



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101837003 B

(45) 授权公告日 2013.09.04

(21) 申请号 200910164117.2

A61K 31/352(2006.01)

(22) 申请日 2003.04.30

A61P 39/06(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 19/02(2006.01)

60/377,168 2002.04.30 US

(56) 对比文件

(62) 分案原申请数据

CN 1093914 A, 1994.10.26, 权利要求 1.

03809821.0 2003.04.30

US 6093403 A, 2000.07.25, 权利要求及说明书摘要 .

(73) 专利权人 尤尼根公司

审查员 谌侃

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 贾琦

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

A61K 31/7048(2006.01)

权利要求书2页 说明书37页 附图20页

A61K 31/353(2006.01)

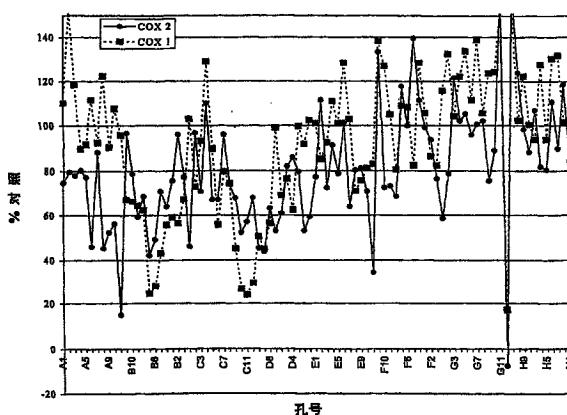
(54) 发明名称

作为治疗剂的包含无取代 B 环类黄酮和黄烷混合物的组合物

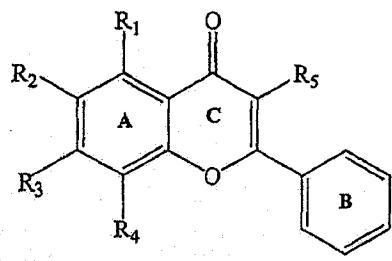
(57) 摘要

本发明提供新型组合物，该组合物包括两种特定种类化合物——无取代 B 环类黄酮和黄烷——的混合物，该组合物用于预防和治疗由 COX-2 和 5-LO 通道调节的疾病和病症。本发明还提供同时抑制环氧合酶 -2(COX-2) 和 5- 脂氧合酶 (5-LO) 酶、并减少 cox-2 mRNA 生成的新型方法。最后，本发明包括用于体重减轻和血糖控制的方法。本发明方法包括向需要的主体给药有效量的含有无取代 B 环类黄酮和黄烷以及药物学可接受的载体的混合物的组合物。本发明主要涉及预防和治疗由环氧合酶 -2(COX-2) 和 5- 脂氧合酶 (5-LO) 通道调节的疾病和病症，包括但不限于缓解与如骨关节炎、类风湿性关节炎的病症有关的关节不适和疼痛，以及其他由于使用过度导致的损伤。

CN 101837003 B



1. 组合物, 其总活性成分为至少一种无取代 B 环类黄酮和至少一种黄烷的混合物, 其中所述无取代 B 环类黄酮选自具有下列结构的化合物的组中:



其中

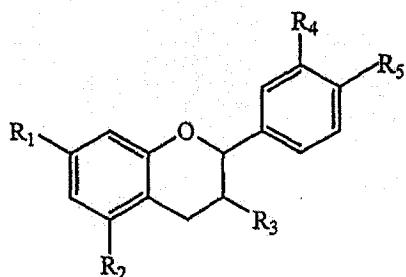
R_1, R_2, R_3, R_4 和 R_5 独立地选自以下组中: $-H, -OH, -SH, -OR, -SR, -NH_2, -NHR, -NR_2, -NR_3^+$
 X^- , 单个糖的糖苷或者多个糖结合的糖苷;

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基; 以及

X 选自药物学可接受的抗衡阴离子; 且

所述黄烷选自具有下列结构的化合物的组中:



其中

R_1, R_2, R_3, R_4 和 R_5 独立地选自以下组中: $-H, -OH, -SH, -OR, -SR, -NH_2, -NHR, -NR_2, -NR_3^+$
 X^- , 选自以下组中的酯: 没食子酸酯、乙酸酯、肉桂酰基酯和羟基肉桂酰基酯、三羟基苯甲酰酯和咖啡酰酯; 单个糖的糖苷或者多个糖结合的糖苷;

其中

R 是具有 1-10 个碳原子的烷基; 以及

X 选自药物学可接受的抗衡阴离子;

并且其中所述组合物包含佐剂、赋形剂或载体。

2. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中所述佐剂选自以下组中: 基于钙的盐类、硅石、硼、组氨酸、硫酸葡糖胺、硫酸软骨素、葡萄糖酸铜、纤维素、维生素 D、维生素 K、鲨鱼和牛软骨。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中在所述组合物中的无取代 B 环类黄酮比黄烷的重量比例选自 99 : 1 无取代 B 环类黄酮 : 黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮 : 黄烷的范围。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中所述组合物中无取代 B 环类黄酮 : 黄烷的重量比例为 85 : 15。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中所述糖为戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖或己酮糖。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中所述抗衡阴离子为氢氧根、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子或碳酸根。
7. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中所述混合物包含无取代 B 环类黄酮 - 贝加灵和黄烷 - 儿茶素和 / 或表儿茶素。
8. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中所述无取代 B 环类黄酮和所述黄烷分离自选自以下组的植物部分 : 茎、茎皮、根、根皮、生殖器官、叶及其他气生部分。
9. 如权利要求 8 所述的组合物, 其中所述茎为干、嫩枝、块茎、嫩梢和根茎。
10. 如权利要求 8 所述的组合物, 其中所述茎皮为主干树皮。
11. 如权利要求 8 所述的组合物, 其中所述生殖器官为种子和花。
12. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中所述无取代 B 环类黄酮分离自黄芩属植物中的一种或多种植物, 所述黄烷分离自金合欢属植物中的一种或多种植物。
13. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中 $-OR$ 为 $-OCH_3$ 。
14. 如权利要求 1 所述的组合物, 其中 $-SR$ 为 $-SCH_3$ 。
15. 权利要求 1-14 中任一项权利要求所述的组合物在制备用于减轻关节疼痛的药物中的应用。
16. 权利要求 1-14 中任一项权利要求所述的组合物在制备用于减轻关节僵硬的药物中的应用。
17. 权利要求 1-14 中任一项权利要求所述的组合物在制备用于改善活动能力的药物中的应用。

作为治疗剂的包含无取代 B 环类黄酮和黄烷混合物的组合物

[0001] 本申请是 2003 年 4 月 30 日提交的第 03809821.0 号发明名称为“作为治疗剂的包含无取代 B 环类黄酮和黄烷混合物的组合物”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明主要涉及预防和治疗由环氧合酶 -2(COX-2) 及 5- 脂氧合酶 (5-L0) 通道调节的疾病和病症。具体而言，本发明涉及一种用于预防和治疗由 COX-2 及 5-L0 通道调节的疾病和病症的新型组合物，该组合物包含混合两种特定种类的化合物——无取代 B 环类黄酮和黄烷——的混合物。本发明包括一种同时抑制 COX-2 和 5-L0 酶的蛋白质功能的方法，以及一种给药本发明的新型组合物以调节 mRNA 生成的方法。本发明还包括一种预防和治疗由 COX-2 和 5-L0 调节的疾病和病症的方法，所述疾病和病症包括但不限于与诸如骨性关节炎、类风湿性关节炎的病症相关的关节不适和疼痛以及其他由于使用过度导致的损伤。本发明进一步包括一种减少血糖和促进重量减轻的方法。

背景技术

[0003] 花生四烯酸 (AA) 从细胞膜中的释放与代谢通过几种不同途径导致生成前致炎 (pro-inflammatory) 代谢物。可论证的，最重要的发炎途径中的两种是由 5- 脂氧合酶 (5-L0) 和环氧合酶 (COX) 酶类调节的。这些平行的通道分别导致白三烯和前列腺素的生成，它们在炎症反应的引发和发展中扮演重要角色。这些血管活性化合物为化学吸引素，其促进发炎细胞渗透入组织并导致延长炎症反应。因此，负责生成炎症介质的酶成为许多目的为治疗炎症的新药的目标，该炎症是导致类风湿性关节炎、骨性关节炎、阿耳茨海默氏病和某些类型的癌症的发病机制的因素。

[0004] 环氧合酶 (COX) 的抑制是大多数非甾体抗炎药 (NSAIDS) 的作用机制。存在两种不同的同种型 COX 酶 (COX-1 和 COX-2)，它们共有大约 60% 的序列同序性，但表达事件以及功能不同。COX-1 是与前列腺素的生理生成相联系的组成型酶，前列腺素与如血小板凝集的正常生理功能的调节、胃中细胞功能的保护以及正常肾功能的维持有关 (Dannhardt and kiefer (2001) Eur. J. Med. Chem. 36 :109–26)。第二种同种型 COX-2 是可被前致炎细胞因子如白细胞介素 -1 β (IL-1 β) 和其他生长因子诱导的酶的形式 (Herschmann (1994) Cancer Metastasis Rev. 134 :241–56 ;Xie 等, (1992) Drugs Dev. Res. 25 :249–65)。该同种型催化从 AA 生成前列腺素 E₂ (PGE₂)。COX-2 的抑制是常规 NSAID 具有抗炎活性的原因。

[0005] 对 COX-2 和 5-L0 表现出双重特异性同时维持了相对于 COX-1 的 COX-2 选择性的抑制剂具有抑制 AA 代谢的多重途径的明显好处。该抑制剂通过抑制其生成可以阻断 PGE₂ 的以及多重白三烯 (LT) 的作用。其包括 LTB₄ 和 LTD₄ 的血管舒张、血管通透性和趋化性作用以及也公知作为 anaphalaxis 慢反应物质的 LTE₄ 的作用。其中，LTB₄ 具有最有效的趋化性以及化学增活作用 (Moore (1985), Prostanoids :Pharmacological, Physiological and Clinical Relevance, Cambridge University Press, N. Y., pp. 229–30)，且显示出在患炎症

性肠疾病的胃肠道粘膜中 (Sharon 和 Stenson (1983) *Gastroenterology* 84 :1306-13) 以及患类风湿性关节炎患者的滑液中有所提高 (Klickstein 等 (1980) *J. Clin. Invest.* 66 : 1166-70 ;Rae 等 (1982) *Lancet* ii :1122-4)。

