治疗病毒疾病的成分和方法

技术领域

本发明属于生物医药领域；更具体地，本发明涉及治疗病毒疾病的成分和方法。

背景技术

手足口病是西太平洋地区常见的一种病毒性感染疾病，是引起中国和亚洲地区儿童疾病及死亡的一大原因。2011 年，西太平洋地区有两百万儿童患手足口病(中国大于一百六十万，日本大于三十四万，越南大于十一万)。在过去二十年中，温带气候国家每两至三年就有一次发生于夏季和初秋的疫情爆发(Solomon，Lewthwaite et al. 2010)。而中国大陆地区自 2008 年后，每年春夏季都有爆发。

手足口病主要感染五岁以下儿童，主要症状包括口腔溃疡，手足和口部疱疹，及口部疼痛灼烧(疱疹性咽峡炎)。大多数病例只有轻度症状并有自限性。然而，依然有大量病例(2010 年中国两万七千多例，约 1.6%)显示出严重神经系统症状，例如无菌性脑膜炎，脑炎和脊髓灰质炎样的麻痹及中枢神经系统紊乱以及神经源性肺水肿及心脏功能失常(Huang，Liu et al. 1999; Yang，Wang et al. 2009; Weng，Chen et al. 2010; Rhoades，Tabor-Godwin et al. 2011)。2010 年和 2011 年在中国各有 905 和 506 例死亡病例。

手足口病由非脊髓灰质炎肠道病毒引起，在 2008 年安徽省爆发的手足口病疫情中，主要致病病毒为 EV71 和 CVA16(Yan，Gao et al. ; Zhang，Wang et al. 2010; Zhu，Zhu et al. 2010)，其中绝大部分重症和死亡病例均由 EV71 感染引起。在中国 EV71 C4 亚型是主要流行株，而在亚洲其他地区有 EV71 C1，C2，C4 及 B3，B4 亚型的流行(Yang，Ren et al. 2009)。

手足口病人与人间传播由直接接触感染者口鼻分泌物，疱液和粪便引起(Solomon，Lewthwaite et al. 2010)。感染者在发病后一周的传染性最强，但症状好转后仍有持续感染性(Han，Ma et al. 2010)。很多感染者(包括多数成年感染者)并无症状，出现口腔疱疹的儿童通过临床和后续病毒学诊断较易诊断。

目前尚无手足口病疫苗及药物。卫生，支持治疗，缓解疼痛，漱口水和静脉注射免疫球蛋白是治疗病患和阻止传播的唯一方法(中国卫生部 2010)。虽有疫苗在研发中，但是保护效率仍然未知，且大规模实施接种仍需较长时日。

因此，本领域需要大力研究能够防治手足口病的药物，特别是研究抑制 EV71 和 CVA16 病毒感染的药物以从源头上进行防治。

发明内容

本发明的目的在于提供一种治疗病毒疾病的成分和方法。

在本发明的第一方面，提供一种 P2X 受体拮抗剂的用途，用于制备抑制正义单链

RNA 病毒微小核糖核酸病毒的组合物。

在一个优选例中，所述的 P2X 受体拮抗剂用于制备预防、缓解或治疗手足口病的组合物。

在另一优选例中，所述的组合物还用于：全身给药或肠胃外给药；较佳地，所述的组合物用于口服、静脉注射、肌肉注射或吸入给药。

在本发明的另一方面，提供一种抑制正义单链 RNA 病毒微小核糖核酸病毒的方法，包括：给予需要抑制病毒的对象有效量的 P2X 受体拮抗剂。

在一个优选例中，所述的对象是病毒感染的哺乳动物，包括肠道病毒 71 型或柯萨奇病毒感染的人，猴子或鼠等，更佳地是手足口病患者。

在另一优选例中，所述的 P2X 受体拮抗剂选自下组：PPADS，iso-PPADS，PPNDS，Suramin，NF023， TNP-ATP， NF279， NF157， Evans Blue，和/或它们的类似物或衍生物，和/或它们的药学上可接受的盐。

在另一优选例中，所述的病毒是肠道病毒。

在另一优选例中，所述的病毒是肠道病毒 A（enterovirus A）。

在另一优选例中，所述的病毒是人肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒。

更佳地，所述的病毒是人肠道病毒71型，C4亚型和柯萨奇病毒A16亚型。

本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图 1、不同 E02 浓度下用 EV71 临床分离株感染 RD 细胞，MOI 为 0.1。培养 46 小时后提取培养上清中的病毒 RNA，定量 RT-PCR 测定 EV71 相对病毒量。表中 2、3、4 列数字代表 3 次重复试验的结果，右图是三次结果的平均值。

图 2、在不同 E02 浓度下用 10 倍梯度稀释的 EV71 感染 RD 细胞，培养 3-4 天后光学显微镜下观察 CPE (细胞病变现象)，并用结晶紫染色，计算半数组织培养感染剂量($TCID_{50}$)。

图 3、在不同 E02 浓度下用 EV71 感染 12 孔板中培养的 RD 细胞，培养 5～7 天后染色计算空斑形成单位(PFU)。

图 4、在不同 E02 浓度下用 10 倍梯度稀释的 EV71 M.A.V.感染 RD 细胞，培养 3 至 4 天后光学显微镜下观察 CPE，并用结晶紫染色，计算半数组织培养感染剂量($TCID_{50}$)。

图 5、在不同 E02 浓度下用 EV71 M.A.V.感染 12 孔板中培养的 RD 细胞，培养 5～7 天后染色，计算空斑形成单位(PFU)。

图 6、在不同 E02 浓度下用 10 倍梯度稀释的柯萨奇病毒 A16 感染 RD 细胞，培养 2 天后光学显微镜下观察 CPE，并用结晶紫染色，计算半数组织培养感染剂量($TCID_{50}$)。

图 7、用 EV71 临床分离株感染三日龄新生 ICR 小鼠，感染后 5 天采血分离血清；提取血清中病毒 RNA，一步法实时定量 RT-PCR 检测病毒载量。

图 8、CVA16 在 ICR 新生小鼠各器官或组织中的分布。其中，1 号和 2 号表示从分别的 2 只小鼠获取的血液样品。

图 9、用 CVA16 病毒感染三日龄新生 ICR 小鼠，感染后 6 天取组织，采血分离血清，提取组织和血清 RNA，测定 CVA16 病毒 RNA，计算病毒载量。

图 10、用 Celltiter Glo reagent 测定不同浓度 E02 对于 RD 细胞的细胞毒性。

图 11、三日龄 ICR 小鼠分别腹腔注射 50 微升剂量为 50mg/kg，20mg/kg 的 E02 或者 50 微升 DMEM 培养基，连续 4 天，每日注射，观察毒性的结果。

图 12、E02 加入时间测试，测试在感染前(B，C)、感染中(D，E)、感染后(F)分别加入 E02，E02 抑制 EV71 感染的有效性。

图 13、在不同 PPADS 浓度下用 EV71 临床分离株感染 RD 细胞，测定 PPADS 对 EV71 复制的抑制作用。

图 14、通过 RT-PCR 方法，测定六种 P2X 亚型在 RD 细胞中的 mRNA 表达情况。

图 15、E02 抑制 EV71 分离株 SH-TS 和 SH-RS 在 RD 细胞中复制。

图 16、E02 降低 RD 细胞中 EV71 分离株 SH-TS，SH-RS 的 PFU。

图 17、E02 抑制 EV71 分离株 SEP-4 在 Vero 细胞中复制。

图 18、E02 抑制 EV71 在恒河猴体内的复制。

图 19、E02 抑制 EV71 引起的恒河猴体温的升高。

图 20、P2X 受体拮抗剂抑制 RD 细胞中 EV71 复制。

图 21、其它一些拮抗剂和激动剂对于 EV71 的作用。

具体实施方式

本发明人经过深入的研究，首次揭示了一种 P2X 受体拮抗剂的新用途，用于制备一种病毒的组合物。所述的 P2X 受体拮抗剂通过抑制病毒发挥预防或治疗手足口病的作用。

P2X 受体拮抗剂及其用途

P2X 是一类 ATP 门控离子通道蛋白家族，表达于细胞膜，一般为同源或异源三聚体，由一个胞外区、两个跨膜区和两个胞内区组成。P2X 家族包括七个亚型。经胞外 ATP 触发，P2X 离子通道打开，引发钙离子内流，胞内钙离子聚集，通过 MAPK，PKC 和钙调蛋白激发系列下游信号转导(Erb，Liao et al. 2006)。

本发明人深入研究后发现，一些 P2X 受体拮抗剂对于抑制病毒是有用的，所述的病毒是正义单链 RNA 病毒微小核糖核酸病毒科的病毒，包括口蹄疫病毒属（Aphthovirus），禽肝炎病毒属（Avihepatovirus），心病毒属（Cardiovirus），泰勒病

毒属（Theilovirus），肠病毒属（Enterovirus），马鼻病毒属（Erbovirus），肝病毒属（Hepatovirus），嵴病毒属（Kobuvirus），Parechovirus 等；更佳地，所述的病毒是肠道病毒属，包括肠道病毒 A-H 类，鼻病毒 A-C（Rhinovirus A-C）；更佳地，所述的病毒是肠道病毒 A 类(Enterovirus A)，包括狒狒肠道病毒（Baboon enterovirus），人柯萨奇病毒 A2-8，A10，A12，A14，A16 型，人肠道病毒 71，76，89，90-92 型等；更佳地，包括肠道病毒 71 型 (EV71) (包括 A，B 和 C 亚型)，柯萨奇病毒 (包括 A 和 B 类，优选包括 A16 亚型；CVA16)。

