



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115192599 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 16

(21) 申请号 202210961662.X

A61K 45/06 (2006.01)

(22) 申请日 2022.08.11

A61P 31/20 (2006.01)

A61K 31/57 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115192599 A

(43) 申请公布日 2022.10.18

(73) 专利权人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所(中国动物卫生与流行病学中心哈尔滨分中心)

地址 150069 黑龙江省哈尔滨市香坊区哈平路678号

(72) 发明人 赵东明 步志高 朱远茂 李芳 孙恩成 张振江

(74) 专利代理机构 北京爱棱台知识产权代理事务所(普通合伙) 16054

专利代理师 张洪生 武志宏

(56) 对比文件

CN 111789861 A, 2020.10.20

CN 113082049 A, 2021.07.09

CN 113797184 A, 2021.12.17

WO 2020193688 A2, 2020.10.01

Chen, WY et al.. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. SCIENCE CHINA-LIFE SCIENCES. 2020, 第63卷623-634.

王露露等. 非洲猪瘟病毒pA1 04R蛋白单克隆抗体的制备与应用. 中国预防兽医学报. 2021, 第43卷1-5.

审查员 蔡维

(51) Int. Cl.

A61K 31/7052 (2006.01)

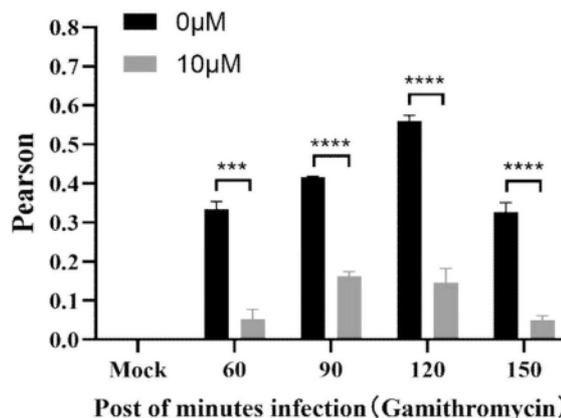
权利要求书2页 说明书13页 附图13页

(54) 发明名称

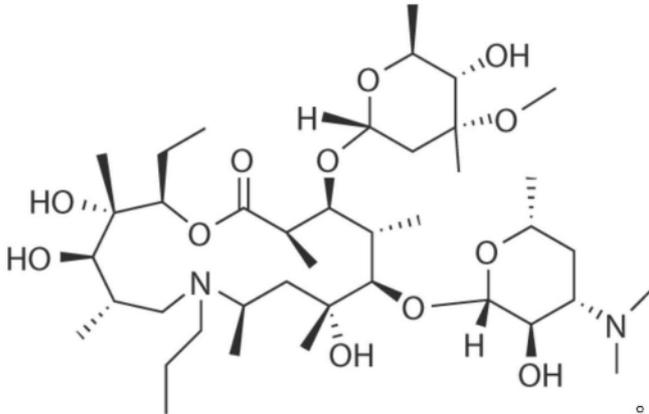
一种加米霉素在制备治疗非洲猪瘟的制剂中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种加米霉素在制备用于治疗或减缓非洲猪瘟或抑制非洲猪瘟病毒增殖的制剂中的应用。加米霉素能够有效抑制ASFV进入PAM的晚期内吞体中,使ASFV不能脱壳释放基因组进入细胞核,从而能够有效抑制非洲猪瘟病毒的增殖,为治疗或减缓非洲猪瘟提供了新的活性药物与药物组合物的物质基础。本发明还公开了含有加米霉素的药物组合物,组合物能够更好地抑制非洲猪瘟病毒的增殖。



1. 一种活性物质在制备用于减缓、治疗或控制非洲猪瘟和/或抑制非洲猪瘟病毒增殖的制剂中的应用,所述活性物质为加米霉素与加米霉素的药用盐中的任一种或两种的组合;所述加米霉素的结构式为:



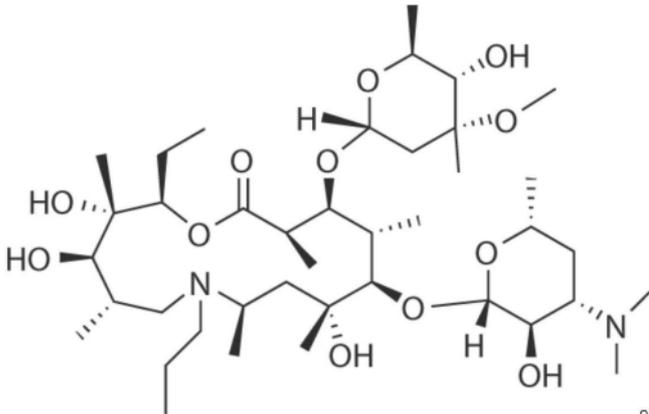
2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述活性物质为唯一药物活性物质。

3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述加米霉素的药用盐包括:加米霉素的甲磺酸盐、甲磺酸盐、苹果酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐、碳酸盐、磷酸盐、氢溴酸盐和氢碘酸盐。

4. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述制剂为药物。

5. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述制剂为饲料添加剂。

6. 一种活性物质在制备用于通过抑制非洲猪瘟病毒进入易感细胞的晚期内吞体中而减缓、治疗或控制非洲猪瘟或抑制非洲猪瘟病毒增殖的制剂中的应用,所述活性物质为加米霉素与加米霉素的药用盐中的任一种或两种的组合;所述加米霉素的结构式为:



7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述活性物质为唯一药物活性物质。

8. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述加米霉素的药用盐包括:加米霉素的甲磺酸盐、甲磺酸盐、苹果酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐、碳酸盐、磷酸盐、氢溴酸盐和氢碘酸盐。

9. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述易感细胞为猪肺泡巨噬细胞。

10. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述制剂为药物。

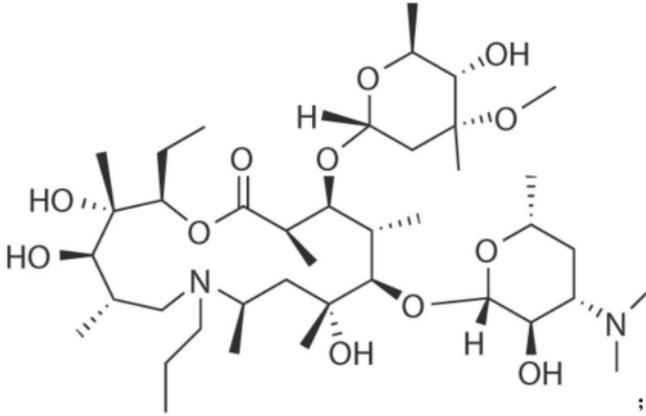
11. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述制剂为饲料添加剂。

12. 一种药物组合物,所述药物组合物的药物活性成分包括第一活性物质和第二活性物质;

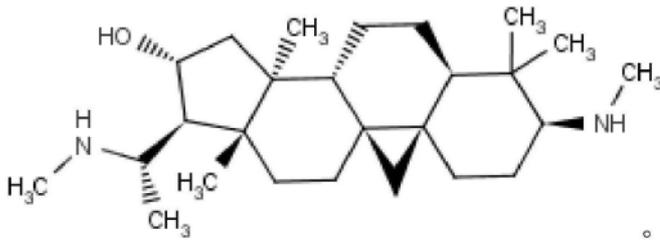
所述第一活性物质为加米霉素与加米霉素的药用盐中的任一种或两种的组合;

所述第二活性物质为环维黄杨星D与环维黄杨星D的药用盐中的任一种或两种的组合;

所述加米霉素的结构式为:



所述环维黄杨星D的结构式为:



13. 如权利要求12所述的药物组合物,其特征在于,所述第一活性物质与所述第二活性物质的摩尔量比为1:0.1-10。

14. 如权利要求13所述的药物组合物,其特征在于,所述第一活性物质与所述第二活性物质的摩尔量比为1:0.2-5。

15. 如权利要求14所述的药物组合物,其特征在于,所述第一活性物质与所述第二活性物质的摩尔量比为1:1。

16. 如权利要求12所述的药物组合物,其特征在于,所述加米霉素的药用盐包括:加米霉素的甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苹果酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、二盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐、碳酸盐、磷酸盐、氢溴酸盐和氢碘酸盐。

17. 如权利要求12所述的药物组合物,其特征在于,所述环维黄杨星D的药用盐包括:环维黄杨星D的甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苹果酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐、碳酸盐、磷酸盐、氢溴酸盐和氢碘酸盐。

18. 如权利要求12-17中任一种所述的药物组合物在制备用于减缓、治疗或控制非洲猪瘟和/或抑制非洲猪瘟病毒增殖的制剂中的应用。

19. 如权利要求18所述的应用,其特征在于,所述制剂为药物。

20. 如权利要求18所述的应用,其特征在于,所述制剂为饲料添加剂。

一种加米霉素在制备治疗非洲猪瘟的制剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于制药学领域,涉及一种加米霉素在制备治疗非洲猪瘟的制剂中的应用。

背景技术

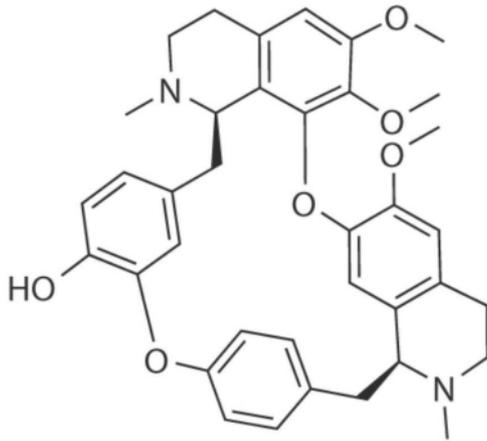
[0002] 非洲猪瘟病毒(African Swine Fever Virus,ASFV)是非洲猪瘟病毒科(Asfarviridae)唯一的成员,也是唯一已知的DNA虫媒病毒,强毒感染死亡率高达100%,严重威胁世界养猪业的健康发展。ASFV主要传播媒介是家猪、野猪和软蜱。该病毒分为24个基因型,8个血清型,基因I和II型是目前的流行毒株。

[0003] 迄今为止,尚未研制出针对ASF的有效疫苗和抗病毒药物,主要原因是该病毒基因组庞大和结构复杂,另外病毒免疫逃逸机制和宿主保护性免疫机理尚不清楚。根据ASFV的复制机制,潜在的抗病毒药物可分为两类:(1) 通过靶向病毒蛋白直接作用于ASFV的抑制剂(直接作用的抗病毒药物);(2) 靶向ASFV复制的细胞因子的抑制剂(宿主靶向抗病毒药物)。虽然已经报道了各种类型抗ASFV的活性药物,但这些化合物的体内疗效尚未得到评估。目前在临床上仍然缺乏有效的治疗和预防ASFV的药物。因此,开展抗ASFV 的药物研究很有必要,可以为ASF防控提供物质基础。

[0004] 化合物二盐酸小檗胺(Berbamine(dihydrochloride),CAS:6078-17-7) 和小檗胺(Berbamine,CAS:478-61-5)是一种从中草药黄芦木中分离而来的双苜基异喹啉类天然产物。它们是bcr/abl的新型抑制剂和NF- κ B的抑制剂,具有抗白血病活性,可以抑制癌细胞的生长,并诱导人骨髓瘤细胞凋亡。

