一种治疗肠道病毒感染的组合物和联合用药方法

技术领域

本发明属于生物医药领域，具体地说，本发明涉及一种治疗肠道病毒感染的组合物和联合用药方法。

背景技术

肠道病毒是带有单股正链 RNA 的微小核糖核酸病毒科病毒，目前共发现多于 100 种血清型。多数肠道病毒感染并不引起严重的症状或仅仅引起较轻微的疾病，但在儿童和免疫缺陷人群中通常造成严重后果。肠道病毒属中的肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A16(CVA16)是引起亚太地区婴幼儿手足口病的主要病原体。手足口病的症状通常较轻微如发热、咽痛、腹泻、局部出疹等，但也有些病人会发展成中枢神经系统(CNS)疾病，如无菌性脑膜炎、致死性脑炎甚至死亡。而 EV71 是引起重症手足口病的主要病原体。迄今为止尚无有效针对肠道病毒感染的药物治疗手段，现有的治疗手段仅限于支持性护理、静脉注射免疫球蛋白或利巴韦林，因此寻找抗病毒药物迫在眉睫。肠道病毒使用病毒自身的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶合成基因组，所以在 RNA 复制过程中，子代 RNA 很容易发生突变。

因此，为了有效地预防或治疗肠道病毒感染，本领域迫切需要开发新型的预防和/或治疗肠道病毒感染的技术。

发明内容

本发明的目的在于提供一种治疗肠道病毒感染的组分和联合用药方法。

本发明的第一方面，提供了一种抑制肠道病毒组合物，所述组合物包括第一活性成分和第二活性成分，

其中，所述第一活性成分为肠道病毒（如，EV71）的 3D 蛋白抑制剂；

所述第二活性成分为肠道病毒（如，EV71）的衣壳蛋白抑制剂；

或者

其中，所述第一活性成分为肠道病毒（如，EV71）的 3C 蛋白抑制剂；

所述第二活性成分选自下组：

肠道病毒（如，EV71）的3A蛋白抑制剂；和

肠道病毒（如，EV71）的3D蛋白抑制剂。

在另一优选例中，所述组合物包括第一活性成分和第二活性成分，

其中，所述第一活性成分为肠道病毒（如，EV71）的3D蛋白抑制剂；

所述第二活性成分为肠道病毒（如，EV71）的衣壳蛋白抑制剂。

在另一优选例中，所述第一活性成分特异性结合肠道病毒的3D蛋白的第121位氨基酸残基（优选为丝氨酸残基），其中氨基酸残基编号基于SEQ ID NO.1。

在另一优选例中，所述第一活性成分包括法匹拉韦、其类似物、或其药学上可接受的盐；

所述第二活性成分包括苏拉明、其类似物、或其药学上可接受盐。

在另一优选例中，所述法匹拉韦的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与法匹拉韦相同的物质。

在另一优选例中，所述苏拉明的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与苏拉明相同的物质。

在另一优选例中，所述肠道病毒选自下组：肠道病毒71型(EV71)、柯萨奇病毒A16(CVA16)、CVB3型、PV1型或EV68型，以及鼻病毒。

在另一优选例中，所述第一活性成分和第二活性成分的摩尔比约为10～100：1～20，优选地为10～100：1～10，更更优选地为10～100：1～5。

在另一优选例中，所述第一活性成分具有肠道病毒（如，EV71）的3D蛋白抑制活性。

在另一优选例中，所述第二活性成分具有肠道病毒（如，EV71）的衣壳蛋白抑制活性。

在另一优选例中，所述组合物中还包括药学上可接受的载体或赋形剂。

在另一优选例中，所述药物组合物的剂型包括片剂、颗粒剂、胶囊、丸剂、注射剂、或口服液。

在另一优选例中，所述的组合物为单元剂型，每个单元剂型中所述第一活性成分和所述第二活性成分的含量约为日剂量的0.1至1(或0.25-1，或0.5-1)，其中所述日剂量为20-100mg。

在另一优选例中，所述的日剂量为25-70mg，如25mg、40mg、50mg。

在另一优选例中，所述组合物包括第一活性成分和第二活性成分，

其中，所述第一活性成分为肠道病毒（如，EV71）的3C蛋白抑制剂；

所述第二活性成分选自下组：

肠道病毒（如，EV71）的3A蛋白抑制剂；和

肠道病毒（如，EV71）的3D蛋白抑制剂。

在另一优选例中，所述第一活性成分包括芦平曲韦、其类似物、或其药学上可接受盐；

所述第二活性成分选自下组：伊曲康唑、其类似物、或其药学上可接受盐；和法匹拉韦、其类似物、或其药学上可接受盐。

在另一优选例中，所述芦平曲韦的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与芦平曲韦相同的物质（如：AG7404）。

在另一优选例中，所述伊曲康唑的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与伊曲康唑相同的物质。

在另一优选例中，所述肠道病毒选自下组：肠道病毒71型(EV71)、柯萨奇病毒A16(CVA16)、CVB3型、PV1型或EV68型，以及鼻病毒。

在另一优选例中，所述第一活性成分和第二活性成分的摩尔比约为1～20：10～100，优选地为1～10：10～100，更更优选地为1～5：10～100。

在另一优选例中，所述第一活性成分具有肠道病毒（如，EV71）的3C蛋白抑制活性。

在另一优选例中，所述第二活性成分具有肠道病毒（如，EV71）的3A蛋白抑制活性；和/或3D蛋白抑制活性。在本发明中，伊曲康唑具有3A蛋白抑制活性，法匹拉韦具有3D蛋白抑制活性。

在另一优选例中，所述组合物中还包括药学上可接受的载体或赋形剂。

在另一优选例中，所述药物组合物的剂型包括片剂、颗粒剂、胶囊、丸剂、注射剂、或口服液。

在另一优选例中，所述的组合物为单元剂型，每个单元剂型中所述第一活性成分和所述第二活性成分的含量约为日剂量的0.1至1(或0.25-1，或0.5-1)，其中所述日剂量为20-100mg。