公知地，肠道病毒 71 型或柯萨奇病毒 A16 亚型感染是手足口病的主要病因。中国卫生部公布的《手足口病诊疗指南(2010 年版)》及多项已发表的研究都指出，EV71 和 CVA16 是主要病原。因此，P2X 受体拮抗剂可以用于防治手足口病。

作为本发明的一种选择方式，所述的 P2X 受体是 P2X1-7 亚型受体。

作为本发明的另一优选方式，所述的 P2X 受体拮抗剂选自：PPADS，Iso-PPADS，PPNDS，Suramin，NF023(Suramin 衍生物)， TNP-ATP， NF279， NF 157， Evans Blue。

作为本发明的更优选方式，所述的 P2X 受体拮抗剂可以是：Suramin，PPADS，iso-PPADS，PPNDS，NF023，NF279，TNP-ATP，NF157，Evans Blue。

本发明还包括上述所列举的各种化合物的异构体、外消旋体、药学上可接受的盐、水合物、前体、衍生物或类似物，只要所述的异构体、外消旋体、药学上可接受的盐、水合物、衍生物或类似物也具有抑制病毒 (如肠道病毒 71 型或柯萨奇病毒 A16 亚型) 的功能。

所述的“异构体”包括：构象异构体，光学异构体(如对映异构体和非对映异构体)，几何异构体(如顺反异构体)。

所述的“衍生物或类似物”是指具有上述所列举的 P2X 受体拮抗剂类似的结构式，特别是具有相同的母核结构的，但一些化合物基团被相近的基团所取代的化合物，该化合物仍然保留有抑制病毒 (如肠道病毒 71 型或柯萨奇病毒 A16 亚型) 的功能。例如，H 被 C1-C4 烷基取代；C1 烷基被 C2 烷基取代；卤素基团(包括 F、Cl、Br、I)之间发生取代；OH、OCH_3、OCH_2CH_3、OCH_2CH_3 之间发生取代等。

所述的“药学上可接受的盐”是指上述化合物与无机酸、有机酸、碱金属或碱土金属等反应生成的盐。这些盐包括(但不限于)：(1)与如下无机酸形成的盐：如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、磷酸；(2)与如下有机酸形成的盐，如乙酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸、葡萄糖酸、安息香酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、草酸、丁二酸、酒石酸、马来酸、或精氨酸。其它的盐包括与碱金属或碱土金属(如钠、钾、钙或镁)形成的盐，铵盐或水溶性的胺盐(如 N-甲基葡糖胺盐)、低级的烷醇铵盐以及其它药学上可接受的胺盐(比如甲胺盐、乙胺盐、丙胺盐、二甲基胺盐、三甲基胺盐、二乙基胺盐、三乙基胺盐、叔丁基胺盐、乙二胺盐、羟乙胺盐、二羟乙胺盐、三羟乙胺盐，以及分别由吗啉、哌嗪、赖氨酸形成的胺盐)，或其它常规的“前体药物”的形式。化合

物具有一个或多个不对称中心。所以，这些化合物可以作为外消旋的混合物、单独的对映异构体、单独的非对映异构体、非对映异构体混合物、顺式或反式异构体存在。

所述的“化合物的前体”指当用适当的方法服用后，该化合物的前体在病人体内进行代谢或化学反应而转变成本发明前面所列举的 P2X 受体拮抗剂化合物，或 P2X 受体拮抗剂化合物所组成的盐或溶液。化合物的前体包括但不局限于所述化合物的羧酸酯、碳酸酯、磷酸酯、硝酸酯、硫酸酯、砜酯、亚砜酯、氨基化合物、氨基甲酸盐、偶氮化合物、磷酰胺、葡萄糖苷、醚、乙缩醛等形式。

筛药方法

本发明人的研究发现一类 P2X 受体拮抗剂能抑制病毒的复制，该抑制作用可能是通过靶向 P2X 受体发挥的。

在得知了 P2X 受体拮抗剂通过选择性地结合于 P2X 受体，发挥抑制病毒的作用后，可以基于该特征来筛选结合于 P2X 受体的物质。之后，可从所述的物质中找到对于抑制病毒真正有用的药物。

因此，本发明提供筛选防治手足口病的潜在药物的方法，所述方法包括：(1) 提供一包含 (如表达) P2X 受体的体系；(2) 将候选物质给予步骤(1)的体系，观察候选物质与 P2X 受体的结合情况；若候选物质能够与 P2X 受体结合，则该候选物质是防治手足口病的潜在药物。所述的包含 (如表达) P2X 受体的体系例如可以是细胞体系，所述的细胞可以是内源性表达 P2X 受体的细胞；或可以是重组表达 P2X 受体的细胞。所述的包含 P2X 受体的体系还可以是亚细胞体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系 (如动物模型，优选非人哺乳动物的动物模型，如鼠、兔、羊、猴等) 等。检测一个化合物是否与受体或受体的部分亚基结合是本领域已知的技术。

在本发明的优选方式中，在进行筛选时，为了更易于观察到 P2X 受体与候选物质结合情况的差异，还可设置对照组，所述的对照组可以是不添加所述候选物质的包含 P2X 受体的体系。

所述的候选物质可以包括 (但不限于)：小分子化合物，多肽，配体。较佳地，所述的候选物质是小分子化合物。例如，所述的候选物质可以是各种 P2X 受体拮抗剂。

作为本发明的优选方式，所述的方法还包括：对获得的潜在物质进行进一步的细胞实验和/或动物试验，以进一步选择和确定对于抑制病毒真正有用的物质。

另一方面，本发明还包括采用所述筛选方法获得的抑制病毒的物质。

组合物

本发明的化合物可以制备药物组合物，药用载体可以是固体或液体，固体制剂包括散剂、片剂、丸剂、胶囊、扁囊剂、栓剂和可分散颗粒剂，固体载体可以是一种或多种物质，它们可以作为稀释剂、矫味剂、黏合剂、防腐剂、片剂崩解剂或包囊材料。在散

剂中，载体是微细分的固体，本发明的化合物与微细分的活性组份存在于混合物中。在片剂中，此化合物与所需的粘合载体以适当比例混合，并压制成所需的形状和大小。适宜的载体是碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点腊和可可脂等。同样，扁囊剂或锭剂、片剂、散剂、胶囊、丸剂、扁囊剂和锭剂可以是适合于口服给药的固体剂型。

溶液形式的制剂包括溶液、悬浮剂和乳剂，例如水或含水丙二醇溶液。对于非肠道注射液体制剂，可以在含水聚乙二醇溶液中制备。适于口服的含水溶液可以通过将活性组份溶解于水中，并按照需要加入适宜的着色剂、矫味剂、乳化剂和增稠剂制备。

所述的组合物可用于全身给药、局部给药或肠胃外给药等。

适于口服的含水混悬剂可以通过将微细分的活性组份分散于含水粘性物质中制备，如天然或合成胶、树脂、甲基纤维素、羟甲基纤维素钠及其他熟知的混悬剂。

在治疗用途中，用于本发明的化合物以起始剂量每天 0.01 mg 至 200 mg/kg 体重，更佳地 0.25 mg 至 100 mg/kg 体重，更佳地 0.5mg 至 50mg/kg 体重。但是，这些剂量可以根据患者的需要、被治疗病症的严重性以及使用的化合物而变化，一般来说，开始以小于该化合物最佳剂量的较小剂量治疗，此后，小量增加此剂量达到最佳效果，方便起见，如果需要可将总日剂量再细分为一天内分次给药。

本发明的药物组合物还可同时与其它治疗剂或辅剂联合使用。

试剂盒

本发明所述的 P2X 受体拮抗剂或含有 P2X 受体拮抗剂的组合物，可以被置于试剂盒中，以便于出售或使用。

所述的 P2X 受体拮抗剂或含有 P2X 受体拮抗剂的组合物可以被制成单元剂型的形式，置于试剂盒中。“单元剂型”是指为了服用方便，将本发明的 P2X 受体拮抗剂或含有 P2X 受体拮抗剂的组合物制备成单次服用所需的剂型，包括但不限于各种固体剂(如片剂)、液体剂、胶囊剂、缓释剂。当制备成单元剂型时，可每天服用所述单元剂型的组合物 1-3 剂。

所述的试剂盒中还包括：将 P2X 受体拮抗剂给予需要抑制病毒的对象 (如患有病毒疾病的患者，或含有病毒的场所) 的给药说明书，以知道人们正确地用药。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。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具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 J.萨姆布鲁克等编著，分子克隆实验指南，科学出版社，2002 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体积计算。

I. 实验材料

1、细胞系

横纹肌肉瘤细胞 (RD 细胞) 购自 ATCC，编号 VR-805。细胞培养基为在含有 10%(v/v)FBS 的 DMEM，加入 1%(w/v)氨苄青霉素/链霉素溶液。

