

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480040083.1

[51] Int. Cl.

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 24 日

[11] 公开号 CN 1901921A

[22] 申请日 2004.11.10

[21] 申请号 200480040083.1

[30] 优先权

[32] 2003.11.10 [33] US [31] 60/518,998

[86] 国际申请 PCT/CN2004/001279 2004.11.10

[87] 国际公布 WO2005/044281 英 2005.5.19

[85] 进入国家阶段日期 2006.7.7

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 袁国勇 陈峰 陈国雄 高一村

管轶 L·潘烈文

JSM·裴伟士

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 程淼 李连涛

权利要求书 4 页 说明书 32 页 附图 4 页

[54] 发明名称

用于治疗 SARS 冠状病毒感染或其它相关感染的黄芩苷和其衍生物

[57] 摘要

本发明涉及可用于治疗人和其它动物中与冠状病毒科的巢状病毒目病毒例如严重急性呼吸综合症(SARS)病毒有关的疾病的药物组合物。特别是,本发明涉及一种天然存在的化合物,即黄芩苷,其是从中国药用植物 *Scutellaria baicalensis* Georgi(中国名称:黄芩)提取并纯化的,其针对感染人类及其它动物的冠状病毒科的巢状病毒目成员显示了有效的抗病毒活性;特别是对于人类的 SARS 病毒(“hSARS 病毒”)。本发明还涉及一种治疗方法,该方法使用包含黄芩苷化合物的药物组合物来治疗、改善、控制或预防与冠状病毒科的巢状病毒目成员例如 hSARS 有关的疾病。

1. 治疗与属于冠状病毒科的巢状病毒目的病毒有关的疾病的方法，所述方法包括给予需要所述治疗的受试者治疗有效量的黄芩苷和/或其药学可接受的衍生物或盐。

2. 权利要求1的方法，其中所述病毒感染人类及其它动物。

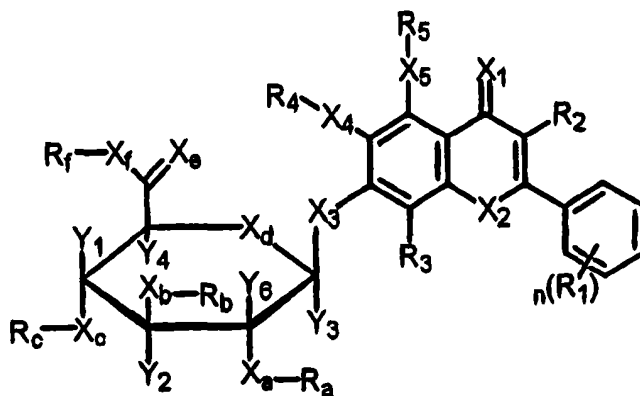
3. 权利要求2的方法，其中所述病毒是hSARS病毒。

4. 权利要求1的方法，其中所述受试者是哺乳动物。

5. 权利要求4的方法，其中所述受试者是人类。

6. 权利要求1的方法，其中该方法进一步包括给予治疗有效量的类固醇、抗病毒剂、抗生素、镇痛药和/或支气管扩张药。

7. 一种药物组合物，其包括具有下式的黄芩苷和/或其药学可接受的衍生化合物：



其中

每个 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_a 、 X_b 、 X_c 、 X_d 、 X_e 和 X_f 独立地是 O 或 S；

每个 R_4 、 R_5 、 R_a 、 R_b 和 R_c 独立地是 H、任选被 1-5 个 R_y 基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基，或 (C_1-C_{10}) 烷基-O- (C_1-C_{10}) 烷基，其中每个 (C_1-C_{10}) 烷基任选被 1-5 个 R_y 基团取代；

每个 R_y 独立地是 R_q 或 $-(C_2-C_{10})$ 链烯基、 $-(C_2-C_{10})$ 炔基、 $-(C_3-C_{10})$ 环烷基、 $-(C_8-C_{14})$ 二环烷基、 $-(C_8-C_{14})$ 三环烷基、 $-(C_5-C_{10})$ 环烯基、 (C_8-C_{14}) 二环烯基、 $-(C_8-C_{14})$ 三环烯基、-苯基、-萘基或 $-(C_{14})$ 芳基，其中每个是未取代的或被一个或多个 R_z 基团取代；

每个 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地是 R_q 或 $-(C_1-C_{10})$ 烷基、 $-(C_2-C_{10})$ 链烯基、 $-(C_2-C_{10})$ 炔基、 $-(C_3-C_{10})$ 环烷基、 $-(C_8-C_{14})$ 二环烷基、 $-(C_8-C_{14})$ 三环烷基、 $-(C_5-C_{10})$ 环烯基、 $-(C_8-C_{14})$ 二环烯基、 $-(C_8-C_{14})$ 三环烯基、-苯基、-萘基或 $-(C_{14})$ 芳基，其中每个是未取代的、被一个或多个 R_q 基团取代、被一个或多个 R_z 基团取代、或被一个或多个 R_q 基团和一个或多个 R_z 基团取代；

R_f 是 H、任选被 1-5 个 R_y 基团取代的 (C_1-C_{12}) 烷基、 (C_1-C_{12}) 烷基 $-O-(C_1-C_{12})$ 烷基，其中每个 (C_1-C_{12}) 烷基任选被 1-5 个 R_y 取代，或是反离子；

每个 R_q 独立地是 CN, OH, 卤素, N_3 , NO_2 , $N(R_z)_2$, $=NR_z$, $CH=NR_z$, NR_zOH , OR_z , COR_z , $C(O)OR_z$, $OC(O)R_z$, $OC(O)OR_z$, SR_z , $S(O)R_z$ 或 $S(O)_2R_z$ ；

每个 R_z 独立地是 $-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(C_2-C_6)$ 链烯基、 (C_2-C_6) 炔基、 (C_3-C_8) 环烷基、 $-(C_5-C_8)$ 环烯基、-苯基、 $-(3\text{-至 } 5\text{-元})$ 杂环、 $C(\text{卤})_3$ 或 $-CH(\text{卤})_2$ ；
和

n 是 0、1、2、3、4 或 5，和

药学可接受的载体。

8. 权利要求 7 的组合物，其中所述化合物的 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_a 、 X_b 、 X_c 、 X_d 、 X_e 和 X_f 的一个或多个是 O。

9. 权利要求 8 的组合物，其中所述化合物的每个 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_a 、 X_b 、 X_c 、 X_d 、 X_e 和 X_f 都是 O。

10. 权利要求 7 的组合物，其中所述化合物的 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_f 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 的一个或多个是 H。

11. 权利要求 10 的组合物，其中所述化合物的每个 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_f 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 都是 H。

12. 权利要求 7 的组合物，其中所述化合物的 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 和 Y_6 的一个或多个是 H。

13. 权利要求 12 的组合物，其中所述化合物的每个 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 和 Y_6 都是 H。

14. 权利要求 7 的组合物，其中所述化合物的 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 和 Y_6 的一个或多个是 CH_3 。

15. 权利要求 7 的组合物，其中所述化合物的 R_1 是 H 或 CH_3 。

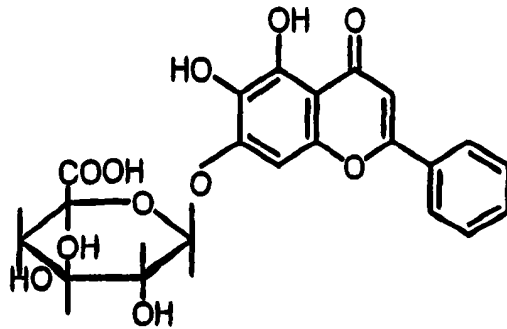
16. 权利要求 7 的组合物, 其中所述化合物的 n 是 5.

17. 权利要求 7 的组合物, 进一步包括治疗有效量的类固醇、抗病毒剂、抗生素、镇痛药和/或支气管扩张药。

18. 一种治疗需要治疗的受试者的方法, 包括给予该受试者预防有效量的黄芩苷和/或其药学可接受的衍生物和/或盐; 和预防有效量的疫苗, 所述疫苗包括失活病毒, 该失活病毒属于冠状病毒科的巢状病毒目, 从而预防该受试者被所述病毒感染。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述病毒是 hSARS 病毒。

20. 治疗感染上 hSARS 病毒的受试者的方法, 所述方法包括给予该受试者治疗有效量的包含具有下式的化合物



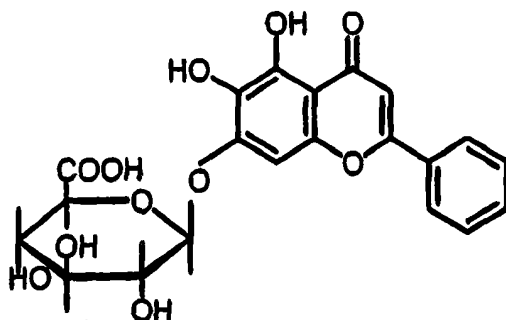
和药学可接受的载体的药物组合物。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述组合物进一步包括治疗有效量的类固醇、抗病毒剂、抗生素、镇痛药和/或支气管扩张药。

22. 权利要求 20 的方法, 进一步包括黄芩苷的药学可接受的衍生物和/或盐。

23. 包括容器的试剂盒, 该容器中含有权利要求 7 的药物组合物。

24. 基本上由下式的化合物组成的组合物:



25. 权利要求 24 的组合物，其中所述化合物具有至少约 82% 的纯度。

26. 权利要求 25 的组合物，其中所述化合物具有至少约 96% 的纯度。

用于治疗 SARS 冠状病毒感染或其它 相关感染的黄芩苷和其衍生物

本申请要求于 2003 年 11 月 10 日申请的美国临时专利申请 NO.60/518,998 为优先权，本文中引入其全部内容作为参考。

1. 发明领域

本发明涉及可用于治疗人和其它动物中与冠状病毒科 (family Coronaviridae) 的巢状病毒目 (order Nidovirales) 有关的疾病例如严重急性呼吸综合症(SARS)的治疗剂。本发明的治疗剂涉及高纯化形式的中药。特别是，本发明涉及一种天然存在的化合物，即黄芩苷 (baicalin)，其是从中国药用植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) (中国名称：黄芩)提取并纯化的，其针对感染人类及其它动物的冠状病毒科的巢状病毒目成员显示了有效的抗病毒活性；特别是对导致人类严重急性呼吸综合症(SARS)的病毒(“hSARS 病毒”)显示了有效的抗病毒活性。已知黄芩苷比许多现行抗病毒药的毒性小。由此，黄芩苷和其衍生物代表了一类新的化合物，其具有研制治疗由冠状病毒成员例如 hSARS 病毒所引起的感染及其它相关感染的安全药品的可能性。本发明也涉及一种治疗方法，该方法使用包含黄芩苷化合物的治疗方法，用于治疗、改善、控制或预防与至少感染人类的冠状病毒科的巢状病毒目成员有关的疾病；特别是 hSARS 病毒菌株的冠状病毒成员。

2. 发明背景

近来，在中国大陆的广东省，爆发了非典型肺炎。在 2002 年 11 月和 2003 年 3 月之间，有 792 个记录的病例，其中 31 人死亡(WHO. Severe Acute Respiratory Syndrome(SARS)Weekly Epidemiol. Rec. 2003; 78: 86)。为了应付这种危机，香港的医院专家对于患有严重非典型肺炎的受试者增加了监测。在该调查期间，许多护理人员确定患有该疾病。另外，在与那些感染者紧密接触的人当中，也有许多肺炎事件发生。尽管进行了典型用于细菌性病原体的抗生素治疗，但该疾病的严重度和发展是异乎寻常的，其中已知细菌性病原体通常与

非典型肺炎有关。

新千年的第一次 SARS 大流行,感染了 8,422 人,916 人死亡[World Health Organization, Summary table of SARS by country, November 1, 2002 to August 7, 2003. Available at: <http://www.who.int/csr/sars/country/en/country2003-08-15.pdf>. 访问日期 September 30, 2003]。不断地从对该病毒特定血清转化的受试者中分离出一种新的 hSARS 病毒,并确定其在灵长类动物模型中繁殖 SARS[Fouchier RA 等人,"Aetiology: Koch's Postulates fulfilled for SARS virus."Nature 2003; 423: 240;Kuiken T 等人,"Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome."Lancet 2003; 362: 263-70]。尽管该大流行已经被成功地用隔离和感染控制措施来控制,但在野味动物中还存在该病毒[Guan Y 等人,"Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China."Science 2003; 302: 276-78] 而且该疾病的潜在的季节性还表明这样的流行病可能再次出现。由于所有年龄段都受到感染,且在老年人以及带有并发症的人中出现的高死亡率 [Donnelly CA 等人,"Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong."Lancet 2003; 361: 1767-72], 所以急需找到该病的治愈方法。

在 SARS 受试者的鼻咽分泌物中预期的临床和病毒携带研究表明病毒复制在症状发病之后第十天达到峰值[Peiris JS 等人,"Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study."Lancet 2003; 361: 1767-72]。这种病毒复制期后是病毒携带减少和具体中和抗体伴生出现的免疫控制阶段。然而由于在此免疫控制阶段期间肺泡损伤的扩散,大约三分之一受试者仍旧进入呼吸衰竭状态,这提出了部分损伤是与免疫调节障碍有关的[Nicholls JM 等人,"Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome."Lancet 2003 ; 361: 1773-8]。

目前,还没有可商业购买的对于 hSARS 病毒特制的抗病毒药。因此,急需寻找一种用于临床和毒性特性的药剂,以致可以通过流行病学方法、抗病毒预防或治疗和接种疫苗的方法实现 SARS 的随机安慰剂对照 (placebo control)。在上次 SARS 的流行期间,控制的唯一有

效手段是公共卫生方法，例如嫌疑病例的隔离、隔断接触、和对于高危个体例如护理工作人员的个人感染保护控制规程。急需发现具有可接受副作用特性的、有效的抗病毒药。在发展中国家，例如中国，具有抗病毒效果的可商业购买的西药的价格不太可能被大多数人承受。此外，中国大陆的 SARS 致死率只有 7%，与其它地区的 15 至 27% 相比具有一定的优势。如果在接下来的冬天重现该流行病，可以进行对照试验。

3. 发明概述

本发明部分地基于意外发现，该发现就是从中草药 *Scutellaria baicalensis* Georgi(中国名称：黄芩)中提取和纯化的生物学活性化合物黄芩苷和其衍生物对于那些感染人类及其它动物的冠状病毒菌株、尤其是至少 10 种 hSARS 病毒的菌株显示了有效的抗病毒活性，这些菌株属于冠状病毒科的巢状病毒目，所述发现基于中和试验和噬菌斑减少试验。这些菌株包括 M39849、M36871、M65189、M67349、M70221、M71749、M51776、M61576 和 M61565。在具体实施方案中，hSARS 病毒是 2003 年 4 月 2 日保藏在中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection)(CCTCC)的 hSARS 病毒，登记号码为 CCTCC-V200303。

据估计，当今使用和开处方的数以千计的药品中大约 50% 衍生自植物来源或含有植物化合物的化学模仿物(Mindell, E.R., Earl Mindell's Herb Bible, A Fireside Book(1992))。目前，许多医学制剂含有草药组分或草药的提取物。草药是小的、非木质的(即肉质茎)、一年生或多年生的种子植物，其所有地上部分在每个生长季节结束时枯萎。按照通常使用的和本文实际上应用的措辞，草药是具有医学用途的任何植物或植物部分。因此，术语“草药”也通常指的是用于获得治疗提取物的种子、叶子、茎、花、根、浆果、茎皮或任何其它植物部分。

草药已经用于治疗各种人类和动物的疾病，并且其许多形式都是可获得的，包括胶囊、片剂或糖衣片剂；小丸；提取物或酞剂；粉末；新鲜或干燥的植物或植物部分；制备的茶类；汁液；乳膏剂和油膏；精油；或任何这些形式的联用。草药类药物可以通过各种方法的任一

种来给予，包括口服、直肠、胃肠外、肠内、透皮、静脉内、通过饲管和局部给予。

本发明涉及黄芩苷或其衍生物的纯化形式，其是从传统中国草药(例如 *Scutellaria baicalensis* Georgi, 中国名称：黄芩)中提取的。本发明公开了一种病毒治疗方法，该病毒属于冠状病毒科的巢状病毒目，例如 hSARS，该方法基于针对 hSARS 病毒呈现有效抗病毒活性的黄芩苷化合物。本发明可有效用于临床和科学研究的用途。

黄芩苷是天然存在的化合物，分子量为 446.38。它比许多现行抗病毒药的毒性小。本发明提出，黄芩苷和其衍生物代表了一类新的化合物，其具有研制用于治疗与属于冠状病毒科的巢状病毒目的病毒有关的疾病，例如 SARS 感染或其它相关感染的安全药品的可能性。

本文中使用的术语“黄芩苷化合物”是指黄芩苷和其衍生物，由式(I)表示，并且可以包括黄芩苷的原料、或提取物、它的衍生物或组分。在一个实施方案中，本发明的治疗方法提供了给予包含黄芩苷或其衍生物的治疗剂。在另一个实施方案中，该治疗剂另外包含类固醇或其它草药。在另一个实施方案中，本发明也提供了一种治疗方法，该治疗方法进一步包括给予受试者免疫原制剂和疫苗制品。在一个具体实施方案中，本发明的免疫原制剂或疫苗制品包括冠状病毒科的巢状病毒目中的减毒活病毒，其可以含有或者不含助剂或抗病毒药剂。在另一个具体实施方案中，本发明的免疫原制剂或疫苗制品包括冠状病毒科的巢状病毒目中的失活或死病毒，其可以含有或者不含助剂或抗病毒药剂。

在另一个方面，本发明提供了包括黄芩苷或其衍生物和药学可接受介质的药物组合物。在一个具体实施方案中，药学可接受的介质包括载体。在另一个具体实施方案中，药学可接受的介质包括非活性介质例如赋形剂。本发明也提供了含有本发明药物组合物的试剂盒。

3.1 定义

本文在非蛋白类似物的上下文中使用的术语“类似物”是指第二种有机或无机分子，其具有与第一种有机或无机分子类似或相同的功能，并且在结构上类似于第一种有机或无机分子。

本文中使用的术语“抗体 (antibody)”和“抗体 (antibodies)”指的是单克隆抗体、多克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、人

类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、骆驼化抗体、单域抗体、单链 Fvs(scFv)、单链抗体、Fab 片段、F(ab')片段、二硫化物-连接的 Fvs(sdFv) 和抗独特型(抗 Id)抗体(包括,例如,本发明抗体的抗 Id 抗体)、和上述任一项的表位结合片段。特别是,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即含有抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可以具有任何类型(例如, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 和 IgY)、类别(例如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 和 IgA2)或亚类。

本文中使用的术语“抗原性”是指物质(例如外源物质、微生物、药品、抗原、蛋白质、肽、多肽、核酸、DNA、RNA 等等)在特定生物体、组织和 /或细胞中引发免疫反应的能力。有时,术语“抗原性的”和术语“免疫原性的”同义。

本文中使用的术语“黄芩苷组合物”是指黄芩苷和其衍生物,由式 I 表示。

本文在非蛋白衍生物的上下文中使用的术语“衍生物”是指第二种有机或无机分子,其是基于第一种有机或无机分子的结构形成的。有机分子的衍生物包括但不局限于:改性分子,例如增加或取消羟基、甲基、乙基、羧基或氨基。有机分子也可以被酯化、烷基化和/或磷酸化。

本文中使用的术语“草药”和“草药的”指的是小的、非木质的(即肉质茎)、一年生或多年生的有种子植物,其所有地上部分在每个生长季节结束时枯萎。按照通常使用的和本文实际上应用的措辞,草药是具有医学用途的任何植物或植物部分。因此,术语“草药”也通常指的是用于获得治疗提取物的种子、叶子、茎、花、根、浆果、茎皮或任何其它植物部分。术语“草药的”用来指源自于一或多种药草,或以一或多种药草作为来源。

本文中使用的术语“严格条件下杂交”描述了杂交和洗涤的条件,在此条件下,具有至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%相互一致性的核苷酸序列典型地保持相互杂交。这种杂交条件描述在例如但不局限于下列中: **Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.(1989), 6.3.1-6.3.6.; Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science**

Publishing Co., Inc., N.Y.(1986), pp. 75-78, 和 84-87; 和 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.(1982), pp. 387-389, 且为本领域技术人员所熟知。严格杂交条件的优选的、非限制例子是：在 6X 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)、0.5% SDS 中、在大约 68℃ 杂交，然后在室温下在 2X SSC、0.5% SDS 中洗涤一或多次。严格杂交条件的另一个优选的、非限制例子是在 6X SSC 中、在大约 45℃ 杂交，然后在 0.2X SSC、0.1% SDS 中、在大约 50-65℃ 洗涤一或多次。

本文中使用的术语“免疫原性”是指物质(例如外源物质、微生物、药品、抗原、蛋白质、肽、多肽、核酸、DNA、RNA 等等)在生物体之内引起免疫反应的能力。免疫原性在一定程度上取决于所讨论物质的大小和在一定程度上取决于宿主分子与所述物质如何不同。高度保守的蛋白质往往具有更低的免疫原性。

本文中使用的术语“突变体”是指与野生型生物体相比较，生物体的核苷酸序列中存在突变。

本文中使用的术语“药理学活性剂”是指任何医学上有用的物质，包括任何治疗有利的物质，其可以与本发明的纯净黄芩苷或其衍生物或组合物组合使用，包括但不限于：杀病毒剂；杀微生物剂；抗生素；氨基酸；肽；维生素；蛋白质合成的辅因子；激素包括生长激素；内分泌组织；活细胞包括例如：干细胞、软骨细胞、骨髓细胞和实质细胞；合成剂；酶；生物相容的表面活性剂；抗原性药剂；生长因子包括但不限于：转化生长因子和胰岛素类生长因子；免疫抑制剂；和渗透增强剂。

本文中使用的术语“受试者”和“患者”可互换使用。本文中使用的术语“受试者(subject)”和“受试者(subjects)”指的是动物，优选哺乳动物，包括非灵长类(例如，牛，猪，马，山羊，绵羊，猫，狗，鼬，獾，兔，貉，麝猫，鸟类物种和啮齿类)和灵长类(例如猴子例如猕猴和人类)，且更优选人类。

本文中使用的术语“变异体”是指 hSARS 病毒的天然存在的遗传突变体，或 hSARS 病毒的重组制备的变异形式，与 CCTCC-V200303 的 hSARS 病毒相比，每一个在其基因组中都含有一或多个突变。术语“变异体”也可以指所给定肽的天然存在的变异形式、或所给定肽或蛋白质的重组制备的变异形式，其中一个或多个氨基酸残基已经通过

氨基酸取代、增加或者取消而改变。

本文中使用的术语“介质”是指便于与其混合的药品、染料、或其它材料使用的物质。The New Oxford American Dictionary(2001).

本文中使用的术语“载体”是指用于承载或输送另一物质例如染料、催化剂或放射性物质的物质。The New Oxford American Dictionary(2001).

本文中使用的术语“赋形剂”是指非活性物质，其作为药品或其它活性物质的介质或媒介物。The New Oxford American Dictionary(2001). 赋形剂是惰性物质，其通常用作药品的稀释剂、介质、防腐剂、粘结剂或稳定剂，包括但不限于：蛋白质(例如，血清清蛋白等等)，氨基酸(例如，天冬氨酸，谷氨酸，赖氨酸，精氨酸，甘氨酸，组氨酸，等等)，脂肪酸和磷脂(例如，烷基磺酸酯，辛酸酯，等等)，表面活性剂(例如，SDS，聚山梨酸酯，非离子型表面活性剂，等等)，糖类(例如，蔗糖，麦芽糖，海藻糖，等等)和多元醇(例如，甘露糖醇，山梨糖醇，等等)。参见 Joseph P. Remington, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA), 在此引入其全部内容。

本文中使用的术语“ $-(C_1-C_{10})$ 烷基”是指具有 1 至 10 个碳原子的饱和直链或支链的非环烃。代表性的饱和直链 $-(C_1-C_{10})$ 烷基包括-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、-正己基、-正庚基、-正辛基、-正壬基和-正癸基。代表性的饱和支链 $-(C_1-C_{10})$ 烷基包括-异丙基，-仲丁基，-异丁基，-叔丁基，-异戊基，-2-甲基丁基，-3-甲基丁基，-2,2-二甲基丁基，-2,3-二甲基丁基，-2-甲基戊基，-3-甲基戊基，-4-甲基戊基，-2-甲基己基，-3-甲基己基，-4-甲基己基，-5-甲基己基，-2,3-二甲基丁基，-2,3-二甲基戊基，-2,4-二甲基戊基，-2,3-二甲基己基，-2,4-二甲基己基，-2,5-二甲基己基，-2,2-二甲基戊基，-2,2-二甲基己基，-3,3-二甲基戊基，-3,3-二甲基己基，-4,4-二甲基己基，-2-乙基戊基，-3-乙基戊基，-2-乙基己基，-3-乙基己基，-4-乙基己基，-2-甲基-2-乙基戊基，-2-甲基-3-乙基戊基，-2-甲基-4-乙基戊基，-2-甲基-2-乙基己基，-2-甲基-3-乙基己基，-2-甲基-4-乙基己基，-2,2-二乙基戊基，-3,3-二乙基己基，-2,2-二乙基己基，-3,3-二乙基己基等等。

本文中使用的术语“ $-(C_2-C_{20})$ 链烯基”是指具有 2 至 10 个碳原子并且包括至少一个碳-碳双键的直链或支链的非环烃。代表性的直链和

基, -1,2,7,8-四氢萘基等等。

本文中使用的术语“ $-(C_8-C_{14})$ 三环烯基”是指在每个环中具有至少一个碳-碳双键和具有 8 至 14 个碳原子的三环烃环系统。代表性的 $-(C_8-C_{14})$ 三环烯基包括-蒽基, -菲基, -phenalenyl, -醋萘基, -as-indacenyl, -s-indacenyl 等等。

本文中使用的术语“ $-(C_{14})$ 芳基”是指 14 元芳香碳环部分, 例如蒽基和菲基。

本文中使用的术语“ $-(3\text{-至 } 5\text{-元})$ 杂环 (heterocycle)”或“ $-(3\text{-至 } 5\text{-元})$ 杂环 (heterocyclo)”是指 3 至 5 元单环杂环, 其是饱和、不饱和、非芳香或芳香的。3 或 4 元杂环可以含有至多 3 个杂原子, 5 元杂环可以含有至多 4 个杂原子。每个杂原子独立地选自氮, 其可以是季铵化的; 氧; 和硫, 包括亚砷和砷。所述 $-(3\text{-至 } 5\text{-元})$ 杂环可以通过任一杂原子或碳原子相连接。代表性的 $-(3\text{-至 } 5\text{-元})$ 杂环包括咪喃基, 噻吩基, 吡咯基, 噁唑基, 咪唑基, 噻唑基, 异噁唑基, 吡唑基, 异噻唑基, 三嗪基, 吡咯烷酮基, 吡咯烷基, 乙内酰脲基, 氧杂环丙基, 氧杂环丁烷基, 四氢咪喃基, 四氢噻吩基等等。

本文中使用的术语“ $-\text{CH}(\text{卤})_2$ ”是指其中甲基的两个氢被卤素取代的甲基。代表性的 $-\text{CH}(\text{卤})_2$ 基团包括 $-\text{CHF}_2$, $-\text{CHCl}_2$, $-\text{CHBr}_2$, $-\text{CHBrCl}$, $-\text{CHClI}$ 和 $-\text{CHI}_2$ 。

本文中使用的术语“ $-\text{C}(\text{卤})_3$ ”是指其中甲基的每个氢都被卤素取代的甲基。代表性的 $-\text{C}(\text{卤})_3$ 基团包括 $-\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2\text{Cl}$, $-\text{CCl}_3$, $-\text{CBr}_3$, $-\text{CFBr}_2$ 和 $-\text{Cl}_3$ 。

本文中使用的术语“反离子”是指带正电荷的部分, 包括铵和碱金属例如钠、钾和锂的阳离子; 碱土金属例如钙和镁的阳离子; 其他金属例如铝和锌的阳离子; 有机胺, 例如未取代或羟基-取代的单、二或三烷基胺; 二环己基胺; 三丁胺; 吡啶; N-甲基-N-乙基胺; 二乙胺; 三乙胺; 单、二或三-(2-羟基-低级烷基胺), 例如单、二或三-(2-羟乙基)胺、2-羟基-叔丁胺或三-(羟甲基)甲胺; N,N-二-低级烷基-N-(羟基低级烷基)-胺, 例如 N,N-二甲基-N-(2-羟乙基)胺或三(2-羟乙基)胺; N-甲基-D-葡萄糖胺; 和氨基酸例如精氨酸、赖氨酸等等的阳离子。

本文中所使用的术语“卤素”包括 F、Cl、Br 和 I。

本文中使用的短语“药学可接受的盐”是由酸和一种式(I)化合物

的碱性氨基团形成的盐。例证性的盐包括但不局限于：硫酸盐，柠檬酸盐，乙盐酸，草酸盐，氯化物，溴化物，碘化物，硝酸盐，硫酸氢盐，磷酸盐，酸式磷酸盐，异烟酸盐，乳酸盐，水杨酸盐，酸式柠檬酸盐，酒石酸盐，油酸盐，丹宁酸盐，泛酸盐，酒石酸氢盐，抗坏血酸，琥珀酸盐，马来酸盐，龙胆酸盐，富马酸盐，葡糖酸盐，葡糖醛酸盐，糖酸盐，蚁酸盐，苯甲酸盐，谷氨酸盐，甲磺酸盐，乙磺酸盐，苯磺酸盐，对-甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即，1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。术语“药学可接受的盐”也指由具有酸性官能团例如羧酸官能团的式(I)化合物与药学可接受的无机或有机碱制备的盐。合适的碱包括，但不局限于：碱金属例如钠、钾和锂的氢氧化物；碱土金属例如钙和镁的氢氧化物；其它金属例如铝和锌的氢氧化物；氨和有机胺，例如未取代或羟基-取代的单、二或三烷基胺；二环己基胺；三丁胺；吡啶；N-甲基-N-乙基胺；二乙胺；三乙胺；单、二或三-(2-羟基-低级烷基胺)，例如单、二或三-(2-羟乙基)胺、2-羟基-叔丁胺或三-(羟甲基)甲胺，N,N-二-低级烷基-N-(羟基低级烷基)-胺，例如 N,N-二甲基-N-(2-羟乙基)胺或三(2-羟乙基)胺；N-甲基-D-葡糖胺；和氨基酸例如精氨酸、赖氨酸等等。

4. 附图的说明

图 1 显示了黄芩苷的化学结构。

图 2 显示了使用所选择的具有抗病毒活性的化合物来进行体外噬菌斑减少试验的结果。结果用噬菌斑减少的百分数来表示，其中将源于阳性对照(没有加入药品)的噬菌斑形成单位(PFU)数目的减少百分比定为 0%。

图 3 显示了用制备 HSCCC 纯化的黄芩苷的 HPLC 色谱图：1 = 黄芩苷。实验条件：柱--反相对称 C₁₈ 柱(150 X 3.9 mm i.d., 5 μ m)；柱温--30 $^{\circ}$ C；流动相--0.1%磷酸(A)和乙腈(B)，线性梯度洗脱—15 分钟内从 A-B(75 : 25, v / v)变至 A-B(45 : 55, v / v)，然后立刻变至初始条件 A-B(75 : 25, v / v)；流速--1.0 ml min⁻¹；检测--277 nm；注射体积--20 μ l。使用 HSCCC 的第一次分离产生 82.0%纯度的黄芩苷。

图 4 显示用制备 HSCCC 第二次纯化黄芩苷的 HPLC 色谱图，其产生具有 96.5%纯度的黄芩苷。

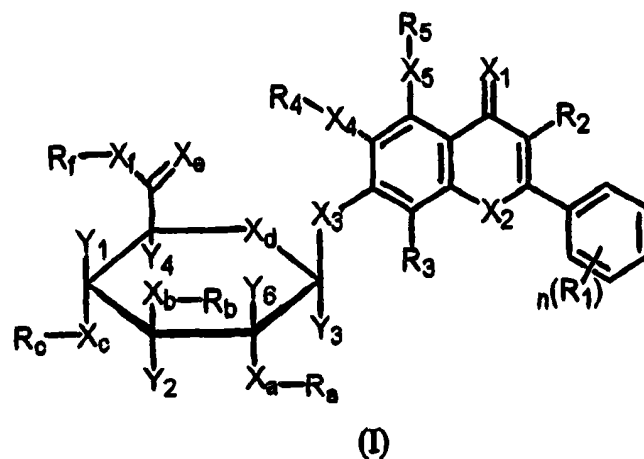
5. 发明的详细说明:

本发明涉及可用于治疗人和其它动物中与冠状病毒科的巢状病毒目有关的疾病例如严重急性呼吸综合症(SARS)的治疗剂。本发明的治疗剂涉及黄芩苷和其衍生物的高纯度形式,其是从中国药用植物 *Scutellaria baicalensis* Georgi(中国名称:黄芩)中提取并纯化的,其针对感染人类的冠状病毒科的成员显示了有效的抗病毒活性;特别是导致人类严重急性呼吸综合症(SARS)的病毒(“hSARS 病毒”)。本发明也涉及一种治疗方法,该方法使用包含黄芩苷的治疗法,用于治疗、改善、控制或预防与感染动物(至少包括人类)的冠状病毒成员有关的疾病;特别是 hSARS 病毒菌株的冠状病毒成员。

5.1 包括黄芩苷和/或其衍生物的治疗剂

黄芩苷是从传统中国药草(例如 *Scutellaria baicalensis* Georgi, 中国名称:黄芩)提纯的天然存在的化合物,已知其具有抗菌活性。黄芩苷是用于抗病毒预防或治疗的价格比较低廉的替换物。

本发明包括黄芩苷和其衍生物,即式(I)的化合物:



其中

每个 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_a 、 X_b 、 X_c 、 X_d 、 X_e 和 X_f 独立地是 O 或 S;

每个 R_4 、 R_5 、 R_a 、 R_b 和 R_c 独立地是 H、任选被 1-5 个 R_y 基团取

代的(C₁-C₁₀)烷基, 或(C₁-C₁₀)烷基-O-(C₁-C₁₀)烷基, 其中每个(C₁-C₁₀)烷基任选被 1-5 个 R_y 基团取代;

每个 R_y 独立地是 R_q 或-(C₂-C₁₀)链烯基、-(C₂-C₁₀)炔基、-(C₃-C₁₀)环烷基、-(C₈-C₁₄)二环烷基、-(C₈-C₁₄)三环烷基、-(C₅-C₁₀)环烯基、(C₈-C₁₄)二环烯基、-(C₈-C₁₄)三环烯基、-苯基、-萘基或-(C₁₄)芳基, 其中每个是未取代的或被一个或多个 R_z 基团取代;

每个 R₁、R₂ 和 R₃ 独立地是 R_q 或-(C₁-C₁₀)烷基、-(C₂-C₁₀)链烯基、-(C₂-C₁₀)炔基、-(C₃-C₁₀)环烷基、-(C₈-C₁₄)二环烷基、-(C₈-C₁₄)三环烷基、-(C₅-C₁₀)环烯基、(C₈-C₁₄)二环烯基、-(C₈-C₁₄)三环烯基、-苯基、-萘基或-(C₁₄)芳基, 其中每个是未取代的、被一个或多个 R_q 基团取代、被一个或多个 R_z 基团取代、或被一个或多个 R_q 基团和一个或多个 R_z 基团取代;

R_f 是 H、任选被 1-5 个 R_y 基团取代的(C₁-C₁₂)烷基、(C₁-C₁₂)烷基-O-(C₁-C₁₂)烷基, 其中每个(C₁-C₁₂)烷基任选被 1-5 个 R_y 取代, 或是反离子;

每个 R_q 独立地是 CN, OH, 卤素, N₃, NO₂, N(R_z)₂, =NR_z, CH=NR_z, NR_zOH, OR_z, COR_z, C(O)OR_z, OC(O)R_z, OC(O)OR_z, SR_z, S(O)R_z 或 S(O)₂R_z;

每个 R_z 独立地是-(C₁-C₆)烷基、-(C₂-C₆)链烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₃-C₈)环烷基、-(C₅-C₈)环烯基、-苯基、-(3-至 5-元)杂环、C(卤)₃ 或 -CH(卤)₂; 和

n 是 0、1、2、3、4 或 5。

某些式(I)的化合物可以具有不对称中心, 并因此存在不同的对映体和非对映体形式。式(I)的化合物可以是旋光异构体或非对映体的形式。相应地, 本发明包括其旋光异构体、非对映体和混合物形式的式(I)的化合物和其用途, 如本文所描述的那样, 其中所述混合物包括外消旋混合物。

式(I)化合物的一个或多个氢、碳或其它原子可以被氘、碳或其它原子的同位素替代。包括在本发明中的这种化合物, 在代谢药物动力学研究和结合试验中作为研究和诊断手段是有用的。

在一个优选实施方案中, X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X_a、X_b、X_c、X_d、X_e 和 X_f 的一个或多个是 O。

在另一个优选实施方案中， R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_f 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 的一个或多个是H。

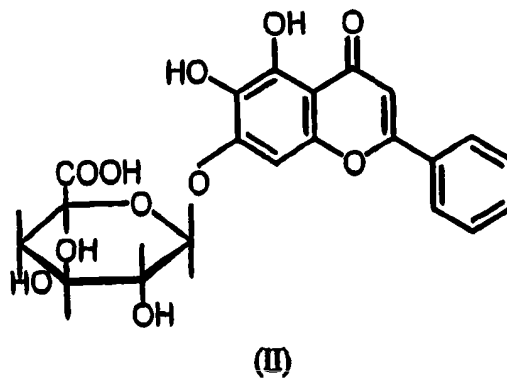
在另一个优选实施方案中， Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 和 Y_6 的一个或多个是H。

在另一个优选实施方案中， Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 和 Y_6 的一个或多个是 CH_3 。

在另一个优选实施方案中， R_1 是 CH_3 。

在另一个优选实施方案中， n 是5。

在另一个优选实施方案中，本发明的治疗剂包括由下式(II)表示的黄芩苷：



尽管口服 1.5 mg 剂量的黄芩苷仅仅达到 $0.47 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的血清浓度，但静脉内给予人类 360 mg 剂量的黄芩苷可以达到 $74 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的峰值血清浓度。因此在发展中国家的随机化安慰剂对照试验中应该考虑静脉内给予黄芩苷的治疗方式，在这些国家，这种制剂是可得到且可承受的。

可用于本发明的黄芩苷组合物可以通过各种方法制备，例如通过提取、与水沸腾、溶解在有机溶剂例如醇中、使用色谱方法的分离技术和超临界 CO_2 流体提取等等。在一个实施方案中，黄芩苷组合物可以通过提取黄芩苷或其衍生物的原料来制备。例如，可以首先收集原料。任选地，提取之前可以对这种原料进行清洁或干燥或两种操作都进行。然后将原料加工，获得黄芩苷组合物。例如（不是限制），包含黄芩苷组合物的粉末可以与水沸腾并过滤。然后向滤液中加入水至所需要的浓度，然后将制剂消毒并用于注射。

在另一个实施方案中,黄芩苷组合物可以通过在醇例如乙醇中浸泡来制备,其中在乙醇中的浸泡时间应该足够长,以从黄芩苷组合物的原料中将其释放出来。应理解,制备黄芩苷组合物的其它方法在本发明范围内。

进一步的,属于 *Scutellaria baicalensis* Georgi 植物的提取物可以有利地从这些植物的成熟形式中获得,但还可以从干燥的成熟果实中提取。属于 *Scutellaria baicalensis* Georgi 植物的提取物可以从这些植物的种子、花、茎、叶子和/或根获得。

当制备属于 *Scutellaria baicalensis* Georgi 植物的提取物时,可使用提取植物来源的提取物所通常使用的任何方法。也就是说,属于 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的植物可以在新鲜状态下用溶剂提取,或如果需要的话,可以干燥,然后按原状使用或研磨形成粉末。用于提取的溶剂可以是任何常规的溶剂,这种溶剂通常在从植物中提取植物组分时使用,并没有特别限制。

例如,源于 *Scutellaria baicalensis* Georgi 植物物质例如果实、种子、叶子、花、茎或根的提取物,可以是水/水-互溶的有机溶剂提取物。最终使用的有机溶剂不能将本发明的活性组分黄芩苷破坏。例如,一些组分可以在水中仅仅是微溶的。水与水-可互溶的有机溶剂的比例通常为 0.5%至 70% v/v 水-可互溶的有机溶剂(例如甲醇,乙醇,丙醇,丙二醇,赤藓醇,丁醇,丁二醇,乙腈,乙二醇,缩水甘油,甘油二羟基丙酮或丙酮)。

在这点上,提取物可以通过将 *Scutellaria baicalensis* Georgi 植物物质与水/水-可混溶溶剂混合物接触来制备。一般地说,接触时间间接地与混合物的温度成正比。混合物的温度可以在例如从环境温度到沸点温度的范围。接触时间可以在例如 5 分钟至几天之间。

通过标准方法,可以从提取物中除去不希望有的组分,以得到本文中使用的最终的 *Scutellaria baicalensis* Georgi 植物提取物。实例包括色谱技术,例如制备性高效液相色谱法(HPLC),使用 UV 检测。色谱介质的例子包括无机材料,例如多孔硅胶;可控孔度玻璃磷灰石,氟磷灰石,氧化铝,复合材料例如涂层硅胶和涂层聚苯乙烯;和合成聚合物例如聚丙烯酰胺,聚甲基丙烯酸酯和聚苯乙烯。色谱分离的溶剂相可以是有机溶剂例如甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、戊醇、丙酮、丁酮、

氯仿、二氯甲烷、二氯乙烷、二氯丁烷、乙酸乙酯、醚或二甲基亚砷，其可以用来溶解提取物。

在一个具体实施方案中，通过如下文献所述的高速逆流色谱法(HSCCC)从 *Scutellaria baicalensis* Georgi 中分离和提纯黄芩苷 "Application of high-speed counter-current chromatography to the preparative separation and purification of baicalin from the Chinese medicinal plant *Scutellaria baicalensis*" (Lu 等人, 2003, J Chromatogr A 1017 : 117-123), 在此引入其全部内容作为参考。因此，在一个优选实施方案中，本发明提供了基本上由黄芩苷或式(II)代表的化合物组成的化合物。本文中使用的术语“基本上由黄芩苷或式(II)代表的化合物组成”是指纯化的黄芩苷，具有至少大约 80%、至少大约 82%、至少大约 84%、至少大约 85%、至少大约 86%、至少大约 88%、至少大约 90%、至少大约 92%、至少大约 94%、至少大约 95%、至少大约 96%、至少大约 97%、至少大约 98%、或至少大约 99% 纯度。参见下面图 3 和 4 和部分 6。

获得式(I)范围内化合物的方法是受益于本公开内容的本领域技术人员所熟知的。更特别地，式(I)范围内的任一化合物可以以有用的形式、在使用 HSCCC 纯化黄芩苷以后通过在获得黄芩苷本身所描述的方法内对黄芩苷进行适当改变加以获得，所述方法例如本领域普通技术人员所熟知的那些黄芩苷的提取和/或简单的化学改性。

在另一个实施方案中，黄芩苷组合物可以通过黄芩苷与一或多种药学可接受的介质例如载体、赋形剂、助剂和 /或稀释剂混合来制备。

此外，本发明提供了包含本发明化合物和另外的抗病毒药剂与一或多种药学可接受介质的药物组合物。本发明也提供了包含本发明化合物的药物组合物，和进一步提供包含其它草药和任选的类固醇的其它药物组合物。本发明还提供了包含本发明药物组合物的试剂盒。

5.2 治疗与冠状病毒科的巢状病毒目有关的疾病的方法

本发明的方法涉及治疗与属于冠状病毒科的巢状病毒目的病毒有关的疾病，这种病毒感染人类及其它动物。所述病毒可以包括在严格条件下与该序列杂交的核酸序列。

在另一个实施方案中，本发明的方法提供了黄芩苷和/或其药学可

接受的衍生物和/或盐的用途。该方法可以进一步包括疫苗制剂的共同给予，这种疫苗制剂包含属于冠状病毒科的巢状病毒目的病毒，包括所述病毒的重组体和嵌合形式，或所述病毒的亚单位。在一个具体实施方案中，所述疫苗制品包括属于冠状病毒科的巢状病毒目中的减毒活病毒，其可以含有或者不含有药学可接受的赋形剂，包括助剂。在另一个具体实施方案中，疫苗制品包括属于冠状病毒科的巢状病毒目中的失活或死病毒，其可以含有或者不含有药学可接受的赋形剂，包括助剂。

在具体实施方案中，本发明的方法对于包括保藏在 GenBank®、具有下列登记入册号的序列的 hSARS 病毒是有效的： NC.004718, AY304495, AY304494, AY304493, AY304492, AY304491, AY304490, AY304489, AY304488, AY304487, AY304486, AY360146, AY278491, AY310120, AY278489, AY362699, AY362698, AY283798, AY283797, AY283796, AY283795, AY283794, AY268070, AY278741, AY340092, AY351680, AP006561, AP006560, AP006559, AP006558, AP006557, AY278554, AY348314, AY338175, AY338174, AY323977, AY322199, AY322198, AY322197, AH013000, AY322208, AY322207, AY322206, AY322205, AH012999, AY321118, AY323976, AY323975, AY323974, AY286320, AY290752, AY291315, AY307165, AY279354, AY278490, AY278487, AY297028, AY286402, AY274119, AY291451, AY271716, AY282752, AY278488, AY268049, AY269391, 本文全部引入所有内容作为参考。

此外，本发明提供了治疗、改善、控制或预防冠状病毒所引起的疾病包括 SARS 的方法，该方法单独给予本发明的黄芩苷和/或其药学可接受的衍生物和/或盐和疫苗制剂或抗体、或在与其它草药组合物、抗病毒药(例如，氨基三环癸烷，金刚乙胺，更昔洛韦，无环鸟苷，病毒唑，喷昔洛韦，奥塞米韦，膦甲酸，叠氮胸苷(AZT)，双脱氧胸苷(ddI)，拉米夫定(3TC)，扎西他滨(ddC)，司他夫定(d4T)，内维拉平，地拉韦啉，引哚那韦，利托那韦，阿糖腺苷，奈非那韦，沙奎那维，扎那米韦，奥赛他米韦，普拉康纳利，干扰素等等，以及与目标病毒免疫特异性结合的抗体)、类固醇和皮质类固醇例如强的松、可的松、氟替卡松和糖皮质激素、抗生素、镇痛药、支气管扩张药、或用于呼吸和/或

病毒感染的其它治疗药的组合中给予。所述疫苗制剂、抗体、草药组合物、抗病毒素、类固醇、皮质类固醇、抗生素、镇痛药、支气管扩张药及用于呼吸道感染的其它治疗剂可以同时或顺序共同给予。

本发明提供了对与感染动物(至少包括人类)的冠状病毒科的巢状病毒目有关的疾病的治疗、改善、控制和预防。在具体实施方案中,病毒是 hSARS 病毒。本发明也涉及静脉内、直肠、胃肠外、肠内、透皮、通过饲管和局部给予黄芩苷。

5.3 疫苗

本发明也提供了用于预防和治疗感染的疫苗制剂,此外还给予包括黄芩苷和/或其衍生物的治疗化合物。在某些实施方案中,本发明的疫苗包括 hSARS 病毒。在某些实施方案中,所述病毒是减活的、失活的或死病毒。

在某些实施方案中,本发明的疫苗进一步包括 SARS 病毒的重组体和嵌合病毒。在某些实施方案中,病毒是减活的、失活的或死病毒。在其它实施方案中,本发明的黄芩苷组合物在与一或多种类固醇组合使用,以治疗由属于冠状病毒科的巢状病毒目的病毒例如 hSARS 病毒所引起的疾病。

在本发明此方面的另一个实施方案中,灭活疫苗制剂可以使用传统方法杀死嵌合病毒来制备。在它们的传染性已经被破坏的定义上来说,灭活疫苗是“死的”。理想地,病毒的传染性遭到破坏,但没有影响其免疫原性。为了制备灭活疫苗,所述嵌合病毒可以在细胞培养物或鸡胚的尿囊中生长,通过区域超速离心法纯化,通过甲醛或 β -丙内酯失活,并收集。得到的疫苗通常肌肉内接种。

失活病毒可以用适当的助剂配制,以提高免疫反应。这种助剂可以包括但不局限于无机物凝胶,例如,氢氧化铝;表面活性物质例如溶血卵磷脂,普流罗尼多元醇,多阴离子;肽;油乳化液;和可能有效的人用助剂例如 BCG 和短小棒状杆菌。

本发明的疫苗可以是多价或单价的。多价疫苗从指导一个以上抗原表达的重组病毒制造。

在另一个方面,本发明的方法也提供了与黄芩苷和/或其衍生物组合给予 DNA 疫苗制剂,该 DNA 疫苗制剂包括核酸或 hSARS 病毒的片

段。在另一个具体实施方案中，可用于本发明的 DNA 疫苗制剂包括编码抗体的核酸或其片段，该抗体免疫特异地结合 hSARS 病毒。在 DNA 疫苗制剂中，疫苗 DNA 包括病毒载体，例如来源于 hSARS 病毒、细菌质粒或其它表达载体的病毒载体，其带有包括本发明的核酸分子的插入物，与一或多种控制元件可操作地相连接，从而允许在预防接种受试者中由所述核酸分子编码的预防接种蛋白质进行表达。这种载体可以通过重组 DNA 技术以带有 hSARS 病毒的核酸分子的重组体或嵌合病毒载体的形式制备。

许多方法可以用来引入如上所述疫苗制剂。这些方法包括但不局限于：口服、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内途径和通过破皮法(划去皮肤的表层，例如使用叉状的针)。

给予疫苗的患者优选哺乳动物，最优选人类，但还可以是非人类的动物，包括但不局限于牛、马、羊、猪、兔、浣熊、貉、鼬、獾、麝猫、鸟类、家禽(例如小鸡)、山羊、猫、狗、仓鼠、小鼠和大鼠。

5.4. 确定作为治疗剂的黄芩苷和其衍生物的效果和剂量的试验

本发明的具体治疗对于治疗 SARS 是否有效，可以通过任何本领域已知的方法来确定，例如但不局限于本节中描述的那些方法。

所建议的治疗方法的安全性及效果可以在动物的系统医学和生物学测定、急性和系统毒性的毒理学分析、组织学研究和功能检查、和具有各种 SARS 适应症的受试者的临床评价期间进行试验。

本发明方法的效果可以在合适的动物模型、在人类的临床试验中通过本领域已知的任何方法来试验。例如，可以针对本发明的方法所用来治疗的 SARS 的任何指标来对受试验的动物或人受试者加以评价。本发明方法治疗 SARS 的效果可以在治疗之前、期间或之后，以合适的时间间隔通过测量受试验动物模型或人受试者中的 hSARS 病毒的核酸分子、蛋白质水平来评价。可以识别任何变化或不变化，以及使其与受试者的治疗效果相互关联。

本发明提供了鉴别化合物的方法，该化合物可以抑制 hSARS 病毒感染宿主或宿主细胞的能力。在某些实施方案中，本发明提供了鉴别可以降低 hSARS 病毒在宿主或宿主细胞中复制的能力的黄芩苷衍生物的方法。可使用对于熟练技术人员来说熟知的任何技术来筛选黄芩苷

衍生物，所述黄芩苷衍生物可以消除或降低 hSARS 病毒感染宿主和/或在宿主或宿主细胞中复制的能力。

在某些实施方案中，本发明提供了鉴别化合物的方法，该化合物可以抑制 hSARS 病毒在哺乳动物或哺乳动物细胞中复制的能力。更具体地说，本发明提供了鉴别化合物的方法，该化合物可以抑制 hSARS 病毒感染哺乳动物或哺乳动物细胞的能力。在某些实施方案中，本发明提供了鉴别化合物的方法，该化合物可以抑制 hSARS 病毒在哺乳动物细胞中的复制能力。在一个具体实施方案中，所述哺乳动物细胞是人类的细胞。

在另一个实施方案中，细胞接触试验化合物并感染了 hSARS 病毒。在某些实施方案中，在没有试验化合物的情况下，对照培养物感染上 hSARS 病毒。细胞可以在感染上 hSARS 病毒之前、同时、或之后接触试验化合物。在一个具体实施方案中，所述细胞是哺乳动物细胞。在一个更加具体的实施方案中，所述细胞是人类的细胞。在某些实施方案中，将细胞用试验化合物培养至少 1 分钟、至少 5 分钟、至少 15 分钟、至少 30 分钟、至少 1 小时、至少 2 小时、至少 5 小时、至少 12 小时或至少 1 天。病毒的效价可以在试验期间的任何时间测量。在某些实施方案中，测定培养物中的病毒生长的时间过程。如果在试验化合物的存在下病毒生长得到抑制或降低，那么可以确定试验化合物对于抑制或降低 hSARS 病毒的生长或感染是有效的。在一个具体实施方案中，对于抑制或降低 hSARS 病毒生长的化合物，测试其抑制或降低其它病毒生长速率的能力，以试验其对于 hSARS 病毒的特异性。

在一个实施方案中，将试验化合物给予动物，并使该动物感染 hSARS 病毒。在某些实施方案中，在不给予试验化合物的情况下，对照动物感染上 hSARS 病毒。可以在感染上 hSARS 病毒之前、同时、或之后给予试验化合物。在一个具体实施方案中，所述动物是哺乳动物。在一个更加具体的实施方案中，模型动物可以是但不局限于：棉鼠、小鼠或猴子。模型动物中的病毒的效价可以在试验期间的任何时间测量。在某些实施方案中，测定培养物中的病毒生长的时间过程。如果在试验化合物的存在下病毒生长得到抑制或降低，那么可以确定试验化合物对于抑制或降低 hSARS 病毒的生长或感染是有效的。在

一个具体实施方案中，对于抑制或降低动物中的 hSARS 病毒生长的化合物，测试其抑制或降低其它病毒生长速率的能力，以试验其对于 hSARS 病毒的特异性。

本发明治疗剂的效果和剂量可以如下文部分 6 中所示来确定。该方法需要(1)中和试验和(2)噬菌斑减少试验。用于体外抗病毒易感性试验的方法如下：抗原型 hSARS 病毒的体外易感性实验在用恒河猴胎肾-4 细胞播种的 96 孔微滴定平皿中进行。将抗病毒药的两倍稀释物以一式四份对 hSARS 病毒的 100 TCID₅₀ 加以测试，从在最大治疗剂量之后大于峰值血清浓度的 4 倍开始，至小于波谷血清浓度的四分之一。含有药品但没有病毒接种的一套相应的细胞对照组应该用作药物毒性的对照组。

然后应在 48 小时和 72 小时处记录细胞的细胞病变效应(CPE)的抑制作用。还可以将它们的抗病毒活性在 fRHK-4 和 Vero-E6 细胞系二者中加以比较。那些可能具有临床上显著抑制活性的应该通过噬菌斑减少试验加以测试。

对于噬菌斑减少试验，有必要准备具有在含有 10%胎牛血清(FCS)的 1.0 毫升最低必需培养基(MEM)中的融合细胞单层 (1×10^5 细胞每孔)的 24-孔组织培养平皿。吸出介质之后，应该向每个孔中加入与 SARS 有关的冠状病毒的 50-100 噬菌斑形成单位(PFU)(在 1%FCS / MEM 中，含有合适浓度的抗病毒剂)。应将平皿在 37℃下在 5% CO₂ 中培养 2 小时。吸出接种物，向每个孔中加入 1.0 毫升的覆盖层(在 1% FCS / MEM 中的 1.0%低熔点琼脂糖，带有相应的药品稀释物)。

应将平皿在 37℃下在 5% CO₂ 中进一步培养 48 小时。然后将细胞通过加入 2 毫升 10%甲醛并在室温下将平皿培养 2 小时固定。然后吸出琼脂糖填料，并将每个孔用 0.5%在 70%甲醇中制备的龙胆紫染色。将孔用水洗涤几次脱色之后，然后计算病毒噬菌斑的数量。

5.5 药物组合物和试剂盒

本发明包括药物组合物，其包括黄芩苷和/或其药学可接受的衍生物和/或盐。在其它实施方案中，本发明的治疗方法进一步包括给予抗病毒剂和/或类固醇。在一个具体的实施方案中，抗病毒剂是一种抗体，其可免疫特异性结合并中和冠状病毒或其变体，或任何起源于该病毒的蛋白质。当随后给予动物野生型病毒时，该病毒中和抗体可中和病

毒的传染性，并保护动物抵御疾病。

在另一个具体的实施方案中，抗病毒剂是 hSARS 病毒的多肽或核酸分子。该药物组合物具有作为抗病毒预防药的效用，可以给予已经接触或预计将接触病毒的受试者。

各种给药系统是已知的，并可被用于给予本发明的药物组合物，例如，封装在脂质体中，微粒，微胶囊，能够表达突变株病毒的重组细胞，受体介导的胞吞作用(见，例如，Wu 和 Wu, 1987, J.Biol. Chem. 262: 4429-4432)。引入方法包括但不局限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服的途径。该化合物可以通过任何方便的途径给予，例如通过输液或快速浓注，通过透过上皮或粘膜皮肤内层(例如，口腔粘膜，直肠和肠粘膜等等)的吸收，并可以与其它生物活性剂一起给予。给药可以全身或局部给药。在一个优选实施方案中，通过任何合适的途径将本发明的药物组合物引入肺中是合乎需要的。肺部给药还可以，例如，使用吸入器或喷雾器以及具有雾化剂的制剂进行。

在一个具体实施方案中，向需要治疗的区域局部给予本发明的药物组合物可能是合乎需要的；这可以通过以下方式实现，例如：但不是以限制的方式，在手术期间局部输液，局部施用，例如，在手术后与创伤敷料同时使用，通过注射，利用导管，利用栓剂，或利用植入物的方式，所述植入物是一种多孔的、无孔的或凝胶状的材料，包括膜，例如 sialastic 膜或纤维。在一个实施方案中，给药可以通过在感染组织部位(或早先的部位)直接注射进行。

在另一个实施方案中，药物组合物可以以小囊、尤其是脂质体的形式递送(参见 Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Treat 等人, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez Berestein and Fidler(eds.), Liss, New York, pp. 353-365(1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327; 通常见同上)。

在又一个实施方案中，药物组合物可以在可控释放系统中递送。在一个实施方案中可以使用泵(参见 Langer, supra ; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng 14: 201; Buchwald 等人, 1980, Surgery 88: 507; 和 Saudek 等人 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574)。在另一个实施方案中，可使用聚合材料(参见 Medical Applications of Controlled Release,

Langer and Wise(eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(eds.), Wiley, New York(1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61(1983); 参见 Levy et al., 1985, Science 228: 190; During 等人, 1989 Ann. Neurol. 25:351; Howard 等人, 1989 J. Neurosurg. 71:105)。在又一个实施方案中, 可以将可控释放系统放置在接近组合物的目标处, 即肺部, 因此仅仅需要系统剂量的一部分(参见, 例如, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp.115-138(1984))。

其它控制释放系统在 Langer 的综述中得到了讨论(Science 249: 1527-1533(1990))。

本发明的药物组合物包括治疗或预防有效量的黄芩苷或其药学可接受的衍生物或盐和药学可接受的载体。在一个具体实施方案中, 术语“药学可接受的”是指由联邦或州政府的管理机构认可的、或列于美国药典中、或其它通常认可的药典中, 用于动物且更特别用于人类。术语“载体”是指稀释剂、助剂、赋形剂、或介质, 其与药物组合物一起给予。这种药学载体可以是无菌的液体, 例如水和油类, 包括石油产品、动物、植物或合成源的那些, 例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等等。

当静脉内给予药物组合物时, 水是优选的载体。还可以使用盐溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液作为液体载体, 特别用于可注射的溶液。合适的药学赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等等。如果需要的话, 组合物还可以含有较小数量的湿润或乳化剂、或 pH 值缓冲剂。这些组合物可以是溶液、悬浮液、乳状液、片剂、药丸、胶囊、粉末、持续释放制剂等等的形式。可以将组合物使用传统的粘结剂和载体例如甘油三酯配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体例如药学级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等等。合适的药学载体的例子描述在 E.W. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。制剂应该适合给药方式。

在一个优选实施方案中,按照常用方法将组合物配制为适合于静脉内给予人类的药物组合物。一般地,用于静脉内给予的组合物是在无菌等渗含水缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂例如利多卡因,以在注射位点镇痛。通常,可以单独提供或在单位剂型中一起混合提供组分,例如作为在表明活性剂数量的密闭容器例如安瓿或者小囊(sachette)中的冷冻干燥的粉末或无水浓缩物。如果通过输液给予组合物,可以用含有无菌药理学级水或盐水的输液瓶将其配制。如果通过注射给予组合物,可以提供安瓿灭菌注射水或盐水,以使组分在给予之前可以混合。

可以将本发明的药物组合物配制为中性或盐形式。药学可接受的盐包括那些与游离氨基形成的盐,例如那些衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等等的盐,和那些与游离羧基形成的盐,例如那些衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等等的盐。

可有效预防(即预防有效量)和/或治疗(即治疗有效量)具体障碍或病症的本发明的药物组合物的量,取决于障碍或病症的性质,并且可以通过标准临床技术确定。此外,可以任选使用体外试验来帮助确定最佳的剂量范围。在制剂中使用的准确剂量还取决于给药途径和疾病或障碍的严重性,并且应该根据医师的判断和每个受试者的情况来决定。然而,静脉内给予的合适剂量范围通常每公斤体重大约为1-15毫克活性化合物。鼻内给予的合适剂量范围通常大约为0.01 pg/kg体重至1 mg/kg体重。在优选实施方案中,每个人每次治疗的剂量至少为100、200、300、400、500、600、700、1000mg。疗程可以每3、12、24、36、48小时一次。全部治疗周期可以是2、4、6、8、10、14、18、20、30天。有效剂量可以由源于体外或动物模型测试系统的剂量响应曲线来推断。

栓剂通常含有0.5%至10%重量范围的活性组分;口服制剂优选含有10%至95%活性组分。

本发明还提供了药学包装或试剂盒,其包括一个或多个容器,这些容器充满一或多种本发明药物组合物的组分。任选地,与这种容器相伴的可以由管理药物或生物制品的制造、使用或销售的政府办事处指定形式的注意事项,该注意事项反映了上述政府办事处对人给药的

制造、使用或销售的批准。在一个优选实施方案中，试剂盒含有本发明的抗病毒剂，例如黄芩苷和/或其衍生物，单独或与助剂、抗病毒剂、抗生素、镇痛药、支气管扩张药或其它药学可接受的赋形剂组合。

本发明进一步包括试剂盒，该试剂盒包括含有本发明药物组合物和使用说明书的容器。

5.6 基于 *Scutellaria baicalensis* Georgi 植物提取物的化合物在治疗方法中的效果的检测和确定的试验

本发明治疗方法的效果可以通过测定 hSARS 病毒的水平以及其它用于受试者的临床诊断标准来评估。用于检测生物样品中是否存在本发明多肽或核酸的示范性方法，包括由各种渠道获得生物样品并将样品与能够检测 hSARS 病毒的单抗原决定簇或核酸(例如 mRNA，基因组 DNA)的化合物或药剂接触，这样就可以检测样品中 hSARS 病毒的存在。用于检测本发明的 hSARS mRNA 或基因组 RNA 的优选药剂是能够与编码本发明多肽的 mRNA 或基因组 RNA 杂交的经标记的核酸探针。核苷酸探针可以是例如，包括或由任何足以在严格条件下与 hSARS mRNA 或基因组 RNA 进行特定杂交的 hSARS 病毒菌株的核苷酸序列构成的核酸分子。

用于检测 hSARS 病毒的优选药剂是特定结合本发明多肽或 hSARS 病毒的任何单抗原决定簇的抗体，优选具有可检测出的标记的抗体。抗体可以是多克隆的，或更优选单克隆的。可使用完整的抗体或其片段(例如 Fab 或 F(ab')₂)。

关于探针或抗体的术语“经标记的”，是指通过将可检测出的物质与探针或抗体偶联(即物理连接)实现的探针或抗体的直接标记，以及通过与另一个直接标记的试剂反应实现的探针或抗体的间接标记。间接标记的例子包括使用荧光标记的二级抗体和用生物素末端标记 DNA 探针来检测初级抗体，这样就可以将其用荧光标记的抗生物素蛋白链菌素来检测。可使用本发明的检测方法体外以及体内检测样品中的 mRNA、蛋白质(或任何单抗原决定簇)或基因组 RNA。例如，用于检测 mRNA 的体外技术包括 Northern 杂交、原位杂交、RT-PCR 和 RNase 保护。用于检测 hSARS 病毒的单抗原决定簇的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISAs)、Western 印迹、免疫沉淀法和免疫荧光。用于检测基因

组 RNA 的体外技术包括 Northern 杂交、RT-PCR 和 RNase 保护。此外，用于检测 hSARS 病毒的体内技术包括将针对多肽的标记抗体引入到受试者生物体中。例如，抗体可以用放射性标记物标记，放射性标记物在受试者生物体中的存在和位置可以通过标准影象技术包括自动射线照相术来检测。

在一个具体实施方案中，该方法进一步包括由对照受试者获得对照样品，将对照样品与能够检测 hSARS 病毒例如本发明的多肽或编码本发明多肽的 mRNA 或基因组 RNA 的化合物或药剂接触，这样就可以在样品中检测 hSARS 病毒或多肽或编码多肽的 mRNA 或基因组 RNA 的存在，并将对照样品中的 hSARS 病毒或多肽编码多肽的或 mRNA 或基因组 RNA 的存在与试验样品中的 hSARS 病毒或多肽或编码多肽的 mRNA 或基因组 DNA 的存在进行比较。

SARS 的疾病状态可以通过检测试验样品中的 hSARS 病毒或病毒的多肽或核酸存在的试剂盒来确定。该试剂盒例如可以包括能够检测试验样品中的 hSARS 病毒或多肽或编码多肽的核酸分子的经标记的化合物或药剂，和确定样品中的多肽或 mRNA 的量的工具(例如，结合多肽的抗体或与编码多肽的 DNA 或 mRNA 结合的寡聚核苷酸探针)。试剂盒还可以包括使用说明书。

对于基于抗体的试剂盒，试剂盒可以包括，例如：(1)第一抗体(例如，连接至固体载体)，其与本发明的多肽或 hSARS 病毒的单抗原决定簇结合；和任选的(2)不同的第二抗体，其或者与多肽或者与第一抗体结合，并且与可检测药剂结合。

对于基于寡聚核苷酸的试剂盒，试剂盒可以包括，例如：(1)寡聚核苷酸，例如可检测的经标记的寡聚核苷酸，其与编码本发明多肽的核苷酸序列或与 hSARS 基因组内的序列杂交，或(2)一对引物，用于放大含有 hSARS 序列的核酸分子。试剂盒还可以包括例如缓冲剂、防腐剂或蛋白质稳定剂。试剂盒还可以包括检测可检测药剂所必需的组分(例如，酶或底物)。试剂盒还可以含有一种对照样品或一系列对照样品，其可以进行试验并与含有的试验样品相比较。试剂盒的每个部分通常密封在独立的容器内，并且所有的各种容器与使用说明书一起包装在单独包装内。

确定基于 *Scutellaria baicalensis* Georgi 植物提取物的化合物在治

疗与冠状病毒科的巢状病毒目的病毒有关疾病的治疗方法中的效果的试验, 是基于测定黄芩苷衍生物化合物对于治疗、预防、改善或控制 SARS 症状的目标是否具有与黄芩苷相同的结合能力或亲合性。在某些实施方案中, 黄芩苷和/或其衍生物结合的目标是 hSARS 病毒的具有例如下列 GenBank® 登记入册号的核苷酸序列的核酸分子: NC-004718, AY304495, AY304494, AY304493, AY304492, AY304491, AY304490, AY304489, AY304488, AY304487, AY304486, AY360146, AY278491, AY310120, AY278489, AY362699, AY362698, AY283798, AY283797, AY283796, AY283795, AY283794, AY268070, AY278741, AY340092, AY351680, AP006561, AP006560, AP006559, AP006558, AP006557, AY278554, AY348314, AY338175, AY338174, AY323977, AY322199, AY322198, AY322197, AH013000, AY322208, AY322207, AY322206, AY322205, AH012999, AY321118, AY323976, AY323975, AY323974, AY286320, AY290752, AY291315, AY307165, AY279354, AY278490, AY278487, AY297028, AY286402, AY274119, AY291451, AY271716, AY282752, AY278488, AY268049, 或 AY269391, 其补充物, 或其片段, 或通过这种核苷酸序列编码的蛋白质或多肽片段, 和/或这种蛋白质/肽的类似物。

在某些实施方案中, 用于本发明方法的黄芩苷衍生物具有相似的离解常数、全部或部分的离子电荷。

许多试验可以用来确定黄芩苷衍生物的效果。这种试验的一个例子是结合试验。这种方法描述在许多文本中, 包括但不限于: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y.(1989), 6.3.1-6.3.6.; *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing Co., Inc., N.Y.(1986), pp. 75-78, and 84-87; 和 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.(1982), pp. 387-389, 且为本领域技术人员所熟知。

6. 实施例

从 10 个不同 SARS 患者中分离的十种 hSARS 病毒分离物列于表 1 中, 这些患者符合修订的 WHO 的 SARS 标准。

表 1

受试者编号	分离物编号	临床样本	性别/年龄	症状开始后样本的天数	RT-PCR 结果	症状开始后血清转化的天数	通过免疫-荧光染色测定的抗体效价	医院
1	M39849	肺组织 * 活检	M/54	9	阳性	9	1:160	KWH
2	M36871	NPA	F/41	6	阳性	12	1:1280	PMH
3	M65189	NPA	F/38	4	阳性	18	1:640	PYNEH
4	M67349	NPA	F/41	6	阳性	20	1:640	PYNEH
5	M70221	NPA	M/30	10	阳性	22	1:2560	PYNEH
6	M71749	NPA	M/48	11	阳性	24	1:160	PYNEH
7	M51776	NPA	F/39	6	阳性	10	1:640	TKOH
8	M61558	NPA	F/53	10	阳性	18	1:40	UCH
9	M61576	Urine	M/40	12	阳性	18	1:40	UCH
10	M61565	NPA	M/28	10	阳性	18	1:40	UCH

注释: KWH, Kwong Wah 医院; NPA: 鼻咽抽出物; PMH: Princess Margaret 医院; PYNEH: Pamela Youde Nethersole Eastern 医院; TKOH: Tseung Kwan O 医院; UCH: United Christian 医院; * 原型病毒。

最近, 中华人民共和国中国中医研究院组成了中医专家小组, 以起草 "Technical Scheme(Tentative)for the Prevention and Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome(SARS)Using Traditional Chinese Medicine"(用中医学预防和治疗严重急性呼吸综合症(SARS)的技术大纲(试行))。在该大纲中, 推荐了一种“清肺解毒汤”(用于清肺和解毒的汤)配方, 其是由以下成分构成的: 黄芪(Astragalus membranaceus)15gm, 柴胡(Bupleurum chinense)10gm, 麻黄(Ephedra sinica)5gm, 杏仁(Prunus armeniaca)10gm, 生石膏(Plaster Stone)30gm, 薏苡仁(Coix lacryma-jobi)15gm, 瓜蒌皮(Gua Wei Pi)(Benincasa hispida)15gm, 桔梗(platycodon grandiflorum)9gm, 薄荷(Mentha haplocalyx)6gm, 黄芩(Scutellaria baicalensis)10gm, 生甘草

(*Glycyrrhiza uralensis*)5gm, 金银花(*Flos lonicerae*)15gm, 和青蒿(*Artemisia apiacea*)15gm.

黄芩苷的化学结构和药理学性质分别见图 1 和表 2。按照我们先前报道的方式提取黄芩苷 [Lu HT 等人, "Application of high-speed counter-current chromatography to the preparative separation and purification of baicalin from the Chinese medicinal plant *Scutellaria baicalensis*." *J Chromatogr A* 2003; 1017: 117-123]。简要地, 就 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的根来说, 将其在 60℃ 脱水至恒重, 然后粉碎。将 30gm 的粉碎样品放进装有 400 ml 甲醇-水(70:30, v/v)的 1000 ml 烧瓶中。在将提取物在环境温度超声处理 30 分钟后, 将混合物过滤。将提取步骤重复两次(每次 200 ml)。将滤液合并通过循环蒸发方法蒸干。得到粗品黄芩苷(16.9 g), 将其保存在冰箱中, 用于随后的使用。两相溶剂系统的高速逆流色谱分离, 所述两相溶剂系统由正丁醇-水(1:1, v/v)组成。在每次分离中, 将多层-盘旋柱首先全部用上非水固定相填充。然后装载 200 毫克溶于 5 ml 两相中的样品。将混合物在 900 rpm 下离心, 同时通过 HPLC 泵将下含水流动相以 1.0 ml/min 的流速泵入入口柱的顶端。

表 2

化合物	黄芩苷
药草名称	<i>Scutellaria baicalensis</i> (黄芩)
化学结构	请参阅图 1
化学式	$C_{21}H_{18}O_{11}$
分子量	446.38
热稳定性	在沸点温度稳定(典型的提取法)[Han RJ 等人, "Research on the extraction and separation technology." <i>Journal of Agricultural Engineering</i> 2000 ; 16: 118-122](中文)]
血清水平 (口服后)	$C_{max} = 60 \text{ ng/mL}$ (189.8 mg/人, 在人类中)。用于实验的数量(即 189.8mg /人)非常低 [Muto R 等人, "The chemical structure of new substance as the metabolite of baicalin and time profiles for the plasma concentration after oral administration of Sho-Saiko-To in human." <i>Yakugaku Zasshi</i> 1998 ; 118: 79-87(日文)].
在人类中的 标准口服剂 量	~ 1500 mg 黄芩苷(片剂)[Zui YC, <i>Modern Pharmacy</i> (People's Army Medicinal Press(1999)) ; 还可以是至多约 6000 mg 黄芩苷(由草药计算, 假定使用 30 g 草药; 所述草药可能含有至多 20 % 的黄芩苷)。
血清水平 (静脉内给 予后)	$C_{max} = 74 \mu\text{g/mL}$ (360 mg/人)[Wu CL 等人, "Effects of Yan Shuan Ji Mei Su on the pharmacokinetics of Shuang Huang Liang injection preparations." <i>Acta Chinese Medicine and Pharmacology</i> 1998; 3: 46-47(中文); Hua QG 等人, "Studies on quality standards of Shuang Huang Liang injection preparation." <i>Prepared Chinese Medicines</i> 1996; 18: 13-15(中文)]

- 在人类中的 ~ 600 mg 黄芩苷
 静脉内给予 [Zui YC, Modern Pharmacy(People's Army
 的标准剂量 Medicinal Press(1999)]
 半衰期(在 ~ 3 小时, 在人类中 Muto R 等人, "The chemical
 人类中) structure of new substance as the metabolite of
 baicalin and time profiles for the plasma
 concentration after oral administration of Sho-Saiko-
 To in human." Yakugaku Zasshi 1998 ; 118: 79-87(日
 文)].
- 抗病毒效果 抑制 HIV-1[Kitamura K 等人 "Baicalin : an
 inhibitor of HIV-1 production in vitro." Antiviral Res
 1998 ; 37:131-40

在尾部出口洗脱出澄清的流动相表明流动相前部已经出现和在柱中建立了水动平衡后, 将样品溶液通过注入阀注入。用 UV-Vis 检测器在 277 nm 处连续监控柱出口的排出液, 并且通过 L 120 E 平板记录仪来记录色谱图。收集峰值馏份, 并且根据如图 3 和 4 所示的通过 HPLC 测定的洗脱图来检测纯度 [参见 Lu HT 等人, "Application of high-speed counter-current chromatography to the preparative separation and purification of baicalin from the Chinese medicinal plant *Scutellaria baicalensis*." J Chromatogr A 2003; 1017: 117-123]。通过 HPLC 监控黄芩苷在细胞培养系统中的浓度 [Lu HT 等人, 2003]。

用于体外抗病毒易感性试验的方法如下。抗原型 hSARS 病毒的体外易感性实验在用恒河猴胎肾-4 细胞播种的 96 孔微滴定平皿中进行。将抗病毒药的两倍稀释物对 hSARS 病毒的 100 TCID₅₀ 以一式四份加以测试, 从在最大治疗剂量之后大于峰值血清浓度的 4 倍开始, 至小于波谷血清浓度的四分之一。将相应一套含有药品但没有病毒接种的细胞对照组用作药物毒性的对照组。在 48 小时和 72 小时处记录细胞的细胞病变效应(CPE)抑制。还可以将它们的抗病毒活性在 fRHK-4 和 Vero-E6 细胞系二者中加以比较。将那些可能具有临床上显著抑制活性的通过噬菌斑减少试验加以测试。

对于噬菌斑减少试验, 准备 24-孔组织培养平皿, 该组织培养平皿

在含有 10%胎牛血清(FCS)的 1.0 毫升最低必需培养基(MEM)中具有融合细胞单层(每孔 1×10^5 个细胞)。吸出介质之后,向每个孔中加入与 SARS 有关的冠状病毒的 50-100 噬菌斑形成单位(PFU)(在 1%FCS / MEM 中,含有合适浓度的抗病毒剂)。将平皿在 37℃下、在 5% CO₂ 中培养 2 小时,吸出接种物,向每个孔中加入 1.0 毫升的覆盖层(在 1% FCS / MEM 中的 1.0%低熔点琼脂糖,带有相应的药品稀释物)。将平皿在 37℃下、在 5% CO₂ 中进一步培养 48 小时。然后将细胞通过加入 2 毫升 10%甲醛来固定,并在室温下将平皿培养 2 小时。然后吸出琼脂糖填料,并将每个孔用在 70%甲醇中制备的 0.5%龙胆紫染色。将孔用水洗涤几次脱色之后,计算病毒噬菌斑的数量。

通过中和试验, fRhK-4 细胞系中的黄芩苷有效浓度在 48 小时处大约为 12.5 至 25 μg / ml、在 72 小时处为 25 至 50 μg / ml(表 3)。用噬菌斑减少试验发现类似的结果(图 2)。

表 3. 使用 fRhK4 细胞系、通过中和试验测定的黄芩苷针对 SARS-CoV 的 10 个菌株的抗病毒活性

化合物	EC ₅₀ (μg/ml) 48小时	EC ₅₀ (μg/ml) 72小时	CC ₅₀ (μg/ml)	SI = CC ₅₀ / EC ₅₀ 48小时
黄芩苷	12.5 - 25	25 - 50	> 100	> 8

注释: EC₅₀: 抑制细胞病变效应至对照值的 50%所需要的化合物的有效浓度; CC₅₀: 降低细胞寿命至 50%的化合物的细胞毒素浓度; SI: 选择性指数。

7. 等效性

仅仅利用常规实验,本领域技术人员将会认识或能够确定与本文中描述的许多本发明具体实施方案等效的实施方案。这种等效内容包括中下列权利要求中。

在本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请,以其全部内容引入说明书中作为参考,其程度与每个单独的出版物、专利或专利申

请具体地和单独地被表明以其全部内容引入本文中作为参考是相同的。

不应该将本文中对参考文献的引证或讨论理解为对其相对于本发明是现有技术的承认。

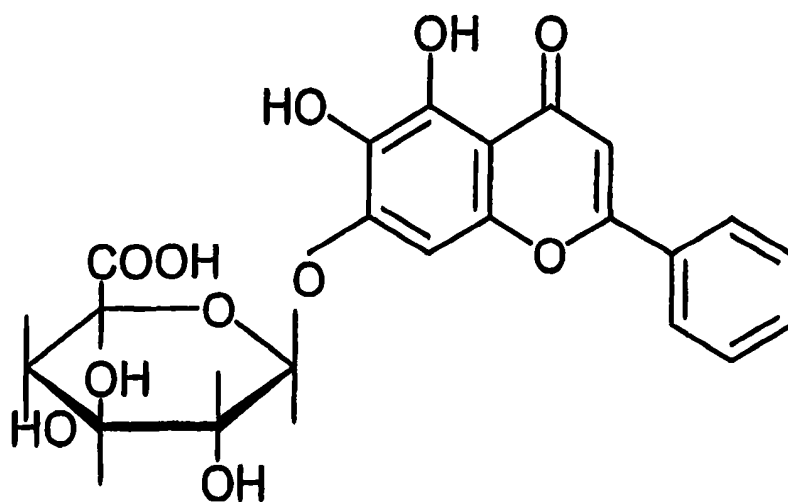


图 1

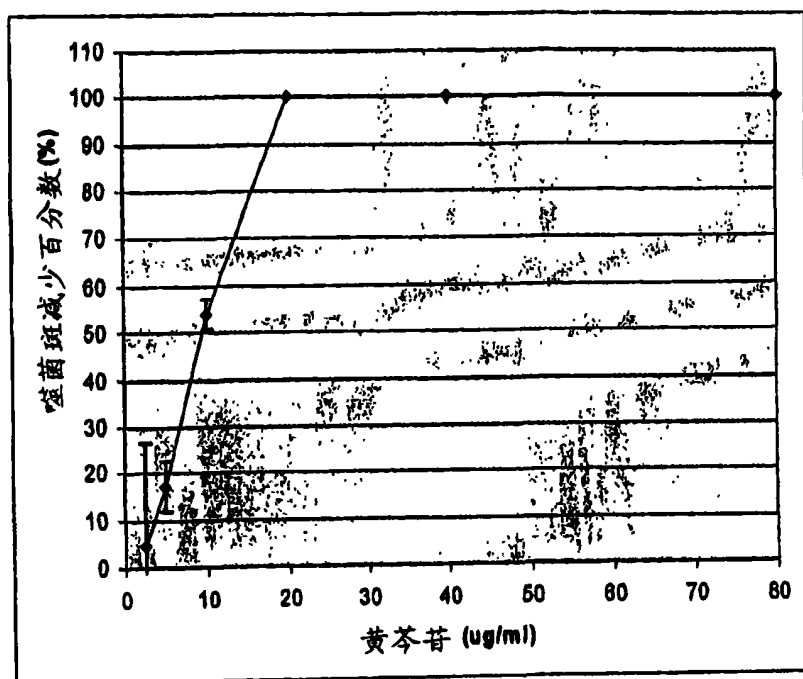


图 2

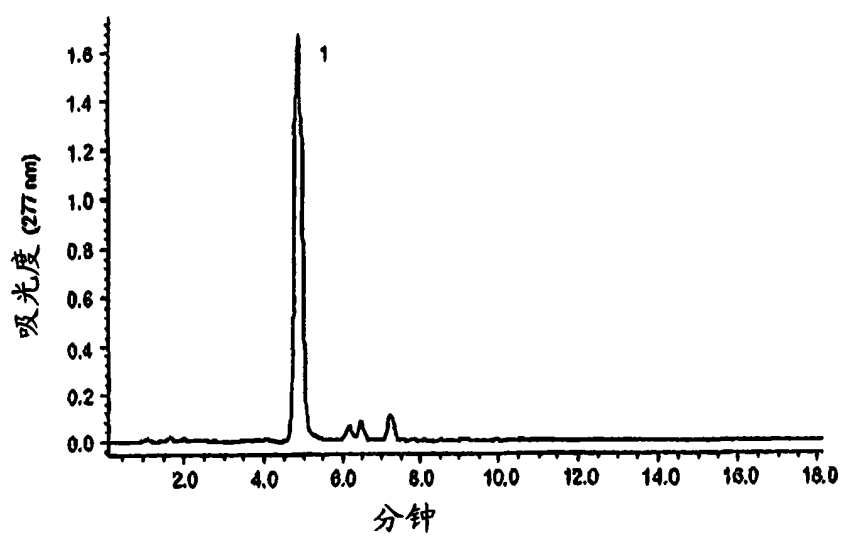


图 3

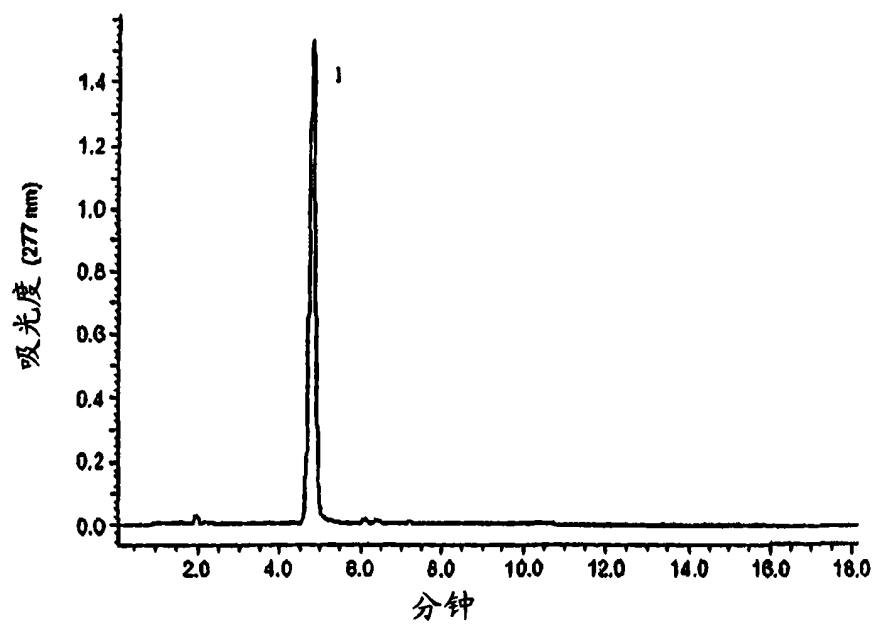


图 4