

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/225
A61K 31/335
A61K 31/357
A61P 31/14



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 03128729.8

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1200705C

[22] 申请日 2003.5.7 [21] 申请号 03128729.8
[71] 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院放
射医学研究所
地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号
[72] 发明人 董俊兴 张慧娟 屠爱萍
审查员 王晶晶

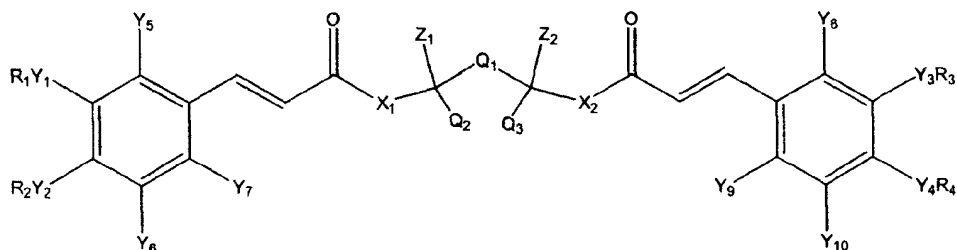
权利要求书 2 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 二咖啡酰奎尼酸衍生物及类似物在
治疗冠状病毒感染有关疾病中的用
途

[57] 摘要
本发明涉及二咖啡酰奎尼酸、二咖啡酰奎尼酸
衍生物在治疗冠状病毒有关疾病上的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 下式的二咖啡酰奎尼酸衍生物在制备用于治疗冠状病毒感染有关疾病的药物中的用途，



式 1

其中

Q_1 为一价键，或 CH_2 、 $CHOH$ 、 CH_2CH_2 、 CH_2CHOH 、 $CHOHCH_2$ 、 $CHCOOH$ 、 CH_2CH_2CHOH 、 $CHOHCH_2CH_2$ 、 $CH_2CHOHCH_2$ 、 $CH_2CHOHCHOH$ 或 $CHOHCHOHCH_2$ ；

Q_2 和 Q_3 可分别为 H 或合在一起表示 CH_2CH_2 、 CH_2CHOH 、 $CHOHCH_2$ 、 CH_2CH_2CHOH 、 $CHOHCH_2CH_2$ 、 $CH_2CHOHCH_2$ 、 $CH_2CHOHCHOH$ 、 $CHOHCHOHCH_2$ 、 $CH_2COH(COOH)CH_2$ 、 $CH_2CH_2COH(COOH)CH_2$ 或 $CH_2COH(COOH)CH_2CH_2$ ，从而形成环状结构，

X_1 为 O、NH、 CH_2 或 $CHCOOH$ ；

X_2 为 O、NH、 CH_2 或 $CHCOOH$ ；

Y_1 、 Y_2 、 Y_3 和 Y_4 各为一价键、O 或 NH；

当 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 和 Y_4 各为一价键时， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 为 CH_2COOH 、 CH_2CH_2COOH 或 $CH_2H_2CH_2COOH$ ；

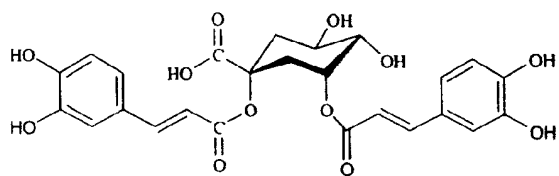
当 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 和 Y_4 各为 O 或 NH 时， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 为 H、 CH_3 、 CH_3CO 、 CH_3CH_2CO 或 $CH_3CH_2CH_2CO$ ；

Y_5 、 Y_6 、 Y_7 、 Y_8 、 Y_9 、 Y_{10} 为 H、Cl、Br 或 I；

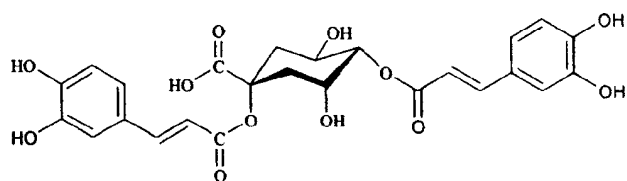
Z_1 和 Z_2 为 H、 $COOH$ 、 $COOM$ ，其中 M 表示 H、C1-6 烷基、苄基、碱金属或碱土金属。

2. 权利要求 1 的用途，当式 1 存在两对映体时，包括两对映体。

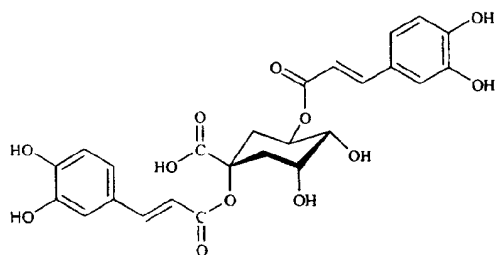
3. 根据权利要求 1 的用途，其中二咖啡酰奎尼酸衍生物为 1,3-二-O-咖啡酰奎尼酸、1,4-二-O-咖啡酰奎尼酸、1,5-二-O-咖啡酰奎尼酸、3,4-二-O-咖啡酰奎尼酸、3,5-二-O-咖啡酰奎尼酸、4,5-二-O-咖啡酰奎尼酸，它们的乙酰化衍生物及其相应的盐。



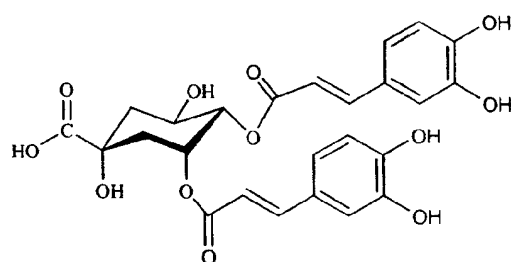
式 2: 1,3-二-O-咖啡酰奎尼酸



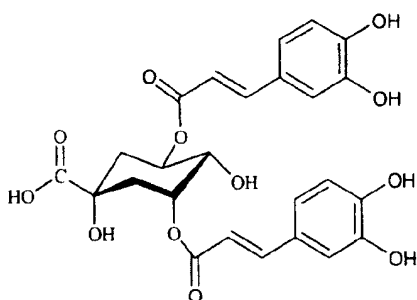
式 3: 1,4-二-O-咖啡酰奎尼酸



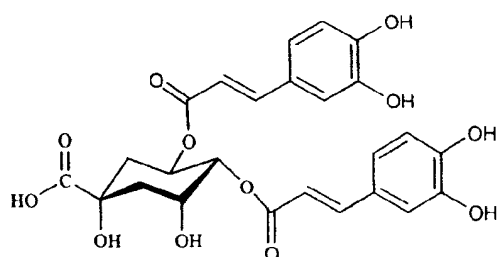
式 4: 1,5-二-O-咖啡酰奎尼酸



式 5: 3,4-二-O-咖啡酰奎尼酸



式 6: 3,5-二-O-咖啡酰奎尼酸



式 7: 4,5-二-O-咖啡酰奎尼酸

4. 根据权利要求 1 的用途, 其中二咖啡酰奎尼酸衍生物为 1,5-二-O-咖啡酰奎尼酸, 其乙酰化衍生物及相应的盐。

二咖啡酰奎尼酸衍生物及类似物在治疗冠状病毒感染有关疾病中的用途

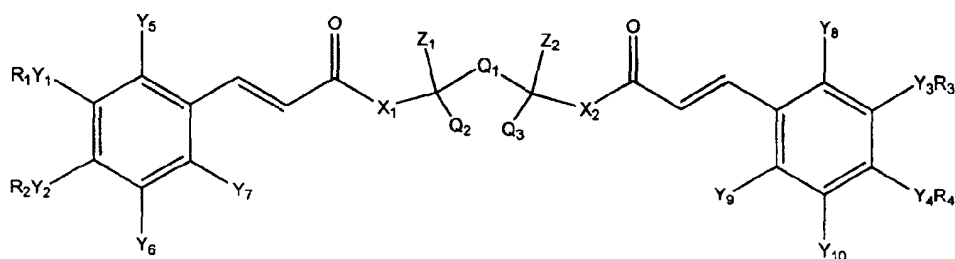
技术领域 本发明涉及二咖啡酰奎尼酸衍生物及类似物在治疗冠状病毒感染有关疾病中的新用途，新的二咖啡酰奎尼酸衍生物及类似物、含二咖啡酰奎尼酸或新的二咖啡酰奎尼酸衍生物及类似物的药物组合物。

背景技术 自 2002 年 11 月我国广东发现非典型肺炎以来，至 2003 年 5 月 5 日，世界上已有 30 个国家和地区，6583 人发病，461 人死亡。至 2003 年 5 月 6 日，我国有 4409 人发病，214 人死亡。2003 年 2 月由 WHO 将这种肺炎定义为重症急性呼吸综合症 (severe acute respiratory syndrome, SARS)。美国 CDC、加拿大、香港、德国和我国军事医学科学院的科学家分别用 Vero E6 和恒河猴胎细胞从不同器官和标本中分离出了冠状病毒样颗粒，说明该病毒与 SARS 的关系。由于越南河内 WHO 办公室的医生和流行病专家 Urbani 博士在 2 月 28 日检查河内不明原因肺炎患者时受到感染而病逝，因此，Ksiazek 等建议将此病毒命名为 Urbani SARS 相关冠状病毒 (Urbani SARS related coronavirus)。已知病毒唑 (利巴韦林) 和更昔洛韦等核苷类药物对冠状病毒有抑制作用，但目前还没有特效抗冠状病毒药物。

发明内容 本发明的目的是提供一类新的抗冠状病毒药物，其具有优良的疗效且毒副作用很低。

本发明人经广泛深入地研究，出人意料地发现二咖啡酰奎尼酸衍生物及类似物对冠状病毒有显著的抑制作用。本发明其于上述发现得以完成。

本发明第一个目的涉及式 1 (若存在对映体时，包括两对映体) 的二咖啡酰奎尼酸衍生物及类似物在制备用于治疗冠状病毒感染有关疾病的药物中的用途，



式 1

其中

Q_1 为一价键，或 CH_2 、 $CHOH$ 、 CH_2CH_2 、 CH_2CHOH 、 $CHOHCH_2$ 、 $CHCOOH$ 、 CH_2CH_2CHOH 、 $CHOHCH_2CH_2$ 、 $CH_2CHOHCH_2$ 、 $CH_2CHOHCHOH$ 、 $CHOHCHOHCH_2$ ；

Q_2 和 Q_3 可分别为 H 或合在一起表示 CH_2CH_2 、 CH_2CHOH 、 $CHOHCH_2$ 、 CH_2CH_2CHOH 、 $CHOHCH_2CH_2$ 、 $CH_2CHOHCH_2$ 、 $CH_2CHOHCHOH$ 、 $CHOHCHOHCH_2$ 、 $CH_2COH(COOH)CH_2$ 、 $CH_2CH_2COH(COOH)CH_2$ 、 $CH_2COH(COOH)CH_2CH_2$ ，从而形成环状结构。

X_1 为 O、NH、 CH_2 或 $CHCOOH$ ；

X_2 为 O、NH、 CH_2 或 $CHCOOH$;

Y_1 、 Y_2 、 Y_3 和 Y_4 各为一价键、O 或 NH;

当 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 和 Y_4 各为一价键时, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 为 CH_2COOH 、 CH_2CH_2COOH 、 $CH_2H_2CH_2COOH$ 等;

当 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 和 Y_4 各为 O 或 NH 时, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 为 H、 CH_3 、 CH_3CO 、 CH_3CH_2CO 、 $CH_3CH_2CH_2CO$ 等;

Y_5 、 Y_6 、 Y_7 、 Y_8 、 Y_9 、 Y_{10} 为 H、Cl、Br 或 I;

Z_1 和 Z_2 为 H、COOH、COOM, 其中 M 表示 H、C1-6 烷基、苄基或碱金属及碱土金属 (如: Li、Na、K、Mg、Ca、Ba) 等;

本发明的再一目的涉及的含式 1 化合物的药物组合物, 该药物组合物对冠状病毒有显著的抑制作用。根据本发明, 该药物组合物中可加有各种药用赋形剂、添加剂及载体。

根据本发明, 本发明的式 1 化合物或含式 1 化合物的药物组合物可用于治疗与冠状病毒有关的各种疾病, 尤其是非典型肺炎 (重症急性呼吸综合症, SARS)。

根据本发明, 本发明的药物组合物可按本领域已知方法配成肠道或非肠道给药的制剂, 如片剂、胶囊、颗粒剂、注射剂、喷雾剂、滴鼻剂等。

根据本发明, 本发明的式 1 化合物, 主要来自菊科、忍冬科等多种植物, 如旋覆花、金银花、吊子银花 *Lonicera similis* Hemsl.、葵花子、茵陈、菊花 *Chrysanthemum morifolium*、洒神菊 *Baccharis gaudichaudiana* DC.、茼蒿 *Chrysanthemum coronarium* L.、狭叶紫锥花 *Echinacea angustifolia* roots、菜蓟、灯盏花、紫菀 *Asterscaber* Thunb.、蜂胶、山莴苣 *Lactuca indica*、冬青属植物 *Ilex brevicuspis*、冬青属 *Ilex paraguariensis*、苦丁茶 *Ilex cornuta* Lindl.、*yacon* (*Smallanthus sonchifolius*)、咖啡豆、甘薯叶 *Ipomoea batatas* L.、甘薯 *Bixa orellana*、*Ipomoea batatas*、梔子、林荫千里光、土豆、*Artichoke* (*Cynara scolymus* L.)、*Arnica montana*、*Isertia pittieri*、*Artemisia vulgaris*、*Eleutherococcus senticosus*、*Eleutherococcus senticosus*、*Phagnalon rupestre*、*Cydonia oblonga* Miller (pulp and peel)、常春藤属 *Hedera helix*、*Canthium schimperianum*、鱼眼草属 *Dichrocephala bicolor*、*Guettarda acreana*、秘鲁植物 *Tessaria integrifolia* and *Mikania cordifolia*、*Pluchea symphytifolia*、*Quercus stenophylla* Makino、*Euphorbia resinifera* Berg、*Artemisia caruifolia*、genus *Leontodon*、leaves of *Corchorus olitorius* L.、*Tesaria intergrifolia*、*Mikania cardifolia* 等。或通过全合成或半合成方法制备。

根据本发明, 本发明优选的抗冠状病毒化合物为二咖啡酰奎尼酸。

根据本发明, 本发明最优选的抗冠状病毒化合物为 1,5-二-O-咖啡酰奎尼酸。

根据本发明, 二咖啡酰奎尼酸可从上述植物中通过以下提取路线制备:

植物 (旋覆花、金银花等) $\rightarrow$ 乙醇提取 $\rightarrow$ 乙酸乙酯萃取 $\rightarrow$ 柱层析分离。

根据本发明, 二咖啡酰奎尼酸可通过 3,4-二羟基被保护的咖啡酰氯与羟其被选择性保护的奎尼酸进行酯化反应制备。

下面将通过二咖啡酰奎尼酸的抗冠状病毒作用来进一步阐述本发明。

在 RDa 细胞培养内, 采用病毒 CPE 法, 观察不同浓度的二咖啡酰奎尼酸对冠状病毒的

抑制效果,试验结果表明二咖啡酰奎宁酸具有抑制冠状病毒的作用。

1 试验材料

1.1 验证药物:二咖啡酰奎宁酸 (DCQA)。

1.2 阳性对照药物:注射用更昔洛韦 批号:020802 由湖北科益药业股份有限公司提供。

1.3 细胞:肿瘤横纹肌传代细胞 (RD_a) 由 CDC 病毒所提供。

1.4 病毒:冠状病毒 9 号分离株 (SARS 病人咽拭子 9 号标本) 由 301 医院提供。

1.5 CO₂ 培养箱 NUAIR US AUTO FLOW 提供。

1.6 XSZ-D2) 由重庆光学仪器厂生产

2 试验方法

2.1 预备试验:

2.1.1 二咖啡酰奎宁酸对 RD_a 细胞的毒性测定

RD_a 细胞以 40 万/ml 浓度接种 96 孔培养板, 37℃、5%CO₂ 培养 24 小时, 加入验证药物, 验证药物二咖啡酰奎宁酸倍比稀释为 2000ug/ml~3.9ug/ml, 阳性对照药物更昔洛韦倍比稀释为 2000ug/ml~3.9ug/ml, 每浓度接种 3 孔, 每孔 100 μl, 同时设正常细胞对照, 37℃ 5% CO₂ 孵箱培养 6 天, 每天在倒置显微镜下观察细胞形态变化 (CPE), 以 25%以下形态变化为 “+”, 26%~50%形态变化为 “++”, 51%~75%形态变化为 “+++”, 76%~100%形态变化为 “++++”, 用 Reed-Muench 法, 计算药物半数中毒浓度 (TD₅₀) 和最大无毒浓度 (TD₀)。

2.1.2 在 RD_a 细胞培养内对冠状病毒 9 号的分离和毒力测定

冠状病毒 9 号的分离 (SARS 病人咽拭子分离):

RD_a 细胞以每毫升 40 万浓度接种试管, 37℃ 5%CO₂ 培养 24 小时, 弃掉培养液, 每管加入 SARS 病人咽拭子标本 9 号, 33℃转鼓培养 5 小时后, 加入维持液 1ml, 同时设正常细胞对照, 33℃转鼓培养 5~7 天。细胞形态出现 CPE 变化后, 采用 PCR 的方法检测冠状病毒, 9 号标本 PCR 检测为阳性, 确定为冠状病毒分离株。经免疫荧光测定双份 SARS 病人血清, IgM 阳性, IgG4 倍升高, 确定为冠状病毒。采用病毒 CPE 法测定其效价。

病毒 CPE 法:

RD_a 细胞以每毫升 40 万浓度接种 96 孔培养板, 37℃ 5%CO₂ 培养 24 小时, 加入病毒液, 病毒稀释 10⁻¹ ~ 10⁻⁸, 8 个浓度, 每浓度 3 孔, 每孔 100 μl, 设正常细胞对照, 37℃ 5%CO₂ 培养 5~7 天, 每 24 小时在倒置显微镜下观察记录细胞形态变化 (CPE): 以 25%以下变化为 “+”, 26%~50%变化为 “++”, 51%~75%为 “+++”, 76%~100%变化为 “++++”, 用 Reed-Muench 法, 计算病毒半数感染浓度 TCID₅₀。

2.2 正式试验

二咖啡酰奎宁酸在 RD_a 细胞培养内对冠状病毒 9 号的抑制作用

观察不同浓度的二咖啡酰奎宁酸在 RD_a 细胞培养内对冠状病毒 9 号的抑制作用, 试验采用病毒细胞 (CPE) 法, 计算药物的半数有效浓度 (IC₅₀) 和最小有效浓度 (MIC) 及治疗指数 TI, 判断药效。

RD_a 细胞以 40 万/ml 浓度接种 96 孔培养板, 37℃ 5% CO₂ 孵箱培养 24 小时, 细胞培

养至单层，弃掉培养液，加入 10 TCID₅₀ 的冠状病毒液，同时设正常细胞对照和病毒对照，置 37℃ 5% CO₂ 吸附 2.5 小时后，弃掉病毒液，加入不同浓度的二咖啡酰奎宁酸药液，药物选用对细胞的最大无毒浓度 (TD₀) 2 倍稀释 10 个浓度即 1000 μg/ml ~ 1.45 μg/ml，阳性对照药物更昔洛韦为 2 倍稀释 10 个浓度即 2000 μg/ml ~ 1.45 μg/ml，将稀释的药物分别加入细胞孔内，每浓度 3 孔，同时设正常细胞对照和病毒对照，置 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 5~7 天，逐日在倒置显微镜下观察病毒 CPE，以病毒对照出现+++ — ++++时结束试验，用 Reed - Muench 法，计算药物的半数有效浓度 (IC₅₀) 和最小有效浓度 (MIC) 及治疗指数 (TI) 判断药效，试验重复三次。

3 试验结果

3.1 预备试验结果：

二咖啡酰奎宁酸对 RDa 细胞的毒性作用：

二咖啡酰奎宁酸和阳性对照药物注射用更昔洛韦在 RDa 细胞培养内，采用细胞形态变化 (CPE) 法。计算药物最大无毒浓度 (TD₀) 和半数中毒浓度 (TD₅₀)，以下试验结果为三次试验结果的均值。

二咖啡酰奎宁酸对 RDa 细胞的毒性试验结果

二咖啡酰奎宁酸：最大无毒浓度 (TD₀) 为 1000 ± 0 μg/ml，半数中毒浓度 (TD₅₀) 为 2000 ± 0 μg/ml

阳性对照药物注射用更昔洛韦：最大无毒浓度 (TD₀) 为 >2000 ± 0 μg/ml，半数中毒浓度 (TD₅₀) 为 >2000 ± 0 μg/ml。

3.2 在 RDa 细胞培养内对冠状病毒 9 号毒力测定结果 (TCID₅₀)

冠状病毒 9 号：半数感染量 (TCID₅₀) 为 10⁻⁵

正式试验结果

二咖啡酰奎宁酸在 RDa 细胞培养内对冠状病毒 9 号的抑制作用 (以下试验数据为三次试验结果的均值)

二咖啡酰奎宁酸：CPE 法，药物半数有效浓度 (IC₅₀) 为 31.25 ± 0 μg/ml，最小有效浓度 (MIC) 为 62.5 ± 0 μg/ml，治疗指数 (TI) 为 16。

阳性对照药物注射用更昔洛韦：CPE 法，药物半数有效浓度 (IC₅₀) 为 15.6 ± 0 μg/ml，最小有效浓度 (MIC) 为 31.25 ± 0 μg/ml，治疗指数 (TI) 为 >64。