2、病毒株

EV71 临床分离株：EV71 FY 573，由 2008 年中国安徽省手足口病例样本中分离得到，基因型为 EV71 C4，Genbank 登录号 HM_064456。由中国科学院上海生命科学研究院提供。

EV71 临床分离株 SH-TS 和 SH-RS，由中国科学院上海生命科学研究院提供，基因型为 C4。

EV71 临床分离株 SEP-4，由柬埔寨巴斯德研究所 (Institut Pasteur of Cambodia)从柬埔寨临床手足口病样本分离所得并提供，基因型为 C4。

EV71-FY23 株：由中国医学科学院医学生物学研究所病毒免疫室提供，批号：20121001, Genebank 登录号 EU812515.1。

EV71 M.A.V.：EV71 小鼠适应株，将 EV71 FY 573 在新生小鼠内反复传代获得。

CVA16：柯萨奇病毒 A16 亚型，shzh05-1 (GenBank# EU262658)。

3、化合物

E02 购自 Sigma-Aldrich，以 Suramin Sodium 给药。

猴子实验所用 suramin 由 Bayer 公司提供，以 Suramin 自由酸给药。

iso-PPADS(0683-10mg)，NF 279 (1199-10mg)，PPNDS(1309)购自 Tocris。

除非另外说明，其他化合物均购自 Sigma-Aldrich 和 Tocis。

4、RT-PCR 引物及探针(5'～3')：

EV71 引物，正向：CCCTGAATGCGGCTAATC (SEQ ID NO: 1)；

EV71 引物，反向：ATTGTCACCATAAGCAGCCA (SEQ ID NO: 2)；

EV71 探针：FAM (6-羧基荧光素)-AACCGACTACTTTGGGTGTCC GTGTTTC (SEQ ID NO: 3)-TAMRA (6-羧基四甲基罗丹明)；

GAPDH 正向引物：GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (SEQ ID NO: 4)；

GAPDH 反向引物：GAAGATGGTGATGGGATTTC (SEQ ID NO: 5)；

P2X1-164F：CCTCTTCGAGTATGACACC (SEQ ID NO: 6)；

P2X1-164R：CAGAGACACTGCTGATGAG (SEQ ID NO: 7)；

P2X2-202F：CTGGACATGCTGGGAAACG (SEQ ID NO: 8)；

P2X2-202R：TGCCCTTGGAGAAGTGGAAT (SEQ ID NO: 9)；

P2X3-153F：GGCTCGACAGCGTTTCT (SEQ ID NO: 10)；

P2X3-153R：TGCCAGCATTCCCGTAT (SEQ ID NO: 11)；

P2X4-201F：TGGGATGTGGCGGATTAT (SEQ ID NO: 12)；

P2X4-201R：TACGCACCTGCCTGTTGAGA (SEQ ID NO: 13)；

P2X5-220F：TCTTTGCCTGGTGCCCGTTG (SEQ ID NO: 14)；

P2X5-220R：ATCACGGAGCCCAGTCGGAAG (SEQ ID NO: 15)；

P2X6-205F：GGAGGACAAAGTATGAGGAGG (SEQ ID NO: 16)；

P2X6-205R：GAATGGGTTGGCAAGTGG (SEQ ID NO: 17)；

P2X7-175F：CGTGGAGAAGTGAAGAAG (SEQ ID NO: 18)；

P2X7-175R：TCGGTCAGAGGAACAGAGC (SEQ ID NO: 19)。

5、试剂及试剂盒

DMEM：Invitrogen cat# 11965118；

FBS：Invitrogen cat# 10099141；

TRYPSIN 0.25% EDTA：Invitrogen cat# 525200072；

病毒 RNA 提取试剂盒：QIAamp Viral RNA Mini Kit，QIAGEN cat#52906；

细胞总 RNA 提取试剂盒：RNeasy Mini Kit (250)，QIAGEN cat#74106；

组织保存液：RNAstore 样本保存液，天根生化科技(北京)有限公司，DP408-02；

组织 RNA 提取试剂盒：RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司，DP43；

Taqman real time RT-PCR reagent：ABI taqMan® One-Step RT-PCR，ABI cat# 4309169；

SYBR real time RT-PCR reagent：QIAGEN QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (200)，Cat# 204243；

一步法 RT-PCR 试剂：QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (100)；Cat# 201212；

DNA 电泳琼脂糖：Biowest Argarose，Cat# BW-R0100；

DNA marker；DL2,000 DNA Marker，Cat# D501；

Crystal violet：Santa Cruz cat# sc-207460；

Seaplaque Agarose：lonza/amaxa 4 50101；

CellTiter Glo：Promega G7572；

PENICILLIN STREPTOMYCIN：Invitrogen Cat# 15140122

6、缩写及简称

CPE：cytopathic effect，细胞病变作用；

CT：cycle threshold，循环阈值；

EC50：50% effective concentration，半数有效剂量；

EV71：Enterovirus 71，肠道病毒 71 型；

Evans Blue ： 6,6-[(3,3‘-Dimethyl[1,1‘-biphenyl]-4,4‘-diyl)bis(azo)bis[4-amino-5-hydroxy-1,3-naphthalenedisulphonic acid] tetrasodium salt；

HFMD：Hand Foot and Mouth Disease，手足口病；

iso-PPADS：pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2’，5’-disulphonic acid；

M.A.V.：Mouse Adapted Virus，小鼠适应病毒；

MAPK：Mitogen-activated protein kinases，促分裂素原活化蛋白激酶；

MOI：Multiplicity of infection，感染复数；

NF 023 ： 8,8‘-[carbonyl*bis*(imino-3,1-phenylenecarbonylimino)]*bis*-1,3,5-naphthalene-trisulphonic acid，hexasodium salt；

NF 157 ： 8,8‘-[Carbonylbis[imino-3,1-phenylenecarbonylimino(4-fluoro-3,1-phenylene)carbonylimino]]；

NF 279 ： 8,8‘-(carbonylbis(imino-4 ， 1-phenylenecarbonylimino-4,1-phenylenecarbonylimino)) bis(1,3,5-naphthalenetrisul fonic acid)

PFU：plaque forming unit

PKC：Protease kinase C，蛋白激酶 C；

PPADS：pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2’，4’-disulphonic acid；哆磷酸盐- 6 –苯偶氮-2’，4’-二磺酸；

PPNDS: Pyridoxal-5′ -phosphate-6-(2′ -naphthylazo-6′ -nitro-4′ ,8′ -disulfonate) tetrasodium salt，哆-5’-磷酸-6-(2’-naphthylazo-6’-硝基-4’，8’-磺酸钠)四钠盐；

RD cell：Rhabdomyosarcoma cell，横纹肌肉瘤细胞；

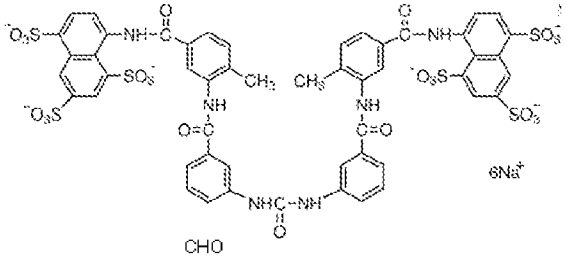
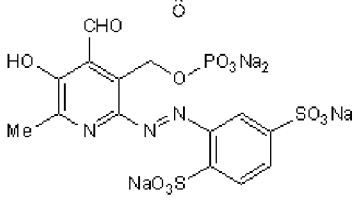
T.O.A.：Time of Addition assay，加入时间实验；

$TCID_{50}$：50% Tissue Culture Infective dose，半数组织培养感染剂量

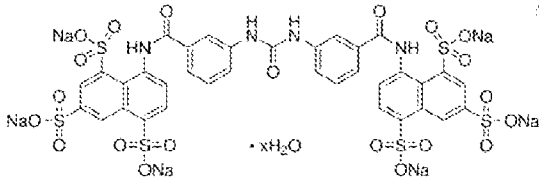
TNP-ATP：trinitrophenol-ATP，苦味酸-ATP；

UTP：uridine triphosphate，尿苷三磷酸；

7、化合物结构式及 CAS 号

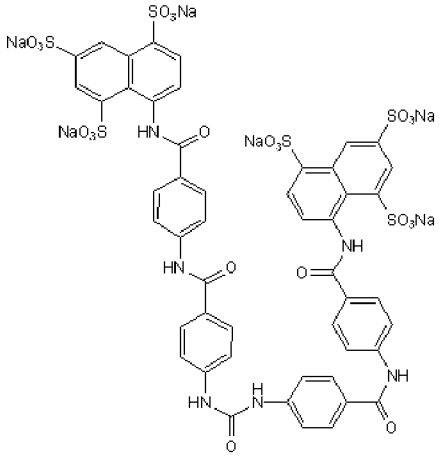
化合物	结构式	CAS 注册号或化学式
E02		CAS: 129-46-4
iso-PPADS		化学式：$C_{14}H_{10}N_3Na_4O_{12}PS_2$

NF023



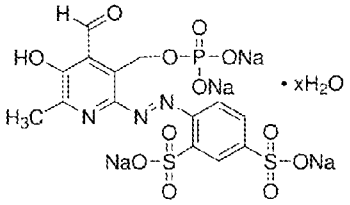
CAS: 104869-31-0
(水合)

