

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 5 月 2 日 (02.05.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/088403 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/4748 (2006.01) **A61P 31/14** (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01) **A61P 11/00** (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/127237
- (22) 国际申请日: 2023 年 10 月 27 日 (27.10.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202211328628.5 2022 年 10 月 27 日 (27.10.2022) CN
- (71) 申请人: 北京化工大学 (**BEIJING UNIVERSITY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区东三环 15 号, Beijing 100029 (CN)。成都中医药大学 (**CHENGDU UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE**) [CN/CN]; 中国四川省成都市温江区柳台大道 1166 号, Sichuan 611137 (CN)。东北林业大学 (**NORTHEAST FORESTRY UNIVERSITY**) [CN/CN]; 中国黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路 26 号, Heilongjiang 150040 (CN)。中国医学科学院药用植物研究所 (**INSTITUTE OF MEDICINAL PLANT DEVELOPMENT, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES**) [CN/CN]; 中国北京市海淀区马连洼北路 151 号, Beijing 100193 (CN)。
- (72) 发明人: 童贻刚 (**TONG, Yigang**); 中国北京市朝阳区东三环 15 号, Beijing 100029 (CN)。陈士林 (**CHEN, Shilin**); 中国四川省成都市温江区柳台

大道 1166 号, Sichuan 611137 (CN)。范华昊 (**FAN, Huahao**); 中国北京市朝阳区东三环 15 号, Beijing 100029 (CN)。冷梁 (**LENG, Liang**); 中国四川省成都市温江区柳台大道 1166 号, Sichuan 611137 (CN)。徐志超 (**XU, Zhichao**); 中国黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路 26 号, Heilongjiang 150040 (CN)。宋驰 (**SONG, Chi**); 中国四川省成都市温江区柳台大道 1166 号, Sichuan 611137 (CN)。邹忠梅 (**ZOU, Zhongmei**); 中国北京市海淀区马连洼北路 151 号, Beijing 100193 (CN)。洪碧霞 (**HONG, Bixia**); 中国北京市朝阳区东三环 15 号, Beijing 100029 (CN)。刘珂 (**LIU, Ke**); 中国北京市朝阳区东三环 15 号, Beijing 100029 (CN)。

(74) 代理人: 北京知元同创知识产权代理事务所 (普通合伙) (**BEIJING ORIGINTELLIGENCE IP LAW FIRM**); 中国北京市海淀区上地东路 35 号院 1 号楼 4 层 3-509, Beijing 100085 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) **Title:** USE OF ISOQUINOLINE ALKALOID IN PREVENTION AND TREATMENT OF DISEASES CAUSED BY CORONAVIRAL INFECTIONS

(54) 发明名称: 异喹啉类生物碱在预防和治疗冠状病毒感染所致疾病中的应用

(57) **Abstract:** The present invention relates to a new use of an isoquinoline alkaloid and a pharmaceutically acceptable salt thereof in medicine, and in particular to a use of an isoquinoline alkaloid compound and a pharmaceutically acceptable salt thereof in the prevention, alleviation and/or treatment of SARS-CoV-2 viral infectious diseases. Experimental results show that the isoquinoline alkaloid obviously inhibits virus infection and replication on an anti-SARS-CoV-2 virus drug screening model, i.e., pangolin coronavirus strain xCoV, a SARS-CoV-2 virus-like particle (trVLP) system, and a VSV pseudovirus system. The isoquinoline alkaloid inhibits virus replication by inhibiting the whole life cycle of the virus, and the results strongly indicate the potential clinical application values of the isoquinoline alkaloid for diseases caused by the currently popular novel coronavirus and other coronaviral infections.

(57) 摘要: 本发明涉及异喹啉生物碱及其药学上可接受的盐在医药方面的新用途, 具体为异喹啉生物碱类化合物及其药学上可接受的盐在预防, 缓解和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染性疾病中的应用。实验结果表明异喹啉类生物碱在抗 SARS-CoV-2 病毒药物筛选模型穿山甲冠状病毒毒株 xCoV、SARS-CoV-2 病毒样颗粒(trVLP) 系统和 VSV 假病毒系统上, 都明显抑制了病毒的感染和复制。异喹啉类生物碱通过抑制病毒的整个生命周期来抑制病毒复制, 这些结果强烈提示异喹啉类生物碱对于目前流行的新冠病毒以及其他冠状病毒感染引起的病症的潜在临床应用价值。

WO 2024/088403 A1

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

异喹啉类生物碱在预防和治疗冠状病毒感染所致疾病中的应用

本申请要求2022年10月27日向中国国家知识产权局提交的，专利申请号为2022113286285，发明名称为“异喹啉类生物碱在预防和治疗冠状病毒中的应用”在先申请的优先权。该申请的全文通过引用的方式结合于本申请中。

技术领域

本发明属于医药技术领域，涉及异喹啉类生物碱在医药方面的新用途，具体为异喹啉类生物碱在预防或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染性疾病中的应用。

背景技术

随着各种突变株大浪潮的出现，尤其是 omicron 各亚型突变株（包括 BA.4、BA.5、BF.7、XBB 等）具有更快的传播速度以及更强的免疫逃逸能力，疫苗接种所诱导的中和抗体的保护活性似乎也在随着时间降低，新的有效药物仍然是治疗 COVID-19 的重点。

从 COVID-19 以来，包括病毒 S 蛋白中和抗体、瑞德西韦、洛匹那韦/利托那韦（克力芝）、I 型干扰素等多种药物在体外或体内实验中表现出了抗病毒活性，但是药物的临床疗效和安全性仍存在争议。目前美国 FDA 还批准了瑞德西韦和几款中和抗体如 Bamlanivimab、Etesevimab、Casirivimab、Imdevimab 用于 COVID-19 住院患者的治疗，但是这些药物需要静脉滴注且价格昂贵，有效性和安全性也尚需进一步临床验证，限制了其进一步应用。2021 年底，Merck 和 Ridgeback Biotherapeutics 联合开发的口服抗新冠药物莫努匹韦（Molnupiravir）以及辉瑞公司研发的奈玛特韦片/利托那韦片（Paxlovid）有条件获批上市，这两种药物分别针对病毒的 RdRp（RNA 依赖 RNA 聚合酶）和 3CLpro，但存在耐药

性的威胁，且莫努匹韦可能引起 DNA 突变，安全性尚待进一步研究。奈玛特韦片/利托那韦片的联合用药和药物相互作用尚需进一步研究，而且这两种药物在疫苗接种人群中的临床效果还未可知。近期，阿兹夫定作为我国首款自主研发、具有完全自主知识产权的口服小分子新冠治疗药物附条件获批，其作用靶点与莫努匹韦相似，针对病毒的 RdRp，同样的，其作为核苷类似物的安全性仍然需要进一步研究。

疫苗接种是预防和控制 COVID-19 的长期策略中最有效的方法。不同的 SARS-CoV-2 疫苗已被开发，截至 2022 年 3 月 28 日，已有 153 种疫苗获批进行临床试验，196 种疫苗处于临床前试验阶段，10 种疫苗（含 3 种印度疫苗）获世卫组织批准紧急使用，目前国内已有 4 款自主研发的新冠疫苗接种上市（https://vac-lshtm.shinyapps.io/ncov_vaccine_landscape/）。这些疫苗主要包括灭活疫苗（占总数的 14%）、减毒活疫苗（1%）、病毒载体疫苗（复制和非复制；占总数的 17%）、RNA 疫苗（18%）、DNA 疫苗（11%）、蛋白质亚单位疫苗（34%）和 VLP 疫苗（4%）。然而随着世界多地报道 SARS-CoV-2 的突变体，目前研究显示疫苗所产生的抗体对 SARS-CoV-2 突变株的中和能力表现出不同程度的下降甚至完全丧失。由于新冠病毒不断升级，新冠疫苗和“特效药”不断“失效”，因此迫切需要开发针对不同靶点的抗病毒新药物，或者使用联合疗法从多方面抑制病毒感染，一方面针对新冠病毒本身开发阻断病毒感染或抑制病毒复制的药物，同时考虑联合用药；另一方面针对新冠病毒与宿主的相互作用，阻断新冠引起的一系列临床症状和并发症，降低病死率。因此，针对新冠肺炎疫情和未来可能出现的冠状病毒病，研发安全有效且具有广谱性的抗病毒药物意义重大。

生物碱是存在于自然界的一类含氮的碱性有机化合物，大多有较复杂的环状结构，氮原子结合在环内。其中异喹啉生物碱的种类最多，异喹啉生物碱来源于苯丙氨酸和酪氨酸系，在植物中分布广泛，数目较多，具有多方面的生物活性。异喹啉生物碱根据连接基团的不同可分为：简单异喹啉类、苄基异喹啉

类、阿朴菲类、双苄基异喹啉类、小檗碱类、普罗托品类、吗啡类和苯菲啶类。当苯基连接在异喹啉的骨架上时该衍生物便称为苄基异喹啉生物碱，单苄基异喹啉类为异喹啉母核 1 位连有苄基，罂粟属中具解痉作用的罂粟碱即属此类。双苄基异喹啉则为两个苄基异喹啉通过 1~3 个醚键相连接的一类生物碱，如存在于防己科北豆根中的主要酚性生物碱蝙蝠葛碱，汉防己中的汉防己甲素和汉防己乙素。

异喹啉生物碱广泛分布于罂粟科、巴比特科、毛茛科和防己科中。异喹啉及异喹啉衍生物是一类重要的医药化工中间体，广泛应用于一系列重要药物的合成过程，异喹啉骨架常用于设计药物分子中的活性结构基团，如阿曲库铵、诺米芬辛、莫沙维林、地莫昔林（甲基罂粟碱）、异喹卡因等。同时，异喹啉生物碱类药物具有多方面的生物活性，包括抗肿瘤、抗菌、镇痛、调节免疫功能、抗血小板凝聚、抗心律失常、降压等。大部分的异喹啉类生物碱药物都存在着异喹啉或异喹啉衍生物等基本结构，此类药物基本可以从简单的异喹啉衍生物进一步合成而衍生出来。

但异喹啉类生物碱是否可用于治疗新冠肺炎，还有待进一步研究。

发明内容

本发明的目的在于提供 SARS-CoV-2 的有效抑制剂，其可以预防，缓解和/或治疗新型冠状病毒所致感染。

本发明首先提供了异喹啉类生物碱及其药学上可接受的盐作为新型冠状病毒抑制剂，在制备预防、缓解和/或治疗冠状病毒所致感染的产品中的应用；

所述异喹啉类生物碱选自轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱（22864-92-2）中的至少一种。

根据本发明的实施方案，所述药学上可接受的盐选自异喹啉类生物碱结构中具有足够碱性的氮原子的酸加成盐，所述酸加成盐包括异喹啉类生物碱与无机酸如盐酸、氢氟酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、焦硫酸、磷酸或硝酸；有机酸

如甲酸、乙酸、乙酰乙酸、丙酮酸、三氟乙酸、丙酸、丁酸、己酸、庚酸、十一烷酸、月桂酸、苯甲酸、水杨酸、2-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、樟脑酸、肉桂酸、环戊烷丙酸、二葡萄糖酸、3-羟基-2-萘甲酸、烟酸、扑酸、果胶酯酸、过硫酸、3-苯基丙酸、苦味酸、特戊酸、2-羟基乙磺酸、衣康酸、氨基磺酸、三氟甲磺酸、十二烷基硫酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、2-萘磺酸、萘二磺酸、樟脑磺酸、柠檬酸、酒石酸、硬脂酸、乳酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、己二酸、藻酸、马来酸、富马酸、D-葡萄糖酸、扁桃酸、抗坏血酸、葡庚酸、甘油磷酸、天冬氨酸、磺基水杨酸、半硫酸或硫氰酸所形成的盐。

根据本发明的实施方案，所述产品为药品、食品、护肤品、化妆品、日用品和保健品，优选为药品。

根据本发明的实施方案，其中冠状病毒为2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)。

根据本发明的实施方案，冠状病毒感染为新型冠状病毒肺炎。

根据本发明的实施方案，如上所述异喹啉类生物碱及其药学上可接受的盐可以配置成各种适合的药物制剂形式。可以单独使用，或者将其与药物辅料（例如赋形剂、稀释剂等）混合，配置成口服给药的片剂、胶囊剂、颗粒剂、糖浆剂等或注射给药的粉针剂、溶液剂，以及研制为功能食品，功能饮品、药酒，滴鼻液及漱口水等。

本发明还提供一种可预防，缓解和/或治疗冠状病毒所致感染的药物组合物，其包括轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱（22864-92-2）中的至少一种。

本发明还提供一种预防，缓解和/或治疗冠状病毒所致感染的方法，包括将异喹啉类生物碱及其药学上可接受的盐中的至少一种施用于有此需要的个体。

所述异喹啉类生物碱选自轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱或6-丙酮基二氢白屈菜红碱（22864-92-2）中的至少一种。

本发明人经过大量研究发现异喹啉类生物碱的新用途，通过利用新冠病毒药物筛选替代模型 GX_P2V、SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）模型及 VSV 假

病毒模型对异喹啉类生物碱进行抗 SARS-CoV-2 病毒活性评价。结果表明本发明的异喹啉类生物碱能有效抑制穿山甲冠状病毒毒株 GX_P2V、SARS-CoV-2 病毒样颗粒 (trVLP) 及 VSV 假病毒的感染和复制, 并且在 GX_P2V、SARS-CoV-2 病毒样颗粒 (trVLP) 入胞前和入胞后、全时段均能发挥抑制作用。

其中, 在新冠病毒药物筛选替代模型 GX_P2V 上, 轮环藤宁在细胞水平的 $EC_{50}=1.37\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>36.50$; 蝙蝠葛碱在细胞水平的 $EC_{50}=17.04\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>2.93$; 蝙蝠葛苏林碱在细胞水平的 $EC_{50}=14.08\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>3.55$; 峨眉唐松草碱在细胞水平的 $EC_{50}=3.31\ \mu\text{M}$, $CC_{50}=49.85\ \mu\text{M}$, $SI=15.06$; 唐松明灵碱在细胞水平的 $EC_{50}=1.29\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>38.76$; 6-丙酮基二氢白屈菜红碱在细胞水平的 $EC_{50}=2.47\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>24.24$ 。在 SARS-CoV-2 病毒样颗粒 (trVLP) 模型上, 轮环藤宁在细胞水平的 $EC_{50}=1.64\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>30.49$; 蝙蝠葛碱在细胞水平的 $EC_{50}=2.84\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>17.61$; 蝙蝠葛苏林碱在细胞水平的 $EC_{50}=\sim 1.52\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>\sim 32.89$; 峨眉唐松草碱在细胞水平的 $EC_{50}=\sim 25.29\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>\sim 1.98$; 唐松明灵碱在细胞水平的 $EC_{50}=6.20\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>8.06$; 6-丙酮基二氢白屈菜红碱在细胞水平的 $EC_{50}=2.25\ \mu\text{M}$, $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$, $SI>22.22$ 。在 VSV 假病毒模型上, 轮环藤宁在细胞水平的 $EC_{50}=6.54\ \mu\text{M}$; 蝙蝠葛碱在细胞水平的 $EC_{50}=5.91\ \mu\text{M}$; 蝙蝠葛苏林碱在细胞水平的 $EC_{50}=8.48\ \mu\text{M}$; 峨眉唐松草碱在细胞水平的 $EC_{50}=2.83\ \mu\text{M}$; 唐松明灵碱在细胞水平的 $EC_{50}=2.73\ \mu\text{M}$; 6-丙酮基二氢白屈菜红碱在细胞水平的 $EC_{50}=11.76\ \mu\text{M}$ 。因此, 发明人认为轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱可应用于针对 COVID-19 感染的预防, 缓解和/或治疗。

与现有技术相比, 本发明的技术效果如下:

本申请发明人发现异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱在细胞水平能够阻断冠状病毒进入细胞, 也具有有效抑制冠状病毒的复制从而达到预防, 缓解和/或治疗

COVID-19 的效果。

附图说明

图 1 为异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱抑制 GX_P2V 病毒感染 Vero E6 细胞的测试结果；

图 2 为异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱抑制 GX_P2V 病毒感染 Vero E6 细胞的不同作用阶段测试结果；

A.异喹啉类生物碱显著降低了 Vero E6 细胞中病毒 RNA 水平；

B.异喹啉类生物碱显著抑制了 Vero E6 细胞中病毒蛋白的表达。

图 3 为异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱抑制 SARS-CoV-2 病毒样颗粒(trVLP)感染 Caco-2-N 细胞的测试结果；

图 4 为异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱抑制 SARS-CoV-2 病毒样颗粒(trVLP)感染 Caco-2-N 细胞的不同作用阶段（细胞中病毒 RNA 水平）测试结果；

图 5 为异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱抑制 SARS-CoV-2 野生型假病毒的感染 BHK21-ACE2 细胞的测试结果。

具体实施方式

下文将结合具体实施例对本发明的技术方案做更进一步的详细说明。应当理解，下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明，而不应被解释为对本发明保护范围的限制。凡基于本发明上述内容所实现的技术均涵盖在本发明旨在保护的范围内。

除非另有说明，以下实施例中使用的原料和试剂均为市售商品，或者可以通过已知方法制备。

一、实验方法

1. 异喹啉类生物碱抑制穿山甲冠状病毒 xCoV (GX_P2V)

1) 细胞病毒培养

非洲绿猴肾细胞系 Vero E6 是从美国模式培养物集存库 (ATCC, 1586 号) 中获得的, 用含有 10% 胎牛血清 (FBS; Gibco Invitrogen) 的 DMEM 培养基 (Gibco), 在 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

穿山甲冠状病毒 xCoV (GX_P2V) (GISAID: EPI_ISL_410539) 为本发明人从海关查获的死亡的穿山甲中分离并培养的一株新型冠状病毒 xCoV。将 GX_P2V 在 Vero E6 细胞中繁殖, 用 Vero E6 细胞 (ATCC, 1586 号) 做噬斑实验测定病毒滴度。所有感染实验均在生物安全 2 级 (BLS-2) 实验室进行。

2) 异喹啉类生物碱抑制穿山甲冠状病毒 xCoV (GX_P2V) 的 EC₅₀ 和 CC₅₀ 测定

EC₅₀ 检测: 将 2.5×10^4 个 Vero E6 细胞接种到 96 孔板中, 在 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24h 后, 在细胞培养孔中分别加入终浓度为 50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.125 μ M、1.56 μ M、0.78 μ M、0.39 μ M、0 μ M 的异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱, 37°C 预孵育 1h, 同时将病毒 (MOI=0.01) 与终浓度为 50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.125 μ M、1.56 μ M、0.78 μ M、0.39 μ M、0 μ M 的异喹啉类生物碱 4°C 预孵育 1h, 孵育结束后将上述病毒-药物混合物加入含对应浓度药物的细胞中, 感染 2h 后 PBS 清洗 3 遍换液, 加入含相同浓度药物的培养基, 37°C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。病毒感染后的 48h, 通过 qRT-PCR 的方法对细胞内病毒 RNA 以及细胞内参基因 GAPDH 的表达情况进行定量检测。用 GraphPad-Prism 8 软件进行数据分析计算 EC₅₀。

CC₅₀ 检测: 使用 CellTiter-Blue 法进行 CC₅₀ 的检测。Vero E6 细胞接种至 96

孔细胞培养板,细胞密度达到 60%-80%时进行试验。Vero E6 细胞换液后加入稀释后的药物,终浓度分别为 50 μM 、25 μM 、12.5 μM 、6.25 μM 、3.125 μM 、1.56 μM 、0.78 μM 、0.39 μM 、0 μM 。37°C 5% CO_2 培养 48h,利用 CellTiter-Blue 试剂检测荧光强度,激发波长 554nm,发射波长 593 nm,GraphPad-Prism 8 软件进行数据分析计算 CC_{50} 。

3) 加药时间实验

将 1×10^5 个 Vero E6 细胞接种到 24 孔板中,在 37°C、5% CO_2 的培养箱中培养 24h 后,在全时段给药组和入胞前给药组细胞培养孔中分别加入根据药物 EC_{50} 确定的终浓度的异喹啉类生物碱,37°C 预孵育 1h,同时将病毒 ($\text{MOI}=0.01$) 与相同浓度的异喹啉类生物碱 4°C 预孵育 1h,孵育结束后用上述病毒-药物混合物病毒感染细胞,感染 2h 后 PBS 清洗 3 遍换液,在全时段给药组和入胞后给药组细胞培养孔中加入含相同浓度药物的培养基,入胞前给药组和对照组细胞培养孔加入不含药物培养基,37°C、5% CO_2 的培养箱中进行培养。病毒感染后的 12h,通过 qRT-PCR 的方法对细胞内病毒 RNA 以及细胞内参基因 GAPDH 的表达情况进行定量检测。同时收集细胞内蛋白,利用 Western Blot 对新冠病毒 N 蛋白和 GAPDH 蛋白进行定量分析。

4) 病毒样本处理和检测

按照制造商的说明,使用细胞/组织 RNA 提取试剂盒(北京诺贝莱生物科技有限公司, R11202109JN)提取总 RNA。反转录使用可消化 gDNA 的 Hifair II 1st strand cDNA 合成试剂盒(上海翊圣生物科技,货号: 11121ES60),qRT-PCR 使用 Quantstudio 实时 PCR 检测试剂(Applied biosystems, Foster City, CA, USA),SYBR-Green 法的 qPCR 扩增: 95°C 5 min, 40 个循环, 95°C 10 s, 55°C 20 s, 72°C 31 s。通过对 GAPDH 基因的检测实现均一化。

2. 异喹啉类生物碱抑制 SARS-CoV-2 病毒样颗粒 (trVLP)

1) 细胞培养

Caco-2-N 细胞用高糖 DMEM+10%胎牛血清,在 37°C 5% CO_2 培养箱中培

养。

SARS-CoV-2 病毒样颗粒 (trVLP) 为清华大学丁强教授团队开发的具有转录和复制能力的系统, 将 SARS-CoV-2 trVLP 表达的报告基因 (GFP) 取代病毒基因组包装和病毒粒子组装所必需的核蛋白基因 (N) (SARS-CoV-2-GFP/ Δ N trVLP), 该病毒可以在异位表达 SARS-CoV-2 N 蛋白的 Caco-2-N 细胞中完成完整的生命周期。由于产生的病毒颗粒核酸中没有 N 基因, 该病毒样颗粒只能感染过表达 N 基因的细胞, 所以对人和动物不具有感染性。该系统在保留了 SARS-CoV-2 生物学特性的同时保证了安全性, 这一成果加快了研究人员在 BSL-2 实验室对新冠病毒的研究。我们在本申请中使用了丁强教授馈赠的 SARS-CoV-2 trVLP 系统, 用于异喹啉类生物碱对 SARS-CoV-2 的抑制作用研究。

2) 异喹啉类生物碱抑制 SARS-CoV-2 病毒样颗粒 (trVLP) 的 EC_{50} 和 CC_{50} 测定

EC_{50} 检测: 将 2.5×10^4 个 Caco-2-N 细胞接种到 96 孔板中, 在 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养 24h 后, 在细胞培养孔中分别加入终浓度为 50 μM 、25 μM 、12.5 μM 、6.25 μM 、3.125 μM 、1.56 μM 、0.78 μM 、0.39 μM 、0 μM 的异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱, 37°C 预孵育 1h, 同时将 SARS-CoV-2 trVLP 病毒 ($\text{MOI}=0.001$) 与终浓度为 50 μM 、25 μM 、12.5 μM 、6.25 μM 、3.125 μM 、1.56 μM 、0.78 μM 、0.39 μM 、0 μM 的异喹啉类生物碱 4°C 预孵育 1h, 孵育结束后用上述病毒-药物混合物感染细胞。感染 2h 后 PBS 清洗 3 遍换液, 加入含相同浓度药物的培养基, 37°C 、5% CO_2 的培养箱中进行培养。病毒感染后的 48h 通过 qRT-PCR 的方法对细胞内病毒 RNA 以及细胞内参基因 GAPDH 的表达情况进行定量检测。用 GraphPad-Prism 8 软件进行数据分析计算 EC_{50} 。

CC_{50} 检测: 使用 CellTiter-Blue 法进行 CC_{50} 的检测。Caco-2-N 细胞接种至 96 孔细胞培养板, 细胞密度达到 60%-80% 时进行试验。Caco-2-N 细胞换液后加入稀释后的药物, 终浓度分别为 50 μM 、25 μM 、12.5 μM 、6.25 μM 、3.125 μM 、

1.56 μM 、0.78 μM 、0.39 μM 、0 μM 。37°C 5% CO_2 培养 48h, 利用 CellTiter-Blue 试剂检测荧光强度, 激发波长 554nm, 发射波长 593 nm, GraphPad-Prism 8 软件进行数据分析计算 CC_{50} 。

3) 加药时间实验

将 1×10^5 个 Caco-2-N 细胞接种到 24 孔板中, 在 37°C、5% CO_2 的培养箱中培养 24h 后, 在全时段给药组和入胞前给药组细胞培养孔中分别加入根据药物 EC_{50} 确定的终浓度的异喹啉类生物碱, 37°C 预孵育 1h, 同时将 SARS-CoV-2 trVLP 病毒 ($\text{MOI}=0.001$) 与相同浓度的异喹啉类生物碱 4°C 预孵育 1h, 孵育结束后用上述病毒-药物混合物感染细胞, 感染 2h 后 PBS 清洗 3 遍换液, 在全时段给药组和入胞后给药组细胞培养孔中加入含相同浓度药物的培养基, 入胞前给药组和对照组细胞培养孔加入不含药物培养基, 在 37°C、5% CO_2 的培养箱中进行培养。病毒感染后 12h, 通过 qRT-PCR 的方法对细胞内病毒 RNA 以及细胞内参基因 GAPDH 的表达情况进行定量检测。用 GraphPad-Prism 8 软件进行数据分析。

4) 病毒样本处理和检测

按照制造商的说明, 使用 Axygen TM 多用途总 RNA 小提试剂盒 (Axygene, 货号 AP-MN-MS-RNA-250G) 进行 RNA 提取。反转录使用可消化 gDNA 的 Hifair II 1st strand cDNA 合成试剂盒 (上海翊圣生物科技, 货号: 11121ES60), qRT-PCR 使用 Quantstudio 实时 PCR 检测试剂 (Applied biosystems, Foster City, CA, USA), SYBR-Green 法的 qPCR 扩增: 95°C 5 min, 40 个循环, 95°C 10 s, 55°C 20 s, 72°C 31 s。通过对 GAPDH 基因的检测实现均一化。

EC_{50} 是指能够有效抑制 50% 细胞感染病毒的药物浓度, 数值越小说明药物对病毒的抑制效果越好。

CC_{50} 是使得 50% 的细胞发生细胞毒性的药物浓度, 数值越高说明药物对细胞的毒性越低。

SI: 选择性指数, 为 CC_{50} 与 EC_{50} 的比值, 数值越大说明成药的可能性越高。

3. 异喹啉类生物碱抑制 SARS-CoV-2 野生型假病毒

1) 细胞培养

BHK21-ACE2、HEK-293T 细胞使用高糖 DMEM+10%胎牛血清培养,在 37°C 5% CO₂ 温箱中孵育。

2) 假病毒包装

SARS-CoV-2 野生型 S 蛋白假病毒的制备采用 VSV 假病毒包装系统,假病毒的组装和测定过程基于 Nie 等人发表的论文中 (Nie et al., Nat Protoc. 2020;15(11):3699-3715.)。将 SARS-CoV-2 野生型 S 蛋白的质粒转染到 HEK-293T 细胞中在细胞表面提供膜蛋白,而利用 G*ΔG-VSV 感染提供 VSV 的基因组,感染和转染后 24h 及 48h 分别收集细胞上清液以获得 SARS-CoV-2 野生型的 S 蛋白假病毒。

3) 异喹啉类生物碱抑制 SARS-CoV-2 野生型假病毒的感染复制

将 5×10^4 个重悬的 BHK21-ACE2 细胞接种到 96 孔板中,在 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24h 后,使用添加 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 分别稀释异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱,然后分别加入野生型 S 蛋白假病毒,4°C 下孵育 60-90 min,使轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱的终浓度为 25 μM、8.33 μM、2.78 μM、0.93 μM、0.31 μM、0.1 μM。同时对应终浓度的异喹啉类生物碱分别与细胞在 37°C 下孵育 60-90 min,孵育结束后,假病毒-异喹啉类生物碱混合物加入对应药物浓度的 BHK21-ACE2 细胞中。37°C 培养 24h 后利用萤光素酶检测系统 (Luciferase Assay System) 检测细胞裂解液中的萤火虫萤光素酶的表达量。

实验结果

结果见图 1-5。

由图 1、图 2 可知,异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、

峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱对 GX_P2V 病毒具有良好的抑制作用，且具有剂量依赖效应。由图 1 可知，在 Vero E6 细胞上异喹啉类生物碱轮环藤宁对于 GX_P2V 在细胞水平的 $EC_{50}=1.37\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ， $SI>36.50$ ；蝙蝠葛碱对于 GX_P2V 在细胞水平的 $EC_{50}=17.04\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ， $SI>2.93$ ；蝙蝠葛苏林碱对于 GX_P2V 在细胞水平的 $EC_{50}=14.08\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ， $SI>3.55$ ；峨眉唐松草碱对于 GX_P2V 在细胞水平的 $EC_{50}=3.31\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}=49.85\ \mu\text{M}$ ， $SI=15.06$ ；唐松明灵碱（Thalmineline）对于 GX_P2V 在细胞水平的 $EC_{50}=1.29\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ， $SI>38.76$ ；6-丙酮基二氢白屈菜红碱对于 GX_P2V 在细胞水平的 $EC_{50}=2.47\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ， $SI>24.24$ 。可见，上述异喹啉类生物碱均对 GX_P2V 具有较好的抑制效果，且存在剂量依赖，毒副作用较小。

由图 2 可知，上述异喹啉类生物碱（轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱）在选定浓度下对 GX_P2V 感染 Vero E6 细胞入胞前、入胞后及全时段均有抑制作用。且上述异喹啉生物碱均在核酸和蛋白水平上对 GX_P2V 感染 Vero E6 细胞入胞前、入胞后及全时段均有抑制作用。

由图 3、图 4 可知，在 Caco-2-N 细胞上异喹啉类生物碱（轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱）对 SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）均具有良好的抑制作用，且具有剂量依赖效应。

由图 3 可知，在 Caco-2-N 细胞上异喹啉类生物碱轮环藤宁对于 SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）在细胞水平的 $EC_{50}=1.64\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ， $SI>30.49$ ；蝙蝠葛碱对于 SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）在细胞水平的 $EC_{50}=2.84\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ， $SI>17.61$ ；蝙蝠葛苏林碱对于 SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）在细胞水平的 $EC_{50}\sim 1.52\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ， $SI>\sim 32.89$ ；峨眉唐松草碱对于 SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）在细胞水平的 $EC_{50}\sim 25.29\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ，

SI>~1.98；唐松明灵碱对于 SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）在细胞水平的 $EC_{50}=6.20\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ，SI>8.06；6-丙酮基二氢白屈菜红碱对于 SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）在细胞水平的 $EC_{50}=2.25\ \mu\text{M}$ ， $CC_{50}>50\ \mu\text{M}$ ，SI>22.22。可见，上述异喹啉类生物碱均对 SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）具有较好的抑制效果，且存在剂量依赖，毒副作用较小。

由图 4 可知，上述异喹啉类生物碱（轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱）在选定浓度下，对 SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）感染 Caco-2-N 细胞入胞前、入胞后及全时段在核酸水平均显示出抑制作用。

由图 5 可知，在 BHK21-ACE2 细胞上异喹啉类生物碱轮环藤宁对于 SARS-CoV-2 野生型假病毒在细胞水平的 $EC_{50}=6.54\ \mu\text{M}$ ；蝙蝠葛碱对于 SARS-CoV-2 野生型假病毒在细胞水平的 $EC_{50}=5.91\ \mu\text{M}$ ；蝙蝠葛苏林碱对于 SARS-CoV-2 野生型假病毒在细胞水平的 $EC_{50}=8.48\ \mu\text{M}$ ；峨眉唐松草碱对于 SARS-CoV-2 野生型假病毒在细胞水平的 $EC_{50}=2.83\ \mu\text{M}$ ；唐松明灵碱（Thalmineline）对于 SARS-CoV-2 野生型假病毒在细胞水平的 $EC_{50}=2.73\ \mu\text{M}$ ；6-丙酮基二氢白屈菜红碱对于 SARS-CoV-2 野生型假病毒在细胞水平的 $EC_{50}=11.76\ \mu\text{M}$ 。上述异喹啉类生物碱均对 SARS-CoV-2 野生型假病毒具有较好的抑制效果，存在剂量依赖。

利用 SARS-CoV-2 病毒进行研究需要高等级的生物防护设施，这与目前研究的迫切需要相冲突。发明人在本申请中采用了穿山甲冠状病毒毒株 xCoV、SARS-CoV-2 病毒样颗粒（trVLP）及基于 VSV 骨架的假病毒系统对几种异喹啉类生物碱进行了活性评价，在保证安全性的前提下也实现了对 SARS-CoV-2 研究的有效性和可靠性，并且通过多种验证手段保证了本发明内容的真实性。

在本申请中，实验数据显示异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱具有显著地抑制冠状病毒的活性。发明人认为异喹啉类生物碱轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏

林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱是潜在的治疗 SARS-CoV-2 感染性疾病的药物。异喹啉类生物碱在抗 SARS-CoV-2 病毒药物筛选模型穿山甲冠状病毒毒株 xCoV、SARS-CoV-2 病毒样颗粒 (trVLP) 系统、VSV 假病毒系统上，都明显抑制了病毒的感染和复制。异喹啉类生物碱在病毒的整个生命周期均能抑制病毒复制，这些结果强烈提示异喹啉类生物碱对于目前流行的新冠病毒以及其他冠状病毒感染引起的病症的潜在临床应用价值。

鉴于所观察到的异喹啉类生物碱对病毒的强烈抑制作用，异喹啉类生物碱极有可能成为新型冠状病毒肺炎的特效药。因此，发明人认为，作为潜在的治疗 SARS-CoV-2 及其他冠状病毒感染的药物，异喹啉类生物碱具有重大的药用价值，是治疗 SARS-CoV-2 病毒及其他冠状病毒感染性疾病的一类有前途的候选药物。

以上，对本发明的实施方式进行了说明。但是，本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求

1. 异喹啉类生物碱及其药学上可接受的盐在制备预防、缓解和/或治疗冠状病毒感染所致疾病的产品中的应用；

所述异喹啉类生物碱选自轮环藤宁、蝙蝠葛碱、蝙蝠葛苏林碱、峨眉唐松草碱、唐松明灵碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱中的至少一种。

2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述药学上可接受的盐选自异喹啉类生物碱结构中具有足够碱性的氮原子的酸加成盐，所述酸加成盐包括异喹啉类生物碱与无机酸或有机酸所形成的盐。

3. 根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述无机酸选自盐酸、氢氟酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、焦硫酸、磷酸或硝酸。

4. 根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述有机酸选自甲酸、乙酸、乙酰乙酸、丙酮酸、三氟乙酸、丙酸、丁酸、己酸、庚酸、十一烷酸、月桂酸、苯甲酸、水杨酸、2-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、樟脑酸、肉桂酸、环戊烷丙酸、二葡萄糖酸、3-羟基-2-萘甲酸、烟酸、扑酸、果胶酯酸、过硫酸、3-苯基丙酸、苦味酸、特戊酸、2-羟基乙磺酸、衣康酸、氨基磺酸、三氟甲磺酸、十二烷基硫酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、2-萘磺酸、萘二磺酸、樟脑磺酸、柠檬酸、酒石酸、硬脂酸、乳酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、己二酸、藻酸、马来酸、富马酸、D-葡萄糖酸、扁桃酸、抗坏血酸、葡庚酸、甘油磷酸、天冬氨酸、磺基水杨酸、半硫酸或硫氰酸。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的应用，其特征在于，所述产品为药品、食品、化妆品、护肤品、日用品和保健品。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的应用，其特征在于，所述冠状病毒为 2019 新型冠状病毒。

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的应用，其特征在于，异喹啉类生物碱及其药学上可接受的盐可以配置成各种适合的药物制剂形式；可以单独使用，或

者将其与药物辅料混合，配置成口服给药的片剂、胶囊剂、颗粒剂、糖浆剂；或注射给药的粉针剂、溶液剂，以及研制为功能食品，功能饮品、药酒，滴鼻液及漱口水。

8. 根据权利要求 1-5 任一项所述的应用，其特征在于，所述药物辅料为赋形剂或稀释剂。

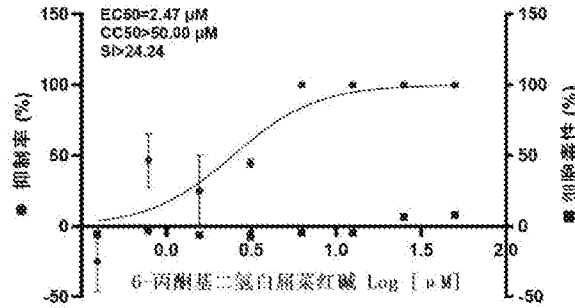
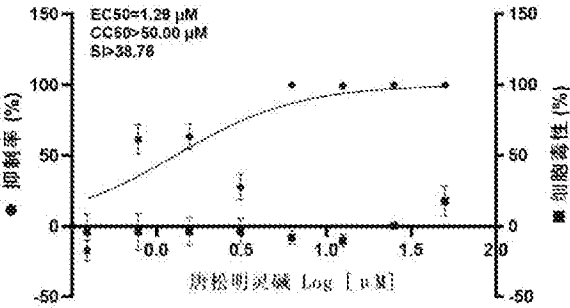
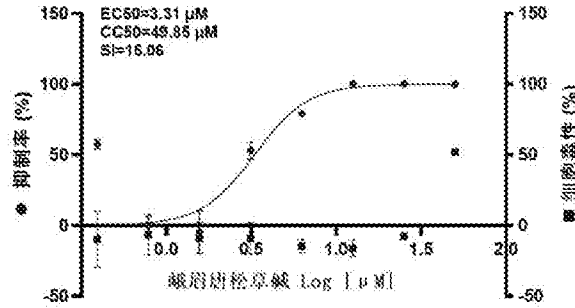
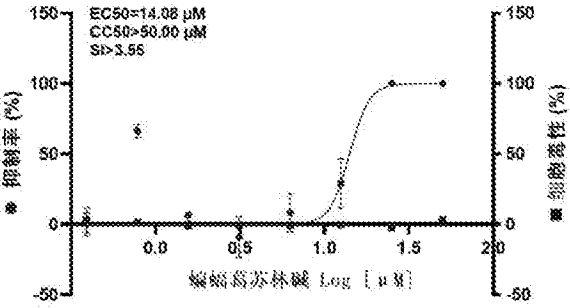
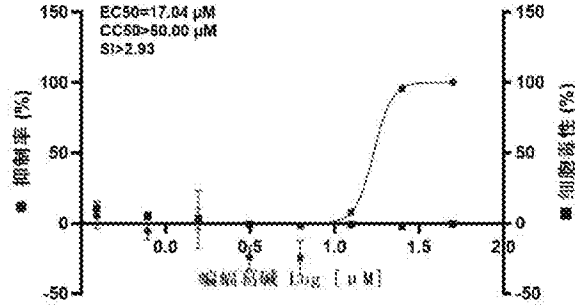
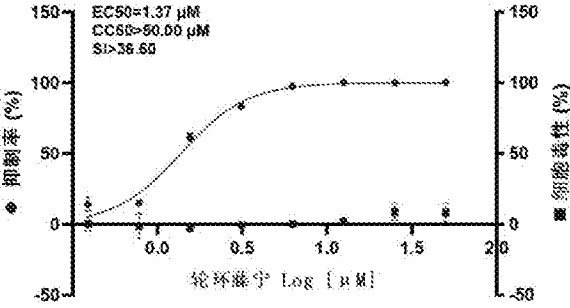
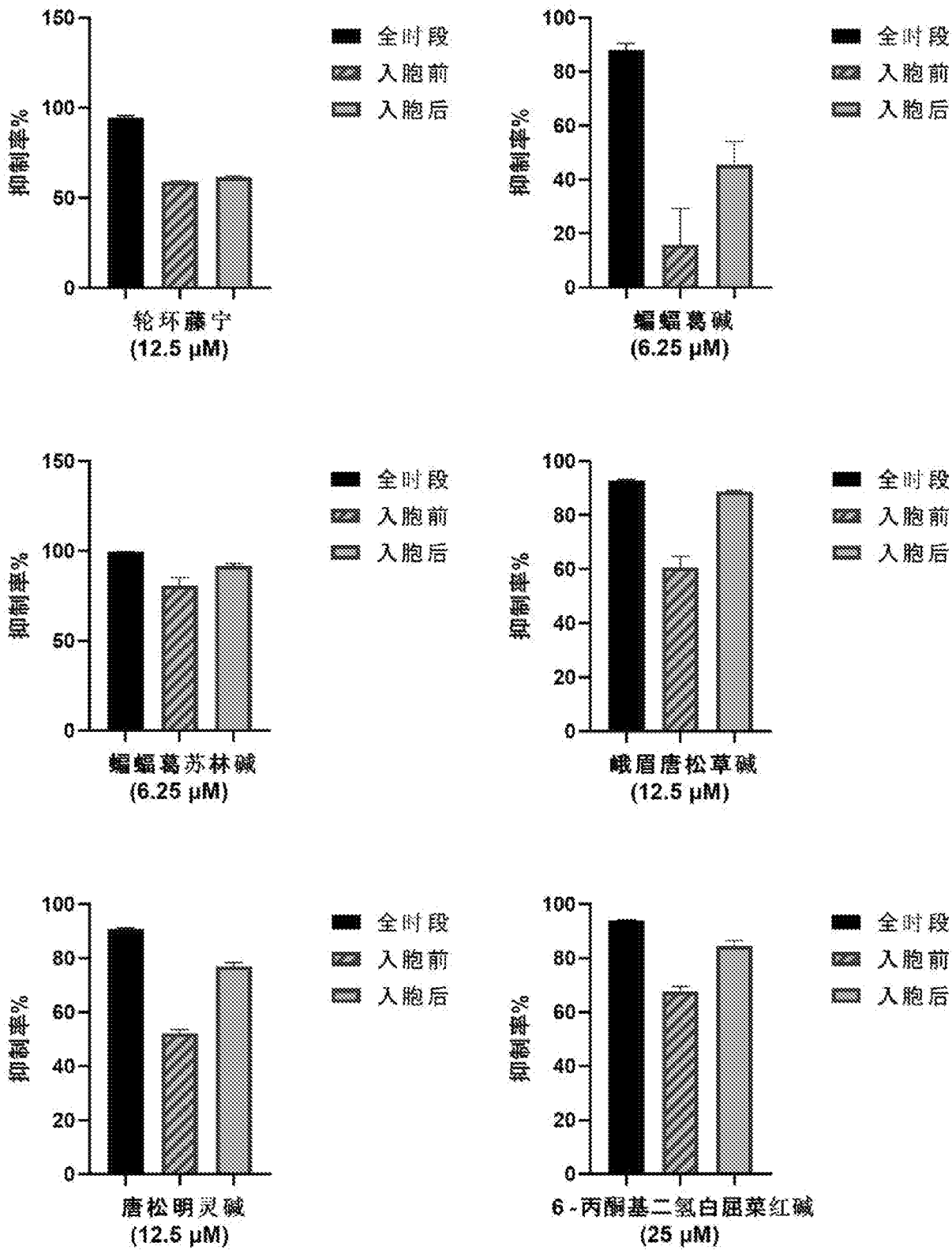


图 1

A



B

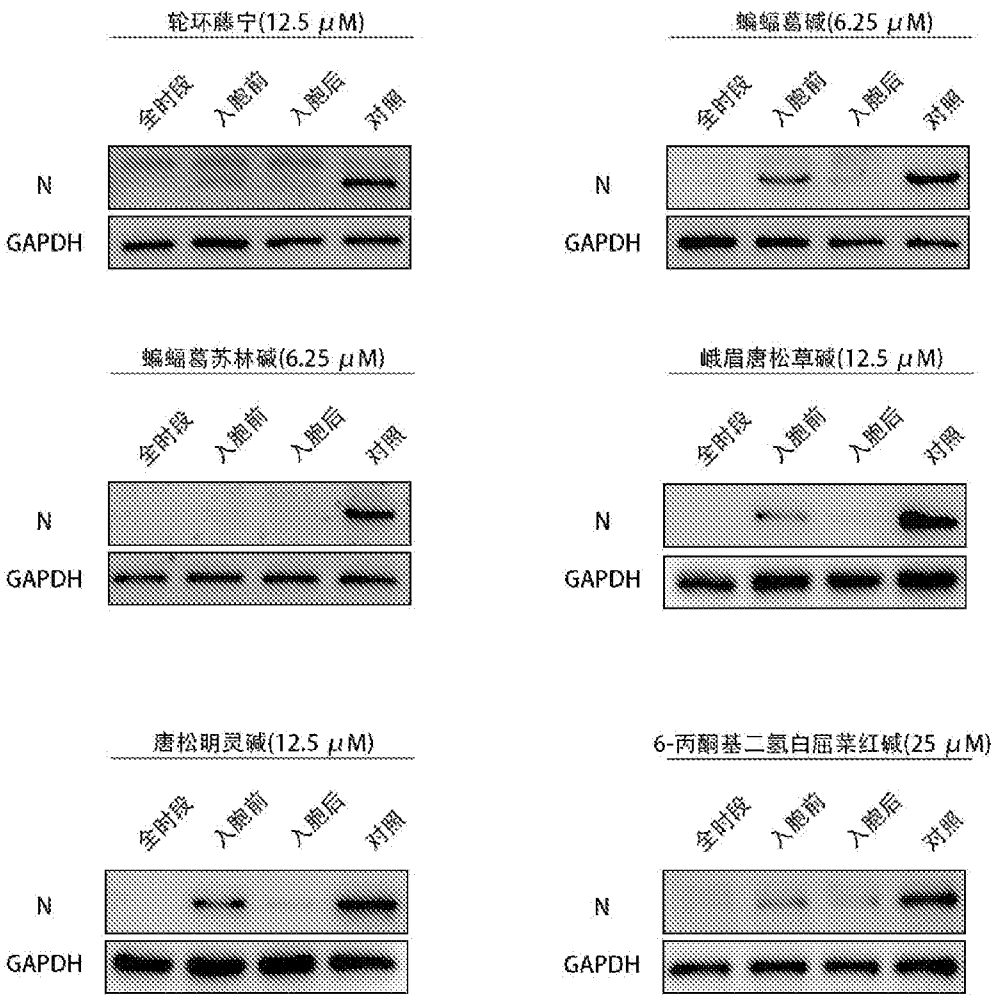


图 2

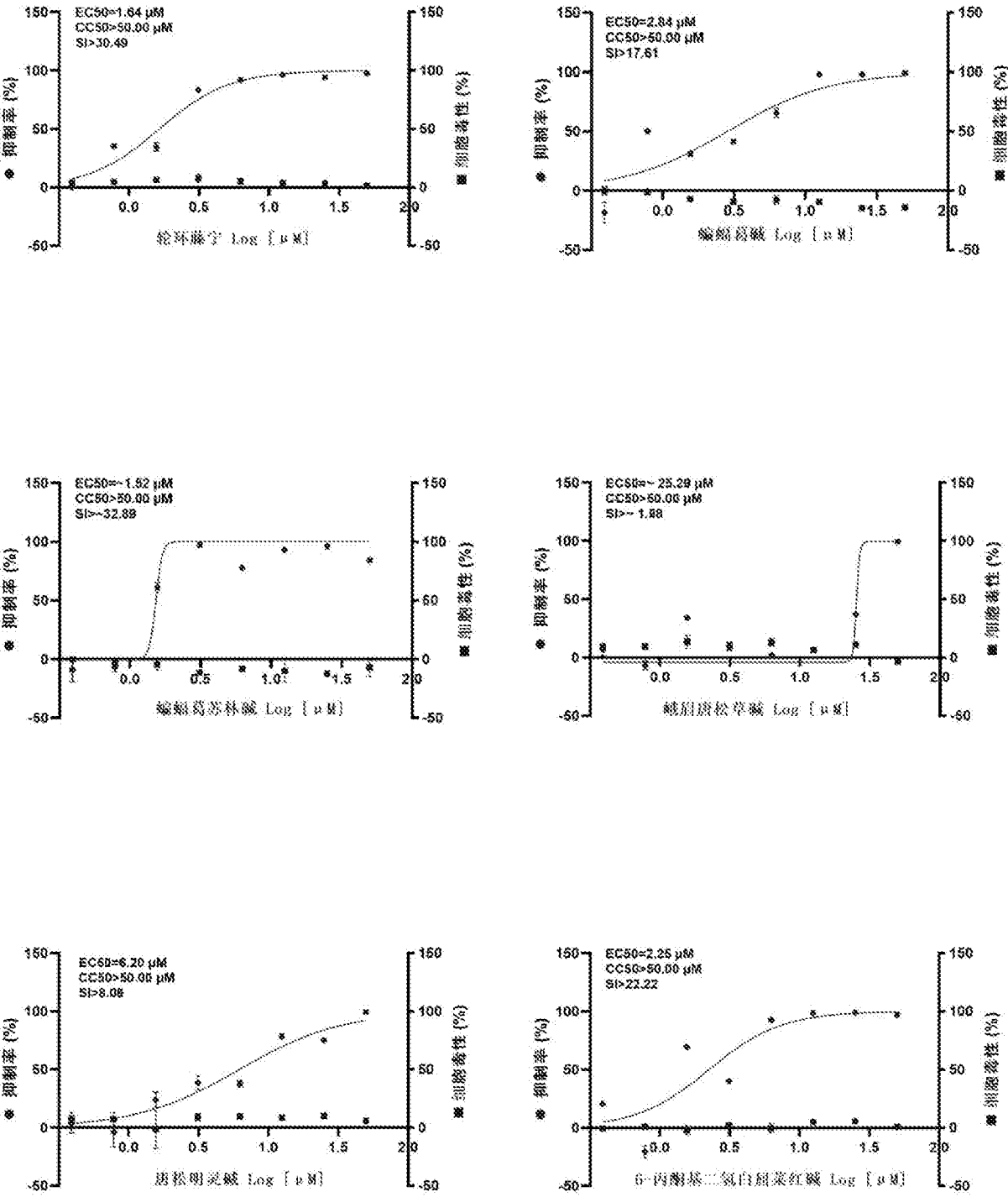


图 3

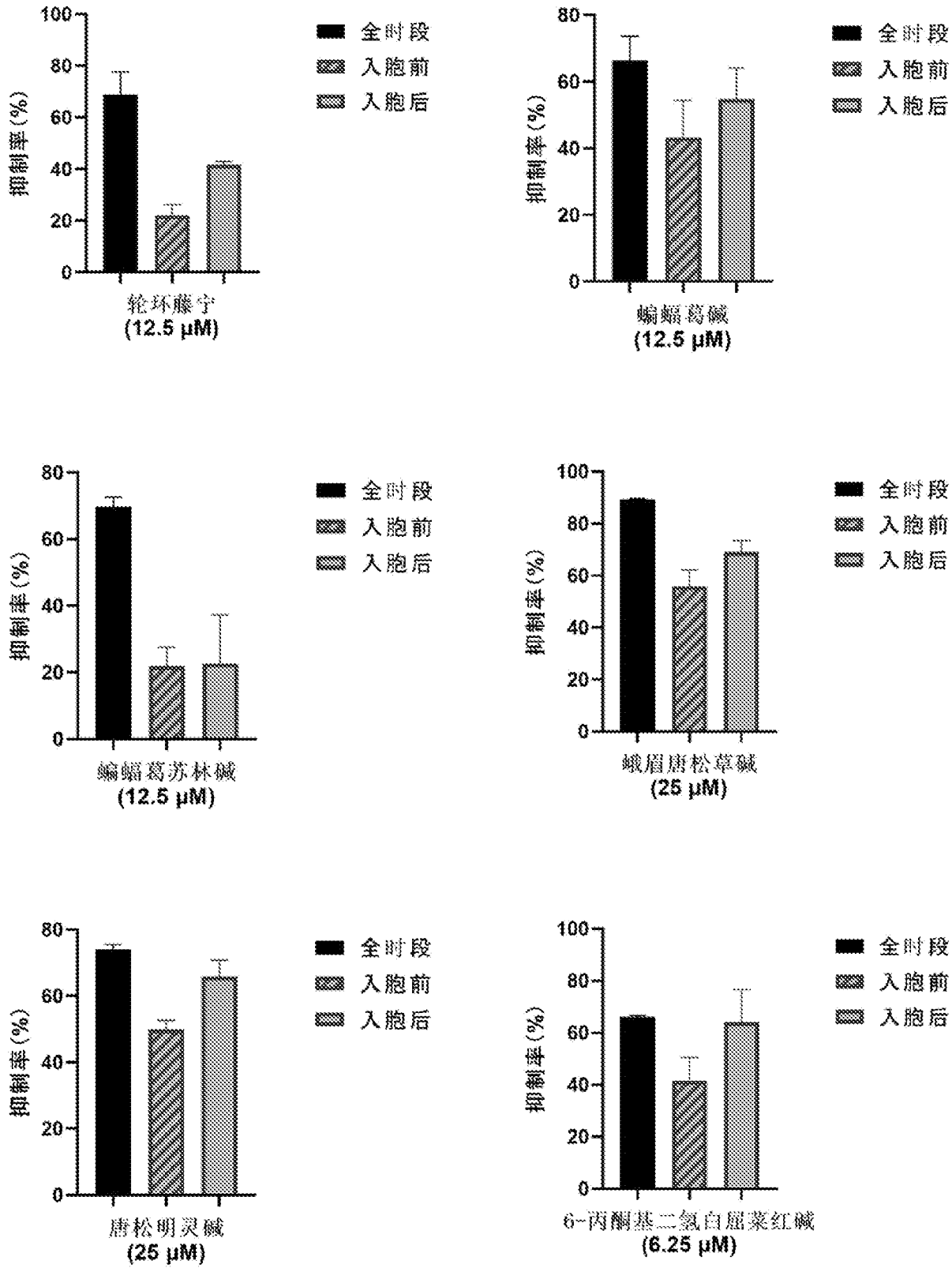


图 4

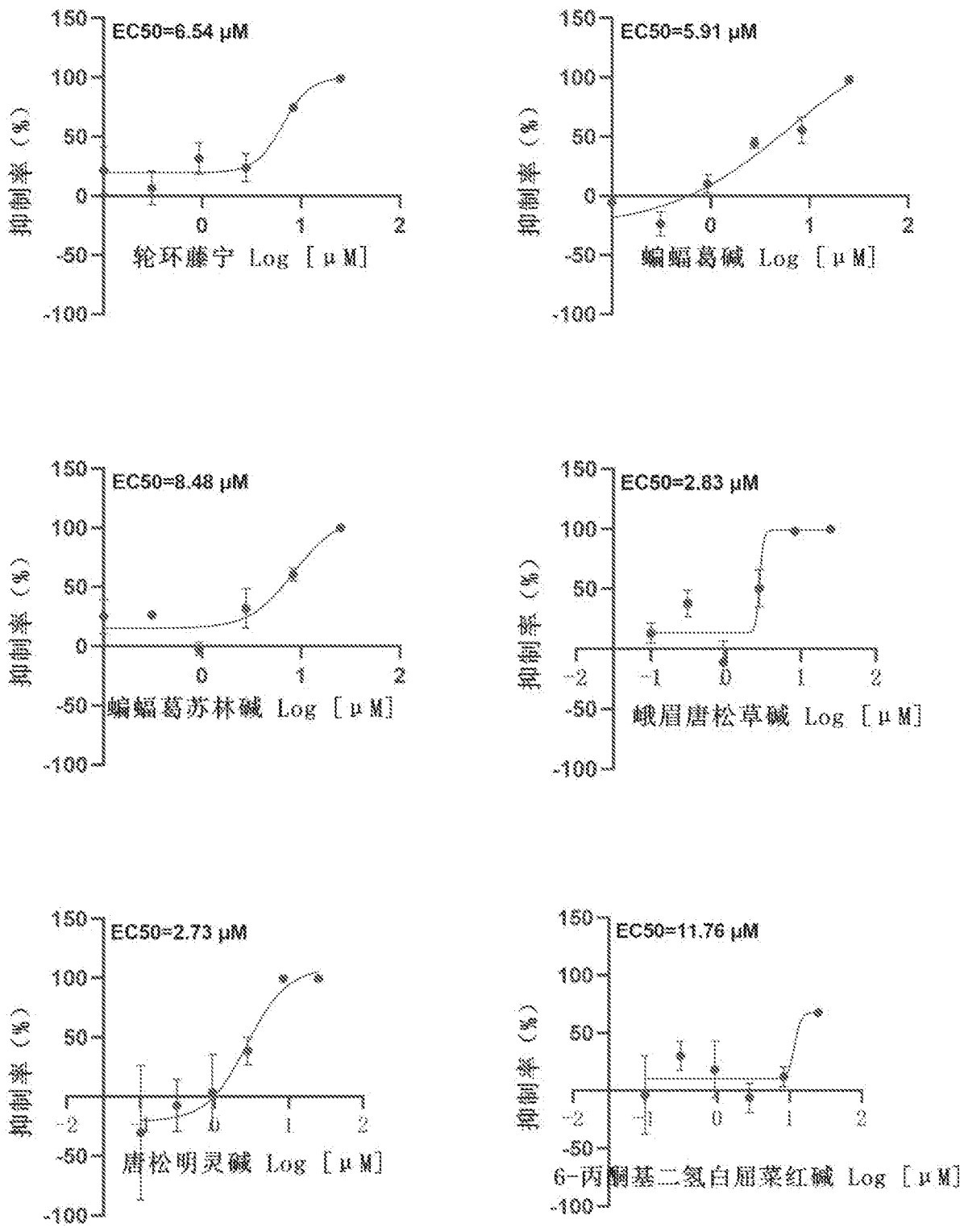


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/127237

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/4748(2006.01)i; A61K31/47(2006.01)i; A61P31/14(2006.01)i; A61P11/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:A61K31; A61K36; D01F8

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

ENTXT, CJFD, CNTXT, ENTXTC, VEN, WPABSC, CNKI, 百度, BAIDU, PUBMED, stn: 丙酮基二氢白屈菜红碱, 峨眉唐松草碱, 冠状病毒, 轮环藤碱, 轮环藤宁, 唐松明灵碱, 新冠, 乙酰甲基二氢白屈菜红碱, cycleanine, methoxyadiantifoline, thalmineline, 2019?nCoV, SARS-cov, SARS-CoV, COVID-19, corona?virus, novel coronavirus, 518-94-5, 115452-09-0, 28328-00-9, 22864-92-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 112516143 A (CHONGQING MEDICAL UNIVERSITY) 19 March 2021 (2021-03-19) description, paragraphs 5-25	1-8
X	CN 114306338 A (SUZHOU INSTITUTE OF SYSTEMS MEDICINE) 12 April 2022 (2022-04-12) description, paragraphs 9-34	1-8
X	WO 2021220284 A1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD) 04 November 2021 (2021-11-04) description, paragraphs 12-16 and 85-87	1-8
E	CN 116942733 A (CHANG GUNG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY; CHANG GUNG UNIVERSITY) 27 October 2023 (2023-10-27) description, paragraphs 5-10	1, 5, 6, 8
A	CN 114892304 A (ZHENGZHOU NUOKEN NEW MATERIAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 12 August 2022 (2022-08-12) description, paragraphs 10-18	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “D” document cited by the applicant in the international application
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 December 2023

Date of mailing of the international search report

03 January 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/127237

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110960532 A (JIN XIAOFEI) 07 April 2020 (2020-04-07) claims 1-8	1-8
A	Gangarapu Kiran et al. "Journal of Ayurveda and Integrative Medicine" <i>In Silico computational screening of Kabasura Kudineer- Official Siddha Formulation and JACOM against SARS-CoV-2 spike protein</i> , Vol. 13, 25 May 2020 (2020-05-25), ISSN: 0975-9476, abstract, and table 1-table 2	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/127237

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112516143	A	19 March 2021	CN	112516143	B	21 March 2023
CN	114306338	A	12 April 2022	None			
WO	2021220284	A1	04 November 2021	CA	3177537	A1	04 November 2021
				EP	4142702	A1	08 March 2023
				AU	2021265602	A1	19 January 2023
				JP	2023524522	A	12 June 2023
				KR	20230035524	A	14 March 2023
				BR	112022022243	A2	20 December 2022
CN	116942733	A	27 October 2023	None			
CN	114892304	A	12 August 2022	None			
CN	110960532	A	07 April 2020	None			

A. 主题的分类

A61K31/4748(2006.01)i; A61K31/47(2006.01)i; A61P31/14(2006.01)i; A61P11/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:A61K31; A61K36; D01F8

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

ENTXT,CJFD,CNTEXT,ENTXTC,VEN,WPABSC,CNKI, 百度, PUBMED, stn:丙酮基二氢白屈菜红碱,峨眉唐松草碱,冠状病毒,轮环藤碱,轮环藤宁,唐松明灵碱,新冠,乙酰甲基二氢白屈菜红碱,cycleanine, methoxyadiantifoline, thalmineline, 2019?nCoV,SARS-cov, SARS-CoV,COVID-19, corona?virus,novel coronavirus, 518-94-5, 115452-09-0, 28328-00-9, 22864-92-2

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 112516143 A (重庆医科大学) 2021年3月19日 (2021 - 03 - 19) 说明书第5-25段	1-8
X	CN 114306338 A (苏州系统医学研究所) 2022年4月12日 (2022 - 04 - 12) 说明书第9-34段	1-8
X	WO 2021220284 A1 (YISSUM RES DEV CO OF HEBREW UNIV JERUSALEM LTD) 2021年11月4日 (2021 - 11 - 04) 说明书第12-16, 85-87段	1-8
E	CN 116942733 A (长庚学校财团法人长庚科技大学 长庚大学) 2023年10月27日 (2023 - 10 - 27) 说明书第5-10段	1,5,6,8
A	CN 114892304 A (郑州诺肯新材料科技有限公司) 2022年8月12日 (2022 - 08 - 12) 说明书第10-18段	1-8
A	CN 110960532 A (金晓飞) 2020年4月7日 (2020 - 04 - 07) 权利要求1-8	1-8

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2023年12月31日

国际检索报告邮寄日期

2024年1月3日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

陈振中

电话号码 (+86) 020-28957133

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	Gangarapu Kiran 等. "Journal of Ayurveda and Integrative Medicine" In Silico computational screening of Kabasura Kudineer– Official Siddha Formulation and JA–COM against SARS–CoV–2 spike protein, 第13卷，2020年5月25日 (2020 – 05 – 25), ISSN: 0975–9476, 摘要，表1–表2	1–8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/127237

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	112516143	A	2021年3月19日	CN 112516143 B	2023年3月21日
CN	114306338	A	2022年4月12日	无	
WO	2021220284	A1	2021年11月4日	CA 3177537 A1	2021年11月4日
				EP 4142702 A1	2023年3月8日
				AU 2021265602 A1	2023年1月19日
				JP 2023524522 A	2023年6月12日
				KR 20230035524 A	2023年3月14日
				BR 112022022243 A2	2022年12月20日
CN	116942733	A	2023年10月27日	无	
CN	114892304	A	2022年8月12日	无	
CN	110960532	A	2020年4月7日	无	