[0006] 除上述双重 COX-2/5-L0 抑制剂的好处外,许多双重抑制剂不引发 NSAID 或 COX-2 抑制剂典型的副作用,包括传统 NSAID 所引起的胃肠道损伤和不适。有人提出 NSAID 引发的胃炎主要归因于 5-L0 代谢物,特别是 LTB₄,其将细胞吸引至胃损伤部位并因此引起进一步的损伤 (Kircher 等, (1997) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 56 :417-23)。白三烯代表前列腺素类被抑制后胃粘膜内主要的 AA 代谢物。这些化合物显示出其在很大程度上促成应用 NSAID 所导致的胃上皮损伤 (Celotti 和 Laufer (2001) *Pharmacol. Res.* 43 : 429-36)。COX-2 和 5-L0 的双重抑制剂还显示出抑制大鼠模型中关节炎心脏 (arthritic hearts) 的冠状血管收缩 (Gok 等 (2000) *Pharmacology* 60 :41-46)。总之,这些特征显示出由于既增强功效还减少副作用,双重 COX-2 和 5-L0 抑制剂相对于特异性 COX-2 抑制剂和非特异性 NSAID 具有明显的优势。

[0007] 由于 COX 抑制剂的作用机制与大多数传统的 NSAID 重叠, COX 抑制剂被用于许多相同症状如短期症状中与发炎有关的疼痛和肿胀以及发炎在其中起关键作用的慢性疾病。短期症状包括与轻度擦伤、晒伤或接触性皮炎有关的炎症的治疗,以及与紧张有关的疼痛和偏头痛以及月经痛的减轻。慢性疾病包括关节炎疾病如类风湿性关节炎和骨关节炎。尽管类风湿性关节炎很大程度上是自身免疫性疾病且骨关节炎是由关节软骨的退化导致的,对分别与其相关的炎症的减少使得这些疾病的患者的生活质量大幅提高 (Wienberg (2001) *Immunol. Res.* 22 :319-41 ;Wollheim (2000) *Curr. Opin. Rheum.* 13 :193-201)。由于发炎通常是风湿病的一部分,COX 抑制剂的应用得以扩展至包括如系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus) (SLE) (Goebel 等 (1999) *Chem. Res. Tox.* 12 :488-500 ;Patrono 等 (1985) *J. Clin. Invest.* 76 :1011-1018) 以及风湿性皮肤病如硬皮病。COX 抑制剂还用于减轻非风湿起因的炎症性皮肤症状如牛皮癣,这些疾病中减轻前列腺素过度生成导致的发炎具有直接的好处 (Fogh 等 (1993) *Acta Derm. Venerol (Oslo)* 73 :191-3)。

[0008] 除了它们作为抗炎药剂的应用外, COX 抑制剂的另一个有潜力的作用是治疗癌症。经证实在各种人恶性肿瘤中 COX-2 过度表达,且 COX-2 抑制剂显示对动物皮肤、乳房和膀胱肿瘤的治疗有效。尽管不明白其作用的机制,但 COX-2 的过度表达显示出抑制致瘤细胞种类的凋亡并增强 其侵袭力 (Dempke 等 (2001) *J. Can. Res. Clin. Oncol.* 127 :411-17 ;Moore 和 Simmons (2000) *Current Med. Chem.* 7 :1131-44)。增强由于 COX-2 过度表达导致的前列腺素的生成有可能促进细胞增生并因此增加血管生成 (Moore (1985) *Prostanoids : Pharmacological, Physiological and Clinical Relevance*, Cambridge University Press, N. Y. , pp. 229-30 ;Fenton 等 (2001) *Am. J. Clin. Oncol.* 24 :453-57)。

[0009] 已经有许多临床研究对 COX-2 抑制剂在预防和治疗不同种类的癌症中的潜在应用进行了评价。1999 年在美国有 130,000 结直肠癌新病例确诊。阿司匹林,一种非特异性 NSAID,经发现能够减少结直肠癌发病率 40-50 % (Giovannucci 等 (1995) *N. Engl. J. Med.* 333 :609-614) 和死亡率 50% (Smalley 等 (1999) *Arch. Intern. Med.* 159 :161-166)。1999 年 FDA 批准了用于 FAP(家族性腺瘤性息肉) 的 COX-2 抑制剂以减少结直肠癌的死亡率。据信,COX-2 抑制剂可以成功防止和 / 或治疗有证据表明 COX-2 参与其中的其他癌症,

包括但不限于食道癌、头和颈癌、乳腺癌、膀胱癌、宫颈癌、前列腺癌、干细胞性肝癌和非小细胞肺癌 (Jaeckel 等 (2001) Arch. Otolaryngol. 127 :1253–59 ;Kirschenbaum 等 (2001) Urology 58 :127–31 ;Dannhardt 和 Kiefer (2001) Eur. J. Med. Chem. 36 :109–26)。还可证明 COX-2 抑制剂能够有效预防高危患者的结肠癌。同样有证据表明 COX-2 抑制剂可以预防或甚至消除几种威胁生命的癌症。迄今为止, 多达 50 例的研究表明 COX-2 抑制剂可以预防动物癌变前和恶化的肿瘤, 并还可能预防膀胱、食道和皮肤癌症。可以证明, COX-2 抑制剂是本世纪最重要的预防医学成就之一。

[0010] 近来科学进展确认了 COX-2 表达、普通炎症以及阿尔茨海默氏病 (AD) 之间的联系 (Ho 等 (2001) Arch. Neurol. 58 :487–92)。在动物模型中, COX-2 酶过度表达的转基因小鼠具有易受损伤的神经元。国家衰老研究所 (NIA) 正在启动一项新的临床研究以确定 NSAID 是否能够延缓 阿尔茨海默氏病的进展。将对萘普生 (一种非特异性 NSAID) 和罗非考昔 (Vioxx, 一种 COX-2 特异性选择性 NSAID) 进行评价。先前的证据表明炎症促进阿尔茨海默氏病。据阿尔茨海默氏病协会和 NIA 表示, 美国大约有 4 百万人患有 AD, 并且预计到世纪中将达到 1400 万。

[0011] COX 酶 (也称为前列腺素 H₂ 合酶) 催化两个独立反应。在第一个反应中, AA 经代谢形成不稳定的前列腺素 G₂ (PGG₂), 这是环氧合酶反应。在第二个反应中, PGG₂ 转化为内过氧化物 (PGH₂), 这是过氧化物酶反应。短命 PGH₂ 无需酶即降解为 PGE₂。此处所述化合物是下述发现策略的结果, 该发现策略是将一聚焦于 COX-1 和 COX-2 过氧化物酶活性的分析法与一种识别新 COX 酶抑制剂的去复制 (derePLICATION) 方法加以结合。

[0012] 术语基因表达经常用于形容 mRNA 生成和蛋白合成的广泛结果。事实上, 实际基因表达的变化可能根本不导致蛋白质水平可观察的变化。其推论, 蛋白质水平的变化不总是起因于基因表达的变化也可为真。由染色体组 DNA 到功能蛋白的途径中存在 6 个可能的调节点:(1) 核因子及其他导致前 mRNA 生成的信号的转录调节;(2) 前 mRNA 加工调节包括外显子剪接、5' 位帽子结构和 3' 位聚腺苷化序列的附加以及成熟 mRNA 从细胞核到细胞质的转运;(3)mRNA 转运调节, 其控制 mRNA 到转译成为蛋白质的特定细胞质位点的定位;(4)mRNA 降解调节, 其在任何蛋白转译之前或作为从特定 mRNA 结束转译的方法控制 mRNA 库的大小;(5) 蛋白质转译起始的特定速率的转译调节;以及(6) 转译后加工调节包括如糖基化和蛋白水解断裂的修饰。在基因研究领域中, 重要的是应用技术, 该技术测量的是接近于初始步骤 (例如 mRNA 水平) 而不是该途径中后续步骤的基因表达水平 (例如蛋白质水平)。

[0013] 最近的报道提出可以引入从药用植物黄芩中分离出的类黄酮改变 cox-2 基因的表达 (Wakabayashi 和 Yasui (2000) Eur. J. Pharmacol. 406 :477–481 ;Chen 等 (2001) Biochem. Pharmacol. 61 :1417–1427 ;Chi 等 (2001) 61 :1195–1203 以及 Raso 等 (2001) Life Sci. 68 :921–931)。所有上述引用的对 cox-2 基因表达的研究都使用 Western Blot 技术评价未经在分子水平确认的推定的基因表达的改变。由于该方法仅测定蛋白质水平而非具体转录产物 mRNA, 导致蛋白质表达的观察到的增加的原因有可能包括其他机制。例如, 据报道 LPS 通过在 3' 非编码区 (3' UTR) 发现的不稳定序列调节 mRNA 的半衰期 (Watkins 等 (1999) Life Sci. 65 :449–481), 其对基因转录速率不变而蛋白质表达增加做出解释。因此, 这些治疗情况是否会带来基因表达有意义的改变这一问题仍需考虑。

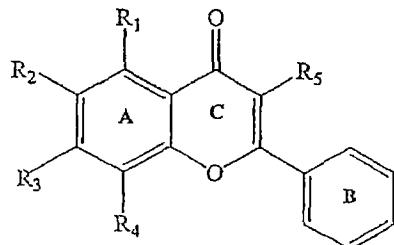
[0014] 如 RT-qPCR 和 DNA 微阵列分析的技术依靠在 mRNA 水平进行分析, 并且可用于在

不同的条件下,例如有或无药物试剂存在的条件下对基因表达水平进行评价。在以无取代B环类黄酮或黄烷作为治疗剂应用时,文献中没有公知的使用直接或间接特定地测定mRNA数量的技术的报道。

[0015] 类黄酮是一种广泛分布的天然产物。经证实类黄酮的摄取与发生痴呆的危险逆相关。尽管不知道其作用机制,但据推测其归因于类黄酮的抗氧化作用 (Commenges 等 (2000) Eur. J. Epidemiol. 16 :357-363)。多元酚类黄酮通过在 mRNA 水平作用于包括 cox-2、核因子 κ B(NF κ B) 和 bcl-X(L) 的基因,从而在变性的结肠细胞 (colonocytes) 中引发程序性细胞死亡、分化和生长抑制 (Wenzel 等 (2000) Cancer Res. 60 :3823-3831)。据报道, B 环羟基的数目在 cox-2 转录活性的抑制中起重要作用 (Mutoh 等 (2000) Jpn. J. Cancer Res. 91 : 686-691)。

[0016] 无取代B环黄酮和黄酮醇是一类特殊的类黄酮,如下列结构通式所示,其芳香B环上无取代基(本文称作无取代B环类黄酮):

[0017]



[0018] 其中

[0019] R₁、R₂、R₃、R₄ 和 R₅ 独立地选自以下组中 : -H、-OH、-SH、-OR、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-NR₃⁺X⁻, 碳、氧、氮或硫, 单个或者多个糖结合的糖苷, 该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物;