NF279



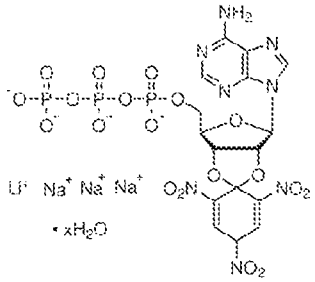
CAS: 202983-32-2

PPADS



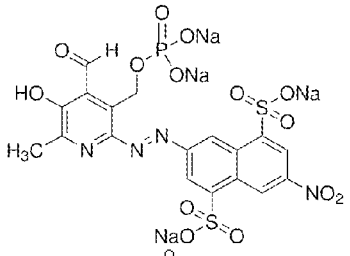
CAS: 192575-19-2
(四钠盐水合物)

TNP-ATP



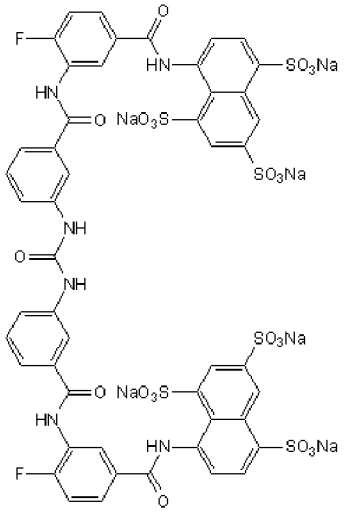
CAS: 61368-63-6

PPNDS

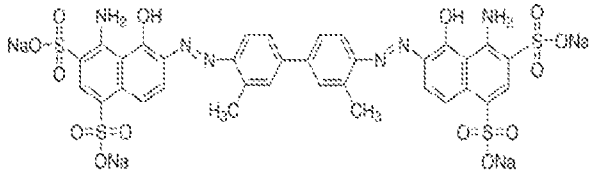


化学式：$C_{18}H_{11}N_4Na_4O_{14}PS_2$

NF 157



104869-26-3

Evans Blue  314-13-6

II. 实施例

EV71 和 CVA16 是导致手足口病的主要病原，本发明人在以下实施例中测定了 E02(Suramin Sodium)或其类似物抑制 EV71 和 CVA16 体外感染及体内感染的能力。

实施例 1、E02 抑制病毒 EV71 临床分离株（EV71 FY 573）感染 RD 细胞 (体外试验)

1、E02 能够抑制 EV71 在 RD 细胞中的复制

在不同 E02 浓度下用 EV71 临床分离株（**EV71 FY 573**）感染 RD 细胞，MOI (multiplicity of infection 感染复数) 为 0.1。培养 46 小时后提取培养上清中的病毒 RNA，定量 RT-PCR 测定 EV71 相对病毒量。详细步骤如下：

①细胞接种：感染前 24 小时，接种 RD 细胞于 96 孔细胞培养板，每孔 5×10^4 个细胞；

②感染：

a. 药物预孵育病毒：用 DMEM 稀释病毒储存液至 5×10^4 $TCID_{50}$/ml，每孔 100 微升分装至 96 孔板，并加入 11 微升相应浓度溶解于 DMEM 的 E02 或者 DMEM 培养基，37℃孵育 1 小时；

b. 药物预孵育细胞：弃去 96 孔板中的细胞培养液，每孔加入 100 微升 DMEM，再加入 11 微升相应浓度的 E02 溶液或者 DMEM 培养基，37℃孵育 1 小时；

c. 孵育 1 小时后，弃去细胞培养板中的药物，将 111 微升药物预孵育的病毒转移至细胞培养板，37℃孵育 1 小时；

d. 孵育后，弃去上清，50 微升 DMEM 洗细胞两次，每孔加入 180 微升含 2% FBS 的 DMEM 培养基，20 微升相应浓度的 E02 DMEM 溶液或者 DMEM 培养基，将细胞培养板置于 37℃，5%(v/v)二氧化碳的培养箱培养；

③病毒收获和 RNA 提取：被感染的细胞培养 46 小时后，转移 140 微升上清至 96 孔深孔板，用病毒 RNA 提取试剂盒 (QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit，cat # 52906) 提取病毒 RNA，按照试剂盒标准操作程序进行；

④病毒载量测定：用 ABI Taqman 一步法 RT-PCR 试剂盒 (ABI TaqMan® One-Step RT-PCR，cat# 4309169) 在 ABI 7900HT 384 孔板 PCR 系统检测 EV71 5'UTR 基因。反应体系和 PCR 程序见表 1 和表 2。EV71 5'UTR 定量 RT-PCR 热循环程序(Taqman)；

⑤将 PCR 的 CT 值用 PCR 标准曲线转化为病毒载量 (标准曲线由已知滴度的病毒十倍梯度稀释，抽提 RNA，RT-PCR 测定 CT 值得到)。

表 1、EV71 5'UTR 实时定量 RT-PCR 反应体系(Taqman)

反应总体积：10 微升	
PCR 试剂 Cat# ABI 4309169	
TaqMan® One-Step RT-PCR	
2×反应缓冲液	5 微升
40×RNA 酶抑制剂	0.25 微升
正向引物 3 微摩	1 微升
反向引物 9 微摩	1 微升
探针 1.5 微摩	1 微升
病毒 RNA 样品	1.75 微升

表 2、EV71 5' UTR 定量 RT-PCR 热循环程序(Taqman)

PCR 热循环程序	
ABI 7900HT 384	
1. 48℃	30 分钟
2. 95℃	10 分钟
3. 95℃	15 秒
4. 60℃	1 分钟
其中，3-4 进行 40 个循环	

结果显示，E02 能够抑制 EV71 在 RD 细胞中的复制，EC50(50%有效浓度)为 6.93 微摩，3.44 微摩可降低 EV71 复制 10 倍；5.19 微摩降低 EV71 复制 100 倍；6.45 微摩降低 1000 倍；7.63 微摩降低 10000 倍，详见图 1。

2、E02 显著降低 RD 细胞中 EV71 $TCID_{50}$

在不同 E02 浓度下用 10 倍梯度稀释的 EV71（临床分离株 EV71 FY 573）感染 RD 细胞，培养 3-4 天后光学显微镜下观察 CPE (细胞病变现象)，并用结晶紫染色，计算半数组织培养感染剂量。详细步骤如下：

①细胞接种：感染前 24 小时，接种 RD 细胞于 96 孔细胞培养板，每孔 5×10^4 个细胞；

②感染：

a. 药物预孵育病毒：用 DMEM 培养基 10 倍梯度稀释病毒储存液，每孔 100 微升分装至 96 孔板，并加入 11 微升相应浓度溶解于 DMEM 的 E02，37℃孵育 1 小时；

b. 药物预孵育细胞：弃去 96 孔板中的细胞培养液，每孔加入 100 微升 DMEM，再加入 11 微升相应浓度的 E02 溶液，37℃孵育 1 小时；

c. 孵育 1 小时后，弃去细胞培养板中的药物，将 111 微升药物预孵育的病毒转移至

细胞培养板，37℃孵育 1 小时；

d. 孵育后，弃去病毒药物混合液，50 微升 DMEM 洗细胞两次，每孔加入 180 微升含 2% FBS 的 DMEM 培养基，20 微升相应浓度的 E02 DMEM 溶液，将细胞培养板置于 37℃，5%二氧化碳的培养箱培养；

③ 培养 3 至 4 天后，光学显微镜下观察 CPE，并用结晶紫染色，用 Reed-Muench 算法计算半数组织培养感染剂量 $TCID_{50}$；

结果显示，E02 能够抑制 RD 细胞中 EV71 病毒感染导致的 CPE，E02 降低 RD 细胞中 EV71 $TCID_{50}$ 的半数有效剂量为 4.7 微摩，见图 2。因此，E02 显著降低 RD 细胞中 EV71 $TCID_{50}$。

3、E02 降低 RD 细胞中 EV71 空斑形成单位

在不同 E02 浓度下用 EV71（临床分离株 EV71 FY 573）感染 12 孔板中培养的 RD 细胞，培养 5～7 天后染色计算空斑形成单位。详细步骤如下：

①细胞接种：感染前 24 小时，接种 RD 细胞于 12 孔板，每孔 2×10^5 个细胞；

②感染细胞：

a. 药物预孵育病毒：用 DMEM 培养基 10 倍梯度稀释病毒储存液至 50000PFU/ml，5000PFU/ml 和 500PFU/ml，每孔 500 微升分装至 12 孔板，并加入 56 微升相应浓度溶解于 DMEM 的 E02，37℃孵育 1 小时；

b. 药物预孵育细胞：弃去 12 孔板中的细胞培养液，每孔加入 500 微升 DMEM，再加入 56 微升相应浓度的 E02 溶液，37℃孵育 1 小时；

c. 孵育 1 小时后，弃去细胞培养板中的药物，将 556 微升药物预孵育的病毒转移至细胞培养板，37℃孵育 1 小时；

d. 孵育后，弃去病毒药物混合液，300 微升 DMEM 洗细胞两次，每孔加入 150 微升相应浓度的 E02 DMEM 溶液，再加入 1350 微升预热熔解(冷却至 37～40℃)的含有 1%低熔点琼脂糖 seaplaque，2%FBS 的 DMEM 培养基。将细胞培养板置于 37℃，5%二氧化碳的培养箱培养；

