

CDK 抑制剂夫拉平度抗冠状病毒作用机制研究

王丽丹, 郭赛赛, 岑 山*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 冠状病毒属冠状病毒包含多种人类致病病毒, 抗冠状病毒药物研发具有重要价值。开发靶向宿主细胞的抗病毒药物不仅有助于发展新的抗病毒策略, 同时有利于解决病毒突变而带来的耐药性等问题。本课题组前期研究发现, 细胞周期依赖性蛋白激酶 (cell cycle-dependent protein kinases, CDKs) 参与冠状病毒的复制, 成为潜在的抗病毒靶点。本研究发现广谱 CDK 抑制剂夫拉平度显著抑制严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) 活性。进一步研究表明, 夫拉平度抑制 SARS-CoV-2 RdRp 的 RNA 合成效率。此外, 夫拉平度能够有效抑制人类冠状病毒 OC43 (human coronavirus OC43, HCoV-OC43) 的复制。本研究表明, CDK 抑制剂夫拉平度可能是潜在的抗冠状病毒药物。

关键词: 夫拉平度; CDK 抑制剂; 冠状病毒; 抗病毒; RNA 依赖性 RNA 聚合酶

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1280-06

The mechanism of anticoronaviral action of CDK inhibitor flavopiridol

WANG Li-dan, GUO Sai-sai, CEN Shan*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Coronaviruses of the genus *Coronavirus* contain a variety of human pathogenic viruses, and the development of anti-coronavirus drugs is of great value. The development of antiviral drugs targeting host cells is not only helpful for the development of new antiviral strategies, but also for solving problems such as drug resistance due to viral mutations. Our preliminary study identified that cell cycle-dependent protein kinases (CDKs) involved in coronavirus replication, for which they would be potential anticoronaviral targets. In this study, we found that the broad-spectrum CDK inhibitor flavopiridol significantly inhibited severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA dependent RNA polymerase (RdRp) activity. Further studies showed that flavopiridol suppressed the RNA synthesis efficiency of SARS-CoV-2 RdRp. In addition, flavopiridol effectively restricted the replication of human coronavirus OC43 (HCoV-OC43). Therefore, our study suggested that the CDK inhibitor flavopiridol may be a potential anticoronaviral drug.

Key words: flavopiridol; CDK inhibitor; coronavirus; antiviral; RNA dependent RNA polymerase

冠状病毒属于冠状病毒科冠状病毒属病毒, 其基因组为单股正链 RNA。根据系统发育树可分为 α 、 β 、

γ 、 δ 四个属。其中 β 冠状病毒属包括多种可感染人的冠状病毒, 如人类冠状病毒 OC43 (human coronavirus OC43, HCoV-OC43)、中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 和严重急性呼吸综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)。MERS-CoV 和

收稿日期: 2024-01-12; 修回日期: 2024-02-22.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-038).

*通讯作者 Tel: 86-10-63037279, E-mail: shancen@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0039

SARS-CoV 是对人类具有高致病性的冠状病毒^[1,2]。于 2019 年暴发的严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 引发冠状病毒大流行病^[3], 导致全球超过 690 万人死亡, 对人类健康和经济造成巨大负担^[4]。由于病毒变异快速且频繁, 使得已有的防控冠状病毒感染的药物或疫苗作用效果减弱^[5-7], 提示研究者寻找更加有效且作用范围广泛的潜在抗冠状病毒药物或疫苗的必要性。

近年来, 靶向宿主的抗病毒药物因其抗病毒活性强、耐药性低及受病毒变异影响较小等优点, 日益成为开发新型靶点的抗病毒新疗法^[8-10]。细胞周期依赖性蛋白激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs) 是真核细胞中推动细胞周期进程的核心宿主因子, 在细胞分裂和转录调节等方面发挥重要功能^[11]。大量研究表明, 病毒感染能够利用宿主细胞内 CDKs, 引发细胞周期失调和克服宿主限制因素, 从而促进多种病毒复制^[12]。已报道, 人类免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)^[13]、单纯疱疹病毒 1 型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1)^[14]和甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV)^[15]均能通过 CDKs 调控病毒复制。此前, 本课题组的研究发现宿主因子 CDK2 与 SARS-CoV-2 非结构蛋白 12 (non-structural protein 12, nsp12) 结合, 诱导 nsp12 的磷酸化, 促进病毒聚合酶复合物的组装, 从而保证病毒 RNA 合成^[16], 因此, CDK 抑制剂可有效抑制 SARS-CoV-2 复制^[16,17], 有望被开发成为新的抗病毒药物。