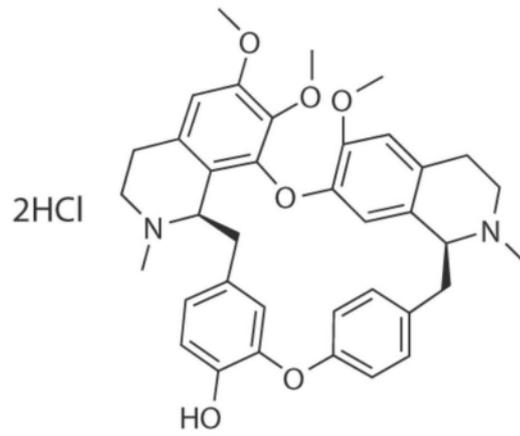
[0005] 化合物加米霉素(Gamithromycin,CAS:145435-72-9)是一种新的大环内酯类抗生素,主要用于治疗牛的呼吸系统疾病。

[0006] 化合物环维黄杨星D(Cycloviobuxin D,CAS:860-79-7)是小叶黄杨中提取的活性化合物,用于治疗急性心肌缺血。

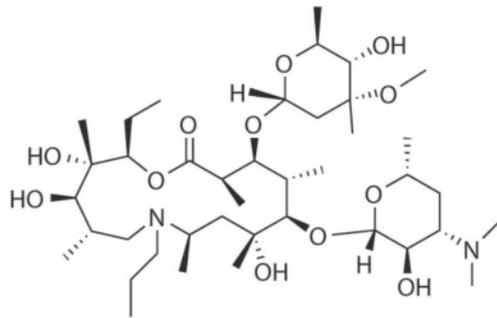


[0007]

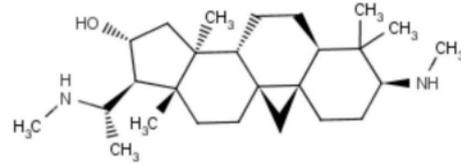
二盐酸小檗胺结构式



小檗胺结构式



加米霉素结构式



环维黄杨星 D 结构式

[0008] 未见该4种化合物能够治疗或预防ASFV感染的报道。

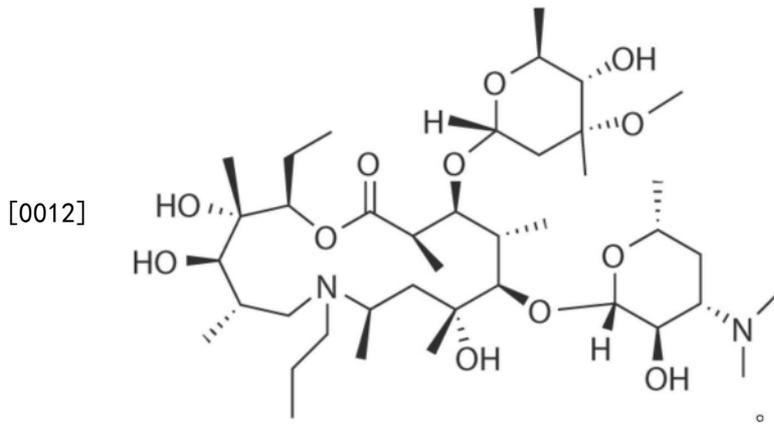
发明内容

[0009] 本发明发现了Berbamine (Dihydrochloride)、Berbamine、Gamithromycin 与 Cyclovirobuxin D这四种化合物不仅能在体外显著抑制ASFV-eGFP模型的复制,还能显著抑制野生型ASFV的复制。通过不同时间加入化合物的研究表明,它们均能够影响ASFV复制。进一步研究发现,这四种化合物抑制 ASFV复制的机理存在不同。Berbamine (Dihydrochloride)和Berbamine通过影响ASFV的吸附、Cyclovirobuxin D通过影响ASFV的吸附和内化、Gamithromycin通过影响ASFV进入晚期内吞体中,各自达到抑制ASFV复制的效果。本发明为治疗或预防ASFV的药物研发提供了应用基础。

[0010] 将它们中不同成分组合成组合物后,它们毒性低、安全性好,组合物应当仍能保证良好的安全性。这些药物作用于ASFV正常的复制周期不同阶段,基本抑制机制明确,组合使用至少在已经发现的机制范围内不会存在相互拮抗作用,成分间会发生协同叠加针对ASFV的抑制效果,组合物可以更好地抑制ASFV的复制。在为了保证相同的ASFV抑制率的情况下,每种药需要的用量相比单独使用可以减少,进而进一步降低潜在的毒副作用。本发明发现新活性的四种化合物的任意种类的组合,相对于单独一种化合物,具有更好的治疗或预防非洲猪瘟病毒感染的应用前景。

[0011] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明第一方面提供了一种活性物质在制备用于预防、减缓、治疗或控制非洲猪瘟和/或抑制非洲猪瘟病毒增殖的制剂中的应用,所述活

性物质为加米霉素,加米霉素的药用盐与加米霉素的前药中的任一种,任两种的组合或三种的组合;所述加米霉素的结构式为:



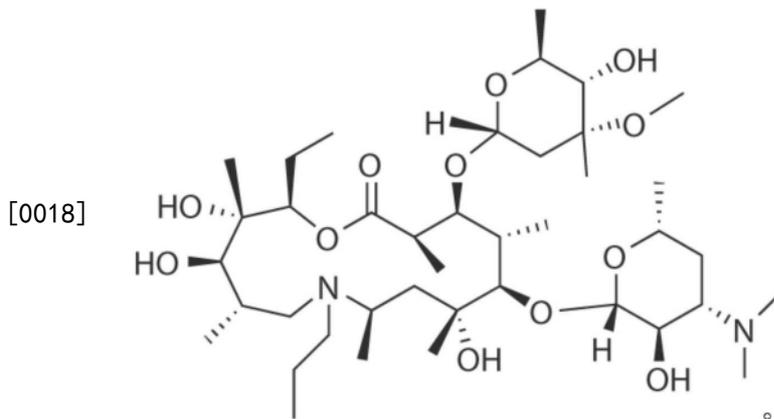
[0013] 在一些实施方式中,所述活性物质为唯一药物活性物质。

[0014] 在一些实施方式中,所述加米霉素的药用盐包括:加米霉素的甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苹果酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐、碳酸盐、磷酸盐、氢溴酸盐和氢碘酸盐。

[0015] 在一些实施方式中,所述制剂为药物。

[0016] 在一些实施方式中,所述制剂为饲料添加剂。

[0017] 本发明第二方面提供了一种活性物质在制备用于通过抑制非洲猪瘟病毒进入易感细胞的晚期内吞体中而预防、减缓、治疗或控制非洲猪瘟或抑制非洲猪瘟病毒增殖的制剂中的应用,所述活性物质为加米霉素,加米霉素的药用盐与加米霉素的前药中的任一种,任两种的组合或三种的组合;所述加米霉素的结构式为:



[0019] 在一些实施方式中,所述活性物质为唯一药物活性物质。

[0020] 在一些实施方式中,所述加米霉素的药用盐包括:加米霉素的甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苹果酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐、碳酸盐、磷酸盐、氢溴酸盐和氢碘酸盐。

[0021] 在一些实施方式中,所述易感细胞为猪肺泡巨噬细胞。

[0022] 在一些实施方式中,所述制剂为药物。

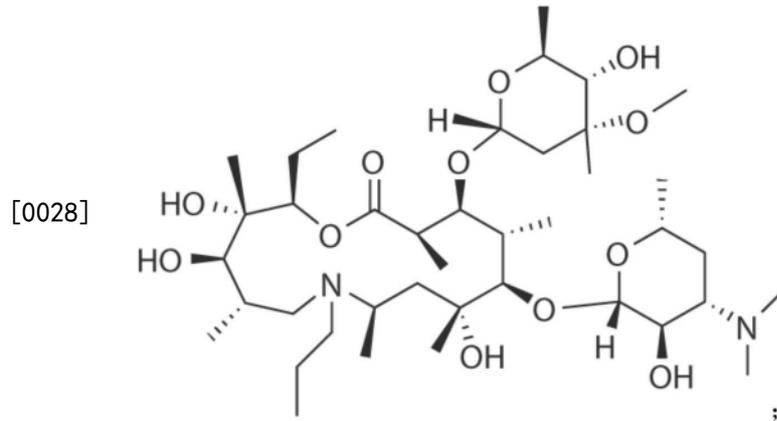
[0023] 在一些实施方式中,所述制剂为饲料添加剂。

[0024] 本发明第三方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物的药物活性成分包括第一活性物质和第二活性物质;

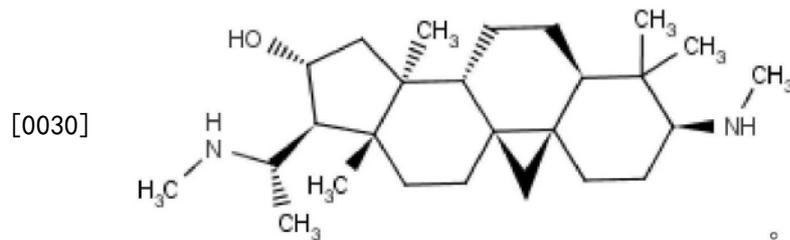
[0025] 所述第一活性物质为加米霉素,加米霉素的药用盐与加米霉素的前药中的任一种,任两种的组合或三种的组合;

[0026] 所述第二活性物质为环维黄杨星D,环维黄杨星D的药用盐与环维黄杨星D的前药中的任一种,任两种的组合或三种的组合;

[0027] 所述加米霉素的结构式为:



[0029] 所述环维黄杨星D的结构式为:



[0031] 在一些实施方式中,所述第一活性物质与所述第二活性物质的摩尔量比为1:0.1-10(比如,1:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10中的任一比值或任两个比值之间的范围)。

[0032] 在一些实施方式中,所述第一活性物质与所述第二活性物质的摩尔量比为1:0.2-5。

[0033] 在一些实施方式中,所述第一活性物质与所述第二活性物质的摩尔量比为1:1。

[0034] 在一些实施方式中,所述加米霉素的药用盐包括:加米霉素的甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苹果酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、二盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐、碳酸盐、磷酸盐、氢溴酸盐和氢碘酸盐。

[0035] 在一些实施方式中,所述环维黄杨星D的药用盐包括:环维黄杨星D的甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苹果酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐、 α -甘油磷酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐、碳酸盐、磷酸盐、氢溴酸盐和氢碘酸盐。

[0036] 本发明第四方面提供了本发明第三方面所述的药物组合物在制备用于预防、减缓、治疗或控制非洲猪瘟和/或抑制非洲猪瘟病毒增殖的制剂中的应用。

- [0037] 在一些实施方式中,所述制剂为药物。
- [0038] 在一些实施方式中,所述制剂为饲料添加剂。
- [0039] 加米霉素能够有效抑制抑制ASFV进入PAM的晚期内吞体中,使ASFV不能脱壳进入细胞核,从而能够有效抑制非洲猪瘟病毒的增殖,为治疗或减缓非洲猪瘟提供了新的活性药物与物质基础。
- [0040] 小檗胺、小檗胺盐酸盐、加米霉素、环维黄杨星D这四种化合物中,任两种、三种或四种的组合比单独使用一种药物对ASFV病毒的抑制效果更好,任三种的组合比该三种中任两种的组合对ASFV病毒的抑制效果更好,四种药物的组合效果最好。由此可见,该四种化合物之间任意种类的组合都具有系统增效作用,没有发生药物配伍减效与拮抗作用,本发明的四种药物组合使用能够增强药效,减小潜在副作用,也给针对不同的感染情况的选择用药提供的支持。

