冠状病毒感染的药物中的用途,所述化合物是AM580。

用于抗MERS-冠状病毒治疗的组合物和方法

[0001] 本申请要求2017年10月18日提交的美国临时申请号62/573933的权益。这些和所有其他参考的外部材料通过引用以其全部并入本文。当通过引用并入的参考文献中的术语的定义或使用与本文提供的该术语的定义不一致或相反时,以本文提供的该术语的定义为准。

技术领域

[0002] 本发明的领域是抗病毒治疗,特别是使用小分子的抗病毒治疗。

背景技术

[0003] 背景说明包括可用于理解本发明的信息。不承认本文提供的任何信息是现有技术或与当前要求保护的发明有关,或明确或隐含引用的任何出版物均为现有技术。

[0004] 严重急性呼吸综合征(SARS)、大流行性甲型流感(H1N1)、中东呼吸综合征(MERS)、西部/东部马脑炎(WEE/EEE)、埃博拉以及寨卡病毒(ZIKV)等的流行性病毒疾病分别发生在2003年、2009年、2012年、2013年、2014年和2016年。这些传染病是致命的和可传播的。这些病毒的高毒力和缺乏有效的治疗对全球公共卫生构成了持续的威胁。常规的“一虫一药”范式——其中开发特定药物以靶向特定病毒——不足以应对新出现的和重新出现的病毒病原体的挑战[1]。本文中的所有出版物通过引用并入,其程度与每个单独出版物或专利申请被明确且单独地指示通过引用并入的程度相同。当在并入的参考文献中术语的定义或使用与本文提供的术语的定义不一致或相反时,适用本文提供的该术语的定义,而参考文献中该术语的定义不适用。必须开发一种广谱的抗病毒药物,以有效控制具有新型潜在病原体的流行性病毒性疾病。这种交叉保护性抗病毒药物能够在无法迅速诊断的病毒综合征患者中快速使用,从而将潜在的流行病或大流行的风险最小化[2]。

[0005] 开发广谱抗病毒剂的当前策略主要集中在两个方面,针对病毒感染性和调节宿主的防御系统。降低病毒感染性的成功候选药物是可用的,其包括病毒附着和融合的阻滞剂[3,4],以及病毒聚合酶活性的抑制剂[5]。然而,由于耐药性的演变,对病毒成分的特异性限制了这种药物的长期应用[6]。可选地,I型干扰素(IFN)和IFN诱导的蛋白触发细胞防御机制来抑制病毒复制。细胞蛋白抑制剂和相关的途径调节剂干预病毒的生命周期,以抑制复制适应性[7,8]。尽管如此,药物对宿主的毒性和产生抗药性病毒后代的挑战仍有待解决。利巴韦林目前是唯—获得FDA批准的用于广谱抗病毒治疗的药物。然而,许多缺陷(比如不利的药代动力学和狭窄的治疗窗口)限制了其在临床环境中的广泛应用[9]。

[0006] 病毒是必需的细胞内寄生虫。病毒诱导的脂质代谢重编程可以极大地影响感染结果,表明靶向这些过程进行广谱抗病毒开发的潜力[10,11]。脂质长期以来一直是病毒和细胞膜的结构元素。动物病毒必须越过宿主边界才能进入和离开细胞。在包膜病毒中,这是通过将传入病毒与新病毒融合并通过细胞膜萌芽而发生的。在非包膜病毒中,病毒进入需要细胞(主要是内体)膜的短暂干扰才能将病毒基因组转移到细胞质中[12]。病毒在细胞内诱导细胞质膜结构和区室,在其中发生基因组复制和组装。最近,脂质作为真核生物中的关键

信号分子出现,在细胞内和细胞间传递信息[13]。

[0007] 因此,仍然需要有效地治疗宽范围的病毒的安全有效的化合物。

发明内容

[0008] 本发明主题提供了一种设备、系统和方法,其中---

[0009] 通过对优选实施方式的以下详细描述以及附图,本发明主题的各种目的、特征、方面和优点将变得更加显而易见,在附图中,相同的数字表示相同的组件。

附图说明

[0010] 图1:AM580的结构。

[0011] 图2:他米巴罗汀的结构。

[0012] 图3:图3描绘了AM580作为抗病毒物质的研究结果。显示了用于筛选MERS-CoV抑制剂和甲型流感(H1N1)pdm09病毒抑制剂的MOI条件和时间点的优化。Favipiravir (50 μ g/ml)和Remdesivir (5 μ M) 用作阳性对照。通过模拟感染细胞的细胞生存力将结果归一化。

[0013] 图4:图4描绘了热图,其显示了针对抗MERS-CoV和/或抗流感病毒候选物的文库筛选。将Huh7细胞感染MERS-CoV (0.1MOI),将MDCK细胞感染甲型流感(H1N1)病毒(0.01MOI),然后在感染后立即用生物活性脂质化合物(10 μ M)或DMSO载体处理。细胞活力分别在24hpi(对于MERS-CoV)和48hpi(对于流感病毒)确定。通过将DMSO对照设置为0并将模拟感染设置为1来进行归一化。显示了三个独立筛选的平均值。

[0014] 图5:图5显示了如图4中所鉴定的抗MERS-CoV抑制剂。

[0015] 图6:图6显示了如图5中所鉴定的抗流感病毒抑制剂。

[0016] 图7:图7显示了使用多周期MERS-CoV生长测定表征AM580的抗MERS-CoV活性的研究结果。Huh7细胞用0.001MOI的MERS-CoV感染,在病毒感染("hpi")后1小时,用DMEM培养基中的20 μ M的AM580代替接种物。如所指示,通过噬菌斑测定在不同时间点定量细胞培养上清液中的病毒滴度。

[0017] 图8:图8显示了表征AM580的抗MERS-CoV活性的免疫印迹研究的结果。蛋白质印迹显示AM580处理后MERS-CoV NP产生减少。在感染1MOI病毒后的所指示的时间点收集Huh7细胞裂解液。检测到 β -肌动蛋白作为内部对照和细胞生存力的指示。

[0018] 图9:图9显示了表征AM580的抗MERS-CoV活性的流式细胞术研究的结果。用流式细胞术检测MERS-CoV-NP阳性细胞。Huh7细胞感染了0.01MOI的MERS-CoV。在用AM580或DMSO温育24小时后,将对照细胞分离、固定、透性化并用抗MERS-CoV-NP抗体染色以进行流式细胞术。显示了典型实验的结果。

[0019] 图10:图10显示了表征AM580的抗MERS-CoV活性的免疫细胞化学研究的结果。Huh7细胞的免疫荧光染色代表MERS-CoV-NP抗原(绿色)和细胞核(蓝色)。

[0020] 图11:图11显示了表征AM580的抗MERS-CoV活性的病毒复制研究的结果。如在24hpi在A549 (0.1MOI)、Calu-3 (0.1MOI)和Vero (0.01MOI)细胞的细胞培养上清液中所检测,AM580减少了MERS-CoV复制。

[0021] 图12:图12显示了表征AM580的抗MERS-CoV活性的病毒复制研究的结果。如在24hpi在单核细胞衍生的巨噬细胞(MDM, 1MOI)和THP-1 (0.1MOI)细胞的细胞裂解液中所检

测,AM580减少了MERS-CoV复制。

[0022] 图13:图13显示了经AM580或未经AM580处理的MERS-CoV感染的细胞的基因表达分析的结果。AM580降低了Huh7细胞和单核细胞衍生的巨噬细胞(MDM)中MERS-CoV诱导的促炎症细胞因子上调,显示了TNF- α 、IL-1 β 和IL-8的代表性细胞因子标志物。使用Student t检验对MERS-CoV和AM580组处理的MERS-CoV之间的差异进行统计学分析。误差棒代表标准偏差。 $*p<0.05$ 。

[0023] 图14:图14显示了AM580的抗病毒活性和细胞毒性研究的结果。AM580类似物的结构活性分析。上图显示了不同浓度(20、5、1.25和0 μ M)下单个化合物的抗病毒效力,下图分别是其化学结构和生物学功能的概述。

[0024] 图15:图15显示了AM580和针对MERS-CoV感染的IC₅₀<1 μ M的选择类似物的化学结构。

[0025] 图16:图16显示了类器官中AM580的抗MERS-CoV活性的研究结果。AM580在人肠类器官(肠样物质(intestinoid))中显示了抗MERS-CoV活性。将分化的肠样物质一式三份接种MERS-CoV(MOI \approx 0.1),然后重新嵌入在基质胶(Matrigel)中并保持在培养基中。在所指示的hpi下,收获肠样物质、无细胞基质胶和培养基以定量病毒产量。将溶解的基质胶和培养基应用于用噬菌斑测定法进行的病毒滴定。

[0026] 图17:图17显示了类器官中AM580的抗MERS-CoV活性的研究结果。AM580在人肠类器官(肠样物质)中显示了抗MERS-CoV活性。将分化的肠样物质一式三份接种MERS-CoV(MOI \approx 0.1),然后重新嵌入在基质胶中并保持在培养基中。在所指示的hpi下,收获肠样物质、无细胞基质胶和培养基以定量病毒产量。通过RT-qPCR定量肠样物质中的绝对病毒载量,并用GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)mRNA转录本进行归一化。

[0027] 图18:图18显示了类器官中AM580的抗MERS-CoV活性的研究结果。AM580在人肠类器官(肠样物质)中显示了抗MERS-CoV活性。将分化的肠样物质一式三份接种MERS-CoV(MOI \approx 0.1),然后重新嵌入在基质胶中并保持在培养基中。在所指示的hpi下,收获肠样物质、无细胞基质胶和培养基以定量病毒产量。在24hpi下,在对MERS-CoV NP、DAPI和鬼笔环肽(Phalloidin)进行固定和免疫荧光染色后,将AM580(20 μ M)或DMSO(0.1%)处理的肠样物质进行整体安装,并用共聚焦显微镜进行3D成像。

[0028] 图19:图19显示了肺组织中AM580的抗MERS-CoV的免疫细胞化学研究的结果,并对(MERS-CoV)感染的离体肺组织进行了MERS-CoV NP的免疫荧光染色(绿色)。正常肺组织以每毫升1 \times 10⁸PFU的MERS-CoV感染,或在37 $^{\circ}$ C下经历模拟感染1小时。感染后总共18小时,将组织固定、冷冻保护并冷冻切片。对载玻片进行顺序染色,并用Carl Zeiss LSM 800显微镜捕获共聚焦图像。在末端细支气管的上皮细胞(DMSO组)中检测到对NP的免疫反应性。AM580(20 μ M)处理可大大降低MERS-CoV-NP抗原表达。

[0029] 图20:图20显示了在动物模型中AM580的抗MERS-CoV活性的研究结果。在用50PFU的MERS-CoV攻击后,将DDP4转基因小鼠(18只/组)用AM580或0.1%DMSO(安慰剂对照)治疗2天。通过腹膜内途径注射药物。监测小鼠的存活和疾病信号持续14天或直至小鼠死亡。使用Log-rank(Mantel-Cox)检验比较和分析治疗组和对照组之间的生存率差异,** $p<0.01$ 。

[0030] 图21:图21显示了在动物模型中AM580的抗MERS-CoV活性的研究结果。AM580抗MERS-CoV活性的表征。存活小鼠的每日体重变化。

[0031] 图22:图22显示了在动物模型中AM580的抗MERS-CoV活性的研究结果。在感染后的第2天和第4天,对每组的四只小鼠实施安乐死,并收集肺用于使用RT-qPCR检测病毒载量。结果表示为平均值+SD。** $p < 0.01$,使用Student t检验与DMSO治疗组比较。

[0032] 图23:图23显示了在动物模型中AM580的抗MERS-CoV活性的研究结果。感染后第2天和第4天收集的小鼠肺组织的组织病理学变化。显示的是苏木精和曙红(H&E)染色的所指示的组的肺组织的代表性组织切片。

[0033] 图24:图24总结了AM580的广谱抗病毒活性。AM580对所指示的病毒表现出广谱抗病毒作用。进行噬菌斑减少测定以评估AM580在MERS-CoV和SARS-CoV(Vero-E6细胞)、ZIKV(Vero细胞)、甲型H1N1流感病毒(MDCK细胞)和EV71(RD细胞)中的抗病毒活性。*对AdV5(Hep-2细胞)进行了病毒载量降低测定。显示的是相对于在不存在化合物的对照的所指示浓度的PFU或病毒载量(%)。

[0034] 图25:图25显示了AM580的抗病毒活性和细胞毒性研究的结果。通过噬菌斑减少测定法确定AM580对不同病毒的 IC_{50} ,但AdV5除外(使用病毒载量减少测定法进行评估)。

[0035] 图26:图26显示了AM580的抗病毒活性和细胞毒性研究的结果。通过分别评估细胞NAD(P)H依赖性细胞氧化还原酶(MTT测定)或ATP活性(CellTiter-Glo测定)来确定不同细胞系中AM580的 CC_{50} 。

[0036] 图27:图27显示了AM580的抗病毒活性和细胞毒性研究的结果。显示了针对不同病毒的AM580抗病毒治疗的选择性指数(CC_{50}/IC_{50})。

[0037] 图28:图28显示了表征动物模型中AM580的广谱抗病毒活性的研究结果。在用100PFU的甲型流感病毒(H7N9)攻击后,将Ba1b/c小鼠(18只/组)用AM580、扎那米韦或0.1% DMSO治疗3天。麻醉后通过鼻内途径递送药物。显示了生存率。在感染后第3天和第6天收获小鼠组织样品。

[0038] 图29:图29显示了表征动物模型中AM580的广谱抗病毒活性的研究结果。在用100PFU的甲型流感病毒(H7N9)攻击后,将Ba1b/c小鼠(18只/组)用AM580、扎那米韦或0.1% DMSO治疗3天。麻醉后通过鼻内途径递送药物。显示了体重变化。在感染后第3天和第6天收获小鼠组织样品。

[0039] 图30:图30显示了表征动物模型中AM580的广谱抗病毒活性的研究结果。在用100PFU的甲型流感病毒(H7N9)攻击后,将Ba1b/c小鼠(18只/组)用AM580、扎那米韦或0.1% DMSO治疗3天。麻醉后通过鼻内途径递送药物。显示了肺组织的病毒载量。在感染后第3天和第6天收获小鼠组织样品。

[0040] 图31:图31显示了表征动物模型中AM580的广谱抗病毒活性的研究结果。在用100PFU的甲型流感病毒(H7N9)攻击后,将Ba1b/c小鼠(18只/组)用AM580、扎那米韦或0.1% DMSO治疗3天。麻醉后通过鼻内途径递送药物。显示了H&E组织病理学染色分析的结果。在感染后第3天和第6天收获小鼠组织样品。

[0041] 图32:图32显示了AM580对RAR- α 信号传导或先天抗病毒反应的影响的研究结果。将Huh7细胞用RAR- α 靶向的siRNA转染24h,然后再进行MERS-CoV感染(0.01MOI)另外的24h。显示了细胞培养上清液中的病毒载量。使用 β -肌动蛋白作为内部对照,通过蛋白质印迹法检测了siRNA敲低(KD)的效率。比较了野生型(模拟)和预处理(siRNA敲低或外源基因过表达)之间的差异。

[0042] 图33:图33显示了AM580对RAR- α 信号传导或先天抗病毒反应的影响的研究结果。将Huh7细胞用RAR- α 过表达质粒转染24h,然后再进行MERS-CoV感染(0.01MOI)另外的24h。显示了细胞培养上清液中的病毒载量。使用 β -肌动蛋白作为内部对照,通过蛋白质印迹法检测了RAR- α 的过表达(OE)。比较了野生型(模拟)和预处理(siRNA敲低或外源基因过表达)之间的差异。

[0043] 图34:图34显示了AM580对RAR- α 信号或先天抗病毒反应的影响的研究结果。RAR- α 拮抗剂和AM580的组合使用的研究结果并未降低抗病毒活性。

[0044] 图35:图35显示了AM580对RAR- α 信号传导或先天抗病毒反应的影响的研究结果。携带编码荧光素酶标记的报告构建体的基因的基因修饰的细胞的荧光素酶测定的结果显示,AM580不会抑制启动子(比如TK、CMV和SV40)的反式激活。

[0045] 图36:图36显示了AM580对RAR- α 信号传导或先天抗病毒反应的影响的研究结果。如所指示,进行双荧光素酶测定以评估报告基因的表达。将IFN- β (100单位/ml)作为用于测量IFN- β -Luc和ISRE-Luc活性的阳性对照。在荧光素酶测定中,AM580(20 μ M)和DMSO(0.5%)的浓度一致。结果表示为两个独立实验的平均值+SD。

[0046] 图37:图37显示了AM580对RAR- α 信号传导或先天抗病毒反应的影响的研究结果。AM580在WT和带有MERS-CoV感染的RIG-1缺陷的A549细胞中均表现出类似的抗病毒活性模式。

[0047] 图38:图38显示了AM580对MERS-CoV进入和内化的影响的研究结果。将Huh7细胞用AM580(20 μ M)和MERS-CoV(2MOI)的混合物处理2h,然后进行强力洗涤、从培养板中解离、并进行MERS-CoV-NP阳性细胞的流式细胞术分析。

[0048] 图39:图39显示了AM580对SREBP依赖性脂质生物合成的影响的研究结果。AM580处理后对MERS感染的细胞的脂质组学分析。显示的是基于所鉴定的脂质列表的层次聚类分析。每个条代表通过其平均强度在从蓝色(降低的水平)到红色(升高的水平)的归一化范围上着色的脂质。基于脂质强度构建顶部的树状图。

[0049] 图40:图40显示了如图39所示的LysoPE(18:0/0:0)代谢物的峰高。通过单因素方差分析试验(one-way ANOVA test)分析组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0050] 图41:图41显示了如图39所示的LysoPE(16:0/0:0)代谢物的峰高。通过单因素方差分析测试分析了组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0051] 图42:图42显示了如图39所示的LysoPE(16:1/0:0)代谢物的峰高。通过单因素方差分析测试分析了组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0052] 图43:图43显示了如图39所示的LysoPE(18:1/0:0)代谢物的峰高。通过单因素方差分析测试分析了组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0053] 图44:图44显示了如图39所示的PE(P-18:0/0:0)代谢物的峰高。通过单因素方差分析测试分析了组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0054] 图45:图45显示了如图39所示的Lyso-PC(0:0/16:1)代谢物的峰高。通过单因素方差分析测试分析了组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0055] 图46:图46显示了如图39所示的Lyso-PC(16:1/0:0)代谢物的峰高。通过单因素方差分析测试分析了组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0056] 图47:图47显示了如图39所示的PC(18:1/20:1)代谢物的峰高。通过单因素方差分

析测试分析了组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0057] 图48:图48显示了如图39所示的PC (20:1/18:3) 代谢物的峰高。通过单因素方差分析测试分析了组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0058] 图49:图49显示了如图39所示的PE (38:4) 代谢物的峰高。通过单因素方差分析测试分析了组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0059] 图50:图51显示了如图39所示的PE (38:5) 代谢物的峰高。通过单因素方差分析测试分析了组之间的差异。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0060] 图51:图51显示了AM580对SREBP依赖性脂质生物合成的影响的研究结果。AM580降低了细胞脂滴(LD)的水平。在0.1%DMSO或20 μ M的AM580的存在下,将Huh7细胞以0.01MOI的MERS-CoV感染24小时,或进行模拟感染。固定细胞并用DAPI和BODIPY 493/503染色。

[0061] 图52:图52显示了AM580对SREBP依赖性脂质生物合成的影响的研究结果。AM580降低细胞胆固醇水平。将Huh7细胞固定,并用与游离胆固醇特异性结合的非林(蓝色)染色。

[0062] 图53:图53显示了经AM580处理或未经AM580处理的MERS-CoV感染的细胞的基因表达分析的结果。通过RT-qPCR分析脂肪酸合成途径中多个基因的表达。使用Student t检验对MERS-CoV组和AM580处理的MERS-CoV组之间的差异进行统计学分析。误差棒代表标准偏差。* $p < 0.05$ 。

[0063] 图54:图54显示了经AM580处理的或未经AM580处理的MERS-CoV感染的细胞的基因表达分析的结果。通过RT-qPCR分析胆固醇合成途径中多个基因的表达。使用Student t检验对MERS-CoV组和AM580处理的MERS-CoV组之间的差异进行统计学分析。误差棒代表标准偏差。* $p < 0.05$ 。

[0064] 图55:图55显示了siRNA敲低对病毒复制的影响的研究结果。SREBP1或2的siRNA敲低减少了MERS-CoV复制。将Huh7细胞连续两天用75nM SREBP1、SREBP2或加扰(scramble)对照siRNA转染。使用蛋白质印迹评估敲低效率。用MERS-CoV以0.01MOI感染siRNA处理的细胞。24hpi后,用qPCR分析评估细胞培养上清液中的病毒载量。与对照siRNA处理组相比,* $p < 0.05$ 。

[0065] 图56:图56显示了AM580与n-SREBP过度诱导病毒复制组合的结果。在AM580存在下,内源性n-SREBP1或2的过度诱导减少了MERS-CoV复制。通过在含有5%LPDS和10 μ M美伐他汀的培养基中温育16h,即,饥饿,使Huh7细胞中的固醇减少。在分别通过蛋白质印迹检测n-SREBP1和n-SREBP2之前,收获细胞并裂解以制备核部分。将饥饿的细胞用MERS-CoV以指示的MOI感染,并用AM580(10 μ M)处理24小时。用qPCR分析定量细胞培养上清液中的病毒载量。使用Student t检验分析经饥饿处理或未经饥饿处理的组之间的差异。

[0066] 图57:图57显示了n-SREBP处理的抑制剂对病毒复制的影响的研究结果。n-SREBP处理的抑制剂PF 429242和桦木醇显示了抗MERS-CoV活性。将Huh7细胞感染MERS-CoV,并用具有指示浓度的化合物处理。24小时后,与0 μ M组相比,通过qPCR分析上清液中的病毒载量,* $p < 0.05$ 。

[0067] 图58:图58显示了AM580对n-SREBP与SRE结合的影响。AM580阻止了n-SREBP1和SRE结合。含有SRE的SREBP1特异性双链DNA(dsDNA)序列固定在96孔板的孔中。将Huh7核提取物与阳性对照竞争物dsDNA、白蛋白(50 μ M)或AM580(20 μ M)一起添加。根据制造商的方案检测到结合的SREBP-1。*指示与没有药物输入的模拟对照组相比,* $p < 0.05$ 。

[0068] 图59:图59显示了AM580对n-SREBP与SRE结合的影响。SREBP2 DNA结合活性测定表明,AM580以剂量依赖性方式抑制SRE和SREBP2结合。

[0069] 图60:图60显示了AM580对n-SREBP与SRE结合的影响。将指示浓度的AM580与固定有SRE的孔一起温育2小时,在加入核提取物之前进行彻底洗涤。可选地,将AM580与等量的核提取物一起预温育2小时,然后添加到检测孔中。发现AM580与n-SREBP1结合,而不是与SRE结合。

[0070] 图61:图61显示了AM580的分子对接研究的结果。预计AM580会占据SREBP1和2二者的SRE识别位点。显示的是3D分子对接分析。SREBP上的潜在相互作用表面为红色,而AM580以棒和网格表示显示。下图:人和小鼠SREBP1和2的DNA结合部分的部分序列比对。Tyr335其为AM580结合的关键残基,用方框突出显示,并且显示为被完全保留。

[0071] 图62:图62显示了AM580的分子对接研究的结果。对接分析预测了与AM580相互作用的SREBP1的关键氨基酸残基。

[0072] 图63:图63显示了AM580结合上的n-SREBP1突变的结果。将截短的n-SREBP1(WT)及其突变质粒构建体Y335R转染到HEK293T细胞中48h,然后进行核提取并测量DNA结合强度。通过Student t检验分析了WT和Y335R之间的差异。 $*p < 0.05$ 。发现Tyr335对于n-SREBP1结合活性至关重要。

[0073] 图64:图64显示了AM580类似物的抗病毒活性的研究结果。化学修饰的化合物AM580——叠氮-AM580,在MERS-CoV感染的Vero和Huh7细胞中显示出类似的抗病毒效力。

[0074] 图65:图65显示了用AM580类似物处理的细胞的荧光成像的结果。将Huh7细胞用叠氮-AM580(20 μ M)处理6小时,固定,透性化并用DyLightTM488-磷、DAPI和鬼笔环肽进行免疫荧光染色以进行共聚焦成像。由于缺少磷特异性叠氮基团,因此将AM580用作对照。

[0075] 图66:图66显示了AM580衍生的光亲和探针(AM580dp)的结构,其显示了具有特定功能的指定基团的定位。通过叠氮-PEG5-胺和AM580之间的反应获得叠氮-AM580。通过添加三官能交联剂2-[N2-[N α -苯甲酰基苯甲酰氨基-N6-6-生物素酰胺基乙酰]赖氨酸}乙基-2'-(N-磺基琥珀酰亚胺基羧基)乙基二硫化钠盐(Santacruz)与4-[2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基]-2-二苯基磷基苯甲酸甲酯反应然后与叠氮-AM580反应来合成AM580dp。

[0076] 图67显示了使用如图66所显示的AM580类似物进行的亲和力结合研究的结果。将AM580dp固定在链霉亲和素微球上,并与用WT或Y335R构建体转染的细胞裂解液一起温育。在紫外暴露以激活交联(点击化学)后,AM580dp结合的蛋白复合物被其生物素标签拉下。采用蛋白质印迹法以使用抗标志物和n-SREBP1特异性抗体检测n-SREBP1,而RAR- α 作为下拉分子中的阳性对照蛋白,而叠氮-AM580用作阴性对照以排除非特异性结合。

[0077] 图68:图68显示了AM580处理后的转录激活的研究结果。通过携带HMGCS-启动子-Luc和FAS-启动子-Luc报告构建体并暴露于该药物的细胞中萤光素酶活性的丧失显示了AM580对HMGCS和FAS转录激活的抑制作用。

[0078] 图69:图69描绘了显示了n-SREBP加工——下游途径所报道的受影响的病毒科以及用于研究AM580对脂肪生成酶的影响的,对照抑制剂的示意图。

[0079] 图70:图70显示了AM580处理对脂肪生成和病毒复制的影响的研究结果。在不存在补充的外源性棕榈酸酯的情况下(白色条)或在存在补充的外源性棕榈酸酯(100 μ M)(灰色

条)的情况下,用DMSO(0.1%)或C75(10 μ M)或AM580(20 μ M)处理感染了MERS-CoV(0.01MOI)的Huh7细胞。显示了在24hpi的病毒产量。组间差异通过单因素方差分析试验进行分析。发现外源性棕榈酸酯可在经历AM580处理的细胞中拯救MERS-CoV复制。

[0080] 图71:图71显示了AM580处理对脂肪生成和病毒复制的影响的研究结果。在不存在补充的外源性棕榈酸酯的情况下(白色条)或在存在补充的外源性棕榈酸酯(100 μ M)的情况下(红色条),用DMSO(0.1%)或C75(10 μ M)或AM580(20 μ M)处理感染了甲型流感(H1N1)(0.001MOI)的MDCK细胞。显示了在24hpi的病毒产量。组间差异通过单因素方差分析试验进行分析。外源性棕榈酸酯拯救了经历AM580处理的细胞中的甲型流感(H1N1)病毒复制。

[0081] 图72:图72显示了AM580处理对脂肪生成和病毒复制的影响的研究结果。在不存在补充的外源性棕榈酸酯的情况下(白色条)或在存在补充的外源性棕榈酸酯(100 μ M)(蓝色条)的情况下,用DMSO(0.1%)或C75(10 μ M)或AM580(20 μ M)处理感染了EVA-71(0.001MOI)的RD细胞。显示了在24hpi的病毒产量。组间差异通过单因素方差分析试验进行分析。外源性棕榈酸酯拯救了经历AM580处理的细胞中EVA-71病毒的复制。

[0082] 图73:图73显示了AM580处理对脂肪生成和病毒复制的影响的研究结果。在不存在补充的外源性棕榈酸酯的情况下(白色条)或在存在补充的外源性棕榈酸酯(100 μ M)(灰色条)的情况下,用DMSO(0.1%)或C75(10 μ M)或AM580(20 μ M)处理感染了人类AdV5(0.1MOI)的HEp-2细胞。显示了在24hpi的病毒产量。组间差异通过单因素方差分析试验进行分析。外源性棕榈酸酯拯救了经历AM580处理的细胞中人AdV5病毒的复制。

[0083] 图74:图74显示了AM580处理对形成双膜囊泡(“DMV”)的结果。用MERS-CoV感染Vero细胞,并在存在或不存在AM580的情况下温育18小时。用戊二醛固定细胞团块,并进行电子显微镜观察。未经处理的病毒感染的细胞显示出DMV的核周簇(红色框),并且在AM580处理(20 μ M)时缺乏DMV产生。所显示的每个代表性图像均选自两个独立实验中捕获的超过30个图像的库。AM580抑制了DMV的形成。

[0084] 图75:图75显示了AM580处理对棕榈酰化的影响的研究结果。A549细胞用来自甲型(H1N1)流感病毒的HA质粒转染。转染后5小时进行DMSO(0.1%)或5 μ M 2-BP(阳性对照抑制剂)或20 μ M AM580的药物处理,而24小时后收获细胞裂解液。使用蛋白质印迹法分析不同组的总HA(输入)和棕榈酰化的HA。将 β -肌动蛋白作为内部对照。AM580减少了病毒蛋白棕榈酰化。

[0085] 图76:图76显示了2-BP对病毒复制的影响的研究结果。用0.001MOI的甲型(H1N1)流感病毒感染MDCK细胞,并用指示的无毒浓度的化合物处理。在24hpi后,通过标准噬菌斑测定分析上清液中的病毒滴度。2-BP减少了甲型(H1N1)流感病毒的复制。2-BP还减少了Huh7细胞中的MERS-CoV复制。与0 μ M组相比,**p<0.01。所有数据代表两个独立实验的平均值和标准偏差。

