(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115916189 A
(43)申请公布日 2023.04.04

(21)申请号 202180031027.5

(22)申请日 2021.04.08

(30)优先权数据
63/008,529 2020.04.10 US
63/062,623 2020.08.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/026303 2021.04.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/207444 EN 2021.10.14

(71)申请人 伊格尔制药公司
地址 美国新泽西州

(72)发明人 阿德里安·赫普纳

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
专利代理师 金海霞 刘慧

(51)Int.Cl.
A61K 31/4178(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

(54)发明名称

治疗严重急性呼吸综合征的方法

(57)摘要

本公开涉及使用丹曲林或丹曲林前药或它们的药学上可接受的盐来治疗严重急性呼吸综合征的方法。

CN 115916189 A

1.一种治疗受试者的严重急性呼吸综合征的方法,所述方法包括将丹曲林或其药学上可接受的盐施用于所述受试者或者通过施用丹曲林前药或其药学上可接受的盐。

2.如权利要求1所述的方法,包括将丹曲林施用于所述受试者。

3.如权利要求1所述的方法,包括将丹曲林的药学上可接受的盐施用于所述受试者。

4.如权利要求1所述的方法,包括将丹曲林钠施用于所述受试者。

5.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中与基线相比,所述施用导致所述受试者的WHO序数量表评分降低至少1分。

6.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中与基线相比,所述施用导致所述受试者的序贯器官衰竭评估每日评分的改善。

7.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中与对照受试者中的发热正常化的时间相比,所述施用导致所述受试者中的发热正常化的时间减少。

8.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中与对照受试者中的氧饱和度正常化的时间相比,所述施用导致所述受试者中的氧饱和度正常化的时间减少。

9.一种用于抑制SARS-CoV在受试者中复制的方法,所述方法包括将丹曲林或其药学上可接受的盐施用于所述受试者或者通过施用丹曲林前药或其药学上可接受的盐。

10.如权利要求9所述的方法,包括将丹曲林施用于所述受试者。

11.如权利要求9所述的方法,包括将丹曲林的药学上可接受的盐施用于所述受试者。

12.如权利要求9所述的方法,包括将丹曲林钠施用于所述受试者。

13.一种用于抑制SARS-CoV在宿主细胞中复制、抑制SARS-CoV进入宿主细胞、抑制SARS-CoV病毒颗粒在宿主细胞中成熟或者抑制SARS-CoV从宿主细胞释放的方法,所述方法包括将丹曲林或其药学上可接受的盐施用于所述宿主细胞或者通过施用丹曲林前药或其药学上可接受的盐。

14.如权利要求13所述的方法,包括将丹曲林施用于所述宿主细胞。

15.如权利要求13所述的方法,包括将丹曲林的药学上可接受的盐施用于所述宿主细胞。

16.如权利要求13所述的方法,包括将丹曲林钠施用于所述宿主细胞。

17.一种用于降低SARS-CoV的感染性的方法,所述方法通过将丹曲林或其药学上可接受的盐施用于宿主细胞或者通过施用丹曲林前药或其药学上可接受的盐来进行。

18.如权利要求17所述的方法,包括将丹曲林施用于所述宿主细胞。

19.如权利要求17所述的方法,包括将丹曲林的药学上可接受的盐施用于所述宿主细胞。

20.如权利要求17所述的方法,包括将丹曲林钠施用于所述宿主细胞。

治疗严重急性呼吸综合征的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年4月10日提交的美国临时专利申请号63/008,529和2020年8月7日提交的美国临时专利申请号63/062,623的优先权和权益,这两件临时专利申请的公开内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及使用丹曲林或丹曲林前药或它们的药学上可接受的盐来治疗严重急性呼吸综合征的方法。

背景技术

[0004] 严重急性呼吸综合征(SARS)是由SARS相关冠状病毒(SARS-CoV)(例如,SARS-CoV-1和SARS-CoV-2)导致的病毒性呼吸系统疾病。SARS-CoVs已经对全球公共卫生构成了威胁。需要开发有效治疗这些病毒的治疗方法。

发明内容

[0005] 本公开涉及治疗受试者的严重急性呼吸综合征的方法,所述方法包括将丹曲林或其药学上可接受的盐施用于所述受试者或者通过施用丹曲林前药或其药学上可接受的盐。

[0006] 本公开还涉及用于抑制SARS-CoV在受试者中复制的方法,所述方法包括将丹曲林或其药学上可接受的盐施用于所述受试者或者通过施用丹曲林前药或其药学上可接受的盐。

[0007] 本公开还涉及用于抑制SARS-CoV在宿主细胞中复制、抑制SARS-CoV进入宿主细胞、抑制SARS-CoV病毒颗粒在宿主细胞中成熟或者抑制SARS-CoV从宿主细胞释放的方法,所述方法包括将丹曲林或其药学上可接受的盐施用于所述宿主细胞或者通过施用丹曲林前药或其药学上可接受的盐。

[0008] 本公开还涉及用于降低SARS-CoV的感染性的方法,所述方法通过将丹曲林或其药学上可接受的盐施用于宿主细胞或者通过施用丹曲林前药或其药学上可接受的盐来进行。

具体实施方式

[0009] 通过参考以下具体实施方式以及附图和实施例可以更容易地理解本公开,这些附图和实例形成本公开的一部分。应当理解,本公开不限于本文描述和/或显示的特定组合物、装置、方法、应用、条件或参数,并且本文使用的术语是用于仅以举例的方式描述特定实施方案的目的,并且不旨在限制要求保护的公开。

[0010] 如在包括所附权利要求的说明书中所用,除非上下文另外明确指明,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数,并且对特定数值的引用包括至少该特定值。

[0011] 当表示值的范围时,示例性实施方案包括从一个特定值和/或至另一个特定值。所有范围都包括端值在内并且是可组合的。此外,对范围内所述的值的引用包括该范围内的

每一个值。当通过使用介词“约”将值表示为近似值时，应当理解特定值形成另一个实施方案。如本文所用，术语“约”在提及可测量的值诸如量、持续时间等等时，意在涵盖该值例如从指定值的±10％的合理变化。例如，短语“约50％”可以包括50的±10％，或从45％至55％，包括50％。

[0012] 应当理解，为清晰起见，本文在单独的实施方案的上下文中描述的本公开的某些特征也可以在单个实施方案中以组合提供。相反，为简洁起见，在单个实施方案的上下文中描述的本公开的各种特征也可以单独或以任何子组合提供。

