

抗肠病毒71型药物化学新进展

陶昱岑, 郝霞, 刘新泳*, 展鹏*

(山东大学药学院药物化学研究所, 化学生物学教育部重点实验室, 山东 济南 250012)

摘要: 近年来肠病毒感染呈现频繁流行的态势并发展为重要的公共健康问题。自1997年以来, 肠病毒71型(enterovirus71, EV71)感染导致的手足口病在全球持续暴发, 尤其以亚太地区为重灾区, 手足口病已经成为我国儿童常见的感染疾病。目前尚无有效治疗EV71感染的药物上市。本综述精选国内外近年来EV71抑制剂研究的实例, 从药物化学视角总结了抗EV71药物研究进展, 为研发新型抗EV71药物提供重要指导。

关键词: 肠病毒71型; 生长周期; 抑制剂; 复制周期; 药物设计

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)04-0744-10

New advances in the discovery of anti-enterovirus-71 agents

TAO Yu-cen, HAO Xia, LIU Xin-yong*, ZHAN Peng*

(Department of Medicinal Chemistry, Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education),
School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: In recent years, enterovirus infection has become a frequent epidemic and developed into an important public health problem. For example, hand-foot-mouth disease has become a common infection among children in China. Hand-foot-mouth disease (HFMD) has been spreading globally since 1997, especially in the Asia-Pacific region. Enterovirus 71 (EV71) is one of the main pathogens causing HFMD. And now there is no drug available to treat EV71 infection. This review summarizes the research progress of anti-enterovirus-71 drugs from the perspective of medicinal chemistry.

Key words: enterovirus71; life cycle; inhibitor; replication cycle; drug design

肠病毒(enterovirus)属于小RNA病毒,是一类病毒的总称,包括脊髓灰质炎病毒(poliiovirus)、柯萨奇病毒(Coxsackievirus)、埃可病毒(ECHO virus)及新型肠病毒68-71型^[1]。肠病毒是无包膜单正链RNA小病毒颗粒,并形如20面体,直径约27~30 nm,其外表的衣壳蛋白对乙醚和其他有机溶剂、酸和各种抗生素或去污剂有较弱的抵抗作用^[2]。肠病毒71型(EV71)是目前我国手足口病的主要致病病原体。EV71感染还可致脑炎、脑膜炎、口腔炎、咽炎、出疹性疾病、肌病,严重

者可造成死亡,目前尚无有效治疗EV71感染的药物上市^[3]。本综述精选国内外近年来对抗EV71病毒药物的研究实例,从药物化学视角总结了抗肠道病毒药物的研究进展。

1 肠病毒71型的结构、生命周期、机制及临床表现

1.1 肠病毒71型结构

肠病毒71型^[4]直径在25 nm左右,没有包膜和凸起,形如20面体(图1左),具有正极性(+)RNA的单链RNA基因组。病毒衣壳蛋白中的VP1、VP2、VP3位于衣壳表面,VP4则被包埋于蛋白质衣壳内侧,与病毒核心相连(图1右)。

1.2 肠病毒71型的生命周期及其侵入机制

虽然肠病毒71型生命周期的精确机制尚未完全明确,但是肠病毒都具有一个基本相似的生命周期模

收稿日期: 2019-12-03; 修回日期: 2019-12-26.

基金项目: 国家自然科学基金重点国际合作研究项目(81420108027); 山东省重大科技创新工程(2019JZZY021011, 2017CXGC1401).

*通讯作者 Tel: 86-531-88380270,

E-mail: zhanpeng1982@sdu.edu.cn; xinyongl@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0972

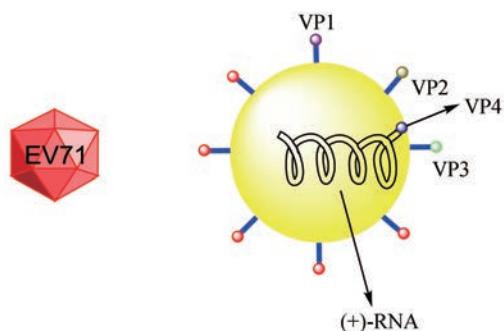


Figure 1 The structure of EV71

式, 因此可通过肠病毒复制的一般模式来推测肠病毒71型的生命周期^[5,6]。病毒与一个或多个宿主细胞表面受体的结合是所有肠病毒生命周期的起始, 病毒通过宿主的胞吞作用进入细胞, 胞内的pH变化或者与核内体受体的结合作用都可导致病毒衣壳蛋白解聚, 使得病毒RNA通过解聚衣壳表面的孔道释放, 不同肠道病毒也有可能通过不同的途径释放RNA。释放的病毒RNA进入细胞质后, 指导合成1个单一的多聚蛋白, 而随后水解酶2A、3C、3D将该多聚蛋白水解成10种不同的蛋白质, 比如病毒衣壳蛋白VP1~VP3、蛋白酶2A~2C、3A~3D等。肠病毒基因组复制发生在病毒诱导产生的膜结构上, 称为复制细胞器。病毒开始以(+)RNA为模板在RNA依赖的RNA聚合酶作用下复制(-)RNA, 接着病毒又可以用(-)RNA为模板复制(+)RNA, 新复制出的RNA接着作为模板继续复制, 或者被包装成新的病毒颗粒外排。病毒颗粒的包

装由VP0、VP1、VP3蛋白完成, 先包装成原体和五联体, 再组装在新复制的RNA上, 形成新病毒颗粒—这是一个与病毒RNA复制紧密结合的过程。最后, 在新合成RNA的诱导下, VP0被加工成VP2和VP4从而产生成熟的病毒颗粒(图2)。

病毒蛋白酶2A、3C除了能水解病毒多聚蛋白, 还能水解宿主细胞中的部分蛋白以优化自身的转录、复制和扩散, 这一过程也可以降低宿主对病毒的抵抗反应。

2 抗肠病毒71型药物研究新进展

综上所述, 病毒生理周期可大致分为侵入、RNA复制、蛋白质合成和病毒的释放。理论上, 病毒的每一个生理周期都可以作为设计抗肠病毒药物的靶点, 但目前的研究主要集中在病毒侵入抑制剂、病毒复制抑制剂、蛋白质合成抑制剂与疫苗等方面。

2.1 病毒侵入抑制剂

2.1.1 衣壳蛋白抑制剂

肠病毒与宿主细胞的结合主要依赖于一种叫VP1的蛋白, 该蛋白的结构中存在一个疏水性空腔, 可与宿主细胞表面受体结合, 引发病毒的侵入和脱壳。若设计化合物嵌入该疏水口袋可有效增强VP1蛋白的稳定性, 进而阻止VP1蛋白的解聚从而阻止病毒的入侵与脱壳^[7]。