夫拉平度 (flavopiridol) 是一种半合成的黄酮类化合物, 来源于植物生物碱。其作为广谱 CDK 抑制剂, 可抑制 HIV-1^[18]、IAV^[19]等病毒复制, 是一种富有前景的广谱抗病毒药物。前期研究发现, 夫拉平度是潜在的 SARS-CoV-2 抗感染药物^[16]。为进一步研究夫拉平度抑制冠状病毒复制的作用机制, 发展冠状病毒治疗策略, 本研究利用 SARS-CoV-2 RNA 聚合酶药物评价系统证明夫拉平度显著抑制 SARS-CoV-2 RNA 合成。夫拉平度抑制 SARS-CoV-2 RNA 聚合酶活性半数效应浓度 (concentration for 50% of maximal effect, EC₅₀) 为 0.1 μmol·L⁻¹, 并且表现出较强的抑制 HCoV-OC43 活性及低细胞毒性。该研究表明, 夫拉平度是潜在的抗冠状病毒药物。

材料与方法

细胞、病毒与试剂 人胚肾细胞 HEK293T 和仓鼠肾成纤维细胞 BHK21 细胞系为本实验室冻存, 维持于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基, 于 5% CO₂ 条件下

37 °C 恒温培养; 重组人冠状病毒 HCoV-OC43 病毒获赠于中国疾病预防控制中心, 扩增至 BHK21 细胞系; 胎牛血清、DMEM 培养基均购自于美国赛默飞公司; 夫拉平度 (货号: HY-10005)、瑞德西韦 (货号: HY-104077) (MedChemExpress 公司) 溶解于二甲基亚砜溶液; 腔肠素 h (货号: 50909-86-9, 上海翌圣生物科技有限公司); 细胞总 RNA 提取试剂盒 (货号: RC101-01)、荧光定量 PCR 反应试剂盒 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix (货号: Q712-02) 均购自南京诺维赞公司; 细胞增殖及毒性检测试剂盒 CCK-8 (货号: MA0218, 大连美仑生物公司); 反转录酶 MMLV (货号: 639574, 日本 Takara 公司); Flag 标签一抗 DYKDDDDK Tag antibody (货号: 8146)、β-actin 一抗 (货号: 4967) 购自于 Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (货号: ZB-2305)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (货号: ZB-2301) 购自于北京中杉金桥公司。

质粒 SARS-CoV-2 RdRp 质粒和高斯荧光素酶报告基因 (Guassia luciferase, GLuc) 质粒依据报道文献^[20]构建。SARS-CoV-2 nsp7、nsp8 和 nsp12 分别在 C 端带有 Flag 标签。GLuc 报告基因质粒由 CMV 启动子驱动, GLuc 正链两侧为 SARS-CoV-2 5' 非翻译区和 3' 非翻译区序列。

细胞总 RNA 提取和荧光定量 PCR 反应 取每毫升细胞数为 2×10⁵ 个细胞铺板于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基的 6 孔板中, 至完全贴壁后进行转染, 加入阳性对照 5 μmol·L⁻¹ 瑞德西韦或不同浓度的夫拉平度培养至 24 h, 收集细胞, 根据说明书使用细胞总 RNA 提取试剂盒裂解细胞并提取 RNA。在进行反转录时, 根据说明书使用反转录酶 MMLV 将 RNA 反转录为 cDNA, 所使用的特异性引物序列, 正链-Gluc-RT: 5'-TGGATCTTGCTGGCGAATGT-3'; 负链 -Gluc-RT: 5'-ACTGTCGTTGACAGGACACG-3'。使用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应, PCR 反应的引物和内参基因引物为 GLuc-F: 5'-CGGGTGTGACCGAAAGGTAA-3'; GLuc-R: 5'-TGGATCTTGCTGGCGAATGT-3'; GAPDH-F: 5'-GTCCACTGGCGTCTTACCA-3'; GAPDH-R: 5'-GTGGCAGTGATGGCATGGAC-3'。