具体实施方式

[0086] 以下描述包括可用于理解本发明的信息。不承认本文提供的任何信息是现有技术或与当前要求保护的发明有关,或明确或隐含引用的任何出版物均为现有技术。

[0087] 本发明的主题提供了装置、系统和方法,其中干扰脂肪生成的小分子被用于在体外和体内提供广谱抗病毒活性。发明人已经发现,调节细胞脂质代谢以干扰病毒繁殖可以

提供广谱抗病毒治疗途径。不希望受到理论的束缚,发明人认为对脂肪生成和/或脂质代谢的扰动可以减小和/或降低病毒适应性。生物活性脂质库的药理筛选可以识别潜在的抗病毒抑制剂。例如,发现AM580(已知为类视黄醇衍生物,见图1)在体外和体内提供有效和广谱的抗病毒活性。结构活性分析进一步鉴定了他米巴罗汀(图2)(AM580的类似物)是有效的MERS-CoV复制抑制剂。这种化合物可以与调节脂质代谢的其他化合物和/或抗病毒化合物结合使用。

[0088] 通过以下对优选实施方式的详细描述,本发明主题的各种目的、特征、方面和优势将变得更加显而易见。以下讨论提供了本发明主题的许多实例实施方式。虽然每个实施方式代表发明要素的单个组合,但是发明主题被认为包括所公开要素的所有可能的组合。因而,如果一个实施方式包括要素A、B和C,而第二实施方式包括要素B和D,那么即使没有明确地公开,本发明主题也被认为包括A、B、C或D的其他剩余组合。

[0089] 在一些实施方式中,用于描述和要求保护本发明的某些实施方式的表示成分的数量、性质比如浓度、反应条件等的数字应理解为在某些情况下由术语“大约”修饰。因此,在一些实施方式中,在书面描述和所附权利要求书中阐述的数字参数是近似值,其可以根据特定实施方式试图获得的期望性质而变化。在一些实施方式中,应当根据报告的有效数字的数目并通过应用普通的舍入技术来解释数字参数。尽管阐述了本发明的一些实施方式的广泛范围的数值范围和参数是近似值,但是在具体实例中阐述的数值被尽可能精确地报告。在本发明的一些实施方式中呈现的数值可能含有某些误差,这些误差必然是由于在它们各自的测试测量中发现的标准偏差引起的。

[0090] 如本文的说明书和遍及随后的权利要求书中所使用,除非上下文另有明确指示,“一个(a, an)”和“所述(the)”的含义包括复数含义。而且,如本文的说明书中所使用,“在...中(in)”的含义包括“在...中(in)”和“在...上(on)”,除非上下文另有明确指示。

[0091] 本文中数值范围的列举仅旨在用作分别指代落入该范围内的每个单独数值的速记方法。除非本文另有指示,否则每个单独的值都被并入说明书中,如同它在本文中被单独引用一样。除非本文另有指示或与上下文明显矛盾,否则本文描述的所有方法可以以任何合适的顺序进行。相对于本文的某些实施例提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如“比如”)的使用仅旨在更好地说明本发明,并且不对以其他方式要求保护的本发明的范围构成限制。说明书中的任何语言都不应解释为指示对实施本发明必不可少的任何未要求保护的要素。

[0092] 本文公开的本发明的可选的要素或实施方式的分组不应解释为限制。每个组成员可以单独引用或要求保护,也可以与该组的其他成员或在本文中找到其他要素组合使用。出于方便和/或可专利性的原因,组中的一个或多个成员可以包括在组中或从该组中删除。当发生任何这种包括或删除时,说明书在此被认为含有改变的组,从而满足所附权利要求中使用的所有马库什组的书面描述。

[0093] 在一些实施方式中,广谱抗病毒化合物可以是类视黄醇或类视黄醇衍生物。合适的类视黄醇衍生物包括AM580、他米巴罗汀和/或贝沙罗汀。制剂可以口服、肠胃外、通过注射、通过输注和/或通过粘膜吸收来施用。制剂可以作为溶液、悬浮液、注射剂、丸剂、片剂、胶囊剂和/或栓剂提供。在一些实施方式中,药物还可以包括药学上可接受的载体和/或另一种药学活性化合物。这种药学活性化合物可以是另一种抗病毒化合物,比如利巴韦林。在

其他实施方式中,药学活性化合物可具有抗病毒感染的症状或后遗症的活性,比如抗炎药、止吐药、镇痛药和/或抗生素。

[0094] 当将本发明构思的类视黄醇衍生物与一种或多种另外的药学活性化合物组合使用时,可以观察到协同作用(即,大于加和作用)。例如,当组合使用抗MERS-CoV时,AM580和洛匹那韦的有效IC₅₀当量显示FICI为小于0.5,表明存在协同效应。

[0095] 表1

组合比率	IC ₅₀ 当量 ^a		FICI ^b
	AM580	洛匹那韦	
AM580:洛匹那韦			
10:1	0.21	0.05	0.26*
5:1	0.39	0.07	0.46*
1:1	0.12	0.12	0.24*
1:5	0.09	0.34	0.43*
1:10	0.07	0.39	0.46*

[0097] ^a IC₅₀当量浓度是指通过将组合中该药物的IC₅₀除以单独使用时药物的IC₅₀计算出的归一化浓度。

[0098] ^b FICI是每种组合中使用的A580和洛匹那韦IC₅₀当量浓度之和。

[0099] *FICI<0.50被认为是显著的协同效应。

[0100] 本发明构思的另一个实施方式是通过施用减少脂肪生成和/或干扰或以其他方式调节脂质代谢的化合物来治疗病毒感染和/或使用这种化合物来配制显示广谱(即,超过一种病毒株或物种)抗病毒活性的药物的方法。易感病毒可以包括MERS-冠状病毒、SARS-冠状病毒、寨卡病毒、甲型流感病毒(比如甲型流感(H1N1)pdm09、甲型流感病毒(H5N1)和甲型流感病毒(H7N9))、人腺病毒(比如人腺病毒5)和肠病毒(比如EV71)。在一些实施方式中,化合物可以是类视黄醇或类视黄醇衍生物。合适的类视黄醇衍生物包括AM580、他米巴罗汀和/或贝沙罗汀。制剂可以口服、肠胃外、通过注射、通过输注和/或通过粘膜吸收来施用。制剂可以作为溶液、悬浮液、注射剂、丸剂、片剂、胶囊剂和/或栓剂提供。在一些实施方式中,药物还可以包括药学上可接受的载体和/或另一种药学活性化合物。这种药学活性化合物可以是另一种抗病毒化合物,比如利巴韦林。在其他实施方式中,药学活性化合物可具有抗病毒感染的症状或后遗症的活性,比如抗炎药、止吐药、镇痛药和/或抗生素。

[0101] 在这种实施方式中,该方法可以包括给药方案,该给药方案以有效减少或控制病毒感染的剂量和频率提供制剂。这种给药方案可以以每剂量1μg/kg体重至100mg/kg体重的量提供减少脂肪生成和/或干扰或以其他方式调节脂质代谢的化合物。这种给药方案可以提供恒定的输注,或者可以提供定期的给药。合适的定期给药方案可以以每4小时到每周一次或更长时间的频率提供制剂。

[0102] 应当领会,所公开的技术提供了许多有利的技术效果,包括提供了广谱抗病毒化合物,这可以减少对特定病毒株鉴定的需求以及随后有效治疗的延迟。

[0103] 在本发明构思的一个实施方式中,减少脂肪生成和/或干扰或以其他方式调节脂质代谢的化合物形成了显示出广谱(即,超过一种病毒株或物种)抗病毒活性的制剂的至少一部分。易感病毒可以包括MERS-冠状病毒、SARS-冠状病毒、寨卡病毒、甲型流感病毒(比如

甲型流感(H1N1)pdm09、甲型流感病毒(H5N1)和甲型流感病毒(H7N9)、人腺病毒(比如人腺病毒5)和肠病毒(比如EV71)。在一些实施方式中,化合物可以是类视黄醇或类视黄醇衍生物。合适的类视黄醇衍生物包括AM580、他米巴罗汀和/或贝沙罗汀。

[0104] 为了鉴定抗病毒化合物,发明人开发了反映细胞生存力的比色测定法,该比色测定法被优化以筛选可以抑制针对MERS-CoV和/或甲型流感(H1N1)pdm09病毒感染后的细胞病变效应(CPE)发展的化合物。为了最大程度地区分药物治疗组和未治疗组之间的细胞生存力,评估了感染复数(MOI)和生存力检查时间点的各种组合。病毒感染的高MOI会损害抗病毒活性并缩短药物筛选的窗口。另一方面,较低的MOI可能需要多轮病毒复制才能区分药物功效,进而导致药物通过细胞代谢而降解。采用了Huh7和MDCK细胞,因为它们可以分别强大地支持MERS-CoV和甲型流感病毒的复制。GS5734(Remdesivir)和T-705(Favipiravir)分别由于它们对冠状病毒[20]和甲型流感病毒[21]的显著抗病毒效力而被用作阳性对照抑制剂。确定0.1MOI和在感染后24小时(hpi)的终点的组合适用于抗MERS-CoV筛选,而对于抗流感抑制剂,其确定为0.01MOI,并且发现48hpi是合适的(见图3)。基于优化的条件,采用含有189种生物活性脂质的文库进行初步筛选,然后进行剂量依赖性分析,以验证和按优先顺序列出候选化合物(见图4)。

[0105] 值得注意的是,化合物AM580保护细胞免受MERS-CoV和甲型流感(H1N1)pdm09病毒二者的感染。芳烃受体(AhR)激动剂FICZ和凋亡调控信使C16神经酰胺特异性地保护MDCK细胞免受甲型流感病毒(H1N1)pdm的病毒感染,而具有抗炎作用的脂质代谢产物25-羟基维生素D3保护Huh7细胞免受MERS-CoV感染(见图5和6)。AM580被鉴定为对两种病毒均表现出细胞保护作用的化合物,被选择用于进一步表征。

[0106] 使用MERS-CoV感染作为模型,发明人表征了AM580在细胞培养中的抗病毒活性。进行多周期病毒生长测定以绘制存在或不存在AM580的病毒复制动力学。在感染后18、24、36、42和48小时(“hpi”)的所指示的时间点,与DMSO阴性对照相比,AM580处理降低了细胞上清液中的病毒滴度>3对数(见图7)。令人惊讶的是,在整个研究过程中,AM580组的感染性噬菌斑形成单位(PFU)被限制在基线水平,这表明AM580在初始感染周期中能高效抑制MERS-CoV。此外,蛋白质印迹显示,添加AM580后,特别是在9hpi时,MERS-CoV核蛋白(NP)的表达显著降低(见图8)。

[0107] 利用流式细胞术来确定AM580处理后感染了MERS-CoV的细胞的百分比。将Huh7细胞感染0.01MOI的MERS-CoV,并在存在或不存在20 μ M的AM580的情况下温育24小时。如图9所显示,MERS-CoV NP-阳性细胞从65%(DMSO组)降低到5.38%(AM580组),表明AM580有效阻断了子代病毒的产生。用流式细胞术数据证实的是,在经MERS-CoV感染的Huh7细胞中对MERS-CoV NP的免疫荧光染色表明在AM580处理后病毒感染几乎被完全抑制(见图10)。

[0108] 另外,还发现AM580在多种细胞类型中减少了MERS-CoV复制,包括肺细胞(A549和Calu-3)、肾脏(Vero-E6)和免疫细胞[THP-1和人原代单核细胞-衍生的巨噬细胞(MDM)](见图11和12)。还发现AM580在Huh7细胞和MDM中抑制病毒诱导的促炎症细胞因子激活(见图13)。总体而言,AM580在细胞培养物中显示出有效的抗MERS活性,具有细胞保护作用并抑制病毒复制并且具有抗炎反应。

[0109] 为了筛选具有提高的生物利用度和抗病毒效力的AM580类似物,测试了与AM580具有结构相似性的十三种化合物的抗MERS-CoV活性。发现他米巴罗汀和贝沙罗汀具有与

AM580相当的抗MERS-CoV活性,其IC₅₀分别为 $320 \pm 26 \text{ nM}$ 和 $875 \pm 15 \text{ nM}$ (见图14)。应当领会的是,这三种化合物具有高度的结构相似性,其中所有化合物在桥连基团的一侧均具有四氢萘部分,而在另一侧均具有苯甲酸部分(见图15)。这些化合物之间的显著区别是连接四氢化萘和苯甲酸部分的中心连接桥连基团。具体而言,AM580和他米巴罗汀均利用酰胺键,但方向相反。贝沙罗汀在该位置具有乙烯)。不希望受到理论的束缚,发明人认为这些分子的四氢化萘和苯甲酸部分对抗病毒效力可能是重要和/或关键的。

[0110] 三维培养的人类类器官极大地推进了人类传染病的研究[22]。发明人已经建立并表征了人类肠道类器官(肠样物质)中的MERS-CoV感染性和复制动力学,它们具有人类肠道中的大多数类型的上皮细胞,以模拟体内环境的形态和功能性质[23]。发明人评估了AM580在这种人体器官样系统中的抗病毒效力。接种0.1MOI的MERS-CoV后,肠样物质在基质胶和上清液介质中的感染性病毒滴度中展现出稳定上升(即在24hpi和48hpi分别约为 $3 \log_{10}$ 和 $4 \log_{10}$),并且在肠样物质内检测到生产性病毒复制(见图16和17)。发现AM580处理显著($p < 0.05$)减少了细胞内和细胞外的MERS-CoV复制。在48hpi时,在AM580处理的($20 \mu\text{M}$)肠样物质培养物上清液中未检测到PFU,相对于DMSO处理的对照肠样物质,其代表大约 $6 \log_{10}$ PFU/ml的降低(见图16)。此外,如在DMSO处理的对照肠样物质中所观察,AM580处理的肠样物质在形态上保持完整,并且不表现出MERS-CoV诱导的CPE(见图18)。与DMSO处理的对照肠样物质相比,AM580处理的肠样物质中病毒NP的表达明显降低也证明了AM580对肠样物质中的MERS-CoV的抑制(见图18)。另外,离体人肺器官培养模型显示出AM580处理导致末端细支气管的上皮细胞中的MERS-CoV NP表达显著降低(见图19)。显然,AM580强烈抑制人肺和肺外组织中MERS-CoV的病毒复制。

[0111] 为了评估AM580的体内抗病毒活性,发明人检查了该药物化合物是否在使用人DPP4(hDPP4)-转基因小鼠建立的小鼠模型中赋予针对MERS-CoV和甲型流感病毒致死性攻击的保护[23]。如图20所显示,在接受50PFU的MERS-CoV攻击的hDPP4-转基因小鼠中,有10/10只小鼠(100%)在接受腹膜内注射AM580 3天后存活,而只有3/10(30%)PBS治疗的小鼠存活($p < 0.01$)。AM580治疗的小鼠的平均体重通常也高于DMSO治疗的对照小鼠的平均体重(见图21)。

[0112] 在攻击后的第2天和第4天,将每组中的四只小鼠安乐死以进行病毒学和组织学分析。在这两个时间点,与DMSO治疗的对照小鼠相比,AM580治疗的小鼠的肺组织中病毒RNA含量显著降低($p < 0.01$)。类似地,在攻击后第4天,几乎未检测到AM580治疗的小鼠的脑组织的病毒RNA含量,并且比DMSO治疗的对照小鼠的脑组织的病毒RNA含量低 $4-1 \log_{10}$ (见图22)。组织病理学检查显示,相对于DMSO治疗的对照小鼠的那些,AM580治疗的小鼠的肺组织中的肺泡损伤和间质炎性浸润显著改善(参见图23)。总体而言,这些结果表明,AM580通过在体内抑制MERS-CoV复制和病毒相关病理,有效地保护了hDPP4-转基因小鼠免受致命的MERS-CoV攻击。

[0113] 发明人还表征了AM580对其他病毒病原体——包括RNA[例如,SARS-CoV、寨卡病毒(ZIKV)、流感病毒(例如甲型流感(H1N1)pdm009病毒)和肠病毒(例如肠病毒-A71(EV-A71))]和DNA[例如,人类5型腺病毒(AdV5)]病毒二者——的抗病毒作用。出乎意料的是,AM580在纳摩尔浓度至较低微摩尔浓度范围内并以剂量依赖性方式抑制了所有这些变异病毒物种的复制(见图24和25)。使用甲基噻唑基四唑鎓盐(MTT)和CellTiter-Glo测定二者,在不同

的细胞系——包括从人类和非人类起源衍生的细胞系中,AM580的细胞毒性相似($\sim 100-200\mu\text{M}$) (见图26)。重要的是,对于大多数所测试的病毒,特别是MERS-CoV (507)、SARS-CoV (114)和甲型流感(H1N1) pdm09病毒(159),AM580的选择性指数足够高,其可以为临床使用提供理想的安全窗口(见图27)。总体而言,已发现AM580具有针对RNA和DNA病毒的广谱抗病毒活性,并具有适当的药学特性。

[0114] 使用野生型Ba1b/c小鼠模型,还评估了AM580对高致病性甲型流感(H7N9)流感病毒的抗病毒活性,该甲型流感病毒比A(H1N1) pdm09更具毒性。在受到100PFU的A(H7N9)病毒攻击的小鼠中,AM580治疗的小鼠的生存率(6/10,60%)显著高于DMSO治疗的对照小鼠(0/10,0%) ($p<0.01$) (见图28)。从攻击后第8天开始,用AM580治疗的小鼠的平均体重逐渐反弹(见图29)。AM580治疗的小鼠的肺组织中的平均病毒RNA载量显著($p<0.01$) 低于DMSO治疗的对照小鼠的肺组织中的平均病毒RNA载量(见图30)。组织病理学检查显示,AM580治疗改善了病毒相关的肺炎性浸润和支气管肺炎(见图31)。显而易见的是,AM580对高毒性/致死性甲型流感(H7N9)病毒攻击具有显著的体内保护作用。

[0115] AM580是已知的选择性类视黄醇受体- α (RAR- α) 激动剂。令人惊讶的是,发明人发现AM580的抗病毒活性不依赖于RAR- α 信号传导的激活,也不依赖于宿主的固有抗病毒反应的激活。为了确定AM580的抗病毒活性在多大程度上依赖于RAR- α 信号传导途径的激活,进行了功能丧失和功能获得测定。通过RAR- α 基因沉默的途径的下调(见图32)或RAR- α 受体的过表达(见图33)都不会显著影响MERS-CoV复制。下游RAR- α 拮抗剂ER50891和AM580的组合使用没有降低AM580的抗病毒效力(见图34)。这些结果表明AM580的抗病毒活性独立于RAR- α 信号传导途径。RAR- α 是核受体,然而,包括CMV、TK和SV40启动子的报告基因荧光素酶测定法排除了AM580用作泛转录抑制剂的可能性(见图35)。

[0116] 为了解释AM580的广谱抗病毒活性并确定该药物改变宿主的固有免疫反应的程度,发明人开发了由IFN- β 启动子(IFN β -Luc)或IFN-刺激的反应元件(ISRE-Luc)驱动的报告基因构建体(见图36)。这些结果指示,AM580的抗病毒活性不太可能与宿主的固有免疫反应的激活有关,并且不能起到信号传导放大器的作用。这得到以下观察结果的支持:AM580在RIG-1基因敲除和野生型A549细胞中表现出类似的抗病毒活性(见图37)。总体而言,这些数据表明,AM580的广谱抗病毒活性不是通过激活RAR- α 信号传导途径或通过宿主的固有免疫反应而发挥。

[0117] 为了确定AM580的抗病毒机理,发明人利用了加药时间测定,以便证明药物化合物不干扰MERS-CoV的附连或内在化(见图38)。不希望受到理论的束缚,发明人认为该药物化合物可能干扰MERS-CoV生命周期的进入后步骤。为了表征AM580如何影响细胞内病毒-宿主相互作用,发明人对存在或不存在该化合物的MERS-CoV感染的细胞进行了总体基因表达研究。在被MERS-CoV感染的Ca1u-3细胞中,许多基因被上调($n=2061$)或被下调($n=1626$)。值得注意的是,AM580治疗组和模拟感染组的基因表达谱类似。

[0118] 发明人还对在AM580处理的细胞和DMSO处理的细胞中显著地差异性表达的基因进行了途径富集分析。列出了两个变化最大的基因簇,其富集得分 >2.0 证明了这一点(见表1)。

[0119] 表1

富集簇 1 (得分, 5.99)		数量	<i>P</i>
阿尔茨海默病		50	2.73×10^{-8}
非酒精性脂肪肝病(NAFLD)		44	4.10×10^{-7}
氧化磷酸化		39	1.77×10^{-6}
亨廷顿病		49	5.46×10^{-6}
帕金森病		39	9.80×10^{-6}
[0120]	富集簇 2 (得分, 2.53)	数量	<i>P</i>
	赖氨酸降解	19	6.37×10^{-5}
	脂肪酸降解	16	3.12×10^{-4}
	色氨酸代谢	15	3.61×10^{-4}
	丁酸酯代谢	10	5.89×10^{-3}
	脂肪酸代谢	14	7.59×10^{-3}
	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	12	3.86×10^{-2}

[0121] 对经过AM580处理和未经处理的样品中差异性表达的基因进行途径富集和聚类分析。

[0122] 每个基因簇中得分最高的途径分别与阿尔茨海默氏病和赖氨酸降解有关。在此之后进行排名,用AM580处理的MERS-CoV感染的细胞显著降低了在功能上与脂肪酸代谢、脂肪酸降解和非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 相关的基因的表达。总体而言,不希望受到理论的束缚,发明人认为AM580可能会重编程由病毒复制触发的脂质代谢谱。值得注意的是,胆固醇和磷酸肌醇途径的调节异常与阿尔茨海默氏病的淀粉样蛋白生成高度相关[24],而生酮必需氨基酸(比如赖氨酸)调节脂质合成途径[25]。

[0123] 为了进一步探索AM580在MERS-CoV诱导的脂质稳态的扰动中的作用,发明人在存在或不存在AM580的情况下,对MERS-CoV感染的Ca1u-3细胞进行了未标记的脂质组学分析(见图39)。在24hpi时,分离脂质。表征了11种脂质类别中正态模式下308个脂质特征和负态模式下的199个脂质特征的丰度。去除重复的脂质特征后,进行数据处理和统计分析。当与模拟感染的和DMSO处理的MERS-CoV感染的对照细胞相比时,在AM580处理的MERS-CoV感染的细胞中观察到细胞脂质组的许多变化。十二种内源性脂质显示出显著的变化($p < 0.05$) (见图40至50)。所有鉴定出的脂质均属于甘油磷脂类别。甘油磷脂(GP)构成哺乳动物细胞膜的主要脂质类别。在结构上,GP进一步分为四个亚组,包括两个溶血磷脂(LysoPL) [溶血磷脂酰胆碱(LysoPC)和溶血磷脂酰乙醇胺(LysoPE)]和两个磷脂(PL) [磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰乙醇胺(PE)]。为了表征变化趋势,发明人基于不同脂质的丰度进行了层次聚类分析。与模拟感染的对照相比,在24hpi, MERS-CoV感染下调了LysoPL (LysoPC和LysoPE)并上调了PL (PC和PE) (见图39)。AM580拮抗这种病毒诱导的脂质稳态的扰动,并表现出与模拟感染的对照类似的脂质组(见图40至50)。

[0124] 两种协同的酶,即,磷脂酶A2 (PLA2) 和溶血磷脂酰基转移酶(LPCAT),在Lands的循环中平衡了LysoPL和PL的周转[26]。PLA2特异性地水解PL的sn-2位酯键以形成LysoPL。随

后,脂质再生酶LPCAT将酰基从酰基辅酶A转移至LysoPL以再生磷脂,从而完成去酰化/再酰化循环。MERS-CoV复制有利于PL而不是LysoPL的形成(见图40至50)。与脂质组学数据一致,当与AM580处理的或模拟感染的对照组相比时,MERS-CoV感染显著抑制了包括PLA2G4A、PLA2G10、PLA2G12A、PLA2G16和PLA2R1的组PLA2的基因表达($p < 0.05$)。总的来说,这些结果指示,MERS-CoV感染通过Lands循环的去酰化和再酰化来干扰脂质稳态,其中细胞磷脂酶起调节作用。发明人认为这些是病毒引起的有利于病毒复制和存活的变化。

[0125] 为了表征脂质代谢变化,发明人使用免疫荧光在存在或不存在AM580的情况下可视化MERS-CoV感染的Huh7细胞内的细胞脂质滴(LD)和胆固醇的分布模式,并进行RT-qPCR测定来测量mRNA表达的变化。如图51和52所显示,MERS-CoV感染显著增强了LD和胆固醇的积聚,而AM580的添加则大大降低了它们的产生。此外,还表征了参与脂肪酸代谢的18种关键催化基因的表达,其包括从头合成脂肪酸和摄取途径(ACC、FAS、ADRP)、脂肪酸氧化途径(CPT1a、HADH α 、UCP2、ACOX、BOX、CYP2E1、CYP4A11、PPAR α)、抗氧化剂途径(SOD、过氧化氢酶、GSS)和甘油三酸酯合成和催化途径(DGAT1、PPAR γ 、HSL)。当与DMSO处理的感染的对照相比时,在AM580处理的感染细胞中的13/17(76.5%)基因中检测到mRNA表达的显著降低(见图53)。

[0126] 类似地,通过AM580处理降低了胆固醇合成途径中比如HMGCR、HMG-CoA合酶(HMGCS)和SCD的胆固醇合成途径中10/12(83.3%)被测基因的mRNA表达(见图54)。这些发现不仅表明脂肪酸和胆固醇的合成是MERS-CoV生命周期的重要组成部分(在MERS-CoV感染期间主要生物合成酶、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、脂肪酸合酶(FAS)和HMGCS的大量增加证明了这一点),而且AM580及其类似物可以以影响病毒复制的一个或多个步骤的方式抑制脂质合成。不希望受到理论的束缚,发明人认为,由MERS-CoV感染引发的增高的新陈代谢需求迅速地上调了脂质生物合成途径,而AM580可能拮抗这种重编程并导致病毒复制减少。

[0127] SREBP-1和SREBP-2是控制胆固醇、脂肪酸和甘油三酸酯的生物合成的主要转录因子[27]。为了表征SREBP在MERS-CoV复制期间的作用,发明人比较了野生型(模拟处理)和预处理(SREBP的敲低(knockdown)或过表达)细胞之间MERS-CoV的生长。值得注意的是,用靶向SREBP-1或SREBP-2的siRNA的转染减少了前体SREBP(pre-SREBP)的产生,这导致显著($p < 0.05$)减少了MERS-CoV复制(见图56)。这指示SREBP对MERS-CoV复制至关重要。

[0128] 脂质生物合成基因的反式激活需要pre-SREBP的裂解以释放核形式(n-SREBP);这个过程受固醇调节[28]。为了诱导这种成熟形式的SREBP模拟病毒感染期间脂质生物合成的过度激活,通过与5%脂蛋白缺乏血清(LPDS)和10 μ M美伐他汀温育过夜,使Huh7细胞的固醇减少。饥饿的细胞富集内源性n-SREBP1和n-SREBP2(见图56)。然而,当MERS-CoV感染0.1或1MOI时,增加的n-SREBP将10 μ M的AM580的抗病毒效力降低约11log₁₀单位。这表明SREBP在MERS-CoV复制中起促进作用,AM580和相关化合物对所涉及的n-SREBP起抑制作用。

[0129] SREBP的成熟是通过与SREBP切割激活蛋白(SCAP)以及位点1蛋白酶(S1P)和位点2蛋白酶(S2P)的顺序切割结合而诱导的。发明人认为,阻断SREBP的成熟对于抗病毒治疗可能是有效的。为此,发明人表征了白桦脂醇(一种SCAP抑制剂)和PF429242(一种S1P抑制剂)的抗MERS-CoV活性。两种化合物均以剂量依赖性方式减少了MERS-CoV复制,当使用50 μ M处理MERS-CoV感染的Huh7细胞时,实现了约11log₁₀ PFU/ml的病毒滴度降低(见图57)。发明人认为,这些结果指示了SREBP在MERS-CoV诱导的代谢重编程中的重要和/或必不可少的作

用。另外,n-SREBP的加工步骤可提供药物可修饰的分子靶标,以便抑制病毒复制。

[0130] 观察到增加的n-SREBP降低了AM580的抗病毒效力,使得发明人推测AM580和相关化合物可以通过与n-SREBP结合而起作用(见图56)。核SREBP通过与存在于基因启动子中的SRE结合来上调一组脂肪酶的基因表达,比如HMGCS、HMG-CoA还原酶、FAS、ACC和角鲨烯合酶。为了确定AM580和相关化合物是否可以中断这种相互作用,对n-SREBP的DNA结合活性进行了表征。将包括SREBP1或SREBP2结合构件(element)的特定双链DNA(dsDNA)序列固定在测试孔(test well)上,然后在存在或不存在候选抑制剂的情况下表征核提取的SREBP1或SREBP2的结合程度。出人意料的是,AM580抑制了n-SREBP1和n-SREBP2两者与它们相应的SRE的结合(见图58和59)。

[0131] 发明人还研究了AM580抑制n-SREBP结合的机理。为了确定AM580是否靶向n-SREBP或SRE,发明人将药物化合物进行了以下预温育:(1)在添加n-SREBP之前与固定的dsDNA一起预温育,或(2)在与dsDNA结合之前与n-SREBP一起预温育。以n-SREBP1作为实例,发现AM580与n-SREBP1结合而不是与SRE结合,并且发现AM580以剂量依赖性方式抑制n-SREBP1的DNA结合活性(见图60)。

[0132] 为了预测AM580可能与其相互作用的潜在氨基酸残基(一个或多个),发明人使用公开的SREBP1和SREBP2的晶体结构进行了分子对接分析[30,31]。预测AM580与残基Tyr335相互作用(见图61和62),该残基位于DNA结合域内并确定SRE识别[30]。应当领会,SREBP1和SREBP2二者的SRE识别位点在人和小鼠之间高度保守(见图61),这可以解释发明人在各种细胞系、人类器官、离体组织、和小鼠模型中所观察到的一致的抗病毒活性。不希望受到理论的束缚,发明人相信AM580通过阻断SRE识别位点来抑制SREBP的DNA结合活性。