[0013] 如本文所用，无论是单独使用还是与另一个或多个术语组合使用，应当理解，短语“治疗方法”和“治疗的方法”可以与短语“用于治疗”特定疾病可互换使用。

[0014] 如本文所用，无论是单独使用还是与另一个或多个术语组合使用，“药学上可接受的”表示指定的实体例如药学上可接受的赋形剂，通常与组合物中的其他成分在化学上和/或在物理上相容，以及/或者通常与它们的接受者在生理上相容。

[0015] 如本文所用，无论是单独使用还是与另一个或多个术语组合使用，“受试者”、“个体”和“患者”是指哺乳动物，包括人。术语人是指并且包括人类儿童、青少年或成人。

[0016] 如本文所用，无论是单独使用还是与另一个或多个术语组合使用，“治疗(treats、treating、treated和treatment)”是指并且包括改善、姑息和/或治疗使用和结果，或者它们的任何组合。在其他实施方案中，本文所述的方法可以预防性使用。应当理解，“预防”或预防性使用或结果并不指也不需要绝对或完全预防(即，100％的预防性或保护性使用或结果)。如本文所用，预防或预防性使用或结果是指化合物或组合物的施用减少或降低本文所述的特定病症、症状、障碍或疾病的严重性；减少或降低经历本文所述的特定病症、症状、障碍或疾病的可能性；或者延迟本文所述的特定病症、症状、障碍或疾病的发作或复发(再发)；或者前述的任何组合的使用和结果。

[0017] 如本文所用，无论是单独使用还是与另一个或多个术语组合使用，“治疗”和“治疗有效量”是指(a)治疗本文所述的特定病症、症状、障碍或疾病；(b)减弱、改善或消除本文所述的特定病症、障碍或疾病的一种或多种症状；(c)延迟本文所述的特定病症、症状、障碍或疾病的发作或复发(再发)的化合物或组合物的量。应当理解，术语“治疗”和“治疗有效”涵盖前述效果(a)-(c)中的任一者，单独或与任何其他效果(a)-(c)的组合。

[0018] 如本文所用，“宿主细胞”是例如上皮细胞，例如肺上皮细胞，例如哺乳动物肺上皮细胞，诸如人肺上皮细胞。其他宿主细胞包括白细胞，例如巨噬细胞和T细胞。

[0019] 如本文所用，“发热正常化”是受试者的温度降低至<36.6℃腋窝、<37.2℃口腔或<37.8℃直肠，持续至少24小时。

[0020] 如本文所用，“氧饱和度正常化”是受试者的外周毛细血管氧饱和度(SpO2)增加>94％，持续至少24小时。

[0021] 如本文所用，“抑制SARS-CoV的复制”是指降低SARS-CoV的病毒载量。本领域的技术人员可以确定用于确定SARS-CoV复制抑制的方法。

[0022] 丹曲林已被批准用于治疗恶性高热和预防高风险患者的恶性高热。恶性高热是易感个体在暴露于有效挥发性麻醉剂(氟烷、异氟醚、七氟醚、地氟醚等)和骨骼肌松弛剂琥珀酰胆碱时易发生危及生命的不良反应的病症。麻醉药物触发Ca^{2+}通过兰诺定受体(RyR)从内质网(ER)的不受控制的释放，这导致肌浆Ca^{2+}的快速持续升高。丹曲林的施用通过抑制ER中

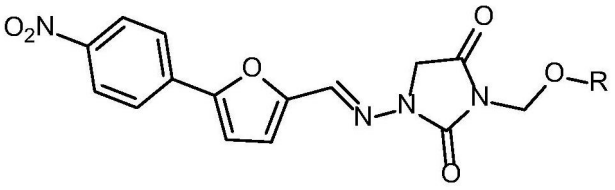
的释放通道来重新建立细胞钙稳态，这导致胞内Ca^{2+}的水平降低。

[0023] RYANODEX(丹曲林钠，250mg/小瓶)已被批准用于治疗恶性高热和预防高风险患者的恶性高热。RYANODEX在用5mL USP无菌注射用水(WFI)(不含抑菌剂)重构后形成含有50mg/mL丹曲林的用于静脉内注射的水性纳米混悬剂。RYANODEX混悬剂在人血浆中的溶解非常迅速，在1分钟内实现完全溶解。

[0024] 丹曲林是一种出乎意料有效的SAR-CoV感染的治疗方法。丹曲林可以降低病毒复制、成熟、产生病毒颗粒、从细胞释放和/或感染其他细胞的能力。

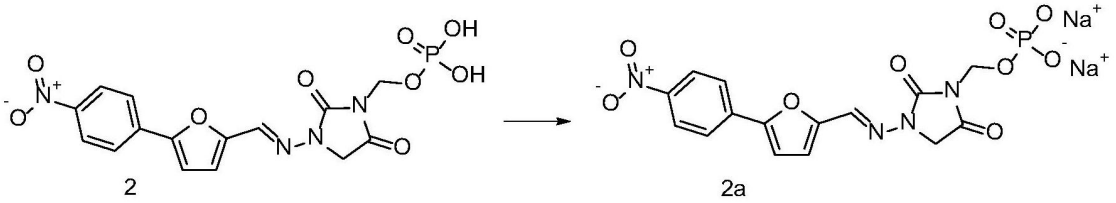
[0025] 本公开的方法也可以使用丹曲林前药以及它们的药学上可接受的盐来实现。示例性丹曲林前药在WO2019/079721中有所描述，该专利的全部内容以引用的方式并入本文。

[0026] 优选的丹曲林前药包括例如式I的化合物

[0027] 

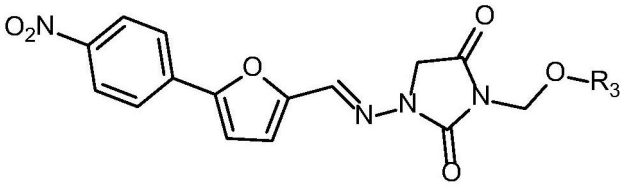
I

[0028] 其中R是-P(O)(OH)$_2$或-P(O)(OR_1)(OR_2)；R_1是H、-C_{1-26}烷基、芳基、C_{1-6}烷基C(O)OC_{1-26}烷基、-C_1烷基OC(O)C_{1-26}烷基或C_1烷基OC(O)OC_{1-26}烷基；并且R_2是-C_{1-26}烷基、芳基、C_{1-6}烷基C(O)O-C_{1-26}烷基、-C_1烷基OC(O)C_{1-26}烷基或C_1烷基OC(O)OC_{1-26}烷基，以及它们的药学上可接受的盐。特别优选的式I的化合物包括化合物2和2a：

[0029] 

2 2a

[0030] 其他丹曲林前药包括式II的化合物

[0031] 

II

[0032] 其中R_3是H、-C(O)-Z-N(R_4)(R_5)、-C(O)Z-C(O)-OH或-C(O)-NH-Y-CH_2-OC(O)-Z-C(O)-OH；Z是C_{1-6}烷基；Y是亚芳基；C_{1-6}烷基；R_5是H或C_{1-6}烷基；或者R_4和R_5与它们所连接的氮一起形成杂环烷基；以及它们的药学上可接受的盐。

[0033] 本发明的一个方面涉及治疗受试者的SARS的方法。受试者可以被临床诊断为SARS。用于诊断受试者患有SARS的标准是已知的，并且包括使用PCR确定的SARS-CoV感染的实验室确认，并结合一种或多种SARS症状的表现。还可以使用用于确定SARS-CoV感染的其他测定法。SARS的症状包括轻度至重度呼吸系统疾病，伴有发热、咳嗽和呼吸急促的症状。一些SARS患者可以在一侧或双侧肺出现肺炎。一些SARS患者可以出现多器官衰竭。

[0034] 在一些方面，根据例如与另一个已经被临床诊断为SARS或已经被临床诊断为SARS-CoV感染的人有过密切接触，受试者可以被怀疑患有SARS。根据受试者的症状表现，其他受试者可以被怀疑患有SARS。

[0035] 在一些方面，通过将丹曲林施用于受试者来治疗受试者的SARS。在其他方面，通过将丹曲林的药学上可接受的盐，例如丹曲林钠，施用于受试者来治疗受试者的SARS。在一些方面，通过将丹曲林前药，例如化合物2，施用于受试者来治疗受试者的SARS。在一些方面，通过将丹曲林前药的盐，例如化合物2a，施用于受试者来治疗受试者的SARS。优选地施用治疗有效量的丹曲林、丹曲林的药学上可接受的盐、丹曲林前药或丹曲林前药的盐。治疗有效量包括例如约1mg/kg至10mg/kg，每天施用，持续一天或多天。特别优选的量包括约1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或约10mg/kg，每天施用，一剂或多剂，持续一天或多天。

[0036] 在一些方面，与在基线处受试者的WHO序数量表评分相比，施用导致受试者的WHO序数量表评分降低至少1分。评估WHO序数量表评分的方法是本领域已知的。在一些方面，与在基线处受试者的WHO序数量表评分相比，施用导致受试者的WHO序数量表评分降低2分。在一些方面，与在基线处受试者的WHO序数量表评分相比，施用导致受试者的WHO序数量表评分降低3分。在一些方面，与在基线处受试者的WHO序数量表评分相比，施用导致受试者的WHO序数量表评分降低4分。在一些方面，与在基线处受试者的WHO序数量表评分相比，施用导致受试者的WHO序数量表评分降低5分。

[0037] 在一些方面，施用导致改善，例如，与基线相比，受试者的序贯器官衰竭评估每日评分增加。评估受试者的序贯器官衰竭评估每日评分的方法是本领域已知的。

[0038] 在一些方面，与对照组受试者的发热正常化的时间相比，例如，与仅接受护理治疗标准的受试者相比，施用导致受试者的发热正常化的时间减少。在一些方面，施用导致接受SARS治疗的受试者的发热减少。在其他方面，施用导致受试者的发热在临床上显著减少。在一些方面，施用导致受试者的发热正常化。

[0039] 在一些方面，与对照组受试者的氧饱和度正常化的时间相比，例如，与仅接受护理治疗标准的受试者相比，施用导致受试者的氧饱和度正常化的时间减少。在一些方面，施用导致受试者的氧饱和度增加。在其他方面，施用导致受试者的氧饱和度在临床上显著增加。在其他方面，施用导致受试者的氧饱和度正常化。

[0040] 在另外其他方面，施用导致受试者的SARS的一种或多种症状改善。在其他方面，施用导致受试者的SARS的一种或多种症状在临床上显著改善。

[0041] 本公开的其他方面涉及抑制SARS-CoV在受试者中复制的方法。受试者可以被临床诊断为SARS-CoV感染。用于诊断受试者患有SARS-CoV感染的标准是已知的，并且包括使用PCR确定的实验室确认。还可以使用用于确定SARS-CoV感染的其他测定法。

[0042] 在一些方面，根据例如与另一个已经被临床诊断为SARS或已经被临床诊断为SARS-CoV感染的人有过密切接触，受试者可以被怀疑患有SARS-CoV感染。

[0043] 在一些方面，通过将丹曲林施用于受试者来实现对受试者中SARS-CoV复制的抑制。在其他方面，通过将丹曲林的药学上可接受的盐，例如丹曲林钠，施用于受试者来实现对受试者中SARS-CoV复制的抑制。在一些方面，通过将丹曲林前药，例如化合物2，施用于受试者来实现对受试者中SARS-CoV复制的抑制。在一些方面，通过将丹曲林前药的盐，例如化合物2a，施用于受试者来实现对受试者中SARS-CoV复制的抑制。优选地施用治疗有效量的丹曲林、丹曲林的药学上可接受的盐、丹曲林前药或丹曲林前药的盐。治疗有效量包括例如约1mg/kg至10mg/kg，每天施用，持续一天或多天。特别优选的量包括约1、1.5、2、2.5、3、

3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或约10mg/kg，每天施用，一剂或多剂，持续一天或多天。

[0044] 本公开的一些方面涉及用于抑制SARS-CoV在宿主细胞中复制的方法。本领域的技术人员可以确定病毒复制的抑制。在这些方法中，通过将丹曲林施用于宿主细胞来抑制复制。在其他方面，通过将丹曲林的药学上可接受的盐，例如丹曲林钠，施用于宿主细胞来抑制复制。在一些方面，通过将丹曲林前药，例如化合物2，施用于宿主细胞来抑制复制。在一些方面，通过将丹曲林前药的盐，例如化合物2a，施用于宿主细胞来抑制复制。

[0045] 本公开的一些方面涉及用于抑制SARS-CoV进入宿主细胞的方法。对病毒进入宿主细胞的抑制可由本领域技术人员确定。在这些方法中，通过将丹曲林施用于宿主细胞来抑制病毒进入。在其他方面，通过将丹曲林的药学上可接受的盐，例如丹曲林钠，施用于宿主细胞来抑制病毒进入。在一些方面，通过将丹曲林前药，例如化合物2，施用于宿主细胞来抑制病毒进入。在一些方面，通过将丹曲林前药的盐，例如化合物2a，施用于宿主细胞来抑制病毒进入。

[0046] 本公开的一些方面涉及用于抑制SARS-CoV病毒颗粒在宿主细胞中成熟的方法。对病毒颗粒在宿主细胞中成熟的抑制可由本领域技术人员确定。在这些方法中，通过将丹曲林施用于宿主细胞来抑制病毒颗粒成熟。在其他方面，通过将丹曲林的药学上可接受的盐，例如丹曲林钠，施用于宿主细胞来抑制病毒颗粒成熟。在一些方面，通过将丹曲林前药，例如化合物2，施用于宿主细胞来抑制病毒颗粒成熟。在一些方面，通过将丹曲林前药的盐，例如化合物2a，施用于宿主细胞来抑制病毒颗粒成熟。

[0047] 本公开的一些方面涉及用于使SARS-CoV从宿主细胞释放的方法。对从宿主细胞释放的抑制可由本领域技术人员确定。在这些方法中，通过将丹曲林施用于宿主细胞来抑制病毒释放。在其他方面，通过将丹曲林的药学上可接受的盐，例如丹曲林钠，施用于宿主细胞来抑制病毒释放。在一些方面，通过将丹曲林前药，例如化合物2，施用于宿主细胞来抑制病毒释放。在一些方面，通过将丹曲林前药的盐，例如化合物2a，施用于宿主细胞来抑制病毒释放。

[0048] 本公开的一些方法涉及用于降低SARS-CoV的感染性的方法。本领域的技术人员可以确定感染性的降低。在这些方法中，通过将丹曲林施用于宿主细胞来降低感染性。在其他方面，通过将丹曲林的药学上可接受的盐，例如丹曲林钠，施用于宿主细胞来降低感染性。在一些方面，通过将丹曲林前药，例如化合物2，施用于宿主细胞来降低感染性。在一些方面，通过将丹曲林前药的盐，例如化合物2a，施用于宿主细胞来降低感染性。

[0049] 提供以下实施例以展示本公开中描述的一些概念。虽然每个实施例都被认为提供了公开的具体单个实施方案，但是不应认为这些实施例限制了本文所述的更一般的实施方案。在以下实施例中，已经努力确保关于使用的数字(例如量、温度等)的准确性，但是应考虑一些实验误差和偏差。

[0050] 实施例

[0051] 实施例1

[0052] 方法

[0053] 该研究是丹曲林用于静脉内施用(IV)的COVID-19的辅助治疗方法的单中心、开放标签、双实验组平行研究。在一个治疗实验组中，丹曲林将按照为COVID-19患者的住院治疗

制定的医疗实践和程序与目前的护理标准联合施用。在第二治疗实验组中，受试者将按照为COVID-19患者的住院治疗制定的医疗实践和程序接受目前的护理标准。

[0054] 在对受试者进行初步分类和初步评估后，将记录受试者的基线状态。一旦获得合格标准和基线状态，即可开始丹曲林的施用。

[0055] A组：丹曲林，作为对护理标准的补充

[0056] B组：仅护理标准

[0057] 治疗方法施用-A组

[0058] 随机分配到A组的合格COVID-19受试者将按照下文所述接受丹曲林(如RYANODEX，丹曲林钠)：

[0059] • 1mg/kg剂量将以静脉内推注施用，大约每12小时一次，连续2天(研究第1天和第2天)。

[0060] • 在研究的第3天，对1mg/kg剂量表现出足够耐受性的受试者将开始在研究的剩余部分(研究第3天至第14天，包括首尾两天)接受大约每12小时一次静脉内推注2mg/kg剂量。足够耐受性被定义为缺乏临床上显著的不良反应，这些反应可以对受试者的整体状态产生负面影响，这些负面影响并非继发于COVID-19、任何其他潜在病症或伴随药物。

[0061] • 如果患者未对2mg/剂量表现出足够耐受性，受试者将退出研究。

[0062] • 参与研究的每位受试者将接受最多4(四)剂1mg/kg剂量(第1-2天)和最多24(二十四)剂2mg/kg剂量(第3-14天)，每剂以静脉内推注施用(最多一分钟)。

[0063] 接受丹曲林的受试者将继续按照处方接受所有其他治疗方法，但排除标准中包括的治疗方法除外。每个剂量施用前和施用后10分钟内应清晰记录生命体征(血压、心率、呼吸率、体温)的评估。

[0064] B组

[0065] 随机分配到B组的患者将按照可接受的医疗实践接受护理标准。

[0066] 研究阶段

[0067] 该研究将包括2个阶段：筛选和治疗。

[0068] 在筛选阶段期间，将进行合格和基线评估。在研究程序开始之前将获得知情同意书。

[0069] 在确定合格并获得知情同意后，合格的患者将被随机分配到A组或B组，治疗阶段将开始，并且将按照上文针对A组所述进行研究药物的施用。不合格的受试者将按照批准的医疗实践接受主治医生认为必要的医疗协助。

[0070] 停止研究药物

[0071] 如果受试者表现出丹曲林毒性的临床显著体征/症状，则应停止研究药物。丹曲林毒性可以包括肌肉无力和意识状态的改变(例如嗜睡、镇静)、呕吐、腹泻和结晶尿，这些毒性不可归因于其他原因，诸如COVID-19的进展、其他潜在病症(例如，败血症、缺氧、不受控制的糖尿病)和/或伴随药物(例如，镇静剂、抗生素、退热药)。可以随时停止研究药物。

[0072] 诊断和主要纳入标准

[0073] 如果男性或未怀孕女性受试者被诊断患有COVID-19并且在筛选时满足所有以下标准，即可将他们纳入研究：

[0074] • 至少18岁。

[0075] • 愿意并且能够在进行研究程序之前提供书面知情同意书，或者如果受试者不能提供，授权代表愿意并且能够代表患者提供同意书。

[0076] • 根据严重度的WHO序数量表，COVID-19严重度评分为3-5分

[0077] • 在筛选前7天内出现COVID-19症状。

[0078] • 住院患者。

[0079] • 在筛选前48小时内通过PCR或其他商业或公共卫生测定法确定为实验室确认的SARS-CoV-2感染。

[0080] • 在同意后至少48小时内记录有以温度≥36.6℃腋窝、≥37.2℃口腔或≥37.8℃直肠定义的发热。

[0081] 如果男性或非怀孕女性受试者在筛选时符合以下标准中的任一者，则将他们排除在本研究之外：

[0082] • 参与任何其他COVID-19实验性治疗方法的临床试验。

[0083] • 丙氨酸氨基转移酶(ALT)或天冬氨酸氨基转移酶(AST)>5X正常上限(ULN)。

[0084] • 孕妇或哺乳期妇女。

[0085] • 存在暗示不良预后的合并症(根据临床判断)。

[0086] • 对丹曲林过敏。

[0087] 剂量和施用方式

[0088] Ryanodex:(丹曲林钠)注射用混悬剂;250mg/小瓶，用5mL无菌注射用水(不含抑菌剂)重构，得到50mg/mL混悬剂;如方案中所述，以1mg/kg或2mg/kg快速静脉内推注施用。

[0089] 功效将根据以下标准进行评估：

[0090] • 世界卫生组织(WHO)序数量表严重度评分。

[0091] • 序贯器官衰竭评估(SOFA)评分。

[0092] • 发热正常化的时间长度(发热正常化被定义为温度<36.6℃腋窝、<37.2℃口腔或<37.8℃直肠，持续至少24小时)。

[0093] • 氧饱和度正常化的时间长度(氧饱和度正常化被定义为外周毛细血管氧饱和度(SpO2)>94％，持续至少24小时)。与基线相比，使用WHO序数量表评估的在第14天的临床状态变化(1-8分)。

[0094] 1:门诊。无活动限制

[0095] 2:门诊。有活动限制

[0096] 3:住院，轻度疾病。不提供氧气治疗

[0097] 4:住院，轻度疾病。通过面罩或鼻管提供氧气

[0098] 5:住院，重度疾病。提供非侵入性通气或高流量氧气

[0099] 6:住院，重度疾病。提供插管和机械通气

[0100] 7:住院，重度疾病。通气+额外器官支持(加压器、肾脏替代疗法、体外膜氧合)

[0101] 8:死亡

[0102] • 与基线相比，使用WHO序数量表评估的在第5天和第10天的临床状态变化(1-8分)。

[0103] • WHO序数量表评分降低1分的时间。

[0104] • 与基线相比，序贯器官衰竭评估(SOFA)每日评分(第1-14天)的变化。

[0105] • 发热正常化的时间长度(发热正常化被定义为温度<36.6℃腋窝、<37.2℃口腔或<37.8℃直肠,持续至少24小时)。

[0106] • 氧饱和度正常化的时间长度(氧饱和度正常化被定义为外周毛细血管氧饱和度(SpO2)>94%,持续至少24小时)。

[0107] 将对安全性进行评估,并且安全性将包括以下指标(如果有的话)的测量和观察:

[0108] • 生命体征(心率、血压、呼吸率、体温)

[0109] • 临床实验室检验(血液学和血液化学)

[0110] • ECG监测

[0111] • 氧饱和度

[0112] • 体格检查

[0113] 实施例2

[0114] 测试丹曲林浓度:5、10、20、30、40、50和100μM(如RYANODEX,丹曲林钠)。

[0115] 针对SARS-CoV-2病毒的测试代表COVID-19全球大流行病的病原体。测试通过标准病毒中和(VN)测定法来进行,该测定法评估中和SARS-CoV-2的能力。

[0116] 病毒中和(VN)测定法。使用对SARS-CoV-2感染敏感的Vero E6细胞进行VN测定法。在VN测定法前一(1)至三(3)天,将细胞接种于96孔板中,并且在37℃和5%CO_2下温育。在测定法当天,Vero E6细胞的单层达到至少70%至80%汇合,以运行VN。用于VN的化合物的制备在测定法当天进行。用无血清培养基将化合物稀释至所期望的起始浓度(1:10),然后在无血清培养基中连续稀释2倍。

[0117] 病毒的标准化要求事先运行TCID50以确定每毫升病毒储备液中感染性病毒颗粒的浓度。使用TCID50滴度进行计算以确定需要向病毒储备液中添加多少无血清培养基才能获得1e2 TCID50/mL。一旦制备好标准化病毒,即可将等体积的病毒添加至含有稀释化合物样品的96孔深孔板中。保持温育至少一小时。然后将病毒/化合物混合物从96孔深孔板架转移至适当的Vero接种的96孔板中。在添加后,将板送回37℃和5%CO_2培养箱中培养三(3)至五(5)天至六(6)天。在温育期后,在相差倒置镜下观察孔,并且对细胞中是否存在SARS-CoV-2细胞病变效应(CPE)进行评分。滴度是抑制病毒感染(不显示CPE的细胞)的丹曲林的最终稀释度的倒数,即,最低有效滴度是在所有时间点持续抑制病毒感染(不显示CPE的细胞)的丹曲林的最终稀释度。

[0118] 每个板上都具有若干用于VN测定法的对照。首先,提供无病毒的化合物对照以确保化合物本身不引起CPE;使用系列中的化合物的最低稀释度(通常为1:10)和测试浓度的其他连续稀释度来进行该对照。还提供阴性对照孔(无化合物或病毒)以验证无血清培养基不引起CPE。此外,还进行病毒的反滴定,作为病毒的阳性CPE对照,它用于验证标准化病毒的滴度是否在可接受的范围内。如果所有这些对照都符合它们的接受标准,则该板上的样品的结果被认为是有效的。

[0119] 不希望受任何特定理论的限制,据信丹曲林调节胞内Ca^{2+},包括通过此前未报道的机制,从而影响SARS-CoV-2病毒例如感染细胞、复制、成熟、产生病毒颗粒或从细胞释放的能力。

[0120] 实施例3

[0121] 测试丹曲林浓度:5、10、20、30、40、50和100μM(如RYANODEX,丹曲林钠)。

[0122] 针对SARS-CoV-2病毒的测试代表COVID-19全球大流行病的病原体。测试通过标准病毒中和(VN)测定法来进行,该测定法评估中和SARS-CoV-2的能力。

[0123] 病毒中和(VN)测定法。使用对SARS-CoV-2感染敏感的Vero E6细胞(非洲绿猴细胞系)进行VN测定法。Vero E6细胞在生长培养基(补充有5%FBS(胎牛血清)、Glutamax和PSN(青霉素、链霉素和新霉素)的Dulbecco改良的Eagle培养基)中培养。在VN测定法前一天将细胞接种至96孔深孔板中,并且在37℃和5%CO_2下温育,以允许细胞生长至70%汇合。每个样品和对照均一式三份进行。

[0124] 用于VN的RYANODEX的制备在测定法当天进行。如RYANODEX处方信息中所述,用5mL无菌注射用水重构RYANODEX,以制备丹曲林浓度为50mg/mL的初始储备液。使用细胞生长培养基将储备液进一步稀释至丹曲林浓度为100M,然后连续稀释至50、40、30、20、10和5M。在添加病毒之前,将稀释液针对细胞预温育60分钟。

[0125] 病毒的标准化要求事先使用本领域已知的程序进行中等组织培养感染剂量(TCID50)以测定每毫升病毒储备液的感染性病毒颗粒的浓度。参见,例如,Reed&Muench,(1938)A simple method of estimating fifty percent endpoints,The American Journal of Hygiene,.27:493-497;World Health Organization,Laboratory Procedures,Serological detection of avian influenza A(H7N9)infections by microneutralization assay,2013年5月23日。使用TCID50滴度进行计算以确定需要向病毒储备液中添加多少无血清培养基才能获得1e2 TCID50/mL。一旦制备好标准化病毒,即可将等体积的病毒添加至含有稀释化合物样品的96孔深孔板中。将病毒添加至适当的孔中并且与细胞和化合物一起温育2小时。然后将细胞用新鲜培养基洗涤3次,并且将100μL/孔的新鲜培养基添加至所有孔中并进一步温育6天。在温育期期间,在相差倒置镜下观察孔,并且对细胞中是否存在SARS-CoV-2细胞病变效应(CPE)进行评分。滴度是抑制病毒感染(不显示CPE的细胞)的丹曲林的最终稀释度的倒数,即,最低有效滴度是在所有时间点持续抑制病毒感染(不显示CPE的细胞)的丹曲林的最终稀释度。

[0126] 每个板上都具有若干用于VN测定法的对照。首先,在无病毒的测试浓度下,提供仅包含RYANODEX的丹曲林对照,以确保丹曲林本身在测试浓度下不引起CPE。还提供阴性对照孔(无RYANODEX或病毒)以验证无血清培养基不引起CPE。此外,还进行病毒的反滴定(包含100L TCID50/孔的病毒),作为病毒的阳性CPE对照,它用于验证标准化病毒的滴度是否在可接受的范围内。如果所有这些对照都符合它们的接受标准,则该板上的样品的结果被认为是有效的。

[0127] 中和测定法的分析表明,最高丹曲林浓度(50和100μM稀释度)在第2天和第4天在感染的细胞和未感染的对照中显示出细胞病变效应,正如预期的那样。50μM稀释度在感染后第6天具有反弹细胞生长,但是与较低的稀释度相比有所减少。在这些较高的丹曲林浓度下,未感染的对照显示出与感染的重复相同的细胞毒性特征。

[0128] 在感染后第2天,在任何含有RYANODEX的孔中均未观察到CPE。在感染后第4天和第6天,在用20-40μM丹曲林温育的细胞中未观察到CPE。在用10μM丹曲林感染后第4天和第6天,在3个重复中的2个中观察到CPE,但是在第2天未观察到CPE。在5μM浓度的丹曲林下,在感染后第4天和第6天,在3个重复中的1个中观察到CPE,但是在该丹曲林浓度下第2天未观察到CPE。参见下表

[0129] 表

[0130]

稀释度	第 2 天读取	第 4 天读取	天
100μm	3/3 孔的 CPE>90%	3/3 孔的 CPE>90%	3/3 孔的 CPE>90%
50μm	3/3 孔具有稀疏汇合	3/3 孔具有稀疏汇合	3/3 孔具有稀疏汇合但是大于第 4 天
40μm	3/3 孔无 CPE	3/3 孔无 CPE	3/3 孔无 CPE
30μm	3/3 孔无 CPE	3/3 孔无 CPE	3/3 孔无 CPE
20μm	3/3 孔无 CPE	3/3 孔无 CPE	3/3 孔无 CPE
10μm	3/3 孔无 CPE	2/3 孔的 CPE>90%	2/3 孔的 CPE>90%
5μm	3/3 孔无 CPE	1/3 孔的 CPE>90%	1/3 孔的 CPE>90%

[0131] CPE＝细胞病变效应

[0132] 所有未感染的对照都保持健康，并且在整个6天的感染后温育期内未显示出任何CPE。可以得出以下结论，丹曲林的最小抑制浓度为20μM，虽然较低的浓度10M和5M也显示出抗病毒活性。在所有时间点20和40μM丹曲林浓度均未观察到细胞病变效应(表明无病毒生长)。在存在或不存在病毒的情况下，仅在2个最高丹曲林浓度(100和50μM)下观察到细胞毒性效应。相比之下，在较低的稀释度(<50μM丹曲林)下，未感染的Vero E6细胞显示出良好的细胞活力。病毒感染但不含RYANODEX的对照细胞均具有CPE，这证实了病毒生长。

[0133] 总之，VN测定法表明，在施用推荐剂量的RYANODEX后，在与人血浆水平相容的丹曲林浓度下，观察到RYANODEX的体外抗病毒活性，但无细胞毒性。

[0134] 不希望受任何特定理论的限制，据信丹曲林调节胞内Ca^{2+}，包括通过此前未报道的机制，从而影响SARS-CoV-2病毒例如感染细胞、复制、成熟、产生病毒颗粒或从细胞释放的能力。

[0135] 实施例4

[0136] 方法

[0137] 该研究是丹曲林用于静脉内施用(IV)的SARS的辅助治疗方法的单中心、开放标签、双实验组研究。在一个治疗实验组中，丹曲林将按照为SARS患者的治疗制定的医疗实践和程序与目前的护理标准联合施用。在第二治疗实验组中，受试者将按照为SARS患者的治疗制定的医疗实践和程序接受目前的护理标准。

[0138] 在对受试者进行初步分类和初步评估后，将记录受试者的基线状态。一旦获得合格标准和基线状态，即可开始丹曲林的施用。

[0139] A组:丹曲林，作为对护理标准的补充

[0140] B组:仅护理标准

[0141] 治疗方法施用-A组

[0142] 随机分配到A组的合格SARS受试者将按照下文所述接受丹曲林(如RYANODEX，丹曲林钠)：

[0143] • 1mg/kg丹曲林剂量将以静脉内推注施用，大约每12小时一次，连续2天(研究第1天和第2天)。

[0144] • 在研究的第3天，对1mg/kg剂量表现出足够耐受性的受试者将开始在研究的剩余部分(研究第3天至第14天，包括首尾两天)接受大约每12小时一次静脉内推注2mg/kg。足够耐受性被定义为缺乏临床上显著的不良反应，这些反应可以对受试者的整体状态产生负面影响，这些负面影响并非继发于SARS、任何其他潜在病症或伴随药物。

[0145] • 如果患者未对2mg/剂量表现出足够耐受性，受试者将退出研究。

[0146] • 参与研究的每位受试者将接受最多四(4)剂1mg/kg剂量(第1-2天)和最多24(二十四)剂2mg/kg剂量(第3-14天)，每剂以静脉内推注施用(最多一分钟)。

[0147] 接受丹曲林的受试者将继续按照处方接受所有其他治疗方法，但排除标准中包括的治疗方法除外。每个剂量施用前和施用后10分钟内应清晰记录生命体征(血压、心率、呼吸率、体温)的评估。

[0148] B组

[0149] 随机分配到B组的患者将按照可接受的医疗实践接受护理标准。

[0150] 研究阶段

[0151] 该研究将包括2个阶段：筛选和治疗。

[0152] 在筛选阶段期间，将进行合格和基线评估。在研究程序开始之前将获得知情同意书。

[0153] 在确定合格并获得知情同意后，合格的患者将被随机分配到A组或B组，治疗阶段将开始，并且将按照上文针对A组所述进行研究药物的施用。不合格的受试者将按照批准的医疗实践接受主治医生认为必要的医疗协助。

[0154] 停止研究药物

[0155] 如果受试者表现出丹曲林毒性的临床显著体征/症状，则应停止研究药物。丹曲林毒性可以包括肌肉无力和意识状态的改变(例如嗜睡、镇静)、呕吐、腹泻和结晶尿，这些毒性不可归因于其他原因，诸如SARS的进展、其他潜在病症(例如，败血症、缺氧、不受控制的糖尿病)和/或伴随药物(例如，镇静剂、抗生素、退热药)。可以随时停止研究药物。

[0156] 诊断和主要纳入标准

[0157] 如果男性或未怀孕女性受试者被诊断患有SARS并且在筛选时满足所有以下标准，即可将他们纳入研究：

[0158] • 至少18岁。

[0159] • 愿意并且能够在进行研究程序之前提供书面知情同意书，或者如果受试者不能提供，授权代表愿意并且能够代表患者提供同意书。

[0160] • 根据严重度的WHO序数量表，SARS严重度评分为3-5分

[0161] • 在筛选前7天内出现SARS症状。

[0162] • 在筛选前48小时内通过PCR或其他商业或公共卫生测定法确定为实验室确认的SARS-CoV感染。

[0163] • 在同意后至少48小时内记录有以温度≥36.6℃腋窝、≥37.2℃口腔或≥37.8℃直肠定义的发热。

[0164] 如果男性或非怀孕女性受试者在筛选时符合以下标准中的任一者，则将他们排除在本研究之外：

[0165] • 参与任何其他SARS实验性治疗方法的临床试验。

[0166] • 丙氨酸氨基转移酶(ALT)或天冬氨酸氨基转移酶(AST)>5X正常上限(ULN)。

[0167] • 孕妇或哺乳期妇女。

[0168] • 存在暗示不良预后的合并症(根据临床判断)。

[0169] • 对丹曲林过敏。

[0170] 剂量和施用方式

[0171] Ryanodex:(丹曲林钠)注射用混悬剂;250mg/小瓶,用5mL无菌注射用水(不含抑菌剂)重构,得到50mg/mL混悬剂;如方案中所述,以1mg/kg快速静脉内推注施用。

[0172] 功效将根据以下标准进行评估:

[0173] • 世界卫生组织(WHO)序数量表严重度评分。

[0174] • 序贯器官衰竭评估(SOFA)评分。

[0175] • 发热正常化的时间长度(发热正常化被定义为温度<36.6℃腋窝、<37.2℃口腔或<37.8℃直肠,持续至少24小时)。

[0176] • 氧饱和度正常化的时间长度(氧饱和度正常化被定义为外周毛细血管氧饱和度(SpO2)>94%,持续至少24小时)。

[0177] • 与基线相比,使用WHO序数量表评估的在第14天的临床状态变化(1-8分)。

[0178] 1:门诊。无活动限制

[0179] 2:门诊。有活动限制

[0180] 3:住院,轻度疾病。不提供氧气治疗

[0181] 4:住院,轻度疾病。通过面罩或鼻管提供氧气

[0182] 5:住院,重度疾病。提供非侵入性通气或高流量氧气

[0183] 6:住院,重度疾病。提供插管和机械通气

[0184] 7:住院,重度疾病。通气+额外器官支持(加压器、肾脏替代疗法、体外膜氧合)

[0185] 8:死亡

[0186] • 与基线相比,使用WHO序数量表评估的在第5天和第10天的临床状态变化(1-8分)。

[0187] • WHO序数量表评分降低1分的时间。

[0188] • 与基线相比,序贯器官衰竭评估(SOFA)每日评分(第1-14天)的变化。

[0189] • 发热正常化的时间长度(发热正常化被定义为温度<36.6℃腋窝、<37.2℃口腔或<37.8℃直肠,持续至少24小时)。

[0190] • 氧饱和度正常化的时间长度(氧饱和度正常化被定义为外周毛细血管氧饱和度(SpO2)>94%,持续至少24小时)。

[0191] 将对安全性进行评估,并且安全性将包括以下指标(如果有的话)的测量和观察:

[0192] • 生命体征(心率、血压、呼吸率、体温)

[0193] • 临床实验室检验(血液学和血液化学)

[0194] • ECG监测

[0195] • 氧饱和度

[0196] • 体格检查

[0197] 实施例5

[0198] 测试丹曲林浓度:5、10、20、30、40、50和100μM(如RYANODEX,丹曲林钠)。

[0199] 测试通过标准病毒中和(VN)测定法来进行,该测定法评估中和SARS-CoV的能力。

[0200] 病毒中和(VN)测定法。使用对SARS-CoV感染敏感的细胞进行VN测定法。在VN测定法前一(1)至三(3)天,将细胞接种于96孔板中,并且在37℃和5%CO_2下温育。在测定法当天,细胞的单层达到至少70%至80%汇合,以运行VN。用于VN的化合物的制备在测定法当天

进行。用无血清培养基将化合物稀释至所期望的起始浓度(1:10),然后在无血清培养基中连续稀释2倍。

[0201] 病毒的标准化要求事先运行TCID50以确定每毫升病毒储备液中感染性病毒颗粒的浓度。使用TCID50滴度进行计算以确定需要向病毒储备液中添加多少无血清培养基才能获得1e2 TCID50/mL。一旦制备好标准化病毒,即可将等体积的病毒添加至含有稀释化合物样品的96孔深孔板中。保持温育至少一小时。然后将病毒/化合物混合物从96孔深孔板架转移至适当的细胞接种的96孔板中。在添加后,将板送回37℃和5%CO_2培养箱中培养三(3)至五(5)天至六(6)天。在温育期后,在相差倒置镜下观察孔,并且对细胞中是否存在SARS-CoV细胞病变效应(CPE)进行评分。滴度是抑制病毒感染(不显示CPE的细胞)的血清的最终稀释度的倒数,即,最低有效滴度是在所有时间点持续抑制病毒感染(不显示CPE的细胞)的丹曲林的最终稀释度。

[0202] 每个板上都具有若干用于VN测定法的对照。首先,提供无病毒的化合物对照以确保化合物本身不引起CPE;使用系列中的化合物的最低稀释度(通常为1:10)和测试浓度的其他连续稀释度来进行该对照。还提供阴性对照孔(无化合物或病毒)以验证无血清培养基不引起CPE。此外,还进行病毒的反滴定,作为病毒的阳性CPE对照,它用于验证标准化病毒的滴度是否在可接受的范围内。如果所有这些对照都符合它们的接受标准,则该板上的样品的结果被认为是有效的。

[0203] 不希望受任何特定理论的限制,据信丹曲林调节胞内Ca^{2+},包括通过此前未报道的机制,从而影响SARS-CoV例如感染细胞、复制、成熟、产生病毒颗粒或从细胞释放的能力。

[0204] 实施例6

[0205] 测试丹曲林浓度:5、10、20、30、40、50和100μM(如RYANODEX,丹曲林钠)。

[0206] 测试通过本领域已知的标准病毒中和(VN)测定法来进行,该测定法评估中和SARS-CoV的能力。VN测定法使用本领域已知的方法来进行,以测量病毒感染细胞、复制、成熟、产生病毒颗粒和从细胞释放活病毒的能力。

[0207] 通常,VN测定法需要对病毒感染敏感的相容性宿主细胞。合适的细胞系包括但不限于Vero E6、HeLa、293T、L929、成纤维细胞、CHO、B95-8、MRC-5、HEp-2、SPF CE、MDCK、COS-7和LLC-MK2细胞衍生物。在其他实例中,从动物分离的原代细胞可以被用于测定法。用于VN测定法的细胞可以是野生型细胞,或者它们可以是已经使用本领域已知技术进行遗传修饰的细胞。细胞系在适当的生长培养基中培养,所述培养基包括但不限于Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)、RPMI、Eagle最低基础培养基(EMEM)、Leibovitz L-15培养基和VeroPlus SFM。这种生长培养基含有维持细胞的生长所需的补充剂。示例性补充剂包括但不限于胎牛血清、glutamax、青霉素、链霉素和新霉素。在其他实例中,可以添加补充剂以选择具有特定遗传修饰的细胞。

[0208] 在VN测定法之前将细胞接种至96孔深孔板,并且在37℃和5%CO_2下温育,以允许细胞生长至适当的汇合。每个样品和对照均一式三份进行。

[0209] 用于VN的RYANODEX的制备在测定法当天进行。如RYANODEX处方信息中所述,用5mL无菌注射用水重构RYANODEX,以制备丹曲林浓度为50mg/mL的初始储备液。使用细胞生长培养基将储备液进一步稀释至丹曲林浓度为100M,然后连续稀释至50、40、30、20、10和5M。在添加病毒之前,将稀释液针对细胞预温育60分钟。

[0210] 病毒的标准化要求事先使用本领域已知的程序进行中等组织培养感染剂量(TCID50)以测定每毫升病毒储备液的感染性病毒颗粒的浓度。参见,例如,Reed&Muench,(1938)A simple method of estimating fifty percent endpoints,The American Journal of Hygiene.27:493-497;World Health Organization,Laboratory Procedures,Serological detection of avian influenza A(H7N9)infections by microneutralization assay,2013年5月23日。使用TCID50滴度进行计算以确定需要向病毒储备液中添加多少无血清培养基才能获得1e2 TCID50/mL。一旦制备好标准化病毒,即可将等体积的病毒添加至含有稀释化合物样品的96孔深孔板中。将病毒添加至适当的孔中,并且与细胞和化合物一起温育适当的时间,这与来自TCID50测定法的观察结果一致。在一些情况下,该时间期为2小时。在其他情况下,时间期为30分钟至1小时。在其他情况下,时间期为4-8小时。在另外其他情况下,病毒可以与细胞一起温育24-48小时。以及在其他情况下,细胞可以在测定法期间继续与病毒一起温育。此外,感染可以通过本领域已知的其他方法(诸如离心感染)来促进。

[0211] 如果病毒在针对抗病毒效果进行评分之前从细胞中除去,则用新鲜培养基洗涤细胞3次,再将100μL/孔的新鲜培养基添加至所有孔中,并且根据所采用的VN测定法进一步温育适当的时间长度。

[0212] 在适当的时间,使用本领域已知的方法来测定细胞针对病毒感染和复制的征象。仅举例来说,在不同条件下处理的细胞的病毒载量可以使用聚合酶链式反应(PCR)或本领域已知的其他方法来测量。作为另一个实例,可以测定细胞形态的变化,诸如斑块形成。作为又一个实例,使用本领域已知的方法(诸如光学显微镜检查或膜联蛋白V、FITC、碘化丙啶(PI)或苏木精和伊红(H&E)染色)对含有病毒的孔进行评分,以确定细胞中是否存在病毒性细胞病变效应(VPE)。作为又一个实例,将鸡红细胞悬浮液与连续稀释的病毒一起温育,并且在血凝测定法中监测红细胞栅格的形成。作为另一个实例,在血吸测定法中监测红细胞的悬浮液与病毒感染的细胞单层表面的附着。

[0213] 滴度是抑制病毒感染的丹曲林的最终稀释度的倒数,即,最低有效滴度是在所有时间点持续抑制病毒感染的丹曲林的最终稀释度。

[0214] 每个板上都具有若干用于VN测定法的对照。首先,提供在测试浓度下仅包含RYANDEX而无病毒的丹曲林对照,以确保使用针对病毒感染的测定法时丹曲林本身在测试浓度下不引起阳性信号。还提供阴性对照孔(无RYANODEX或病毒)以验证使用针对病毒感染的测定法时无血清培养基不引起阳性信号。此外,还进行病毒的反滴定(包含100TCID50/孔的病毒),作为阳性VPE或病毒感染对照,它用于验证标准化病毒的滴度是否在可接受的范围内。如果所有这些对照都符合它们的接受标准,则该板上的样品的结果被认为是有效的。

[0215] 不希望受任何特定理论的限制,据信丹曲林调节胞内Ca^{2+},包括通过此前未报道的机制,从而影响SARS-CoV例如感染细胞、复制、成熟、产生病毒颗粒或从细胞释放的能力。