③培养 5-7 天后，移去凝胶，用结晶紫染色，PBS 冲洗一次，计空斑数并计算空斑形成单位。

结果显示，E02 能够抑制 EV71 在 RD 细胞中形成的空斑数量。E02 降低 RD 细胞中 EV71 PFU 的半数有效剂量为 2.6 微摩，见图 3。因此，E02 可以降低 RD 细胞中 EV71 空斑形成单位。

综上，通过实时定量 RT-PCR，$TCID_{50}$ 和 PFU 三种测试方法，结果均表明 E02 能够抑制 EV71 临床分离株感染 RD 细胞：抑制 EV71 在 RD 细胞中复制的 EC50 为 6.93 微摩；降低 RD 细胞中 $TCID_{50}$ 的 EC50 为 4.7 微摩；降低 PFU 的 EC50 为 2.6 微摩。

实施例 2、E02 抑制肠道病毒 EV71 鼠适应株感染 RD 细胞 (体外试验)

1、E02 降低 RD 细胞中 EV71 M.A.V. $TCID_{50}$

在不同 E02 浓度下用 10 倍梯度稀释的 EV71 M.A.V.感染 RD 细胞，培养 3 至 4 天后光学显微镜下观察 CPE，并用结晶紫染色，计算半数组织培养感染剂量。具体步骤同实施例 1 中相应的 $TCID_{50}$ 测试步骤。

结果显示，E02 降低 RD 细胞中 EV71 M.A.V. $TCID_{50}$ 的半数有效剂量为 8.07 微摩，见图 4。因此，E02 降低 RD 细胞中 EV71 M.A.V. $TCID_{50}$。

2、E02 降低 RD 细胞中 EV71 M.A.V. PFU

在不同 E02 浓度下用 EV71 M.A.V.感染 12 孔板中培养的 RD 细胞，培养 5～7 天后染色，计算空斑形成单位。详细步骤同实施例 1 中相应的 PFU 测试方法。

E02 降低 RD 细胞中 EV71 M.A.V. PFU 的半数有效剂量为 2.0 微摩，见图 5。因此，E02 降低 RD 细胞中 EV71 M.A.V. PFU。

综上，TCID50 和 PFU 测试表明，E02 能够抑制小鼠适应 EV71 病毒株感染 RD 细胞，EC50 分别为 8.07 微摩和 2.0 微摩。

实施例 3、E02 抑制柯萨奇病毒 A16(CVA16)感染 RD 细胞 (体外试验)

在不同 E02 浓度下用 10 倍梯度稀释的柯萨奇病毒 A16 感染 RD 细胞，培养 2 天后光学显微镜下观察 CPE，并用结晶紫染色，计算半数组织培养感染剂量。具体步骤同实施例 1 中 $TCID_{50}$ 测试方法。

结果显示，25 微摩 E02 使 RD 细胞中 CVA16 滴度由的 1×10^{9} $TCID_{50}$/ml 降至 1×10^{4} $TCID_{50}$/ml，见图 6。因此，E02 降低 RD 细胞中 CVA16 $TCID_{50}$.

以上实施例 1-3 的测定结果表明，E02 能够在体外抑制 EV71 和 CVA16 感染 RD 细胞。E02 抑制 EV71 临床分离株的 EC50 小于 6.93 微摩，10 微摩 E02 能够完全抑制 E02 临床株和鼠适应株感染 RD 细胞，并使 CVA16 在 RD 细胞中的 $TCID_{50}$ 降低。

实施例 4、E02 抑制肠道病毒 EV71 感染 ICR 新生小鼠

用 EV71 临床分离株（EV71 FY 573）感染三日龄新生 ICR 小鼠，测试小鼠体内 E02 抑制 EV71 的能力。实验小鼠分为三组：药物组、感染组、安慰组。小鼠二日龄时，药物组腹腔注射 50 微升 50mg/kg 剂量 E02，感染组和安慰组腹腔注射 50 微升 DMEM 培养基；三日龄时药物组腹腔注射 50mg/kg 剂量 E02 和 5×10^{7} $TCID_{50}$ 剂量的 EV71 临床分离株病毒混合物(50 微升)，感染组注射 5×10^{7} $TCID_{50}$ 病毒(25 微升)和 25 微升 DMEM 混合物，安慰组腹腔注射 50 微升 DMEM 培养基。

感染后 5 天采血分离血清。提取血清中病毒 RNA(病毒 RNA 提取试剂盒，QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit，cat # 52906)；用一步法实时定量 RT-PCR 试剂盒(QIAGEN

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit)在 ABI 7900HT 384 孔板 PCR 系统检测 EV71 5'UTR 基因及 GAPDH 基因拷贝，反应体系和 PCR 程序见表 3 和表 4。

表 3、EV71 5'UTR 和 GAPDH 基因实时定量 RT-PCR 反应体系(SYBR)

一步法 RT-PCR 试剂盒(SYBR Green)	
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit 204243	
反应体系	15 微升
2X 反应缓冲液	7.5 微升
酶溶液	0.15 微升
正向引物 (5 微摩)	1.5 微升
反向引物 (5 微摩)	1.5 微升
样品 RNA	1.5 微升
无 RNA 酶水	2.85 微升

表 4、EV71 5'UTR 和 GAPDH 基因实时定量 RT-PCR 热循环程序(SYBR)

PCR 程序		
1	50℃	30 分钟
2	95℃	15 分钟
3	94℃	15 秒
4	55℃	30 秒
5	72℃	30 秒
其中，3～5 步循环 40 次		
熔解曲线		

计算 EV71 和 GAPDH RNA 载量比值，感染组平均值为 15.0，药物组平均值为 1.8，见图 7。结果表明，E02 降低小鼠血清中 EV71 病毒量，50mg/kg 的 E02 能够降低感染 EV71 的 ICR 新生小鼠血清中的病毒量。

实施例 5、E02 抑制柯萨奇病毒 A16 感染 ICR 新生小鼠

1、CVA16 在小鼠体内的组织分布

注射 5×10^6 $TCID_{50}$ CVA16 病毒(50 微升)感染三日龄 ICR 新生小鼠两只，感染后 5 天采集血清及组织(脑，骨髓，心脏，小肠，肾，肝脏，肺，肌肉，脾，胸腺)。提取血清中病毒 RNA(病毒 RNA 提取试剂盒，QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit，cat # 52906)。组织置于 RNAstore 样本保存液(天根，DP408-02)保存在-80℃冰箱，用组织 RNA 提取试剂盒(RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒)提取组织总 RNA。用一步法实时定量 RT-PCR 试剂盒(QIAGEN QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit)在 ABI 7900HT 384 孔板 PCR 系统检测 CVA16 病毒基因组及 GAPDH 基因拷贝，引物同 EV71 5'UTR

引物，反应体系和 PCR 程序见表 3 和表 4。各组织及血清中相对病毒量见图 8。可见，CVA16 病毒主要检出于脑，脊髓，肌肉和血清中。

2、E02 抑制 CVA16 感染新生 ICR 小鼠

用 CVA16 病毒感染三日龄新生 ICR 小鼠，测试小鼠体内 E02 抑制 EV71 的能力。实验小鼠分为三组：药物组，感染组和安慰组。小鼠二日龄时，药物组腹腔注射 50 微升 50mg/kg 剂量 E02，感染组和安慰组腹腔注射 50 微升 DMEM 培养基；三日龄时药物组腹腔注射 50mg/kg 剂量 E02 和 1×10^4 $TCID_{50}$ 剂量的 CVA16 病毒(50 微升)，感染组注射 1×10^4 $TCID_{50}$ 剂量的 CVA16 病毒(25 微升)和 25 微升 DMEM 混合物，安慰组腹腔注射 50 微升 DMEM 培养基。感染后 6 天取组织，采血分离血清，提取组织和血清 RNA，测定 CVA16 病毒 RNA，处理步骤同前述“1”。

结果见图 9。结果显示，50 mg/kg E02 使 ICR 新生小鼠的脑，骨髓，肌肉和血清中的 CVA16 病毒 RNA 均有显著下降。

综上实施例 4-5，新生 ICR 小鼠中的测试表明，50mg/kg E02 可在体内抑制肠道病毒 EV71 和柯萨奇病毒 A16。

实施例 6、E02 安全性、耐受性及毒性测试

1、E02 无体外细胞毒性

用 Celltitr Glo reagent 测定不同浓度 E02 对于 RD 细胞的细胞毒性，如下：

(1) 细胞接种：测试前 24 小时，每孔 5×10^4 个细胞接种 RD 细胞于 96 孔细胞培养板；

(2) E02 培养细胞：弃去细胞培养板内的培养基，加入 180 微升含 2% FBS 的 DMEM 培养基，再加入 20 微升相应浓度的 E02 DMEM 溶液，置 37℃，5% CO_2 培养箱培养；

(3) 培养 46 小时后，用 PROMEGA Celltitr Glo reagent 测定细胞 ATP 水平，按照试剂说明书测定。

测定结果显示：1×10^{-6} 至 1×10^4 微摩的 E02 对 RD 细胞均无细胞毒性，见图 10。

2、E02 对 ICR 新生小鼠无毒性

三日龄 ICR 小鼠分别腹腔注射 50 微升剂量为 50mg/kg，20mg/kg 的 E02 或者 50 微升 DMEM 培养基，连续 4 天，每日注射，观察未见毒性，见图 11。