在EV71中, VP1蛋白有一个保守的疏水口袋, 可能是潜在的药物结合靶点。通过针对性地设计小分子抑制剂, 可以抑制该疏水口袋的构象变化, 从而达到抑

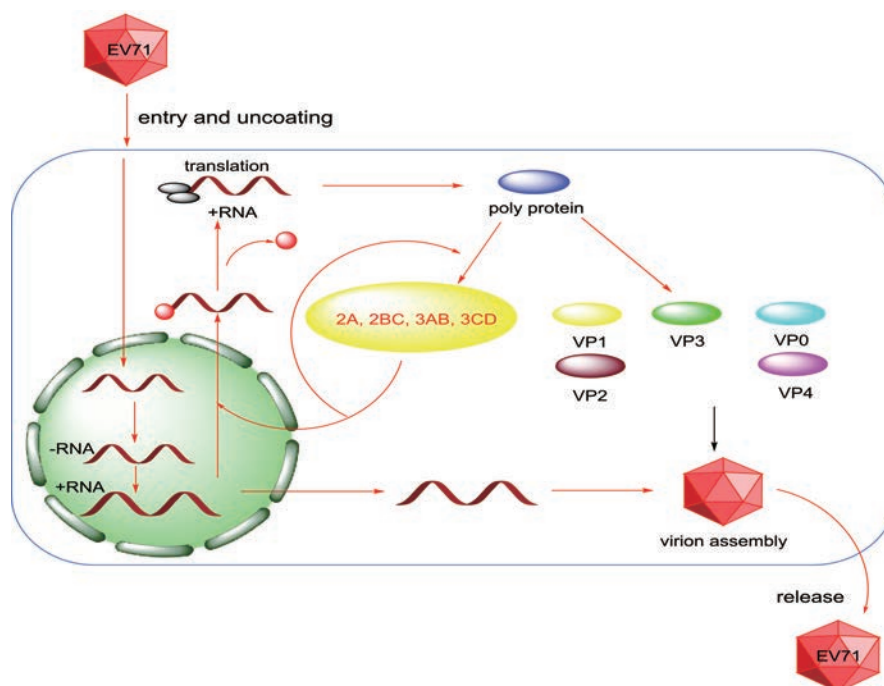


Figure 2 The life cycle of EV71^[6]

制病毒脱壳过程, 阻断病毒基因在人体内的释放, 最终达到治疗 EV71 感染的目的。

2.1.1.1 “Win”系列化合物 靶向病毒衣壳蛋白是较早使用的抗肠病毒策略, 即通过使用所谓的“衣壳结合物”占据疏水性口袋, 取代囊性因子, 从而增加粒子稳定性, 防止其与受体结合和/或释放基因组。“Win”系列化合物(图3左)是最早研究的衣壳蛋白可逆结合抑制剂^[8-10], 它的发现为该靶点抑制剂的研发提供了良好的化学结构模板, 在这一系列化合物中最成功的便是 pleconaril (化合物1, 图3右), 但 pleconaril 在人横纹肌肉瘤细胞系 (human rhabdomyosarcoma cell, RD 细胞系) 中并未表现出对 EV71 的抑制活性 ($EC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

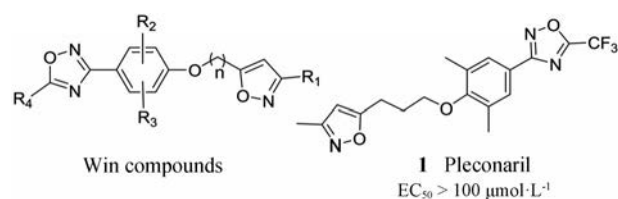
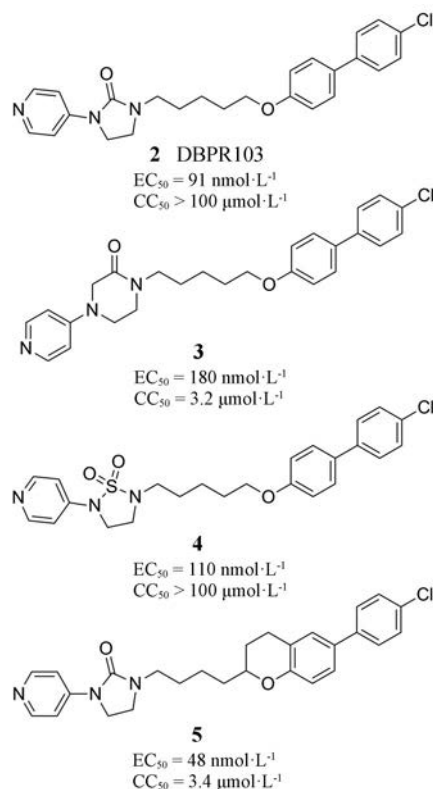


Figure 3 The structures of “Win” compounds and pleconaril

2002年, 中国台湾地区的研究者报道了以“Win”系列化合物骨架为模板, 并且基于此结构设计产生了一个虚拟化合物库, 这些化合物的最小能量结构与 VP1 口袋形状相似^[11]。在该虚拟化合物库基础之上, Shia 等^[11]发现了咪唑烷酮衍生物, 该类化合物普遍对 EV71 表现出了良好的活性。其中 DBPR103 (化合物2, $EC_{50} = 91 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 活性最好。

2017年, Li 等^[12]在 DBPR103 的基础上进行结构优化, SAR 研究表明, 咪唑烷酮中的羰基氧若替换成硫原子, 活性明显降低, 若将羰基替换成砷基, 活性可明显提高; 用吡嗪烷酮替换咪唑烷酮, 且吡嗪处于4位氮原子时活性明显提高。体外细胞活性试验表明, 在 RD 细胞中3~5均具有较高抗病毒活性, 其中5 ($EC_{50} = 48 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 活性最高。

Li 等^[12]接着对4进行了结构优化, 通过在吡嗪环上引入氨基得到6 ($EC_{50} = 12 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 活性相较于4提高了近10倍, 然后用脲基替换6中的氯苯基得到7 ($EC_{50} = 0.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 活性相较于6又提高了10多倍。由于临床中醛脲基结构药物比较少见(推测其原因为醛脲基结构在体内代谢中可能生成毒性代谢物), 而酮脲基结构更常见, 因此该课题组又在7的基础上合成了一系列衍生物, 其中8 ($EC_{50} = 4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相较于4活性提高了几十倍, 但毒性也相对提高。此外, Li 等还通过分子模拟分析了8与 VP1 蛋白的结合模式(图4, 黄色虚线为氢键作用)。



2.1.1.2 恩韦肟类化合物 2008年, Arita 等^[13]通过筛选生物活性化合物库, 发现了 GW5074 (化合物9), 它对 PV 和 EV71 的假病毒属均表现出了良好的活性, 其在 RD 细胞系抑制 EV71 假病毒属的 EC_{50} 值为 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在此工作基础上, Arita 等^[14]于2010年又通过对天然产物的虚拟筛选, 发现了 AN-12-H5 (化合物10), 对 PV 和 EV71 的假病毒属也表现出了良好的抗病毒活性, RD 细胞系中测得其抑制 EV71 假病毒属的 EC_{50} 值为 $0.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比 GW5074 活性有明显提高。

2.1.2 细胞表面受体抑制剂

在病毒入侵的过程中, 与细胞表面受体结合是非常重要的步骤。研究发现^[15], 人类清道夫受体 SCARB2 在病毒入侵的过程中可直接、特异性的与肠病毒结合, 从而使得病毒在不敏感的细胞中繁殖并促使细胞病变。推测其机制为, 细胞表面的 SCARB2 受体通过与病毒 VP1 衣壳蛋白凹槽相结合, 从而将病毒颗粒从稳定的 160S 转变为不稳定的 135S, 促进病毒衣壳蛋白的解聚, 加速病毒的侵入。除 SCARB2 之外, 最近发现^[16]的人类选择性 P 糖蛋白配体 PSGL-1 也是肠道病毒入侵白细胞时的细胞表面受体。PSGL-1 蛋白 N 端可与肠病毒特异性结合并促使肠病毒在非白细胞环境下复制, 但单独的 PSGL-1 不能像 SCARB2 一样提高病毒的滴度。针对以上两种细胞表面受体的抗病毒治疗已经有了一定基础, 例如, 抗 SCARB2 抗体和可

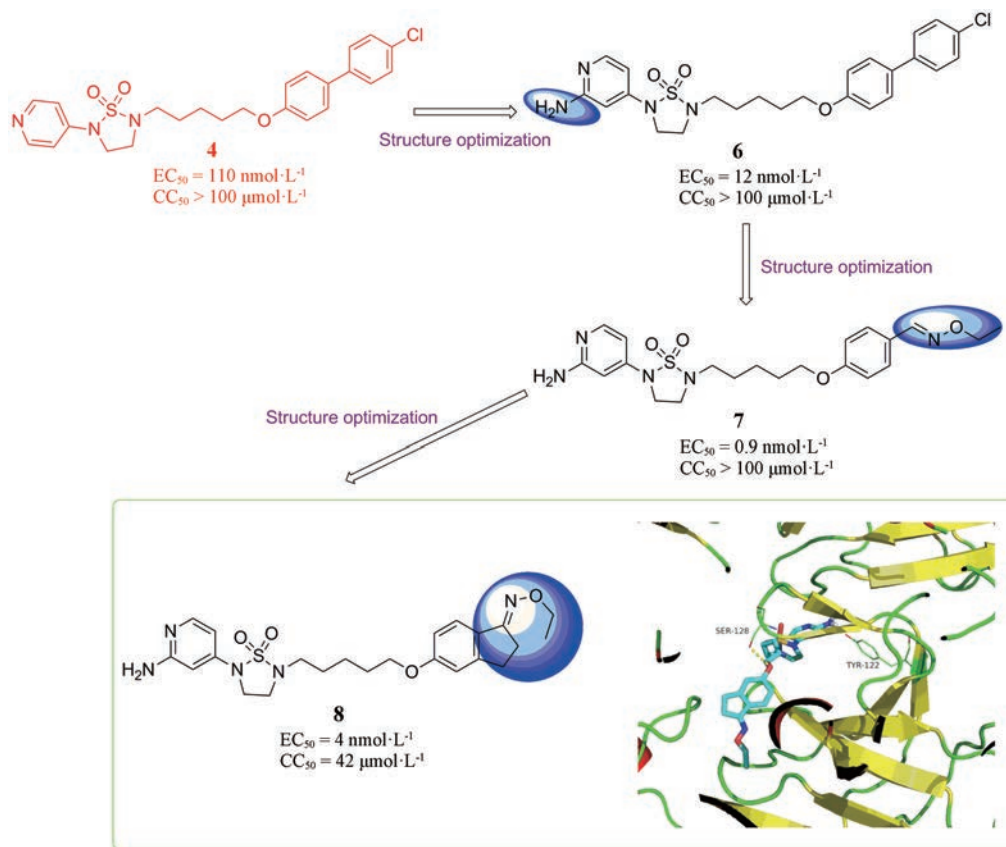
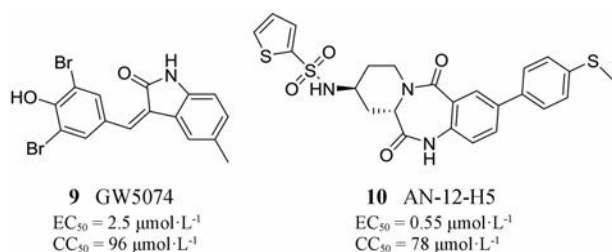


Figure 4 The structures of compounds 6-8^[12]



溶性 SCARB2-Fc 复合物能够以剂量依赖的方式抑制 EV71 感染。同样,也可以通过剂量依赖的抗 PSGL-1 抗体来竞争性抑制 PSGL-1 和可溶性 PSGL-1。Yang 等^[17]证实,唾液酸酶可以通过清除血浆膜蛋白中的唾液酸残基从而保护 DLD-1 易感肠细胞不受 EV71 感染。另一项研究显示^[18],在抗 DC-SIGN 抗体环境下未成熟树突状细胞经 DC-SIGN 感染 EV71 的概率减少高达 50%。

2.2 病毒 RNA 复制抑制剂

在所有肠病毒中, RNA 复制都极其保守,因此阻断病毒 RNA 复制可有效阻断病毒感染^[19]。

2.2.1 黄酮类化合物

研究发现,中药成分中的黄酮类化合物对病毒复制具有抑制作用^[20,21],Min 等^[22]通过计算机高通量筛选,发现了两个具有抗 EV71 活性的黄酮衍生物: ST077124

(化合物 11) 和 ST024734 (化合物 12)。在 1% DMSO 条件下使用其允许的最大药物浓度实验,结果 80% RD 细胞仍然存活,说明 ST077124 和 ST024734 对细胞毒性低;使用被 EVA71 型病毒感染的 RD 细胞实验,随着 ST077124 和 ST024734 量的增加,病毒毒力减弱。当 ST077124 和 ST024734 增加到 50 μmol·L⁻¹ 时,病毒的感染滴度分别为: 3.5 log₁₀ PFU·mL⁻¹、2.5 log₁₀ PFU·mL⁻¹,说明 ST077124 和 ST024734 具有一定抗 EV71 病毒活性。后续病毒空斑实验、荧光素酶染色等实验表明,ST077124 和 ST024734 对病毒的抑制作用是由于其能有效抑制病毒 RNA 复制,抑制的同时并不干扰内部核糖体进入位点序列 (internal ribosome entry site, IRES) 的活动。除此之外,ST077124 还是肠病毒 A71 型特异性抑制剂,而 ST024734 还对登革病毒 2 型具有抑制活性。

2.2.2 异黄酮类化合物

异黄酮类化合物作为黄酮类化合物的一种亚类,广泛存在于自然界的可食植物中,并在抗流感、抗病毒方面表现出了良好的生物活性^[23]。基于此背景,Wang 等^[24]对 7-羟基异黄酮 (化合物 13) 展开了深入研究。体外细胞 (非洲绿猴肾细胞系) 活性实验表明其抗 EV71 的 EC₅₀ 为 3.25 ± 0.27 μmol·L⁻¹, CC₅₀ 为 87.03 μmol·L⁻¹。

在此基础上,通过 RT-PCR、Western blotting 等技术进一步探讨了 7-羟基异黄酮如何抑制 EV71,结果表明 7-羟基异黄酮可有效抑制病毒的 RNA 复制。

2.2.3 天然产物 OSW-1

近年来研究显示,OSBP 是肠道病毒复制过程中的一种重要宿主因子,因此 OSBP 的配体—天然产物 OSW-1 (化合物 **14**) 在抗肠病毒药物研发中具有极大的潜力^[25]。Albulescu 等^[26]选用 EV71、CVA21 等多种肠病毒测试了 OSW-1 的抑制活性。其中,OSW-1 在海拉细胞系中对 EV71 表现出了纳摩尔级的活性 ($EC_{50} = 2.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.2.4 吡唑并吡啶类化合物

在病毒生命周期中 2C 蛋白具有极为重要的作用,扮演着 ATPase、ATPase 依赖的 RNA 解旋酶、ATPase 依赖的 RNA 分子伴侣等角色,这在多种肠病毒复制周期中是不可或缺的^[27-29],同时,小 RNA 病毒属的 2C 蛋白序列具有高度保守性^[30],因此以 2C 蛋白为靶点的广谱抗肠病毒药物研发极具前景。Xing 等^[31]使用快速活病毒筛选的方法筛选了 86 000 种化合物,发现吡唑并吡啶衍生物 (化合物 **15**, $EC_{50} = 2.3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 具有较好的抗病毒活性,靶标为蛋白酶 2C。

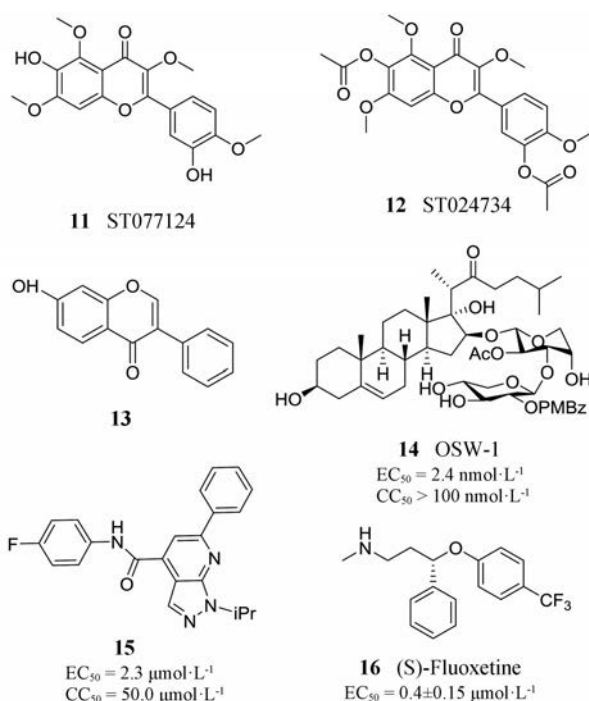
由于 **15** 的骨架不同于以往任何肠病毒 RNA 抑制剂,因此 Xing 等^[31]以 **15** 为先导化合物,分别对其吡唑环、吡啶环和苯环进行结构优化。SAR 研究表明:吡啶 N 邻位被 2-噻吩取代活性最高 ($EC_{50} = 2.3 \pm 1.2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),2-咪唑基取代细胞毒性显著降低 ($CC_{50} > 200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);苯环上的氟原子被噻唑基取代时活性最佳 ($EC_{50} = 0.8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $CC_{50} > 200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);苯胺基用吡啶氨基、噻唑基、噻吩基等替代可提高化合物活性,其中 4-噻唑基取代可提高活性且细胞毒性最低 ($EC_{50} = 0.8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $CC_{50} > 200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);最后, Xing 等使用芳香基团、取代甲基、H 等代替吡唑环上的异丙基,但并未表现出抗病毒活性,因此该异丙基或许为活性必需基团。

2.2.5 氟西汀

在药物再利用 (drug-repurposing) 的思路下,研究人员通过高通量筛选得到了一系列 2C 蛋白酶抑制剂^[32]。Bauer 等^[33]选择氟西汀 (fluoxetine, 化合物 **16**, $EC_{50} = 0.4 \pm 0.15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行了抗病毒活性测试。深入研究其构型对生物活性的影响,发现仅有 (S)-氟西汀能与 2C 蛋白空腔结合从而抑制该蛋白活性。

2.3 病毒蛋白质合成抑制剂

蛋白酶 2A、3C 在肠病毒蛋白质合成中扮演着重要角色。2A 蛋白序列高度保守;3C 蛋白酶活性位点为半胱氨酸,而且其结构与丝氨酸蛋白酶、胰凝乳蛋白酶相似^[34]。抑制 2A、3C 中的一种或两种蛋白酶均可



达到抗病毒目的。

2.3.1 蛋白酶 2A 抑制剂

Falah 等^[35]发现某些多肽类化合物可以通过与 2A 蛋白酶活性中心结合,从而抑制病毒复制。其中,优势肽 LVLQTM 在体内外实验中均能抑制 EV71 2A 蛋白酶。LVLQTM 在海拉细胞中与 2A 蛋白酶结合的解离常数 (K_d) 为 $9.6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,焓值 (ΔS) = $19.7 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$,焓值 (ΔH) = $-956 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$,揭示 LVLQTM 可与 2A 蛋白酶紧密结合。

2.3.2 蛋白酶 3C 抑制剂

苯硫基酮类化合物 天然底物的拟肽类似物是迄今为止发现的最有效的 3C 蛋白酶抑制剂之一^[36],它们与蛋白酶活性中心的半胱氨酸共价结合从而抑制病毒基因组复制^[37]。但由于较差的药代动力学参数,拟肽类共价抑制剂很难用于临床治疗。Schulz 等^[38]在“结构简化”的思路下将拟肽类共价抑制剂简化为 **F1** (化合物 **17**),而后通过“骨架迁越”的方法得到优势骨架 **18** [$K_{\text{inact}}/K_i = 21.3 \pm 8 \text{ (mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$],**18** 中的苯硫基酮片段可通过与活性中心的半胱氨酸形成共价键从而抑制 3C 蛋白酶活性。Schulz 等^[38]在该骨架基础上继续结构衍生化 **19~22** (图 5)。抑酶实验显示,**19** 和 **20** 属于可逆抑制剂,**21** 和 **22** 属于不可逆抑制剂。

该类衍生物通过在优势骨架 **18** 的吡咯环 N 原子上引入苯丙基,插入 3C 蛋白酶的 S2 空腔,而“Win”骨架则与 S1 空腔结合,这大大增强了化合物对 3C 蛋白酶的抑制作用 (**22** 与 3C 蛋白结合模式图,图 6,红色

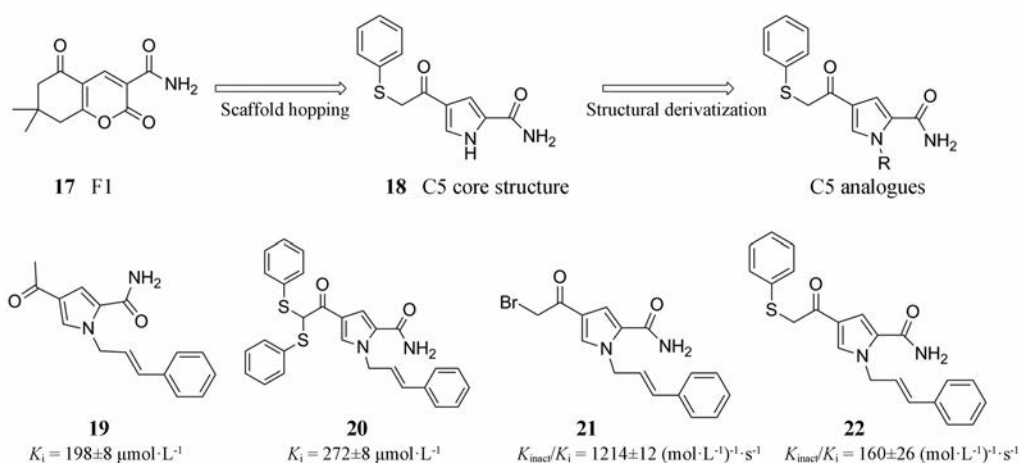


Figure 5 The chemical structures of 17-22

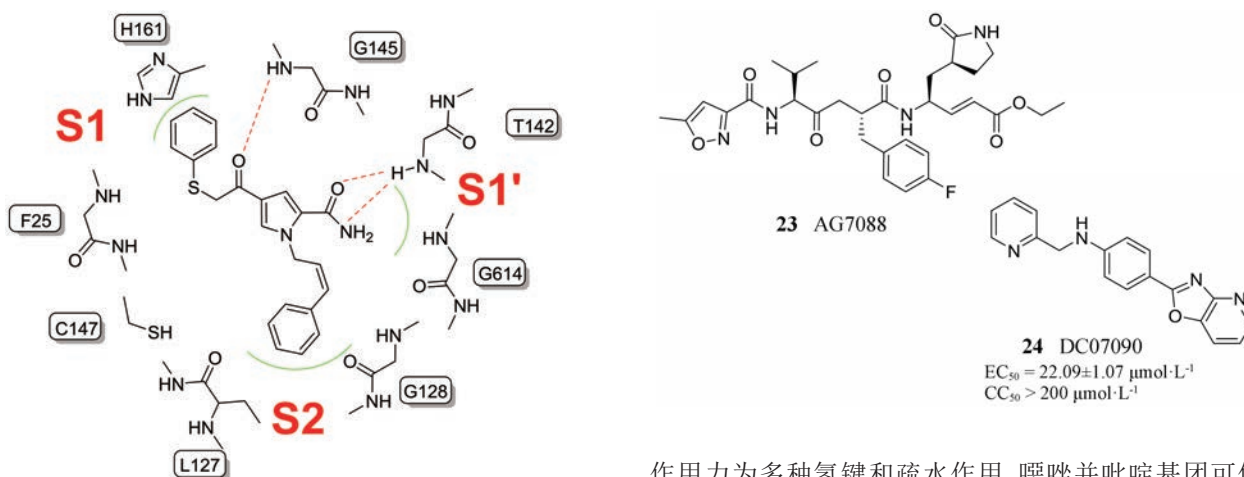


Figure 6 The binding mode of 22^[38]

虚线为氢键作用)。

AG7088 (芦平曲韦, rupintrivir) AG7088 (芦平曲韦, 化合物 **23**) 也是一类成功的多肽类 3C 蛋白酶抑制剂, 但 AG7088 不能降低自然感染 HRV 患者的病毒滴度或中度感染疾病的严重程度, 因此终止了其临床前研究^[39]。

DC07090 2016 年, Ma 等^[40]通过虚拟筛选和抑酶实验发现 DC07090 (化合物 **24**) 对 EV71 3C 蛋白酶具有微摩尔级的抑制作用 ($EC_{50} = 22.09 \pm 1.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

Ma 等^[40]以 DC07090 为先导化合物进行结构优化, 其优化策略为: 首先在苯环和杂环上引入小基团以增加分子的疏水性, 接着延长苯环与噁唑环之间的 linker, 改变化合物在 3C 蛋白酶中的构象, 以期增强化合物对靶点的亲和力。但优化后的抑制剂活性未超越 DC07090, 因此对 DC07090 进行了分子模拟研究, 探讨了 DC07090 与 EV71 3C 蛋白酶的结合方式。其主要

作用力为多种氢键和疏水作用, 噁唑并吡啶基团可伸入 S1' 口袋处与 G145 形成疏水作用力, 位于苯环与吡啶环之间的 -NH- 可与 G164 形成氢键, 位于 DC07090 末端的吡啶环则插入 S4 空腔并与氨基酸残基 Leu125 等形成疏水作用, DC07090 的吡啶氮亦可与 Ser128 的主链形成氢键作用 (图 7; 红色虚线为氢键作用, 蓝色虚线为疏水作用)。

亚氨基唑啉酮类化合物 2018 年, 南开大学尚鲁庆等^[41]发现, 使用生物电子等排体一亚氨基唑啉酮替换 R-1 (化合物 **25**, $EC_{50} = 0.088 \pm 0.006 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 人肝微粒体 $t_{1/2} = 6 \text{ min}$) 中的氰基可显著提高化合物的活性和代谢稳定性。在小鼠实验中, **26** ($EC_{50} = 0.21 \pm 0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 人肝微粒体 $t_{1/2} = 40 \text{ min}$)、**27** ($EC_{50} = 0.10 \pm 0.02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 人肝微粒体 $t_{1/2} = 76 \text{ min}$) 的活性较好且稳定性相较于 R-1 显著提高。

双激活 Michael 受体类化合物 2019 年, 尚鲁庆等^[42]发现与两个吸电子基团偶联的双激活 Michael 受体可作为一种新型“亲电弹头”, 该“弹头”通过与 3C 蛋白酶活性中心半胱氨酸的巯基发生亲电加成从而抑制病毒关键蛋白酶 3C。含有该弹头的 **28~30** 在 RD 细胞

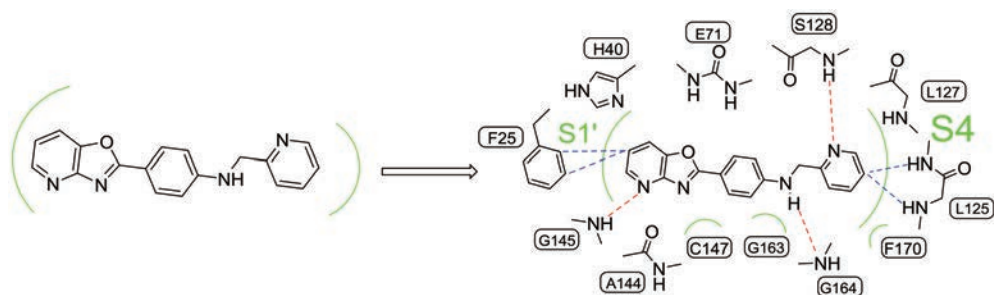


Figure 7 The binding mode of DC07090^[40]

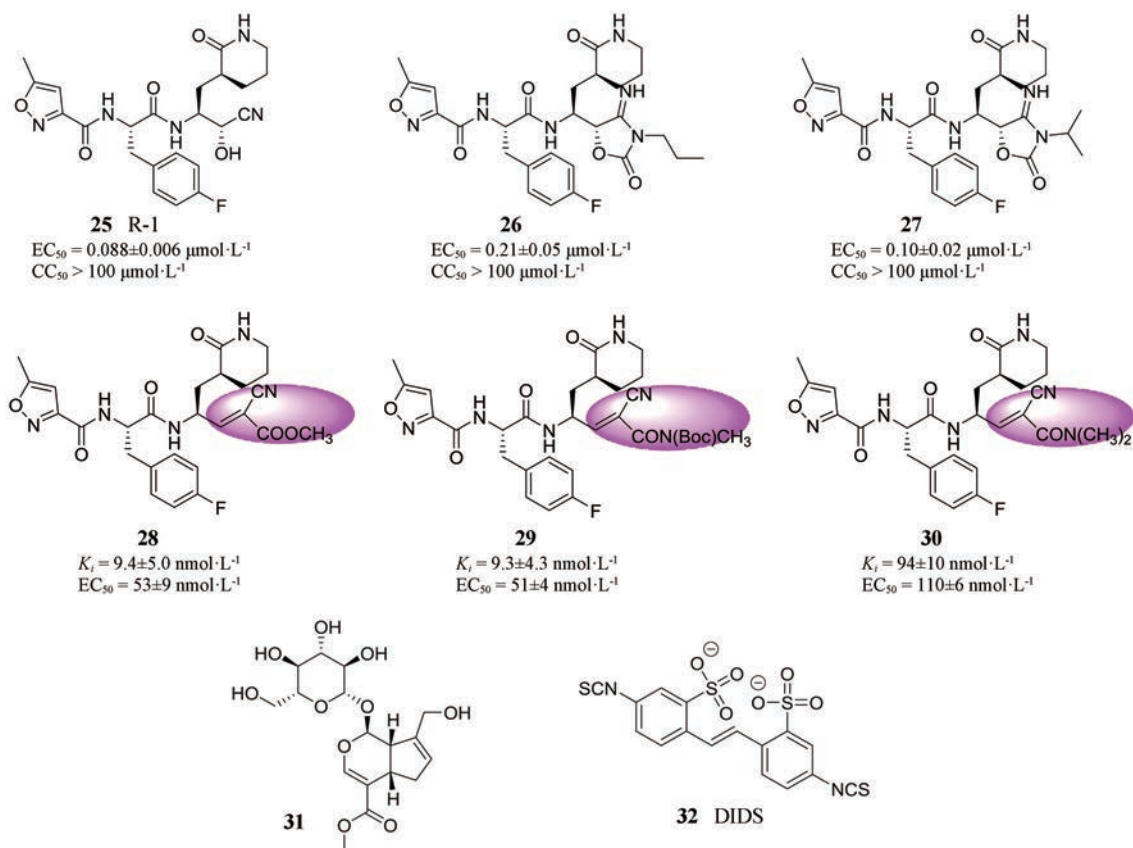
系中都表现出了良好的抗病毒活性, 而且在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时未观察到细胞毒性。

分子对接表明, 该类“亲电弹头”可以插入 S1' 空腔, 其中的羰基氧原子与蛋白疏水性表面的 Cys147、Gly145 形成氢键; 氰基与 His40 形成氢键 (图 8)。

梔子苷类化合物 (F. Gardeniae) 2018 年, Lin 等^[43]发现梔子苷 (化合物 **31**) 可阻止 EV71 在 RD 细胞中的传染。实验结果表明, 使用 $1\sim 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 梔子苷处理被 EV71 感染的 RD 细胞 36 h, 其病毒 RNA 水平下降 60%, 这表明梔子苷对病毒有一定的抑制作用。同时, RD 细胞的存活率高达 80%, 这表明梔子苷对细胞毒性相对较低。随后的细胞实验表明, 梔子苷可通过阻断病毒蛋白质的翻译减弱病毒的滴度。

2.4 2B 蛋白抑制剂

病毒在完成 RNA 复制以后与新合成的衣壳蛋白组装成新的病毒颗粒, 在这一过程中, 2B 蛋白扮演着重要角色。2B 蛋白可介导形成氯离子通道, 影响胞质中游离离子的浓度, 从而参与控制新病毒颗粒的释放^[44]。化合物 DIDS (化合物 **32**) 可部分阻断 2B 蛋白介导的电流从而抑制病毒新颗粒的释放, 因此 DIDS 是一种潜在的 2B 蛋白抑制剂^[45]。Sun 等^[45]测定了 DIDS 的抗 EV71 活性。RD 细胞中, 在 $5\sim 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内随着 DIDS 浓度的增加, 对病毒的抑制逐渐增强, 当浓度高于 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 病毒的抑制不再随浓度的增大而增加, 而对细胞形态的影响逐渐显现。虽然 DIDS 对细胞有一定影响, 但依然表现出了潜在的临床应用前景。