在另一优选例中，所述的日剂量为25-70mg，如25mg、40mg、50mg。

本发明的第二方面，提供了如本发明第一方面所述的抑制肠道病毒组合物的

用途，用于制备预防和/或治疗肠道病毒感染的药物。

本发明的第三方面，提供了一种预防和/或治疗肠道病毒感染的方法，所述方法包括步骤：

给需要的对象施用本发明第一方面所述的抑制肠道病毒组合物，从而抑制所述对象体内的肠道病毒。

在另一优选例中，所述的对象包括人和非人哺乳动物(如啮齿动物)。

在另一优选例中，所述的施用的用量为 10-100mg/kg 体重，较佳地 15-70mg/kg 体重，更佳地 10-50mg/kg 体重，以所述第一活性成分的重量计。

本发明的第四方面，提供了一种体外非治疗性地抑制肠道病毒生长或者杀灭肠道病毒的方法，包括步骤：在需要处理的场所使用本发明的第一方面所述的抑制肠道病毒组合物。

本发明的第五方面，提供了法匹拉韦、其类似物、或其药学上可接受盐在制备试剂中的用途，所述试剂用于：

(I)抑制肠道病毒 3D 蛋白的合成,和/或

(II)特异性结合肠道病毒 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基，其中氨基酸残基编号基于 SEQ ID NO.1。

在另一优选例中，所述肠道病毒 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基为丝氨酸。

在另一优选例中，所述试剂还用于：(III)抑制肠道病毒的复制。

在另一优选例中，所述肠道病毒为肠道病毒 71 型。

本发明的第六方面，提供了一种复合物，所述复合物如式 I 所示

A-B (I)

其中，A 为法匹拉韦或其类似物；B 为肠道病毒的 3D 蛋白。

在另一优选例中，所述复合物中，A 和 B 的结合位点包括肠道病毒 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基，其中氨基酸残基编号基于 SEQ ID NO.1。

本发明的第七方面，提供了一种肠道病毒耐药毒株，所述毒株的 3D 蛋白发生了突变，并且所述突变导致所述肠道病毒产生了耐药性。

在另一优选例中，所述突变发生在 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基。

在另一优选例中，所述 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基由丝氨酸残基突变为天冬氨酸残基。

在另一优选例中，所述毒株为肠道病毒 71 型毒株。

本发明的第八方面，提供了本发明第七方面所述的耐药毒株的用途，用于筛选抑制或杀灭肠道病毒的药剂或试剂。

本发明的第九方面，提供了一种本发明所述的肠道病毒耐药毒株的抑制剂，所述抑制剂能抑制或杀灭本发明第七方面所述的的耐药毒株。

本发明的第十方面，提供了一种筛选药物的方法，所述方法包括：将待筛选药物与肠道病毒或者肠道病毒的 3D 蛋白接触，并检测是否形成式 II 所述的复合物，

A'-B (II)

其中，A'为待筛选药物；B 为肠道病毒的 3D 蛋白.

在另一优选例中，所述复合物中，A'和 B 的结合位点包括肠道病毒 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基，其中氨基酸残基编号基于 SEQ ID NO.1

在另一优选例中，所述待筛选药物包括法匹拉韦、其类似物、或其药学上可接受盐。

本发明的第十一方面，提供了一种肠道病毒的抑制剂，所述抑制剂以肠道病毒 3D 蛋白为靶点，抑制所述肠道病毒的生长或繁殖。

在另一优选例中，所述抑制剂以肠道病毒 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基为靶点，其中氨基酸残基编号基于 SEQ ID NO.1。

在另一优选例中，所述抑制剂选自法匹拉韦、其类似物、或其药学上可接受盐。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图 1. 伊曲康唑、芦平曲韦、法匹拉韦、苏拉明和 GW5074 抑制 EV71 的感染。其中，图 1A 显示了各化合物对 EV71 的抑制效果及对细胞的毒性作用；图 1B 显示了显示了不同浓度的各化合物对病毒滴度的影响.

图 2.法匹拉韦通过作用于肠道病毒 71 型 3D 蛋白抑制病毒复制。

图 3.不同药物组合在治疗 EV71 感染中的相互作用效果。

图 4.伊曲康唑和芦平曲韦联合用药可以协同抑制 EV71 效价。

具体实施方式

本发明人通过广泛而深入的研究，首次意外地发现了一种抑制肠道病毒组合物，所述组合物中以法匹拉韦为第一活性成分，以苏拉明为第二活性成分，或者所述组合物中以芦平曲韦为第一活性成分，以伊曲康唑和/或法匹拉韦为第二活性成分，实验结果表明，此药物组合具有显著的协同作用，而且在被测浓度组合下均未发现增强的细胞毒性。

本发明公开了能够有效抑制肠道病毒感染的联合用药方法。针对肠道病毒的抑制活性，本发明人经过大量的测试意外的发现法匹拉韦和苏拉明，芦平曲韦和伊曲康唑、芦平曲韦和法匹拉韦表现出显著地协同作用。而且上述药物组合，在被测浓度组合下均未发现增强的细胞毒性。法匹拉韦和苏拉明组合或芦平曲韦和伊曲康唑组合能够阻止耐药病毒的产生。此外本发明人还发现法匹拉韦通过作用于 EV71 的 3D 蛋白来抑制病毒复制，该位点可以作为潜在的靶点用以开发抗病毒药物。

在描述本发明之前，应当理解本发明不限于所述的具体方法和实验条件，因为这类方法和条件可以变动。还应当理解本文所用的术语其目的仅在于描述具体实施方案，并且不意图是限制性的，本发明的范围将仅由所附的权利要求书限制。

除非另外定义，否则本文中所用的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。如本文所用，在提到具体列举的数值中使用时，术语“约”意指该值可以从列举的值变动不多于 1%。例如，如本文所用，表述“约 100”包括 99 和 101 和之间的全部值(例如，99.1、99.2、99.3、99.4 等)。

虽然在本发明的实施或测试中可以使用与本发明中所述相似或等价的任

何方法和材料，本文在此处例举优选的方法和材料。

法匹拉韦及其类似物

法匹拉韦(favipiravir)是一种具有广谱抗病毒活性的 RdRP 抑制剂。经过深入的研究本发明人意外地发现法匹拉韦能够在体外抑制 EV71 复制，机制研究发现其作用位点位于 EV71 的 3D 蛋白。