实施例 7、E02 抑制肠道病毒 EV71 临床分离株 SH-TS 和 SH-RS 感染 RD 细胞

1、E02 抑制 EV71 SH-TS 和 SH-RS 在 RD 细胞中复制

在不同 E02 浓度下用 EV71 SH-TS 或 SH-RS 毒株感染 RD 细胞，MOI 0.1。培养 46

小时后提取培养上清中的病毒 RNA，定量 RT-PCR 测定 EV71 相对病毒量。定量 RT-PCR 具体步骤参见实施例 1。

结果显示，E02 能够抑制 EV71 临床分离株 SH-TS 和 SH-RS 在 RD 细胞中的复制，对于 SH-TS，7.14 微摩可使 EV71 复制降低 10 倍，25.35 微摩可使 EV71 复制降低 100 倍；对于 SH-RS，4.41 微摩可使 EV71 复制降低 10 倍；16.29 微摩可使 EV71 复制降低 1000 倍，如图 15。

因此，E02 抑制 EV71 SH-TS 和 SH-RS 在 RD 细胞中复制。

2、E02 抑制 EV71 SH-TS 和 SH-RS 感染 RD 细胞(空斑形成单位，PFU)

在不同 E02 浓度下用 EV71 SH-TS 或者 SH-RS 毒株感染 12 孔板中培养的 RD 细胞，培养 5～7 天后染色计算空斑形成单位。详细步骤同实施例 1 中“3、E02 降低 RD 细胞中 EV71 空斑形成单位”。

结果，E02 降低 RD 细胞中 EV71 SH-TS PFU 的半数有效剂量为 2.24 微摩，对于 SH-RS 为 3.47 微摩，如图 16。

病毒复制和 PFU 测试表明 E02 能够抑制 EV71 临床分离株 SH-TS 和 SH-RS 感染 RD 细胞。

实施例 8、E02 抑制肠道病毒 EV71 柬埔寨分离株 SEP-4 感染 Vero 细胞

在不同 E02 浓度下用 EV71 SEP-4 病毒株(由 Institut Pasteur of Cambodia 提供，Cambodia 毒株)感染 Vero 细胞，MOI 0.1。培养 46 小时后提取培养上清中的病毒 RNA，定量 RT-PCR 测定 EV71 相对病毒量。具体步骤参见实施例 1。

结果显示，E02 能够抑制 EV71 SEP-4 株在 Vero 细胞中的复制，5.89 微摩 E02 可使 EV71 复制降低 10 倍，15.49 微摩使 EV71 复制降低 100 倍，如图 17。

实施例 9、E02 抑制肠道病毒 EV71 在恒河猴体内的复制

将已检测 EV71 抗体阴性的 10 只成年恒河猴随机分为 2 组(恒河猴(Macaca)，来源：中国医学科学院医学生物学研究所，实验动物使用许可证号：SYXK(滇)2010-0009，发证单位：云南省科学技术厅)，即：5 只对照组(年龄约 4 岁，体重约 5.3kg，注射生理盐水)，5 只给药组(年龄约 4.6 岁，体重约 5.44kg，注射 50mg/kg suramin)。采用静脉多次注射 suramin (50mg/kg)，并于首次注射 suramin 的 1 天后感染 4.5 $lgCCID_{50}$EV71 FY-23 病毒(EV71-FY23 株(由中国医学科学院医学生物学研究所病毒免疫室提供)，批号：20121001，含量：7.5 lgCCID50/ml，保存条件：-80℃)，逐日检测病毒在感染成年恒河猴(>3 岁)体内的病毒载量，观察感染动物的临床症状、体温，从而分析该药对 EV71 感染的治疗预防作用。具体的实验操作流程如下：

1) 感染前一天：采集本底全血及血清，测量体温，观察动物的外观体征、行为活动、

精神状态、给药局部是否异常等。并按剂量静脉给药(50mg/kg suramin 或生理盐水)。

2) 感染当天(0 天)：测量体温，观察动物的外观体征、行为活动、精神状态、给药局部是否异常等。并按 4.5 lgCCID50 EV71 FY-23 进行静脉攻毒。

3) 感染期间(1-14 天)：每日测量体温，观察动物的外观体征、行为活动、精神状态、给药局部是否异常等，检测病毒载量。并于感染后 1、3、5 天，按剂量静脉给药(50mg/kg suramin 或生理盐水)。

4) 感染后期(21 和 28 天)测量体温，观察动物的外观体征、行为活动、精神状态、给药局部是否异常等，检测病毒载量。

血液病毒载量检测

提取全血 RNA：取 0.2ml，加入 0.8mlTRNzol-A$^+$，充分混匀后在室温放置 10min；加入 0.2ml 氯仿，盖好管盖，剧烈震荡 15sec，室温放置 5min，于 12500rpm，4℃离心 20min，取水相 0.4ml 于另一新管中，加入等体积异丙醇，混匀，室温放置 30 分钟；12500rpm，4℃离心 20min，弃上清，加入 1ml 75%乙醇洗涤沉淀，12500rpm，4℃离心 30min.弃上清，室温放置 30min，干燥 RNA，加入 20μl RNase-free ddH2O，充分溶解 RNA。检测病毒载量，测定方法如下：

1) 标准品稀释：标准品提取（按TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA extraction Kit Ver. 3.0 说明操作），取10μl 提取好的标准品，10倍系列稀释为10^6、10^5、10^4、10^3、10^2、10^1、10^0

2) 引物序列（Taqman 探针法）：

上游引物（10μM）：5’-agcccaaaagaacttcacta-3’；

下游引物（10μM）：5’-atccagtcgatggctgctca-3’；

探针 5-FAM-agtgatatcctgcagacgggcaccatcc-TAMRA-3。

3) 配制RT-PCR 反应液（反应液配制在冰上进行）：

2x One Step RT-PCR Buffer Ⅲ：10μl

TaKaRa Ex TaqTM HS（5U/μl）：0.4μl

PrimescriptTM RT Enzyme Mix Ⅱ：0.4μl

上游引物（10μM）：0.4μl

下游引物（10μM）：0.4μl

探针：0.8μl

ROX Reference Dye Ⅱ：0.4μl

Total RNA：2μl

RNase Free dH_2O：5.2μl

总量：20μl

4) 进行 Real Time One Step RT –PCR 反应。

1、病毒载量检测

10 只实验动物经 4.5 $lgCCID_{50}$ 的 EV71 FY23 株攻击后，对照组动物在攻毒后第 6 和 7 天出现一过性的病毒载量升高(达 1-1.5$\times10^3$ 拷贝/ml)，在第 8 天后开始下降，在攻毒后第 9 天出现一过性的病毒载量升高(达 5.25$\times10^2$ 拷贝/ml)，第 10 天开始下降。给药组动物分别在攻毒后第 4 天、第 7 天和第 13 天出现了病毒载量的小幅升高(平均 1.5$\times10^1$ 拷贝/ml)，病毒载量明显低于对照组，如图 18。

2、体温检测

对照组动物体温在感染后 1 天就出现一定的上升，并随之(约于感染后 3 天)降低至正常范围内；给药组动物体温基本均在正常范围内，如图 19。

结论：在本实验条件下，静脉途径感染 4.5 $lgCCID_{50}$ EV71 病毒后，对照组成年恒河猴体内病毒载量在特定时间内出现一定的升高，并且体温也出现小幅上升。与之相比，在该特定时间内给药组成年恒河猴出现病毒载量的小幅升高，病毒载量明显低于对照组，体温检测未出现显著变化。

实施例 10、E02 作用靶点鉴定

1、E02 抑制 EV71 进入细胞

用 MOI 10 的 EV71 临床分离株 EV71 FY573 感染 96 孔板中的 RD 细胞，在感染前，感染中和感染后三个阶段分别加入 32 微摩 E02(溶解于 DMEM)或者 DMEM 培养基，测定 EV71 复制，确定 E02 抑制 EV71 感染的作用阶段。详细步骤如下：

(1) 细胞接种：感染前 24 小时，接种 RD 细胞于 96 孔细胞培养板，每孔 5×10^4 个细胞；

(2) 药物预孵育细胞：弃去 96 孔板中的细胞培养液，每孔加入 100 微升 DMEM，再加入 11 微升 320 微摩 E02 溶液(药物处理细胞组)或者 11 微升 DMEM 培养基(细胞未经药物处理组)，37℃孵育 1 小时；

(3) 药物预孵育病毒：用 DMEM 稀释病毒储存液至 5$\times10^6$ $TCID_{50}$/ml，每孔 100 微升分装至 96 孔板，并加入 11 微升 320 微摩 E02 溶液(B，C 组)或者 11 微升 DMEM 培养基(A，F 组)，37℃孵育 1 小时；

(4) 感染：药物孵育细胞和病毒 1 小时后，弃去细胞培养板中的药物，将 111 微升药物(B，C 组)或 DMEM(A，F 组)预孵育的病毒转移至细胞培养板，D,E 组移入 100 微升病毒溶液后补加 11 微升 320 微摩 E02，37℃孵育 1 小时；