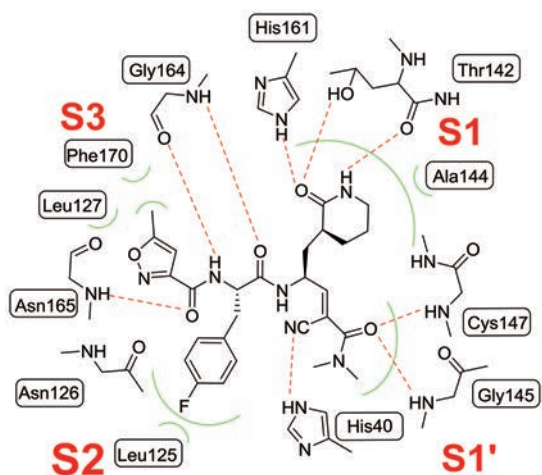


Figure 8 The binding mode of 30^[42]

2.5 疫苗

除了抗EV71药物外,疫苗在防治EV71中也有着重要的地位。现阶段针对EV71的疫苗主要包括灭活全病毒疫苗、减毒活疫苗、病毒颗粒样疫苗等^[46-49]。其中,灭活全病毒疫苗相比于其他类型疫苗免疫原性更高,而且可以在现有的灭活脊髓灰质炎疫苗的技术之上更快地开发新一代EV71灭活全病毒疫苗^[50,51]。通过对EV71疫苗株及其生产工艺的优化^[52,53],中国台湾地区^[54]中试生产的疫苗免疫原性良好,并首次进入了临床试验。第一阶段临床试验的结果表明,5和10 μg剂量在成年受试者中均具有良好的安全性和较高的免疫原性,两种剂量下的疫苗中和抗体阳性率分别是93.1%和96.3%。此外,新加坡研制^[55]的EV71疫苗—Inviragen I期临床试验结果表明,在0.3和3 μg两种剂量下中和抗体阳性率均是100%。

3 总结与展望

尽管目前抗EV71新药研发取得了一定进展,但是现阶段防治EV71仍然主要依赖于疫苗,因此加快抗EV71药物的研发仍然迫在眉睫。

本综述总结了近几年国内外抗EV71新药研究的最新进展。通过高通量筛选依然是发现抗EV71先导化合物的主要手段之一,筛选出的先导化合物可通过“骨架跃迁”、“基团添加或替换”等策略进一步优化以提高其活性。除此之外,从传统中医药中发现抗肠病毒71型的活性物质具有广阔的前景,例如前文提及的黄酮中间代谢物ST077124和ST024734的发现。

随着多学科的发展与融合,当前对于EV71衣壳蛋白以及部分关键蛋白酶的晶体结构已有深入的认识,例如3C、3D蛋白酶等,因此,未来的肠病毒药物研发可基于此蛋白晶体结构进行合理的药物设计。同时,也需要进一步加强对EV71生命周期模式的理解,

促进抗EV71药物的研发。除此之外,基于片段的药物设计也可用于EV71共价抑制剂的研发,发现更多潜在的“亲电弹头”,进一步提高抗EV71药物活性,但是需要注意药物脱靶后对细胞的毒性,因此EV71共价抑制剂研发是一个充满机遇与挑战的新兴领域。

同时,随着病毒突变株的出现,病毒耐药性增强,传统化合物活性降低,为了提高化合物抗病毒活性,可以将目光转向发现多靶点、多位点协同的抑制剂。除此之外,还可以从蛋白质组学水平发现新靶点,并在此基础上筛选新的先导化合物,提高化合物对病毒突变株的活性。总之,要在现有药物化学策略和方法的基础上进一步探索新策略、新方法和新靶点,以此进一步促进抗EV71病毒的药物发现。

References

- [1] Oberste MS, Peñaranda S, Maher K. Complete genome sequences of all members of the species human enterovirus A [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85: 1597-1607.
- [2] Sin J, Mangale V, Thienphrapa W, et al. Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis [J]. *Virology*, 2015, 484: 288-304.
- [3] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26: 91-107.
- [4] Zhang Y, Simpson AA, Ledford RM, et al. Structural and virological studies of the stages of virus replication that are affected by antirhinovirus compounds [J]. *J Virol*, 2004, 78: 11061-11069.
- [5] Tan CW, Lai JK, Sam IC, et al. Recent developments in antiviral agents against enterovirus 71 infection [J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21: 14.
- [6] Buchta D, Füzik T, Hrebík D, et al. Enterovirus particles expel capsid pentamers to enable genome release [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 1138.
- [7] Wu KX, Ng MM, Chu JJ. Developments towards antiviral therapies against enterovirus 71 [J]. *Drug Discov Today*, 2010, 15: 1041-1051.
- [8] Han L, Li K, Jin C, et al. Human enterovirus 71 protein interaction network prompts antiviral drug repositioning [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43143.
- [9] Diana GD, McKinlay MA, Otto MJ. [(4,5-Dihydro-oxazolyl 2-) phenoxy]alkyl]isoxazoles inhibitors of picornavirus uncoating [J]. *J Med Chem*, 1985, 28: 1906-1910.
- [10] Bailey TR, Diana GD, Kowalczyk PJ, et al. Antirhinoviral activity of heterocyclic analogs of Win 54954 [J]. *J Med Chem*, 1992, 35: 4628-4633.
- [11] Shia KS, Li WT, Chang CM, et al. Design, synthesis and structure-activity relationship of pyridyl imidazolidinones: a novel class of potent and selective human enterovirus 71 inhibitors [J].