[0020] 其中

[0021] R 是具有 1-10 个碳原子的烷基; 以及

[0022] X 选自药物学可接受的抗衡阴离子, 其包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

[0023] 无取代B环类黄酮相对稀少。在 9396 种合成或从天然来源分离的类黄酮中, 已知仅有 231 种无取代B环类黄酮 (The Combined Chemical Dictionary, Chapman & Hall/CRC, 5 : 1 版 e 2001 年 6 月)。据报道, 无取代B环类黄酮具有种种生物活性。例如, 高良姜精 (3,5,7-三羟基黄酮) 起抗氧化剂和自由基清除剂的作用, 并且据信是一种有前景的候选抗遗传毒性和癌症化学预防剂 (Heo 等 (2001) Mutat. Res. 488 :135-150)。其为酪氨酸酶单酚酶抑制剂 (Kubo 等 (2000) Bioorg. Med. Chem. 8 :1749-1755)、兔心脏碳基还原酶抑制剂 (Imamura 等 (2000) J. Biochem. 127 :653-658), 具有抗菌活性 (Afolayan 和 Meyer (1997) Ethnopharmacol. 57 :177-181) 和抗病毒活性 (Meyer 等 (1997) J. Ethnopharmacol. 56 : 165-169)。贝加因以及另外两种无取代B环类黄酮对人乳腺癌细胞具有抗增殖活性 (So 等 (1997) Cancer Lett. 112 :127-133)。

[0024] 通常基于类黄酮的有效性随机测定其活性。偶尔地, 特定生物活性 强调需要 B 环上的取代, 如与 p- 糖蛋白高的亲和力结合 (Boumendjel 等 (2001) Bioorg. Med.

Chem. Lett. 11 :75-77), 强心作用 (Itoigawa 等 (1999) J. Ethnopharmacol. 65 :267-272)、抗亚油酸过氧化氢诱导毒性的对内皮细胞的保护作用 (Kaneko 和 Baba (1999) Biosci. Biotechnol. Biochem. 63 :323-328)、COX-1 抑制活性 (Wang (2000) Phytomedicine 7 :15-19) 以及前列腺素内过氧化物合酶活性 (Kalkbrenner 等 (1992) Pharmacology 44 :1-12) 需要 B 环上被取代。仅有为数不多的出版物提到无取代 B 环类黄酮中未取代的 B 环的重要性。一个实例为抑制 NADPH 醛受体氧化还原酶的 2- 苯基黄酮作为潜在的抗凝血剂的应用 (Chen 等 (2001) Biochem Pharmacol. 61 :1417-1427)。

[0025] 报道的各种无取代 B 环类黄酮的作用机制存在争议。无取代 B 环类黄酮柯因 (Liang 等 (2001) FEBS Lett. 496 :12-18)、沃贡宁 (Chi 等 (2001) Biochem. Pharmacol. 61 :1195-1203) 以及 halangin (Raso 等 (2001) Life Sci. 68 :921-931) 的抗炎活性通过过氧化物酶体增生物活化受体 γ (PPAR γ) 的活化以及对脱粒和 AA 释放的影响从而与诱导型 (inducible) 环氧合酶和一氧化氮合酶的抑制有关 (Tordera 等 (1994) Z. Naturforsch [C] 49 :235-240)。据报道,木蝴蝶素、贝加因和沃贡宁抑制 12- 脂氧合酶活性而不影响环氧合酶 (You 等 (1999) Arch. Pharm. Res. 22 :18-24)。新近据报道,沃贡宁、贝加灵和贝加因的抗炎活性通过抑制由一氧化氮抑制剂和脂多糖诱导的诱导型一氧化氮合酶和 cox-2 酶生成而产生 (Chen 等 (2001) Biochem. Pharmacol. 61 :1417-1427)。还有报道显示木蝴蝶素通过抑制 NF κ B 的活化起作用 (Chen 等 (2001) Biochem. Pharmacol. 61 :1417-1427)。最后,有报道显示沃贡宁抑制巨噬细胞中诱导型 PGE₂ 的生成 (Wakabayashi 和 Yasui (2000) Eur. J. Pharmacol. 406 :477-481)。

[0026] 据报道,黄芩根抗炎活性的机理是贝加因对丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 磷酸化以及对 Ca²⁺ 离子载体 A23187 诱导的 PGE₂ 的释放的抑制 (Nakahata 等 (1999) Nippon Yakurigaku Zasshi 114, Supp. 11 :215P-219P; Nakahata 等 (1998) Am. J. Chin. Med. 26 :311-323)。据报道显示源自黄芩的贝加灵抑制超抗原葡萄球菌外毒素刺激的 T 细胞增生和 IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 以及干扰素 - γ (IFN- γ) 的生成 (Krakauer 等 (2001) FEBS Lett. 500 :52-55)。因此,贝加灵的抗炎活性与由超抗原活化的前致炎细胞因子调节的信号通路的抑制有关。然而,还有人提出贝加灵的抗炎活性是由于限制它们的生物活性的各种趋化因子的结合 (Li 等 (2000) Immunopharmacol. 49 :295-306)。近来,有报道表明贝加灵对由凝血酶和凝血酶受体激动肽诱导的粘附分子表达 (Kimura 等 (2001) PlantaMed. 67 :331-334), 以及 MAPK 级联 (Nakahata 等 (1999) Nippon Yakurigaku Zasshi 114, Supp 11 :215P-219P; Nakahata 等 (1998) Am. J. ChinMed. 26 :311-323) 的作用。

[0027] 中国药用植物黄芩含有大量的无取代 B 环类黄酮,包括贝加因、贝加灵、沃贡宁和 baicalenoside。传统上,该植物用于治疗许多病症,包括清热、泻火、湿温和暑热病;高烧引起的烦渴;痈、溃疡和其他花农的皮肤感染;上呼吸道感染如急性扁桃体炎、咽喉炎和猩红热;病毒性肝炎;肾炎;盆腔炎 (pelvitis);痢疾;呕血和鼻出血。该植物传统上还用于预防流产 (见 Encyclopedia of Chinese Traditional Medicine, 上海科技出版社, 上海, 中国, 1998)。临幊上,黄芩现用于治疗的病症包括小儿肺炎、小儿细菌性腹泻、病毒性肝炎、急性胆囊炎、高血压、由伤口和外科手术引起的局部急性发炎、支气管哮喘和上呼吸道感染 (Encyclopedia of Chinese Traditional Medicine, 上海科技出版社, 上海, 中国, 1998)。黄芩的根治疗支气管哮喘的药理学效能据报道与无取代 B 环类黄酮的存在以及其

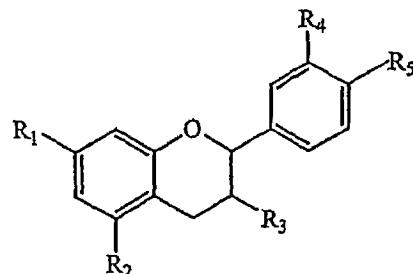
抑制作用有关,它们可以抑制嗜酸性细胞的与嗜酸性细胞趋化因子相关的补充 (Nakajima 等 (2001) Planta Med. 67 (2) :132-135)。

[0028] 迄今为止,许多天然存在的无取代 B 环类黄酮得以商品化用于各种用途。例如,黄芩提取物的脂质体剂型用于护肤 (美国专利 5,643,598 ;5,443,983)。由于对致癌基因具有抑制作用,贝加灵被用于预防癌症 (美国专利 6,290,995)。贝加灵和其他化合物被用作抗病毒、抗菌和免疫调节剂 (美国专利 6,083,921) 并作为天然的抗氧化剂 (波兰专利公开 9,849,256)。柯因由于其降低焦虑性质得以应用 (美国专利 5,756,538)。抗炎类黄酮用于控制和治疗肛门直肠和结肠疾病 (美国专利 5,858,371) 以及抑制脂氧合酶 (美国专利 6,217,875)。这些化合物与葡糖胺胶原以及其他成分一起制成剂型用于修补和维护结缔组织 (美国专利 6,333,304)。类黄酮酯含有美容组合物的活性成分 (美国专利 6,235,294)。于 2002 年 3 月 1 日提出,序列号为 10/091,362,名为“Identification of Free-B-ring Flavonoids as Potent COX-2 Inhibitors”(无取代 B 环类黄酮作为有效的 COX-2 抑制剂的鉴定) 的美国申请公开了通过向需要的主体给药含有无取代 B 环类黄酮的组合物或含有无取代 B 环类黄酮混合物的组合物来抑制环氧合酶 COX-2 的方法。本文特别引入该申请的整体作为参考。

[0029] 日本专利 63027435 描述了贝加因的提取和富集,日本专利 61050921 描述了贝加灵的纯化。

[0030] 黄烷包括以下述结构通式所表示的化合物:

[0031]



[0032] 其中

[0033] R₁、R₂、R₃、R₄ 和 R₅ 独立地选自以下组中 : -H、-OH、-SH、-OCH₃、-SCH₃、-OR、-SR、-NH₂、-NRH、-NR₂、-NR₃⁺X⁻, 所述取代基的酯包括但不限于没食子酸酯、乙酸酯、肉桂酰基和羟基肉桂酰基酯、三羟基苯甲酰酯和咖啡酰酯、以及它们的化学衍生物; 碳、氧、氮或硫, 单个或者多个糖结合的糖苷, 该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物; 二聚、三聚以及其他多聚黄烷;

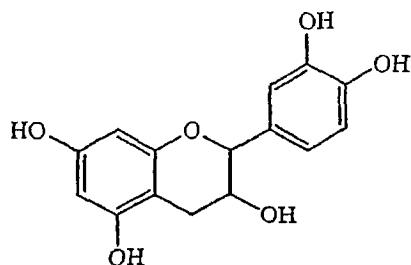
[0034] 其中

[0035] R 是具有 1-10 个碳原子的烷基; 以及

[0036] X 选自药物学可接受的抗衡阴离子, 包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

[0037] 儿茶素是一种黄烷, 主要发现于金合欢, 其具有下列结构:

[0038]



[0039] 儿茶素既单独又与其他在茶中发现的类黄酮一同起作用，并且其既具有抗病毒又具有抗氧化活性。据证实，儿茶素对病毒性肝炎的治疗有效。其还显示可预防对心脏、肾、肺、脾的氧化损伤，并可抑制胃癌细胞的生长。