[0133] 为了确定Tyr335是否为AM580-SREBP相互作用位点(或相互作用位点的至少一部分),发明人进行了定点诱变以构建Y335R突变体n-SREBP1,并评估了WT和Y335R n-SREBP1对AM580或SRE的结合亲和力。当Tyr335被精氨酸取代时,n-SREBP1的DNA结合活性显著降低($p < 0.01$) (见图63)。这指示了n-SREBP1中的Tyr335对结合AM580可能至关重要。为了比较AM580对WT和Y335R n-SREBP1的结合亲和力,合成了AM580衍生的探针(AM580dp)。在合成AM580dp之前,发明人将含有叠氮部分的连接臂引入AM580的羧酸基团以生成叠氮-AM580,其被设计用于将来添加具有特定和/或附加探测功能的化学基团。与AM580类似,发现叠氮-AM580抑制Huh7和Vero细胞中的MERS-CoV复制(见图64)。使用叠氮基反应性绿色荧光染料,可以看到叠氮-AM580主要位于宿主细胞的核中,这与之前的结论——AM580靶向脂肪生成反式激活事件——是一致的(见图65)。AM580dp含有光亲和基团和生物素标签二者(见图66)。

[0134] 为了捕获结合靶标,通过其生物素基团将AM580dp固定在链霉亲和素缀合的琼脂糖上,并分别与外源表达的WT和Y335R n-SREBP1一起温育。在基于点击化学紫外线(UV)照射以激活AM580dp中的非特异性交联基团后,将蛋白-AM580dp复合物固定并通过生物素标签纯化将其一起拉下。在通过蛋白质印迹表征时,WT和突变体Y335R n-SREBP1沉淀了等量的RAR- α ,指示AM580dp具有生物学功能(见图67)。与Y335R n-SREBP1相比,拉下了显著更多的WT n-SREBP1,这表明AM580和WT n-SREBP1之间的结合亲和力比Am580和Y33R n-SREBP1之间的结合亲和力高得多(见图67)。不希望受到理论的束缚,发明人认为至少部分由于与残基Tyr335的相互作用,AM580靶向n-SREBP1。

[0135] SREBP通过控制脂肪形成途径中的酶如HMGCS和FAS的表达来调节脂质稳态。为了确定AM580是否可以抑制SREBP依赖性转录激活,制备了两种报告基因构建体,即HMGCS-启动子-Luc和FAS-启动子-Luc。前者包括仓鼠HMGCS启动子序列(-324/-225) [32],而后者包括FAS-启动子[33]。AM580表现出对报告基因活性的浓度依赖性抑制,指示了脂肪生成酶比如HMGCS和FAS在转录水平被阻断(见图68)。为了证实AM580的抗MERS-CoV活性与脂质生物合成减少之间的相关性,发明人表征了脂肪酸从头生物合成途径的终产物——棕榈酸钠(见图69)——逆转AM580的抗病毒活性的能力。在这些研究中,已知的FAS抑制剂(C75)被用作阳性对照。值得注意的是,C75和AM580二者均显示出抗-MERS-CoV活性(图70)。棕榈酸钠的添加不影响用DMSO处理的MERS-CoV感染的细胞中的病毒产量,但是增加了用AM580或C75处理的MERS-CoV感染的细胞中的病毒产量($p < 0.05$) (见图70)。这表明AM580至少部分通过破坏脂肪酸合成来抑制MERS-CoV复制。

[0136] 发明人还探索了脂肪酸合成是否与AM580可能抑制的其他病毒的复制密切相关。为此,进行了使用甲型流感(H1N1) pdm09病毒(负链RNA病毒)、EV-A71(无包膜RNA病毒)和AdV5(DNA病毒)的复制拯救测定(见图71至73)。添加100 μ M棕榈酸钠后,实现了对这些病毒的显著程度的拯救($p < 0.05$)。其中,甲型流感(H1N1) pdm09病毒显示出了对脂肪酸合成的最高依赖性($p < 0.01$)。总体而言,这些数据表明,AM580及其类似物的广谱抗病毒活性至少部分与重编程脂质通量的能力有关。

[0137] 已知正义RNA病毒可在细胞内膜上复制其基因组。对于MERS-CoV的情况,双膜囊泡(DMV)和其他复制细胞器(RO)为病毒复制/转录复合物(RTC)提供了锚固支架。为了确定这些病毒诱导的囊泡是否可以作为AM580和类似化合物阻断脂肪酸合成的特定靶标,发明人使用了MERS-CoV诱导的DMV作为代表性研究模型。通过电子显微镜,在MERS-CoV感染的细胞中容易检测到核周DMV簇(图74,左图)。相反,在用AM580处理后未观察到DMV(图74,右图)。不希望受到理论的束缚,发明人相信AM580和相关化合物可以至少部分通过阻止DMV的形成来抑制病毒复制。

[0138] 负义病毒(比如甲型流感病毒)利用了独立于细胞内膜的基因组复制和转录的不同机理。棕榈酸酯具有几种生物学功能,包括棕榈酰化。棕榈酰化是调节蛋白质功能和蛋白质定位的脂肪酸的翻译后附连[34]。在甲型流感病毒中,最好表征的病毒棕榈酰化蛋白是表面糖蛋白血凝素(HA) [35]。对AM580处理的或AM580未处理的棕榈酰化水平进行表征,以确定脂肪酸合成的阻滞是否会阻止HA流感的棕榈酰化,并且因此,阻止病毒生命周期的翻译后步骤。HA-过表达的A549细胞与AM580、载体/对照(DMSO)或阳性对照抑制剂2-BP一起培养,该阳性对照抑制剂2-BP通过抑制棕榈酰基转移酶棕榈酸酯来特异性地破坏棕榈酰化[36]。S-棕榈酰化的HA蛋白经由树脂辅助捕获进行纯化。在不同治疗组之间未检测到总HA蛋白量的显著差异,表明2-BP和AM580对蛋白合成没有影响(见图75)。

[0139] 通过添加2-BP和AM580观察到降低水平的棕榈酰化HA,指示了降低的病毒蛋白棕榈酰化。当与DMSO处理的对照相比时,病毒入侵后添加2-BP展现出了上清液中的甲型流感(H1N1) pdm09病毒滴度降低了 $1 \log_{10}/\text{ml}$ (见图76)。不希望受到理论的束缚,发明人认为AM580抑制SREBP依赖性途径来损害病毒棕榈酰化并减少甲型流感H1N1 pdm09病毒复制。出人意料的是,2-BP也以剂量依赖的方式抑制了MERS-CoV复制(见图76),表明病毒棕榈酰化可能是另一个重要的广谱抗病毒靶标。

[0140] 病毒依靠其细胞宿主的代谢网络为其复制提供能量和建构模块 (building block)。AM580和相关化合物通过抑制SREBP相关途径在体外和体内具有显著的抗病毒功效,指示了宿主脂质代谢的重编程在病毒生命周期的多个方面至关重要,并且重要地,表明这些步骤是易受攻击的,代表了抗病毒干预的药学上可寻址的分子靶标。发明人发现,SREBP在协调病毒诱导的脂质过度诱导中是必不可少的(见图55),其因此影响DMV生物合成(见图74)和翻译后蛋白棕榈酰化(参见图75)。在病毒感染的情况下,AM580下调胆固醇和脂肪酸生物合成中的基因并降低细胞脂质的含量以限制病毒复制(见图52和53)。在SREBP的蛋白酶解加工之前,pre-SREBP最初是作为ER跨膜蛋白合成的[19]。当固醇较低时,SCAP将SREBP从ER护送到高尔基体,在高尔基体中SREBP被蛋白酶S1P和S2P依次裂解,从而释放n-SREBP并转运至细胞核以反式激活基因表达。然而,当细胞固醇水平较高时,胆固醇或羟固醇会刺激SCAP与胰岛素诱导的基因1蛋白(INSIG1)之间的缔合,导致ER保留SCAP-SREBP复合物,从而降低n-SREBP并降低脂质代谢中所涉及基因的表达。发明人已经示出,AM580转录通过阻断n-SREBP和SRE之间的结合而抑制多种脂肪酶(见图59和61)。针对早期事件,Tang及其同事鉴定出了可通过促进SREBP的ER保留来抑制SREBP的桦木醇[28]。实际上,桦木醇和S1P活性的抑制剂二者均展现出对病毒复制的抑制(见图57)。总体而言,发明人已将SREBP的蛋白水解加工鉴定为广谱抗病毒的可行目标。

[0141] 受SREBP调节,已经表明参与细胞脂质代谢的脂肪酶在宿主-病毒相互作用中起重要作用[37],这与发明人的发现是一致的。实际上,C75对FAS的药理抑制作用已导致黄病毒[38]和牛痘病毒[39]的复制受损。使用C75作为阳性对照,发明人证明AM580对不同的病毒、包膜(MERS,流感)和无包膜(EV-A71)、RNA或DNA(AdV5)病毒的抑制作用可以通过外源性棕榈酸酯部分地拯救(见图71至74)。这些研究的结果显示,脂质生物合成(尤其是脂肪酸从头合成)对于最佳和/或最大的病毒复制的不可或缺性。这也解释了在不同细胞系、小鼠模型、人类类器官和离体模型中观察到的AM580的广谱抗病毒效力(见图7至12、15至22、24和27至31)。发明人相信,在通过AM580使转录失活之后,除FAS以外的脂肪生成酶的沉默也可有助于病毒复制受损(见图69)。如以上所显示,棕榈酰化抑制剂(2-BP)对甲型流感(H1N1)病毒和MERS-CoV二者均展现出抗病毒活性,表明病毒蛋白棕榈酰化是广谱抗病毒药的另一种药学上可寻址的宿主分子靶标(见图44)。用作raft-靶向信号,棕榈酰化是病毒组装和出芽中必不可少的常见且保守的生物学过程。关于人类病原体所报告的突出实例包括表面糖蛋白,比如甲型流感病毒的HA、乙型流感病毒的NB、麻疹病毒的融合(F)蛋白、丝状病毒和逆转录病毒(包括HIV)的糖蛋白[34]。蛋白质棕榈酰化还调节细胞蛋白质的功能。因而,在开发棕榈酰化抑制剂作为抗病毒治疗剂之前权衡预期的功效与副作用是重要的。DHHC蛋白家族的发现以这种方式阐明了观点[40]。DHHC蛋白以不同的底物特异性催化棕榈酰化,这表明这些蛋白可能是有前途的药物靶标,因为它们的阻断应导致病毒复制的抑制,而细胞蛋白的酰化作用不会受到损害[41]。

[0142] 令人惊讶地,AM580的抗病毒活性不依赖于RAR- α 途径(见图32至34)。AM580的结构活性分析指导了对叠氮-AM580和AM580dp的适当修饰,从而使得其细胞分布可视化(见图65),并下拉SREBP作为AM580的直接结合靶标(见图68)。敲低SREBP1或2没有展现出与AM580类似水平的抗病毒效力(见图55),这可能是由于当一种蛋白受损时SREBP1和SREBP2可以相互补偿[42]。虽然已经报告了AM580在小鼠模型中的致畸作用[43],但预期的治疗益处胜过

了这种副作用的风险,尤其是当考虑到在动物实验中AM580短时间治疗3天时。在探索具有同等效力和改善的生物利用度的AM580类似物时,已鉴定出他米巴罗汀(一种口服活性类视黄醇,用于治疗急性早幼粒细胞白血病)[44]。应当领会的是,他米巴罗汀具有已知和全面的安全性,并且是在日本上市的产品。随着他米巴罗汀在临床上的耐受性成功,发明人相信AM580和/或相关化合物可以作为一种安全且广谱的抗病毒治疗剂进行修饰,特别是因为AM580仅在病毒感染诱发升高的脂质需求爆发时才具有活性。

[0143] 实施例

[0144] 细胞和病毒:人胚肾(HEK293T)细胞、人肺癌(A549)细胞、人肝癌(Huh7)细胞、人横纹肌肉瘤(RD)细胞、人上皮2型(HEp-2)细胞,人肺腺癌(Calu-3)细胞、人类白血病(THP-1)单核细胞、Madin-Darby犬肾(MDCK)细胞、非洲绿猴肾(Vero)细胞和Vero-E6细胞均获自ATCC,并且根据供应商/制造商的建议保存在培养基中。根据香港大学的机构审查委员会批准的方案,从香港红十字会输血服务中心收集的健康成人血液样品中分离出人外周血单核细胞衍生的巨噬细胞(MDM)。单核细胞制备和分化是根据既定的方案进行的,如发明人先前所述[45]。所有细胞系均在37°C下在5%的CO₂中培养。如通过Plasmo Test(InvivoGen)所确定,确认了研究中使用的所有细胞系均不含支原体污染。在病毒感染后,将感染的细胞保持在含或不含化合物的无FBS的培养基中。在MDCK细胞中培养甲型流感病毒株/Hong Kong/415742/2009(H1N1)pdm09、MERS-CoV(HCoV-EMC/2012)和SARS-CoV(GZ50)在Vero-E6细胞中增殖。在Vero细胞中扩增了ZIKV的临床分离株(Puerto Rico株PRVABC59)。在RD细胞中培养肠病毒A71(SZ/HK08-5)。临床分离的人类5型腺病毒(AdV5)在A549细胞中增殖。使用两种适应小鼠的病毒株A/Anhui/1/2013(H7N9)和MERS-CoV(HCoV-EMC/2012)进行体内抗病毒测试。所有培养的病毒均通过噬菌斑形成单位测定(噬菌斑测定)和/或50%组织培养物感染剂量(TCID₅₀)测定进行滴定,如发明人先前所述并稍作修改[46]。将所有病毒储备等分地保存在-80°C。所有活病毒实验都是使用生物安全性2级或3级设施进行的,如发明人先前所述[47]。

[0145] 化学试剂和抗体:除非另有说明,AM580购自Cayman Chemical(Michigan,United States),而其他化学抑制剂从Sigma-Aldrich(Missouri,United States)获得。如发明人先前所述,用豚鼠抗-MERS-CoV NP血清检测到了MERS-CoV NP[48]。购买了针对人类RAR- α (Abcam)、SREBP1(Santa Cruz)、SREBP2(Santa Cruz)、n-SREBP1(Novus Biological)、n-SREBP-2(Novus Biological)、Flag标签(Sigma)的初级抗体并且在相关实验中使用。将Alexa Fluor 488山羊抗-pg IgG(H+L)抗体(Invitrogen)用作免疫荧光染色的二级抗体。4',6-双脒基-2-苯吡啶(DAPI,Sigma)和鬼笔环肽-Atto 647N(Sigma)分别用于细胞核和细胞膜染色。Silencer Select人SREBP1 siRNA、Silencer Select人SREBP2 siRNA和Silencer Select siRNA阴性对照均获得自Life Technologies。使用荧光中性脂质染料4,4-二氟-1,3,5,7,8-五甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-茛烯(BODIPY 493/503,Invitrogen)染色脂质液滴(LD),而采用Filipin III(Cayman Chemical)来观察细胞内胆固醇。可将磷激活的荧光染料DyLight™488-磷(Invitrogen)用于叠氮化物标记的分子(即,Azido-AM580)的特异性标记和检测。

[0146] 质粒:FAS启动子荧光素酶是来自Bruce Spiegelman博士的礼物(Addgene质粒#8890),含有HMG-CoA合酶启动子的pSynSRE-T-Luc(Addgene质粒#60444)、pcDNA3.1-2×

FLAG-SREBP-2 (Addgene质粒#26807)、pcDNA3.1-2×FLAG-SREBP-1c (Addgene质粒#26802) 是来自Timothy Osborne博士的礼物。萤光素酶构建体IFN β -Luc和ISRE-Luc由Dong-yan JIN博士(香港大学)提供。

[0147] 初级筛选: 购买含有189种生物活性脂质的化合物文库(Cayman Chemical, Michigan, USA)以进行筛选。该文库包括前列腺素、受体激动剂和拮抗剂以及神经酰胺衍生物,其对于G蛋白偶联受体筛选和常规药理筛选是理想的。如发明人先前所述并稍作修改,进行了基于MTT的CPE抑制测定[49]。为了鉴定抗-MERS-CoV抑制剂,将96孔培养板(4×10^4 细胞/孔)中的融合Huh7细胞一式三份以0.1感染复数(MOI)感染MERS-CoV。病毒吸收后一小时,移除接种物,然后添加含药物的培养基($10 \mu\text{M}$)。24小时后,将 $10 \mu\text{l}$ 的 5mg/ml 的MTT溶液(Sigma)添加至孔中。将单层如上温育4小时。最后,添加 $100 \mu\text{l}$ 的含 0.01M HCl的10% SDS,并在 37°C 和5% CO_2 下温育过夜。参考波长 640nm ,读取 570nm 处的活性。为了筛选抗流感病毒抑制剂,MDCK细胞以 0.01MOI 感染了流感病毒A(H1N1) pdm09病毒,而细胞生存力评分的时间点是感染后48小时(hpi)。其他步骤与上述相同。接下来,进行了使用噬菌斑减少测定(PRA)的剂量反应分析[50],以评估主要化合物的体外抗病毒效果,其中依次稀释了各个化合物(10 、 5 、 2.5 、 1.25 和 $0.625 \mu\text{M}$),并测试了MERS-CoV或甲型流感(H1N1)病毒抑制。

[0148] 选择性指数: 计算每种化合物的选择性指数(SI)为50%细胞毒性浓度(CC_{50})与50%抑制浓度(IC_{50})的比率。 CC_{50} 值是根据制造商的方案(protocol),通过MTT测定法(Invitrogen)和CellTiter-Glo测定法(Promega)确定的,而如所指示, IC_{50} 数据是通过噬菌斑减少测定或病毒载量减少测定获得的[51]。 CC_{50} 和 IC_{50} 均使用GraphPad Prism 6计算。

[0149] 流式细胞术: 对于细胞内染色,用PBS中的 10mM EDTA使细胞脱离,用4%多聚甲醛固定,并用PBS中的0.1% Triton X-100透性化。用于流式细胞术的免疫染色是按照发明人先前所描述的标准步骤进行的[52]。使用BD FACSCanto II流式细胞仪(BD Biosciences)进行流式细胞术,并使用FlowJo vX(Tree Star)分析数据。

[0150] 动物实验: 将人二肽基肽酶4(DPP4)转基因C57BL/6小鼠和BALB/c雌性小鼠保持在3级生物安全室中,并随意获得标准颗粒饲料和水。所有实验方案均已获得香港大学动物伦理委员会批准,并按照生物安全3级动物设施的标准操作程序进行。如发明人先前所述,分别在DPP4小鼠模型[23]和BALB/c小鼠模型[47]中测试了MERS-CoV和甲型流感病毒(H7N9)。为了检查AM580的抗MERS-CoV活性,总共评估了36只小鼠(18只小鼠/组)。麻醉后,对小鼠鼻内(i.n.)接种 $20 \mu\text{L}$ 的含有50PFU的MERS-CoV的病毒悬浮液。病毒攻击后6小时通过腹膜内(i.p.)接种开始治疗。一组小鼠腹膜内(i.p.)接种 $200 \mu\text{L}$ 的AM580持续3天(12.5mg/kg/天)。第二组小鼠腹膜内(i.p.)施用 $200 \mu\text{L}$ 的PBS中的0.1% DMSO作为未处理的对照。监测动物存活和疾病信号持续14天或直至死亡。攻击后第2天和第4天分别随机对每组四只小鼠实施安乐死。如发明人先前所述,收集小鼠的肺和脑进行病毒滴定和H&E组织病理学分析[47]。为了评估AM580在体内的抗流感效力,对BALB/c小鼠(18只小鼠/组)鼻内(i.n.)接种 $20 \mu\text{L}$ 的病毒悬浮液,即,100PFU的甲型流感(H7N9)病毒。病毒攻击后6小时通过鼻内施用开始治疗。一组小鼠鼻内(i.n.)接种了 $20 \mu\text{L}$ 的AM580(1mg/kg/天)。第二组小鼠鼻内(i.n.)施用 $20 \mu\text{L}$ 的扎那米韦(2mg/kg/天)作为阳性对照。第三组鼻内给予PBS中0.1% DMSO作为未处理的对照。每天两次施用鼻内剂量的AM580、扎那米韦或PBS持续3天(共6剂量/小鼠)。监测动物存活和疾病信号持续14天或直至死亡。分别在病毒攻击后的第3天和第6天收集肺组织(4只小鼠/组)

用于病毒滴定和H&E组织病理学分析。

[0151] 人肠道类器官培养物和病毒感染实验:根据香港大学/医院管理局香港西区医院群审查委员会批准的方案,从接受手术切除的患者获得正常小肠。然后培养肠类器官,并针对MERS-CoV感染进行区分,如发明人在其他地方所描述[23]。使用 10^5 PFU的MERS-CoV接种物感染一滴肠样物质(intestinoid)(含有50至100个肠样物质),估计MOI为0.1。在移除接种物后,用PBS冲洗病毒接种的肠样物质,然后重新嵌入在基质胶中,并在48孔板中用含有或缺乏AM580(20 μ M)的培养基进行培养。在所指示的时间点,收获肠样物质用于定量细胞内病毒载量,而将无细胞基质胶和培养基合并用于病毒滴定细胞外上清液。

[0152] 离体肺组织培养和病毒感染实验:离体肺组织培养和病毒感染实验得到香港大学/医院管理局香港西区机构的机构审查委员会的批准。新鲜的正常肺组织获得自接受肺外科切除的患者。病毒感染和随后的免疫荧光染色的实验条件是按照发明人先前所述进行的[45]。简而言之,将肺组织切成2-mm³的立方体,然后用 2×10^8 PFU/ml的MERS-CoV接种物感染,或在37 $^{\circ}$ C下模拟感染1小时。接种后,在固定和冷冻切片之前,将组织块保持在补充有10%人血清和青霉素/链霉素的DMEM/F12培养基中。

[0153] 转录组分析:将Calu-3细胞模拟感染或以MOI为2感染MERS-CoV,并在含有(或缺乏)AM580的DMEM培养基(20 μ M)中温育。在第24hpi,收集单个组的总RNA(n=3)。使用RNA-Seq技术分析了MERS-CoV感染和AM580处理后基因表达的改变[53]。测序文库由华大基因(Beijing Genomics Institute)(BGI)构建和测序,在过滤低质量样品后,平均可产生23,977,722个干净读数。使用HISAT[54]/Bowtie2将干净的读数映射为参考[55]。将经过或未经过AM580处理的MERS感染样品中的差异表达基因提交给DAVID服务器,以进行途径富集和聚类分析。

[0154] 脂质组分析:将Calu-3细胞模拟感染或以MOI为2感染MERS-CoV,并在含有(或缺乏)AM580的DMEM培养基(20 μ M)中温育。在8和24hpi,分别收集细胞并进行细胞脂质提取。通过噬菌斑测定证实病毒感染力的失活。根据已发表的论文,样品制备进行了少量修改[56]。简而言之,将150mM碳酸氢铵的冰冷淬灭缓冲液添加到解离细胞中,然后将其转移到防氯仿管中。向该试管中加入2毫升氯仿/甲醇(v/v 2:1),然后涡旋并在4 $^{\circ}$ C下以4500rpm的转速离心10分钟。将底部相收集到玻璃小瓶中,并通过真空浓缩器干燥以在-80 $^{\circ}$ C下储存。LC-MS分析后,将干燥的样品在300 μ l氯仿/甲醇(v/v 2:1)中重构,并使用与Synapt G2-HDMS质谱仪系统(Waters Corp., MA, USA)耦合的Acquity UPLC系统进行分析。色谱法在Waters ACQUITY BEH C18柱(1.7 μ m, 2.1 \times 100mm, 内径, 1.7mm, Waters, Milford, MA, USA)上进行。流动相由(A)水中的0.1%乙酸和(B)乙腈组成。在以下梯度程序下以0.4ml/min的流速进行分离:0.5%B(0至1.5分钟),0.5%至8%B(1.5至2分钟),8%至35%B(2至7分钟),35至70%B(7至13分钟),70至99.5%B(13至29分钟),99.5%B(29至36分钟)。质谱数据以正模式和负模式获取。亮氨酸脑素被用作所有实验的锁定物质。碰撞能量的使用范围为20到40eV,用于破碎化,以便对重要代谢物进行假设鉴定和结构说明。

[0155] 电子显微镜:电子显微镜用于观察由MERS-CoV感染诱导的双膜囊泡(DMV)。Vero细胞在6孔板中生长。在用MERS-CoV的MOI为3感染(或模拟感染)1小时后,将细胞培养基替换为含有20 μ M AM580或0.1%DMSO的新鲜培养基作为对照。12小时后,移除细胞培养基。细胞用PBS洗涤,胰蛋白酶消化并用4%甲醛固定,以进行进一步处理和对比染色[57]。图像是在

香港大学电子显微镜部门获取。

[0156] 分子对接:从蛋白质数据库中检索出SREBP1 (PDB代码:1AM9) 和SREBP2 (PDB代码:1UKL) 的晶体结构。用Pymol提取SREBP1二聚体和SREBP2二聚体。使用I-TASSER服务器对SREBP2中的残留残基进行建模[58]。用Maestro中的蛋白质制备向导模块制备蛋白质模型[59]。可从PubChem数据库中下载AM580的3D构象[60]。Leadfinder v 1.81被用来以超高精度方法进行对接模拟[61]。

[0157] 化学合成:叠氮-AM580用于AM580的细胞内可视化,而AM580dp被设计和合成用于AM580结合靶的下拉研究。

[0158] 为了合成叠氮-AM580,将20mg的AM580与3.14ml溶解在二甲基甲酰胺(DMF)中的叠氮-PEG5-胺(Conju-Probe, LLC) (10mg/ml) 混合。接着,将1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐(HATU)、50 μ l的N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)和2.46ml的二氯甲烷(DCM)添加至最终体积5.7ml。反应在室温下摇动进行。温育过夜后,将反应混合物冻干以移除溶剂。通过HPLC纯化叠氮-AM580,并通过质谱(MS)检测m/z 640。最终产率通过核磁共振(NMR)定量。

[0159] 为了合成AM580dp,将纯化的叠氮-AM580与胺反应性三官能交联剂(2-{N2-[N α -苯甲酰基苯甲酰胺基-N6-6-生物膜氨基己酰基]赖氨酰氨基}乙基-2'-(N-磺基琥珀酰亚胺基羧基)乙基二硫化钠盐(Santa Cruz)连接,其是一种生物素-紫外线激活的NHS酯化合物,被称为化合物A。该三官能交联剂含有NHS-酯头基——其用于连接另一种交联剂磷化合物(化合物B) (4-[2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基]-2-二苯基膦基-苯甲酸甲酯(Shinsei Chemical Company Ltd.)的胺尾,在另一端上用于链霉亲和素树脂结合的生物素头基,和紫外激活的二苯甲酮基团——其用于与AM580的目标结合蛋白交联。具体而言,通过DMF将1mg的化合物A与30 μ l的74.8mM的化合物B(溶于DMSO-d6中)混合至最终体积为1ml。化合物A与化合物B的摩尔比为1:2。反应在40 $^{\circ}$ C并以1400rpm振动下进行。将过量的叠氮-AM580添加到混合物中,以允许通过施陶丁格连接反应与膦基交联。然后将反应产物与链霉亲和素琼脂糖树脂(Pierce)一起温育以捕获AM580dp产物。

[0160] 对于本领域的技术人员应当显而易见的是,在不脱离本发明的发明构思的前提下,除了已经描述的修改之外,还有更多的修改是可能的。因此,除了所附权利要求的精神之外,本发明的主题不受限制。此外,在解释说明书和权利要求书二者时,应以与上下文一致的尽可能广泛的方式解释所有术语。特别地,术语“包括(comprises, comprising)”应被解释为以非排他性的方式指代要素、组件或步骤,指示所引用的要素、组件或步骤可以存在、利用或与其他未明确引用的要素、组件或步骤组合。在说明书权利要求书中是指选自A、B、C...和N中的至少一种时,则该文本应解释为仅需要组中的一个要素,而不是A加N或B加N等。

[0161] 参考文献

[0162] 1.Peiris,J.S.,et al.,Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome.Lancet,2003.361(9366):p.1319-25.

[0163] 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.

[0164] 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.

[0165] 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.

[0166] 5. De Clercq, E., Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. 1(1): p. 13-25.

[0167] 6. Zumla, A., et al., Coronaviruses—drug discovery and therapeutic options. *Nat Rev Drug Discov*, 2016. 15(5): p. 327-47.

[0168] 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.

[0169] 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.

[0170] 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.

[0171] 10. Zhu, J.D., et al., Broad-spectrum antiviral agents. *Front Microbiol*, 2015. 6: p. 517.

[0172] 11. Burke, J.D., L.C. Plataniotis, 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.

[0173] 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.

[0174] 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.

[0175] 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.

[0176] 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.

[0177] 16. Dimitrov, D.S., Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol*, 2004. 2(2): p. 109-22.

[0178] 17. Altan-Bonnet, N., Lipid Tales of Viral Replication and Transmission. *Trends Cell Biol*, 2017. 27(3): p. 201-213.

[0179] 18. Lorizate, M. and H.G. Krausslich, Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. 3(10): p. a004820.

- [0180] 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.
- [0181] 20.Sheahan,T.P.,et al.,Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses.Sci Transl Med,2017.9(396).
- [0182] 21.Furuta,Y.,et al.,Favipiravir(T-705),a novel viral RNA polymerase inhibitor.Antiviral Res,2013.100(2):p.446-54.
- [0183] 22.Qian,X.,et al.,Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure.Cell,2016.165(5):p.1238-1254.
- [0184] 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.
- [0185] 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.
- [0186] 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.
- [0187] 26.Lands,W.E.,Stories about acyl chains.Biochim Biophys Acta, 2000.1483(1):p.1-14.
- [0188] 27.Goldstein,J.L.,R.A.DeBose-Boyd,and M.S.Brown,Protein sensors for membrane sterols.Cell,2006.124(1):p.35-46.
- [0189] 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.
- [0190] 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.
- [0191] 30.Parraga,A.,et al.,Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution.Structure,1998.6(5):p.661-72.
- [0192] 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.
- [0193] 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.
- [0194] 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.