(5) 病毒感染细胞 1 小时后，弃去细胞培养板中病毒药物混合液，50 微升 DMEM 洗细胞两次，每孔加入 180 微升含 2% FBS 的 DMEM 培养基，20 微升 320 微摩 E02 溶液(B，E，F 组)或 20 微升 DMEM 培养基(A，C，D 组)，将细胞培养板置于 37℃，5%二氧化碳的培养箱培养。

(6) 病毒收获和 RNA 提取：被感染的细胞培养 18 小时后，转移 140 微升上清至 96 孔深孔板，用病毒 RNA 提取试剂盒 (QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit，cat # 52906)

提取病毒 RNA，按照试剂盒标准操作程序进行。

(7) 病毒载量测定：用 ABI Taqman 一步法 RT-PCR 试剂盒 (ABI taqMan® One-Step RT-PCR，Cat# 4309169) 在 ABI 7900HT 384 孔板 PCR 系统检测 EV71 5'UTR 基因。反应体系和 PCR 程序见表 1 和表 2。

(8) 用 PCR 标准曲线将 PCR 的 CT 值转化为病毒载量 (标准曲线由已知滴度的病毒梯度稀释，抽提 RNA，RT-PCR 测定 CT 值得到)。

高 MOI 病毒感染细胞，可使大部分细胞同步感染，18 小时的培养时间保证病毒只有一次扩增，该感染条件可测试药物抑制病毒作用发生在病毒生活周期的哪个阶段 (Bonavia，Franti et al. 2011; Daelemans，Pauwels et al. 2011)。如图 12，E02 加入时间测试的结果表明在感染前(B，C)和感染中(D，E)加入 E02 均可抑制 EV71 感染，而感染后加入 E02(F)，不能抑制 EV71 感染。若感染过程中已加入药物，则感染后是否再加入药物(D 与 E)对病毒复制并无显著影响。该结果显示，E02 通过抑制 EV71 病毒进入细胞而抑制 EV71 病毒感染。

2、P2X 受体拮抗剂能够抑制 EV71 感染

E02 是感知受体 P2X 的拮抗剂，能够抑制 P2X1，2，3 和 5 亚型 (Khakh，Burnstock et al. 2001; Burnstock 2004; Coddou，Yan et al. 2011)受体，即是 P2X1，2，3 和 5 亚型受体的拮抗剂。P2X 是一类 ATP 门控离子通道蛋白家族，表达于细胞膜，一般为同源或异源三聚体，由一个胞外区、两个跨膜区和两个胞内区组成。P2X 家族包括七个亚型。经胞外 ATP 触发，P2X 离子通道打开，引发钙离子内流，胞内钙离子聚集，通过 MAPK，PKC 和钙调蛋白激发系列下游信号转导(Erb，Liao et al. 2006)。P2X 受体在高等动物组织中广泛分布(Valera，Hussy et al. 1994)，表达于 CNS 各部分，在神经元突触触发，感知信号(如疼痛，味觉，听觉等)传入，平滑肌收缩，心血管系统血压控制和炎症反应中都发挥作用(Surprenant and North 2009)。

EV71 感染中枢神经系统会导致急性弛缓性麻痹，急性传播性脊髓炎和急性横贯性脊髓炎，还可引起无菌性脑膜炎和脑炎，肠病毒感染还可能引起潜在行为和记忆障碍 (Yang，Wang et al. 2009; Rhoades，Tabor-Godwin et al. 2011)。EV71 主要通过诱发病毒感染患者 CNS 炎症，而导致神经紊乱。EV71 感染可在大脑皮层，脑干和脊髓各个层次引起炎症。EV71 感染病人常死于肺水肿或者出血，有研究表明 EV71 肺水肿是神经性的 (Solomon，Lewthwaite et al. 2010)。在死于肺部综合征的 EV71 感染病人中，只有脊髓和大脑检测到炎症，而在肺部和心脏检测不到病毒颗粒和炎症。(Weng，Chen et al. 2010)。联系 EV71 感染引发的疾病的特点，以及 P2X 的分布和生理作用，本发明人认为 P2X 在 EV71 病理中发挥重要作用。

因此，本实施例中，本发明人用化学探针(已知的 P2X 抑制剂或激活剂)来确定 P2X 受体在 EV71 感染中的作用。

1、PPADS 抑制 EV71 感染 RD 细胞

PPADS 是 E02 的类似物(Khakh，Burnstock et al. 2001; Burnstock 2004; Coddou，Yan et al. 2011)，对 P2X 各亚型的抑制作用与 E02 一致。在不同 PPADS 浓度下用 EV71 临床分离株 FY 573 感染 RD 细胞，测定 PPADS 对 EV71 复制的抑制作用。详细过程同实施例 1 中“1”。并测定各浓度 PPADS 对 RD 细胞的细胞毒性，详细步骤同实施例 6 中“1”。

结果见图 13，64 微摩以下浓度 PPADS 对 RD 细胞无细胞毒性，抑制 EV71 复制的 EC50 为 18.9 微摩。

2、P2X 受体在 RD 细胞中的表达

提取 RD 细胞中总 RNA，一步法 RT-PCR 扩增 P2X 各亚型 mRNA，凝胶电泳鉴定 PCR 产物长度。具体步骤如下：

①. 细胞总 RNA 提取：取 2×10^6 个 RD 细胞，用 QIAGEN RNeasy 试剂盒提取总 RNA，实验按照试剂盒说明书进行，产物溶于 50 微升无核酸酶水；

②. PCR：一步法 RT-PCR 扩增各 P2X 亚型和 GAPDH mRNA，反应体系和循环程序如表 5 和表 6。

③. 电泳：2%凝胶电泳检测 PCR 产物大小。

表 5、P2X mRNA RT-PCR 反应体系

一步法 RT-PCR 试剂盒	
qiangen 201202	
反应体系	25 微升
5X 反应缓冲液	5 微升
酶溶液	1 微升
正向引物 (10 微摩)	1.5 微升
反向引物 (10 微摩)	1.5 微升
dNTP	1 微升
样品 RNA	2 微升
无 RNA 酶水	14 微升

表 6、P2X mRNA RT-PCR 热循环程序

PCR 程序		
1	50℃	30 分钟
2	95℃	15 分钟
3	94℃	15 秒
4	50℃	60 秒

5	72℃	60 秒
3～5 步，循环 40 次		
72℃ 10 分钟		

电泳结果显示，除 P2X7 外，其它六种 P2X 亚型在 RD 细胞中均有表达，结果见图 14。

3、P2X 受体拮抗剂抑制 EV71 感染 RD 细胞

测定 0.1，1，10 和 100 微摩各 P2X 受体拮抗剂及激动剂对 EV71 复制的抑制作用，具体步骤参考实施例 1 中“1”，但感染后细胞需孵育 3～4 天，光学显微镜观察并用结晶紫染色，确定有无 CPE(细胞病变现象)。并测定各浓度化合物对 RD 细胞的细胞毒性，在不同浓度化合物中培养 RD 细胞后 3～4 天，光学显微镜观察并用结晶紫染色，观察细胞层有无破坏。能保护细胞免于感染，无 CPE 且不破坏健康细胞层的化合物，能够抑制 RD 细胞中 EV71 的复制。

结果见表 7 及图 20，除 E02，PPADS 外，P2X 受体拮抗剂 iso-PPADS，NF023，NF279，NF157，TNP-ATP，PPNDS，Evans Blue 也能够抑制 EV71 复制。

表 7、P2X 受体拮抗剂抑制 RD 细胞中 EV71 复制

化合物		抑制 EV71 复制			
		100 微摩	10 微摩	1 微摩	0.1 微摩
拮抗剂	E02	+	+	-	-
	PPADS	+	+	-	-
	iso-PPADS	+	-	-	-
	NF023	+	+	-	-
	NF279	+	+	-	-
	NF157	+	+	-	-
	TNP-ATP	+	-	-	-
	PPNDS	+	+	-	-
	Evans Blue	+	-	-	-
激动剂	Ivermectine	-	-	-	-
	bzATP	-	-	-	-
	UTP	-	-	-	-

对比这些化合物对 P2X 和 EV71 感染的抑制作用，如表 8，表明 P2X 受体在 EV71 感染 RD 细胞中发挥重要作用。

表 8、P2X 受体与 EV71 复制

	P2X 受体	1	2	3	4	5	6	7	2/3	抑制 EV71 复

										制
激动剂	Bz-ATP(Burnstock 2004)	+++	++	+	+++	++		++		-
	UTP(Burnstock 2004)	-	-	-	-	+				-
	Ivermectin(Khakh，Proctor et al. 1999)				++					-
拮抗剂	PPADS(Burnstock 2004)	++	++	++	-	++	+	+		+
	Iso-PPADS(Burnstock 2004)	++	++	++						+
	NF023(Burnstock 2004)	++	+	+						+
	NF279(Burnstock 2004)	+++	+	+	-			+		+
	TNP-ATP(Burnstock 2004)	+++	+	+++	+	+		+		+
	PPNDS(Burnstock 2004)	++								++
	E02(Burnstock 2004)	++	+	+	-	++	-	-		+