[0040] 儿茶素与其异构体表儿茶素抑制前列腺素内过氧化物合酶， IC_{50} 值为 $40 \mu M$ (Kalkbrenner 等 (1992) Pharmacol. 44 :1-12)。从 4 种植物种类 *Atuna racemosa*、*Syzygium carynacarpum*、*Syzygium malaccense* 和 *Vantanea peruviana* 中分离出来的五种黄烷-3-醇衍生物包括 (+)-儿茶素和没食子儿茶精相对于 COX-1 对 COX-2 显示出同等或较弱的抑制作用，其 IC_{50} 值从 $3.3 \mu M$ 到 $138 \mu M$ 变化 (Noreen 等 (1998) Planta Med. 64 :520-524)。从 *Ceiba pentandra* 皮中分离出的 (+)-儿茶素抑制 COX-1 的 IC_{50} 值为 $80 \mu M$ (Noreen 等 (1998) J. Nat. Prod. 61 :8-12)。可从商业途径 得到的纯 (+)-儿茶素抑制 COX-1 的 IC_{50} 值视试验条件而定，约为 183 到 $279 \mu M$ ，对 COX-2 不具有选择性 (Noreen 等 (1998) J. Nat. Prod. 61 :1-7)。

[0041] 绿茶儿茶素当补充加入至 Sprague dawley 雄性大鼠的膳食中时，降低了血小板 PLA_2 的活性水平并显著减少了血小板环氧合酶水平 (Yang 等 (1999) J. Nutr. Sci. Vitaminol. 45 :337-346)。儿茶素和表儿茶素据报道可微弱抑制 cox-2 基因在人结肠癌 DLD-1 细胞中的转录 ($IC_{50} = 415.3 \mu M$) (Mutoh 等 (2000) Jpn. J. Cancer Res. 91 :686-691)。(+)-儿茶素保护神经不受红葡萄酒侵害的能力源自儿茶素的抗氧化剂性能，而不是其对细胞内酶类如环氧合酶、脂氧合酶或一氧化氮合酶的抑制作用 (Bastianetto 等 (2000) Br. J. Pharmacol. 131 :711-720)。由绿茶和红茶中纯化而得的儿茶素衍生物如表没食子儿茶精-3-没食子酸酯 (EGCG)、表没食子儿茶精 (EGC)、表儿茶素-3-没食子酸酯 (ECG) 和茶黄素，其显示出对人结肠粘膜和结肠肿瘤组织中 AA 的环氧合酶和脂氧合酶依赖性代谢 (Hong 等 (2001) Biochem. Pharmacol. 62 :1175-1183) 以及诱导型 cox-2 基因表达和 PGE_2 生成的抑制 (Park 等 (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 286 :721-725)。由 *Celastrus orbiculatus* 的气生部分分离得到的表阿夫儿茶精展现出剂量依赖性 COX-1 活性抑制，其 IC_{50} 值为 $15 \mu M$ ，并且据证实，在口服 $100mg/kg$ 剂量之后其对角叉菜胶诱导的鼠踝肿胀具有抗炎活性 (Min 等 (1999) Planta Med. 65 :460-462)。

[0042] 儿茶素及其源自各种植物特别是从绿茶叶子的衍生物被用于治疗 HPV 感染的尖锐湿疣 (Cheng, 美国专利 5,795,911) 以及治疗由乳头状瘤病毒引起的增生 (Cheng, 美国专利 5,968,973 和 6,197,808)。儿茶素及其衍生物还被局部用于如皮肤癌、牛皮癣、蜘蛛血管 (spider vein) 或下出射光瞳 (under eye circle) 等病症中 (Anderson, 美国专利 6,248,341)、用于对抗 UVB 诱导的小鼠肿瘤发生 (Agarwal 等 (1993) Photochem. Photobiol. 58 :695-700)、用于在基因表达和酶活性水平抑制一氧化氮合酶 (Chan, 美国专利 5,922,756)、以及用作生发剂 (Takahashi, 美国专利 6,126,940)。基于儿茶素的化合

物还被与其他提取物和维生素一同配制成治疗痤疮 (Murad, 美国专利 5, 962, 517)、硬化消化器组织 (Shi, 美国专利 5, 470, 589) 和用于在治疗雄激素紊乱相关的疾病及癌症中抑制 5 α -还原酶活性的剂型 (Liao, 美国专利 5, 605, 929)。绿茶提取物与其他 7 种植物提取物配制成通过抑制 COX-2 酶消炎的制剂, 而没有确定任何具体有效成分 (Mewmark, 美国专利 6, 264, 995)。

[0043] 金合欢是豆科树木和灌木属。金合欢属包括多于 1000 种属于豆科及含羞草亚科的物种。金合欢分布于全世界如中、南美洲的热带和亚热带地区, 非洲、亚洲部分地区以及具有最多特有品种的澳洲。金合欢主要生于森林经常为空旷多刺灌木状态的干燥干旱地区。金合欢属主要根据叶子形态学分为三个亚属——金合欢、Aculiferum 和 Heterophyllum。金合欢可分为两种常见组群——典型的二回羽状叶品种和叶状柄品种。叶状柄是扩展为叶状结构没有小叶的改良的叶柄, 其为对旱生植物条件的适应。典型的二回羽状叶品种主要发现于遍及热带, 而叶状柄品种则主要生于澳洲。据报道, 印度具有 40 多种金合欢品种。Gamble 在其名为“Flora of Madras Presidency”的书中列出 23 种南印度的本土品种, 其中 15 种发现于泰米尔纳德。但从那时起, 许多新金合欢品种被引进到印度, 并且如今单在泰米尔纳德一处即有大约 40 个品种。本土的品种主要是多刺树木或灌木, 少数为多刺的蔓生草木, 如 *A. caesia*、蛇藤和藤金合欢。许多品种为从非洲和澳洲引入, 包括具有二回羽状叶的黑荆树、*A. picnantha* 和白粉金合欢和叶状柄品种大叶相思、*A. holoserecia* 和马占相思。

[0044] 金合欢有重大的经济意义, 其提供了鞣质、树胶、木材、燃料和饲料的原料。鞣质主要从树皮中分离得到, 被广泛用于鞣制皮革和碎革。一些金合欢树皮还用于当地醋剂的调味。如藤金合欢的一些成分也产出 皂昔, 其为各种植物多糖中的任何一种, 当与水一同混合并搅拌时, 形成象肥皂的泡沫。皂昔用于洗涤剂、发泡剂和乳化剂。金合欢属的一些物种花气味芬芳因此用于生产香水。例如, 金合欢香水从 *A. ferruginea* 中得到。许多金合欢的心材用于制造农业工具, 还是木柴的来源。金合欢树胶广泛用于药物和甜点, 并用作纺织工业中的定型和修整材料。紫胶虫可在数个品种上生长, 包括阿拉伯胶金合欢和儿茶。一些品种被用于荒地造林, 包括阿拉伯胶金合欢, 其可抵挡洪水泛滥, 并且一些同种地区已成为鸟类避难所。

[0045] 迄今为止, 约从各种金合欢品种中分离出 330 种化合物。类黄酮为一类水溶性植物颜料, 其为从金合欢种分离出的主要类型的化合物。已鉴定有大约 180 种不同的类黄酮, 其中 110 种为黄烷。萜类是从金合欢属物种中分离出的第二大类化合物, 已鉴定 48 种化合物。从金合欢中分离出的其他类型化合物包括生物碱 (28)、氨基酸 / 肽 (20)、鞣质 (16)、烃类 (15)、含氧杂环 (15) 和脂肪族化合物 (10) (Buckingham, The Combined Chemical Dictionary, Chapman & Hall CRC, 5 :2 版, Dec. 2001)。

[0046] 所有金合欢品种中具有中等到高浓度的酚类化合物, 特别是黄烷 (Abdulrazak 等 (2000) J. Anim. Sci. 13 :935-940)。在历史上, 金合欢属的大多数植物和提取物被用作收敛药治疗胃肠道紊乱、腹泻、消化不良以及止血 (Vautrin (1996) Universite Bourgogne (France) European abstract 58-01C :177 ;Saleem 等 (1998) Hamdard Midicus. 41 :63-67)。*A. Arabica Willd.* 的树皮和莢中含有大量的鞣质, 因此被用作收敛药和祛痰药 (Nadkarni (1996) India Materia Medica, Bombay Popular Prakashan, pp. 9-17)。

据报道,从来自索马里的 *A. tortilis* 的树皮中分离出的二芳基丙醇衍生物具有松弛平滑肌作用 (Hagos 等 (1987) *Planta Med.* 53 :27–31, 1987)。还有报道指出分离自胜利金合欢的萜类糖苷对二甲基苯并蒽诱导的鼠皮致癌作用具有抑制作用 (Hanausek 等 (2000) *Proc. Am. Assoc. Can. Res. Annu. Mtg.* 41 :663) 且诱发细胞凋亡 (Haridas 等 (2000) *Proc. Am. Assoc. for Can. Res. Annu. Mtg.* 41 :600)。据报道阿拉伯胶金合欢的植物提取物具有致痉、血管收缩和抗高血压作用 (Amos 等 (1999) *Phytotherapy Research* 13 :683–685; Gilani 等 (1999) *Phytotherapy Research* 13 :665–669), 以及抗血小板凝集作用 (Shah 等 (1997) *Gen. Pharmacol.* 29 :251–255)。报道指出阿拉伯胶金合欢具有抗炎活性。据推测, 类黄酮、多糖和有机酸为可能的活性成分 (Dafallah 和 Al-Mustafa (1996) *Am. J. Chin. Med.* 24 :263–269)。迄今为止, 唯一有报道的由金合欢分离的 5- 脂氧合酶抑制剂为单萜氨甲酰 (Seikine 等 (1997) *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 45 :148–11)。

[0047] 金合欢树胶与其他植物成分配制剂型用于预防溃疡而没有任何有效成分得以鉴定 (Fuisz, 美国专利 5,651,987)。金合欢树胶还与其他植物成分被配制成制剂型并通过降低营养组合物的粘度 (Chancellor, 美国专利 5,545,411) 改善药物溶出度 (Blank, 美国专利 4,946,684)。

[0048] 金合欢树皮提取物在日本申请的专利为作为增白剂外部应用 (Abe, 日本专利 10025238)、作为葡萄糖转移酶抑制剂的牙科应用 (Abe, 日本专利 07242555)、作为蛋白质合成抑制剂 (Fukai, 日本专利 07165598)、作为活性氧清除剂用于外部皮肤制剂 (Honda, 日本专利 0717847, Bindra 美国专利 6,1266,950), 以及作为透明质酸酶抑制剂口服用于预防炎症、花粉热和咳嗽 (Ogura, 日本专利 07010768)。

[0049] 文献的综述揭示, 没有人类临床应用使用无取代 B 环类黄酮和黄烷混合物缓解疼痛或测定用于治疗骨关节炎的生化临床结果。本报告看来是这些化合物在人中最早的随机、双盲、安慰剂对照的安全性和有效性试验。