- [0195] 34.Veit,M.,Palmitoylation of virus proteins.Biol Cell,2012.104(9):p.493-515.
- [0196] 35.Veit,M.,M.V.Serebryakova,and L.V.Kordyukova,Palmitoylation of influenza virus proteins.Biochem Soc Trans,2013.41(1):p.50-5.
- [0197] 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.
- [0198] 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.
- [0199] 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.
- [0200] 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.
- [0201] 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.
- [0202] 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.
- [0203] 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.
- [0204] 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.
- [0205] 44.Miwako,I.and H.Kagechika,Tamibarotene.Drugs Today (Barc),2007.43(8):p.563-8.
- [0206] 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.
- [0207] 46.Kao,R.Y.,et al.,Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target.Nat Biotechnol,2010.28(6):p.600-5.
- [0208] 47.Zheng,B.J.,et al.,Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1virus.Proc Natl Acad Sci U S A,2008.105(23):p.8091-6.

- [0209] 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.
- [0210] 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.
- [0211] 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.
- [0212] 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.
- [0213] 52.Chan,C.M.,et al.,Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule5 Is an Important Surface Attachment Factor That Facilitates Entry of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus.J Virol,2016.90(20):p.9114-27.
- [0214] 53.Mortazavi,A.,et al.,Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq.Nat Methods,2008.5(7):p.621-8.
- [0215] 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.
- [0216] 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.
- [0217] 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.
- [0218] 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.
- [0219] 58.Yang,J.,et al.,The I-TASSER Suite:protein structure and function prediction.Nat Methods,2015.12(1):p.7-8.
- [0220] 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.
- [0221] 60.Kim,S.,et al.,PubChem Substance and Compound databases.Nucleic Acids Res,2016.44(D1):p.D1202-13.
- [0222] 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.

[0001] 序列表
 [0002] <110> 阿瓦隆黄病毒治疗(香港)有限公司
 [0003] <120> 用于广谱抗病毒治疗的组合物和方法
 [0004] <130> 103244.0001PCT
 [0005] <160> 1
 [0006] <170> PatentIn version 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 80
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 智人
 [0011] <400> 1
 [0012] Gly Glu Lys Arg Thr Ala His Asn Ala Ile Glu Lys Arg Tyr Arg Ser
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Ser Ile Asn Asp Lys Ile Ile Glu Leu Lys Asp Leu Val Val Gly Thr
 [0015] 20 25 30
 [0016] Glu Ala Lys Leu Asn Lys Ser Ala Val Leu Arg Lys Ala Ile Asp Tyr
 [0017] 35 40 45
 [0018] Ile Arg Phe Leu Gln His Ser Asn Gln Lys Leu Lys Gln Glu Asn Leu
 [0019] 50 55 60
 [0020] Ser Leu Arg Thr Ala Val His Lys Ser Lys Ser Leu Lys Asp Leu Val
 [0021] 65 70 75 80