在本发明的一个优选地实施方式中，根据本发明的法匹拉韦的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与法匹拉韦相同的物质。

在本发明的一个优选地实施方式中，本发明提供了一种肠道病毒的抑制剂，所述抑制剂以肠道病毒 3D 蛋白为靶点，抑制所述肠道病毒的生长或繁殖。

在一个优选地实施方式中，所述抑制剂以肠道病毒 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基为靶点，其中氨基酸残基编号基于 SEQ ID NO.1。

在一个优选地实施方式中，所述抑制剂选自法匹拉韦、其类似物、或其药学上可接受盐。

3D 蛋白是一种肠道病毒(EV71 病毒)RNA 依赖的 RNA 聚合酶，是病毒基因组编码的重要的酶，它催化了病毒基因组的复制和转录。在本发明的一个优选地实施方式中，所述 3D 蛋白的氨基酸序列如下：

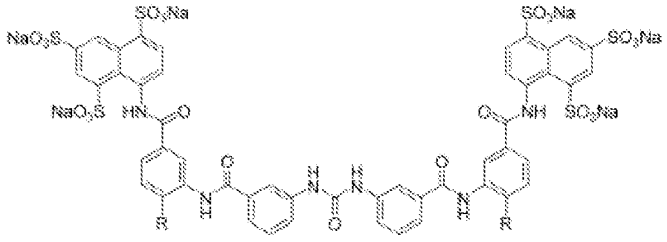
GEIQWVKPNKETGRLNINGPTRTKLEPSVFHDIFEGNKEPAVLHSKDPRLEVDFEQALFSKYV
GNTLYEPDEYIKEAALHYANQLKQLEINTSQMSMEEACYGTENLEAIDLHTSAGYPYSALGIKKRDI
LDPTTRDVSKMKFYMDKYGLDLPYSTYVKDELRSIDKIKKGKSRLIEASSLNDSVYLRMTFGHLYEA
FHANPGTITGSAVGCNPDTFWSKLPILLPGSLFAFDYSGYDASLSPVWFRALELVLREIGYSERAVS
LIEGINHTHHVYRNKTYCVLGGMPSGCSGTSIFNSMINNIIIRALLIKTFKGIDLDELNMVAYGDDV
LASYPFPIDCLELAKTGKEYGLTMTPADKSPCFNEVNWGNATFLKRGFLPDEQFPFLIHPTMPMREI
HESIRWTKDARNTQDHVRSLCLLAWHNGKQEYEKFVSTIRSVPVGRALAIPNYENLRRNWLELF

（SEQ ID NO.1）

苏拉明及其类似物

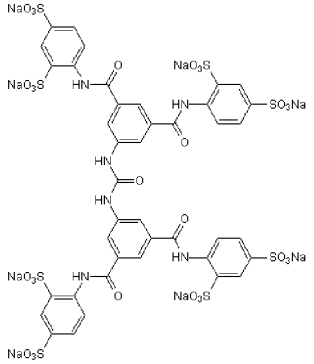
苏拉明(suramin)在临床上用于治疗锥体虫病，它能够与 EV71 的衣壳蛋白作用从而抑制病毒吸附进入细胞。

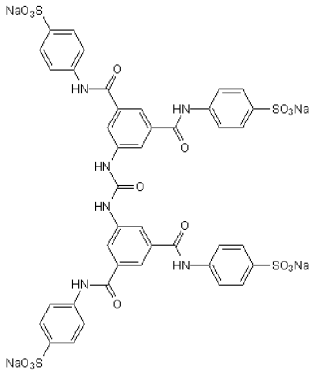
在本发明的一个优选地实施方式中，根据本发明的苏拉明的类似物具有下式 IV 所示的结构：

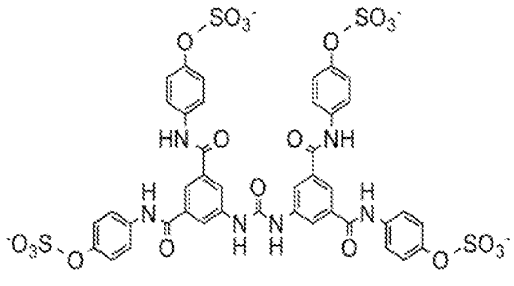


。

在本发明的一个优选地实施方式中，根据本发明的苏拉明的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与苏拉明相同的物质（如：NF449、NF110、NM16）

NF449：；

NF110：；

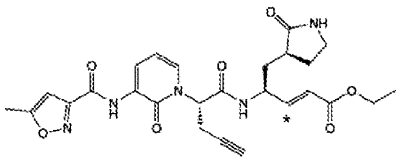
NM16：。

芦平曲韦及其类似物

芦平曲韦(rupintrivir)最初用于治疗鼻病毒感染，研究表明它主要通过抑制EV71的3C蛋白从而抑制病毒复制。

在本发明的一个优选地实施方式中，根据本发明的芦平曲韦的类似物AG7404

具有如下结构：



。

在本发明的一个优选地实施方式中，根据本发明的芦平曲韦的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与芦平曲韦相同的物质（如：AG7404）。

伊曲康唑及其类似物

伊曲康唑(itraconazole)是一种口服的三唑类广谱抗真菌剂，能够抑制曲霉菌和白色念珠菌，也能有效治疗儿童的霉菌感染，它也是一种最近被报道的肠道病毒广谱抑制剂，通过作用于病毒的 3A 蛋白和宿主的氧化固醇结合蛋白抑制病毒生命周期。

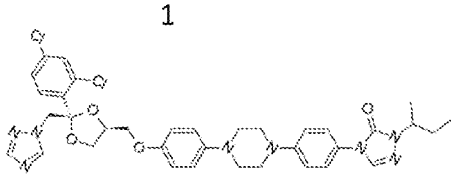
在本发明的一个优选地实施方式中，根据本发明的伊曲康唑的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与伊曲康唑相同的物质。

GW5074 及其类似物

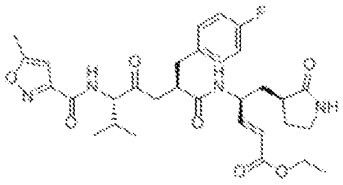
GW5074 是 Raf 信号通路激酶抑制剂，对肠道病毒复制具有抑制作用，但并不作用于该细胞通路，它通过作用于脊髓灰质炎病毒的 3A 蛋白发挥抗病毒活性。