发明内容

[0050] 本发明包括一种由无取代 B 环类黄酮和黄烷混合物组成的新型组合物。本文中新型组合物是指 UnivestinTM。在组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例可根据预防和治疗特定疾病和病症有关的适应症和特殊需要进行调节。通常无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中, 无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中: 约 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 和 10 : 90。在本发明优选的实施方案中, 组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 85 : 15。在优选的实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离, 黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

[0051] 本发明还包括可同时有效地既抑制 COX-2 又抑制 5-LT 的方法。该同时双重抑制 COX-2 和 5-LT 通道的方法包括向需要的主体给药含有合成和 / 或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物的组合物。该方法的有效性由纯化的酶在不同的细胞系、多种动物模型以及最终人类临床试验中得以证实。组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中, 无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中: 约 90 : 10、

80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 和 10 : 90。在本发明优选的实施方案中,组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 85 : 15。在优选的实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离,黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

[0052] 本发明还包括预防和治疗 COX-2 和 5-L0 诱导的疾病和病症的方法,包括但不限于月经痛、动脉硬化、心脏病发作、肥胖症、糖尿病、X 综合症、阿尔茨海默氏病、呼吸过敏反应、慢性静脉功能不全、痔疮、系统性红斑狼疮、牛皮癣、慢性紧张性头痛、偏头痛、炎症性肠疾病,由 病毒、细菌和真菌引起的感染,晒伤、热灼伤、接触性皮炎、黑素瘤和癌瘤。治疗和预防由 COX-2 和 5-L0 诱导的疾病和病症的方法包括向需要的主体给药有效量的含有合成和 / 或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物以及药物学可接收载体的组合物。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中,无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中:约 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 和 10 : 90。在本发明优选的实施方案中,组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 85 : 15。在优选的实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离,黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

[0053] 在另一实施方案中,本发明包括治疗一般关节疼痛和僵硬、改善活动能力和身体机能以及预防和治疗骨关节炎和类风湿性关节炎病理症状的方法。治疗关节疼痛和僵硬、改善活动能力和身体机能以及预防和治疗骨关节炎和类风湿性关节炎病理症状的方法包括向需要的主体给药有效量的含有合成和 / 或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物以及药物学可接收载体的组合物。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中,无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中:约 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 和 10 : 90。在本发明优选的实施方案中,组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 85 : 15。在优选的实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离,黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

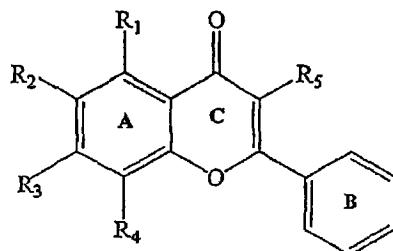
[0054] 本发明包括由于活动能力、柔性和身体机能改善而增加身体活动度从而减轻体重和控制血糖的方法,所述方法包括向需要的主体给药有效量的含有合成和 / 或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄 烘的混合物以及药物学可接收载体的组合物。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中,无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中:约 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 和 10 : 90。在本发明优选的实施方案中,组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 85 : 15。在优选的实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离,黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

[0055] 本发明还包括一种调节与疼痛通道有关的 mRNA 的生成的方法,所述方法包括向需要的主体给药有效量的含有合成和 / 或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物以及药物学可接收载体的组合物。尽管不受理论的限制,申请人相信调节 mRNA 生成的能力是由无取代 B 环 / 黄烷组合物的活性成分通过降低由 cox-2 基因而不是

cox-1 基因生成的 mRNA 的生成实现的。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中, 无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中: 约 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 和 10 : 90。在本发明优选的实施方案中, 组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 85 : 15。在优选的实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离, 黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

[0056] 此处所述无取代 B 环类黄酮也指可根据以下的发明应用的无取代 B 环黄烷和黄酮醇, 包括以下结构通式所示的化合物:

[0057]



[0058] 其中

[0059] R_1, R_2, R_3, R_4 和 R_5 独立地选自以下组中: -H、-OH、-SH、-OR、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-NR₃⁺X⁻, 碳、氧、氮或硫, 单个或者多个糖结合的糖苷, 该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物;

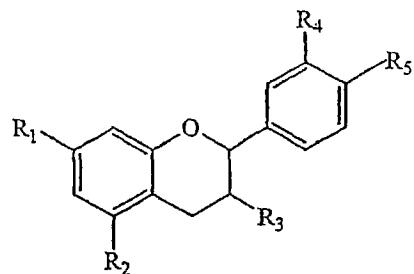
[0060] 其中

[0061] R 是具有 1-10 个碳原子的烷基; 以及

[0062] X 选自药物学可接受的抗衡阴离子, 其包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

[0063] 可根据以下发明应用的黄烷包括以下的结构通式所示的化合物:

[0064]



[0065] 其中

[0066] R_1, R_2, R_3, R_4 和 R_5 独立地选自以下组中: -H、-OH、-SH、-OCH₃、-SCH₃、-OR、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-NR₃⁺X⁻, 所述取代基的酯, 包括但不限于没食子酸酯、乙酸酯、肉桂酰基和羟基肉桂酰基酯、三羟基苯甲酰酯和咖啡酰酯、以及它们的化学衍生物; 碳、氧、氮或硫, 单个或者多个糖结合的糖苷, 该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物; 二聚、三聚以及其他多聚黄烷;

[0067] 其中

[0068] R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

[0069] X 选自药物学可接受的抗衡阴离子，其包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

[0070] 本发明的无取代 B 环类黄酮可由合成方法获得，或从下列各科植物中提取，包括但不限于番荔枝科、菊科 (Asteraceae)、紫葳科、使君子科、菊科 (Compositae)、大戟科、唇形科、樟科 (Lauraceae)、豆科、桑科、松科、凤尾蕨科、中国蕨科、榆科和姜科。该无取代 B 环类黄酮可由高等植物属提取、浓缩和纯化，包括但不限于假鹰爪属、Achyrocline、木蝴蝶属、Buchenavia、香青属、山芫荽属、鼠麴草属、蜡菊属、矢车菊属、泽兰属、Baccharis、乌桕属、黄芩属、Molsa、羽萼木属、水苏属、牛至属、新塔花属、山胡椒属、黄肉楠属、金合欢属、鱼藤属、甘草属、鸡血藤属、水黄皮属、灰毛豆属、木波罗属、榕属、粉叶蕨属、隐囊蕨属、松属、榆属和山姜属。

[0071] 如上所述，本发明的黄烷可由选自金合欢属的一种或多种植物中提取而来。在一个优选的实施方案中该植物选自以下组中：儿茶、*A. concinna*、金合欢、阿拉伯胶树、*A. speciosa*、阿拉伯金合欢、*A. caesia*、蛇藤、藤金合欢、黑荆树、*A. picnantha*、白粉金合欢、大叶相思、*A. holoserecia* 和马占相思。

[0072] 本发明包括用不同的酶和体内模型对不同的无取代 B 环类黄酮和黄烷进行评价以优化剂型得到最佳效果。该组合物的有效性和安全性通过人类临床试验得以证实。本发明提供可用于商业上分离、纯化以及将 *Acacia* 黄烷与无取代 B 环类黄酮组合以得到具有所需生理活性的组合物的方法。本发明组合物可以本领域普通技术人员所知的任意方法给药。给药方式包括但不限于肠内（口服）给药、非胃肠道给药（静脉、皮下和肌肉）给药和局部应用。本发明治疗方法包括需要的主体内服或外敷有效量的合成和 / 或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物。

[0073] 应理解为前述总体描述及下述详细描述都仅是举例说明和解释，而并非对所要求保护的本发明的限制。

附图说明

[0074] 图 1 图示为源自儿茶的 HTP 部分对 COX-1 和 COX-2 的抑制。该提取物的提取和分离如实施例 1 和实施例 3 所述。对该提取物对重组绵羊 COX-1 (■) 或绵羊 COX-2 (◆) 过氧化物酶活性抑制的测定如实施例 2 所述。数据显示为未经处理的对照的百分比。

[0075] 图 2 图示为源自黄芩的 HTP 部分对 COX-1 和 COX-2 的抑制。该提取物的提取和分离如实施例 1 和实施例 3 所述。对该提取物对重组绵羊 COX-1 (■) 或绵羊 COX-2 (◆) 过氧化物酶活性抑制的测定如实施例 2 所述。数据显示为未经处理的对照的百分比。

[0076] 图 3 为从黄芩 (lot#RM052302-01) 分离得到的无取代 B 环类黄酮含量为 82.2% 的标准化的提取物的 HPLC 色谱图。用 HPLC/PDA/MS 阐释出十种结构，为贝加灵、沃贡宁 -7- 葡糖苷酸、木蝴蝶素 A7- 葡糖苷酸、贝加因、沃贡宁、柯因 -7- 葡糖苷酸、去甲沃贡宁 -7- 葡糖苷酸、黄芩素、柯因和木蝴蝶素 A。

[0077] 图 4 图示为分离和纯化自黄芩的贝加因对 COX-1 和 COX-2 的抑制图。测定该提取物对重组绵羊 COX-1 (◆) 或绵羊 COX-2 (■) 过氧化物酶活性的抑制。数据显示为没有抑制剂的试验对抑制剂浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 的抑制百分比。对 COX-1 的 IC_{50} 经计算为 $0.18 \mu\text{g/mL}$ /

酶单位,对 COX-2 的 IC₅₀ 经计算为 0.28 μ g/mL/ 酶单位。

[0078] 图 5 图示为分离和纯化自黄芩的贝加灵对 COX-1 和 COX-2 的抑制图。测定该提取物对重组绵羊 COX-1(◆) 或绵羊 COX-2(■) 过氧化物酶活性的抑制。数据显示为没有抑制剂的试验对抑制剂浓度 (μ g/mL) 的抑制百分比。对 COX-1 的 IC₅₀ 经测定为 0.44 μ g/mL/ 酶单位,对 COX-2 的 IC₅₀ 经测定为 0.28 μ g/mL/ 酶单位。

[0079] 图 6 图示为分离自黄芩的无取代 B 环类黄酮提取物 (基于 HPLC 测定含 83% 贝加灵) 对 COX-1 和 COX-2 的抑制图。测定该提取物对重组 绵羊 COX-1(◆) 或绵羊 COX-2(■) 过氧化物酶活性的抑制。数据显示为没有抑制剂的试验对抑制剂浓度 (μ g/mL) 的抑制百分比。对 COX-1 的 IC₅₀ 经计算为 0.24 μ g/mL/ 酶单位,对 COX-2 的 IC₅₀ 经计算为 0.48 μ g/mL/ 酶单位。

[0080] 图 7 图示为分离和纯化自儿茶的儿茶素对 COX-1 和 COX-2 的抑制图。测定该提取物对重组绵羊 COX-1(◆) 或绵羊 COX-2(■) 过氧化物酶活性的抑制。数据显示为没有抑制剂的试验对抑制剂浓度 (μ g/mL) 的抑制百分比。对 COX-1 的 IC₅₀ 测定为 0.11 μ g/mL/ 酶单位,对 COX-2 的 IC₅₀ 经测定为 0.42 μ g/mL/ 酶单位。

[0081] 图 8 图示为分离和纯化自儿茶的经含有 50% 总儿茶素的标准化的黄烷提取物对 COX-1 和 COX-2 的抑制图。测定该提取物对重组绵羊 COX-1(◆) 或绵羊 COX-2(■) 过氧化物酶活性的抑制。数据显示为没有抑制剂的试验对抑制剂浓度 (μ g/mL) 的抑制百分比。对 COX-1 的 IC₅₀ 经计算为 0.17 μ g/mL/ 酶单位,对 COX-2 的 IC₅₀ 经测定为 0.41 μ g/mL/ 酶单位。

[0082] 图 9 描述用 80% 甲醇水溶液提取自儿茶的黄烷的 HPLC 色谱图。

[0083] 图 10 图示为纯化自儿茶的黄烷对 5-L0 的抑制图。测定该化合物对重组马铃薯 5- 脂氧合酶活性 (◆) 的抑制。数据显示为没有抑制剂的试验对抑制剂浓度 (μ g/mL) 的抑制百分比。对 5-L0 的 IC₅₀ 为 1.38 μ g/mL/ 酶单位。

[0084] 图 11 图示为如实施例 14 所述的无取代 B 环类黄酮与黄烷以 85 : 15 的比例结合得到的 Univestin™ 组合物对 COX-1 和 COX-2 的抑制图。测定 Univestin™ 对重组绵羊 COX-1(◆) 或绵羊 COX-2(■) 过氧化物酶活性的抑制。数据显示为没有抑制剂的试验对抑制剂浓度 (μ g/mL) 的抑制百分比。对 COX-1 的 IC₅₀ 为 0.76 μ g/mL/ 酶单位,对 COX-2 的 IC₅₀ 为 0.80 μ g/mL/ 酶单位。

[0085] 图 12 图示为如实施例 14 所述的无取代 B 环类黄酮与黄烷以 50 : 50 的比例结合得到的 Univestin™ 组合物对 COX-1 和 COX-2 的抑制图。测定 Univestin™ 对重组绵羊 COX-1(◆) 或绵羊 COX-2(■) 过氧化物酶活性的抑制。数据显示为没有抑制剂的试验对抑制剂浓度 (μ g/mL) 的抑制百分比。对 COX-1 的 IC₅₀ 为 0.38 μ g/mL/ 酶单位,对 COX-2 的 IC₅₀ 为 0.84 μ g/mL/ 酶单位。

[0086] 图 13 图示为如实施例 14 所述的无取代 B 环类黄酮与黄烷以 20 : 80 的比例结合得到的 Univestin™ 组合物对 COX-1 和 COX-2 的抑制图。测定 Univestin™ 对重组绵羊 COX-1(◆) 或绵羊 COX-2(■) 过氧化物酶活性的抑制。数据显示为没有抑制剂的试验对抑制剂浓度 (μ g/mL) 的抑制百分比。对 COX-1 的 IC₅₀ 为 0.18 μ g/mL/ 酶单位,对 COX-2 的 IC₅₀ 为 0.41 μ g/mL/ 酶单位。

[0087] 图 14 描述在 THP-1 或 HT-29 细胞中 (ATCC) 以 ELISA 测定的提高 Univestin™ 浓

度对 LPS 诱导的新合成的 LTB_4 (◆) 的作用。合并提取物的活性以诱导的 LTB_4 合成的%抑制率表示。

[0088] 图 15 是如实施例 16 中所示, 将以 ELISA 测定的在未诱导的细胞中以 $3 \mu \text{g}/\text{mL}$ UnivestinTM 处理后残留在 HT-29 细胞中的 LTB_4 水平同以 $3 \mu \text{g}/\text{mL}$ 布洛芬的处理进行比较。

[0089] 图 16 是将各种 UnivestinTM 浓度对 cox-1 和 cox-2 基因表达的影响进行比较。将表达水平标准化至 18S rRNA 表达水平 (内参照), 然后校正至未处理、无 LPS 条件。该图证实, 在 LPS 刺激并暴露于 UnivestinTM 后, cox-2 而非 cox-1 基因表达下降。

[0090] 图 17 是将 $3 \mu \text{g}/\text{mL}$ UnivestinTM 对 cox-1 和 cox-2 基因表达的作用与同等浓度的其他 NSAID 进行对比。基因水平标准化至 18S rRNA 表达水平 (内标对照), 然后校正至未处理、无 LPS 条件。

[0091] 图 18 图示为测定炎症抑制的方法的耳肿胀数据。将无取代 B 环类黄 酮与黄烷以 80 : 20 的比例结合得到的 UnivestinTM 与未处理小鼠以及给予消炎痛 (50mg/kg) 的小鼠通过口腔灌服进行比较。数据表示为对每只小鼠未处理对比处理过的耳垂的微米级测量的差异。

[0092] 图 19 显示 100mg/kg 的 UnivestinTM (无取代 B 环类黄酮比黄烷比例为 80 : 20 的标准化提取物) 对注射 AA 的小鼠踝 (UnivestinTM+ 花生四烯酸) 的作用与未处理小鼠 (未处理 + 花生四烯酸)、未注射 AA 的小鼠 (阴性对照) 或注射液体载体的小鼠 (载体对照) 进行比较。

[0093] 图 20 图示为以 250mg/ 天剂量的 UnivestinTM 治疗的基线、30、60 和 90 天时的疼痛指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0094] 图 21 图示为以 500mg/ 天剂量的 UnivestinTM 治疗的基线、30、60 和 90 天时的疼痛指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0095] 图 22 图示为以 200mg/ 天剂量的塞来昔布治疗的基线、30、60 和 90 天时的疼痛指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0096] 图 23 图示为以安慰剂治疗的基线、30、60 和 90 天时的疼痛指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0097] 图 24 图示为以 250mg/ 天剂量的 UnivestinTM 治疗的基线、30、60 和 90 天时的僵硬指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0098] 图 25 图示为以 500mg/ 天剂量的 UnivestinTM 治疗的基线、30、60 和 90 天时的僵硬指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0099] 图 26 图示为以 200mg/ 天剂量的塞来昔布治疗的基线、30、60 和 90 天时的僵硬指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0100] 图 27 图示为以安慰剂治疗的基线、30、60 和 90 天时的僵硬指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0101] 图 28 图示为以 250mg/ 天剂量的 UnivestinTM 治疗的基线、30、60 和 90 天时的功能障碍 (functional impairment) 指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0102] 图 29 图示为以 500mg/ 天剂量的 UnivestinTM 治疗的基线、30、60 和 90 天时的功能障碍指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0103] 图 30 图示为以 200mg/ 天剂量的塞来昔布治疗的基线、30、60 和 90 天时的功能障

碍指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0104] 图 31 图示为以安慰剂治疗的基线、30、60 和 90 天时的功能障碍指数 WOMAC 分值的 95% 置信区间。

[0105] 图 32 显示 250 和 500mg/ 天剂量的 UnivestinTM 在降低 BMI 作用方面与 200mg/ 天的塞来昔布及安慰剂的比较。

[0106] 图 33 显示 250 和 500mg/ 天剂量的 UnivestinTM 在减轻体重作用方面与 200mg/ 天的塞来昔布及安慰剂的比较。

[0107] 图 34 显示 250 和 500mg/ 天剂量的 UnivestinTM 在降血脂作用方面与安慰剂的比较。

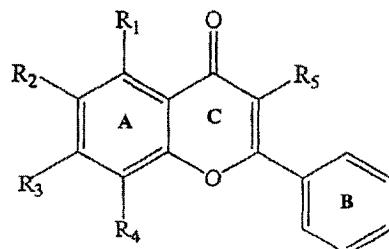
[0108] 具体实施方式

[0109] 此处所使用的各种术语提到本发明的多个方面。提供以下定义以帮助阐明本发明组成的说明。

[0110] 应注意术语“一个”(“a”或“an”)实体是指一个或多个该实体；例如一种类黄酮指一种或多种类黄酮。同样地，术语“一个”、“一个或多个”和“至少一个”在此处可互相替换。

[0111] 此处所用的“无取代 B 环类黄酮”为一类特殊的类黄酮，如下列结构通式所示，其芳香 B 环无取代基：

[0112]



[0113] 其中

[0114] R₁、R₂、R₃、R₄ 和 R₅ 独立地选自以下组中：-H、-OH、-SH、-OR、-SR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-NR₃⁺X⁻，碳、氧、氮或硫，单个或者多个糖结合的糖苷，该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物；

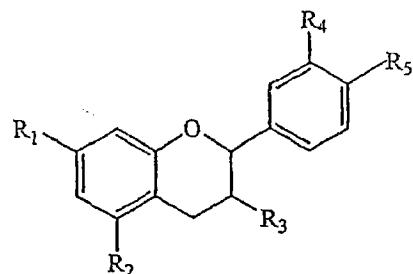
[0115] 其中

[0116] R 是具有 1-10 个碳原子的烷基；以及

[0117] X 选自药物学可接受的抗衡阴离子，其包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

[0118] “黄烷”为一类特殊的类黄酮，其通常可由下列结构通式代表：

[0119]



[0120] 其中

[0121] R_1, R_2, R_3, R_4 和 R_5 独立地选自以下组中 : -H、-OH、-SH、-OCH₃、-SCH₃、-OR、-SR、-NH₂、-NRH、-NR₂、-NR₃⁺X⁻, 取代基的酯, 包括但不限于没食子酸酯、乙酸酯、肉桂酰基和羟基肉桂酰基酯、三羟基苯甲酰酯和咖啡酰酯、以及它们的化学衍生物; 碳、氧、氮或硫, 单个或者多个糖结合的糖苷, 该糖包括但不限于戊醛糖、甲基戊醛糖、己醛糖、己酮糖以及它们的化学衍生物; 二聚、三聚以及其他多聚黄烷;

[0122] 其中

[0123] R 是具有 1-10 个碳原子的烷基; 以及

[0124] X 选自药物学可接受的抗衡阴离子, 其包括但不限于羟基、氯离子、碘离子、硫酸根、磷酸根、乙酸根、氟离子、碳酸根等。

[0125] “基因表达”指从基因到 mRNA 的转录。

[0126] “蛋白质表达”指从 mRNA 到蛋白质的转译。

[0127] “RT-qPCR”为将 mRNA 分子逆转录为 cDNA 分子, 之后使用聚合酶链式反应 (PCR) 外加荧光报道基团 (fluorescent reporter) 对基因表达的水平加以定量评价的方法。

[0128] 本文所用“有效的”包括治疗和 / 或预防。当使用时, 有效是指人类也指其他动物。

[0129] “药物学或治疗有效的剂量或量”指足以引发所需生物学结果的剂量水平。该结果可以是病征、症状或疾病的起因的缓解或任何其他所需的生物学系统的改变。

[0130] “安慰剂”指由非活性物质对该足以引发所需的可缓解病征、症状或疾病的起因的生物学结果的药物学或治疗有效的剂量或量的替代。

[0131] “主体”或“患者”为向其给药本发明组合物的, 为人或动物的生存的对象。

[0132] 注意本申请从头到尾提供各种引用。各个引用特定地全部并入本文作为参考。

[0133] 本发明包括一种由无取代 B 环类黄酮和黄烷混合物组成新型组合物。本文中新型组合物是指 Univestin™。在组合物中无取代 B 环类黄酮比黄烷的比例可根据预防和治疗特定疾病和病症有关的适应症和特殊需要进行调节。通常无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中, 无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中: 约 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 和 10 : 90。在本发明优选的实施方案中, 组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 85 : 15。在优选的实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离, 黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

[0134] 在本发明一实施方案中, 如实施例 5、7 和 13; 表 5、7、8 和 9 以及图 3 中所述, 标准化的无取代 B 环类黄酮提取物包含纯度在 1-99 重量 % 之间的总无取代 B 环类黄酮活性化合物。贝加灵在提取物中是主要活性成分, 其含量大约为总无取代 B 环类黄酮的 50-90 重量%。在一优选的实施方案中, 该标准化提取物含有 > 70% 总无取代 B 环类黄酮, 其中 > 75% 的无取代 B 环类黄酮是贝加灵。

[0135] 在一实施方案中, 如在实施例 8、9 和 12; 表 4、6 和 9 以及图 9 中所述, 标准化的黄烷提取物包含纯度在 1-99 重量 % 之间的总黄烷活性化合物。儿茶素在提取物中为主要活性成分, 其含量达总黄烷的 50-90 重量%。在一优选的实施方案中, 该标准化黄烷提取物含有 > 50% 总黄烷, 其中 > 70% 的黄烷是儿茶素。

[0136] 在一实施方案中,通过以比例 99 : 1 到 1 : 99 混合上述两种提取物或合成化合物制备 UnivestinTM。如实施例 14 中所述无取代 B 环类黄酮比黄烷优选的比例为 85 : 15 无取代 B 环类黄酮 : 黄烷。

[0137] 在 UnivestinTM 中无取代 B 环类黄酮的浓度可以为从 1% 到 99%,且 UnivestinTM 中黄烷的浓度可以为从 99% 到 1%。在本发明一个优选的实施方案中,UnivestinTM 中总无取代 B 环类黄酮的浓度约为 75%,其中贝加灵的含量为 UnivestinTM 总重的约 60%;UnivestinTM 中总黄烷的浓度约为 10%,其中儿茶素的含量约为 9%。在该实施方案中,UnivestinTM 中的总活性成分(无取代 B 环类黄酮加上黄烷)为 > 总重量的 80%。

[0138] 本发明还包括可同时有效地既抑制 COX-2 又抑制 5-L0 的方法。该同时双重抑制 COX-2 和 5-L0 通道的方法包括向需要的主体给药含有合成和 / 或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物的组合物。组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中,无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中:约 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 和 10 : 90。在本发明优选的实施方案中,组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 85 : 15。在优选的实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离,黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

[0139] 本发明还包括预防和治疗 COX-2 和 5-L0 诱导的疾病和病症的方法。该治疗和预防由 COX-2 和 5-L0 诱导的疾病和病症的方法包括向需要的主体给药有效量的含有合成和 / 或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物以及药物学可接收载体的组合物。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中,无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中:约 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 和 10 : 90。在本发明优选的实施方案中,组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 85 : 15。在优选的实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离,黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

[0140] 在又一另外的实施方案中,本发明包括治疗一般关节疼痛和僵硬、改善活动能力和身体机能以及预防和治疗骨关节炎和类风湿性关节炎病理症状的方法。治疗关节疼痛和僵硬、改善活动能力和身体机能以及预防和治疗骨关节炎和类风湿性关节炎病理症状的方法包括向需要的主体给药有效量的含有合成和 / 或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物以及药物学可接收载体的组合物。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明的具体实施方案中,无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中:约 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 和 10 : 90。在本发明优选的实施方案中,组合物中无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例为约 85 : 15。在优选的实施方案中无取代 B 环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离,黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

[0141] 本发明还包括一种调节与疼痛通道有关的 mRNA 的生成的方法。所述方法包括向需要的主体给药有效量的含有合成和 / 或从一种或多种植物中分离的无取代 B 环类黄酮和黄烷的混合物以及可任选地药物学可接受载体的组合物。无取代 B 环类黄酮与黄烷的比例范围可为 99 : 1 无取代 B 环类黄酮比黄烷到 1 : 99 无取代 B 环类黄酮比黄烷。在本发明

的具体实施方案中,无取代B环类黄酮与黄烷的比例选自以下组中:约90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80和10:90。在本发明优选的实施方案中,组合物中无取代B环类黄酮与黄烷的比例为约85:15。在优选的实施方案中无取代B环类黄酮从一种或多种黄芩属植物中分离,黄烷从一种或多种金合欢属植物中分离。

[0142] 根据本发明方法可以应用的无取代B环类黄酮包括上述提出的结构通式所示的化合物。本发明的无取代B环类黄酮可由合成方法获得,或从下列各科植物中提取,包括但不限于番荔枝科、菊科(Asteraceae)、紫葳科、使君子科、菊科(Compositae)、大戟科、唇形科、樟科(Lauraceae)、豆科、桑科、松科、凤尾蕨科、中国蕨科、榆科和姜科。该无取代B环类黄酮可由高等植物属提取、浓缩和纯化,包括但不限于假鹰爪属、Achyrocline、木蝴蝶属、Buchenavia、香青属、山芫荽属、鼠麴草属、蜡菊属、矢车菊属、泽兰属、Baccharis、乌柏属、黄芩属、Molsa、羽萼木属、水苏属、牛至属、新塔花属、山胡椒属、黄肉楠属、金合欢属、鱼藤属、甘草属、鸡血藤属、水黄皮属、灰毛豆属、木波罗属、榕属、粉叶蕨属、隐囊蕨属、松属、榆属和山姜属。

[0143] 无取代B环类黄酮存在于植物的不同部位中,包括但不限于茎、茎皮、嫩枝、块茎、根、根皮、嫩梢、种子、根茎、花及其他生殖器官、叶及其他气生部分。于2002年3月1日递交的名为“Identification of Free-B-ring Flavonoids as Potent COX-2 Inhibitors”(无取代B环类黄酮作为有效的COX-2抑制剂的鉴定)的第10/091,362号美国申请公开了分离和纯化无取代B环类黄酮的方法。此处全文并入作为参考。

[0144] 根据本发明方法可以应用的黄烷包括上述提出的结构通式所示的化合物。本发明的黄烷可由合成方法获得,或从选自金合欢属植物的一种或多种植物中提取。在一个优选的实施方案中该植物选自以下组中:儿茶、*A. concinna*、金合欢、阿拉伯胶树、*A. speciosa*、阿拉伯金合欢、*A. caesia*、蛇藤、藤金合欢、黑荆树、*A. picnantha*、白粉金合欢、大叶相思、*A. holoserecia*和马占相思。

[0145] 黄烷存在于植物的不同部位中,包括但不限于茎、茎皮、干、主干树皮、嫩枝、块茎、根、根皮、嫩梢、种子、根茎、花及其他生殖器官、叶及其他气生部分。于2002年3月22日递交的名为“Isolation of a DualCOX-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor form Acacia”(从金合欢分离双重COX-2和5脂氧合酶抑制剂)的第10/104,477号美国申请公开了分离和纯化黄烷的方法。此处全文并入作为参考。

[0146] 本发明采用将一系列体内试验及体外生化、细胞和基因表达筛选结合的策略来确定特异地抑制COX-2和5-LO酶活性以及影响cox-2而非cox-1 mRNA生成的活性植物提取物和成分。此处所用确定特异地抑制COX-2和5-LO通道的活性植物提取物和成分的方法记载于实施例1到13(图1-10)。这些方法更为详尽的描述记载于在2002年3月1日递交的名为“Identification of Free-B-ring Flavonoids as Potent COX-2Inhibitors”(无取代B环类黄酮作为有效的COX-2抑制剂的鉴定)的第10/091,362号美国申请以及于2002年3月22日递交的名为“Isolation of a Dual COX-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor form Acacia”(从金合欢分离双重COX-2和5脂氧合酶抑制剂)的第10/104,477号美国申请中,在此各自具体并入其全文作为参考。

[0147] 这些试验导致本文所谓UnivestinTM的新型组合物的发现。其包含两种各自包含无取代B环类黄酮和黄烷的标准化提取物的适当的混合。实施例14提供了使用两种各自

分离自金合欢和黄芩的提取物与一种或多种赋形剂一起制备该组合物的通用实施例。实施例 14 中所用的金合欢提取物含有 > 60% 为儿茶素和表儿茶素的总黄烷，黄芩提取物含有 > 70% 主要为贝加灵的无取代 B 环类黄酮。黄芩提取物含有如表 11 所述的其他少量的无取代 B 环类黄酮。可任选向组合物中加入一种或多种赋形剂。所加入的赋形剂量可根据所希望的每种成分的实际活性含量加以调整。用于产品的每个单独的批次的混合表必须根据单独批次成分的产品规格和 QC 结果生成。推荐活性成分范围为 2–5% 的附加量用以满足产品规格的需要。实施例 14 举例说明用于一个 Univestin™ 批次的所生成的混合表 (Lot#G1702-COX-2)。测定 Univestin™ 剂型产品的不同混合比例对 COX-2 和 5-LO 酶活性的抑制能力和如实施例 15–17 中所述的减少 coxmRNA 生成的能力。