附图说明

- [0041] 图1示出了不同浓度DMSO对PAMs的细胞毒性。
- [0042] 图2示出了不同浓度Ethanol对PAMs的细胞毒性。
- [0043] 图3示出了Berbamine (dihydrochloride), Berbamine的CC50和IC50。
- [0044] 图4示出了Gamithromycin 和Cyclovirobuxin D的CC50和IC50。
- [0045] 图5示出了四种药物对ASFV-eGFP复制的荧光照片。
- [0046] 图6示出了四种药物对ASFV-eGFP复制的影响的qPCR结果与WB结果。
- [0047] 图7示出了四种药物对野生型ASFV复制的影响qPCR结果。
- [0048] 图8示出了四种药物对野生型ASFV复制的影响WB结果。
- [0049] 图9示出了添加四种药物不同时间对ASFV-eGFP复制的影响的qPCR结果与WB结果。
- [0050] 图10示出了4种药物对ASFV灭活作用的qPCR检测结果。
- [0051] 图11示出了4种药物对ASFV灭活作用的WB检测结果。
- [0052] 图12示出了4种药物对ASFV吸附作用的qPCR检测结果。
- [0053] 图13示出了4种药物对ASFV吸附作用的WB检测结果。
- [0054] 图14示出了4种药物对ASFV内化作用的qPCR检测结果。
- [0055] 图15示出了4种药物对ASFV内化作用的WB检测结果。
- [0056] 图16示出了gamithromycin对ASFV在细胞早期内吞体的共聚焦图片。
- [0057] 图17示出了gamithromycin对ASFV在细胞早期内吞体运输影响的计算结果。
- [0058] 图18示出了gamithromycin对ASFV在细胞晚期内吞体的共聚焦图片。
- [0059] 图19示出了gamithromycin对ASFV在细胞晚期内吞体运输影响的计算结果。
- [0060] 图20示出了四种药物对ASFV释放作用的TCID₅₀检测结果。
- [0061] 图21示出了单独与组合用药的qPCR检测结果。
- [0062] 图22示出了单独与组合用药的WB检测结果。

具体实施方式

- [0063] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明实施方

式作进一步地详细描述。

[0064] 本发明没有说明的材料与仪器为本领域常规材料与仪器,本发明没有说明的操作细节为本领域常规操作。

[0065] 实验材料

[0066] 实验药品:Berbamine (dihydrochloride)、Berbamine、Gamithromycin和Cyclovirobuxin D(购自Selleck公司)。

[0067] 实验试剂:RPMI 1640完全培养基为Gibco公司提供;猪血清为Hyclone 公司提供;CCK-8为日本同仁化学科技有限公司提供;PBS、二甲基亚砒均为solarbio公司提供。

[0068] 实验器材:滤器、吸管、24孔和96孔细胞培养板为康宁公司提供;洁净操作台,二氧化碳孵育箱,美国Thermo公司提供;倒置光学显微镜为Mshot 公司提供;酶联免疫检测仪为BioTek公司提供。

[0069] 细胞与病毒:PAMs(肺泡巨噬细胞);ASFV野生型毒株(Pig/HLJ/2018 株,Genebank序列号:MK333180.1);ASFV标记毒株(称作ASFV-eGFP株),在ASFV病毒株中表达eGFP,能够使感染了ASFV-eGFP的细胞能够发出绿色荧光,便于通过荧光观察病毒粒子数量与分布,其制备方法参见A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs,Sci China Life Sci,Weiye Chen et al., 2020;63(5):623-634中的ASFV- Δ 6GD毒株。

[0070] 实施例1:DMSO和Ethanol对PAMs的毒性

[0071] 将PAMs以 3×10^5 个细胞/孔加入到96孔细胞培养板,100 μ l/孔,培养液为RPMI 1640完全培养基。置37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱,待细胞完全贴壁后。吸出培养液,实验孔(As)分别加入含有0.0625v/v%,0.125v/v%,0.25v/v%,0.5v/v%,1v/v%,2v/v%,4v/v%的二甲基亚砒(DMSO)和0.3125v/v%,0.625v/v%,1.25v/v%,2.5v/v%,5v/v%,10v/v%乙醇(Ethanol)的RPMI 1640完全培养基,以100 μ l/孔用量分别加入到96孔板内,每个浓度重复3孔。对照孔(Ac)以100 μ l/孔用量加入RPMI 1640完全培养基。空白孔(Ab)中没有细胞,以100 μ l/孔用量加入等体积的RPMI 1640完全培养基。37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱孵育48h。48h后更换100 μ l新鲜RPMI 1640完全培养基,向每孔加入10 μ l的CCK-8溶液(四唑盐溶液)。将培养板在培养箱内孵育1-4h。用酶标仪测定在450nm处的吸光度。按下列公式求出细胞存活率:细胞存活率% = $[(OD_{As} - OD_{Ab}) / (OD_{Ac} - OD_{Ab})] \times 100\%$ 。其中,OD_{As}、OD_{Ab}、OD_{Ac}分别代表试验孔、空白孔、对照孔的OD值。

[0072] 结果显示浓度为4v/v%的DMSO与对照组比较差异极显著(p<0.0001);浓度为2v/v%和1v/v%的DMSO与对照组比较差异显著(p<0.01);浓度为0.5v/v%的DMSO与对照组比较差异不显著(p>0.05)(图1)。因此,0.5%的DMSO对PAM没有明显细胞毒性,可作为药物活性测试的无药物对照或者药物的溶剂。

[0073] 结果显示浓度为10v/v%的Ethanol与对照组比较差异极显著(p<0.0001);浓度为5v/v%的Ethanol与对照组比较差异不显著(p>0.05)(图2)。因此5v/v%的Ethanol对PAM没有明显细胞毒性,可作为药物活性测试的无药物对照或者药物的溶剂。

[0074] 实施例2:Berbamine (dihydrochloride),Berbamine,Gamithromycin和Cyclovirobuxin D小分子化合物IC₅₀与CC₅₀的测定

[0075] 将PAMs以 3×10^5 个/孔加入到96孔细胞培养板,100 μ l/孔,培养液为RPMI 1640完

全培养基。放入37℃5%CO₂培养箱,等细胞完全贴壁后。吸出培养液,实验孔(As)分别加入含有不同浓度四种化合物的RPMI 1640完全培养基,具体浓度见图3、图4各个子图的横坐标,数值为10的指数,单位μM,以100μl/孔用量分别加入到96孔板内,每个浓度重复3孔。对照孔(Ac)以100μl/孔用量加入RPMI 1640完全培养基。空白孔(Ab)中没有细胞,只加入等体积的RPMI 1640完全培养基。37℃5%CO₂培养箱孵育48h。48h后更换100μl新鲜RPMI 1640完全培养基,向每孔加入10μl的CCK-8 溶液。将培养板在培养箱内孵育1-4h。用酶标仪测定在450nm处的吸光度。按下列公式求出细胞存活率:细胞存活率% = $[(OD_{As} - OD_{Ab}) / (OD_{Ac} - OD_{Ab})] \times 100\%$ 。其中,OD_{As}、OD_{Ab}、OD_{Ac}分别代表试验孔、空白孔、对照孔的OD 值。

[0076] 结果显示,与对照孔相比,Berbamine (dihydrochloride), Berbamine, Gamithromycin和Cyclovirobuxin D的CC₅₀分别为61.85μM、53.80μM、132.2μM和61.20μM; Berbamine (dihydrochloride), Berbamine, Gamithromycin 和CyclovirobuxinD的IC₅₀分别为0.71μM、0.87μM、2.25μM和0.32μM。计算出Berbamine (dihydrochloride), Berbamine, Gamithromycin和 Cyclovirobuxin D的选择指数(SI)分别为87.11、61.83、58.76和191.3 (图3、图4)。由此可见,该四种化合物的毒性低,安全性好。

[0077] 实施例3: Berbamine (dihydrochloride), Berbamine, Gamithromycin和 Cyclovirobuxin D药物对ASFV-eGFP复制的影响。

[0078] PAMs培养于24孔板(1.25×10⁶细胞/孔),100μl/孔,培养液为RPMI 1640 完全培养基,待细胞完全贴壁后,加入含有不同浓度Berbamine (dihydrochloride), Berbamine, Gamithromycin和CyclovirobuxinD(10μM, 5μM和2.5μM,0μM)的RPMI 1640完全培养基孵育2h,弃掉后再加入相应浓度的药物(10μM,5μM和2.5μM,0μM)的化合物的RPMI 1640完全培养基和接种ASFV-eGFP(MOI=0.1)感染2h,用PBS清洗3次细胞,加入含有不同浓度(10μM,5μM和2.5μM,0μM)的化合物的RPMI 1640完全培养基。空白对照(Mock)的处理为:不接种病毒和药物只添加RPMI 1640完全培养基。37℃培养48h,并用荧光显微镜对每个孔拍摄白光和荧光图片,结果参见图5,每一孔的荧光照片在上方,白光照片在下方。同收集细胞上清和细胞,分别做qPCR和WB。

[0079] 荧光显微镜在白光下拍摄图片可以观察细胞活力情况,荧光可以确定 ASFV感染情况。白光图片可以看到细胞活力正常;荧光照片显示,与阳性对照组相比,随着药物浓度的提高,荧光数目逐渐减少。

[0080] 根据OIE推荐定量qPCR检测ASFV p72基因拷贝数的方法(可参见文献Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus, Donald P King et al., J Virol Methods. 2003;107(1):53-61.),提取细胞上清中DNA,来做qPCR。结果参见图6左侧柱状图,qPCR试验结果显示,与阳性对照组(0μM用药组)相比,随着药物浓度的提高,细胞上清中的ASFV p72的子代病毒拷贝数逐渐降低。

[0081] 裂解细胞后,用ASFV p54抗体(针对ASFV p54蛋白的单克隆抗体,为申请人的实验自行制备),采用常规WB方法来检测ASFV p54蛋白的表达量,同时设PAMs的β-actin作为细胞内参(抗体购买自Proteintech公司),结果参见图6右侧蛋白电泳图。WB试验结果显示,与阳性对照组相比随着药物浓度的提高,p54蛋白条带逐渐变淡。

[0082] 由此可见,这4种药物均对ASFV-eGFP的复制具有明显的抑制效果,且呈剂量依赖

性。因此,该4种药物具有治疗或减缓治疗非洲猪瘟病毒感染的作用。

[0083] 实施例4:Berbamine (dihydrochloride),Berbamine,Gamithromycin和Cyclovirobuxin D药物对野生型ASFV复制的影响。

[0084] PAMs培养于24孔板(1.25×10^6 细胞/孔),培养液为RPMI 1640完全培养基,待细胞完全贴壁后,加入含有Berbamine (dihydrochloride),Berbamine, Gamithromycin和Cyclovirobuxin D药物的RPMI 1640完全培养基,加药种类和用量分别为:10 μ M Berbamine (dihydrochloride)+0.1v/v%DMSO;10 μ M Berbamine+0.1v/v%DMSO;10 μ M Gamithromycin+0.1v/v%DMSO;10 μ M Cyclovirobuxin D+0.1v/v%Ethanol;0.1v/v%的DMSO和0.1v/v%Ethanol,孵育2h,弃掉后再加入相应浓度的药物和接种野生型ASFV(Pig/HLJ/2018, MOI=0.05)感染2h,用PBS清洗3次细胞,加入含有相应浓度药物的RPMI 1640完全培养基。加药种类和用量分别为:10 μ M Berbamine (dihydrochloride)+0.1v/v%DMSO;10 μ M Berbamine+0.1v/v%DMSO;10 μ M Gamithromycin+0.1v/v%DMSO;10 μ M Cyclovirobuxin D+0.1v/v%Ethanol;0.1v/v%的DMSO和0.1v/v%Ethanol。空白对照组(Mock)的处理为:只添加RPMI 1640完全培养基。37 $^{\circ}$ C培养48h,收集细胞上清和细胞,分别采用与实施例3相同的试剂和方法,对样品做qPCR(结果参见图7)和WB(结果参见图8)检测。

[0085] 为了评价这4种药物对野生型ASFV复制的影响,进行的qPCR和WB分析。qPCR结果显示,加入这4种药物后,在上清液中ASFV p72的拷贝数显著低于阳性对照组(0.1v/v%DMSO和0.1v/v%Ethanol),说明它们可以抑制野生型ASFV的复制。WB结果显示,加入这4种药物后,ASFV p54蛋白表达显著低于阳性对照组。因此,4种药物也能够显著抑制野生型ASFV的复制(图7,图8)。由此可见,该4种药物具有治疗或减缓治疗非洲猪瘟病毒感染的作用。

[0086] 实施例5:Berbamine (dihydrochloride),Berbamine,Gamithromycin和Cyclovirobuxin D药物对ASFV复制阶段的影响

[0087] 为了研究Berbamine (dihydrochloride),Berbamine,Gamithromycin和Cyclovirobuxin D药物对ASFV复制不同阶段的影响,将PAMs培养于24孔板上(1.25×10^6 /孔),培养液为RPMI 1640完全培养基,待细胞贴壁后,接种 ASFV-eGFP(MOI=0.5),接种时间的-2,0,2,4,8和16h时分别添加4种药物,加药种类和用量分别为:10 μ M Berbamine (dihydrochloride)+0.1 v/v%DMSO;10 μ M Berbamine+0.1v/v%DMSO;10 μ M Gamithromycin+0.1v/v%DMSO;10 μ M Cyclovirobuxin D+0.1v/v%Ethanol;0.1v/v%的DMSO和0.1v/v%Ethanol。Berbamine(dihydrochloride),Berbamine,Gamithromycin配0.1v/v%DMSO阳性对照与无药空白对照(Mock);Cyclovirobuxin D配0.1v/v%Ethanol阳性对照与无药空白对照(Mock)。为了严格遵循ASFV复制周期,在感染后24h收集样本,采用与实施例3相同的试剂和方法对每个样品进行qPCR和WB测定。

[0088] 为了分析这4种药物对ASFV复制不同阶段的影响,测定了ASFV感染 PAMs前后,4种药物分别在-2、0、2、4、6、8和16h时间点ASFV p72基因拷贝数。这些药物的加入与阳性对照相比显著抑制了ASFV的复制,特别是在ASFV复制的早期阶段。qPCR结果显示,加入Berbamine (dihydrochloride),Berbamine和Cyclovirobuxin D在-2h到4h时CT值均显著高于阳性对照组,表明3种药物对病毒复制早期的抑制作用最明显。WB的结果同样表明,上述3种药物在复制的早期阶段具有更好的抑制效果。而在加入Gamithromycin,qPCR和WB结

果均表明Gamithromycin在-2h到8h时加入可明显抑制病毒复制,表明其在病毒复制早期和中期均具有抑制ASFV 的复制的效果。因此,Berbamine (dihydrochloride),Berbamine和Cyclovirobuxin D能够抑制ASFV早期复制,而Gamithromycin能够抑制ASFV 早期和中期复制(图9)。

[0089] 实施例6:Berbamine (dihydrochloride),Berbamine,Gamithromycin和Cyclovirobuxin D药物对ASFV的直接灭活作用

[0090] 为评价这4种药物是否可以直接杀灭ASFV,将PAMs铺在24孔板中(1.25×10^6 /孔),培养液为RPMI 1640完全培养基,500 μ l/孔,等待细胞完全贴壁。将ASFV-eGFP(MOI=1)和相应的药物(2 μ M Berbamine (dihydrochloride)+0.02v/v%DMSO;2 μ M Berbamine+0.02v/v%DMSO;2 μ M Gamithromycin+0.02v/v%DMSO;2 μ M Cyclovirobuxin D+0.02v/v%Ethanol;0.1v/v%DMSO和0.02v/v%Ethanol),混合后在37 $^{\circ}$ C下孵育1h。空白对照(Mock)的处理为:只添加RPMI 1640完全培养基。然后将混合液稀释20倍以消除这些药物对ASFV-eGFP感染的潜在影响。然后将上述含有病毒混合液加入到贴壁细胞中,37 $^{\circ}$ C培养2h。弃掉上清后,用PBS清洗细胞3次,加入含有20v/v%猪血清的RPMI 1640完全培养基。48h后收集细胞上清和细胞,采用与实施例3相同的试剂和方法对每个样品,用qPCR和WB检测上清中ASFV p72基因的拷贝数(结果参见图10)和p54蛋白的表达量(结果参见图11)。结果显示,与对照组相比没有显著性差异,4种药物均不能直接杀灭病毒。

[0091] 实施例7:Berbamine (dihydrochloride),Berbamine,Gamithromycin和Cyclovirobuxin D药物对ASFV吸附细胞的抑制作用。

[0092] 将24孔细胞培养板中的PAMs(1.25×10^6 /孔)(培养液为RPMI 1640完全培养基)与ASFV-eGFP(MOI=0.1)和分别10 μ M Berbamine (dihydrochloride)+0.1v/v%DMSO;10 μ M Berbamine+0.1v/v%DMSO;10 μ M Gamithromycin+0.1v/v%DMSO;10 μ M Cyclovirobuxin D+0.1v/v%Ethanol,在4 $^{\circ}$ C下孵育1h,以使病毒与细胞吸附,但防止病毒内化。以Buffer(0.1v/v%DMSO和0.1v/v%Ethanol两种)为阳性对照,Mock为空白孔对照(不添加病毒与药物),弃去上清液,用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS洗涤细胞3次以去除未结合的病毒,加入RPMI 1640完全培养基,500 μ l/孔。然后将细胞培养板转至37 $^{\circ}$ C,孵育48h。收集细胞上清液和细胞。分别采用与实施例3相同的试剂和方法对每个样品做qPCR(结果参见图12)和WB(结果参见图13)。用qPCR检测上清液中ASFV p72拷贝数,用WB检测细胞中病毒p54蛋白表达水平。结果表明,Berbamine (dihydrochloride),Berbamine和Cyclovirobuxin D对ASFV的吸附有影响,而Gamithromycin对ASFV的吸附没有明显影响(图12,图13)。

[0093] 实施例8:Berbamine (dihydrochloride),Berbamine,Gamithromycin和Cyclovirobuxin D药物对ASFV在细胞中内化的抑制作用。

[0094] PAMs与ASFV-eGFP(MOI=0.1)在4 $^{\circ}$ C下培养1h,培养液为RPMI 1640完全培养基,500 μ l/孔,然后用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS洗涤细胞3次。将这4种药物加入细胞培养板孔中,四种药物分别10 μ M Berbamine (dihydrochloride)+0.1v/v%DMSO;10 μ M Berbamine+0.1v/v%DMSO;10 μ M Gamithromycin +0.1v/v%DMSO;10 μ M Cyclovirobuxin D+0.1v/v%Ethanol。以Buffer(0.1 v/v%DMSO和0.1v/v%Ethanol两种)为阳性对照,Mock为空白孔对照(不添加病毒与药物),500 μ l/孔,培养液为RPMI 1640完全培养基。随后将细胞培养板切换至37 $^{\circ}$ C。1h后,用PBS洗涤3次以去除化合物,然后加入新鲜RPMI 1640完全培养基。将细胞移至37 $^{\circ}$ C

的时间点为0h,在48h收集细胞上清和细胞,并分别采用与实施例3相同的试剂和方法通过qPCR(结果参见图14)和WB(结果参见图15)测定病毒的复制和蛋白表达情况。

[0095] qPCR和WB结果均表明,Cyclovirobuxin D影响ASFV的内化,而 Berbamine (dihydrochloride)、Berbamine和Gamithromycin不影响ASFV的内化(图14,图15)。

[0096] 实施例9:Gamithromycin药物对ASFV在细胞早期内吞体的影响。

[0097] PAMs在共聚焦小皿(1.2×10^6 /皿)中培养,培养液为RPMI 1640完全培养基,1mL/皿,再将剂量为MOI = 5的ASFV接种到PAMs中,4℃孵育1h,然后样品组加入10μM Gamithromycin+0.1v/v%DMSO,阳性对照组加入等量的1640完全完全培养基+0.1v/v%DMSO,阴性对照为Mock(不加病毒和药物),37℃下分别孵育15min、30min、45min和60min后取样。取样时用遇冷的PBS冲洗一遍,加入4%的多聚甲醛室温固定细胞30min,用PBS冲洗3遍,加入0.25% TritonX100 1mL静置15min透膜,再用PBS洗3遍,加入0.5%BSA溶液室温封闭1h。一抗为兔源抗ASFV的P72蛋白多克隆抗体血清(为申请人本实验室自行制备)和鼠源Rab5单克隆抗体(购自proteintech公司),用0.5%BSA溶液分别以1:500和1:200的倍数稀释,4℃孵育过夜。用PBS冲洗3遍,加入TRITC-goat anti-Rabbit IgG(H+L)(购自博奥龙公司)和FITC-goat anti-Mouse IgG(H+L)(购自Rdbio公司)作为二抗,室温避光孵育1h,用PBS避光冲洗3遍。最后加入Hochest细胞核染料(购自Thermo公司)室温避光15min,用PBS避光冲洗3遍,用Leica LSM800激光共聚焦显微镜观察和保存照片(荧光照片结果参见图16),并ZEN软件分析细胞内共定位的皮尔森系数(结果参见图17)。

[0098] ASFV在细胞表面经过吸附和内化后,进入细胞内中,通过内体运输途径在胞质内向细胞核运输,参与这一运输途径的内体可具体分为早期内体和晚期内体运输两部分,分别可以用不同的分子标记进行区分,如早期内体 Rab5就是其特异性标记物。前面实验证明Gamithromycin药物既不影响ASFV的吸附也不影响其内化,所以猜测这种药物影响ASFV的在细胞早期内吞体运输过程。通过共聚焦实验,利用针对早期内吞体标记分子Rab5和ASFV P72蛋白,对ASFV的早期内吞体运输进行了追踪。本发明可以看出样品处理组和阳性对照组没有显著性差异,表明ASFV经过早期内吞体的运输进入下一阶段。同样显示出Gamithromycin药物基本上不影响ASFV的在细胞早期内吞体运输过程(图16,图17)。

[0099] 实施例10:Gamithromycin药物对ASFV在细胞晚期内吞体的影响。

[0100] 对晚期内吞体的标记分子为LBPA,因此将实施例9中的一抗鼠源Rab5单克隆抗体更换为鼠源LBPA单克隆抗体(购自Merck-Millipore公司)。其他方面采用与实施例9相同和试剂方法分别在60min、90min、120min和150min对每个样品做激光共聚焦试验(结果参见图18和图19)。

[0101] 随着内体运输途径的进行,ASFV经过在早期内吞体中的运输,随后进入了晚期内吞体。本发明通过激光共聚焦试验,利用晚期内吞体的特异性标记物LBPA对ASFV感染过程中的晚期内体运输阶段的追踪观察。本发明发现加入Gamithromycin药物的样品处理组和阳性对照组在60min、90min、120min和150min有显著性差异,表明ASFV在进入晚期内吞体的运输阶段受到了影响。同样显示出Gamithromycin药物影响ASFV的在细胞晚期内吞体运输过程(图18,图19)。

[0102] 实施例11:Berbamine (dihydrochloride), Berbamine, Gamithromycin 和 Cyclovirobuxin D药物对ASFV在细胞中释放的影响。

[0103] PAMs在24孔细胞培养板中培养,培养液为RPMI 1640完全培养基,500 μ l/孔,ASFV-eGFP(MOI=0.3)与PAMs一起37 $^{\circ}$ C下孵育2h,PBS洗涤3次,加入新鲜RPMI 1640完全培养基。感染16h后,用10 μ M Berbamine (dihydrochloride)+0.1v/v%DMSO;10 μ M Berbamine +0.1v/v%DMSO;10 μ M Gamithromycin+0.1v/v%DMSO;10 μ M Cyclovirobuxin D+0.1v/v% Ethanol 处理ASFV感染细胞1h,分别以0.1v/v%的DMSO和Ethanol为对照,Mock 为空白孔对照(不添加病毒与药物),然后用PBS洗涤3次,加入新鲜RPMI 1640完全培养基。当ASFV的第一个周期完成并释放新的病毒颗粒时,感染后24小时,收集培养物并通过TCID₅₀检测ASFV滴度。

[0104] 结果显示Berbamine (dihydrochloride),Berbamine,Gamithromycin和Cyclovirobuxin D作用后的病毒滴度与阳性对照组无明显差异,由此可见这些药物不影响ASFV在细胞中释放(结果参见图20)。

[0105] 实施例12:4种药物组合对ASFV复制的影响

[0106] PAMs培养于24孔板(1.25 \times 10⁶细胞/孔),培养液为RPMI 1640完全培养基,待细胞完全贴壁后,加入含有Berbamine (dihydrochloride)(代号:BD),Berbamine(代号:B),Gamithromycin(代号:G)和Cyclovirobuxin D(代号:CD)药物的RPMI 1640完全培养基,加药种类和用量分别为:2.5 μ M Berbamine (dihydrochloride);2.5 μ M Berbamine;2.5 μ M Gamithromycin;2.5 μ M Cyclovirobuxin D;2.5 μ M Berbamine (dihydrochloride)和2.5 μ M Cyclovirobuxin D的组合;2.5 μ M Berbamine和2.5 μ M Cyclovirobuxin D的组合;2.5 μ M Gamithromycin和2.5 μ M Cyclovirobuxin D的组合;2.5 μ M Berbamine (dihydrochloride)和2.5 μ M Gamithromycin的组合;2.5 μ M Berbamine和2.5 μ M Gamithromycin的组合;2.5 μ M Berbamine (dihydrochloride)和2.5 μ M Berbamine的组合;2.5 μ M Berbamine (dihydrochloride)、2.5 μ M Berbamine和2.5 μ M Gamithromycin的组合;2.5 μ M Berbamine、2.5 μ M Cyclovirobuxin D和2.5 μ M Gamithromycin的组合;2.5 μ M Berbamine (dihydrochloride)、2.5 μ M Cyclovirobuxin D和2.5 μ M Gamithromycin的组合;2.5 μ M Berbamine (dihydrochloride)、2.5 μ M Cyclovirobuxin D和2.5 μ M Berbamine的组合;2.5 μ M Berbamine (dihydrochloride)、2.5 μ M Cyclovirobuxin D、2.5 μ M Berbamine和2.5 μ M Gamithromycin的组合;同时以上溶液和阳性对照都加入了0.1 v/v%DMSO和0.1v/v% Ethanol,Mock为阴性对照(不添加药物和病毒)孵育2h,弃掉后再加入相应浓度的药物和接种ASFV-eGFP(MOI=0.2)感染2h,用PBS清洗3次细胞,再次在加药孔中分别加入含有前述相应浓度相同药物的RPMI 1640完全培养基。37 $^{\circ}$ C培养48h,收集细胞上清和细胞,分别采用与实施例3相同的试剂和方法,对样品做qPCR(结果参见图21和表1)和WB(结果参见图22)检测。在表1中,药物参见第一列,每种药物与处理对应p72基因拷贝数见第2列,每种药物与其他药物处理对应p72基因拷贝数的比较参见第3-6列,***代表差异显著,NA代表没有比较。

[0107] 表1.qPCR的ASFV p72基因拷贝数差异显著性分析

	p72 基因拷贝数的平均值					
	药物	($1 \times 10^6/\text{mL}$)	BD	B	G	CD
[0108]	BD	58.6	NA	NA	NA	NA
	B	53.1	NA	NA	NA	NA
	G	423.48	NA	NA	NA	NA
	CD	14.67	NA	NA	NA	NA
	BD+CD	8.49	***	NA	NA	***
	B+CD	8.82	NA	***	NA	***
	G+CD	9.13	NA	NA	***	***
	BD+G	41.09	***	NA	***	NA
	B+G	33.10	NA	***	***	NA
[0109]	BD+B	10.56	***	***	NA	NA
	BD+B+G	5.99	***	***	***	NA
	B+CD+G	6.67	NA	***	***	***
	BD+CD+G	6.29	***	NA	***	***
	BD+B+CD	3.05	***	***	NA	***
	BD+B+CD+G	1.14	***	***	***	***
	POSITIVE	786.43	NA	NA	NA	NA
	MOCK	0	NA	NA	NA	NA

[0110] 为了评价这4种药物联合使用对ASFV复制的影响,进行的qPCR和 WB分析。qPCR结果显示,加入这4种药物任意的两种、三种和四种组合后,与相应的药物单独使用相比,在细胞上清液中ASFV p72的拷贝数显著低于相应的药物单独使用对照组,说明它们可以抑制ASFV的复制。WB结果显示,加入这4种药物后任意的两种、三种和四种组合后,与相应的药物单独使用相比,ASFV p54蛋白表达显著低于相应药物单独使用对照组。因此,该小檗胺、盐酸小檗胺、加米霉素与环维黄杨星D这4种药物两组、三组和四组联合也能够显著抑制ASFV

的复制,表现出这4种药物之间的协同增效作用(图21和图22)。由此可见,该小檗胺、盐酸小檗胺、加米霉素与环维黄杨星D药物联合使用更具有治疗或减缓治疗非洲猪瘟病毒感染的作用。

[0111] 由技术常识可知,本发明可以通过其它的不脱离其精神实质或必要特征的实施方案来实现。因此,上述公开的实施方案,就各方面而言,都只是举例说明,并不是仅有的。所有在本发明范围内或在等同于本发明的范围内的改变均被本发明包含。

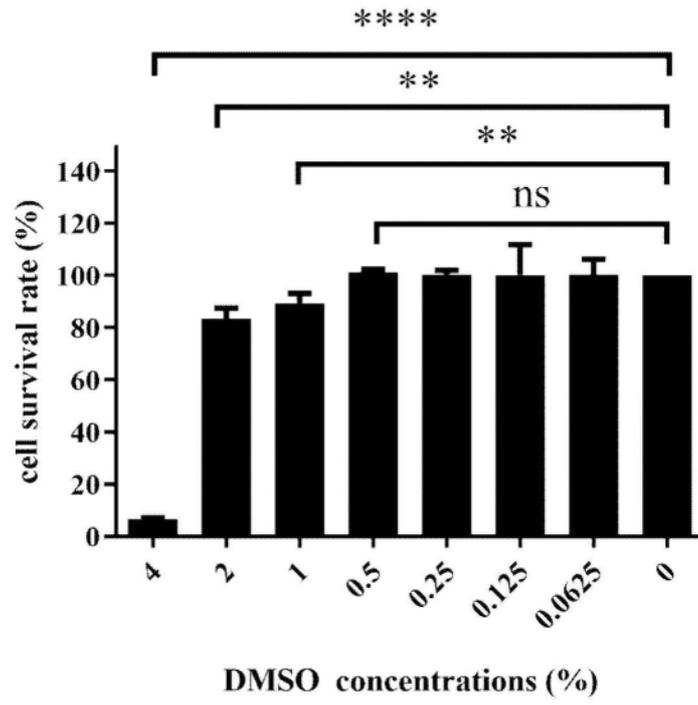


图1

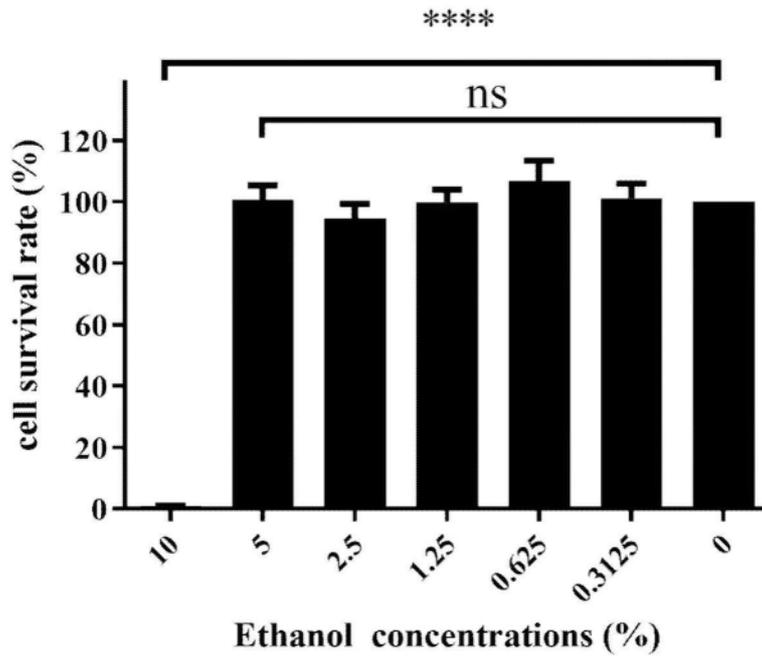


图2

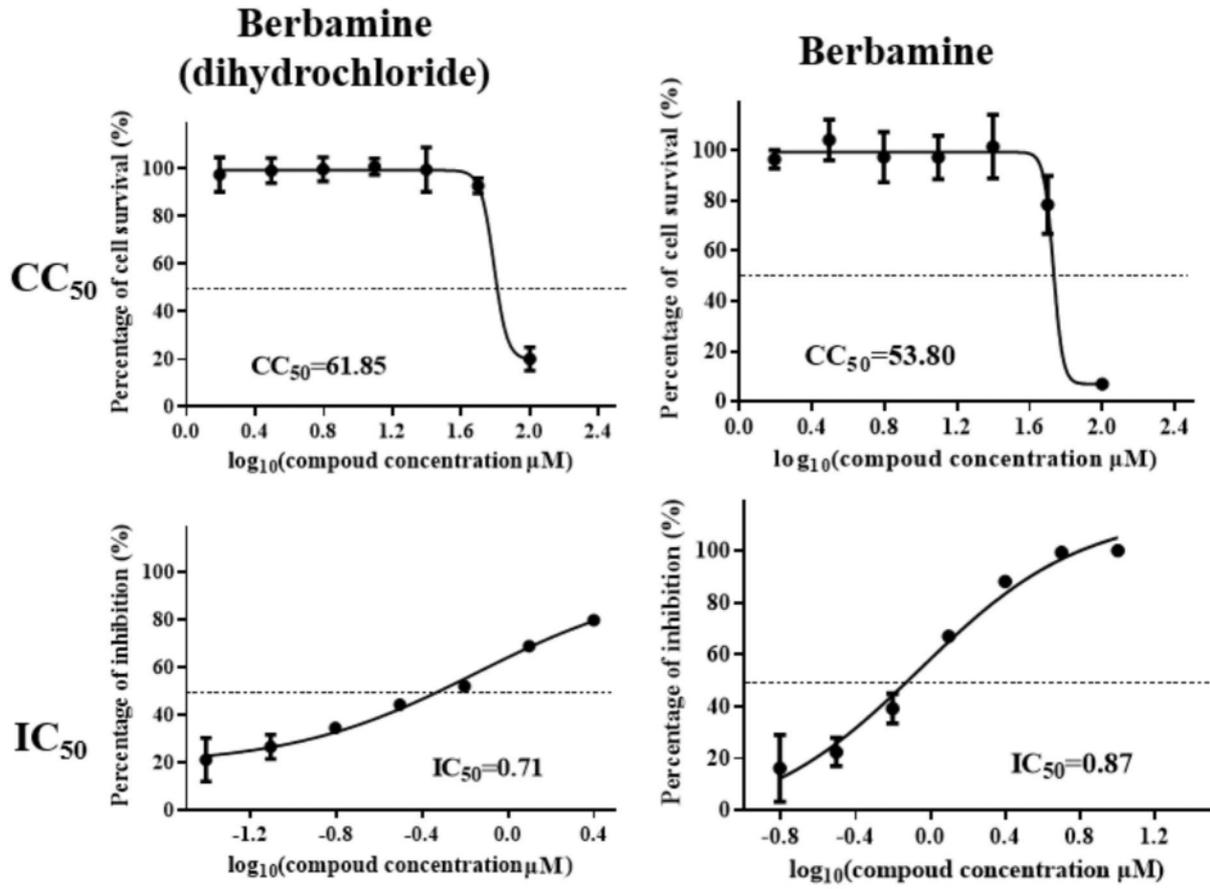


图3

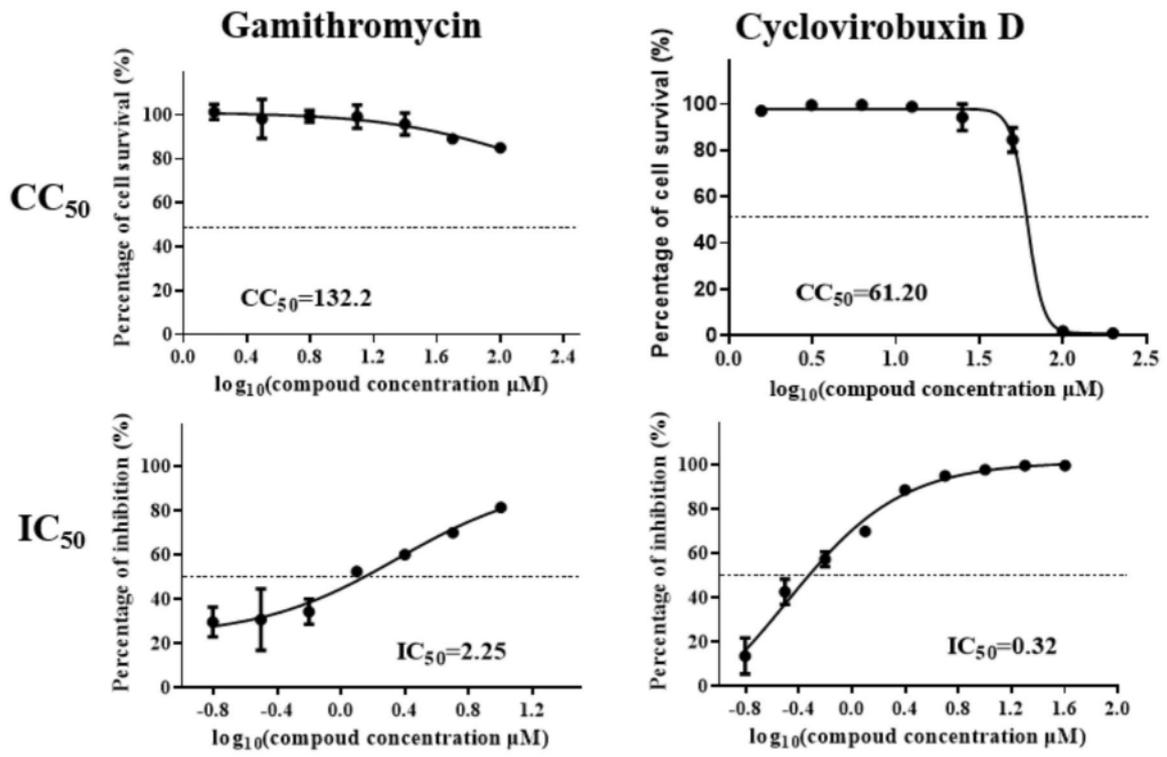


图4

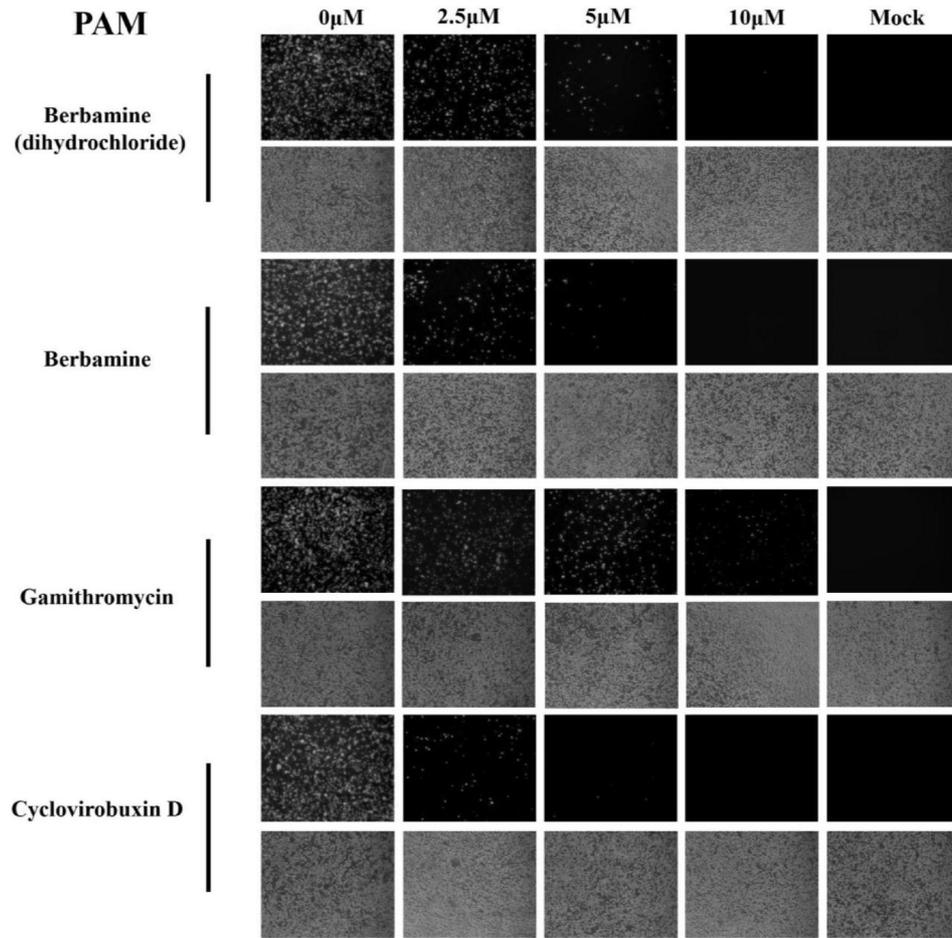


图5

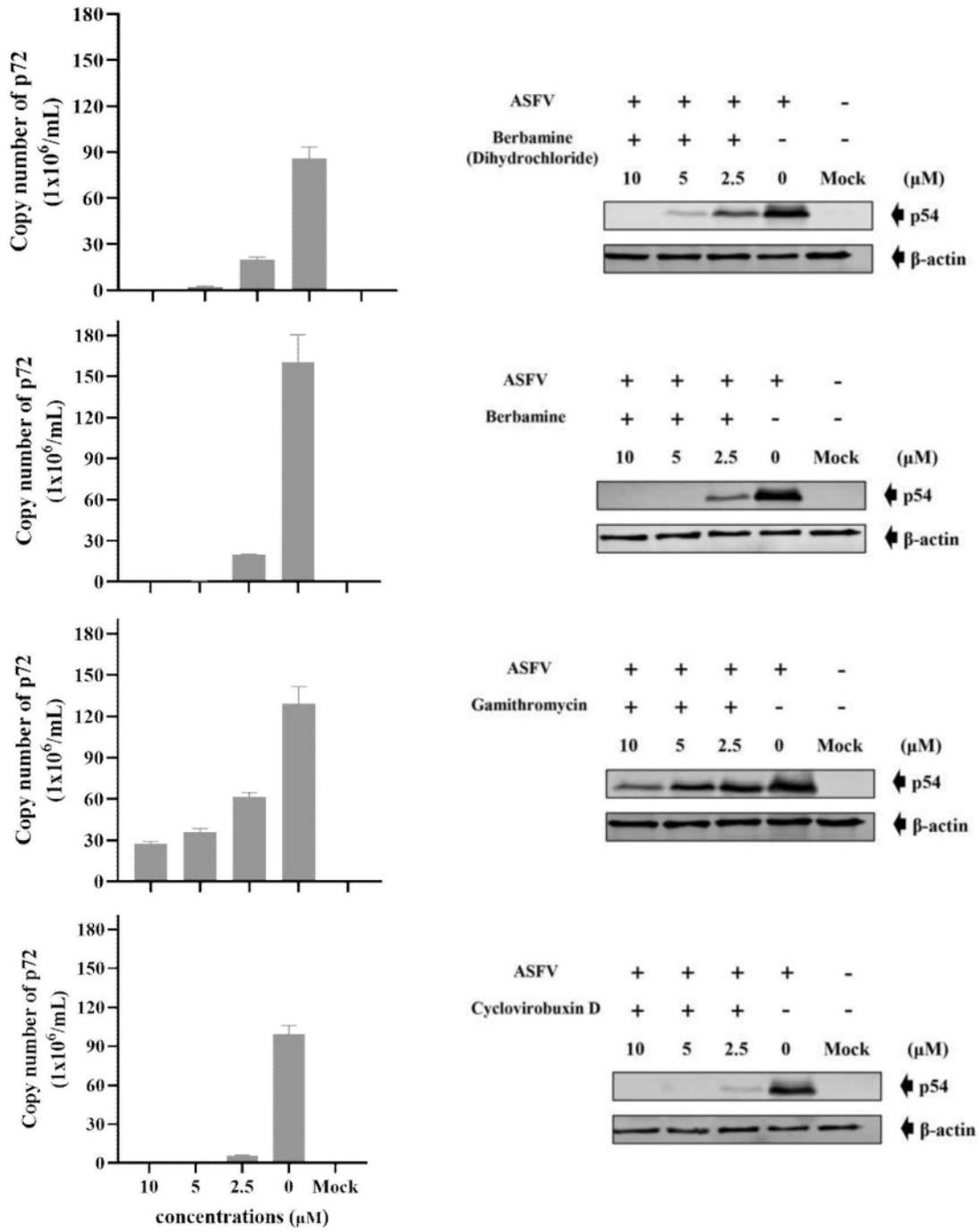


图6

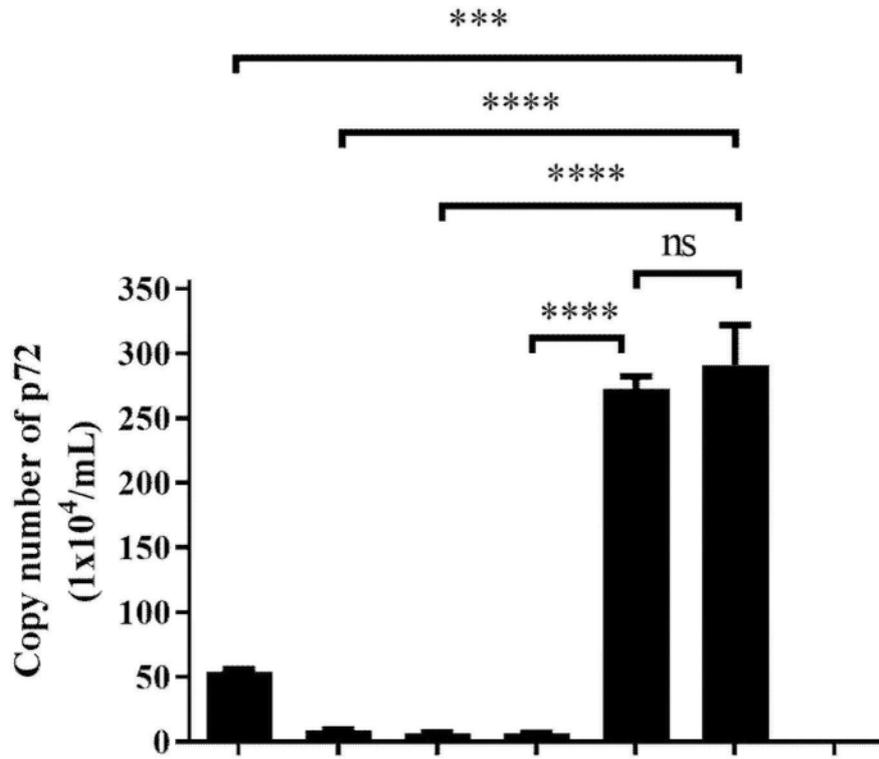


图7

ASFV	+	+	+	+	+	+	-
DMSO	+	+	+	-	-	+	-
Ethanol	-	-	-	+	+	-	-
Berbamine (dihydrochloride)	+	-	-	-	-	-	-
Berbamine	-	+	-	-	-	-	-
Gamithromycin	-	-	+	-	-	-	-
Cycloviobuxin D	-	-	-	+	-	-	-

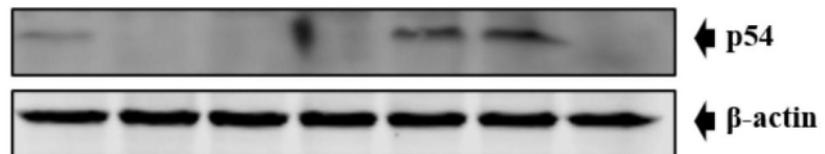


图8

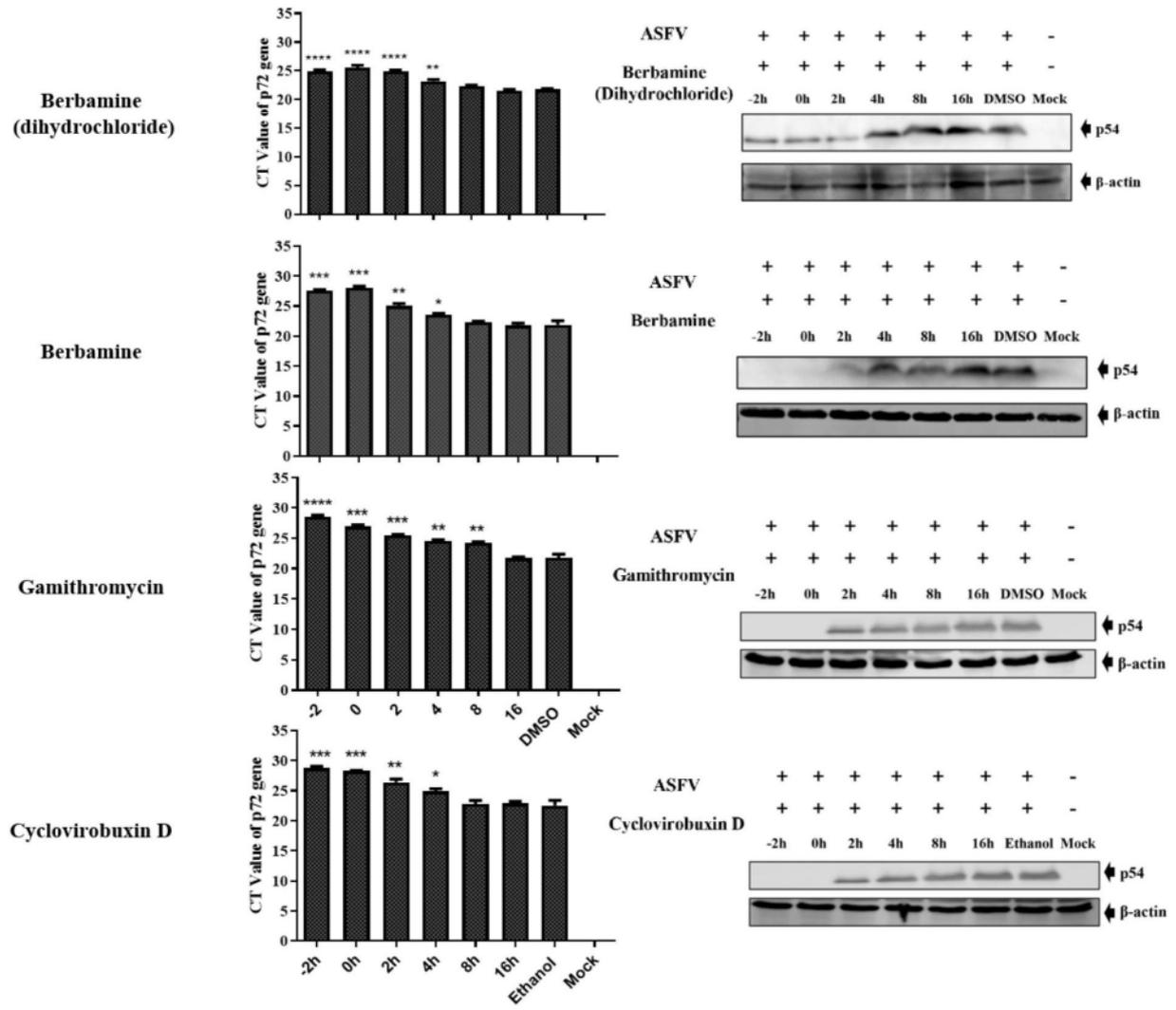


图9

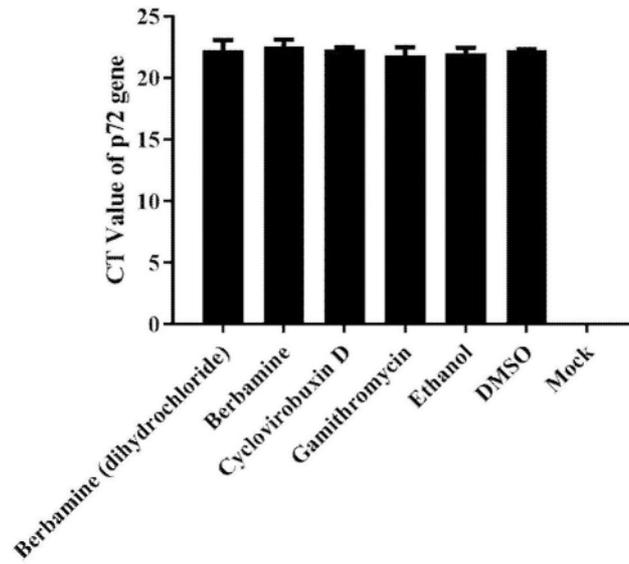


图10

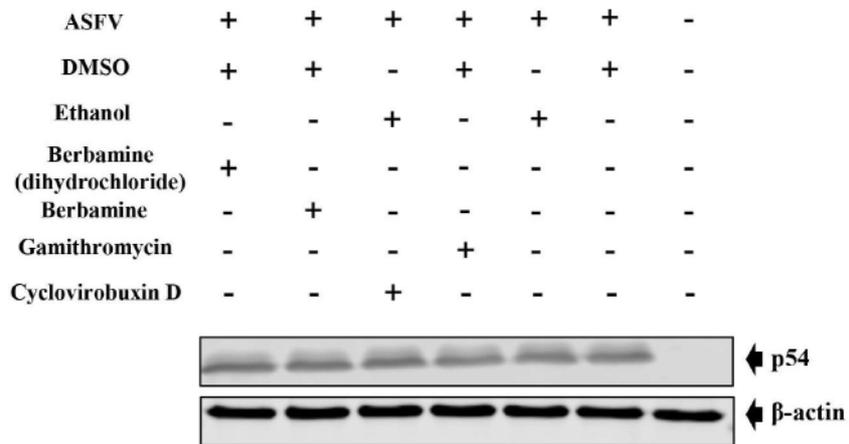


图11

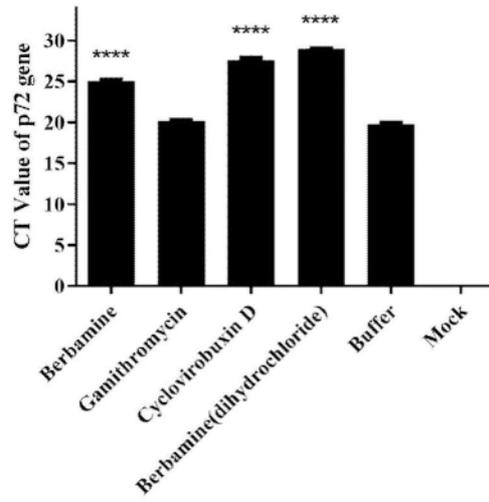


图12

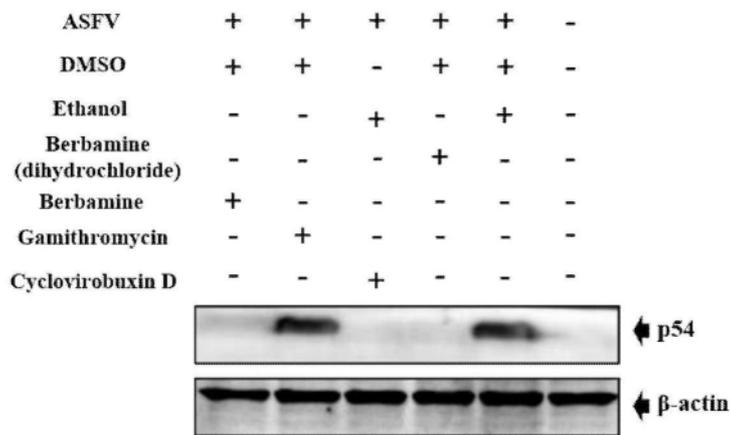


图13

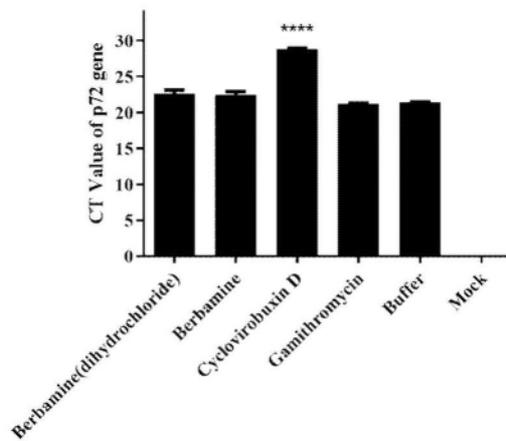


图14

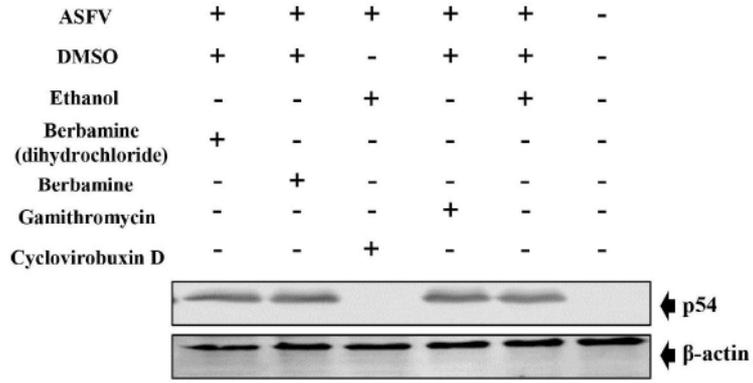