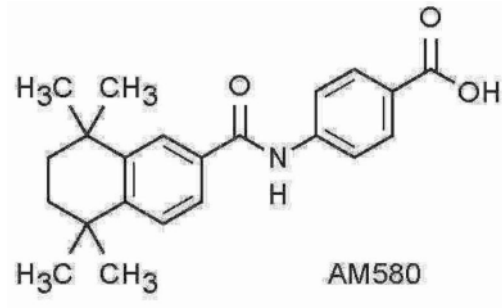


图1



图2

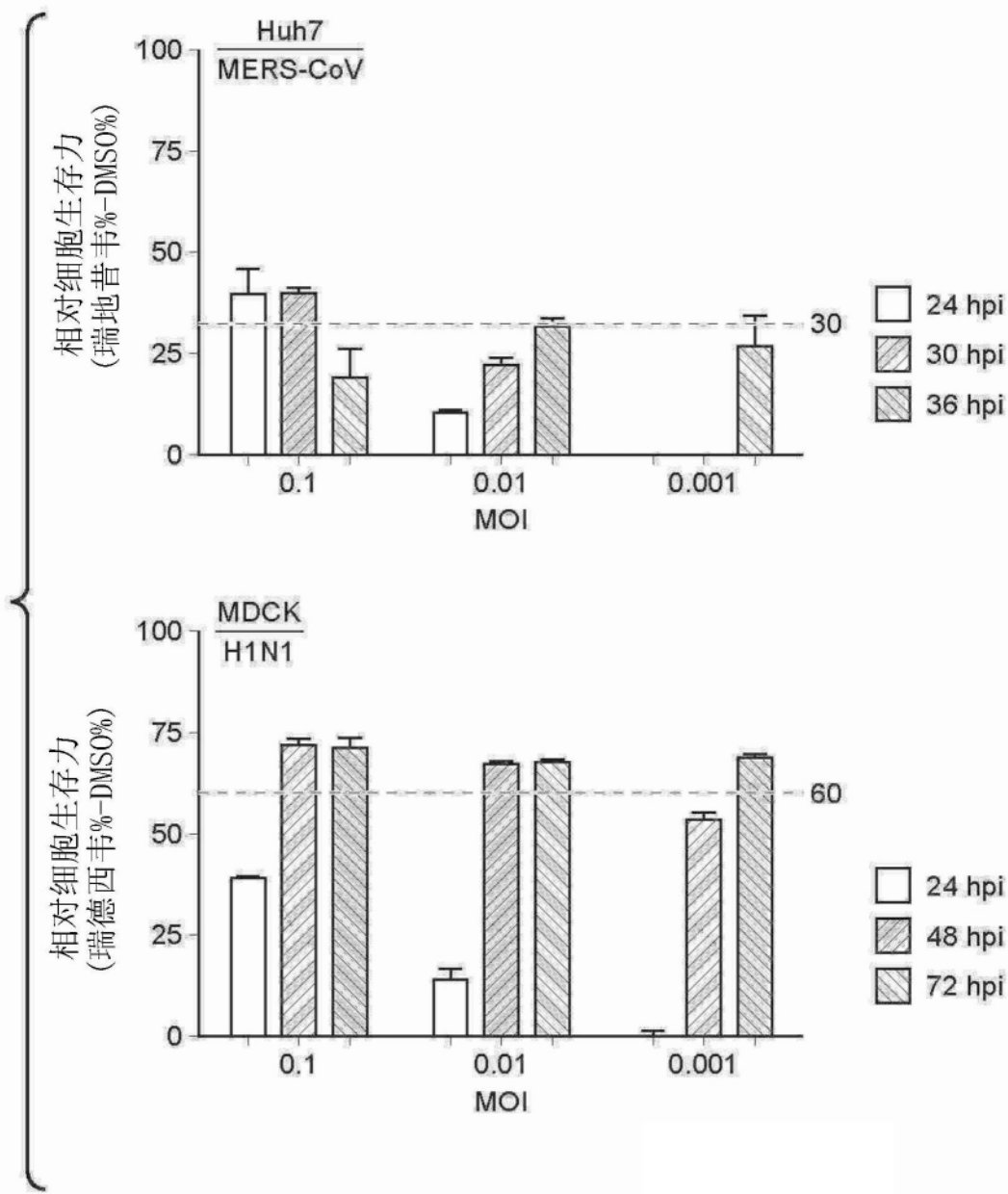


图3

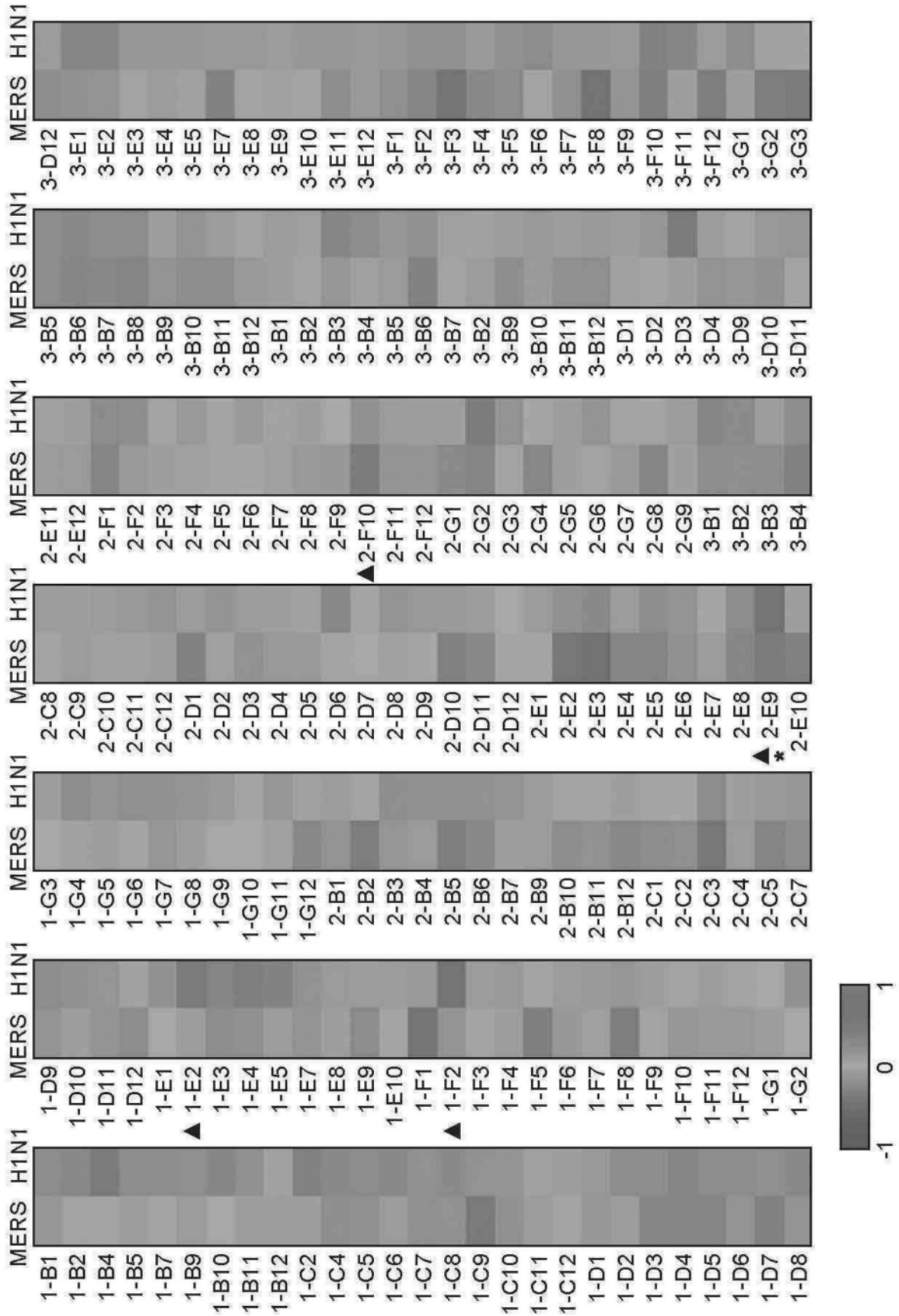


图4

鉴定的抗MERS-CoV抑制剂

ID	名称
2-E9	AM580
2-F10	25-羟基维生素D3

图5

鉴定的抗流感病毒抑制剂

ID	名称
1-E2	FICZ
1-F2	C16神经酰胺
2-E9	AM580

图6

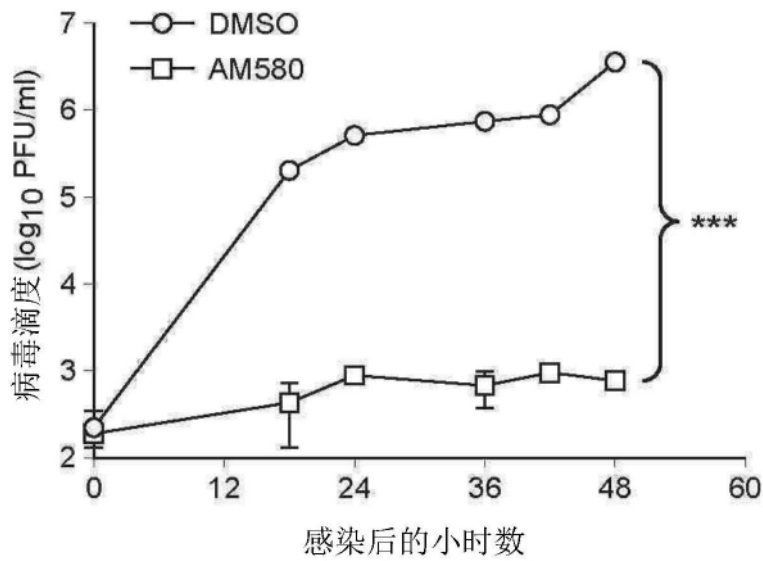


图7

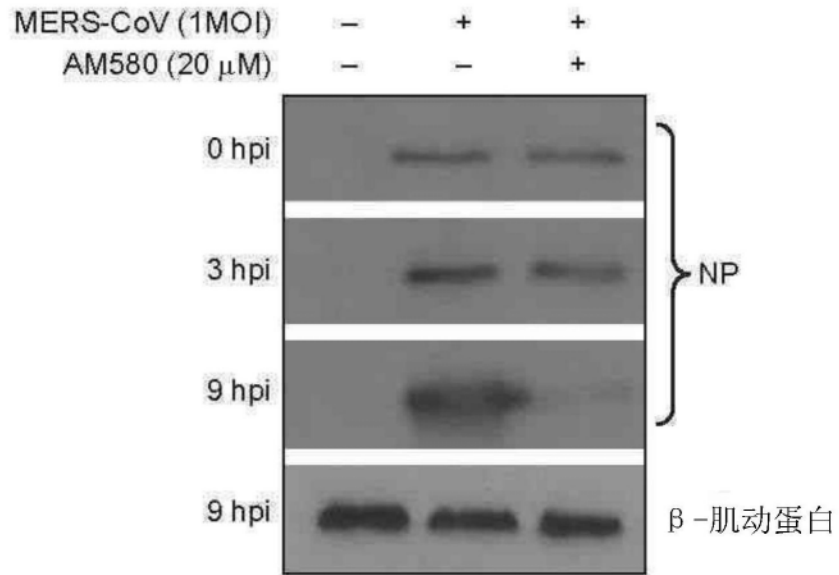


图8

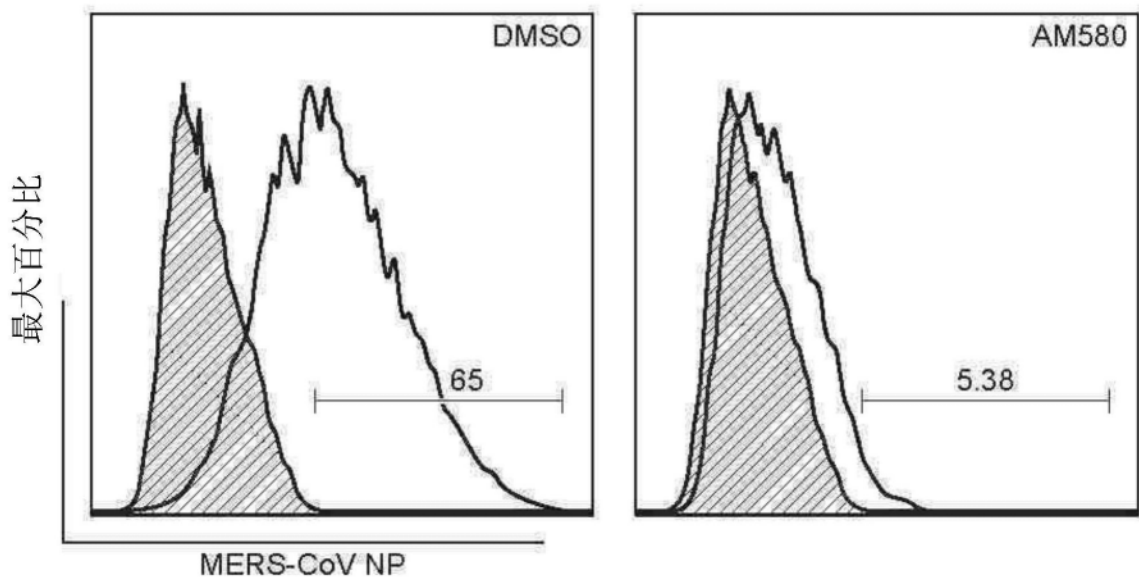


图9

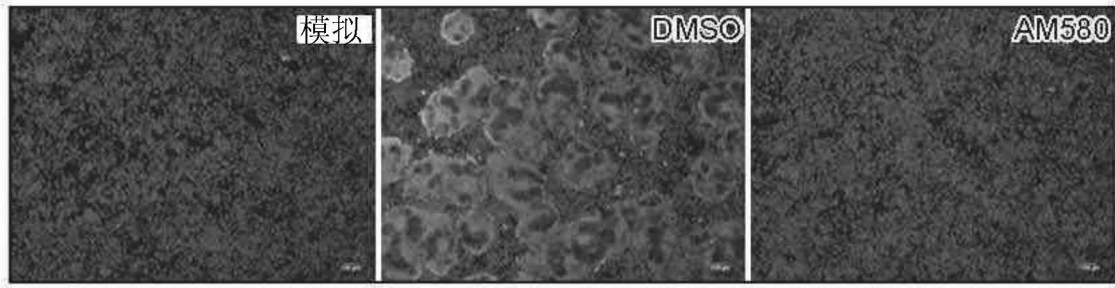


图10

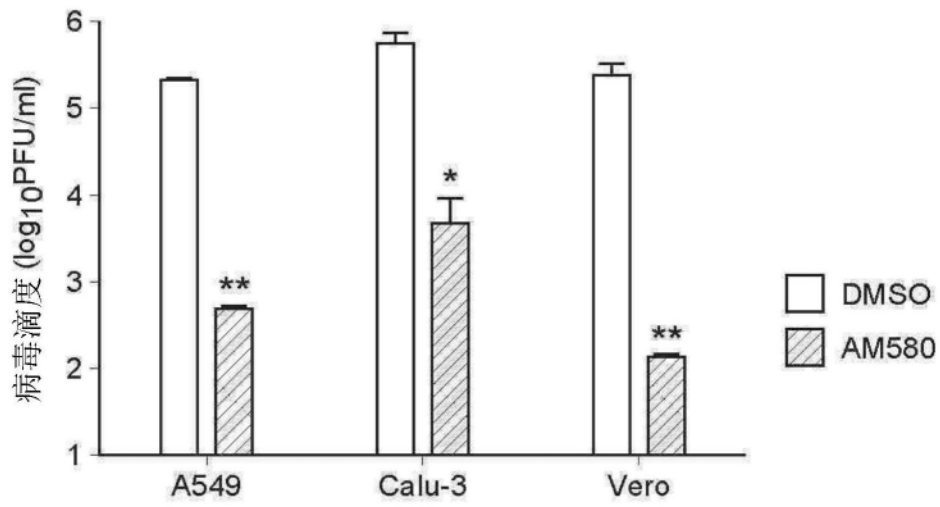


图11

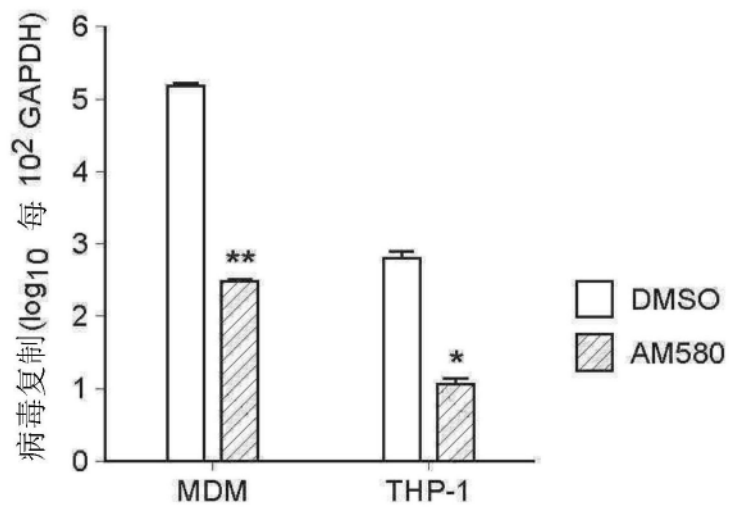


图12

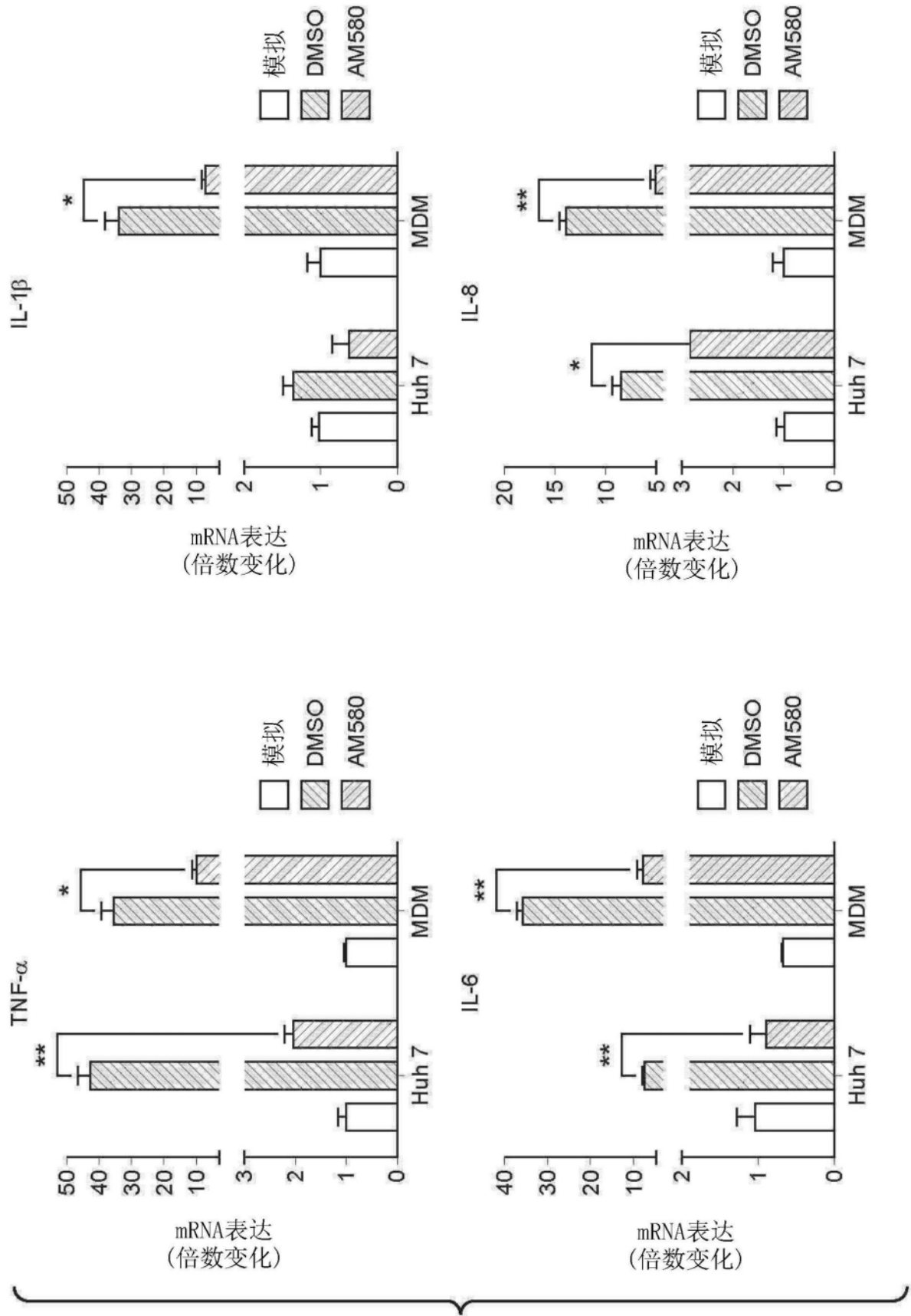


图13

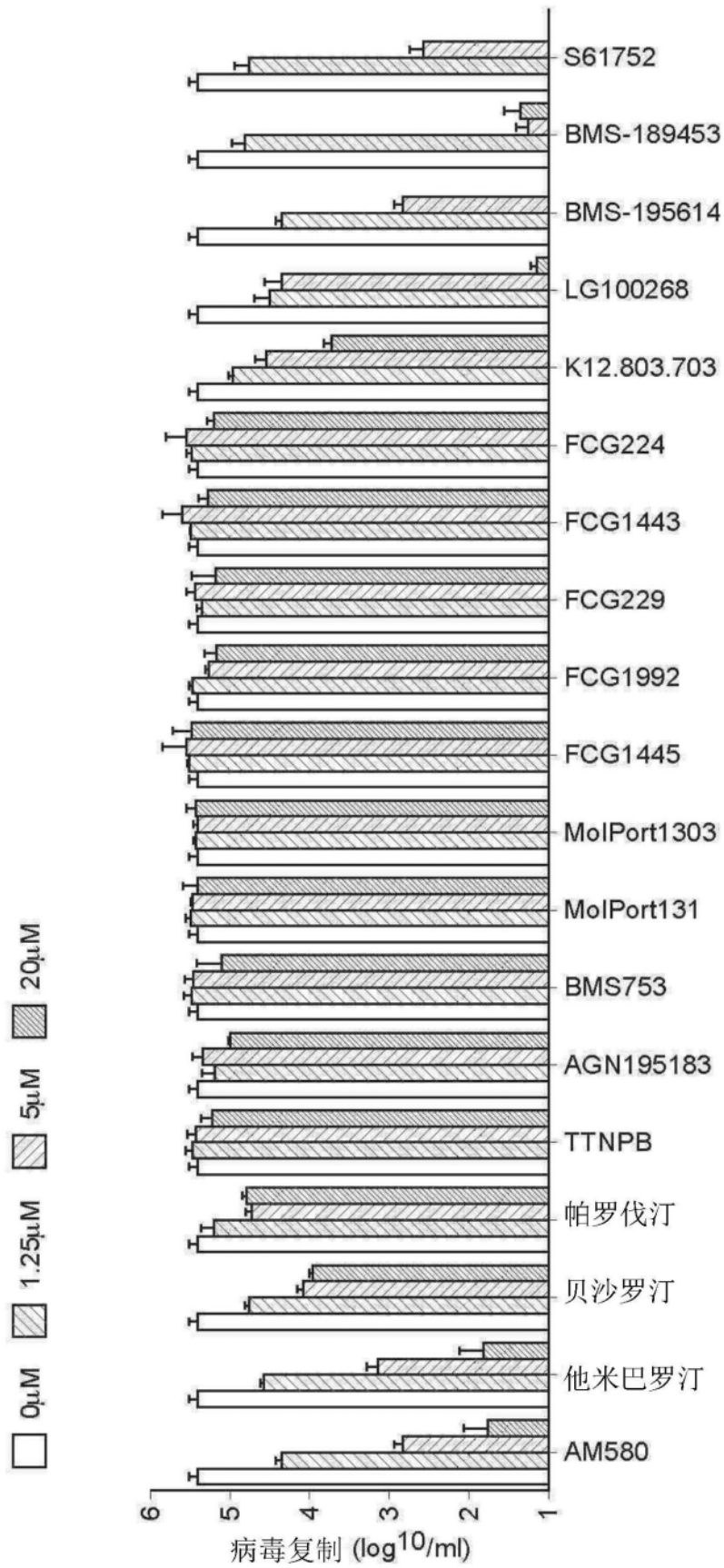


图14

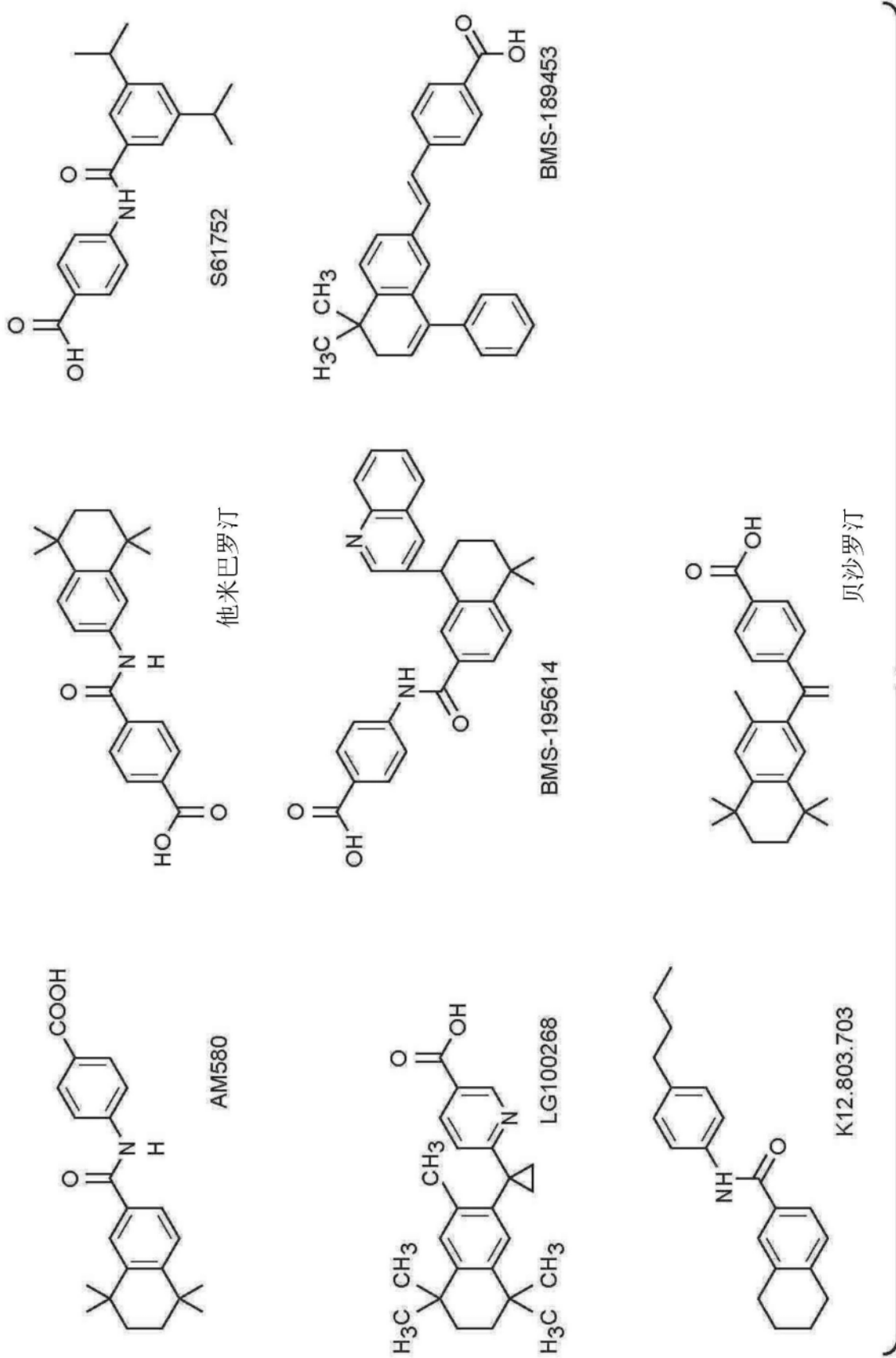


图15

图15

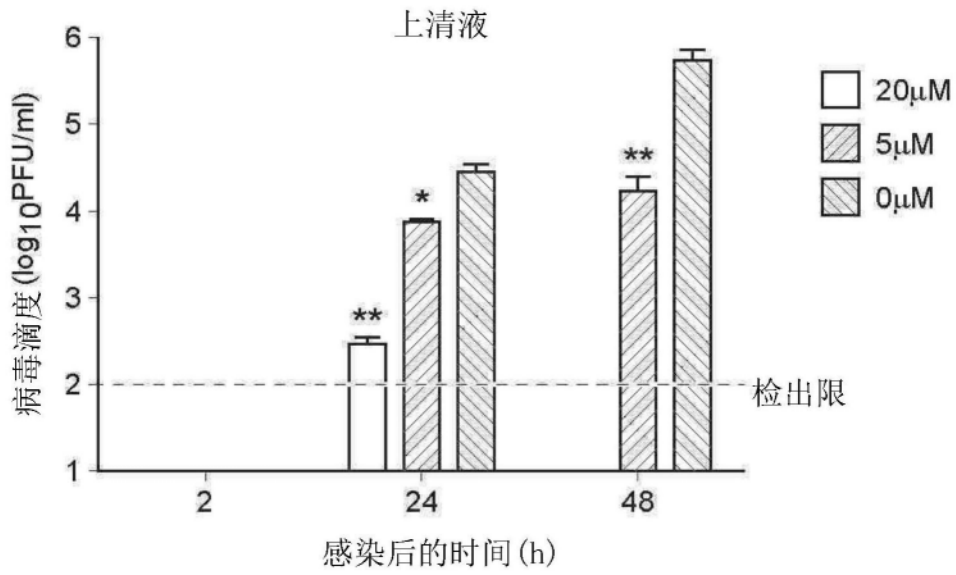


图16

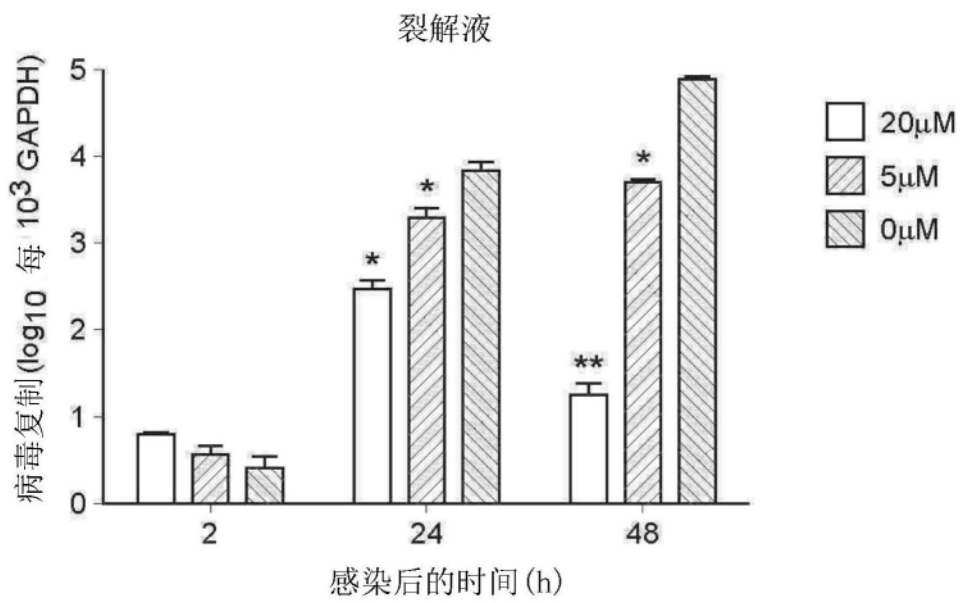


图17

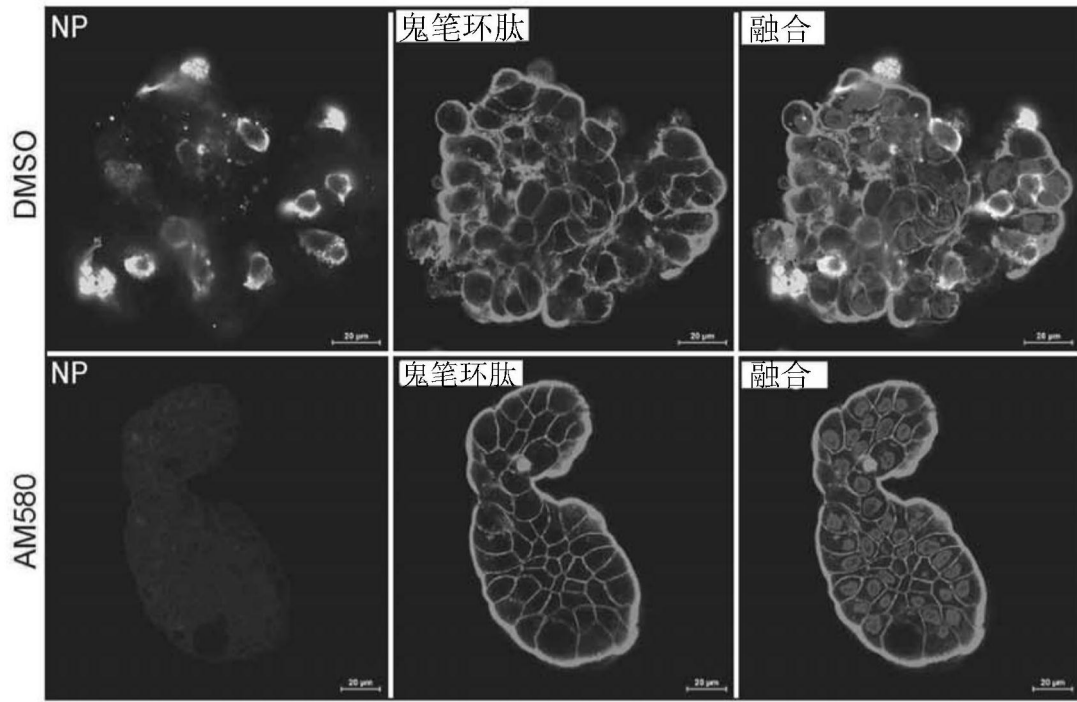


图18

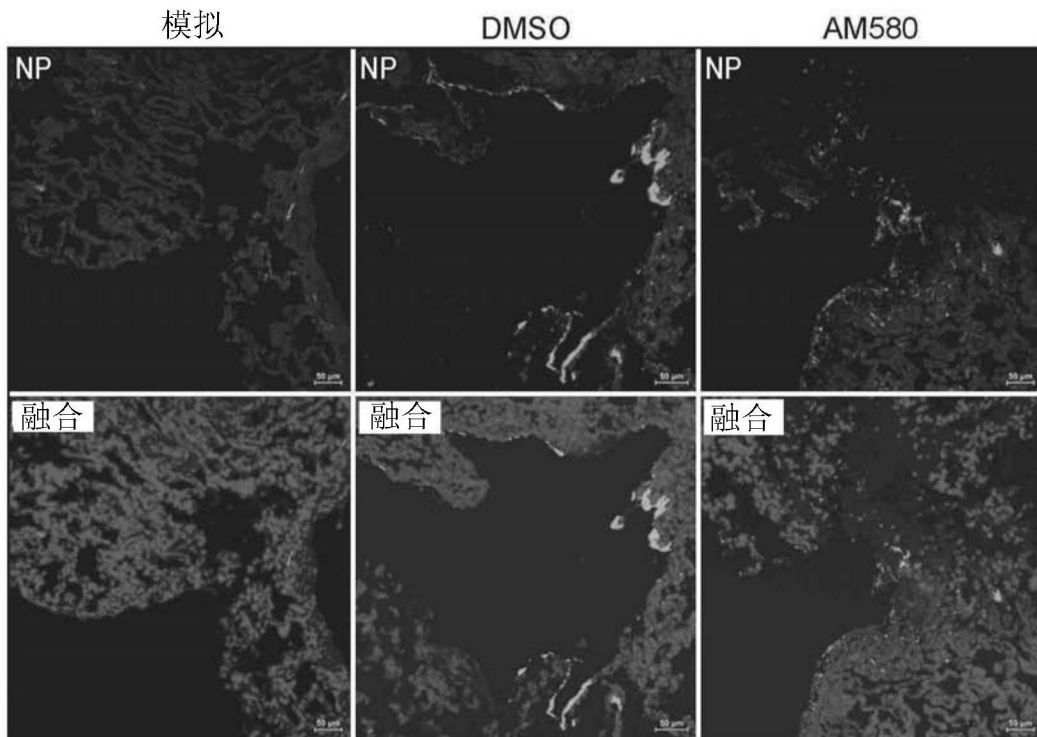


图19

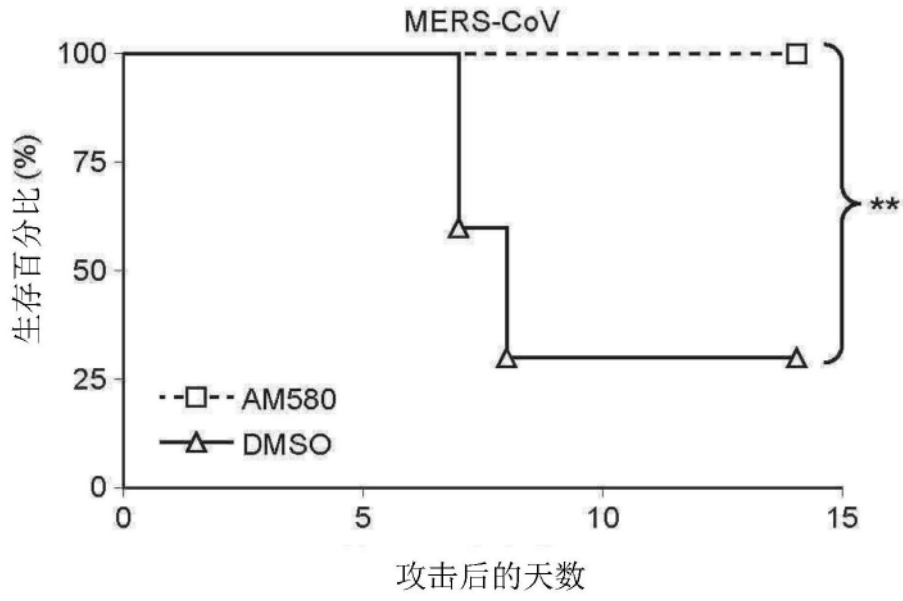


图20

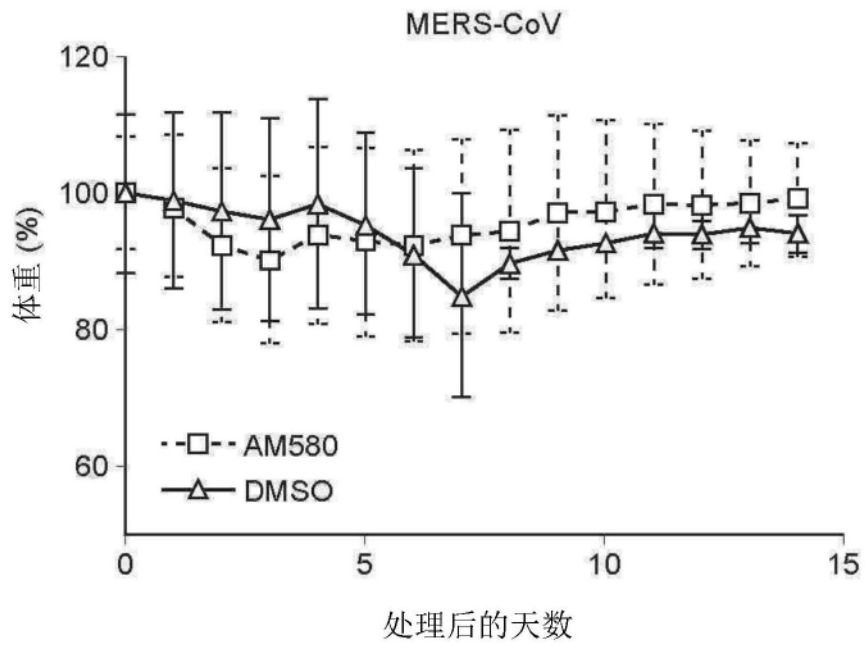


图21

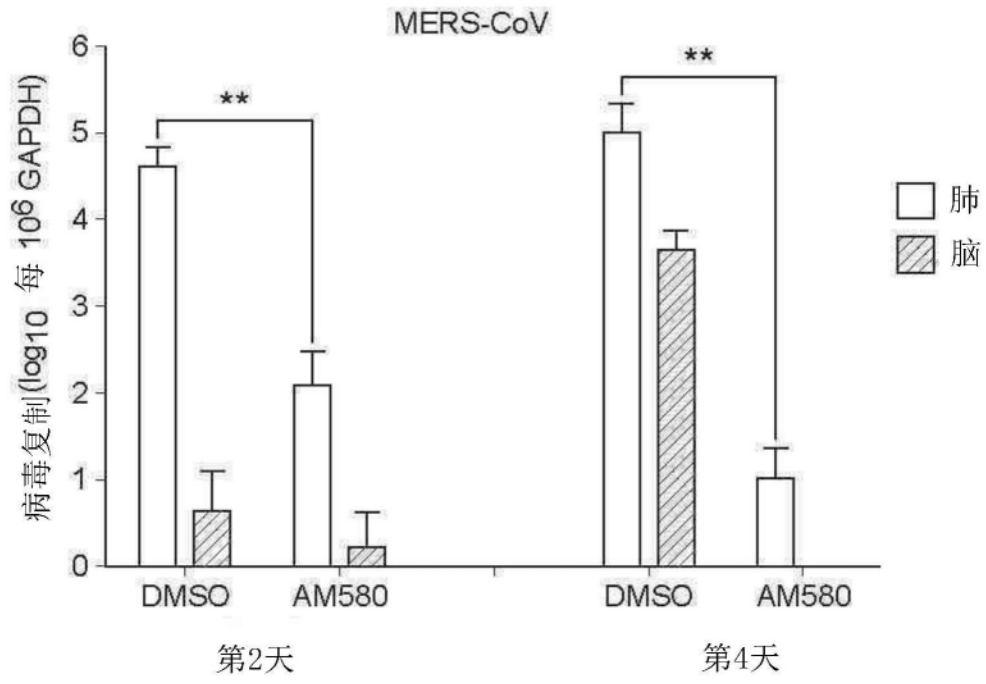


图22

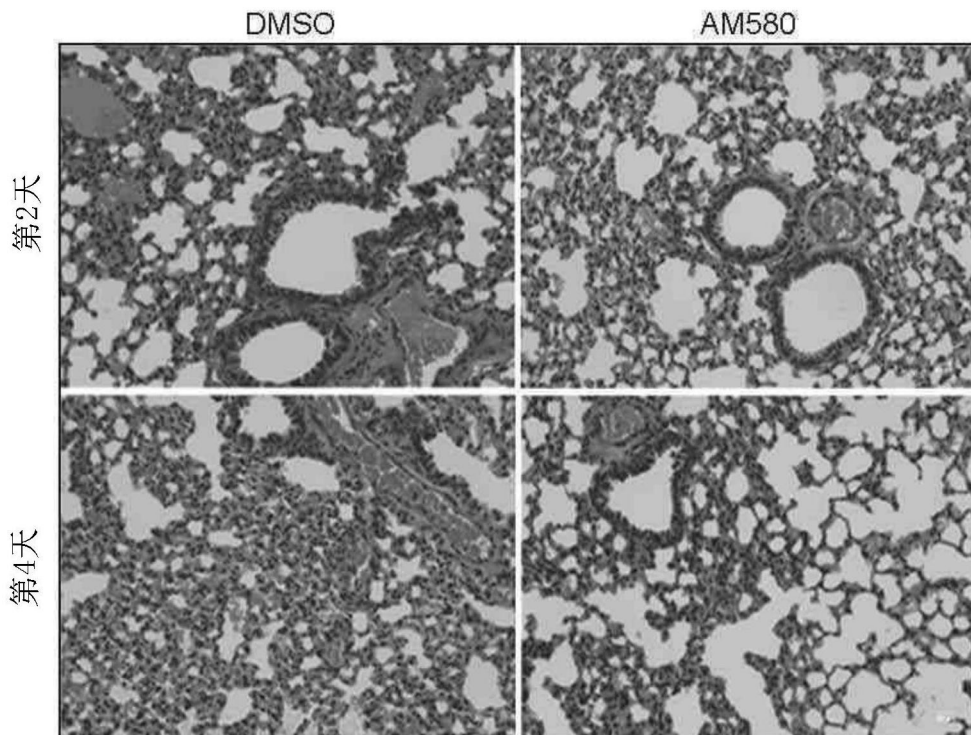


图23

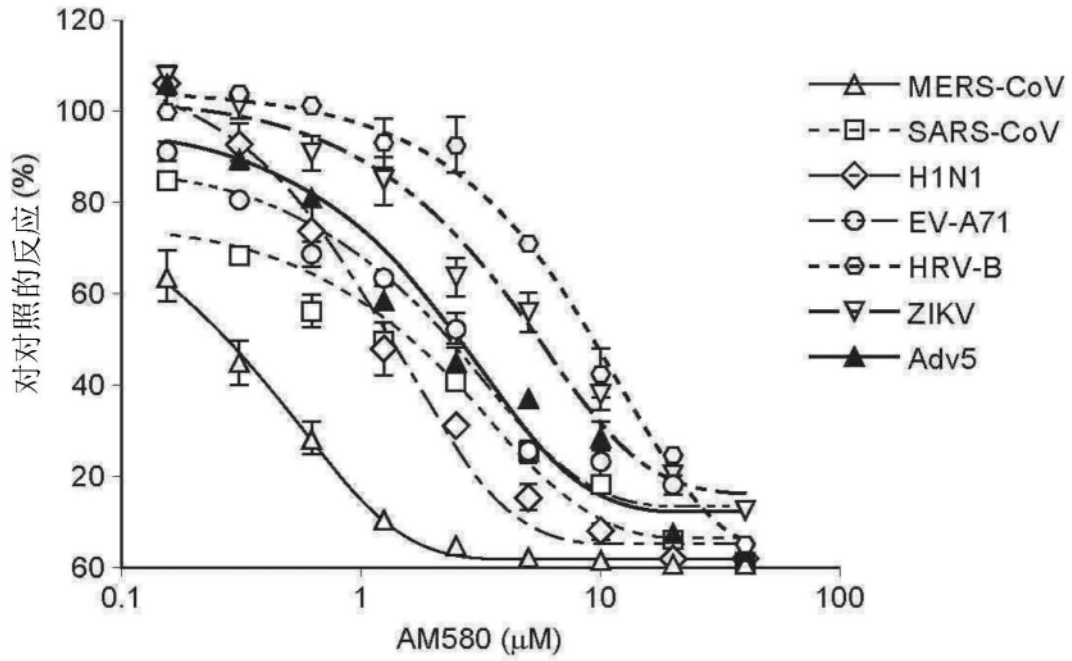


图24

AM580的抗病毒活性

病毒科	病毒	IC ₅₀ (μM)
冠状病毒科	MERS-CoV (HCoV-EMC/2012)	0.25 ± 0.03
	SARS-CoV (GZ50)	1.11 ± 0.83
小RNA病毒科	EV-A71 (SZ/HK05)	2.19 ± 1.35
	人鼻病毒B	9.35 ± 2.46
黄病毒科	ZIKV (PRVABC59)	5.70 ± 1.08
正粘病毒科	甲型流感病毒 (H1N1)pdm09	1.34 ± 1.07
腺病毒科	人AdV 5(临床隔离)	1.51 ± 0.37

图25

AM580的细胞毒性

细胞系	CC ₅₀ (μM) MTT 测定	CC ₅₀ (μM) CellTiter-Glo测定
Huh7	118.1 ± 1.1	106.2 ± 3.1
HEp-2	132.6 ± 1.2	152.6 ± 6.5
RD	127.6 ± 3.2	117.4 ± 2.1
HEK293T	115.7 ± 3.2	192.1 ± 6.3
Vero	126.7 ± 1.7	135.4 ± 2.9
MDCK	212.8 ± 12.3	142.8 ± 4.1

图26

病毒科	病毒	选择性指数 (CC ₅₀ /IC ₅₀)
冠状病毒科	MERS-CoV (HCoV-EMC/2012)	507
	SARS-CoV (GZ50)	114
小RNA病毒科	EV-A71 (SZ/HK05)	58
	HRV-B (临床隔离)	14
黄病毒科	ZIKV (PRVABC59)	22
正粘病毒科	甲型流感病毒(H1N1)pdm09	159
腺病毒科	人 AdV 5 (临床隔离)	51

图27

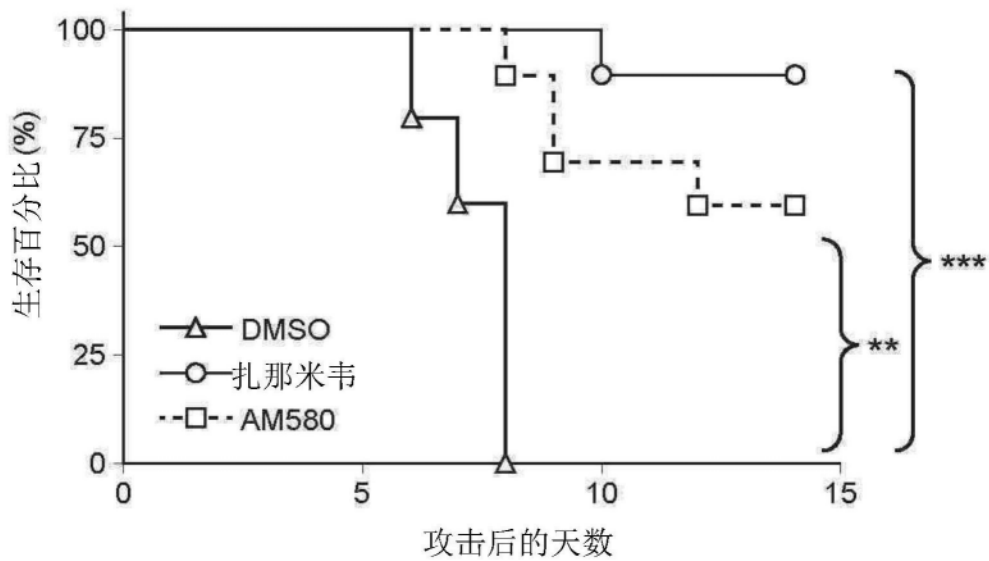


图28

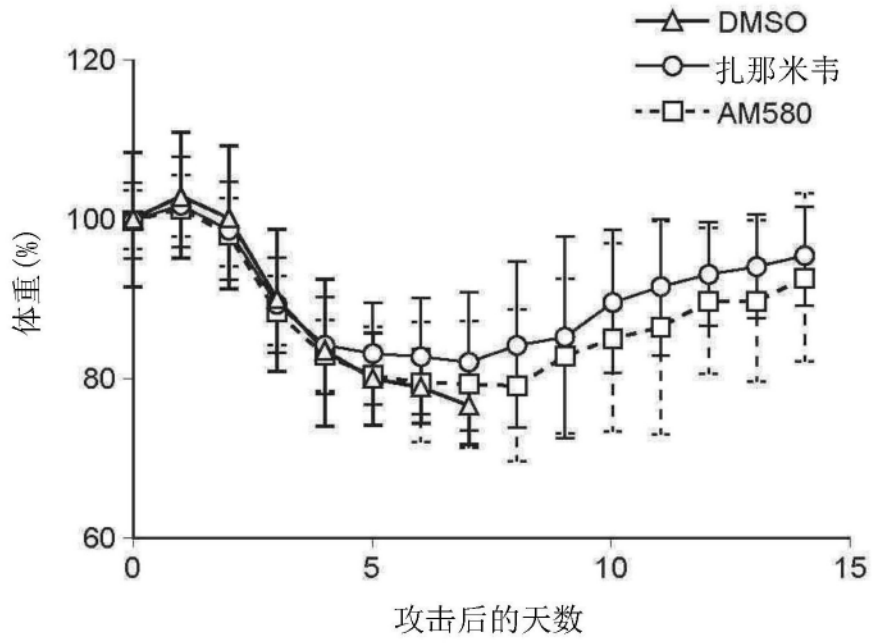


图29

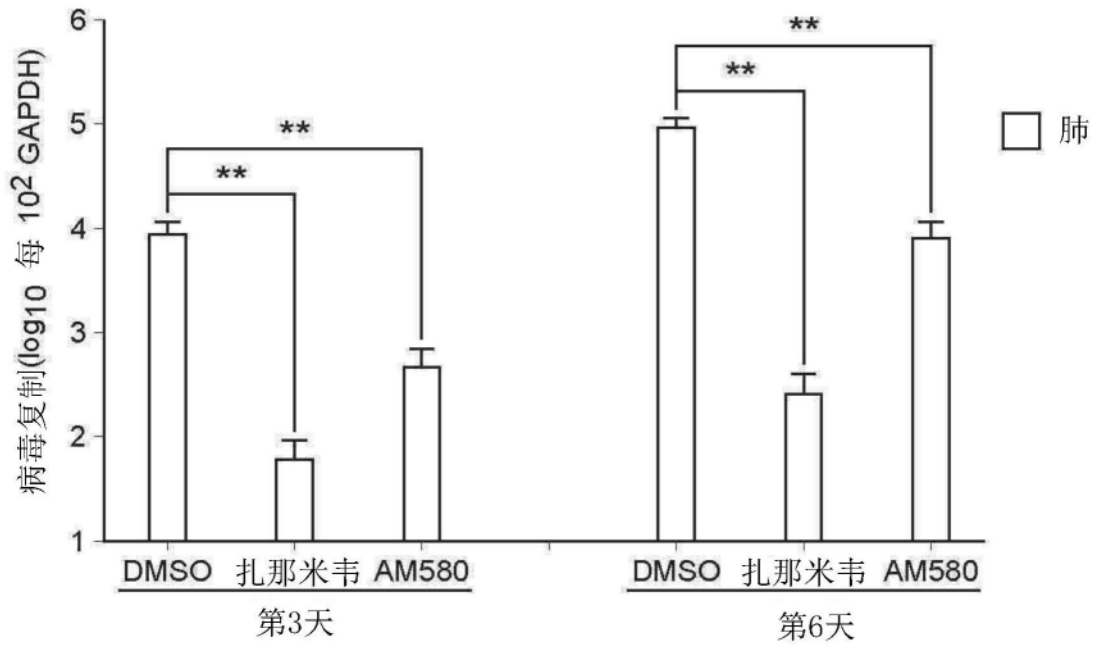


图30

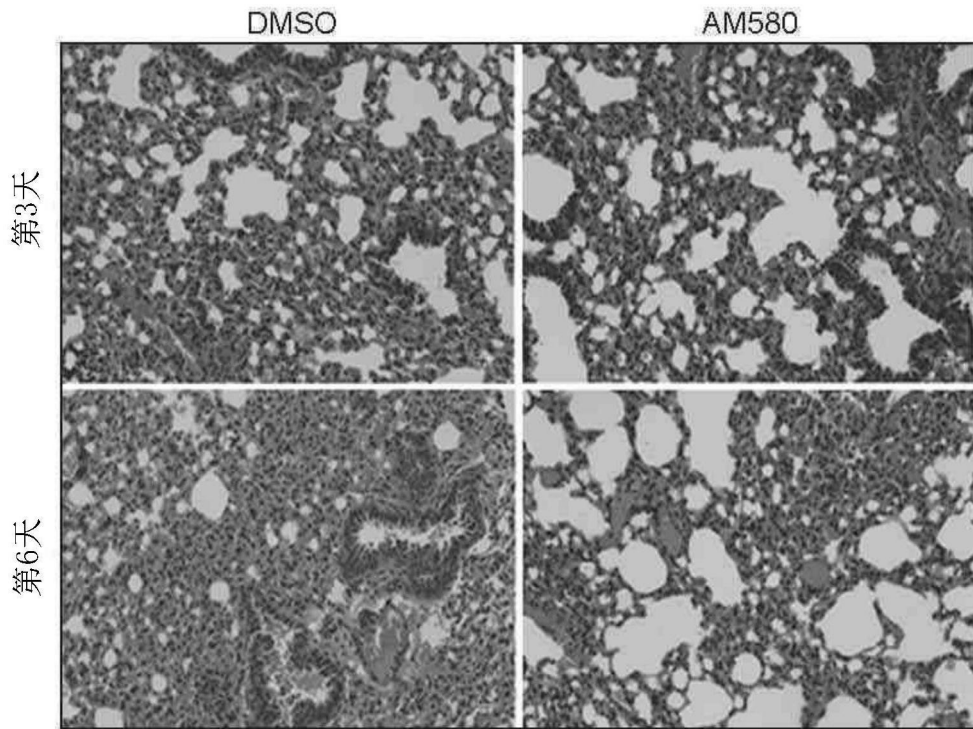


图31

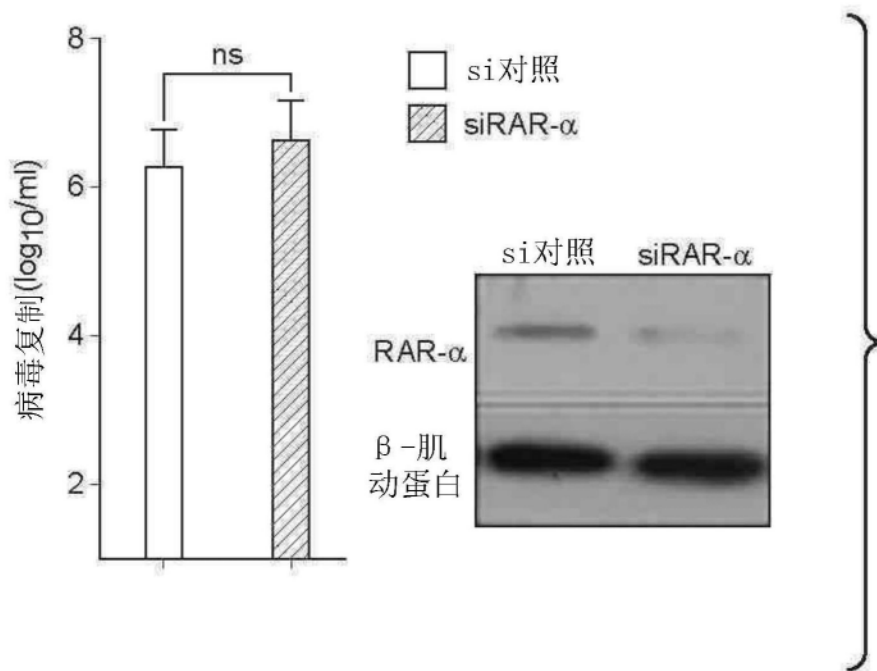


图32

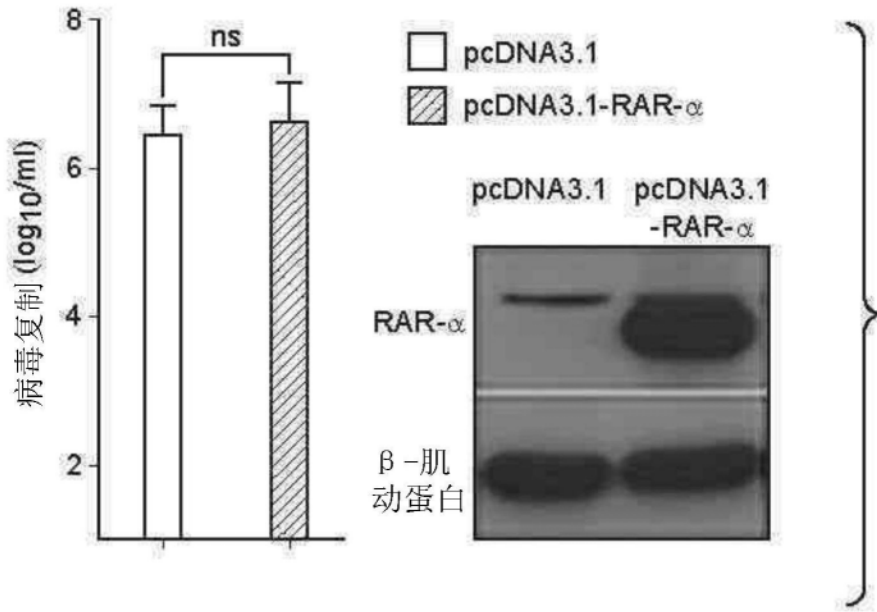


图33

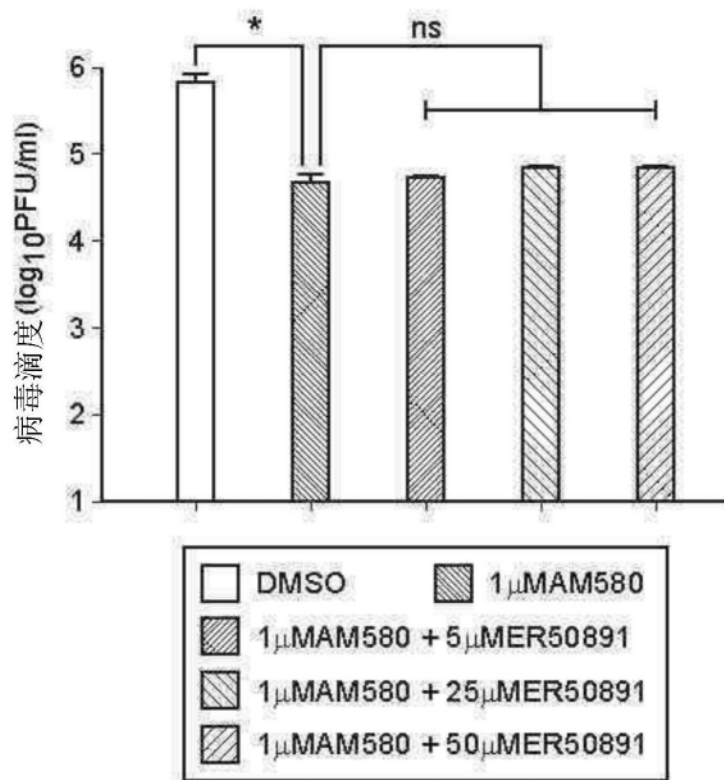


图34

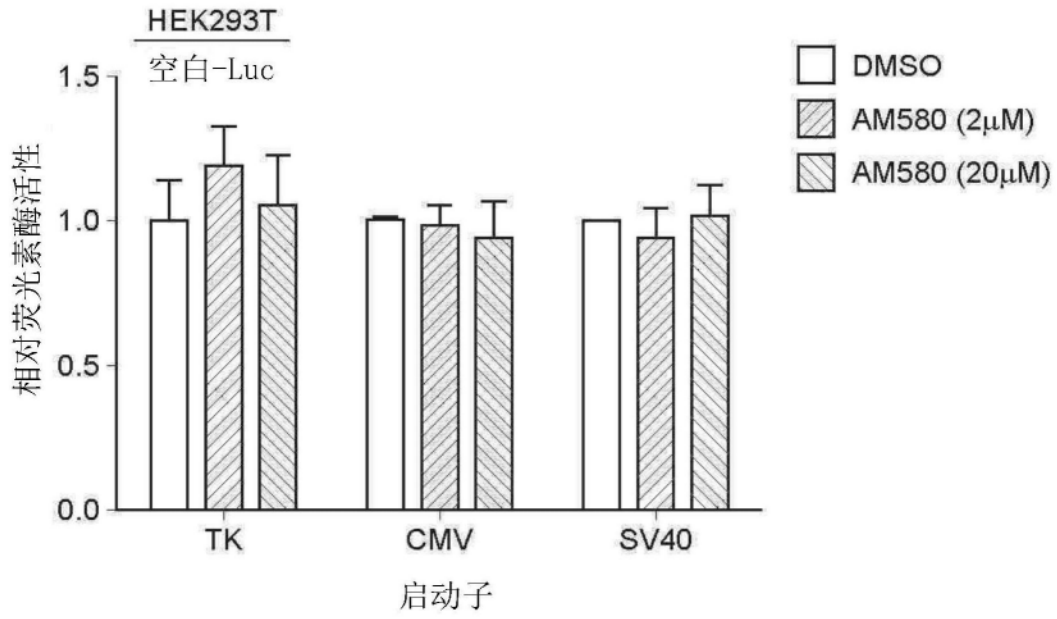


图35

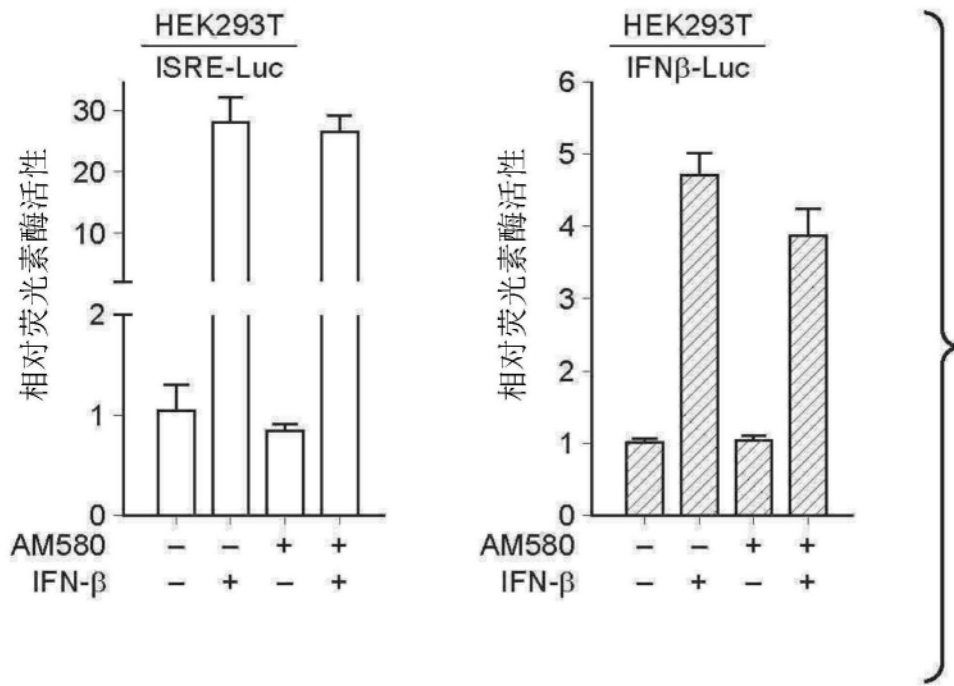


图36

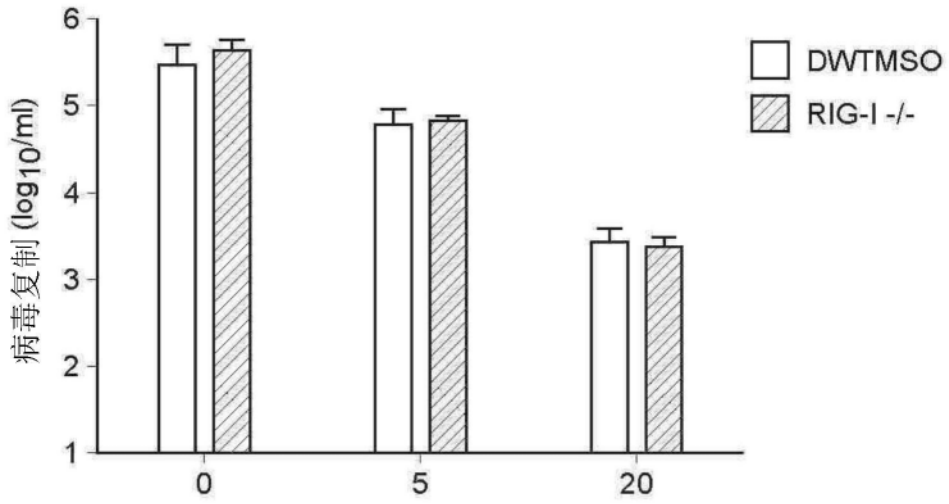


图37

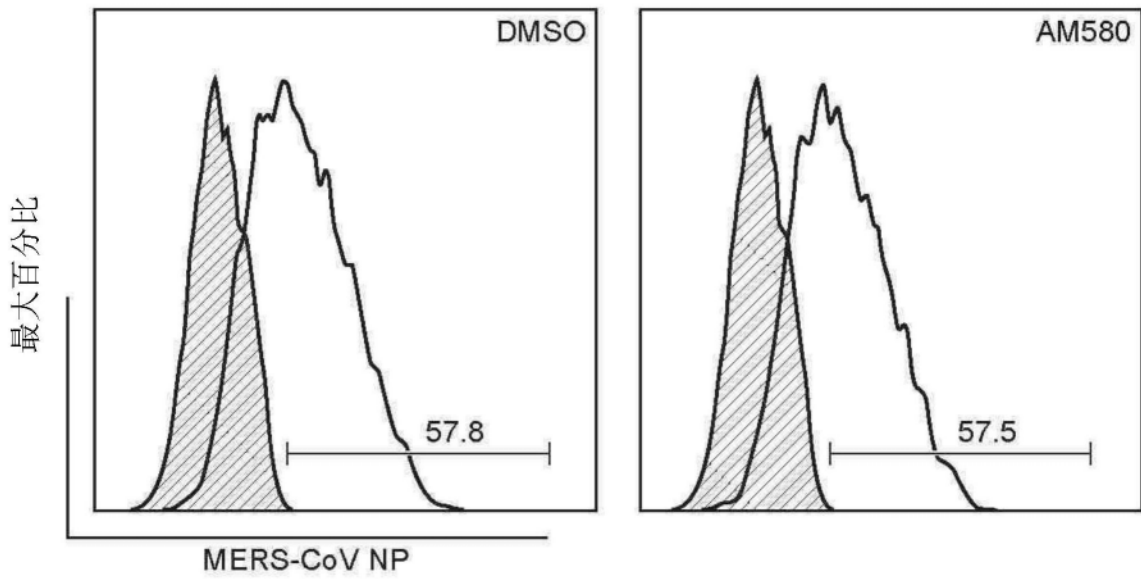


图38

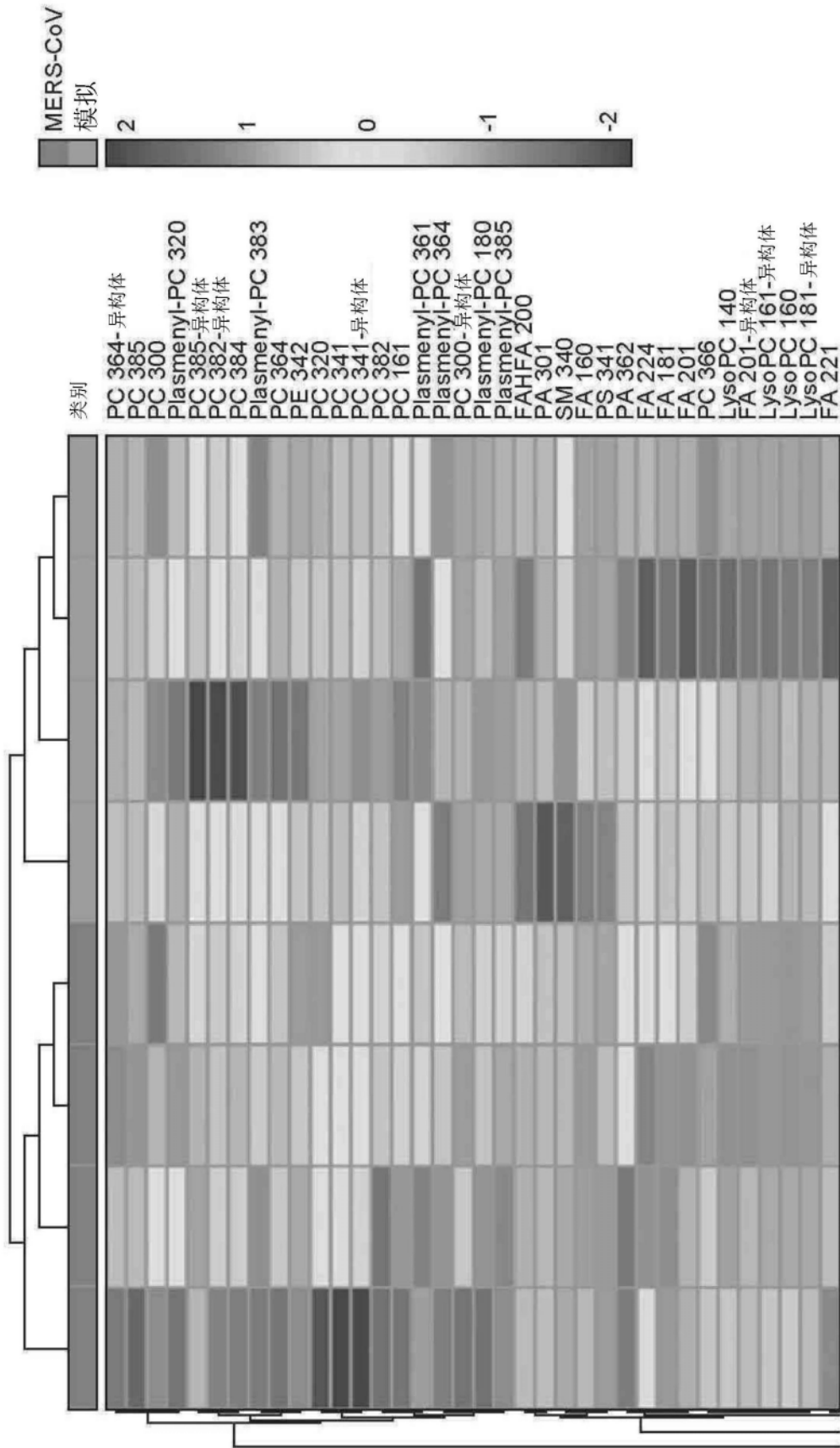


图39A

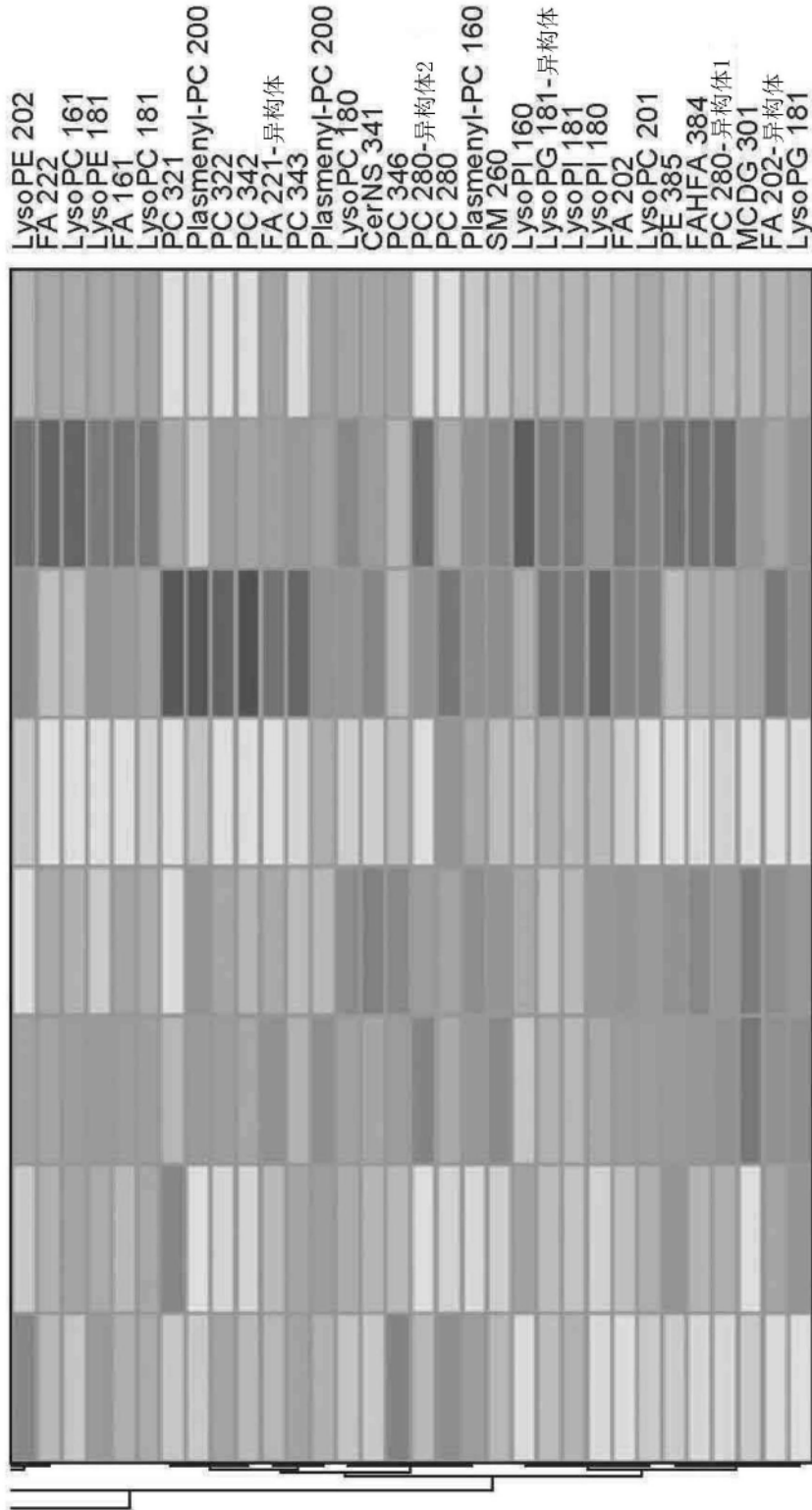


图39B

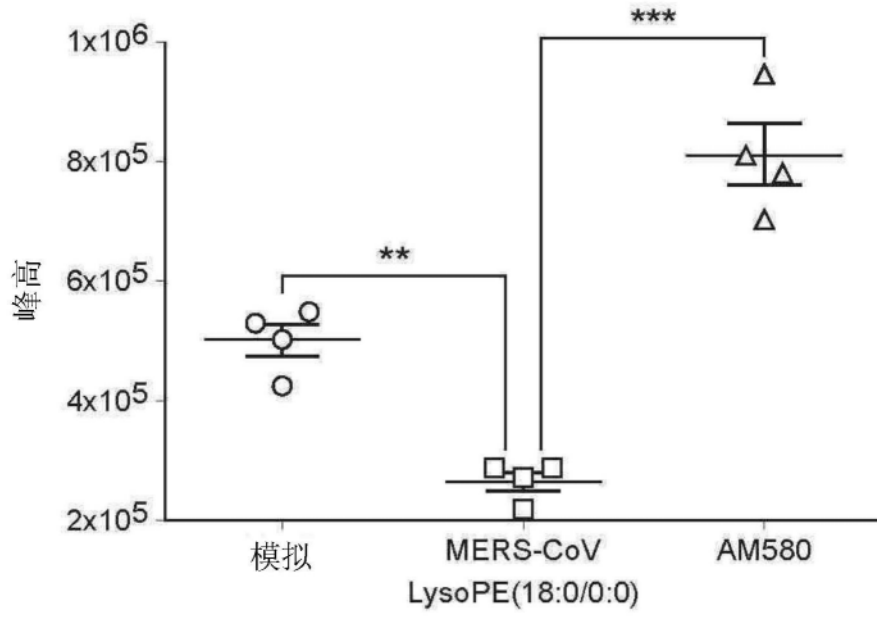


图40

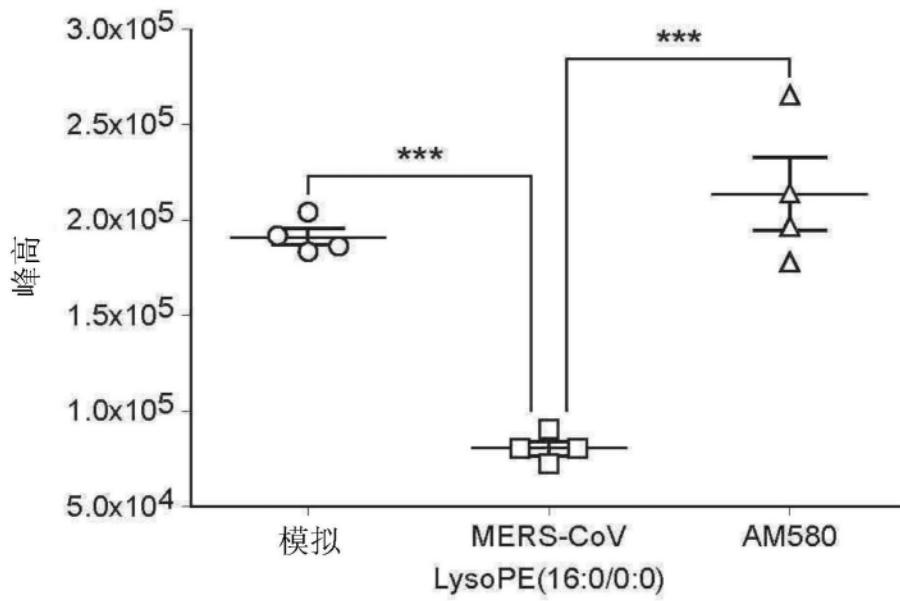


图41

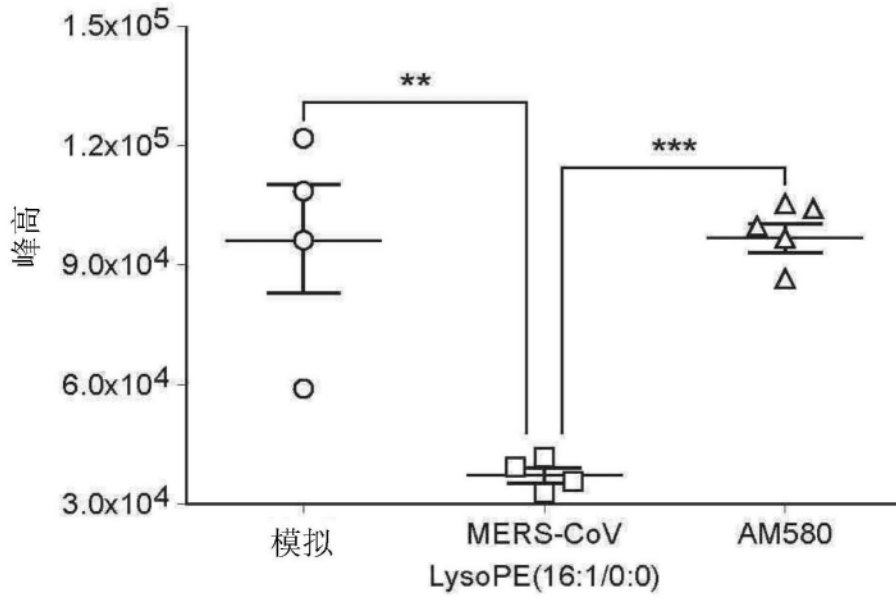


图42

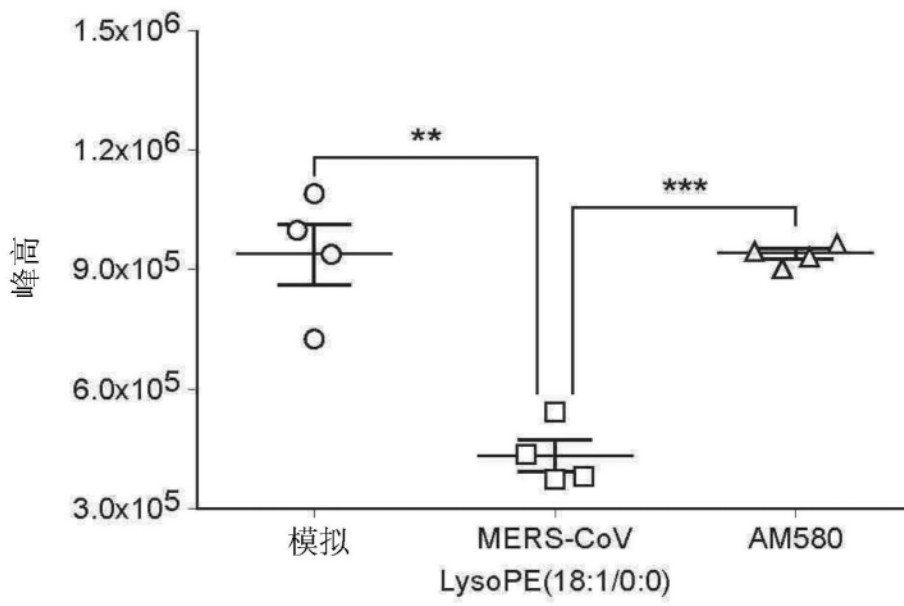