GLuc 活性检测 腔肠素 h 粉末溶解于无水乙醇中, 配成浓度为 1.022 mmol·L⁻¹ 腔肠素储存液。使用时, 利用 PBS 溶液将储存液稀释为 16.7 μmol·L⁻¹ 底物, 并在暗处放置 30 min。取 10 μL 细胞上清于白色非透明 96 孔板中, 加入 60 μL 底物混合, 使用 Berthold Centro XS3 LB 960 微孔板发光计, 检测时间为 0.5 s,

读取荧光强度值。

细胞毒性检测 使用细胞增殖及毒性检测试剂盒 CCK-8 评价夫拉平度在 BHK21 细胞上的细胞毒性。细胞铺板于 96 孔板中至完全贴壁, 加入 1 μL 起始终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 3 倍浓度梯度稀释的夫拉平度, 孵育 48 h, 加入 10 μL CCK-8 试剂于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 90 min, 于 450 nm 处测量吸光度值。

蛋白免疫印迹 使用蛋白上样缓冲液于 100 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解细胞, 并通过 10% SDS-PAGE 分离目的蛋白。将目的蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭, 依次进行一抗、二抗孵育, 使用 ECL 显影液于 Gel Doc XR+ 分子成像仪成像。

抗冠状病毒活性检测 根据文献^[21]进行夫拉平度抗人冠状病毒 HCoV-OC43 活性检测。该病毒为海肾荧光素酶 (renilla luciferase, RLuc) 基因替换病毒 nsp2 构成的重组人冠状病毒, 检测 RLuc 荧光强度即可表征 HCoV-OC43 复制水平。BHK21 (每毫升 1×10^5 个) 铺板于平底 96 孔板至完全贴壁, 加入 1 μL 起始终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 3 倍浓度梯度稀释的夫拉平度, 以病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 0.1 的 HCoV-OC43 进行细胞感染, 孵育 48 h, 使用细胞裂解液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 暗处裂解细胞 30 min, 取 10 μL 细胞裂解上清, 腔肠素 h 测量 RLuc 荧光强度。

统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计学分析, 采用单因素方差分析和 *t* 检验进行差异分析, $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$ 表示具有显著性差异。

结果

1 夫拉平度抑制 SARS-CoV-2 RdRp 活性

在前期研究中, 本课题组已建立了一个基于细胞水平的 SARS-CoV-2 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 抑制剂的筛选系

统^[20], 并筛选出一系列 SARS-CoV-2 RdRp 抑制剂, 其中包括 CDK2 抑制剂 SNS-032^[16,20]。该系统由两部分组成: 荧光素酶 GLuc 报告质粒和表达 SARS-CoV-2 RdRp 的 nsp7、nsp8 和 nsp12 质粒。在 CMV 启动子驱动下, 插入到 SARS-CoV-2 病毒 RNA 序列 5' 非翻译区和 3' 非翻译区之间的 GLuc 被 RdRp 识别并扩增, 使得 GLuc 表达水平大幅增加, 因此检测的 GLuc 水平可代表 SARS-CoV-2 RdRp 的活性。本研究利用该系统探究了 CDK 抑制剂——夫拉平度对 SARS-CoV-2 RdRp 活性的影响。在 HEK293T 细胞中, 共同转染荧光素酶 GLuc 报告质粒和 SARS-CoV-2 RdRp Flag-nsp7、Flag-nsp8 和 Flag-nsp12 质粒, 持续 24 h, 检测细胞上清中 GLuc 表达。DMSO 设置为空白对照组, 以瑞德西韦作为该实验的阳性对照。结果表明, 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 夫拉平度显著抑制 SARS-CoV-2 RdRp 的活性 (图 1)。

2 夫拉平度以剂量依赖方式抑制 SARS-CoV-2 RdRp

接下来, 本研究测定了夫拉平度抑制 SARS-CoV-2 RdRp 的 EC_{50} 以及对实验细胞 50% 细胞毒性浓度值 (concentration of cytotoxicity 50%, CC_{50}), 以瑞德西韦作为阳性对照组。结果表明 (图 2), 夫拉平度以剂量依赖方式抑制 SARS-CoV-2 RdRp, EC_{50} 为 0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CC_{50} 为 0.91 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。阳性对照瑞德西韦 EC_{50} 为 2.62 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CC_{50} 大于 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究表明, 夫拉平度体外抑制 SARS-CoV-2 RdRp 优于瑞德西韦, 且其抑制活性并非源于细胞毒性。

3 夫拉平度抑制 SARS-CoV-2 正链和负链 RNA 合成

为了进一步验证夫拉平度抑制 SARS-CoV-2 RdRp 从而抑制 SARS-CoV-2 RNA 合成, 本研究分别以细胞内合成的荧光素酶报告基因 GLuc 正链和负链特异性引物合成 GLuc 基因的正链和负链。由于在 SARS-CoV-2 5' 非翻译区和 3' 非翻译区之间, GLuc 基因序列代替了 SARS-CoV-2 的保守区域序列 (conserved domain sequences, CDS), 因此合成的 GLuc 正链和负

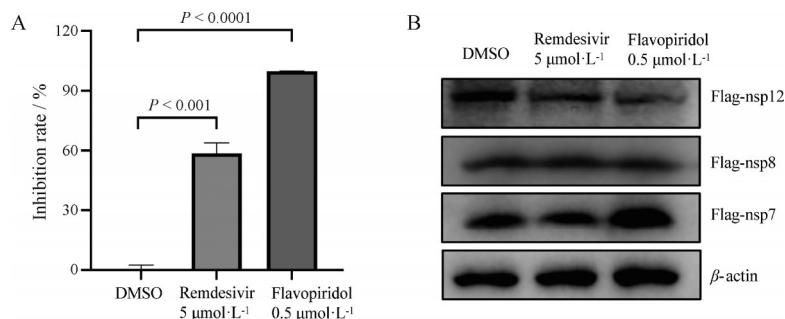


Figure 1 Inhibition of SARS-CoV-2 RdRp by flavopiridol. A: Flavopiridol inhibited SARS-CoV-2 RdRp activity. Remdesivir as the positive control and DMSO as the blank control were used; B: Protein immunoblotting was performed to characterize the expression levels of SARS-CoV-2 RdRp Flag-nsp7, Flag-nsp8 and Flag-nsp12. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase; nsp: Non-structural protein

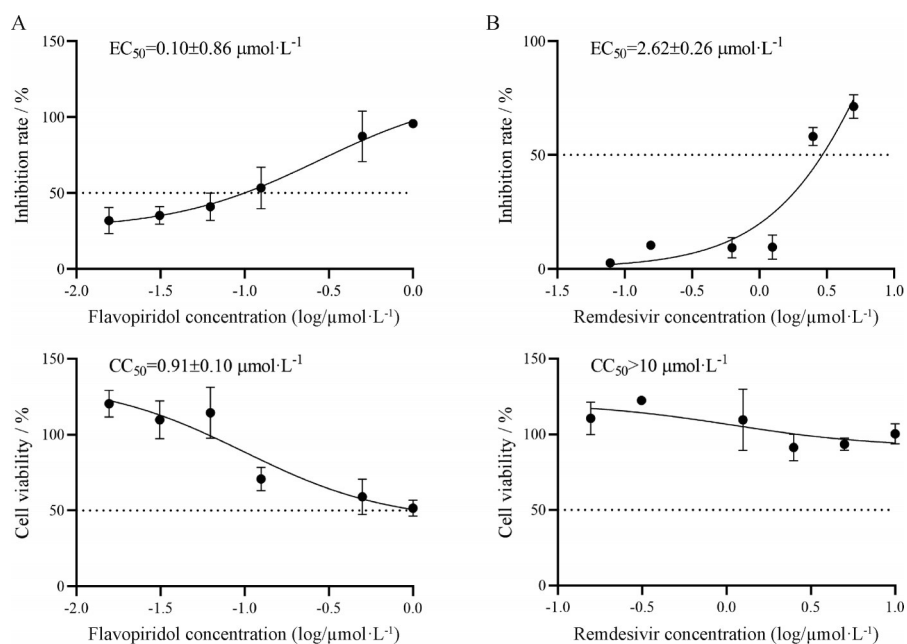


Figure 2 Flavopiridol inhibited SARS-CoV-2 RdRp in a dose-dependent manner. The EC_{50} of flavopiridol (A) and remdesivir (B) inhibiting SARS-CoV-2 RdRp (upper panel), as well as the CC_{50} (lower panel) to HEK293T cells. EC_{50} : Concentration for 50% of maximal effect; CC_{50} : Concentration of cytotoxicity 50%

链即可代表 SARS-CoV-2 核酸序列的正链和负链。首先,在不同的药物浓度下,细胞共同转染 GLuc 质粒和 SARS-CoV-2 RdRp 质粒,24 h 后,收集细胞并提取总 RNA,通过 qRT-PCR 法检测 SARS-CoV-2 正链和负链 RNA 表达水平,并进行相对定量,同时,利用蛋白免疫印迹检测 SARS-CoV-2 RdRp 的表达水平,设置 DMSO 为空白对照组,瑞德西韦为阳性对照组。结果表明,夫拉平度显著抑制 SARS-CoV-2 正链和负链 RNA 的合成。与空白对照组相比,0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 夫拉平度抑制 SARS-CoV-2 RNA 合成约为 80%,0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 夫拉平度抑制 SARS-CoV-2 RNA 合成约 60%,与阳性对照

5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 瑞德西韦相当 (图 3)。

4 夫拉平度对人冠状病毒 HCoV-OC43 抗病毒活性评价

为了评价夫拉平度是否对冠状病毒复制产生抑制作用,本研究利用重组人类冠状病毒 HCoV-OC43,测量夫拉平度对 HCoV-OC43 复制的影响^[21]。在药物不同的浓度下,利用 MOI 为 0.1 的 HCoV-OC43 病毒感染其宿主细胞 BHK21,48 h 后分析 HCoV-OC43 病毒复制水平,同时测试各浓度下药物对细胞毒性作用的影响,以瑞德西韦作为阳性对照。结果显示,夫拉平度以剂量依赖方式抑制 HCoV-OC43 病毒复制, EC_{50} 为

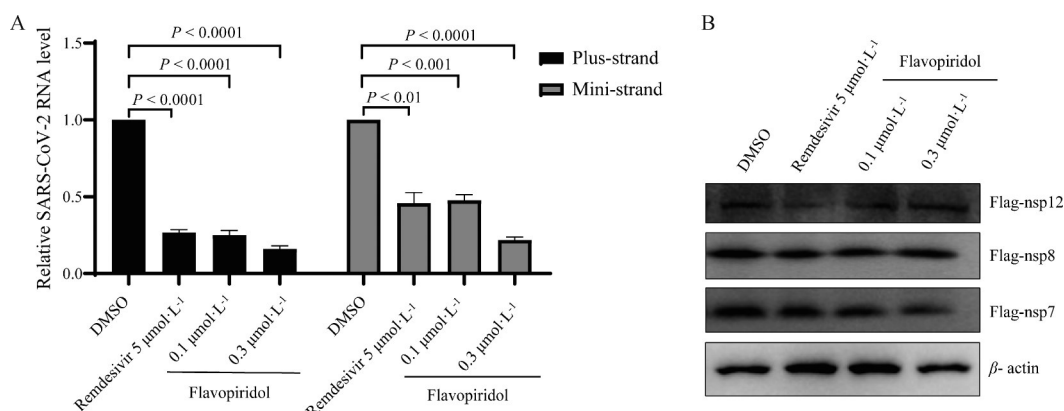


Figure 3 Flavopiridol suppressed SARS-CoV-2 RNA synthesis in both plus- and mini-strand. A: Inhibitory effect of flavopiridol on SARS-CoV-2 plus-strand (left panel) and mini-strand (right panel) RNA synthesis. Remdesivir was the positive control and DMSO was the blank control in this experiment; B: Protein immunoblotting to detect the expression levels of SARS-CoV-2 RdRp Flag-nsp7, Flag-nsp8 and Flag-nsp12. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$.

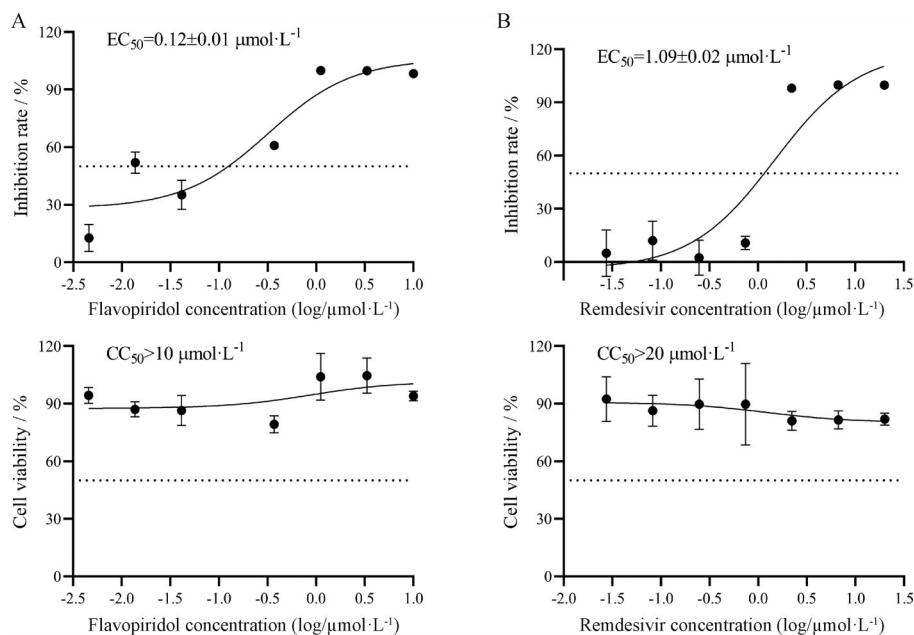


Figure 4 Evaluation of antiviral activity of flavopiridol against recombinant human coronavirus HCoV-OC43. The EC_{50} (upper panel) and CC_{50} (lower panel) of flavopiridol (A) and remdesivir (B) inhibiting HCoV-OC43 replication on BHK21 cell line. $n = 3, \bar{x} \pm s$

$0.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CC_{50} 大于 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 治疗指数 (therapeutic index, TI) 大于 83.33 (图4A), 阳性对照瑞德西韦抑制 HCoV-OC43 病毒复制 EC_{50} 为 $1.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CC_{50} 大于 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TI 大于 18.35 (图4B)。上述实验结果表明, 夫拉平度抑制 HCoV-OC43 病毒复制的能力优于瑞德西韦。

讨论

病毒感染引发宿主细胞周期调控从而使宿主环境往有利于病毒复制的方向发展^[22], CDKs 作为细胞周期调节蛋白在其中发挥重要作用^[16]。CDK 抑制剂通过 ATP 竞争性或非竞争性与 CDKs 结合从而产生药理学活性^[12]。自上世纪以来, 已有多种 CDK 抑制剂获批进入临床试验, 包括夫拉平度和瑞博西尼^[23,24], 但是目前针对 CDK 抑制剂的药理学研究大多集中在抗肿瘤活性上^[24]。近年来, 靶向宿主的 CDK 抑制剂因抗病毒活性强且耐药性低等优点, 在抗病毒研究中备受关注^[25]。本研究对夫拉平度影响人冠状病毒 HCoV-OC43 复制的能力进行了评估。结果显示, 夫拉平度在 BHK21 细胞上有效抑制 HCoV-OC43, EC_{50} 为 $0.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TI 大于 83.33, 其抗病毒活性优于阳性对照瑞德西韦, 并且兼具低细胞毒性 (图4)。

本研究发现, 夫拉平度显著抑制 SARS-CoV-2 RNA 聚合酶 RdRp 活性 (图2A) 以及病毒正链和负链 RNA 合成 (图3A)。基于前期研究结果, 课题组推测夫拉平度通过抑制 CDK2 活性, 阻断 nsp12 的磷酸化和病

毒 RNA 合成。此外, 夫拉平度能够通过抑制 CDK9/cyclin T (positive transcription elongation factor b, P-TEFb) 的活性, 从而阻止 RNA 聚合酶 II C 端结构域的磷酸化, 进而导致转录抑制^[26]。HIV TAT 蛋白^[27]、DENV C 蛋白^[28] 及 IAV RdRp^[29] 等多种病毒蛋白与 P-TEFb 相互作用, 促进自身基因组的转录和复制。目前, 尚不清楚 P-TEFb 是否也参与了冠状病毒 RNA 的合成, 因此也不排除夫拉平度通过抑制 P-TEFb 活性从而抑制病毒复制。

据文献报道, 夫拉平度对包括淋巴瘤、前列腺癌、乳腺癌、白血病等多种癌症有效^[30]。夫拉平度在实体瘤的 I 临床试验研究中发现其剂量限制性毒性是分泌性腹泻, 在 50 和 $78 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ 时, 平均稳态血药浓度分别为 278 和 $390 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[31]。本研究发现, 夫拉平度抑制 SARS-CoV-2 RdRp 活性的 EC_{50} 为 $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图2A), 抑制 HCoV-OC43 病毒复制的 EC_{50} 为 $120 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图4A), 提示夫拉平度应用于抗冠状病毒具有一定的可能性, 但仍需要体内实验证明。

总而言之, 本结果表明, 夫拉平度显著抑制 SARS-CoV-2 RdRp 活性, 同时, 其对 HCoV-OC43 复制表现出强烈抑制作用, 提示夫拉平度是一种潜在的抗冠状病毒药物。CDKs 通过周期调控和转录抑制等方面对病毒复制产生影响, 成为一类极具潜力的抗病毒治疗靶点。本研究为夫拉平度治疗冠状病毒感染提供了理论依据, 将进一步推动夫拉平度抗病毒感染研究。

作者贡献: 王丽丹负责实验操作、数据处理和文章撰写;

郭赛赛负责实验设计与数据分析;岑山负责研究课题监管、论文审阅与修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17: 181-192.
- [2] Wang XY, Peng C, Yang YQ, et al. Research progress on active compounds against pathogenic coronaviruses and their potential target proteins [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2340-2357.
- [3] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China [J]. *Nature*, 2020, 579: 265-269.
- [4] Weil AR. Public health during COVID-19 and more [J]. *Health Aff (Millwood)*, 2023, 42: 309.
- [5] Parums DV. Editorial: the XBB. 1.5 ('Kraken') subvariant of Omicron SARS-CoV-2 and its rapid global spread [J]. *Med Sci Monit*, 2023, 29: e939580.
- [6] Wang Y, Long Y, Wang F, et al. Characterization of SARS-CoV-2 recombinants and emerging Omicron sublineages [J]. *Int J Med Sci*, 2023, 20: 151-162.
- [7] Liu QY, Wang XL. Strategies for the development of drugs targeting novel coronavirus 2019-nCoV [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 181-188.
- [8] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181: 271-280.
- [9] Jeong JH, Choi JH, Kim BK, et al. Evaluating Z-FA-FMK, a host cathepsin L protease inhibitor, as a potent and broad-spectrum antiviral therapy against SARS-CoV-2 and related coronaviruses [J]. *Antiviral Res*, 2023, 216: 105669.
- [10] Huang TG, Sun L, Zhan P, et al. Recent advances in the research of broad-spectrum antiviral agents [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 679-693.
- [11] Lim S, Kaldis P. CDKs, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation [J]. *Development*, 2013, 140: 3079-3093.
- [12] Gutierrez-Chamorro L, Felip E, Ezeonwumelu IJ, et al. Cyclin-dependent kinases as emerging targets for developing novel antiviral therapeutics [J]. *Trends Microbiol*, 2021, 29: 836-848.
- [13] Cribier A, Descours B, Valadão AL, et al. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1 [J]. *Cell Rep*, 2013, 3: 1036-1043.
- [14] Zhao ZY, Tang KW, Muylaert I, et al. CDK9 and SPT5 proteins are specifically required for expression of herpes simplex virus 1 replication-dependent late genes [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292: 15489-15500.
- [15] He Y, Xu K, Keiner B, et al. Influenza A virus replication induces cell cycle arrest in G0/G1 phase [J]. *J Virol*, 2010, 84: 12832-12840.
- [16] Guo S, Lei X, Chang Y, et al. SARS-CoV-2 hijacks cellular kinase CDK2 to promote viral RNA synthesis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 400.
- [17] Schang LM. Advances on cyclin-dependent kinases (CDKs) as novel targets for antiviral drugs [J]. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 2005, 5: 29-37.
- [18] Pumfery A, de la Fuente C, Berro R, et al. Potential use of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors as anti-HIV therapeutics [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12: 1949-1961.
- [19] Wang SX, Zhang JJ, Ye X. Protein kinase inhibitor flavopiridol inhibits the replication of influenza virus *in vitro* [J]. *Acta Microbiol Sin (微生物学报)*, 2012, 52: 1137-1142.
- [20] Zhao J, Guo S, Yi D, et al. A cell-based assay to discover inhibitors of SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase [J]. *Antiviral Res*, 2021, 190: 105078.
- [21] Shen L, Yang Y, Ye F, et al. Safe and sensitive antiviral screening platform based on recombinant human coronavirus OC43 expressing the luciferase reporter gene [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60: 5492-5503.
- [22] Martin CK, Samolej J, Olson AT, et al. Vaccinia virus arrests and shifts the cell cycle [J]. *Viruses*, 2022, 14: 431.
- [23] Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 130-146.
- [24] Goel S, DeCristo MJ, McAllister SS, et al. CDK4/6 inhibition in cancer: beyond cell cycle arrest [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28: 911-925.
- [25] Wild M, Hahn F, Brückner N, et al. Cyclin-dependent kinases (CDKs) and the human cytomegalovirus-encoded CDK ortholog pUL97 represent highly attractive targets for synergistic drug combinations [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 2493.
- [26] Chen R, Keating MJ, Gandhi V, et al. Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death [J]. *Blood*, 2005, 106: 2513-2519.
- [27] Ali A, Ghosh A, Nathans RS, et al. Identification of flavopiridol analogues that selectively inhibit positive transcription elongation factor (P-TEFb) and block HIV-1 replication [J]. *Chembiochem*, 2009, 10: 2072-2080.
- [28] Li LL, Hu ST, Wang SH, et al. Positive transcription elongation factor b (P-TEFb) contributes to dengue virus-stimulated induction of interleukin-8 (IL-8) [J]. *Cell Microbiol*, 2010, 12: 1589-1603.
- [29] Zhang J, Li G, Ye X. Cyclin T1/CDK9 interacts with influenza A virus polymerase and facilitates its association with cellular RNA polymerase II [J]. *J Virol*, 2010, 84: 12619-12627.
- [30] Joshi H, Tuli HS, Ranjan A, et al. The pharmacological implications of flavopiridol: an updated overview [J]. *Molecules*, 2023, 28: 7530.
- [31] Rudek MA, Bauer KS Jr, Lush RM 3rd, et al. Clinical pharmacology of flavopiridol following a 72-hour continuous infusion [J]. *Ann Pharmacother*, 2003, 37: 1369-1374.