注：激动剂：-：无活性，+：激活浓度>10μM，++：激活浓度 1～10μM， +++：激活浓度<1μM；

拮抗剂：-：无活性，+：拮抗浓度>300nM，++：拮抗浓度＝10～300nM，+++：拮抗浓度<10nM。

5

其它一些拮抗剂和激动剂对于 EV71 的作用如表 9 和图 21。

表 9、其它一些拮抗剂和激动剂对于 EV71 的作用

	P2X 受体									**EV71**	
拮抗剂	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**P2Y**	**Heteromultimer**	**log_{10} 降低**	**IC_{90}**
BBG	√	√					√ √ √			NO	NO
MRS 2159	√ √									NO	NO
MRS 2179	√		√					√ √ P2Y1		NO	NO
NF 110	√ √	√	√ √							NO	NO
Ro 0437626	√									NO	NO
TNP-ATP	√ √ √		√ √ √						√ √ √ P2X2/3	NO	NO
A-317491			√ √						√ √ P2X2/3	NO	NO
AF353			√ √						√ √ P2X2/3	NO	NO
RO-3			√ √						√ P2X2/3	NO	NO

Spinorphin			√ √ √							NO	NO
5-BDBD				√						NO	NO
A 438079							√ √			NO	NO
A 740003							√ √			NO	NO
A 839977							√ √			NO	NO
AZ 10606120							√ √ √			NO	NO
AZ 11645373							√ √			NO	NO
KN-62							√ √			NO	NO
oATP							√ √			NO	NO
2',5'-ADP								P2Y1		NO	NO
激动剂	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**P2Y**	**Heteromultimer**	**log_{10} 降低**	**IC_{90}**
BzATP	√ √ √	√ √	√	√ √ √	√ √		√ √ √	P2Y11		NO	NO
UTP					√					NO	NO
Modulator	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**P2Y**	**Heteromultimer**	**log_{10} 降低**	**IC_{90}**
Ivermectin				√ √ √						NO	NO
GW 791343							√ √			NO	
Response Potentiator	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**P2Y**	**Heteromultimer**	**log_{10} 降低**	**IC_{90}**
MRS 2219	√									NO	NO

表中，“空白”表示无报道数据，“NO”表示没有。

对于 Antagonists：√ √ √ 激活浓度<10nM；√ √ 激活浓度 10nM-300nM，√ 激活浓度>300nM，无活性。

对于 Agonists：√ √ √ 激活浓度<1μM，√ √ 激活浓度 1-10μM，√ 激活浓度 >10μM。

因此，P2X1～6 亚型在 RD 细胞中均有 mRNA 表达，且多个 P2X 受体拮抗剂可抑制 EV71 感染 RD 细胞复制，结合 P2X 信号转导和 P2X 异常与疾病的关系，提示 P2X 在 EV71 感染中发挥重要作用，且 P2X 与 EV71 的作用与 EV71 感染引起的手足口病的病理有密切关系。

综上实施例，可以得出如下结论：

(1) P2X 受体拮抗剂化合物 E02 能够抑制 EV71 病毒感染 RD 细胞；

(2) 化合物 E02 能够降低柯萨奇病毒 A16 感染 RD 细胞的感染力；

(3) 化合物 E02 能够在 ICR 新生小鼠体内，降低血清中 EV71 病毒量；

(4) 化合物 E02 能够在 ICR 新生小鼠体内，降低脑，骨髓，肌肉和血清中 CVA16 病毒量；

(5) E02 抑制 EV71 在恒河猴体内的复制以及抑制 EV71 引起的恒河猴体温的升高。

(6) RD 细胞中可检测到 P2X 受体 1～6 六种亚型的 mRNA；

(7) 多个 P2X 受体拮抗剂能够抑制 EV71 感染 RD 细胞。

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。

参考文献

Bonavia, A., M. Franti, et al. (2011). "Identification of broad-spectrum antiviral compounds and assessment of the druggability of their target for efficacy against respiratory syncytial virus (RSV)." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(17): 6739-6744.

Burnstock, G. (2004). "Introduction: P2 Receptors." Current Topics in Medicinal Chemistry **4**(8): 793-803.

Chong, J.-H., G.-G. Zheng, et al. (2010). "Abnormal expression of P2X family receptors in Chinese pediatric acute leukemias." Biochemical and Biophysical Research Communications **391**(1): 498-504.

Coddou, C., Z. Yan, et al. (2011). "Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels." Pharmacological Reviews **63**(3): 641-683.

Daelemans, D., R. Pauwels, et al. (2011). "A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds." Nat. Protocols **6**(6): 925-933.

Erb, L., Z. Liao, et al. (2006). "P2 receptors: intracellular signaling." Pflügers Archiv European Journal of Physiology **452**(5): 552-562.

Gever, J. R., R. Soto, et al. (2010). "AF-353, a novel, potent and orally bioavailable P2X3/P2X2/3 receptor antagonist." British Journal of Pharmacology **160**(6): 1387-1398.

Han, J., X.-J. Ma, et al. (2010). "Long persistence of EV71 specific nucleotides in respiratory and feces samples of the patients with Hand-Foot-Mouth Disease after recovery." BMC Infectious Diseases **10**(1): 178.

Huang, C.-C., C.-C. Liu, et al. (1999). "Neurologic Complications in Children with Enterovirus 71 Infection." New England Journal of Medicine **341**(13): 936-942.

Khakh, B. S., G. Burnstock, et al. (2001). "International Union of Pharmacology. XXIV. Current Status of the Nomenclature and Properties of P2X Receptors and Their Subunits." Pharmacological Reviews **53**(1): 107-118.

Khakh, B. S., W. R. Proctor, et al. (1999). "Allosteric Control of Gating and Kinetics at P2X4 Receptor Channels." The Journal of Neuroscience **19**(17): 7289-7299.

Piqueur, M., W. Verstrepen, et al. (2009). "Improvement of a real-time RT-PCR assay for the detection of enterovirus RNA." Virology Journal **6**(1): 95.

Rhoades, R. E., J. M. Tabor-Godwin, et al. (2011). "Enterovirus infections of the central nervous system." Virology **411**(2): 288-305.

Solomon, T., P. Lewthwaite, et al. (2010). "Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71." The Lancet Infectious Diseases **10**(11): 778-790.

Surprenant, A. and R. A. North (2009). "Signaling at Purinergic P2X Receptors." Annual Review of Physiology **71**(1): 333-359.

Valera, S., N. Hussy, et al. (1994). "A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP." Nature **371**(6497): 516-519.

Weng, K.-F., L.-L. Chen, et al. (2010). "Neural pathogenesis of enterovirus 71 infection." Microbes and Infection **12**(7): 505-510.

Yan, X.-F., S. Gao, et al. "Epidemic characteristics of hand, foot, and mouth disease in Shanghai from 2009 to 2010: Enterovirus 71 subgenotype C4 as the primary causative agent and a high incidence of mixed infections with coxsackievirus A16." Scandinavian Journal of Infectious Diseases **0**(0): 1-9.

Yang, F., L. Ren, et al. (2009). "Enterovirus 71 Outbreak in the People's Republic of China in 2008." Journal of Clinical Microbiology **47**(7): 2351-2352.

Yang, Y., H. Wang, et al. (2009). "Neuropathology in 2 cases of fatal enterovirus type 71 infection from a recent epidemic in the People's Republic of China: a histopathologic, immunohistochemical, and reverse transcription polymerase chain reaction study." Human Pathology **40**(9): 1288-1295.

Zhang, Y., D. Wang, et al. (2010). "Molecular Evidence of Persistent Epidemic and Evolution of Subgenotype B1 Coxsackievirus A16-Associated Hand, Foot, and Mouth Disease in China." Journal of Clinical Microbiology **48**(2): 619-622.

Zhu, Z., S. Zhu, et al. (2010). "Retrospective seroepidemiology indicated that human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulated wildly in central and southern China before large-scale outbreaks from 2008." Virology Journal **7**(1): 300.

中国卫生部 (2010) 手足口病诊疗指南(2010 年版).

权 利 要 求

1. 一种 P2X 受体拮抗剂的用途，用于制备抑制正义单链 RNA 病毒微小核糖核酸病毒的组合物。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，用于制备预防、缓解或治疗手足口病的组合物。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途，其特征在于，所述的组合物用于：全身给药或肠胃外给药；较佳地，所述的组合物用于口服、静脉注射、肌肉注射或吸入给药。

4. 一种抑制正义单链 RNA 病毒微小核糖核酸病毒的方法，包括：给予需要抑制病毒的对象有效量的 P2X 受体拮抗剂。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述的对象是病毒感染的哺乳动物，包括肠道病毒 71 型或柯萨奇病毒感染的人，猴子或鼠等，更佳地是手足口病患者。

6. 如权利要求 1 所述的用途，或如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述的 P2X 受体拮抗剂选自下组：PPADS，iso-PPADS，PPNDS，Suramin，NF023， TNP-ATP，NF279， NF157， Evans Blue，和/或它们的类似物或衍生物，和/或它们的药学上可接受的盐。

7. 如权利要求 1 所述的用途，或如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述的病毒是肠道病毒。

8. 如权利要求 1 所述的用途，或如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述的病毒是肠道病毒 A（enterovirus A）。

9. 如权利要求 1 所述的用途，或如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述的病毒是人肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒。