



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98811423.2

[43] 授权公告日 2003 年 7 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1116306C

[22] 申请日 1998.9.23 [21] 申请号 98811423.2

[30] 优先权

[32] 1997.9.23 [33] US [31] 60/059775

[86] 国际申请 PCT/CA98/00891 1998.9.23

[87] 国际公布 WO99/15566 英 1999.4.1

[85] 进入国家阶段日期 2000.5.22

[71] 专利权人 达尔豪榭大学

地址 加拿大新斯科舍省

[72] 发明人 李送芳 李汉新 徐宏喜 J·布莱
冯维忠

[56] 参考文献

CN1081375A 1994.02.02

JP 平 7 - 291815A 1995.11.07

JP 平 9 - 202731A 1997.12.25

US5411733 1995.05.02

审查员 朱 芳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜

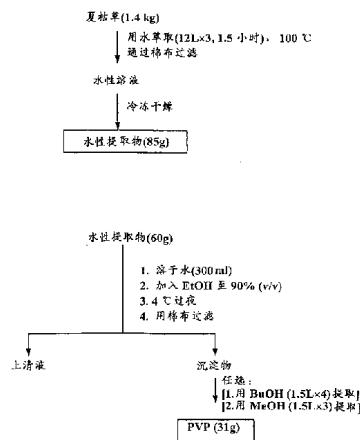
权利要求书 3 页 说明书 36 页 附图 7 页

[54] 发明名称 用于治疗包膜病毒感染的组合物、
其制备方法及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一种用于治疗包膜病毒感染的组合物，其特征在于：(1) 水溶性聚阴离子多糖，它的分子量为 3500Da 并且包括葡萄糖、半乳糖和木糖，其中通过纸层析分析所示，葡萄糖的含量超过组合物重量的 50%；(2) 凝血酶原时间试验测定显示，无抗凝活性；(3) 在病毒结合以前以及在病毒结合和侵入以后均能抑制病毒感染；(4) 无体内毒性；和(5) 来源于 Nepetoideae 亚科的植物。

从夏枯草茎中—提取和分离活性抗-癌物质



1. 一种用于治疗包膜病毒感染的组合物，其特征在于：
 - 5 (1) 水溶性聚阴离子多糖，它的分子量为 3500Da 并且包括葡萄糖、半乳糖和木糖，其中通过纸层析分析所示，葡萄糖的含量超过组合物重量的 50%；
 - (2) 凝血酶原时间试验测定显示，无抗凝活性；
 - (3) 在病毒结合以前以及在病毒结合和侵入以后均能抑制病毒感染；
 - 10 (4) 无体内毒性；和
 - (5) 来源于 Nepetoideae 亚科的植物。
2. 权利要求 1 的组合物，其特征还在于：
 - (6) 以 1mg/ml 的浓度溶于水溶液中时 pH 值为 5.5。
3. 权利要求 1 或 2 的组合物，其特征还在于：
 - 15 (7) 当分散于水性介质中时，在 202nm 有强的紫外线吸收峰以及有在 280nm 开始并延伸至 380nm 的肩峰。
4. 权利要求 1 的组合物，其特征还在于：
 - (8) 在 95-100℃ 范围的温度中暴露 4 小时仍是稳定的；
 - (9) 不溶于甲醇、乙醇、丁醇、丙酮和氯仿；
 - 20 (10) 元素含量为碳 30.78%、氢 3.05%、氮 0.66% 和硫 2.69%；
 - (11) 按重量计含有 42% 的碳水化合物，以葡糖醛酸表示；
 - (12) 按重量计含有 7.5% 的糖醛酸，以葡糖醛酸表示；
 - (13) 在中性 pH 时能与阿尔新蓝和二乙氨基乙基琼脂糖结合；
 - (14) 不是蛋白质；
 - 25 (15) 当在 Supelcosil C18 柱上经反相高压液相层析并用 5% 体积水：95% 体积乙腈以 0.3 ml/min 的流速洗脱时，具有 3.56 分钟的保留时间；以及
 - (16) 用于治疗哺乳动物中包膜病毒的致细胞病变作用。

5. 权利要求 1 或 2 的组合物, 其中所述组合物的特征在于得自植物夏枯草的细胞的化合物。
6. 权利要求 1 或 2 的组合物, 其中所述组合物得自植物夏枯草的细胞。
- 5 7. 一种药物制剂, 其特征在于该制剂包括权利要求 1-6 任一组的组合物和药学上可接受的载体。
8. 一种生产权利要求 1 的组合物方法, 其中所述多糖是通过热水提取、乙醇沉淀和采用能使具有小于 10 kDa 分子量的物质纯化的凝胶介质的凝胶渗透柱层析从夏枯草中分离出的。
- 10 9. 有效量的权利要求 1-6 任一组的组合物在制备用于抑制包膜病毒感染细胞的药物中的应用。
10. 有效量的权利要求 1-6 任一组的组合物在制备用于治疗有需要的哺乳动物中包膜病毒的致细胞病变作用的药物中的应用。
11. 权利要求 10 的应用, 其中包膜病毒的致细胞病变作用是由于暴露于环境因素而获得的。
- 15 12. 权利要求 10 的应用, 其中包膜病毒的致细胞病变作用是由于对使用影响正常免疫力的药物的治疗产生反应而获得的。
13. 权利要求 9 或 10 的应用, 其中所述包膜病毒是单纯疱疹病毒。
- 20 14. 权利要求 10 的应用, 其中所述哺乳动物是人。
15. 权利要求 10 的应用, 其中所述组合物被配制到药学上可接受的载体中。
16. 权利要求 10 的应用, 其中所述药物以连续输注、单位剂量或缓释形式使用。
- 25 17. 权利要求 12 的应用, 其中所述药物以任何可提供生物学有效性的形式使用。
18. 权利要求 10 的应用, 其中所述药物是胃肠外给药制剂形式。
19. 权利要求 10 的应用, 其中所述药物是局部给药制剂形式。

20. 权利要求 10 的应用，其中所述药物是口服给药制剂形式。

用于治疗包膜病毒感染的组合物、其制备方法及其应用

5 本发明领域

本发明涉及一种可从夏枯草(*Prunella vulgaris*)的穗(spikes)中提取并纯化的新的组合物。本发明组合物是一种对哺乳动物中有包膜病毒的致细胞病变作用的治疗有效的药剂。另一方面,本发明涉及利用本发明组合物作为活性药剂,治疗哺乳动物中有包膜病毒的致细胞病变作用及有有关适应症的方法。此外,本发明涉及在接受过免疫抑制治疗方案的哺乳动物中治疗有包膜病毒的致细胞病变作用的方法。另一方面,本发明涉及在用化疗药剂治疗期间或治疗后保护哺乳动物免受再活化病毒感染的方法。另外,本发明涉及从夏枯草中获得具有抗病毒作用的本发明组合物的方法,和获得含有所述组合物的制剂的方法。此外,本发明还涉及从夏枯草中纯化本发明组合物及其鉴定的方法。

本发明背景

由有包膜病毒引起的病毒感染是以宿主细胞的病毒感染为特征的疾病的异型种群(heterogenous group)。这种感染的实例包括由多种类型的疱疹相关病毒(包括 α -、 β -和 γ -疱疹病毒)引起的获得性疱疹病毒感染,并且感染开始是以宿主细胞的单纯疱疹病毒(HSV)感染为特征。原发性疱疹病毒感染通常是在童年时获得的,但是后来进入静止期(即在神经中)。由于各种因素(如紫外线、紧张和成人发病)导致疱疹病毒感染的复活。

大量正做的工作是鉴别那些能抑制病毒的致病性以及预防或治疗病毒感染的化合物。虽然目前有一些可选用的抗病毒药,但对预

防或治疗不同病毒感染更有效和更特异的其它化合物的需求仍是巨大的。

5 由于疾病模式、用药频率以及对药物和类似物耐药的疱疹病毒感染
感染的出现，在过去的十年中疱疹病毒感染的发生率和严重程度已
大大增加，导致对 HSV 有包膜病毒疾病及其病程的病理生理学的新的
兴趣，以便于鉴别出对预防或治疗 HSV 感染更有效和更特异性的
化合物。

10 与疱疹病毒有关的感染是普遍存在的。大约有 16-35%、40-80%
和超过 90% 的美国人在其生命的第三个十年中分别感染过 I 型单纯
疱疹病毒(HSV-1)、II 型单纯疱疹病毒(HSV-2)和水痘带状疱疹病毒
(VZV)或血清学反应呈阳性。HSV-1 引起唇疱疹、角膜炎和脑炎。
HSV-2 导致生殖器疱疹，而 VZV 则是水痘和带状疱疹的致病体。疱
疹病毒科中五个其它成员，特别是 EB 病毒(传染性单核细胞增多症
15 和 Burkitt's 淋巴瘤)、巨细胞病毒(先天性巨细胞病毒感染)、人疱疹病
毒 6 和 7 型(儿童发热和出疹)以及人疱疹病毒 8 型(卡波济氏肉瘤)，
也可导致人类疾病。

20 目前，有两类抗病毒药用于临床抗疱疹感染。第一类以核苷类
似物为代表，如无环鸟苷及其前体药物的衍生物(如伐昔洛韦和泛昔
洛韦)和腺嘌呤阿拉伯糖苷(ara-A)。无环鸟苷在 HSV 感染的细胞中选
择性地抑制病毒 DNA 的合成。无环鸟苷被病毒的胸苷激酶激活并被
磷酸化为无环鸟苷-三磷酸，该物质可通过病毒 DNA 多聚酶掺入到
DNA 链中。

25 第二类抗病毒药是 HSV DNA 多聚酶的直接抑制剂，如膦酰基
甲酸酯(phosphono formate)(Foscovir)和膦酰基乙酸盐。胸苷激酶和
DNA 多聚酶的变异可引起对这些药物的耐药。

在过去的十年中，由于攻击型化疗方案产生的免疫应答受损患
者数量的增加、广泛的器官移植和人免疫缺陷病毒(HIV)感染的发生
率升高，疱疹病毒感染的发生率和严重程度已大大增加。疾病模式

中的这种变化和药物使用频率的增加已导致对无环鸟苷-和其它核苷类似物耐药的疱疹病毒感染的出现，因此需要新的和有用的抗病毒药物，尤其是那些作用模式与无环鸟苷不同的药物。

5 在大约四十年前就已报导了聚阴离子物质对单纯疱疹病毒(HSV)和其它病毒的复制具有抑制作用。然而，这些观察并未引起多大兴趣，因为考虑到所述化合物的抗病毒作用在很大程度上是非特异性的。在1984年鉴定出人免疫缺陷病毒(HIV)是获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的致病体以后不久，即发现肝素和其它的阴离子(硫酸化)多糖类在细胞培养中是HIV-1复制的有效抑制剂。自1988年以来，阴离子多糖类的活性谱已显示扩展到多种有包膜病毒，包括作为条件病原体出现的病毒(如在免疫抑制(如AIDS)病人中的单纯疱疹病毒(HSV)和巨细胞病毒(CMV))。作为潜在的抗病毒药物候选者，阴离子多糖类提供了很多有希望的特征。

15 因此，在本领域中仍需要有效的化合物和方法来预防和治疗由有包膜病毒引起的每一种不同形式的病毒感染所导致的致细胞病变的作用。

本发明简述

20 根据本发明，我们已经发现从夏枯草的穗中提取并纯化的新的组合物是一种治疗在哺乳动物中有包膜病毒的致细胞病变作用的有效药剂。根据本发明的另一实施方案，我们已经发现，利用本发明纯化的组合物作为活性药剂在哺乳动物中治疗有包膜病毒的致细胞病变作用及相关指征的治疗方法。根据本发明的另一实施方案，我们已经发现本发明纯化的组合物是治疗接受过免疫抑制治疗方案的哺乳动物中有包膜病毒的致细胞病变作用的有效药剂。根据本发明的另一实施方案，我们已经发现本发明纯化的组合物是在用化疗药剂治疗期间或治疗后保护哺乳动物免受再活化病毒的感染的有效药剂。根据本发明的另一实施方案，我们已经发现从夏枯草中获得具

有抗病毒作用的本发明组合物的方法；此外，也提供了含有所述组合物的制剂。根据本发明的另一实施方案，我们已经发现从夏枯草中纯化本发明组合物及其鉴定的方法。

5 图的简述

图 1 给出了从夏枯草的穗中提取和分离抗疱疹活性提取物的代表性的方法。

图 2 给出了通过交联葡聚糖凝胶 G-50 柱分离抗疱疹活性物质的代表性的方法。

10 图 3 集中给出了从夏枯草中获得的抗疱疹制剂的 HPLC 分析。因此，图 3A 给出了水性提取物的 HPLC 洗脱分布图；图 3B 给出了部分纯化的提取物(PVP；参见实施例 1)的 HPLC 洗脱分布图，而图 3C 给出了组分 E(参见实施例 2)的 HPLC 洗脱图。

15 图 4 说明了夏枯草水性提取物在高达 500 μ g/ml 时没有细胞毒性。

图 5 说明了抗疱疹活性物质通过生物胶 P4 柱进一步分离。

图 6 给出了纯化的夏枯草多糖的 HPLC 图。

图 7 给出了通过 HPLC 估算夏枯草多糖分子量的描述图。

20 本发明详述

根据本发明，提供基本上纯化形式的组合物，所述组合物特征在于：

- 25 (1) 水溶性聚阴离子多糖类物质包含葡萄糖、半乳糖和木糖，通过纸层析分析所示，其中葡萄糖是主要成份，而半乳糖和木糖是次要成份；
- (2) 通过凝血酶原时间试验测定所示，基本上极少甚或没有抗凝活性；
- (3) 在病毒结合以前以及在病毒结合和侵入以后均能抑制病毒

感染；

(4) 实际上极少甚或没有体内毒性；并且

(5) 具有小于约 10 kDa 的分子量。

5 本发明组合物另一些特征在于：

(6) 以大约 1mg/ml 的浓度分散于水溶液中时具有 5.5 的 pH；

(7) 当分散于水性介质中时，具有在 202nm 的强的紫外线吸收峰和在 280nm 延伸至 380nm 的肩峰；

(8) 在约 95-100℃ 范围的温度中稳定暴露 4 小时；

10 (9) 基本上不溶于甲醇、乙醇、丁醇、丙酮和氯仿；

(10) 具有约 30.78% 碳、3.05% 氢、0.66% 氮和 2.69% 硫的元素含量；

(11) 含有 42%(w/w) 的碳水化合物，以葡糖醛酸表示；

(12) 含有 7.5%(w/w) 糖醛酸，以葡糖醛酸表示；

15 (13) 在中性 pH 时能与阿尔新蓝和 DEAE 琼脂糖结合；

(14) 不是蛋白质的；

(15) 当在 C18 柱(25cm × 4.6mm ID, 5 μ, Supelcosil LC-18, Sigma)上经反相高压液相层析(HPLC)并用 5% 水：95% 乙腈以 0.3ml/min 的流速洗脱时，具有 3.56 分钟的保留时间；以及

20

(16) 对哺乳动物中有包膜病毒的致细胞病变作用的治疗是有效的。

25 本发明的新的组合物能通过多种已建立的提取和纯化的方法来制备。一种这样的方法是在本说明书的实施例 1 和实施例 2 中所描述的一种。在另一种方法中，例如，本发明组合物能从植物夏枯草的细胞中获得，通过将夏枯草的提取物与选择性结合阴电荷物质的阴离子交换物质接触来纯化所述本发明组合物，并且从阴离子交换

物质中回收所述本发明组合物。

本发明也涉及适合于在需要此治疗剂的哺乳动物中治疗有包膜病毒的致细胞病变作用的药用制剂，其含有有效量的本发明组合物，为此伴有或不伴有合适的其药学上可接受的载体。有包膜病毒的实例包括 I 和 II 型单纯疱疹病毒、I 型人免疫缺陷病毒(HIV-1)、人巨细胞病毒、麻疹病毒、流行性腮腺炎病毒、流感和副流感病毒、呼吸道合胞病毒等等。

本发明也涉及适合于在有此需要的哺乳动物中治疗有包膜病毒(更优选单纯疱疹病毒)的致细胞病变作用的药用制剂，该制剂含有有效量的所述纯化的组合物或与药学上可接受的载体在一起的有有效量的所述纯化的组合物。

本发明也涉及治疗有包膜病毒的致细胞病变作用的方法，其包括给予需要它的哺乳动物一个有效剂量的上述药用制剂，或所述纯化的组合物，任选伴有药学上可接受的载体。更优选，治疗的哺乳动物是已诊断患有由所述有包膜病毒引起的感染的人类。最优选治疗的哺乳动物是已特异性地诊断为患有单纯疱疹病毒感染的人类。

根据本发明的另一实施方案，提供了治疗哺乳动物中有包膜病毒的致细胞病变作用的方法。本发明方法包括给予有此需要的哺乳动物有效量的上述纯化的组合物。

如此处所使用的，“哺乳动物”指人类以及其它哺乳动物，并且包括有经济价值的动物，如牛、绵羊和猪。根据本发明考虑治疗的优选的哺乳动物是人类。根据本发明，成人以及未成年人(即新生儿、青春期前的哺乳动物等等)也应考虑治疗。

如此处所使用的，短语“有包膜病毒的致细胞病变作用”指由有包膜病毒感染引起的细胞的异常状态。如以上提到的，由有包膜病毒引起的病毒感染是以宿主细胞内病毒感染为特征的异种疾病组。由有包膜病毒引起的病毒感染可直接由于暴露于有包膜病毒而

获得，或在血清反应阳性的哺乳动物中有包膜病毒感染的再活化而获得，并且该病毒感染的再活化可通过暴露于多种因素而诱发，包括但不限于各种环境因素(如紧张)、免疫应答受损(即有关免疫反应已被疾病、化疗药物或免疫抑制剂削弱)、由其它病毒感染(如 HIV 等)引起的免疫力的削弱、成人发病等等。如此处所描述的，以细胞内病毒感染为特征的疾病包括培养细胞的感染(即溶胞性感染、持续性感染、潜伏性感染、转化性感染、流产性感染等)、感染性不适、状态和疾病(即急性感染、隐性或无症状感染、慢性和持续性感染、潜伏性感染、慢性进行性疾病、病毒诱导的肿瘤等)等等。

5 当本发明的组合物给予病人时优选以纯化的形式给予。当由植物的穗提取获得本发明组合物时，理想的是通过合适的方式(如过滤、离心或其它合适的分离技术)从(残留物)颗粒物质中分离出可溶性提取物。较高的纯化促进了本发明组合物作为治疗剂的用途。当使用较不纯形式的提取物时，可能需要较大的剂量。

15 优选的本发明组合物基本不含有重金属、污染的植物物质、污染的微生物、草酸或草酸前体或者任何其它的可能存在于由植物获得的制剂中的污染物。

本发明组合物也能用于抑制有此需要的哺乳动物尤其是人类中的有包膜病毒(如 HSV)的致细胞病变作用。

20 尽管从夏枯草植物的穗中分离本发明组合物是目前获得这种物质最实用的方法，本发明也考虑过从其它来源获得这种物质，如具有此处所描述的特性的含有可回收量组合物的其它植物。其它考虑的植物包括 Nepetoideae 亚科中的种属，夏枯草是其中一员。通过体外培养植物细胞如夏枯草细胞并从细胞中提取活性成份或从细胞培养基中回收活性成份来获得本发明组合物也是可能的。

25 如此处所使用的，术语“提取物”意指从夏枯草的穗或其它部分或者其它自然资源(包括但不限于所述植物的所有品种、种类、杂种或种属)中分离出的活性成份，而不考虑该活性成份的准确结构、

5 制备的形式或方法或者分离的方法。该术语“提取物”也意指包括具有上述生物学特性或治疗适应症的所述提取物的盐、复合物及/或衍生物。该术语“提取物”也意指包括化学合成或生物学技术生产的具有相同或相似特性的类似物、同种物和模拟物，其产生本发明的相同或相似的生物学作用。

10 考虑用于此处的纯化组合物包括具有此处描述的特性的纯化的提取物成分，其可从任何植物或种类(优选夏枯草)以自然或变异的形式获得，也可从任何不论是自然的、合成的或是重组的来源获得。上述纯化组合物的类似物、同种物和模拟物也包括在本发明的范围内。

本发明也考虑具有本发明组合物特性的合成制剂的用途。该合成制剂能以上述本发明组合物的化学结构和/或功能特性为基础来制备。具有本发明组合物的功能特性和本发明组合物的化学结构的类似物、同种物和模拟物也被考虑。

15 如此处所使用的，本发明组合物的“类似物、同种物和模拟物”包括通过少许增加和/或替代和/或去除一个或多个残基而与本发明组合物的结构不同的化合物，没有明显的结构相似性的化合物。然而，在所有例子中的该化合物均具有与本发明组合物基本相同的活性。因此，“类似物”指具有与本发明组合物相同的基本结构，但有几个残基不同的化合物；“同种物”指通过增加和/或去除和/或替代有限数量的残基而与本发明组合物不同的化合物；以及“模拟物”指就本发明组合物而言没有特别的结构相似性的化合物。确实，模拟物甚至不需要为聚阴离子碳水化合物，但这种化合物仍显示出所述
20 本发明组合物的生物学活性特征。

25 如此处所使用的，“治疗”指治疗学的和预防学的治疗。那些需要治疗的对象包括那些已患有包膜病毒感染的对象以及在他们有包膜病毒感染的治疗已经失败的那些对象。

此处使用的所述本发明组合物能以合适的载体传递给药，因此

这种组合物可以口服给药、经皮给药、皮下给药(如静脉内给药、肌肉内给药、动脉内给药、腹腔内给药等等)、局部给药、吸入给药、渗透泵等等。根据采用的给药方式,上述组合物能以不同的药学上可接受的形式给予。例如,上述组合物能以固体、溶液、乳剂、分散体、微囊、脂质体等形式给予。

考虑在本发明实践中使用的药用制剂包含本发明组合物与适合肠道或肠道外给药的有机或无机载体或赋形剂相混合。例如,活性成份可与通常无毒的、药学上可接受的载体相混合,制成片剂、丸剂、胶囊、栓剂、溶液、乳剂、混悬剂及适合使用的任何其它的形式。能被使用的载体包括固体、半固体或液体形式的葡萄糖、乳糖、阿拉伯胶、明胶、甘露醇、淀粉糊、三硅酸镁、滑石粉、玉米淀粉、角蛋白、胶体二氧化硅、马铃薯淀粉、尿素、中链甘油三酯、葡聚糖及适用于生产制剂的其它载体。其它的辅料、稳定剂、增稠剂和着色剂以及香料也可使用。在所述药用制剂中包括考虑用于此处的活性化合物,该化合物的量足以对有包膜病毒性疾

病产生预期的作用。

含有此处考虑的活性化合物的药用制剂可以是适合口服使用的形式,如,片剂、锭剂、糖锭剂、水性或油性混悬液、可分散的粉剂或颗粒剂、乳剂、硬或软胶囊剂、糖浆或酏剂。按照药用制剂生产领域中任何已知的方法可以制备口服使用的所需制剂。此外,这种制剂可含有一种或多种选自甜味剂(如蔗糖、乳糖或糖精)、调味剂(如薄荷、冬青油或樱桃油)、着色剂和防腐剂等的物质,以便提供美味可口的药用制剂。含有与无毒的药学上可接受的赋形剂混合的活性成份的片剂也可通过已知的方法生产。例如,使用的赋形剂可以是(1)惰性稀释剂如碳酸钙、乳糖、磷酸钙、磷酸钠等等;(2)成粒和崩解剂如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸等等;(3)结合剂如黄耆胶、玉米淀粉、明胶、阿拉伯胶等等;以及(4)润滑剂如硬脂酸镁、硬脂酸、滑石粉等等。该片剂可以没有包衣,或者通过已知的技术包衣

以延迟其在胃肠道中的崩解和吸收，从而提供了一个较长时间的持续作用。例如，可使用象单硬脂酸甘油酯或双硬脂酸甘油酯这样的延时物质。它们也可以通过美国专利号 4,256,108、4,160,452 和 4,265,874 中所描述的技术来包衣，以形成渗透性治疗的控释片。

5 在某些情况下，口服使用的制剂可以是硬胶囊的形式，其中活性成份与惰性固体稀释剂如碳酸钙、磷酸钙、高岭土等相混合。它们也可以是软明胶胶囊的形式，其中活性成份与水或油性介质如花生油、液体石蜡或橄榄油相混合。

药用制剂可以是无菌注射混悬剂的形式。该混悬剂可以按照已知的使用方法使用合适的分散剂或湿润剂以及悬浮剂来制备。无菌注射制剂也可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或混悬液，如在 1,3-丁二醇溶液中的溶液。通常使用无菌的、不挥发的油作为溶剂或悬浮介质。为了这一目的，可以使用任何温和的、不挥发的油包括合成的单-或二脂酸甘油酯、脂肪酸(包括油酸)、自然产生的植物油如芝麻油、椰子油、花生油、棉子油等、或合成的脂肪溶媒如油酸乙酯等等。缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂等也可按需要加入。

理想的是联合给予本发明组合物和其它的病毒 DNA 合成抑制剂或 DNA 多聚酶抑制剂以产生协同的治疗和预防作用。

20 给药的治疗方案或模式可以是一种同时给予对抗本发明组合物作用的药剂和本发明组合物。另外，治疗方案也可以是先给予一种药剂，然后再给予第二种药剂的交替时相(phasic)模式。时相给药包括一种药剂的多次给予，随后第二种药剂多次给予。给药的顺序以及给药的每次时间长度均由医师决定是适合的。

25 使用缓释系统也能合适地给予本发明组合物。缓释组合物的合适的实例包括具有有形物品形式的半渗透的聚合物基质，如薄膜或微囊。缓释的基质包括聚交酯(美国专利号 3,773,919)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman 等, Biopolymers, 22:547-556(1983))、

聚(2-羟乙基-异丁烯酸酯)(Langer等, *J. Biomed. Mater. Res.*,15:267-277(1981))、乙烯基乙酸乙烯酯(Langer等, 同上)或聚-D-(-)-3 羟丁酸(EP133,988)等等。根据本发明, 含有本发明组合物的缓释剂也包括脂质体包载的组合物。通过本领域已知的方法制备脂质体(参见, 例如, DE 3,218,121; 美国专利号 4,485,045 和 4,545,545)。

对于胃肠外给药, 在一个实施方案中, 通过以单位剂量可注射的形式(溶液、混悬液或乳剂)与药学上可接受的载体混合来配制本发明组合物, 该载体即是以使用的剂量和浓度对受体是无毒的并且与制剂的其它成份是相容的。所述制剂优选不包含氧化剂和其它已知对多肽是有害的化合物。

一般, 通过将本发明组合物与液体载体或精细粉碎的固体载体或者与这两种物质均匀和紧密地接触来制备所述制剂。然而, 如果需要的话, 该产品也可制成所需的形式。优选所述载体是胃肠外载体, 更优选是与受体血液等渗的溶液。实例包括水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液等等。非水性载体如不挥发的油和油酸乙酯以及脂质体也可用于此处。

所述载体可适当地含有少量添加剂如增强等渗性和化学稳定性的物质。该物质在使用的剂量和浓度是对受体无毒的并且包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸、琥珀酸、乙酸和其它有机酸或它们的盐; 抗氧化剂如抗坏血酸; 低分子量(约少于十个残基)多肽, 如多精氨酸(polyarginine)或三肽; 蛋白质, 如血清白蛋白、明胶蛋白或免疫球蛋白; 亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或精氨酸; 单糖、双糖和其它碳水化合物包括纤维素或其衍生物、葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂如EDTA; 糖醇, 如甘露醇或山梨醇; 抗衡离子如钠; 和/或非离子表面活性剂, 如多乙氧基醚、poloxmers 或 PEG。按照临床相关的/可接受的方案, 本发明组合物通常在这类溶媒中配制。可以理解, 使用某种前述的赋形剂、载体或稳定剂将导致本发明组合物的盐的形成。

此外，在可接受的载体溶媒中适当地配制本发明组合物以形成药用制剂，优选不抑制(contain)细胞的那种。在一个实施方案中，用于配制的缓冲液将取决于所得制剂是否能立即混合使用或能储存以便以后使用。如果立即使用，本发明组合物能以合适的 pH 配制到甘露醇、甘氨酸和磷酸盐中。如果储存这种混合物，则优选以合适的 pH 配制到缓冲液中，可进一步任选存在表面活性剂以增加本发明组合物在这一 pH 时的稳定性。最终的制剂可以是稳定的液体或冻干的固体。

虽然本发明组合物能以任何适合给药的方式配制，目前优选的制剂含有约 2-20mg/mL 的本发明组合物、约 2-50mg/mL 的渗透剂 osmolyte、约 1-15mg/mL 的稳定剂和约 pH 5-6 的缓冲溶液，更优选 pH 约 5-5.5。优选所述渗透剂是约 2-10mg/mL 浓度的无机盐或约 40-50mg/mL 浓度的糖醇，所述稳定剂是苯甲醇或苯酚，或是两者，以及所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。更优选的是其中渗透剂为氯化钠和乙酸盐为乙酸钠的制剂。更优选本发明组合物的量是约 8-12mg/mL，氯化钠的量是约 5-6mg/mL，苯甲醇的量是约 8-10mg/mL，苯酚的量是约 2-3mg/mL，以及乙酸钠的量是约 50mM 以便所述 pH 是大约 5.4。此外，所述制剂可含有约 1-5mg/mL 的表面活性剂，优选约 1-3mg/mL 剂量的多乙氧基醚或 poloxmers。或者，对于本发明制剂的制备，本发明组合物适宜以 5mg/ml 溶于 pH 为 6 的 10mM 柠檬酸盐缓冲液和 126mM NaCl 中。

用于治疗的本发明组合物必须是无菌的。通过经无菌滤膜(如 0.2 微米的膜)过滤可容易地完成除菌消毒。按照本发明，治疗组合物和制剂通常放置在具有无菌接口的容器中，如，具有可用皮下注射针头穿刺的塞子的小瓶。

本发明组合物和制剂通常以水溶液或以可重新配制的冻干制剂储存在单位剂量或多-剂量的容器，如，封口的安瓿或小瓶中。以冻干制剂为例，10 ml 小瓶装有 5 ml 无菌过滤的根据本发明组合物的水

溶液，并且冻干所得混合物。通过在制菌的注射用水中重新配制冻干的物质来制备输注溶液。

所述活性成份的通常的日剂量一般在每公斤体重约 $10\ \mu\text{g}$ 到约 1g 的范围内，优选在每公斤体重约 $100\ \mu\text{g}$ 到约 500mg 的范围内，并且每日能给药多达 5 次。目前优选的日剂量在每公斤体重约 1mg 到约 50mg 的范围内。通常，所述活性化合物可以药用制剂的 0.1-90%(重量)的量存在，优选为药用制剂的 0.5-50%(重量)。人们在上述范围内的操作将依据给药途径和需要考虑的因素，例如，患者的年龄、患者的体积、患者其它的功能障碍(如果有的话)、以及患者服用的其它药物等的变化而改变。

作为一般的建议，胃肠外给予每个剂量的本发明组合物的总的药理学上有效的量将是足以提供治疗作用而又不引起明显毒性的量。由于个体受试者在症状的严重程度上可表现出较大的变化，并且每种活性成份具有其独特的治疗特性，因此医师需确定受试者对治疗的反应，并据此改变剂量。

此处给出以体外试验为基础的数据，预期每克霜剂或软膏剂含有 $10\ \mu\text{g}$ 到 50mg 本发明组合物的浓度(参见实施例 4)局部给药对预防单纯性疱疹病毒的致细胞病变作用是有有效的。

根据本发明的另一实施方案，提供了在需要此治疗的哺乳动物中治疗有包膜病毒的致细胞病变作用及相关指征的方法，所述方法包括将有效剂量的本发明组合物给予所述哺乳动物。

根据本发明考虑治疗的表现出有包膜病毒致细胞病变作用的患者是那些对有包膜病毒的血清学试验呈阳性的患者，优选那些诊断为 HSV、VZV 或 HIV 感染的患者。

根据本发明的另一实施方案，提供了治疗接受过免疫抑制治疗方案的哺乳动物中有包膜病毒的致细胞病变作用的方法，所述方法包括将有效剂量的本发明组合物给予所述哺乳动物。

根据本发明考虑治疗的表现出有包膜病毒致细胞病变作用并接

受过免疫抑制治疗方案的患者是那些正常的免疫耐受性因随后给予免疫抑制剂而受损的患者，例如，器官移植、异种移植(xenotransplantation)、进行化疗的受试者(如癌症患者)等等。

5 根据本发明的另一实施方案，提供了在用化疗药剂治疗期间或治疗以后保护哺乳动物免受再活化的有包膜病毒感染的致细胞病变作用的方法，所述方法包括将有效剂量的本发明组合物给予所述哺乳动物。

在用化疗药剂治疗期间或治疗以后，保护其免受复活的有包膜病毒的致细胞病变作用的患者是指包括患有任何通常需要给予化疗剂治疗的疾病的患者，如，器官移植后、肾病综合征、癌症患者等。

10 根据本发明的另一实施方案，提供了制备具有抗病毒作用的夏枯草的新的提取组分以及含有所述提取组分的制剂的方法。参见，例如，此处提供的在实施例 1、2 和 3 中所描述的方法。

对预防有包膜病毒的致细胞病变作用有效的所述提取物或提取组分可用于治疗哺乳动物(最优选人类)中有包膜病毒感染的致细胞病变作用。以下列方式进行：

- 15 (i) 由于未处理的水性提取物已经以高达 0.5mg/ml 的浓度给予哺乳动物细胞(参见实施例 8)而没有明显的副作用，它也可被人类受试者吸收，并可减少病毒相关疾病的可能发生。
- 20 (ii) 对有包膜病毒有效的化合物也可在该化合物进一步纯化以后静脉给予病毒感染的患者。当所述化合物静脉给予时可能比口服给予更有效，因为所述活性化合物不可能 100% 的从胃肠道吸收。
- 25 (iii) 也可想象对有包膜病毒有效的所述纯化的化合物可被给予到脑脊液中，并可在有包膜病毒感染的患者中预防有包膜病毒相关疾病的可能发生。

可以预期所述提取物将被配制成药用组合物，该组合物包含有效量的所述提取物，伴有或不伴有药学上可接受的载体(如前所述)。

此处引用的所有文献及专利均通过引用结合到本文中。

已知许多自然产物具有对单纯疱疹病毒的抑制作用。Musci 和 Pragai(参见 *Experientia* 41:6(1985))指出了四种黄酮类化合物, 即, 栝精、栝苷、芦丁和桔皮苷, 对 HSV-1 和 Suid(α)HSV-1(假狂犬病病毒)的抑制作用。在病毒抑制和黄酮类化合物增加宿主细胞内环腺苷酸的能力之间观察到一种直接的关系, 提示黄酮类化合物是经环核苷酸代谢来发挥其抗病毒作用的。Wlekklik 等(参见 *Acta Virol.* 32:522(1988))进一步指出在黄酮类化合物的 3、5、7、3'和 4'位上的羟基化作用与最高的抗疱疹活性有关。Hayashi 等(参见 *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1890-1893(1992))描述了从 *Cepalotaxus drupacea* 中分离出的 bifavanone 银杏黄素对 Vero 细胞内的 HSV-1 和 HSV-2 复制的抑制作用。对 HSV-1 的 IC_{50} (50%抑制浓度)是 $0.91 \mu\text{g/ml}$ 。银杏黄素抑制病毒蛋白质的合成, 而对 HSV-1 结合和侵入细胞则是无效的。Barnard 等(参见 *Chemother.* 39:203-211(1993))描述了一种抑制 HSV 侵入细胞的 2100 Da 的黄酮类化合物聚合物。

已知多糖类影响动物病毒的增长(参见 Shannan, W.M.in G.J.Galasso, T.C.Merigan 和 R.A.Buchanon(ed.), 抗病毒剂和人类病毒疾病, Raven Press, New York(1984)第 55-121 页)。特别是阴离子多糖, 如肝素、葡聚糖硫酸酯、角叉藻聚糖(carrageenans)、戊聚糖聚硫酸酯、岩藻多糖(fucoidan)和硫酸木半乳聚糖(xylogalactans), 是疱疹病毒与宿主细胞结合的有效抑制剂(参见, 如, Gonzalez 等, *Antimicrob.Agents Chemother.* 31:1388-1393(1987); Baba 等, *Antimicrob.Agents Chemother.* 32:1742-1745(1988); 和 Damonte 等, *Chemother.* 42:57-60(1996))。硫酸多糖的活性谱已显示延伸到多种有包膜病毒(如, I 型人免疫缺陷病毒(HIV-1)、麻疹病毒、流行性腮腺炎病毒、流感和副流感病毒、呼吸道合胞病毒(HSV)和巨细胞病毒(CMV)), 包括作为条件病原体出现的病毒。这些多糖是病毒糖蛋白受体(硫酸乙酰肝素)的竞争者。Herold 等(参见 *J.Virol.* 70:3461-

3469(1996))指出了 N-硫酸化作用和肝素上羧基基团的存在是 HSV-1 和 HSV-2 与宿主细胞相互作用的关键的决定性因素。然而, 这些多糖也具有抗凝活性, 因此不适于作为抗疱疹药物。

已知某些植物蛋白具有抗疱疹活性。较为人知的是核糖体失活蛋白(如美洲商陆抗病毒蛋白(参见, 如, Teltow 等, *Antimicrob. Agents Chemother.* 23:390(1983))和凝集素(如伴刀豆凝集素 A; 参见, 如, Okada, Y., 和 J.Kim. *Virology* 5:507(1972))。美洲商陆抗病毒蛋白是不可逆地结合到 HSV 的 30 kDa 单个多肽, 并且只有与病毒结合后才能进入宿主细胞。在进入宿主细胞后, 该蛋白抑制蛋白合成。伴刀豆凝集素 A 与病毒的包膜相互作用以抑制感染性或阻止病毒从感染的细胞中逸出。最近, 描述了两种其它植物蛋白和一种人类血清蛋白的抗 HSV 活性。MAP30 和 GAP31 是分别从中国苦瓜 *Momordica charantia* 和喜马拉雅山白树(*Gelonium multiflorum*)中分离出的 30 kDa 和 31 kDa 蛋白(参见, 如, Bourinbaiar, A.S. 和 S. Lee-Huang, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 219:923-929(1996))。两种蛋白显示出对 HSV-1 和 HSV-2 的 IC_{50} 均在 0.1 到 0.5 μ M 范围内。MAP30 和 GAP31 的作用模式尚不清楚。已发现高密度血清载脂蛋白 A-1 在 1 μ M 时抑制 HSV 诱导的细胞融合(参见 Srinivas, R.V. 等, *Virology* 176:48-57(1990))。与载脂蛋白 A-1 类似的一种 18 氨基酸合成肽可抑制病毒侵入细胞, 但是并不能阻止病毒吸附。

其它的抗疱疹天然产物包括萜类化合物和鞣酸类。萜类化合物(如甘草酸, 参见, 如, Vanden Berghe, D.A. 等, *Bull. Inst. Pasteur* 84:101(1986))抑制 HSV 复制(参见 Hudson, J.B, 来自植物中的抗病毒化合物, CRC 出版, Boca Raton 公司, FL(1990))。鞣酸类被认为是抑制病毒吸附(参见, 如, Fukudri, K. 等, *Antiviral Res.* 11:285-297(1989))。Xu 等(参见 *Heterocycles* 38:167-175(1994))指出了水解鞣酸类、geponin 和正鞣醛(gallic aldehyde)对 HSV-1 分别具有 25 和 12.5 μ g/ml 的 IC_{50} 。

夏枯草，在中国、英伦岛和欧洲常见的一种多年生植物，已被用作内服和外用的收敛剂(参见，如，Grieve, M., 现代草药, Dover Publications, NY.(1973))、天然抗肿瘤药(参见，如，Lee, H.和 J.Y.Lin, Mutation Res. 204:229-234(1988))和降低高血压的草药(参见，如，

5 Namba, T., The encyclopedia of Wakan-Yaku(traditional Sino-Japanese medicines), 第2卷, 第120-121页; Hoikusha 出版有限公司, Osaka, 日本(1994))。在西方草药治疗中，所述植物(其作为“有自愈(self heal)作用的植物”为人所熟知)是以用蜂蜜变甜的热的水浸液的形式用于治疗口腔和咽喉疼痛(参见，如，Grieve, M., 现代草药, Dover

10 Publications, NY.(1973))。Zheng(参见 Chung-Hsi-I-Chieh-Ho-Tsa-Chih. 10:39-41(1990))报道了夏枯草的水性粗提取物在疱疹性角膜炎的临床治疗中的某些成功的应用。78例患者接受了用含有夏枯草和 *Pyrrosia lingua* 的粗提取物的滴眼剂，报道治愈38例，37例显示有改善，3例无效。夏枯草的水性粗提取物含有不能检测到的抗凝活性(参见

15 Zeng, F.Q. M.Sc. Thesis. National University of Singapore(1996))。因此，尽管有某些证据显示夏枯草是一种抗疱疹植物，但所述抗疱疹活性成份仍不清楚。

HSV-1、HSV-2 和 VSV 属于人类 α -疱疹病毒，而巨细胞病毒和 EB 病毒则分别属于 β -疱疹病毒和 γ -疱疹病毒。HSV 是含有双链

20 DNA 的大的(直径 180-200 nm)有包膜病毒。该 DNA 核心由含有 162 个衣壳体的二十面体衣壳包裹。而所述衣壳是由含有糖蛋白的包膜包裹，该包膜由至少 11 个已知的糖蛋白组成(gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gJ、gK、gL 和 gM)，其中许多糖蛋白与病毒附着细胞以及感染细胞的融合有关。在包膜和衣壳之间是间层，其含有其它的病

25 毒蛋白。

宿主细胞的 HSV 感染是一个多步骤的过程，由病毒体结合细胞表面的蛋白聚糖开始。蛋白聚糖上的硫酸肝素部分是病毒结合的位点，尽管 HSV 也能结合到硫酸软骨素。两种病毒糖蛋白，gC 和 gB，

负责将 HSV 附着到硫酸肝素上。GC 在结合中起作用主要，并且当
其从病毒体脱出时，gB 以降低的效率(reduced efficiency)介导结合。
在 HSV 进入细胞中的随后的步骤包括 gD 与第二细胞表面分子，可
5 可能是甘露糖-6-磷酸酯受体的相互作用(参见 Brunetti, C.R.等, J. Biol.
Chem 269:17067-17074(1994))。通过病毒包膜与细胞膜的融合而使
HSV 侵入。这种融合是 pH-非依赖性的并且需要至少四种病毒糖蛋
白，gB、gD、gH 和 gL 的参与。融合以后，病毒核壳释放到胞浆内，
并且病毒脱壳以允许病毒 DNA 进入细胞核。病毒增殖以有序方式在
10 细胞核内发生，开始是基因转录的调节所需的立即早期蛋白的出现，
随后是早期蛋白(如 DNA 聚合酶)和晚期蛋白(结构蛋白)。普遍认为
子代病毒体在细胞核中装配并通过内质网从细胞释放出。

根据本发明，采用标准的空斑数降低测定法已经筛选出 20 多种
具有抗 HSV-1 活性的植物提取物(参见 Edgar, L.等, 临床微生物学
手册, 第 5 版, A.Balows(主编)American society for Microbiology,
15 Washington DC(1991), 1184-1191 页)。从夏枯草的穗中制备的热水提
取物显示出良好的活性，并且没有细胞毒性。通过乙醇沉淀从冻干
的水性提取物中制备部分纯化的提取物(PVP)。通过凝胶渗透柱层析
(Sephadex G-50)进一步纯化抗疱疹提取物。收集具有抗疱疹活性的一个
组分(组分 E)。采用反相(ODS-2)柱的 HPLC 分析显示组分 E 含有
20 一个主峰和两个非常小的峰。空斑数降低测定显示 PVP 和组分 E 分
别具有针对 HSV-1 的 18 和 10 μ g/ml 的 IC_{50} 。

纯化的提取物对 HSV-1 及 HSV-2 的临床分离株和无环鸟苷抗性
(胸苷激酶缺失和 DNA 聚合酶缺失)的病毒株也有效。用纯化的提取
物预温育 HSV-1 可破坏该病毒的感染性；然而，Vero 细胞的预处理
25 则不能防止 HSV-1 感染，证实所述提取物可预防感染的早期事件的
发生(结合和/或侵入)。在一步生长研究中，在感染 0、2、4 和 7.25
小时后加入 PVP 分别显示出病毒总产量(细胞外和细胞内)的 99%、
96%、94%和 90%的减少。这些结果证实所述化合物也干扰病毒的复

制。

通过苯酚硫酸酯分析方法测定，组分 E 含有 42%(w/w)碳水化合物(以葡糖醛酸表达)(参见 Dubois, M.等, 1956. *Anal. Biochem.* 28:350-356(1956))。通过由 Blumenkrantz 和 Asboe-Hansen 所描述的糖醛酸分析方法测定，其含有仅 7.5%(w/w)糖醛酸(以葡糖醛酸表达)(参见 Blumenkrantz, N.和 G. Asboe-Hansen, *Anal. Biochem.* 54:484-489(1973))。从其中性 pH 时能与阿尔新蓝(Whiteman, P., *Biochem. J.* 131:343-350(1973))和 DEAE 琼脂糖结合可以证明，所述化合物是聚阴离子。没有检测到己糖胺和蛋白质。通过纸层析分析，鉴定出所述纯化的抗疱疹多糖是由葡萄糖、半乳糖和木糖组成。

所述纯化的提取物是水溶性的，但不溶于甲醇、乙醇、丁醇、丙酮或氯仿。组分 E 的水溶液(1mg/ml)具有 5.5 的 pH。分光光度测定法显示在 202 nm 有一个强的吸收峰，并且在 280 nm 有一个延伸到 380 nm 的肩峰。通过用凝胶过滤柱 HPLC 估测，所述纯化的化合物的分子量是 3,500 Da。由 Tabba 等(参见 *Antiviral Res.* 11:263-274(1989))先前分离出的聚阴离子多糖、夏枯草皂苷 prunellin 具有 pH 为 7.4 的水性溶液，在 370 nm 显示出一个延伸到 500 nm 的吸收峰，并且具有 10,000 Da 的分子量。这进一步证明组分 E 的抗疱疹化合物也是一种聚阴离子碳水化合物，并且在化学上不同于夏枯草皂苷。

根据本发明，已经发现夏枯草的提取物在抗疱疹病毒的治疗中是有效的。已知该植物含有齐墩果酸、三萜酸(熊果酸)、三萜类化合物、黄酮类化合物(芦丁)、蒽酮、鞣质和夏枯草皂苷(参见，如，Namba, T, *The encyclopedia of Wakan-Yaku(traditional Sino-Japanese medicines)*, 第 2 卷, 第 120-121 页; Hoikusha 出版有限公司, Osaka, 日本(1994))。夏枯草皂苷是一种 10 kDa 阴离子多糖，并且其已显示出抑制人类免疫缺陷病毒-1 的复制(参见，如，Tabba, H.D., *Antiviral Res.* 11:263-274(1989)和 Yao, X.J.等, *Virology* 187:56-62(1992))。已显示出芦丁对 HSV 的某些活性(参见，如，Mucsi, I.和 B.M. Pragai.,

Experientia 41:6(1985)), 然而, 已证明其它的化合物不具有抑制疱疹病毒的活性。

实验用兔眼和鼠耳感染模型被用作 HSV 感染的实验模型。可使用这些及其它动物感染模型来研究夏枯草的所述提取物组分在临床前期评估中的用途。

以下实施例描述了夏枯草植物穗的提取、所述提取物的鉴定和所述提取物对抑制单纯疱疹病毒的致细胞病变作用的效果。

实施例中描述的结果清楚地显示, 夏枯草多糖是一种比已知的抗疱疹病毒剂更优良的抗病毒剂。与肝素, 一种已知的抗凝剂相比, PVP 具有与水相似的平均凝血酶原时间, 表明 PVP 没有或基本上没有抗凝活性。此外, 还发现夏枯草阴离子多糖能在病毒结合前以及病毒结合和侵入后抑制 HSV 感染。一步生长研究(实施例 6)清楚地显示甚至在病毒感染 7.25 小时后, 夏枯草多糖也能减少 90% 的病毒产量。与肝素钠实际相比, 仅仅当病毒感染开始时, 即仅仅当病毒还未结合到细胞开始其感染周期时, 肝素钠才具有抗疱疹活性。

下列实施例仅仅是说明性的, 并不意味着如所附权利要求定义的那样限制本发明的范围。显然, 本领域中的那些技术人员可在不违反本发明的精神和范围时对本发明的方法进行各种修改和变动。因此, 这就意味着本发明涵盖这一发明的修改和变动, 条件是它们须在所附加的权利要求和其相似条款的范围内进行。

实施例 1

从夏枯草中提取本发明组合物

将夏枯草的干穗(1.4Kg)用 Waring 搅拌器研磨成小片。加入蒸馏水(12L)并将该混悬物于 95-100℃ 炖煮 90 分钟。将提取物离心到洁净容器内, 并在相同条件下用水将该植物再提取 2 次。将该提取物通过棉布倾倒以除去不可溶性植物原料。经过旋转蒸发, 澄清的提取物的体积减少到约 1 升。将浓缩的提取物冷冻干燥。获得总量为 85g

的深褐色干燥粉末(参见图 1)。

将水性提取物中的抗疱疹成份用乙醇沉淀。为获取这些，将 30g 冻干的水性提取物溶解于 300ml 的水中，并加入乙醇至终浓度为 90%(体积/体积)。在 4℃ 孵育该混合物 18 小时。通过棉布过滤回收沉淀物，并用 4×1.5L 丁醇，继之用 3×1.5L 甲醇洗涤。获得 31g 深褐色粉末，标示为 PVP(参见图 1)。将乙醇沉淀的上清液弃去，通过空斑数降低测定法(参见实施例 2)测定该上清液中不含有可测到的抗疱疹活性。

5

实施例 2

通过柱层析纯化提取物组分

通过凝胶过滤柱层析进一步纯化所述活性抗疱疹成份。将 PVP(450mg, 10ml)的水性溶液加样到 Sephadex G-50 柱(98×2.5cm)上并用水洗脱。收集到 5ml 组分。采用空斑数降低测定法测定其抗疱疹活性。为做这一步，将组分冷冻干燥并重新溶于蒸馏水中至 1mg/ml。按照 Edgar 等描述的标准方法(参见临床微生物学手册，第 5 版，A.Balows(主编)Amer. Soc. for Microbiology, Washington DC(1991), 1184-1191 页)进行空斑数降低测定。概要地说，用 100-200 pfu(空斑形成单位)的病毒感染生长于培养板上的单层 Vero 细胞。然后培养 1 小时使病毒吸附，将接种物抽吸出来，并用含有夏枯草提取物的 2%甲基纤维素稀释液的培养基(含 2%胎牛血清的 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基)覆盖。在 37℃ 培养 72 小时后，用福尔马林固定培养板，用结晶紫染色，风干并计数空斑数目。用无提取物的培养基覆盖的板作为对照。空斑形成的抑制百分率计算如下：

15

$$\frac{(\text{对照空斑数}) - (\text{试验空斑数}) \times 100}{(\text{对照空斑数})}$$

收集活性组分并冷冻干燥。没有受试化合物的对照板具有平均为 188.5 个空斑/孔的数。

在组分 91-131 号中发现了活化的抗疱疹活性(参见表 1, 其给出了得自 Sephadex G-50 柱的组分的抗-HSV-1 的活性)。收集这些组分以
5 以获得在组分 E 中发现的具有最高活性的混合组分 C、D、E 和 F(参见图 2)。在混合组分的每个组分中回收的物质的量被表示出。

表 1
得自 Sephadex G-50 柱的组分的抗-HSV-1 的活性

混合组分	组分号	%空斑抑制		
		75 μ g/ml	50 μ g/ml	25 μ g/ml
A(186mg)	41	NT ^a	0	0
	45	0	0	0
	51	17.8	7.2	2.9
	56	22.0	11.9	0
	61	2.4	0	NT
	65	11.5	2.4	NT
	71	26.8	0	NT
B(85mg)	75	49.1	16.2	0
	81	79.8	56.5	21.5
	85	86.7	46.9	10.3
C(58mg)	91	100	49.6	7.7
	95	100	100	11.9
	101	100	100	45.9
D(42mg)	105	100	100	65.5
	111	100	100	92.0
	115	100	100	82.5
E(5mg)	121	100	100	84.6
	125	100	100	100
F(32mg)	131	100	54.9	19.4
PVP		100	73.5	36.3

^a NT = 未测试

这一实施例的结果证实本发明从夏枯草中分离出的纯化的提取物组分具有抗疱疹活性。

实施例 3

5 纯化的提取物组分的 HPLC 分析

得自夏枯草的抗疱疹物质的纯度是通过反相高压液相层析(HPLC)对三个制备物(水性提取物、PVP 和组分 E)的分析来评估的。将等分试样(25 μ l)的水性溶液(10 μ g/ml)注入到 C18 柱(25cm \times 4.6mm ID, 5 μ , Supelcosil LC-18, Sigma)中。用 5%水:95%乙腈以 0.3 ml/min 10 的流速洗脱化合物。用紫外分光测定仪于 210 nm 处测定化合物。在纯化过程中,将保留时间为 3.56 分钟的峰浓缩(参见图 3)。对组分 E,其 3.56 分钟的峰基本上只有一个峰。结合实施例 4 中提供的抗疱疹试验结果(其证明在纯化过程中特异性的抗-HSV-1 的活性增加),本实施例的结果证实所述 3.56 分钟的峰是夏枯草的纯化的提取物组 15 分,该纯化的提取物组分可增强抗疱疹的活性。

实施例 4

抑制活性、IC₅₀

通过将一系列浓度的 PVP 和组分 E 用于抑制由 HSV-1 在 Vero 20 细胞中的空斑形成来评估得自夏枯草的抗疱疹化合物的效力。空斑抑制的百分率依赖于加入的 PVP 和组分 E 的量(参见表 2)。将 IC₅₀ 定义为在所述测试系统中,可抑制 50%空斑形成数的提取物的浓度。零抑制就是在测试期间,空斑形成数等于或大于无提取物存在的对照组的空斑形成数。百分之百抑制就是在测试期间无空斑形成。 25 计算达到 50%抑制(IC₅₀)所需要的 PVP 和组分 E 的浓度分别为 18 和 10 μ g/ml。表 2 给出了 PVP 和组分 E 对空斑形成的剂量依赖性抑制(不含受试化合物的对照组平均为 64.25 空斑/孔)。

表 2
PVP 和组分 E 对空斑形成的剂量依赖性抑制

PVP(μ g/ml)	%空斑抑制	组分 E(μ g/ml)	%空斑抑制
50	96.9	50	100
25	61.1	25	100
12.5	35.4	12.5	55.6
6.25	29.2	6.25	35.4
3.125	0	3.125	13.6

5 本实施例的结果证实了得自夏枯草的纯化的提取物组分对单纯疱疹病毒的效力和用途。

实施例 5

活性范围

10 将多种病毒用于空斑数降低测定试验中以评估得自夏枯草的提取物组分的活性范围。结果显示，100 μ g/ml 的 PVP 在 Vero 细胞受实验室和临床 HSV-1 和 HSV-2 病毒株攻击时，可提供完全的空斑形成抑制。在 100 μ g/ml 时，PVP 还可抑制无环鸟苷-抗性的 HSV-1 病毒株 [DM2-1 病毒株(胸苷激酶缺陷型)和 PAAr5 病毒株(DNA 聚合酶缺陷型)]和 HSV-2 的 Kost 病毒株(胸苷激酶变异型)。PVP 在 100 μ g/ml
15 时未显示出抗巨细胞病毒、人类流感病毒 A 和 B 型、脊髓灰质炎 1 型病毒和水疱性口炎病毒的活性。在巨细胞病毒和人类流感病毒的试验中，分别用人包皮细胞和 MDCK(狗肾)细胞代替 Vero 细胞。

20 本实施例的结果证实得自夏枯草的提取物组分具有特异性抗 HSV-1 和 HSV-2 的活性，并且进一步证实，由于其具有抗无环鸟苷-抗性的 HSV 的活性，因此在治疗由无环鸟苷-抗性的 HSV 引起感染的致细胞病变效应中，得自夏枯草的提取物组分是可选择的有用药物。

实施例 6

夏枯草抗疱疹化合物在 HSV-1 感染中的效用

研究 PVP 的抗疱疹效用的作用模式。将 Vero 细胞与 $75 \mu\text{g/ml}$ PVP 一起在 37°C 预培养 16 到 20 小时。用培养基洗涤细胞并用 HSV-1 感染。观察到与其中细胞未用 PVP 处理的对照组具有同样数量的空斑(50 空斑/孔)。这就提示 Vero 细胞用 PVP 的预培养不具有保护作用。

为研究病毒与 PVP 一起预培养是否将去除感染性,将 $100 \mu\text{g}$ PVP 与 10^5 pfu 的 HSV-1 一起在 37°C 孵育。孵育 1 小时后,用培养基将此混合物稀释 10,000 倍并用于感染 Vero 细胞。在培养后的单层细胞中未观察到空斑。相比而言,用培养基代替 PVP 预处理病毒的对照板平均含有 130 空斑/孔。这一发现提示,通过用 PVP 预孵育可除去 HSV-1 的感染性,其可能是通过结合病毒颗粒并阻止它们结合到 Vero 细胞的硫酸乙酰肝素上而产生其效应。这个减低疱疹病毒感染性的作用模式完全不同于无环鸟苷和其它已知的核苷类似物。

通过向 Vero 细胞中同时加入 PVP 和 HSV-1 来证明 PVP 的保护作用。当在同一时间向 Vero 细胞中加入 $75 \mu\text{g/ml}$ PVP 和 HSV-1 时,在空斑形成中观察到大于 98% 的空斑数减少。将 $100 \mu\text{g}$ PVP 和 10^6 空斑形成单位的 HSV 在 4°C 、室温(25°C)和 36°C 孵育 1 小时可消除 99% 的病毒感染性。当感染后加入 PVP 时,进一步证明了 PVP 的保护作用。

在一步生长研究中,更进一步观察到 PVP 对 Vero 细胞中 HSV-1 生长的作用。在 4°C ,用 HSV-1 以 5 的感染复数(MOI)(即每个细胞 5 个病毒体)感染单层 Vero 细胞。在这个温度时,病毒结合但不侵入细胞。因此,所有的单层细胞都同步处于病毒感染的同一步骤中。将所述细胞用冷培养基洗涤,并在洗涤步骤以后 0、2、4 和 7.25 小时用 $75 \mu\text{g/ml}$ PVP 处理。通过从上清液(细胞外)和溶解的细胞(细胞内)中将样本移种出来而测定每个时间点的总的病毒产量。结果证实,同细胞未用 PVP 处理的对照组相比,当 PVP 在感染后 0、2、4 和 7.25

小时加入时，总的病毒产量分别减少 99、96、94 和 90%。

本实施例的结果证实，得自夏枯草的提取物组分也作用于细胞内的疱疹病毒以减少感染的病毒的产量，并防止病毒的细胞到细胞的传播，而且所述提取物组分在病毒增殖过程中在细胞内干扰某些生物合成的步骤。

实施例 7

得自夏枯草的抗疱疹化合物的化学性质

通过不同的化学试验研究所述抗疱疹化合物的化学性质。通过酚硫酸测试方法，用葡糖醛酸作为标准来测定总碳水化合物的含量，其结果显示组分 E 中的抗疱疹化合物含有 42%(w/w)的碳水化合物(以葡糖醛酸表达)。用 Blumenkrantz 和 Asboe-Hansen 描述的方法(参见 Anal. Biochem. 54:484-489(1973))，采用葡糖醛酸作为标准来测定糖醛酸。所述抗疱疹化合物含有 7.5%(w/w)的糖醛酸(以葡糖醛酸表达)。

通过 Molgan-Elson 试剂(参见 Whiteman, P., Biochem. J. 131:343-350(1973))，采用 N-乙酰葡糖胺(Sigma)作为标准来测定己糖胺总量。未测到己糖胺。通过考马斯亮蓝染料结合方法(Bio-Rad)，采用牛血清白蛋白作为标准来测定蛋白质。未测到蛋白质。元素分析显示所述纯化的提取物组分含有 30.78%碳、3.05%氢、0.66%氮和 2.69%硫。

按照 Whiteman 所描述的测试方法(参见 Biochem. J. 131:343-350(1973))，发现用阳离子染料阿尔新蓝 8GX 可沉淀所述抗疱疹化合物。在中性 pH 时，所述抗疱疹化合物与 DEAE 琼脂糖牢固结合，并可用 2M NaCl 洗脱。这些实验证实得自夏枯草的抗疱疹提取物组分是一个聚阴离子碳水化合物。

所述抗疱疹化合物是水溶性的，但不溶于甲醇、乙醇、丁醇、丙酮或氯仿。所述化合物对热稳定(95-100℃，4 小时)。所述抗疱疹化合物的 1mg/ml 水性溶液，其 pH 为 5.5。分光光度法显示在 202 nm 处有一个强吸收峰，而在 280 nm 处有一个延伸到 380 nm 的肩峰。

相比之下，由 Tabba 等(参见 Antiviral Res. 11:263-274(1989))先前分离出的夏枯草皂苷具有 pH 为 7.4 的水性溶液，和一个由 370 nm 延伸到 500 nm 的吸收峰。

5 本实施例的结果证实得自夏枯草的抗疱疹提取物组分不同于夏枯草皂苷。

实施例 8

细胞毒性

按照公开的方法(参见 Blay, J.和 A.S.L. Poon, Toxicon. 33:739-746(1995))采用大鼠肠上皮细胞系(RIE-1)来测试所述水性提取物对哺乳动物细胞的细胞毒性作用。其它细胞系包括那些来源于人类的细胞，如 T84 人肠上皮细胞和 KB 人口腔表皮样瘤细胞也可用于测试以确定细胞毒性的缺失并不局限于一个细胞系或一个种属。在直接加入到 RIE-1 细胞中之前，将干燥的水性提取物溶于 DMSO 中并用培养基(含 5%(v/v)热灭活的牛血清的 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基)稀释。将培养物孵育 48 小时。向培养孔中加入 MTT(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-联苯四唑鎓溴化物)得到终浓度 0.5 mg/ml。在 37°C 孵育所述培养物 3 小时，使 MTT 在线粒体的琥珀酸脱氢酶作用下转化为甲臞染料。用 Titertek Multiscan 培养板读取仪在 A_{492} 处测定所述染料。将含有等量的 DMSO，但没有受试提取物的培养板作为对照。通过将试验组的 A_{492} 读取值与相对应的没有提取物组分的对照孔的 A_{492} 读取值相比较，计算出细胞毒性的百分率。

本实施例的结果证实所述夏枯草的水性提取物组分直到测试的最高浓度(即 500 μ g/ml)时亦未显示有细胞毒性作用(参见图 4)。

25 以上实施例 1 到 8 所描述的系列实验证明得自夏枯草的本发明组合物是聚阴离子碳水化合物，其直到 500 μ g/ml 亦无毒性，并且具有特异性的新的抗有包膜病毒，特别是 HSV-1、HSV-2 病毒株，包括无环鸟苷-抗性的病毒株的活性。

根据以下实施例，将得自夏枯草的活性提取物组分纯化为均匀物质，并且测定其化学和生物学特性，以了解其化学性质、作用模式和活性范围，并因此用以改善其作为抗病毒药物的应用和效能。

5

实施例 9

得自夏枯草的抗疱疹提取物组分的分离和纯化.

采用实施例 2 中所描述的方法，通过在生物凝胶 P4 柱(95×2.5 cm)上再层析组分 D 和 E 的混合物质(参见实施例 2)来纯化所述抗疱疹病毒的阴离子多糖。所获得的产量和组分对 HSV-1 的抑制活性均显示于图 5。如此处所公开的，本发明的所述纯化的提取物组分也可通过提取、沉淀和凝胶过滤层析来制备。其它的纯化的方式，例如，密度平衡离心、超滤和透析也可使用。工业规模生产的所述活性化合物的更经济的纯化可通过，如，离子相互作用层析(ionic interaction chromatography)(DEAE-琼脂糖 4B)和反相高压液相层析来实现。由于所述活性化合物在中性 pH 时与 DEAE 琼脂糖凝胶 4B 牢固结合并能用 2M NaCl 洗脱，故可将所述乙醇沉淀的化合物加样到 DEAE-琼脂糖凝胶柱上，用 NaCl 梯度液洗脱所述活性化合物，并通过标准的空斑数降低测定法来鉴定所述活性组分。此后，可收集所述活性组分、透析并通过使用制备的反相(C-18)柱的 HPLC 进一步纯化，该纯化过程是一种可升至工业规模 HPLCs 的代表性的纯化过程。当通过 HPLC 分析得自组分 IV 的样品时，获得一个单峰，表明所述抗疱疹化合物是纯的(图 6)。所述 HPLC 的条件如下：柱-TSK G3000PW×1，7.8mm×30cm，6 μm；0.8 ml/min 的流速；流动相-水；检测-UV 210nm；注入 20 μl 以及 0.2 mg/ml 的浓度。

25

实施例 10

得自夏枯草的抗疱疹化合物的化学特性

下一个目的是测定所述纯化的化合物的分子量或质量。测定大

分子的分子量的最常用的方法是凝胶渗透层析、HPCL 排阻层析、渗透压、SDS 凝胶电泳、使用 G-75 的 Squire 方法、通过选择性分子量透过的截止(cut off)膜透析、有沉降率测定的超速离心等等。通过具有凝胶过滤柱(TSK-GEL G3000PW×1, 7.8 mm×30 cm, 6 μm)的 HPLC 估测所述纯化化合物的分子量。所述纯化的化合物的分子量估计为 3,500 Da。(图 7; 这是与由 Tabba 等(Antiviral Res.(1989)11(5-6):263-273)先前分离出的具有 10,000 Da 分子量的夏枯草皂苷相对比)。也可使用元素、红外线、NMR 和其它的光谱分析方法来鉴定所述活性化合物。

在 121℃ 于 2N 三氟乙酸中水解所述纯化的化合物 1 小时。当通过纸层析(溶质系统: 吡啶: 乙酸乙酯: 水=4: 10: 3)分析所述水解产物时, 获得具有葡萄糖、半乳糖和木糖标准品的相同 R_f 值的三个斑点。所述产物也可在酸(如, 2N HCl)中彻底水解, 并能通过 HPLC 和气相层析法分析组成的单糖。通过比较所述斑点的强度, 可知葡萄糖是主要的组成糖。半乳糖和木糖是次要成份。

这些结果表明, 所述纯化的抗疱疹多糖主要是由葡萄糖以及一些半乳糖和木糖作为构成的单糖而组成。这些单糖的某些可能在其上含有 SO_4 和 $/COOH$ 基团以赋予所述多糖的阴离子属性。已知的测试法, 如糖醛酸测试法(参见 Blumenkrantz, N. 和 G. Asboe-Hansen, Anal. Biochem. 54:484-489(1973))和 Molgan-Elson 测试法(参见 Ghuyssen, J.M. 等, Methods Enzymology 8:685-699(1966))可用于验证糖醛酸和己糖胺存在的量。通过本领域已知的方法可测定所分离的化合物的其它特性, 如, pI、水性溶液的 pH 和溶解度。

实施例 11

得自夏枯草的抗疱疹化合物的生物学特性

1. 纯化的多糖对 HSV 的活性

如此处所公开的, 所述半纯化的提取物组分在体外试验中具有

两种抗-HSV 活性机制，即通过细胞外和细胞内的作用抑制所述病毒。由于所述活性化合物在细胞外结合，因此减少了感染性病毒的产生并阻止了病毒的细胞到细胞的传递，在病毒增殖过程中，所述化合物可能干扰了细胞内的其它功能或生物合成步骤。

5 通过应用本领域已知的方法，如病毒体结合试验，可以解释特异性的作用模式。在本实施例中，用蔗糖梯度(20-60%, w/w)分级分离法，从病毒感染 7-20 小时的 Vero 细胞的培养液中纯化 ^{35}S -标记的 HSV-1，所述 Vero 细胞生长于含 2% 透析的胎牛血清和 ^{35}S -甲硫氨酸 (10 $\mu\text{Ci/ml}$ ，特异活性 $>800\text{ Ci/mmoles}$ ，New England Nuclear) 的甲硫氨酸缺乏型培养基中。在 4°C 将所述放射标记的病毒同纯化的化合物或培养基一起培养，并且以 1 的感染复数(MOI)加入到单层 Vero 细胞中。接着在 4°C 培养 1 小时以使病毒吸附，用含有牛血清白蛋白(0.5%) 的磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞以除去未吸附的病毒。通过测定用化合物处理的或用培养基处理的病毒感染的单层细胞的放射活性，来比较病毒结合的程度。或者，将单层细胞溶于去污剂中，并通过 SDS-PAGE 和荧光自显影分析所述细胞结合的放射性标记。

10

15

可使用主要的病毒衣壳蛋白 VP5 可作为光密度定量的合适的蛋白(参见 Herold, B.C.等, J. Virol. 65:1090-1098(1991))。可应用本领域中已知的其它的结合实验方法来研究本发明化合物对病毒结合动力学以及对已结合到 Vero 细胞上的病毒的作用。

20

应用 HSV-1 的 gC-缺陷型和 gB-缺陷型突变株以及特异性的抗-gC 和 gB 抗体，可进一步证实所述夏枯草化合物在与 gC 和 gB 有关的病毒结合中的特异性作用。应用本领域已知的方法，如 Herold 等, J. Virol. 70:3461-3469(1996)，可研究所述化合物对病毒侵入的作用，该方法可测定吸附病毒对 pH 3.0 缓冲液的耐受性。

25

通过在 4°C 用 HSV-1 以 20 的 MOI 感染 Vero 细胞，然后在 37°C 病毒感染后 0、0.5、1、2、4、8、12、16 和 20 小时比较有或无所述化合物存在时的病毒生长(得自细胞外上清液和细胞溶解物)，从而研

究所述化合物的细胞内抗-HSV 活性。这种“单细胞生长”实验的实施例有望于证实此处公开的本发明的结果，具体地说，就是在感染后加入所述化合物可减少培养物中病毒的产量。应用已知的方法可进行这些样本的超微结构研究(参见，如，Gollins 和 Porterfield, J. Gen. Virol. 66:1969-1982(1985))。比较 HSV-1 进入细胞内的模式，以及在有或无所述化合物存在时培养的感染细胞的细胞和亚细胞区室 (compartments) 内的随后的形态学发展，将增加对本发明化合物的基本的病毒抑制特性的了解，并可用于限定本发明化合物在生物化学和分子水平的作用模式。

10

表 3
纯化的多糖对 HSV 的活性

			%斑点抑制			
病毒	无环鸟苷敏感性	病毒株# ^a	50 μ g/ml ^b	25 μ g/ml	12.5 μ g/ml	6.25 μ g/ml
HSV-1	敏感	15577	100	95	49	0
HSV-1	胸苷激酶缺乏型抗性的	12959	100	100	14	0
HSV-1	胸苷激酶变异型抗性的	15518	100	88	20	0
HSV-2	敏感	15614	100	100	41	18
HSV-2	胸苷激酶变异型抗性的	15597	100	95	49	0

a 得自 Burroughs Wellcom 公司的良好特性的病毒株。

15 b 纯化的抗疱疹化合物使用的浓度。

这些结果显示得自夏枯草的纯化的多糖含有抑制两种类型的疱

疹病毒的活性，不管它们是否对无环鸟苷敏感或有抗性。所述结果表明得自夏枯草的化合物具有与无环鸟苷不同的作用方式，并且暗示它可用于治疗由无环鸟苷-抗性的疱疹病毒引起的感染。

5 在疱疹病毒科(如 VZV 和巨细胞病毒)和其它有包膜病毒，如 I 型人免疫缺陷病毒(HIV-1)、人类巨细胞病毒、麻疹病毒、流行性腮腺炎病毒、流感和副流感病毒、呼吸道合胞病毒等中，可测定所述提取物组分的纯化化合物对这些病毒的活性，以确定其完整的活性范围和抗凝活性，用于确定其对给出的有包膜病毒的特殊用途。

10 2. 抗凝活性

通过凝血酶原时间试验来测定所述化合物的抗凝活性。使用 BBL 纤维测量仪(fibrometer)(Becton Dickinson and Co, USA)在 37℃ 时测定凝血酶原时间。将采自兔耳缘静脉的血(9 ml)与 3.8%柠檬酸钠(1 ml)混合，并在室温以 1500 x g 离心 10 分钟，获得澄清的上清液作为测试血浆。在经典测试法中，将含有 50 μl 受试溶液(1mg/ml)、150 μl 的 50 mM Tris、0.1 M HCl、pH 7.5 的缓冲液、100 μl 的凝血激酶和钙以及 100 μl 血浆的混合物在 37℃ 孵育。当血凝块形成，纤维测量仪停止测定时，以秒记录凝血酶原时间。

20 所述抗疱疹化合物的平均凝血酶原时间为 25.9 ± 1.5 秒，该值与水对照组 29.9 ± 1.4 秒相似。使用水作为对照以显示血浆的正常凝血酶原时间。该结果显示我们的抗疱疹化合物没有或基本上没有抗凝血活性。这是相对于已知的抗凝血的阴离子多糖-肝素而言，肝素也被描述为具有抗-HSV 活性(Herold 等，(1996)J. Virol. 70:3461-3469)。抗凝剂(如肝素)的凝血酶原时间约为 300 秒。

25

3. 所述夏枯草化合物和肝素钠之间抗疱疹活性的比较研究

对所述夏枯草化合物和肝素钠的抗疱疹活性进行研究以说明这两种多糖之间的差异。首先，应用实施例 2 中所描述的空斑数降低

测定法，观察到所述两种化合物抑制 HSV-1 15577 号毒株和 Δ gC2-3 毒株(糖蛋白 C 缺陷型 HSV-1, Herold 等, (1994)J. Gen. Virol. 75:1211-1222)的能力明显不同。糖蛋白 C 是病毒包膜蛋白的一种，它可调节病毒对哺乳动物细胞上肝素受体的结合。肝素被认为是通过竞争肝素受体而抑制细胞的 HSV-1 感染(Harold 等(1994))。估测肝素抑制 15577 号毒株和 Δ gC 毒株的 IC_{50} 分别为 $750 \mu\text{g/ml}$ 和 $>1 \text{mg/ml}$ 。相比之下，估测所述夏枯草化合物抑制第 15577 号毒株和 Δ gC 株的 IC_{50} 则分别为 $10 \mu\text{g/ml}$ 和 $5 \mu\text{g/ml}$ 。

通过结合实验，观察到所述夏枯草化合物和肝素钠之间的第二个主要差异。在该实验中，将 0.1 ml HSV-1(10^5 pfu)与 0.1 ml 肝素钠 (20mg/ml)或所述夏枯草化合物(1mg/ml)或水一起在 36°C 孵育 1 小时。将该混合物用培养基系列稀释，并用空斑试验测定剩余的感染病毒的数量。将在水处理的对照组中产生的空斑数作为 100%。结果显示，用 2 mg 肝素处理后，分别有 30%和 42%的原始 HSV-1 15577 号毒株和 Δ gC 2-3 毒株仍具感染性，并通过空斑试验回收。相比之下，在相同的病毒数量暴露于 $100 \mu\text{g}$ 的所述夏枯草化合物后，两个毒株中都没有任何病毒保持感染性，并且不可通过空斑试验而回收。

通过结合竞争实验，进一步观察了肝素钠的抗疱疹作用。在该实验中，将 0.5ml HSV-1(约 100 pfu)样品与 0.5ml 不同浓度的肝素钠混合。在 37°C 将所述混合物立即用于感染 Vero 细胞 1 小时。接着培养后，用空斑试验测定空斑数。结果显示当使用 $62.5 \mu\text{g/ml}$ 肝素时，15577 号毒株的空斑形成有 88%被抑制。然而，甚至用到 1mg/ml 的肝素，仍不能达到空斑形成的完全抑制。在 1mg/ml 肝素时，所述空斑抑制百分率是 92%。当应用 gC-缺陷型 HSV-1、 Δ gC2-3 时，得到相似的结果。在该情况下，用 $62.5 \mu\text{g/ml}$ 和 1mg/ml 肝素时，所述空斑抑制百分率分别是 77%和 86%。

这些结果提示只有当病毒感染开始即存在肝素钠时，它才具有抗疱疹的活性。换言之，只有在病毒尚未与细胞结合而启动感染循

环时，肝素才具有对 HSV 的抑制作用。通过空斑数降低测定法测定的 IC_{50} 的高数值(750-1000 μ g/ml)更进一步支持了这一陈述。在空斑数降低测定中，在病毒与 Vero 细胞一起培养 1 小时后(即已结合并可能已侵入细胞)加入肝素。 IC_{50} 的高数值表明肝素不具有抑制作用。

5 所述阴离子多糖肝素是通过阻断病毒向细胞的结合而发挥其抗疱疹的作用。这种阻断只能在病毒尚未与细胞受体结合时有效：这一点确实与所述夏枯草阴离子多糖不同，其在病毒结合之前，以及在病毒结合和侵入之后均可抑制 HSV 感染。在一步生长研究(实施例 6)中说明的结果清楚地显示甚至在病毒感染 7.25 小时后，所述夏枯草多糖仍能减少 90% 的病毒产量。此外，在该实施例中，具体地说是在空斑数降低测定试验和结合实验中，所描述的结果清楚地显示所述夏枯草多糖是比肝素更优越的抗疱疹药物。

10

实施例 12

15 得自夏枯草的抗疱疹化合物的体内毒性试验

可用本领域已知的方法，例如，下述的白化小鼠的两步步骤法 (two-step procedure) 测定本发明化合物的体内毒性。

步骤 1：确定剂量范围。

20 为确定将在小鼠体内产生毒性的剂量，将溶解于 0.4 ml 蒸馏水中的所述抗疱疹的提取物 PVP 通过喂饲管口服给予 BALB/c 雌性小鼠(8 月龄，22-23g)。口服给予一只动物所述新的化合物的低剂量(如 25 mg/kg)，然后每小时观察该动物 1 次持续 24 小时，此后每 8 小时观察 1 次，连续每天监测，持续 14 天。第二组动物接受第一只动物的双倍剂量。然后对以后的动物重复所述过程，每只接受的剂量是前一只动物的 2 倍直至最大量 2000 mg/kg(OCED 准则，1995 年)。在

25 这一步骤中，总量为 10 只的动物被用于确定剂量。每只动物给予的 PVP 量是 25、100、200、400 和 800 mg/kg 体重。

在每个剂量组中，所述动物存活并且未显示出濒死状态的体征。濒死状态以诸如浅呼吸、用力或无规律呼吸、肌无力或震颤、对外来刺激的自主反应缺失、不能保持直立、发绀和昏迷为特征。这些指征中的任何一个即标志着濒死状态，立即使所述动物安乐死亡。

5 然而，如果未观察到濒死作用或致死现象，则于第 14 天处死动物并为组织病理学选取器官样本(心、肺、肝、脾、肾、脑、肌肉、子宫)。由于未观察到濒死状态或致死现象，将动物处以安乐死，并检查每只动物的器官。所述挑选器官的组织学检查未显示有炎症或任何其它病理学症状。这些结果提示直到浓度达到 800 mg/kg 时，PVP 仍无

10 体内毒性。

步骤 2：近似急性毒性(LD₅₀)的测定。

应用步骤 1 的剂量范围的测定，为 LD₅₀ 测定确定三个近似的剂量水平。每一剂量水平应用 10 只动物，每小时监测 1 次，持续 24

15 小时，然后每 8 小时观察 1 次，并连续每天监测，持续 14 天。将表现出濒死状态体征的动物立即处死；在第 14 天处死所有动物并将它们的器官采样用于组织学检查。应用得自这些实验的数据，通过应用本领域已知的方法(参见，如 DePass., Toxicology Letters 49:159(1989))经推断和数学处理来评估急性 LD₅₀。

20 以未处理的提取物(参见实施例 2)和以纯化的组分(实施例 4)存在的化合物在体外均具有抑制 HSV 的致细胞病变作用的活性。基于这后一种活性和它们的某些生物化学特性(特别是它们的阴离子的特性)，这些提取物的制剂能够抑制其它有包膜病毒的致细胞病变性。这一推断得到 Baba 等的支持(参见 Antimicrobial Agents and

25 Chemotherapy 32:1742(1988))。

结论，显然得自如夏枯草的穗的所述本发明组合物是治疗哺乳动物中有包膜病毒的致细胞病变作用的有效药物。这一结果对所述纯化的提取物组分在有包膜病毒中的作用途径提供了洞察方法。

尽管参考其某些优选的实施例已经详细描述了本发明，但是可以理解，修改和变动仍在所描述的和权利要求的精神和范围之内。

从夏枯草穗中提取和分离活性抗-疱疹物质

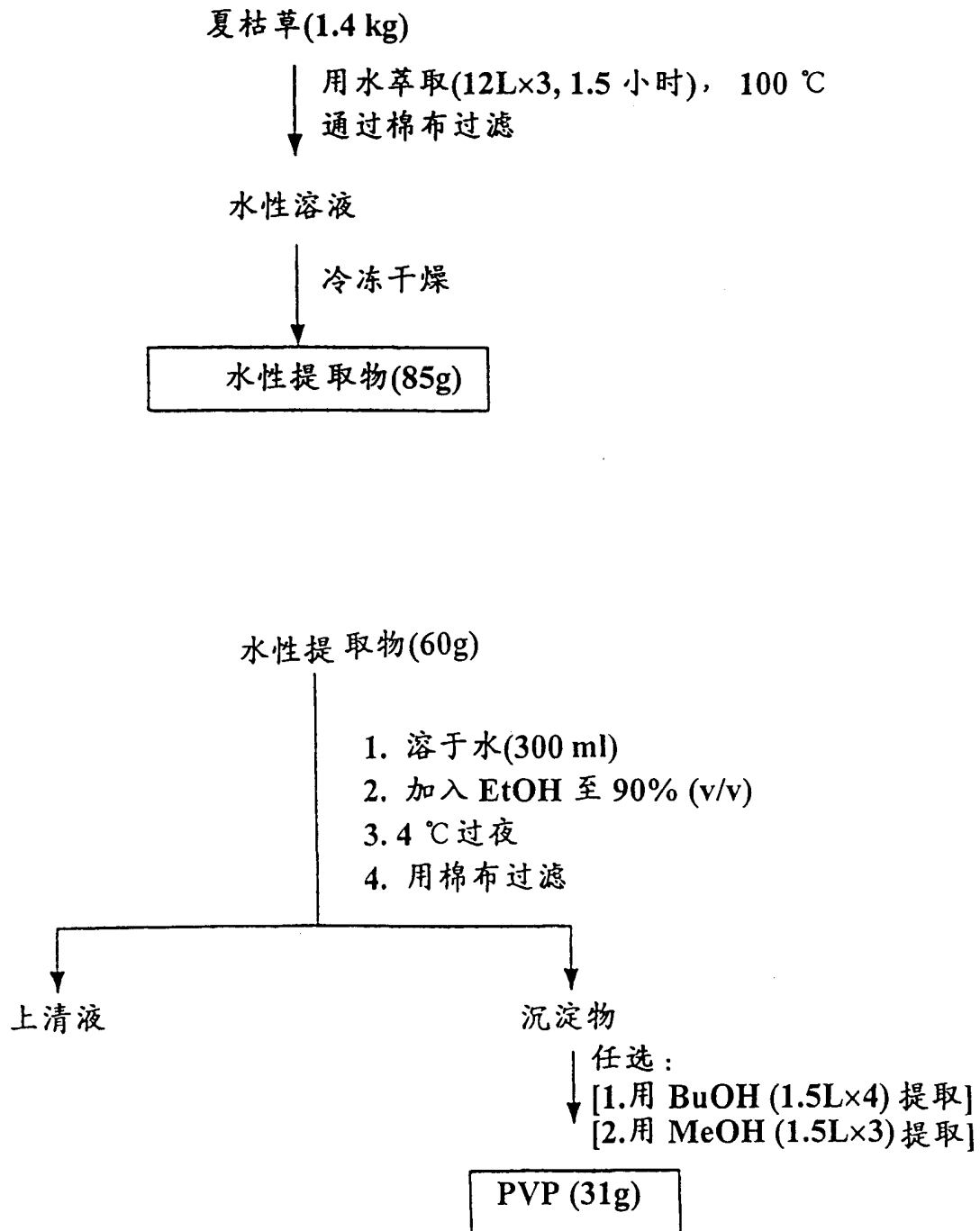
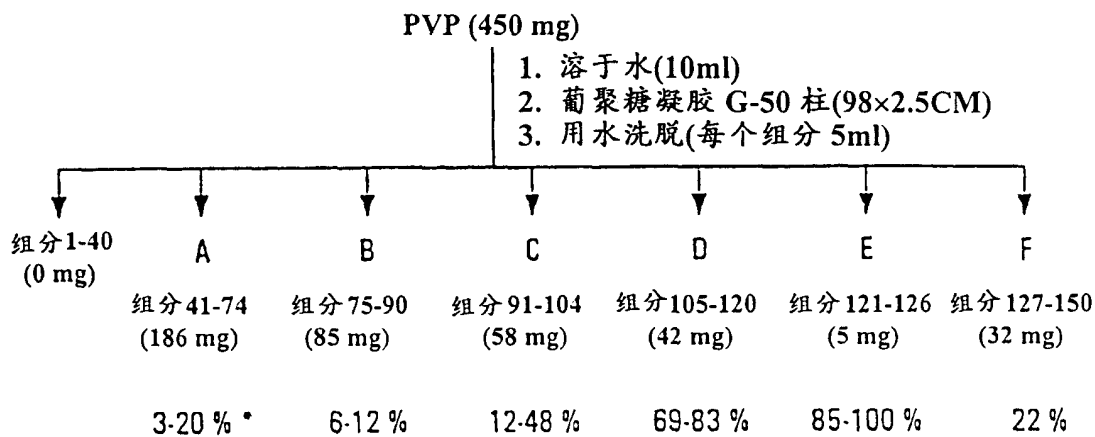


图 1

通过交联葡聚糖凝胶 G-50 柱分离活性抗-疱疹物质



(*在 25-50 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度时对 HSV-1 的抑制活性)

图 2

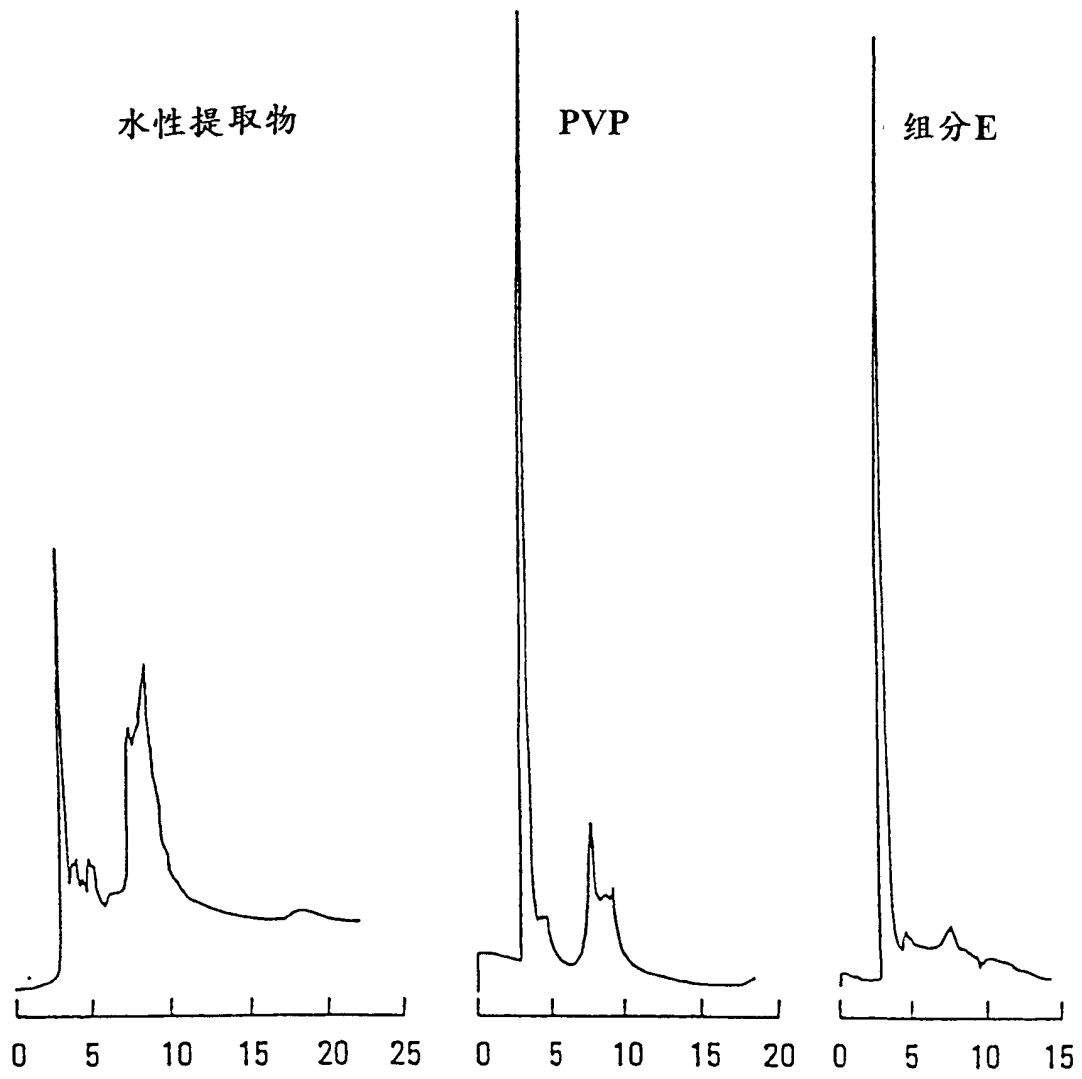


图 3A

图 3B

图 3C

XK 提取物对肠上皮细胞的细胞毒性评估

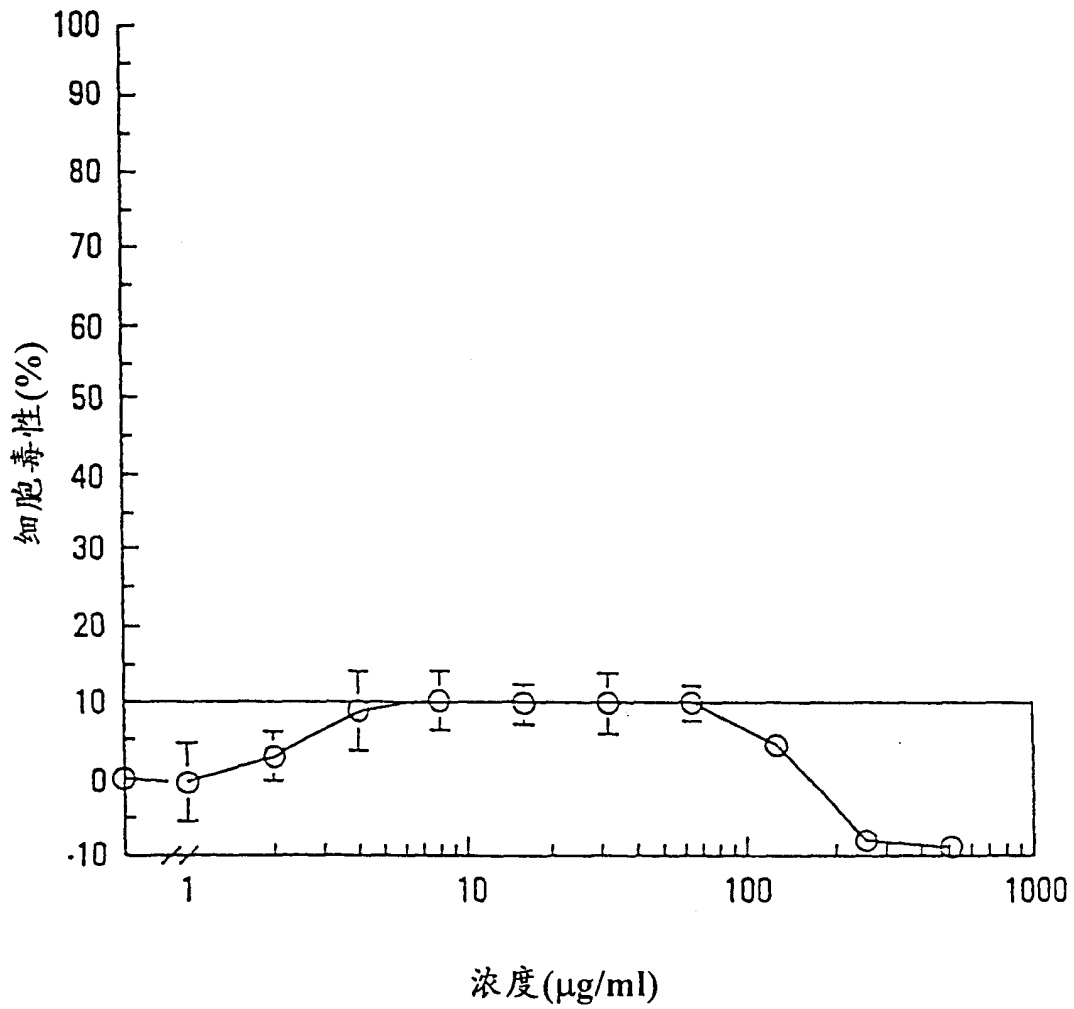
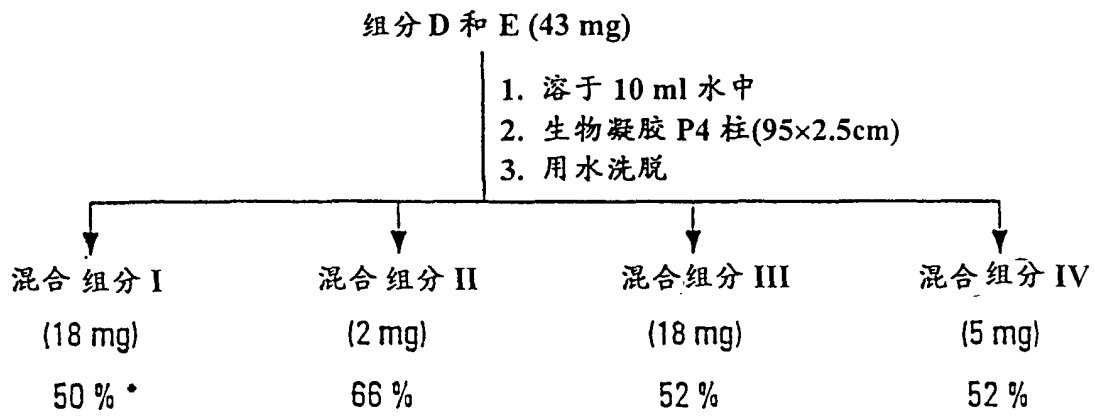


图 4

通过生物凝胶 P4 柱分离活性抗疱疹物质



(*在 10 $\mu\text{g/ml}$ 时对 HSV-1 的抑制活性)

图 5

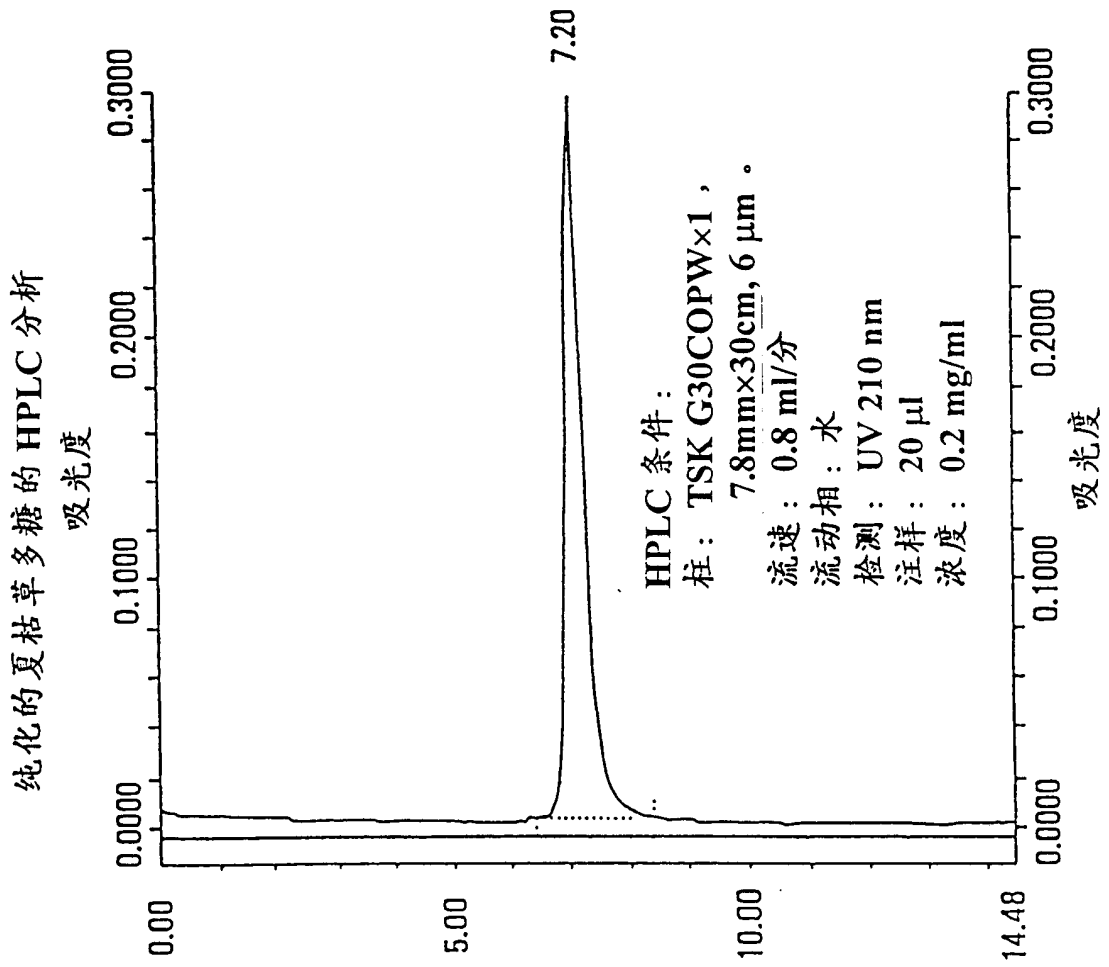


图 6

通过 HPLC 估算夏枯草多糖的分子量

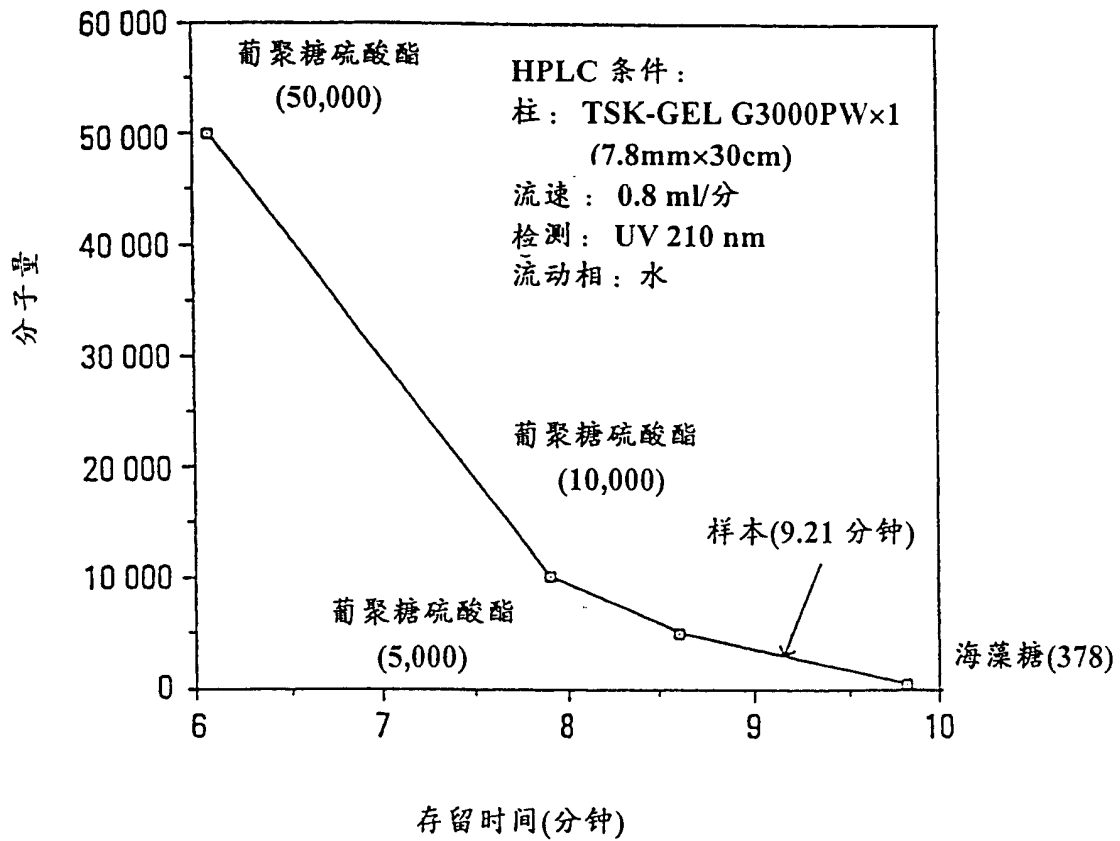


图 7