本申请所涉及的化合物的结构式如下：1 为伊曲康唑，2 为芦平曲韦，3 法匹拉韦，4 为 GW5074，5 为苏拉明。

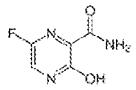
1



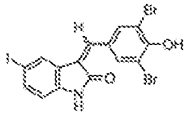
2



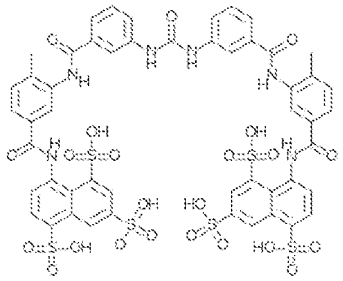
3



4



5



在联合用药疗法中，苏拉明和法匹拉韦，伊曲康唑和芦平曲韦表现出显著的强协同作用，且在被测浓度下没有检测到明显增强的细胞毒性；芦平曲韦和法匹拉韦表现出弱协同作用；芦平曲韦和苏拉明表现出叠加作用；而伊曲康唑和苏拉明，伊曲康唑和法匹拉韦，GW5074 和伊曲康唑表现出强拮抗作用。

组合物

如本文所用，术语“组合物”包括药物组合物。

发明第一方面所述的组合物包含抑制肠道病毒的活性成分，和药学上可接受的载体。抑制肠道病毒的活性成分包括第一活性成分和第二活性成分，其中，所述第一活性成分包括法匹拉韦、其类似物、或其药学上可接受的盐；而第二活性成分选自下组：苏拉明、其类似物、或其药学上可接受盐；和芦平曲韦、其类似物、或其药学上可接受盐。

本发明的药物组合物还可以包含各种与所含化合物或组合物相适应的药物辅料，并通过常规方法制备成有利于给药的剂型，如：但不仅限于水溶液注射剂、粉针剂、丸剂、散剂、片剂、贴剂、栓剂、乳剂、霜剂、凝胶剂、颗粒剂、胶囊剂、气雾剂、喷雾剂、粉雾剂、缓释剂和控释剂等。所述药用辅料既

可以是各种制剂中常规使用的，如：但不仅限于等渗剂、缓冲液、矫味剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、崩解剂和润滑剂等；也可以是为了与所述物质相适应而选择使用的，如：但不仅限于乳化剂、增溶剂、抑菌剂、止痛剂和抗氧剂等，这类辅料能有效提高组合物所含化合物的稳定性和溶解性或改变化合物的释放速率和吸收速率等，从而改善各种化合物在生物体内的代谢，进而增强组合物的给药效果。此外，还可以为实现特定的给药目的或方式，如：缓释给药、控释给药和脉冲给药等，而使用的辅料，如：但不仅限于明胶、白蛋白、壳聚糖、聚醚和聚酯类高分子材料(如：但不仅限于，聚乙二醇、聚氨酯、聚碳酸酯及其共聚物等)。所述有利于给药的主要表现有：但不仅限于提高治疗效果、提高生物利用度、降低毒副作用和提高患者顺应性等。

在水溶液注射剂中，辅料一般包括等渗剂和缓冲液，以及必要的乳化剂(如：Tweeen-80、Pluronic 和 Poloxamer 等)、增溶剂和抑菌剂等。此外，还包括含有药学上可接受的其它药用辅料，如：抗氧剂、pH 调节剂和止痛剂等。

用于制取口服液体制剂的辅料一般包括溶剂，以及必要的矫味剂、抑菌剂、乳化剂和着色剂等。

用于制取片剂的辅料一般包括填充剂(如：淀粉、糖粉、糊精、乳糖、可压性淀粉、微晶纤维素、硫酸钙、磷酸氢钙和甘露醇等)、粘合剂(如：乙醇、淀粉浆、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、明胶溶液、蔗糖溶液和聚乙烯吡咯烷酮的水溶液或醇溶液等)、崩解剂(如：干淀粉、羧甲基淀粉钠、低取代羟丙基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮和交联羧甲基纤维素钠)和润滑剂(如：硬脂酸镁、微粉硅胶、滑石粉、氢化植物油、聚乙二醇 4,000、聚乙二醇 6,000 和月桂醇硫酸镁等)等。

用于制取乳剂的辅料一般为水、油(如：脂肪酸)、乳化剂，以及必要的防腐剂和矫味剂等。

用于制取颗粒剂的辅料与片剂类似，但造粒过程不同。根据需要，将制得的颗粒剂与助流剂混合后装入胶囊即得胶囊剂。

如本文所用，术语“对象”、“生物体”、“动物”或“患者”包括人、野生动物和家畜(Livestock)。野生动物为自然状态下未经人工驯化的动物。家畜是为了提供食物来源而人工饲养的动物，如：但不仅限于狗、猫、鼠、大鼠、仓鼠、猪、兔、奶牛、水牛、公牛、绵羊、山羊、鹅和鸡等。给予治疗的

“患者”或“生物体”优先选择哺乳动物，尤其是人。

如本文所用，术语“预防”是指在未被临床标准认定的疾病前，各种用于防止疾病发生或发展的手段或措施，包括医学、物理或化学的方法，以阻止和降低疾病各种症状的发生或发展。

如本文所用，术语“治疗”是指为了阻止和降低疾病的发生或发展，使疾病病程的发展或加重得以抑制、遏制、减轻、改善、减缓、停止、延迟或反转，所描述的保持和/或用药时的疾病的、紊乱的或病理学状态的各种指标包括减轻或减少症状或并发症，或治愈或消除疾病、紊乱或状况。

如本文所用，术语“药物”是指可以用于预防或治疗某种疾病的单一化合物、多种化合物形成的组合物，或指以单一化合物为主要活性成分的组合物或制剂(formulation)，还指由多种化合物为活性成分的组合物或制剂。“药物”应理解为不仅指根据一国之法律规定，通过其设立的行政机构审批并准予生产的产品，还指在为了获得通过审批和准予生产的过程中，所形成的含单一化合物为活性成分的各类物质形态。“形成”应理解为通过化学合成、生物转化或购买等途径获得。

本发明提供的作为药物组合物的给药途径，包括但不仅限于，口服(Oral)、鼻腔(Nasal)、(面)颊(Buccal)、透皮(Transdermal)、肺部(Pulmonal)、阴道(Vaginal)、皮下(Subcutaneous)或静脉(Intravenous)给予生物体。

本发明的主要优点在于：

(1)首次揭示了法匹拉韦和苏拉明，芦平曲韦和伊曲康唑或法匹拉韦针对肠道病毒的协同抑制作用；

(2)本发明组合物起效量低；

(3) 本发明的组合物可大幅降低临床用药量，既可降低生产成本，也能减轻患者负担；

(4) 本发明的组合物可以阻止耐药株的产生；

(5) 本发明首次公开了一种新颖的肠道病毒作用靶点。

下面结合具体实施例，进一步详陈本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法，通常按照常规条件如美国 Sambrook. J 等著《分子克隆实验室指南》（黄

培堂等译，北京：科学出版社，2002 年）中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

材料和方法：

细胞、病毒和化合物

RD（人横纹肌瘤）、Vero（非洲绿猴肾）细胞在含有 1%青霉素/链霉素(penicillin/streptomycin, P/S)和 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养基中，于 37℃，5% CO_2的培养箱中培养。EV71 FY573 株(GenBank 登录号 HM064456)用于评估化合物抗病毒活性、病毒效价减少实验和联合用药实验。EV71 G082 用于病毒效价减少实验、突变病毒筛选以及评估实验。化合物伊曲康唑、芦平曲韦、法匹拉韦和 GW5074 分别购自 Sigma-Aldrich、Santa Cruz 和 Chembest 公司，并溶解于 DMSO 中进行实验。苏拉明购自拜尔公司并溶解于培养基中。

化合物的评估实验

从 Sigma-Aldrich 购得伊曲康唑，溶于 DMSO 中，终浓度为 10 mM，从拜尔购得苏拉明，溶于含有 2%FBS 的培养基中，终浓度为 50 mM，从 Chembest 购得法匹拉韦，溶于 DMSO 中，终浓度为 400 mM，从 Santa Cruz 公司购得芦平曲韦，溶于 DMSO 中，终浓度为 2 mM，从 Sigma 公司购得 GW5074，溶于 DMSO 中，终浓度为 10 mM。为了评估五种化合物抑制 EV71 诱导的 CPE 活性，本发明人进行了剂量依赖实验。向 96 孔白板(Corning Costar)的每孔中加入 50 μl 含有 10000 个 RD 细胞的 DMEM，在 37℃，5% CO_2的培养箱中培养 24 h 后，每孔分别加入梯度稀释的被测化合物(对于溶解于 DMSO 中的化合物，DMSO 终浓度为 0.25%)，对照组中加入 5 μl 0.25%的 DMSO 或培养基。然后加入 45 μl 含 150 PFU 的病毒稀释液，每孔的终体积为 100 μl，培养 96 小时后，取出，于室温下平衡 30 分钟。而后每孔加入 50 μl CellTiter-Glo (Promega)试剂，在室温下放置 10 到 30 分钟，使用 Veritas Microplate Luminometer(Turner BioSystem)酶标仪进行检测。为了测定化合物对细胞的作用，本发明人进行了细胞毒性实验，实验方法与剂量依赖实验相同，但是不再加入病毒液，取而代之的是等体积的含 2% FBS 和 1% P/S 的 DMEM。

联合用药实验

为评估联合用药疗法对 EV71 感染的抑制效果，本发明人采用了棋盘法进行实验[1-2]。向 96 孔白板(Corning Costar)的每孔中加入 50 μl 含有 10000 个 RD 细胞的 DMEM，在 37℃，5% CO_2的培养箱中培养 24 h 后，向 96 孔板的中央 60 个孔中分别加入 5 μl 两种 2 倍稀释的被测化合物，对照组中加入 5 μl 0.25%的 DMSO 或培养基。然后加入 40 μl 含 150 PFU 的病毒稀释液，每孔的终体积为 100 μl，培养 96 小时后，取出，于室温下平衡 30 分钟。而后每孔加入 50 μl CellTiter-Glo (Promega)试剂，在室温下放置 10 到 30 分钟，使用 Veritas Microplate Luminometer(Turner BioSystem)酶标仪进行检测。为了测定同时加入两种化合物对细胞的影响，本发明人进行了细胞毒性实验，实验方法与联合用药实验相同，但是不再加入病毒液，取而代之的是等体积的含 2% FBS 和 1% P/S 的 DMEM。实验结果用 MacSynergy II 软件分析并得出 3D 示意图。

病毒效价的测定

测 EV71 G082 株和重组病毒的效价，向 12 孔板(Corning Costar)的每孔中加入 1 ml 含 3×10^5个 Vero 细胞的 DMEM，培养 24 h。病毒进行 10 倍倍比稀释，即将 27 μl 病毒液与 243 μl 的含 2% FBS 和 1%P/S 的 DMEM 混匀。吸出 12 孔板中的培养基，每孔加入 200 μl 病毒液。放置在 37℃，5% CO_2的培养箱中感染 1 h，每隔 15 分钟轻轻摇动。然后吸出病毒液，加入 1 ml 含 0.8%甲基纤维素(Aquacide Ⅱ，Calbiochem)和 2% FBS 的 DMEM，在 37℃，5% CO_2的培养箱中培养 6 天，置于 3.7%的福尔马林中固定 1 h 后，用 1%的结晶紫染色。

EV71 FY573 株的滴度是通过半数组织培养感染剂量($TCID_{50}$)测定的。向 96 孔透明板每孔中加入 20000 个 RD 细胞，培养 24 小时后加入 100 μl 10 倍倍比稀释的病毒(从 10^{-1}到 10^{-8})，每个稀释度的病毒加入到 10 个孔中。感染 1 小时后，吸出病毒，加入含 2% FBS 的 DMEM。在 37℃，5% CO_2的培养箱中培养 7 天后置于 3.7%的福尔马林中固定 1 h 后，用 1%的结晶紫染色。用 Reed-Muench 方法测病毒滴度并表示为 $TCID_{50}$/ml。

病毒效价减少实验

在 12 孔板中接种 RD 细胞，3×10^5个/孔，37° C 培养过夜，24 小时后加入 MOI = 0.1 的 EV71 病毒液和 2 倍倍比稀释的伊曲康唑、芦平曲韦、法匹拉韦、苏拉明和 GW5074，在 37° C 培养 48 h 后，收集上清液，放到-80° C 冰箱中冻存，然后测定病毒滴度。为测定传代病毒对法匹拉韦的耐药性，本发明人在 12 孔板中接种 Vero 细胞，3×10^5个/孔，37° C 培养过夜，24 小时后加入 MOI = 0.1 的 EV71 病毒液和浓度分别为 300 μM 和 600 μM 的法匹拉韦，在 37° C 培养 48 h 后，收集上清液，放到-80° C 冰箱中冻存，然后测定病毒滴度。

病毒筛选实验

为筛抗法匹拉韦耐药株，本发明人进行了传代实验。3×10^5个 Vero 细胞被接种在 12 孔板中，37° C 培养过夜，24 小时后加入 MOI = 0.1 的 EV71 G082 株病毒液和法匹拉韦，当观察到明显的细胞病变效应时收集上清，利用收集到的病毒感染预先培养好的 Vero 细胞，并继续加入法匹拉韦，传代过程中逐渐提高法匹拉韦的浓度，每个浓度筛选一到三轮，每一轮有一个对照组。连续传代 16 代后，测定上清中病毒的滴度、对化合物的耐药性并测序。

突变病毒耐药性实验

为测定筛选出的突变病毒和重组病毒对化合物的抗性，本发明人进行了基于细胞病变效应的实验和病毒效价减少实验。基于细胞病变效应的实验中，向 96 孔白板的每孔中加入 5000 个 Vero 细胞，在 37℃，5% CO_2的培养箱中培养 24 h 后，每孔分别加入梯度稀释的被测化合物(对于溶解于 DMSO 中的化合物，DMSO 终浓度为 0.25%)，对照组中加入 5 μl 0.25%的 DMSO 或培养基。然后加入 45 μl 含 250 PFU 的突变病毒或重组病毒稀释液，每孔的终体积为 100 μl，培养 96 小时后，取出，于室温下平衡 30 分钟。而后每孔加入 50 μl CellTiter-Glo 试剂，在室温下放置 10 到 30 分钟，使用 Veritas Microplate Luminometer 酶标仪进行检测。EV71 G082 株作为对照。

病毒效价减少实验中，在 12 孔板中接种 Vero 细胞，3×10^5个/孔，37° C 培养过夜，24 小时后加入 MOI = 0.1 的 EV71 病毒液和 300 μM 的法匹拉韦，培养 48 小时后收集上清，并检测病毒滴度。

构建突变病毒

依照制造商的说明书使用 Fast Site-directed Mutagenesis kit (TransGen Biotech)构建出含有突变DNA片段的质粒并测序验证。线性化测序正确的 cDNA，依照体外转录试剂盒 MEGAscript T7 Kit (Ambion)转录出 RNA并使用电转法将 RNA 转入 Vero 细胞，待观察到明显的 CPE 后收集上清，利用空斑形成实验测定病毒滴度。

RT-PCR

参照 QIAamp viral RNA minikit (Qiagen)试剂盒使用说明书提取病毒 RNA并于-80 度保存，使用 SuperScript III One-Step RT-PCR System withPlatinum Tap DNA Polymerase (Invotroge)试剂盒完成 PCR 反应。

免疫染色实验

为定性检测耐药株筛选实验中的病毒，本发明人进行了免疫染色。在 24孔板中预先接种 3×10^5个 Vero 细胞，在 37℃，5% CO_2的培养箱中培养 24 h 后，向每孔加入病毒原液和 10 倍稀释的病毒，放置在 37℃，5% CO_2的培养箱中感染 1 h，每隔 15 分钟轻轻摇动。然后吸出病毒液，加入 1 ml 含 0.8%甲基纤维素 (Aquacide Ⅱ，Calbiochem)和 2% FBS 的 DMEM，在 37℃，5% CO_2的培养箱中培养 6 天。用 4%甲醛溶液固定细胞，固定好的细胞用含有 0.05%的吐温-20 的 PBS(PBS-T)洗涤两次，然后与抗肠道病毒 71 型的一抗（MAB979, Merck Milipore）在室温下孵育 1 h，之后用 PBS-T 洗涤三次，与连接有辣根过氧化酶的二抗（羊抗鼠，Bethyl, Montgomery, TX）于室温孵育 1 h。再经过 3 次 PBS 洗涤，加入 TrueBlue 过氧化物酶底物 (KPL®, 50-78-02)显色，至对照组形成明显蓝色斑点，利用蒸馏水停止反应，烘干并记录结果。产生蓝色的细胞为阳性，未产生蓝色的细胞则不含有病毒。

数据分析

把原始数据输入到 Excel 表格中计算信背比(S/B)，信噪比(S/N)，Z 因子以及待测化合物对病毒的抑制率。计算公式如下：$S/B = \mu_c/\mu_v$，μ_c表示细胞对照组信号的平均值，μ_v表示病毒对照组信号的平均值，$S/N = (\mu_c-\mu_v)/(\sigma_c-\sigma_v)$，$\sigma_c$表示细胞对照组信号的标准差，$\sigma_v$表示病毒对照组信号的标准差，$Z = 1-((3\sigma_c+3\sigma_v)/|\mu_c-\mu_v|)$，Z 因子在 0.5 与 1 之间表示

实验方法能够有效的区分对照组之间的差异。化合物的抗病毒活性 CPE 抑制率 = （μ_{cpd} - μ_v）/（μ_c - μ_v）× 100%，μ_{cpd}表示待测化合物的平均信号强度，化合物对细胞的作用细胞存活率 = μ_{cpd}/μ_c × 100%。半数最大效应浓度(EC_{50})是指能引起 50%最大效应的浓度。半数细胞毒性浓度(CC_{50})是指引起 50%细胞毒性反应的药物浓度，在此实验中表示为实验组比对照组荧光强度降低 50%。在利用 Macsnergy II 分析两种化合物的相互作用效果时，在 95%置信度，大于零的体积代表两个化合物的相互作用为协同效果，负值代表拮抗作用。位于-25 和+25 之间的数值代表两种化合物见的作用不显著，位于 25 和 50 之间的数值代表显著但较弱的协同作用，位于 50 和 100 间的数值意味着中等协同作用，大于 100 的数值表示强协同作用。

实施例 1 单组分活性测定

伊曲康唑、芦平曲韦、法匹拉韦、苏拉明和 GW5074 能够有效抑制 EV71 对细胞的感染，呈剂量依赖关系。

图 1. 伊曲康唑、芦平曲韦、法匹拉韦、苏拉明和 GW5074 抑制 EV71 的感染。(A) RD 细胞中分别加入 2 倍倍比稀释的伊曲康唑、芦平曲韦、法匹拉韦、苏拉明和 GW5074，加入病毒或培养基培养 96 h 后利用 CellTiter-Glo 试剂盒检测细胞活力，检测四种化合物对 EV71 的抑制效果及对细胞的毒性作用。(B) RD 细胞中分别加入病毒和 2 倍倍比稀释的伊曲康唑、芦平曲韦、法匹拉韦、苏拉明和 GW5074，培养 48 小时后收集上清，并用 $TCID_{50}$法测定病毒滴度。结果使用 Graphpad Prism5 进行处理。图中的数据来自两个独立的平行实验，误差线代表两组平行实验的标准差。

实施例 2 法匹拉韦作用于肠道病毒 71 型 3D 蛋白

通过筛选对法匹拉韦具有耐药性的病毒，本发明人得到两株具有耐药性的病毒。病毒效价减少实验表明这两株病毒均能对法匹拉韦产生耐药性，且通过序列分析本发明人发现在 3D 蛋白上出现相同的突变。耐药病毒表型实验证明带有 3D 蛋白第 121 位突变的 EV71 对法匹拉韦具有抗性。利用反向遗传学系统，本发明人构建出带有该突变的病毒，并验证其对法匹拉韦的耐药性。结果表明，肠道病毒 71 型的 3D 蛋白第 121 位由丝氨酸突变为天冬氨酸会赋予 EV71 耐药性，因此本发明人推断法匹拉韦作用于 EV71 的 3D 蛋白。此外，本发明人测试

了伊曲康唑、芦平曲韦、苏拉明和 GW5074 对该突变病毒的抑制效果，通过与野生型病毒（G082）比较，没有发现交叉耐药性。结果如图 2 所示。

图 2.法匹拉韦通过作用于肠道病毒 71 型 3D 蛋白抑制病毒复制。(A) 将肠道病毒 71 型和法匹拉韦共同培养，并不断增加法匹拉韦浓度。收集第 16 代培养基上清，测序。利用反向遗传学系统构建含有 3D 蛋白突变的 EV71，利用空斑形成实验测定病毒滴度，利用病毒效价减少实验检测病毒对法匹拉韦的耐药性，实验方法与化合物验证实验相同。(B) 利用基于细胞病变效应的实验测定伊曲康唑、芦平曲韦、苏拉明和 GW5074 对含有 3D 蛋白突变的病毒的作用效果。结果使用 Graphpad Prism5 进行处理。图中的数据来自两个独立的平行实验，误差线代表两组平行实验的标准差。

实施例 3 组合活性测试

伊曲康唑、芦平曲韦、法匹拉韦、苏拉明和 GW5074 相互组合在治疗 EV71 感染中产生协同、叠加或者拮抗三种不同效果。结果如图 3 所示。

图3. 不同药物组合在治疗EV71感染中的相互作用效果。3D图使用MacSynergyII软件做出，图中的数据来自至少三次独立的平行实验。(A)伊曲康唑和GW5074组合，(B)伊曲康唑和苏拉明组合，(C)苏拉明和芦平曲韦组合，(D)法匹拉韦和芦平曲韦组合，(E)法匹拉韦和苏拉明组合，(F)法匹拉韦和伊曲康唑组合，G 伊曲康唑和芦平曲韦组合。水平面代表两种药物的相互作用为叠加效果，水平面以上的点代表两种药物的作用为协同效果，水平面以下则为拮抗效果。

表 1

		MacSynergy II 分析	
药物组合		协同/拮抗 （μ M^2%）	作用效果
伊曲康唑	芦平曲韦	434.44/ -4.4	强协同
伊曲康唑	法匹拉韦	34.51/ -88.11	强拮抗
伊曲康唑	苏拉明	0.14/ -246.23	强拮抗
芦平曲韦	法匹拉韦	64.9/ 0	弱协同
芦平曲韦	苏拉明	4.96/ 0	叠加
法匹拉韦	苏拉明	337.59/ 0	强协同
伊曲康唑	GW5074	53.91/ -167.68	强拮抗

表 1 为根据 MacSynergy II 软件所计算得到的协同、叠加或拮抗结果。

实施例 4 伊曲康唑和芦平曲韦协同抑制病毒效价

伊曲康唑和芦平曲韦不仅能够抑制病毒感染过程中产生的细胞病变效应，还能够协同抑制病毒产出。结果如图 4 所示。

图 4. 伊曲康唑和芦平曲韦联合用药可以协同抑制 EV71 效价。向 Vero 细胞中加入感染复数(MOI)为 0.1 的 EV71 和不同浓度的伊曲康唑、芦平曲韦或 DMSO，培养 48 小时后收集上清，并利用空斑形成实验检测病毒滴度。结果使用 Graphpad Prism5 进行处理。图中的数据来自两个独立的平行实验，误差线代表两组平行实验的标准差。

实施例 5 利用 Chou-Talalay 法分析芦平曲韦和伊曲康唑在联合用药中的相互作用

使用 Compusyn 软件，根据 Chou-Talalay 法分析了伊曲康唑和芦平曲韦的相互作用，结果发现两种化合物能产生协同作用。且在摩尔浓度比例为伊曲康唑/芦平曲韦=10/1 时，协同效果最明显。结果如表 2 所示。

表 2

伊曲康唑-芦平曲韦摩尔浓度比	% 抑制率 (ED_n)	CI	DRI	
			伊曲康唑	芦平曲韦
1:0.1	50	0.01（非常强的协同）	285.689	138.384
	75	0.02（非常强的协同）	212.177	89.313
	90	0.02（非常强的协同）	157.582	57.642
	95	0.03（非常强的协同）	128.717	42.795
1:0.05	50	0.21（强协同）	9.514	9.217
	75	0.21（强协同）	10.341	8.706
	90	0.21（强协同）	11.241	8.224
	95	0.21（强协同）	11.897	7.911

表 2. 在 Vero 细胞中加入 EV71 和不同浓度的伊曲康唑和芦平曲韦或 DMSO 共同培养，48 小时后收集上清，用空斑形成实验测定病毒滴度。通过与对照组

比较得出不同浓度组合对EV71感染的抑制效果。利用Compusyn软件分析两种药物在达到 n%抑制效果时的相互作用，使用 CI(combination index)和DRI(dose reduction index)作为评估参数。CI<0.1 表示非常强的协同作用，0.1<CI<0.3表示强协同作用。DRI表示相对于使用一种化合物进行抗病毒治疗时，为达到相同的抑制效果，联合用药中两种化合物所需浓度减少的程度（倍数）。图中的数据来自两个独立的平行实验。

实施例6伊曲康唑和芦平曲韦联合用药能够阻止耐药病毒产生并清除所有病毒

将EV71、伊曲康唑和0.5 μM或1 μM的芦平曲韦同时加入Vero细胞中，传代培养病毒，并收集上清。传代 20 代后，本发明人通过免疫染色实验分别检测了第10、16和20代上清里的病毒，未检测出病毒。病毒效价减少实验证明，伊曲康唑不能清除细胞培养中的全部病毒。实验结果表明，伊曲康唑和芦平曲韦联合疗法能够阻止耐药病毒的产生，且完全抑制EV71在体外复制。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

参考文谢：

1. Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. Antiviral Res 2013; 100:446-454.
2. Prichard MN, Prichard LE, Baguley WA, Nassiri MR, Shipman C, Jr. Three-dimensional analysis of the synergistic cytotoxicity of ganciclovir and zidovudine. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:1060-1065.

权 利 要 求 书

1. 一种抑制肠道病毒组合物，其特征在于，所述组合物包括第一活性成分和第二活性成分，

其中，所述第一活性成分为肠道病毒（如，EV71）的3D蛋白抑制剂；

所述第二活性成分为肠道病毒（如，EV71）的衣壳蛋白抑制剂；

或者

其中，所述第一活性成分为肠道病毒（如，EV71）的3C蛋白抑制剂；

所述第二活性成分选自下组：

肠道病毒（如，EV71）的3A蛋白抑制剂；和

肠道病毒（如，EV71）的3D蛋白抑制剂。

2. 如权利要求1所述的组合物，其特征在于，所述第一活性成分特异性结合肠道病毒的3D蛋白的第121位氨基酸残基（优选为丝氨酸残基），其中氨基酸残基编号基于SEQ ID NO.1。

3. 如权利要求1所述的组合物，其特征在于，所述第一活性成分包括法匹拉韦、其类似物、或其药学上可接受的盐；和/或

所述第二活性成分包括苏拉明、其类似物、或其药学上可接受盐。

4. 如权利要求3所述的组合物，其特征在于，所述法匹拉韦的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与法匹拉韦相同的物质；和/或

所述苏拉明的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与苏拉明相同的物质。

5. 如权利要求3所述的组合物，其特征在于，所述第一活性成分和第二活性成分的摩尔比约为10～100：1～20，优选地为10～100：1～10，更更优选地为10～100：1～5。

6. 如权利要求1所述的组合物，其特征在于，所述第一活性成分包括芦平曲韦、其类似物、或其药学上可接受盐；

所述第二活性成分选自下组：伊曲康唑、其类似物、或其药学上可接受盐；和法匹拉韦、其类似物、或其药学上可接受盐。

7. 如权利要求6所述的组合物，其特征在于，所述芦平曲韦的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与芦平曲韦相同的物质（如：AG7404）；和/或

所述伊曲康唑的类似物包括对肠道病毒的作用靶点与伊曲康唑相同的物质。

8. 如权利要求6所述的组合物，其特征在于，所述第一活性成分和第二活性成分的摩尔比约为1～20：10～100，优选地为1～10：10～100，更更优选地为1～5：10～100。

9. 如权利要求1所述的抑制肠道病毒组合物的用途，其特征在于，用于制备预防和/或治疗肠道病毒感染的药物。

10.一种体外非治疗性地抑制肠道病毒生长或者杀灭肠道病毒的方法，包括步骤：在需要处理的场所使用权利要求 1 所述的抑制肠道病毒组合物。

11.法匹拉韦、其类似物、或其药学上可接受盐在制备试剂中的用途，所述试剂用于：

(I)抑制肠道病毒 3D 蛋白的合成,和/或

(II)特异性结合肠道病毒 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基，其中氨基酸残基编号基于 SEQ ID NO.1。

12. 一种复合物，其特征在于，所述复合物如式 I 所示

A-B (I)

其中，A 为法匹拉韦或其类似物；B 为肠道病毒的 3D 蛋白；优选地，所述复合物中，A 和 B 的结合位点包括肠道病毒 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基，其中氨基酸残基编号基于 SEQ ID NO.1。

13. 一种肠道病毒耐药毒株，其特征在于，所述毒株的 3D 蛋白发生了突变，并且所述突变导致所述肠道病毒产生了耐药性；优选地，所述突变发生在 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基。

14. 一种筛选药物的方法，其特征在于，所述方法包括：将待筛选药物与肠道病毒或者肠道病毒的 3D 蛋白接触，并检测是否形成式 II 所述的复合物，

A'-B (II)

其中，A'为待筛选药物；B 为肠道病毒的 3D 蛋白；优选地，所述复合物中，A' 和 B 的结合位点包括肠道病毒 3D 蛋白的第 121 位氨基酸残基，其中氨基酸残基编号基于 SEQ ID NO.1。

15. 一种肠道病毒的抑制剂，其特征在于，所述抑制剂以肠道病毒3D蛋白为靶点，抑制所述肠道病毒的生长或繁殖；优选地，所述抑制剂以肠道病毒3D蛋白的第121位氨基酸残基为靶点，其中氨基酸残基编号基于SEQ ID NO.1。