图15

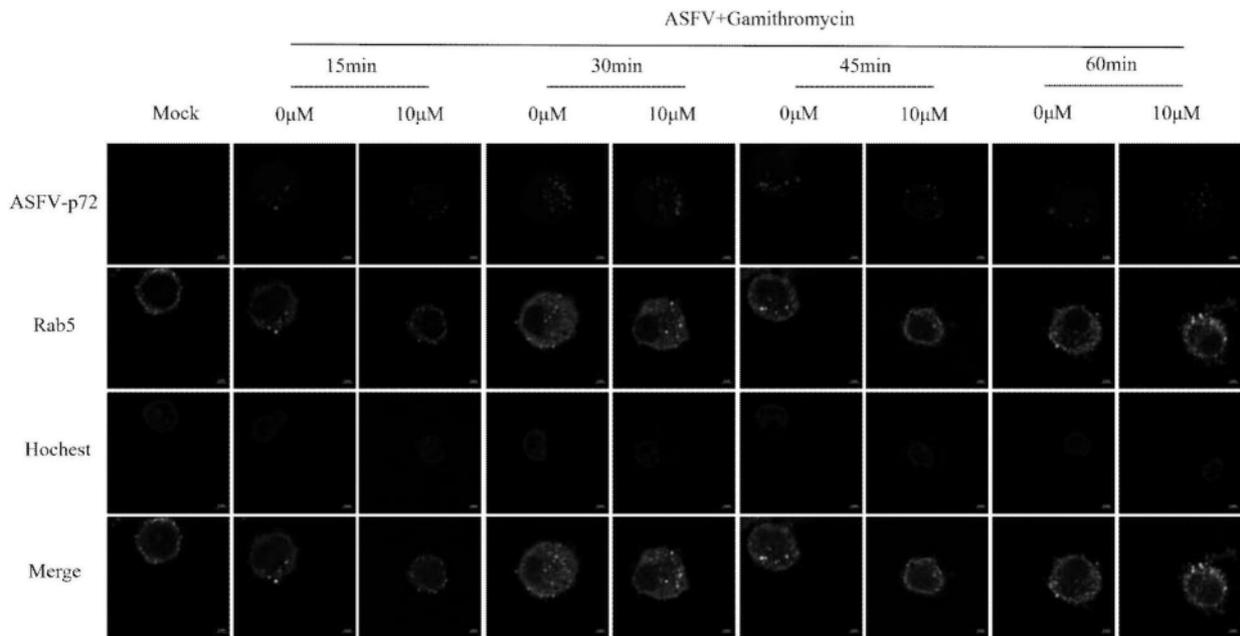


图16

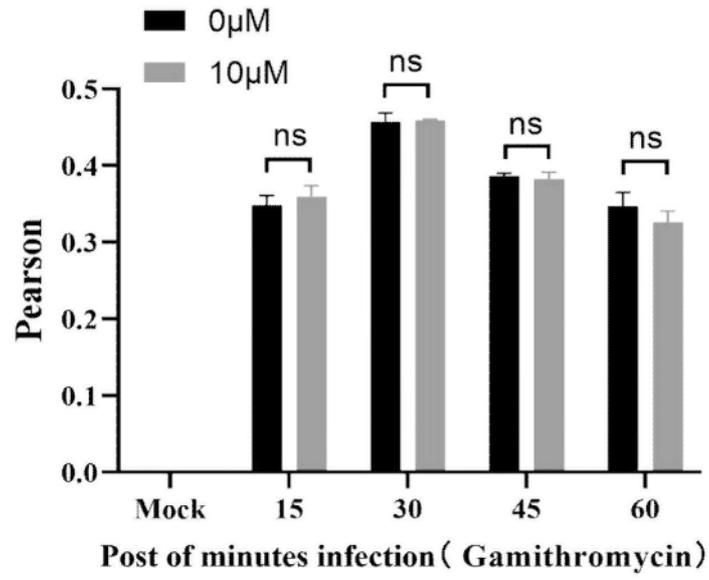


图17

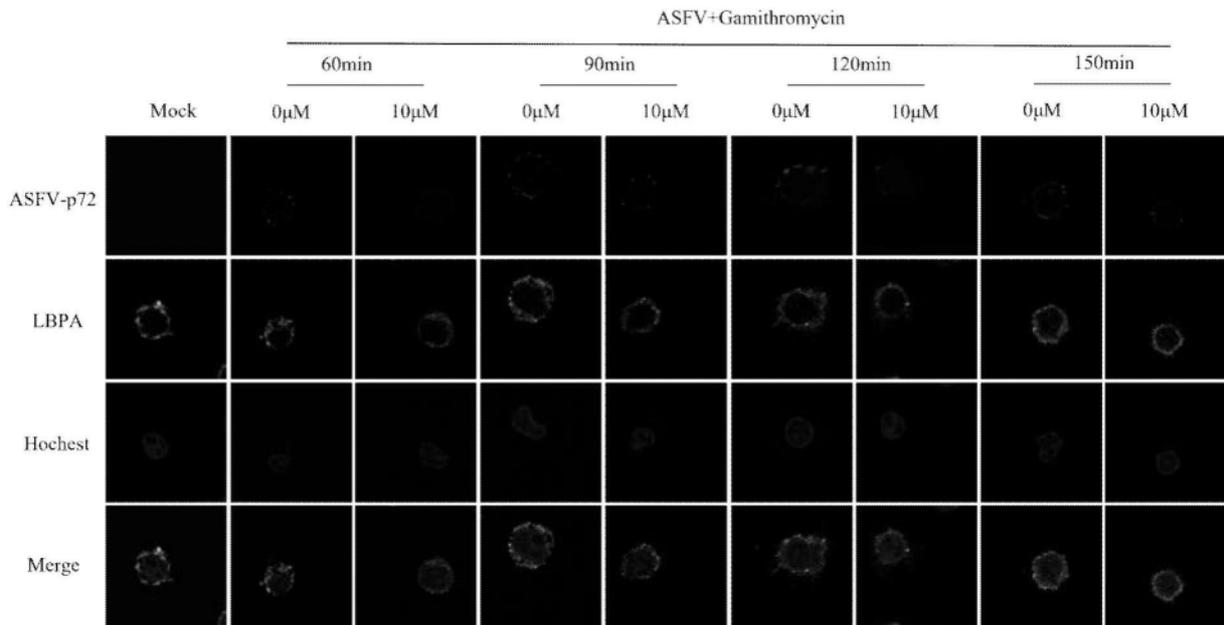


图18

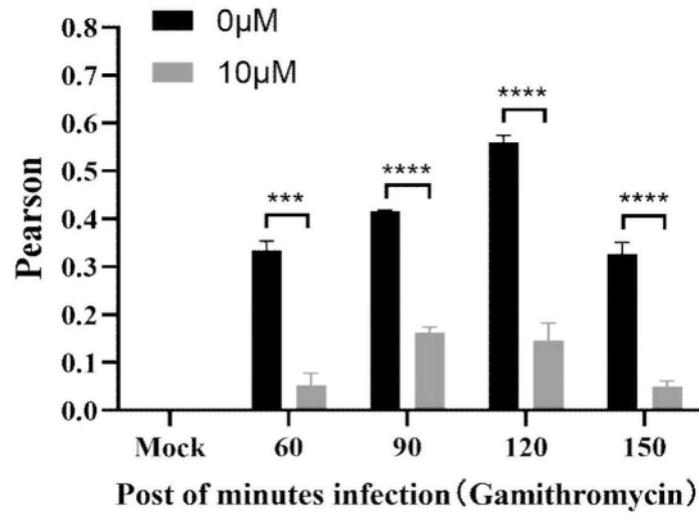


图19

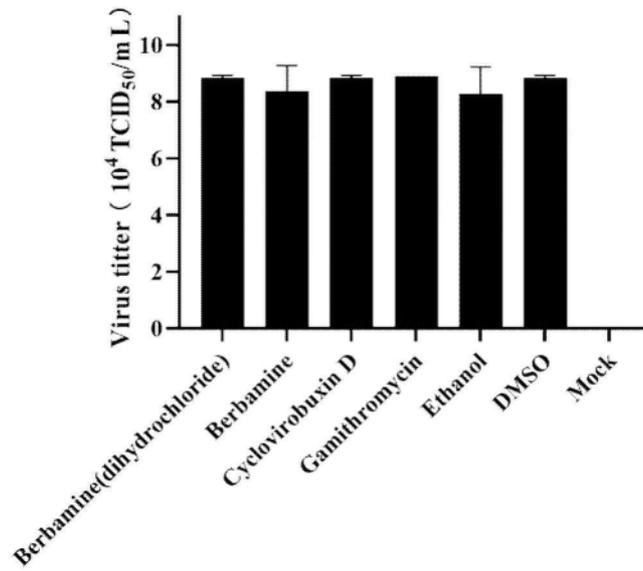


图20

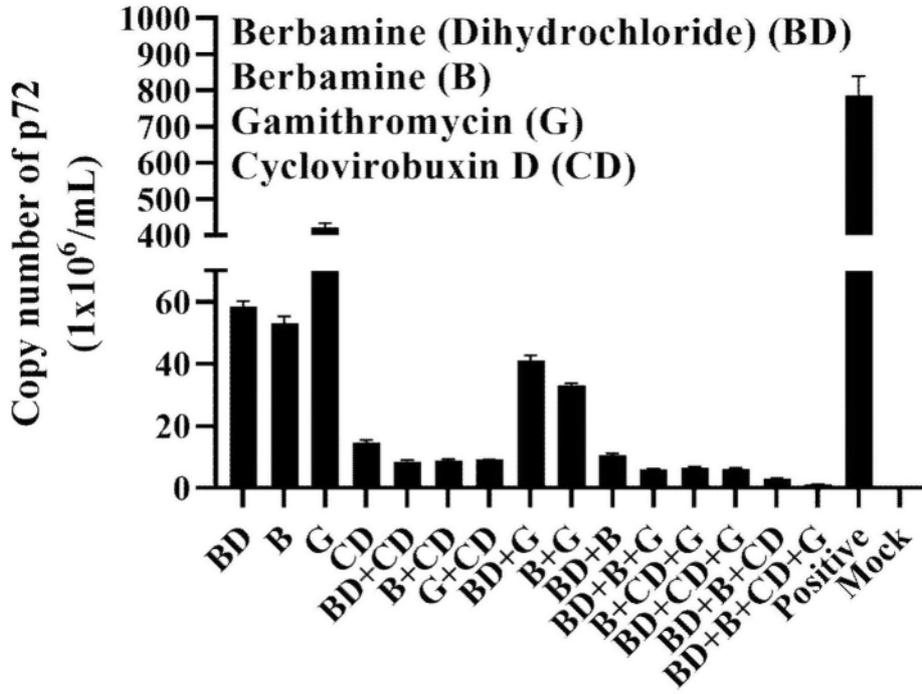


图21

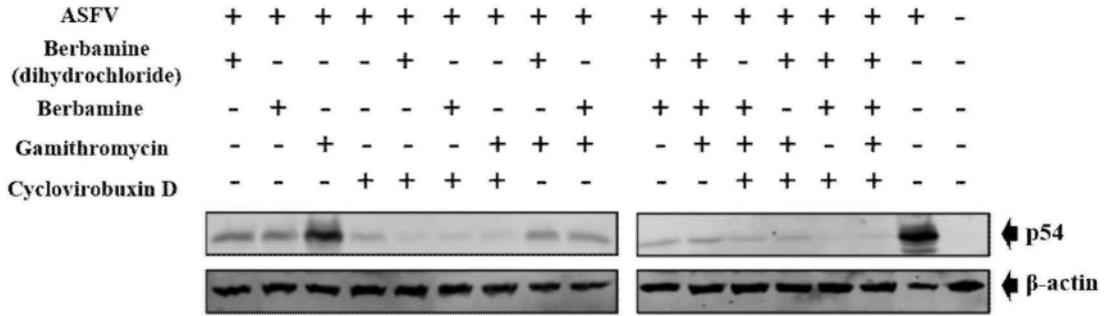


图22