- J Med Chem, 2002, 45: 1644-1655.
- [12] Li P, Yu J, Hao F, et al. Discovery of potent EV71 capsid inhibitors for treatment of HFMD [J]. ACS Med Chem Lett, 2017, 8: 841-846.
- [13] Arita M, Wakita T, Shimizu H. Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity [J]. J Gen Virol, 2008, 89: 2518-2530.
- [14] Arita M, Takebe Y, Wakita T, et al. A bifunctional anti-enterovirus compound that inhibits replication and the early stage of enterovirus 71 infection [J]. J Gen Virol, 2010, 91: 2734-2744.
- [15] Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, et al. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16: 368-381.
- [16] Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, et al. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71 [J]. Nat Med, 2009, 15: 794-797.
- [17] Yang B, Chuang H, Yang KD. Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells [J]. Virol J, 2009, 6: 141.
- [18] Lin YW, Wang SW, Tung YY, et al. Enterovirus 71 infection of human dendritic cells [J]. Exp Biol Med, 2009, 234: 1166-1173.
- [19] Shang L, Xu M, Yin Z. Antiviral drug discovery for the treatment of enterovirus 71 infections [J]. Antiviral Res, 2013, 97: 183-194.
- [20] Meragelman TL, Tucker KD, McCloud TG, et al. Antifungal flavonoids from *Hildegardia barteri* [J]. J Nat Prod, 2005, 68: 1790-1792.
- [21] Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas [J]. Mol Nutr Food Res, 2007, 51: 116-134.
- [22] Min N, Leong PT, Lee RCH, et al. A flavonoid compound library screen revealed potent antiviral activity of plant-derived flavonoids on human enterovirus A71 replication [J]. Antiviral Res, 2018, 150: 60-68.
- [23] Wang L, Wang J, Wang L, et al. Anti-enterovirus 71 agents of natural products [J]. Molecules, 2015, 20: 16320-16333.
- [24] Wang HQ, Meng S, Li ZR, et al. The antiviral effect of 7-hydroxyisoflavone against Enterovirus 71 *in vitro* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2013, 15: 382-389.
- [25] Roberts BL, Severance ZC, Bensen RC, et al. Transient compound treatment induces a multigenerational reduction of oxysterol-binding protein (OSBP) levels and prophylactic antiviral activity [J]. ACS Chem Biol, 2019, 14: 276-287.
- [26] Albulescu L, Strating JR, Thibaut HJ, et al. Broad-range inhibition of enterovirus replication by OSW-1, a natural compound targeting OSBP [J]. Antiviral Res, 2015, 117: 110-114.
- [27] Rodriguez PL, Carrasco L. Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 8105-8110.
- [28] Pfister T, Wimmer E. Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication [J]. J Biol Chem, 1999, 274: 6992-7001.
- [29] Klein M, Eggers HJ, Nelsen-Salz B. Echovirus 9 strain barty non-structural protein 2C has NTPase activity [J]. Virus Res, 1999, 65: 155-160.
- [30] Xia H, Wang P, Wang GC, et al. Human enterovirus nonstructural protein 2CATPase functions as both an RNA helicase and ATP-independent RNA chaperone [J]. PLoS Pathog, 2015, 11: e1005067.
- [31] Xing Y, Zuo J, Krogstad P, et al. Synthesis and structure-activity relationship (SAR) studies of novel pyrazolopyridine derivatives as inhibitors of enterovirus replication [J]. J Med Chem, 2018, 61: 1688-1703.
- [32] Ulferts R, de Boer SM, van der Linden L, et al. Screening of a library of FDA-approved drugs identifies several enterovirus replication inhibitors that target viral protein 2C [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60: 2627-2638.
- [33] Bauer L, Manganaro R, Zonsics B, et al. Fluoxetine inhibits enterovirus replication by targeting the viral 2C protein in a stereospecific manner [J]. ACS Infect Dis, 2019, 5: 1609-1623.
- [34] Bedard KM, Semler BL. Regulation of picornavirus gene expression [J]. Microbes Infect, 2004, 6: 702-713.
- [35] Falah N, Montserret R, Lelogeais V, et al. Blocking human enterovirus 71 replication by targeting viral 2A protease [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67: 2865-2869.
- [36] Patick AK, Brothers MA, Maldonado F, et al. *In vitro* antiviral activity and single-dose pharmacokinetics in humans of a novel, orally bioavailable inhibitor of human rhinovirus 3C protease [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 2267-2275.
- [37] Wolber G, Langer T. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters [J]. J Chem Inf Model, 2005, 45: 160-169.
- [38] Schulz R, Atef A, Becker D, et al. Phenylthiomethyl ketone-based fragments show selective and irreversible inhibition of enteroviral 3C proteases [J]. J Med Chem, 2018, 61: 1218-1230.
- [39] Patick AK. Rhinovirus chemotherapy [J]. Antiviral Res, 2006, 71: 391-396.
- [40] Ma GH, Ye Y, Zhang D, et al. Identification and biochemical characterization of DC07090 as a novel potent small molecule inhibitor against human enterovirus 71 3C protease by structure-based virtual screening [J]. Eur J Med Chem, 2016, 124: 981-991.
- [41] Ma Y, Shang C, Yang P, et al. 4-Iminoxazolidin-2-one as abioisostere of the cyanohydrin moiety: inhibitors of enterovirus 71 3C protease [J]. J Med Chem, 2018, 61: 10333-10339.
- [42] Ma Y, Li L, He S, et al. Application of dually activated Michael acceptor to the rational design of reversible covalent inhibitor for enterovirus 71 3C protease [J]. J Med Chem, 2019, 62: 6146-6162.
- [43] Lin YJ, Lai CC, Lai CH, et al. Inhibition of enterovirus 71 infec-

- tions and viral IRES activity by Fructus gardeniae and geniposide [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 62: 206-213.
- [44] van Kuppeveld FJ, Hoenderop JG, Smeets RL, et al. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release [J]. *EMBO J*, 1997, 16: 3519-3532.
- [45] Xie S, Wang K, Yu W, et al. DIDS blocks a chloride-dependent current that is mediated by the 2B protein of enterovirus 71 [J]. *Cell Res*, 2011, 21: 1271-1275.
- [46] Chou AH, Liu CC, Chang JY, et al. Formalin-inactivated EV71 vaccine candidate induced cross-neutralizing antibody against subgenotypes B1, B4, B5 and C4A in adult volunteers [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e79783.
- [47] Lin YC, Wu CN, Shih SR, et al. Characterization of a Vero cell-adapted virulent strain of enterovirus 71 suitable for use as a vaccine candidate [J]. *Vaccine*, 2002, 20: 2485-2493.
- [48] Lin YL, Yu CI, Hu YC, et al. Enterovirus type 71 neutralizing antibodies in the serum of macaque monkeys immunized with EV71 virus-like particles [J]. *Vaccine*, 2012, 30: 1305-1312.
- [49] Zhou SL, Ying XL, Han X, et al. Characterization of the enterovirus 71 VP1 protein as a vaccine candidate [J]. *J Med Virol*, 2015, 87: 256-262.
- [50] Liang Z, Wang J. EV71 vaccine, an invaluable gift for children [J]. *Clin Transl Immunol*, 2014, 3: e28.
- [51] Yi EJ, Shin YJ, Kim JH, et al. Enterovirus 71 infection and vaccines [J]. *Clin Exp Vaccine Res*, 2017, 6: 4-14.
- [52] Chong P, Hsieh SY, Liu CC, et al. Production of EV71 vaccine candidates [J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2012, 8: 1775-1783.
- [53] Chou AH, Liu CC, Chang JY, et al. Immunological evaluation and comparison of different EV71 vaccine candidates [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 831282.
- [54] Wu CY, Lin YW, Kuo CH, et al. Inactivated enterovirus 71 vaccine produced by 200-L scale serum-free microcarrier bioreactor system provides cross-protective efficacy in human SCARB2 transgenic mouse [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0136420.
- [55] Hwa SH, Lee YA, Brewoo JN, et al. Preclinical evaluation of the immunogenicity and safety of an inactivated enterovirus 71 candidate vaccine [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7: e2538.