图43

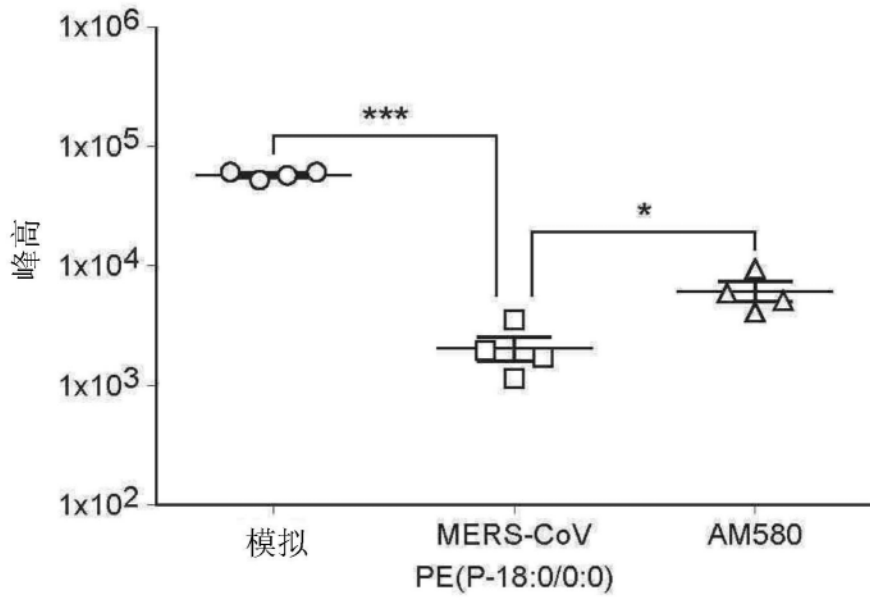


图44

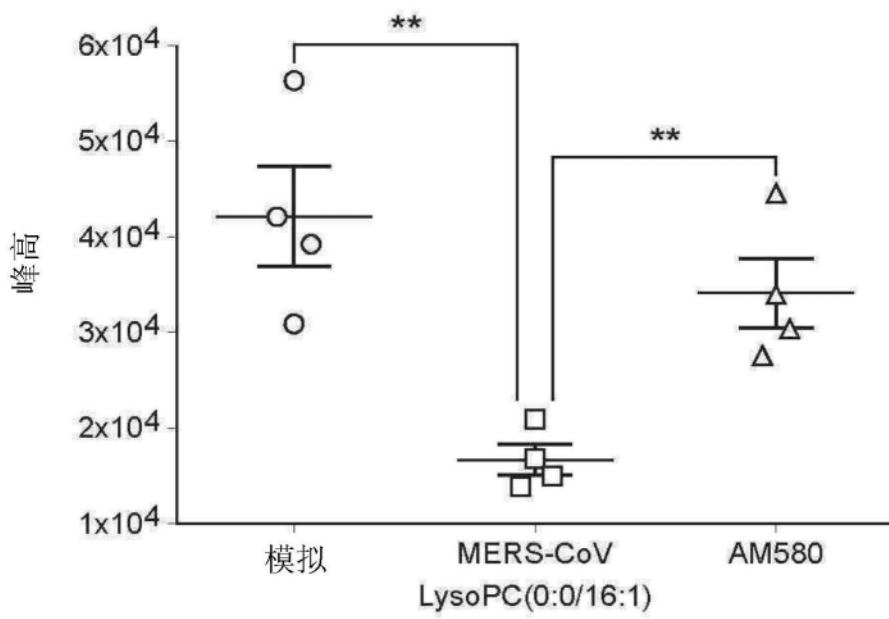


图45

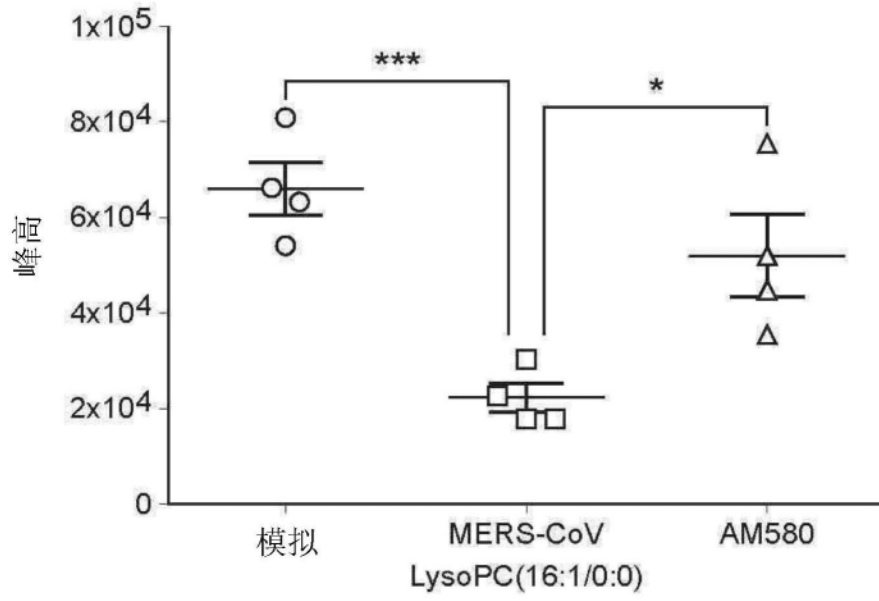


图46

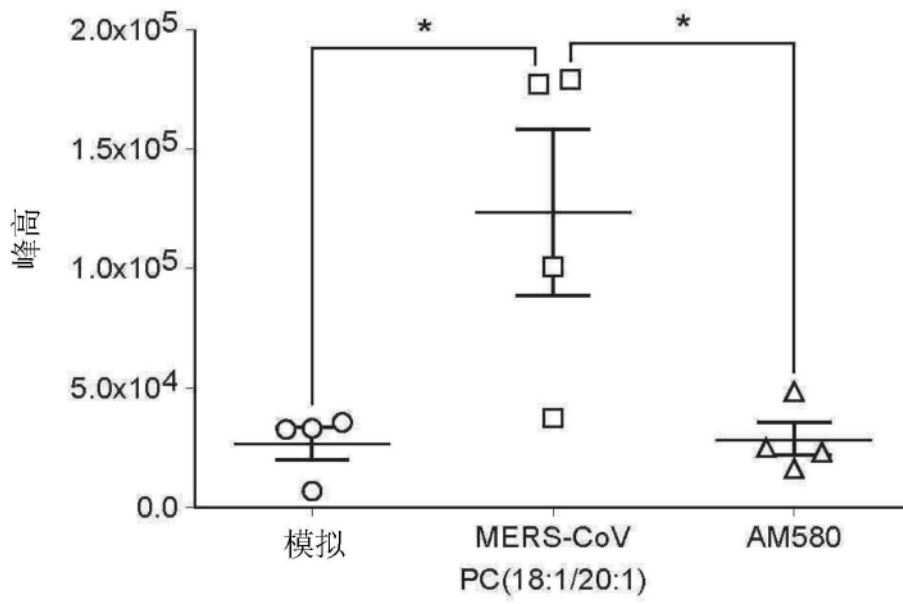


图47

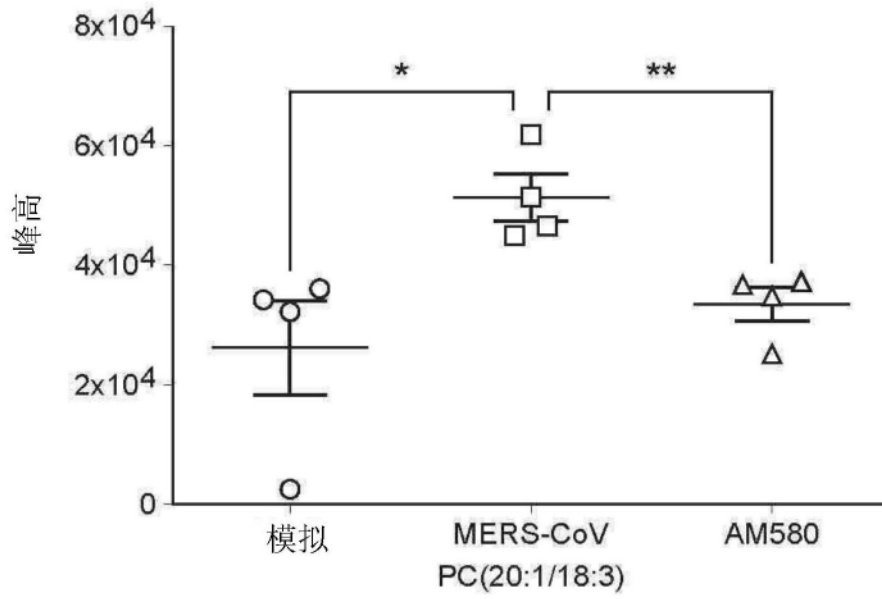


图48

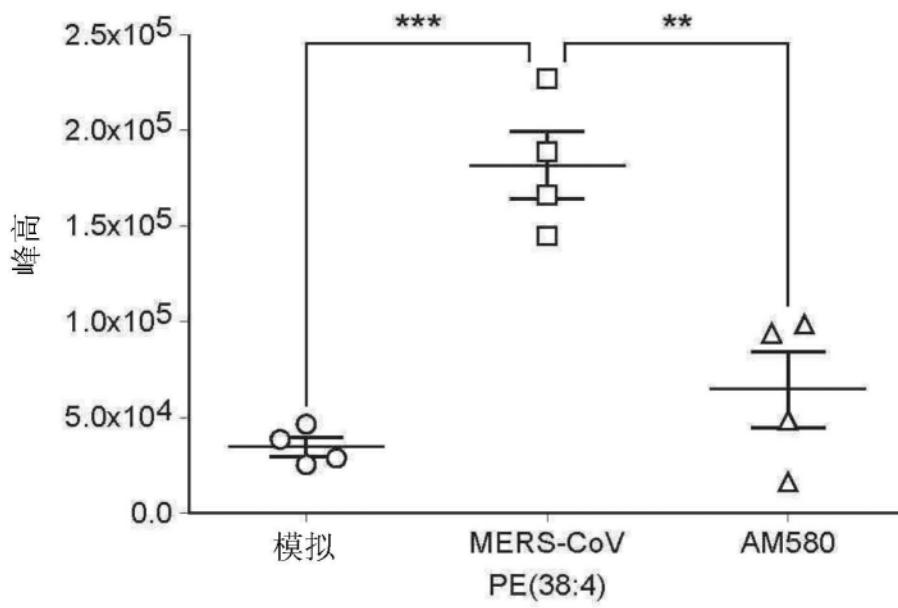


图49

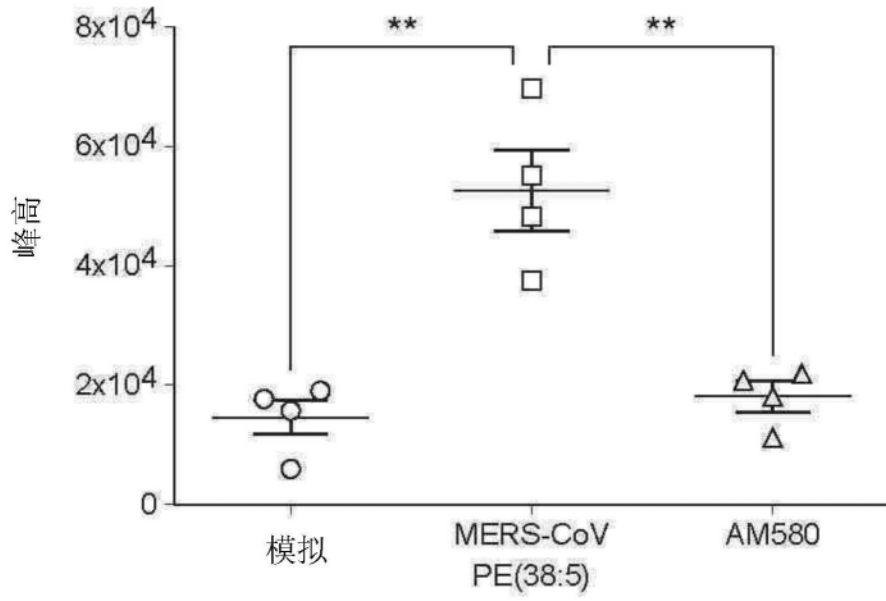


图50

脂质滴

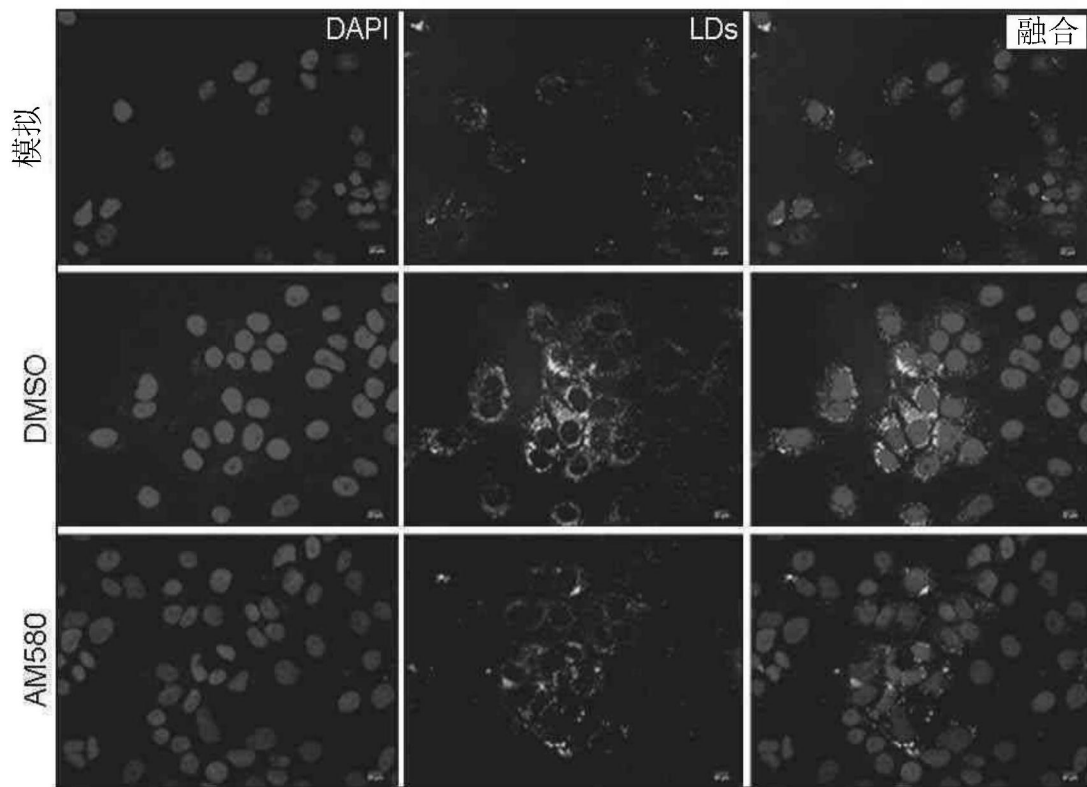


图51

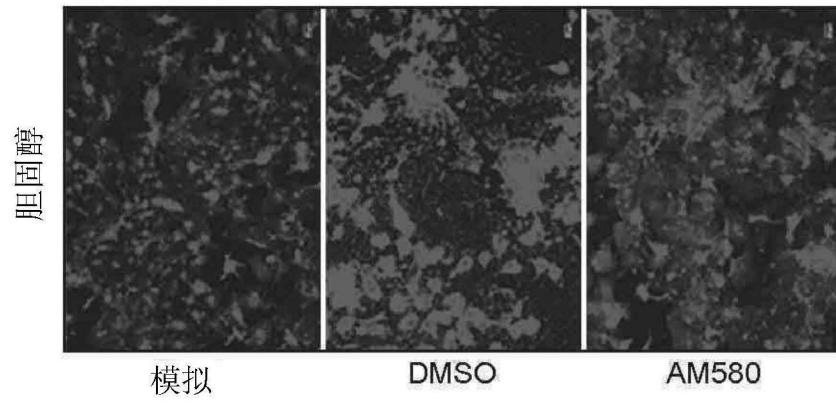


图52

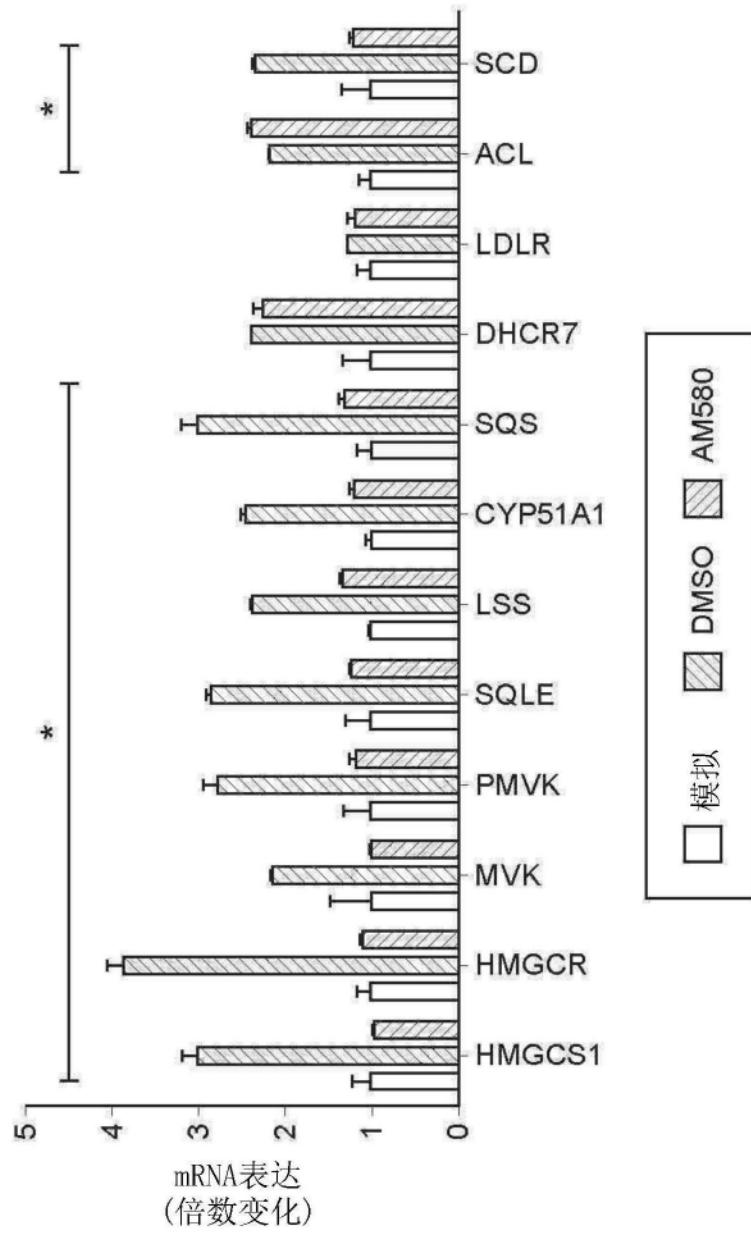


图54

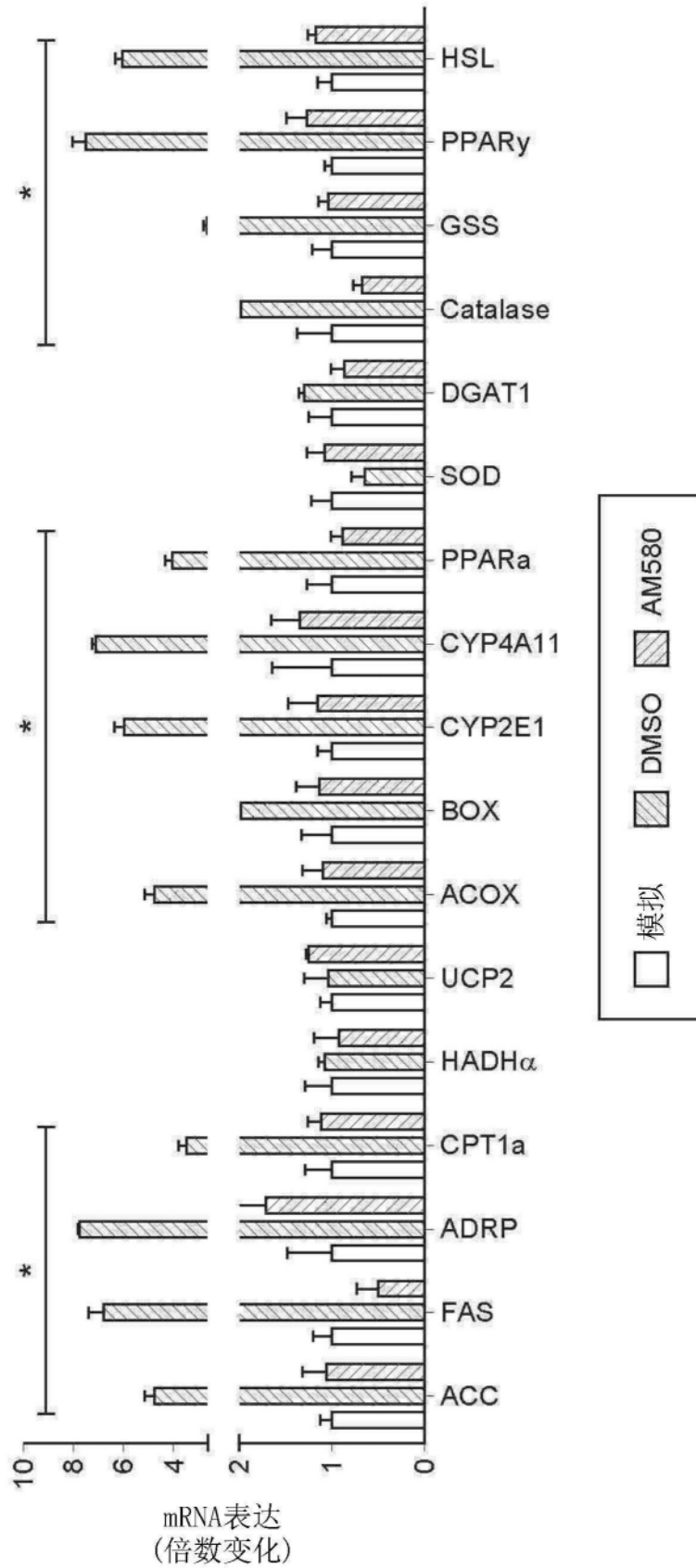


图53

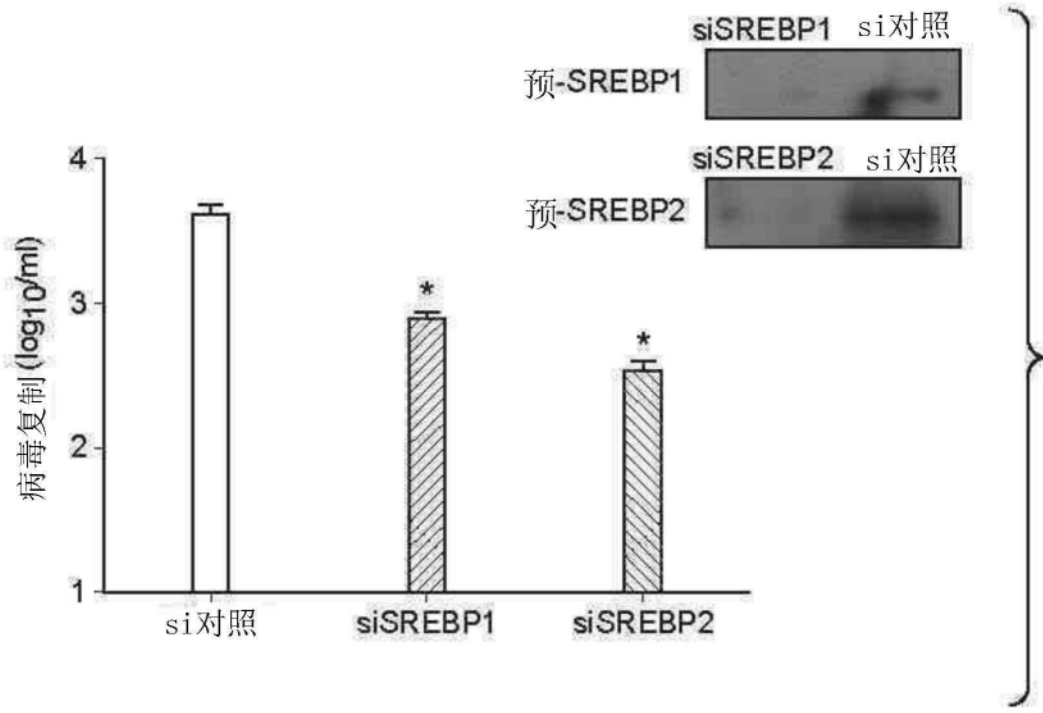


图55

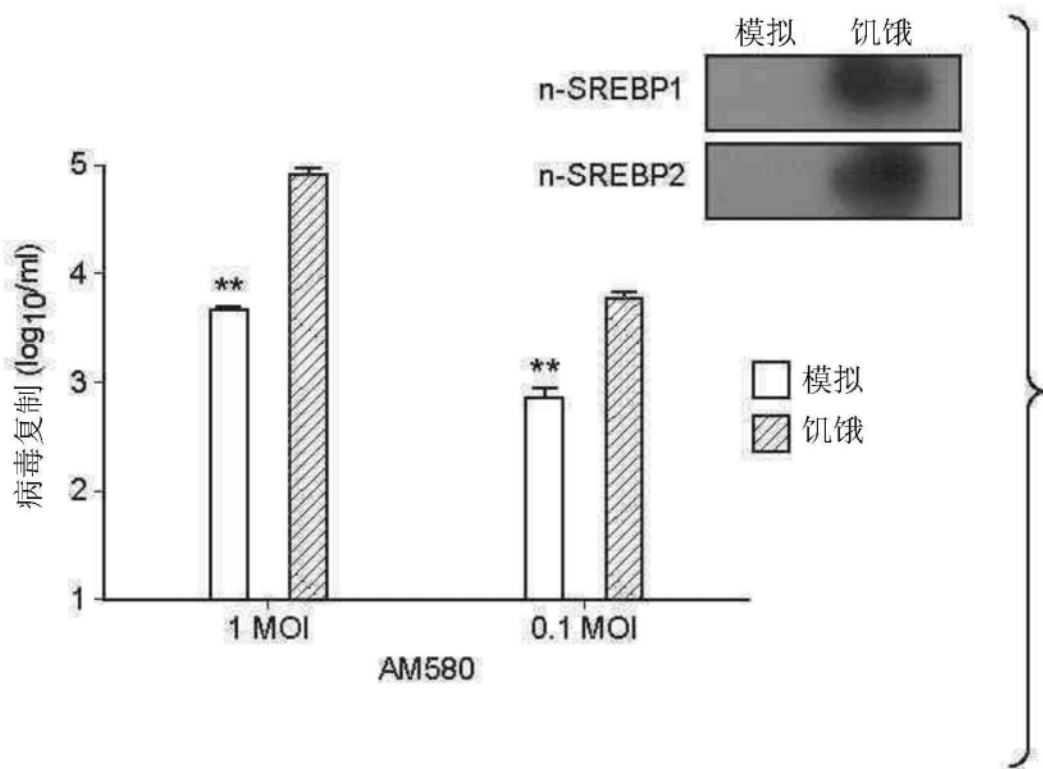


图56

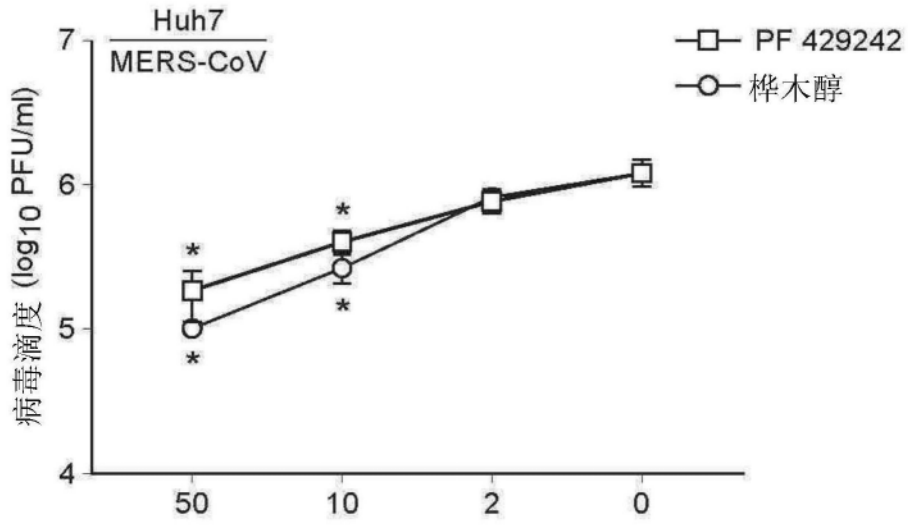


图57

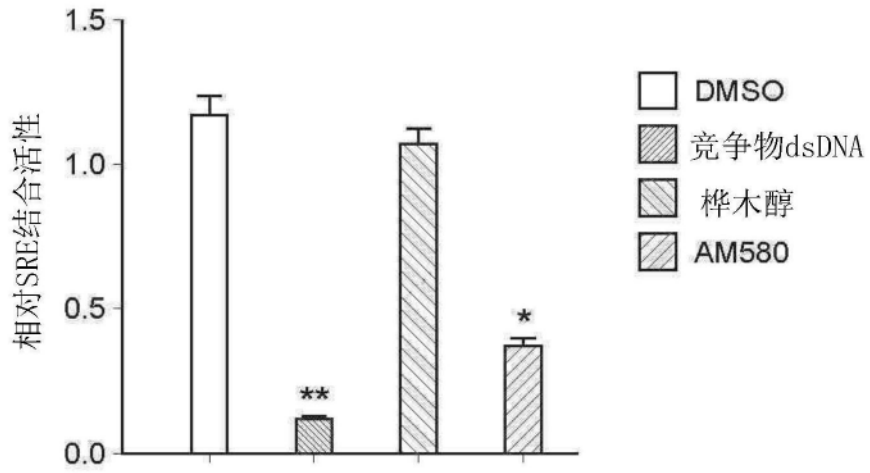


图58

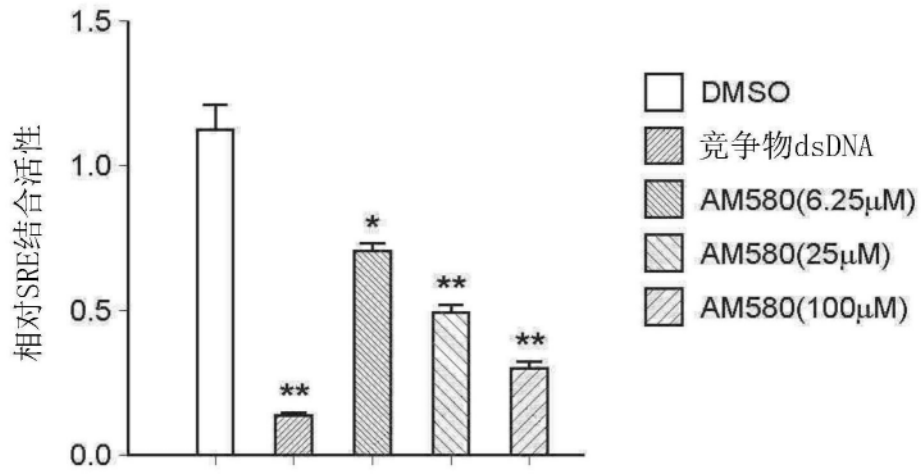


图59

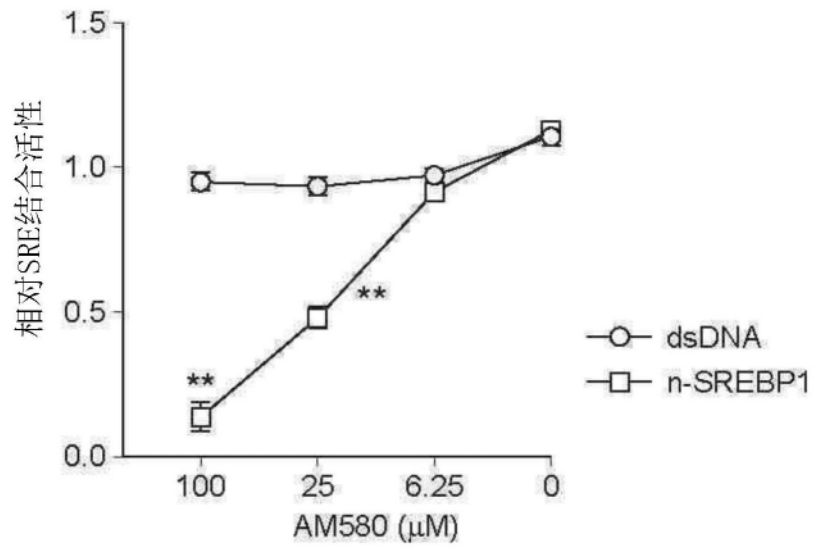


图60

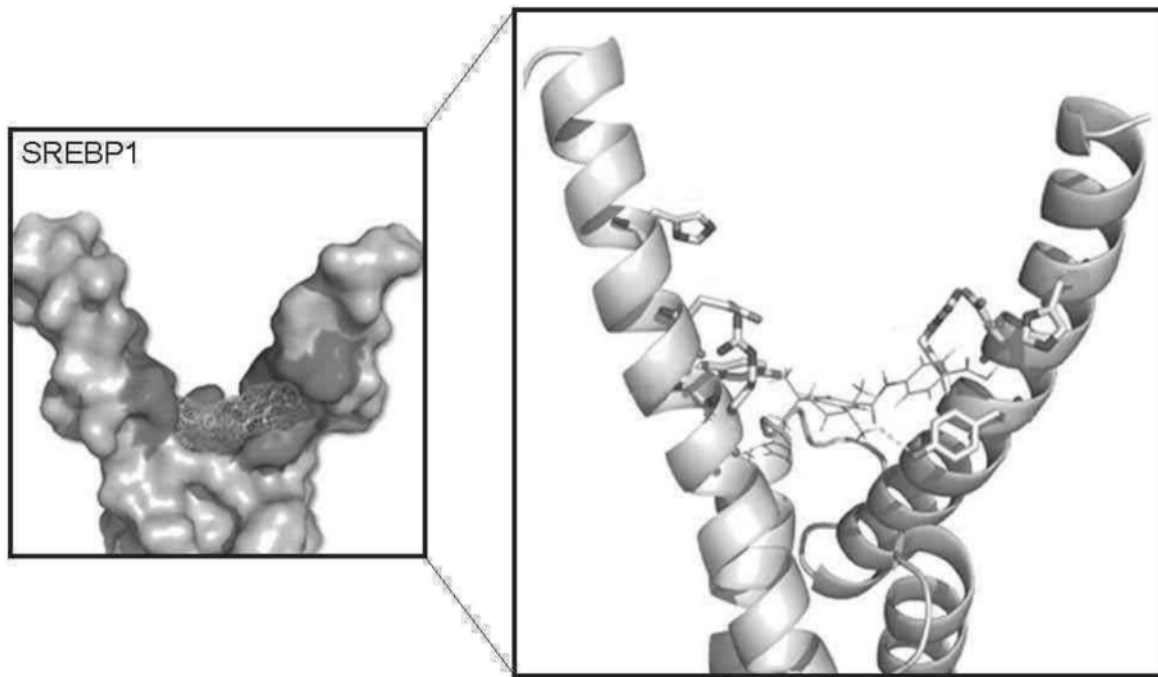


图62

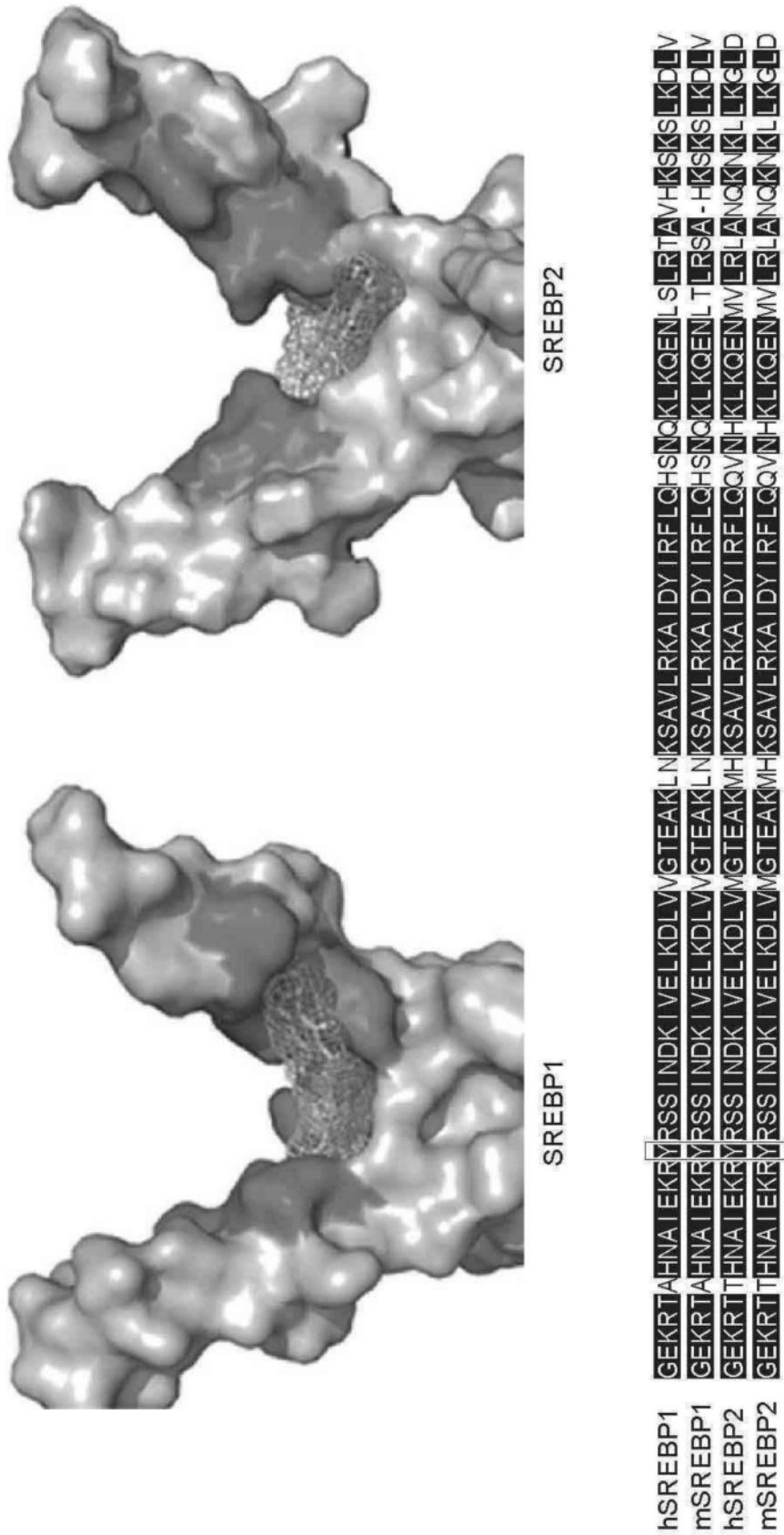


图61

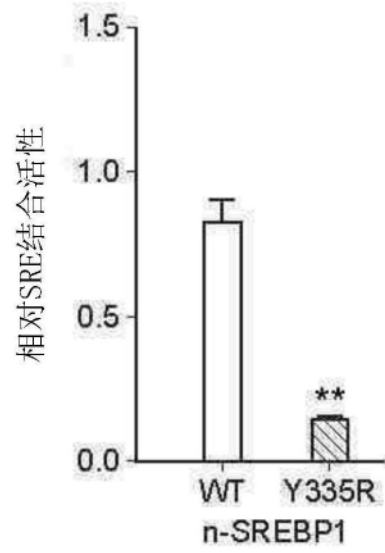


图63

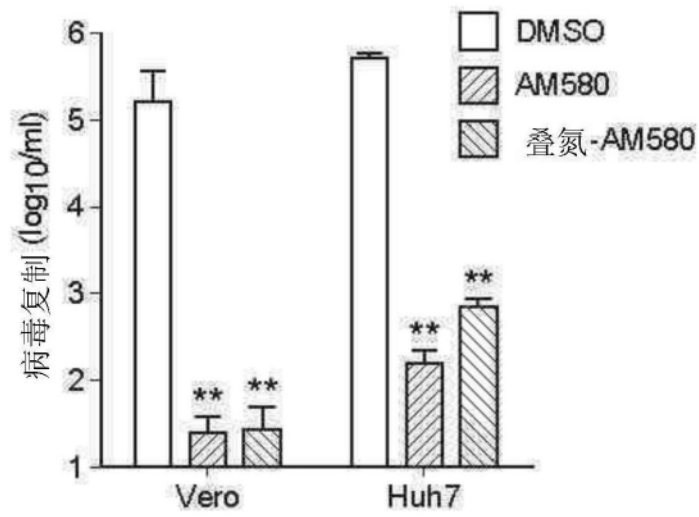


图64

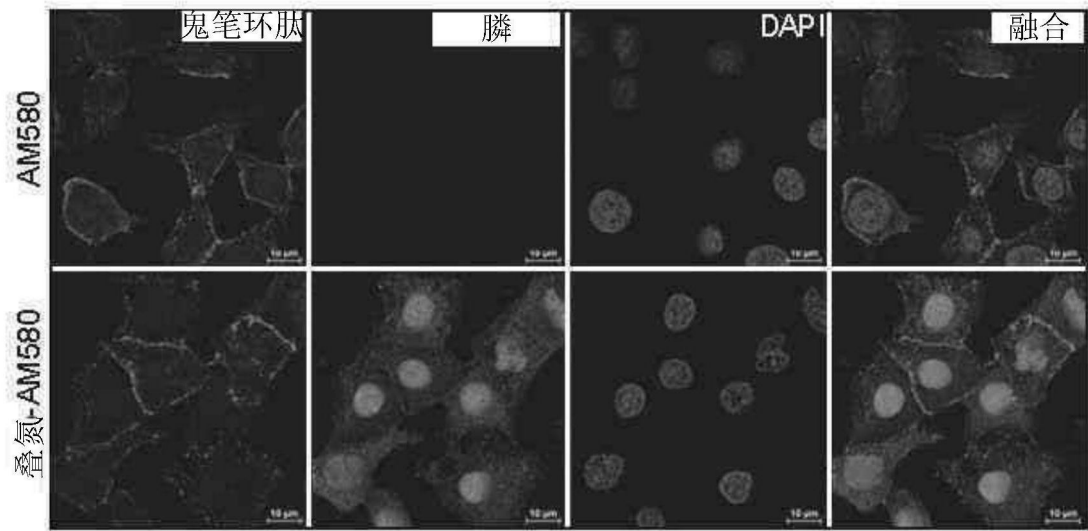


图65

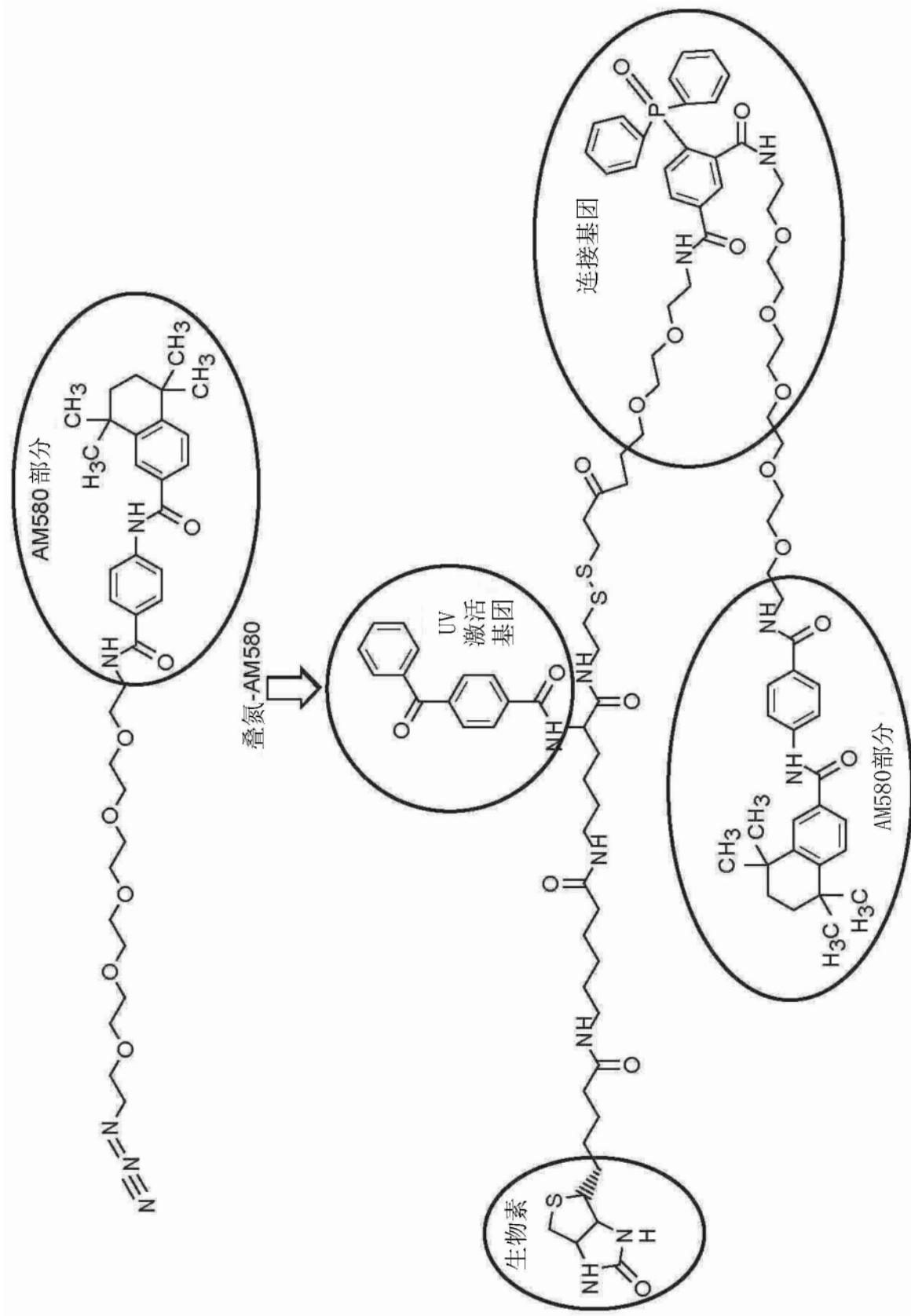


图66

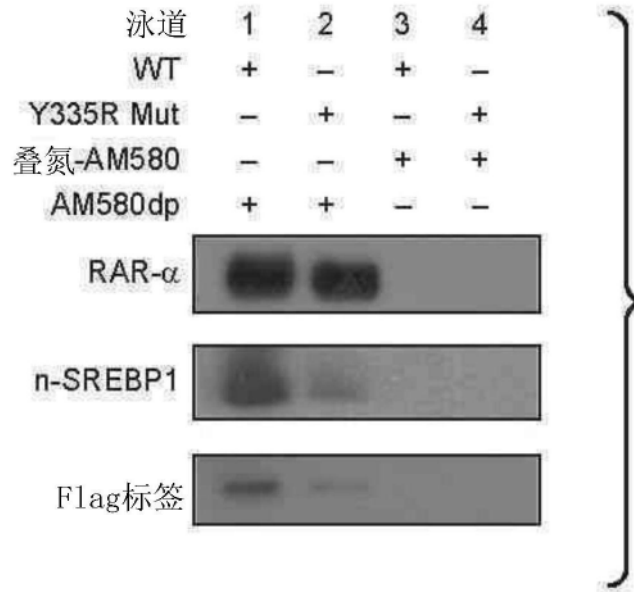


图67

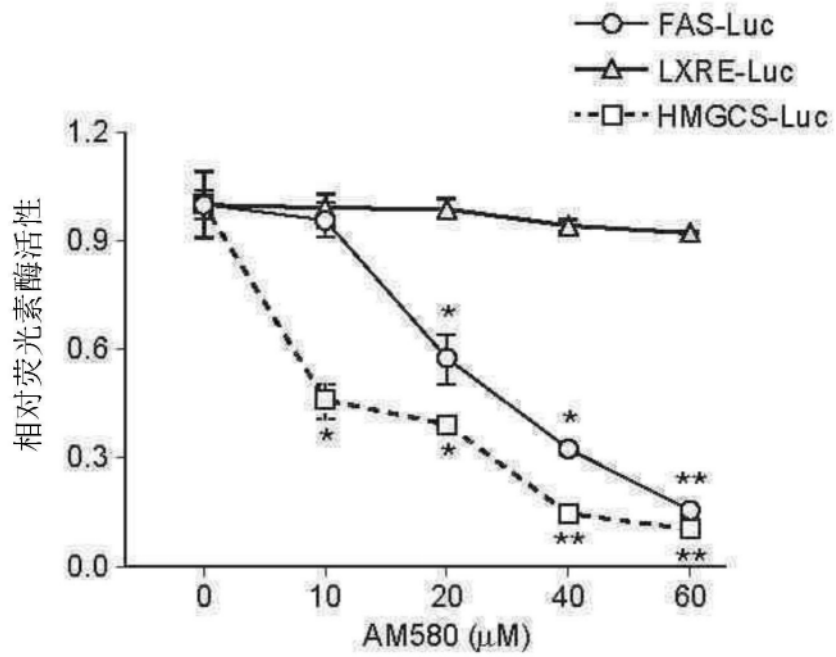


图68

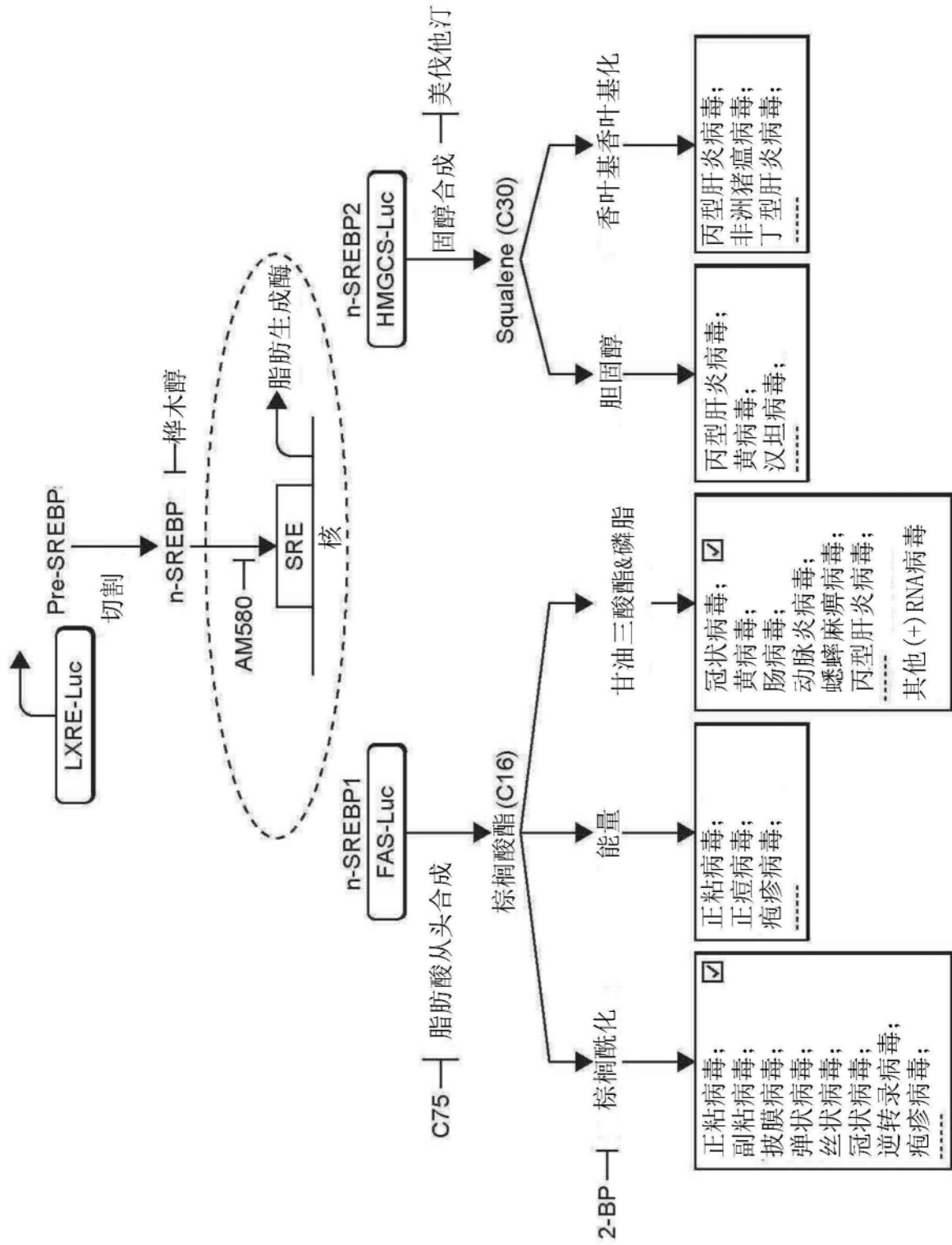


图69

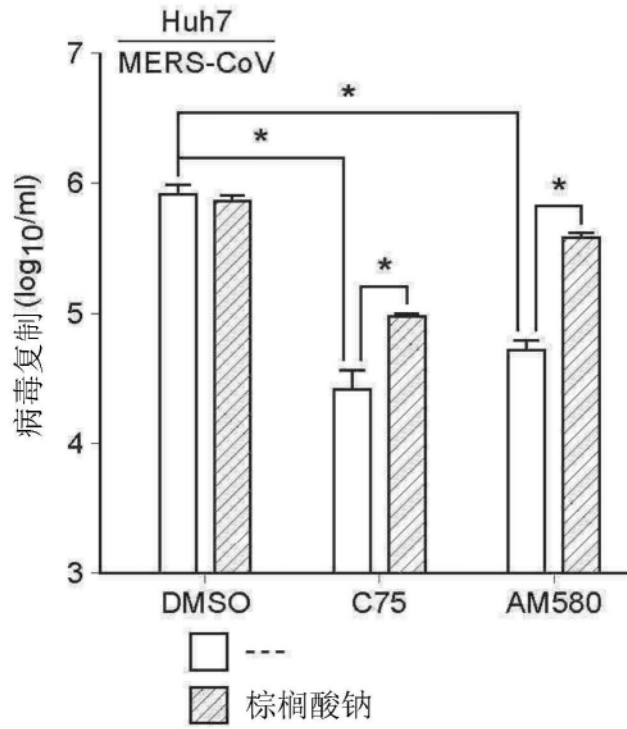


图70

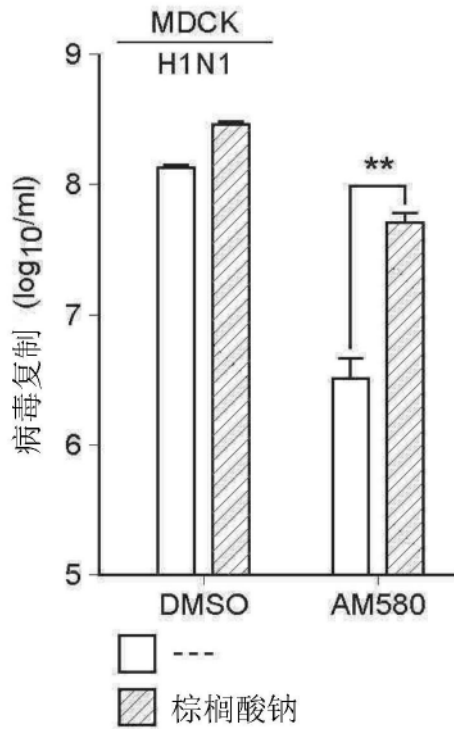


图71

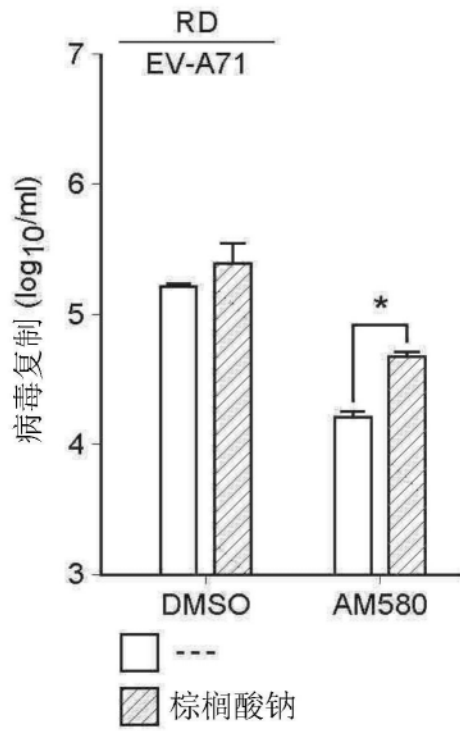


图72

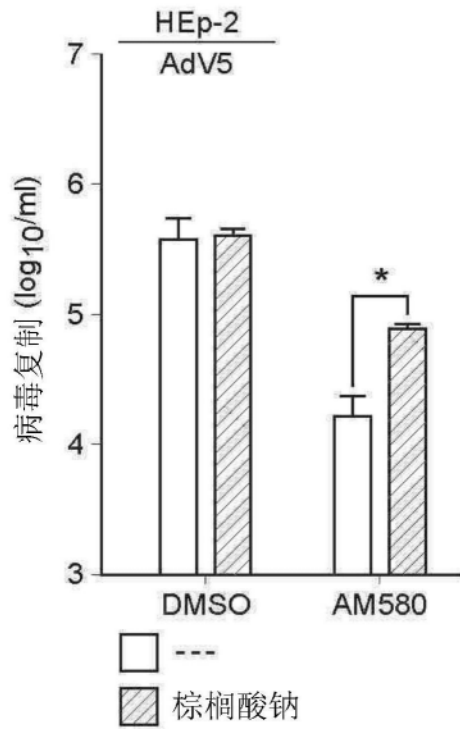


图73

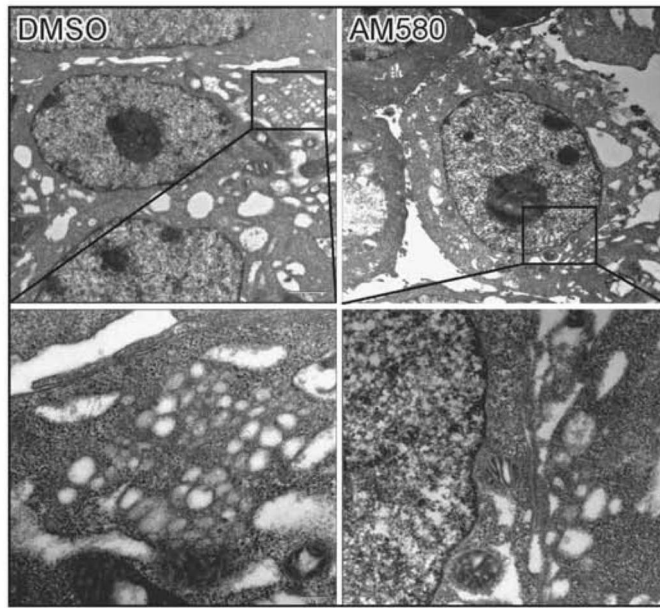


图74

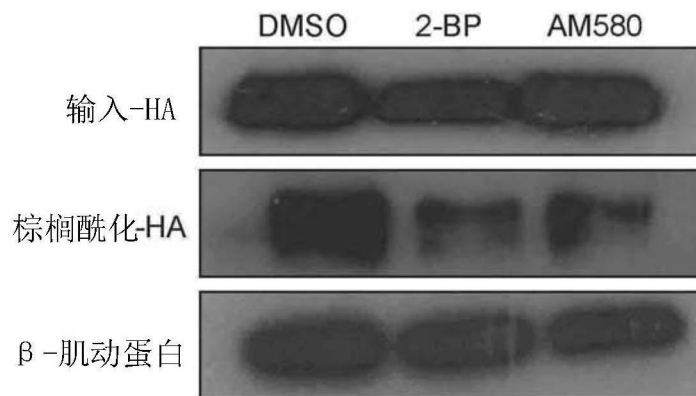


图75

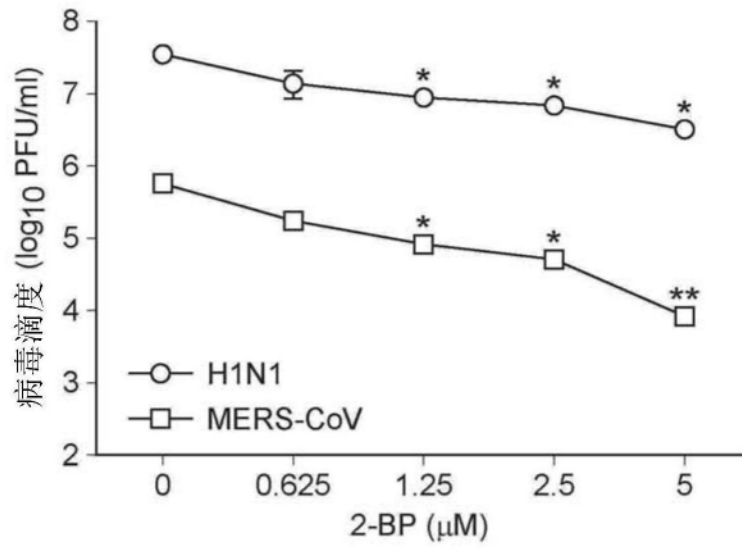


图76