[0148] COX-2 抑制测定依靠在血红素和花生四烯酸存在下过氧化物酶的活性。为筛选抑制 COX-1 和 COX-2 活性的化合物，如实施例 2 和 6 所述利用两种酶的过氧化物酶活性的抑制建立了高通量的体外分析方法。在筛选过程中，在分离抑制 COX-2 活性的植物部分后，通过以固定量的 COX-1 和 COX-2 酶进行滴定，将两种单独的标准化的提取物进行比较。其中一种主要由无取代 B 环类黄酮（分离自黄芩）组成，另一种主要由黄烷（分离自金合欢）组成。对从各个提取物纯化得到的成分以及合并提取物的不同比例同样加以比较。该试验揭示，纯化的无取代 B 环类黄酮，分离自黄芩的贝加灵和贝加因以及纯化的黄烷，分离自儿茶的儿茶素抑制 COX-2 和 5-LO 的活性。此外，每种单独标准化的提取物同样抑制 COX-2 和 5-LO 的活性，其含有的无取代 B 环类黄酮浓度为在 10–90% 范围内（基于 HPLC）且黄烷浓度为在 10–90% 范围内。该试验最后揭示，含有无取代 B 环类黄酮比黄烷比例约为 80 : 20、50 : 50 和 20 : 80 的、各种单独标准化的提取物的混合物的组合物同样可在体外高效抑制 COX-2 酶活性。结果如图 11–13 所示。

[0149] 实施例 16 描述所实施的下述细胞试验，该试验的目的是 5-LO 途径中花生四烯酸分解的化合物、即 LTB₄ 的抑制。结果如图 14 和 15 所示。

[0150] 实施例 17 描述为测定 cox-2 被 Univestin™ 所区别抑制而进行的试验。基因表达数据得自半定量的 RT-qPCR 测定中，用于解释 cox-1 和 cox-2 mRNA 生成的抑制。结果如图 16 和 17 所示。参照图 16 可以看出，Univestin™ 抑制 cox-2 mRNA 生成而不影响 cox-1 基因表达。此外，当与其他 COX-2 抑制药物比较时，Univestin™ 能够降低 LPS 刺激的 cox-1 和 cox-2 基因表达的增加。重要的是，塞来昔布和布洛芬都增加 cox-2 基因表达（图 17）。

[0151] 体内有效性通过如实施例 18 所示，于小鼠耳部应用皮肤刺激物质如 AA 并测量以 Univestin™ 处理后肿胀的减少得以证实。结果如图 18 所示。此外，在炎症和疼痛部位的有效性通过如实施例 19 所示向小鼠踝关节注射刺激物并测量以 Univestin™ 处理后肿胀的减少得以测定。结果如图 19 所示。

[0152] 单独标准化的提取物包含无取代 B 环浓度在 10–99% 范围内（基于 HPLC），黄烷浓度在 10–99% 范围内（基于 HPLC）。采用慢性和急性给药（数据未显示）对其与产品 Univestin™ 在小鼠中的毒性进行测定。在慢性给药方案中，口腔灌服小鼠进食待测物每日剂量为 90mg/kg（等同于人类每日剂量为 500mg）、450mg/kg（五倍每日剂量当量）和 900mg/kg（十倍每日剂量当量）。就体重增加、身体外观和行为而言，小鼠未显示任何副作用。总体尸检结果显示无器官异常且与未处理的对照小鼠相比胃部、肾脏和肝脏组织无任何区别。测定电解质、血蛋白、血酶和肝酶的全血检查与未经处理的对照小鼠相比，未出现任何

异常。在急性方案中,将包含无取代 B 环浓度在 10–99% 范围内(基于 HPLC),黄烷浓度在 10–99% 范围内(基于 HPLC)的单独标准化的提取物以及产品 Univestin™ 以 2g/kg(20 倍每日剂量当量)给药,体重增加、外观、行,总体尸检器官外观,胃部、肾脏、肝脏组织学以及血液检查均未出现任何异常。

[0153] 实施例 20 描述用以评价 Univestin™ 缓解疼痛的有效性的临床试验,该疼痛是由膝盖和 / 或臀部的类风湿性关节炎或骨关节炎引起的。该试验为单中心、随机、双盲、安慰剂对照试验。患有膝盖和 / 或臀部类风湿性关节炎或骨关节炎 60 例患者(n = 60) 随机分为 4 组并用安慰剂、Univestin™(250mg/ 天或 500mg/ 天)、Celebrex™(也称为塞来昔布)(200mg/ 天) 治疗 90 天。如实施例 14、表 11 所示,Univestin™ 包含比例为 85 : 15 的贝加灵含量为 82.2% (w/w) 且总无取代 B 环类黄酮> 90% (w/w) 的黄芩标准化提取物与总黄烷含量为 77.2% (w/w) 的儿茶标准化提取物。Celebrex™ 为处方药的商标名称,该处方药为 COX-2 选择性抑制剂。表 12 所示为治疗前(基线分值)和 30、60 和 90 天时的疼痛、僵硬和功能 WOMAC 指数分值。表 13 所示为治疗前(基线分值)和 30、60 和 90 天时的疼痛、僵硬和功能 WOMAC 指数分值的绝对变化。图 20–31 为本试验结果的图示,其就所有数据以 95% 置信区间作图。

[0154] 如图 20–31 所示,与安慰剂相比,在给药 Univestin™ 期间 WOMAC 组合分数以及与疼痛、僵硬和身体功能有关的单独分数显示出显著改善。此外,同处方药 Celebrex™ 相比,Univestin™ 显示出具有相似的缓解疼痛效果、更好的减轻僵硬效果以及可显著地改善身体功能。在将每一剂量的 Univestin™ 与安慰剂和塞来昔布就缓解与骨关节炎和类风湿性关节炎相关的疼痛、僵硬和功能损伤而言进行比较时可以观察到最大的显著性。

[0155] 以方差分析模型对每个治疗组对进行的多重事后比较显示在 30 天(p = 0.020)的治疗中,500mg/ 天的 Univestin™ 比 200mg/ 天的塞来昔布对骨关节炎引起的疼痛的减轻显著地更加有效。此外,在 30 天(p = 0.044)、60 天(p = 0.032) 和 90 天(p = 0.001) 中,给药 500mg/ 天的 Univestin™ 比安慰剂显著地更有效地减轻疼痛。塞来昔布在 200mg/ 天剂量在治疗 60 天(p = 0.009) 时疼痛的减轻对比安慰剂具有显著性。在 90 天时,500mg/ 天的 Univestin™ 剂量在 90 天(p = 0.038) 内的治疗中与 250mg/ 天的剂量相比显著地更加有效。

[0156] 250mg/ 天的 Univestin™ 在治疗的 30 天(p = 0.00)、60 天(p = 0.027) 和 90 天(p = 0.015) 内比安慰剂对骨关节炎引起的僵硬的减轻显著地更加有效。此外,500mg/ 天剂量的 Univestin™ 在治疗的 30 天(p = 0.001) 和 90 天(p = 0.005) 内比安慰剂对骨关节炎引起的僵硬的减轻显著地更加有效。200mg/ 天的塞来昔布仅在治疗 30 天(p = 0.023) 时比安慰剂对骨关节炎引起的僵硬的减轻显著地更加有效。

[0157] 对于骨关节炎引起的功能损伤的减轻,Univestin™ 比 200mg/ 天的塞来昔布在治疗 30 天(p = 0.010) 内显著地更加有效。此外,在治疗 30 天(p = 0.010)、60 天(p = 0.043) 和 90 天(p = 0.039) 内,250mg/ 天剂量的 Univestin™ 比安慰剂对骨关节炎引起的功能损伤的减少显著地更加有效。在治疗的 30 天(p = 0.015)、60 天(p = 0.043) 和 90 天(p = 0.039) 内,500mg/ 天的 Univestin™ 比 200mg/ 天的塞来昔布对骨关节炎引起的疼痛的减轻显著地更加有效。最后,在治疗的 30 天(p = 0.015)、60 天(p = 0.016) 和 90 天(p = 0.003) 内,500mg/ 天剂量的 Univestin™ 比安慰剂对骨关节炎引起的功能损伤的减轻

显著地更加有效。

[0158] 这些结果提示, UnivestinTM,特别是在 500mg/ 天的剂量时,对骨关节炎引起的疼痛、僵硬的减轻和功能损伤的改善比安慰剂和塞来昔布有效的多。并且,与安慰剂和塞来昔布相比,UnivestinTM以 250mg/ 天的剂量给药时对骨关节炎引起的疼痛、僵硬的减轻和功能损伤的改善也非常有效。塞来昔布对骨关节炎引起的疼痛、僵硬的减轻和功能损伤的改善总体上仅显示出少量的提高。

[0159] 除 UnivestinTM 对骨关节炎引起的疼痛、僵硬的减轻和功能损伤的改善的作用外,实施例 21 显示 UnivestinTM 对身体质量指数 (BMI) 和体重减少的可测量的作用。尽管不受理论所限,该作用可归功于由于服用抗炎药导致的活动能力的提高,也可归功于增加代谢或减少体内脂肪和糖类利用的特殊机制。表 14 显示在治疗的 30 和 90 天后,给药 250 和 500mg/ 天的 UnivestinTM 与塞来昔布和安慰剂对体重和 BMI 的作用。结果如图 32 和 33 所示。参照图 32 和 33 可以看出,给药 250 和 500mg/ 天的剂量均导致体重和 BMI 在 30 天后显著降低,且体重的降低在 90 天后几乎加倍。塞来昔布与 UnivestinTM 相比,对体重和 BMI 具有较小的作用。

[0160] 如实施例 21 所述,对于重量减轻和 BMI,也以方差分析模型对每个治疗组对进行多重时候比较。这些分析显示在治疗 30 天后,与安慰剂相比,250mg/ 天和 500mg/ 天剂量的 UnivestinTM 带来统计学显著的重量减轻 ($p = 0.011$ vs. $p = 0.118$)。塞来昔布在 30 天时相对于安慰剂没有带来显著的重量减轻。重量在以 250 和 500mg/ 天的 UnivestinTM 治疗的 90 天中自始至终持续降低,与安慰剂相比具有统计学显著性 (p 分别等于 0.001 和 0.01)。塞来昔布与安慰剂相比仍然未显示出显著性。对于 250mg/ 天剂量的 UnivestinTM,BMI 的降低沿袭了类似的趋势,其与安慰剂相比在 30 天 ($p = 0.008$) 以及 90 天 ($p = 0.001$) 后具有显著性。UnivestinTM 500mg/ 天的剂量显示,在治疗 30 天时 BMI 的降低无统计学显著性。然而,在治疗的 90 天时,BMI 的降低达到了统计学显著 ($p = 0.011$)。在 90 天的治疗后,塞来昔布治疗组对安慰剂再次显示出 BMI 无统计学显著的变化。

[0161] 实施例 22 提示给药 UnivestinTM 可能影响血糖水平,并且对重量减轻和 BMI 具有影响。以 UnivestinTM 开始治疗 30 天发现血糖水平的可测量差别。在 90 天,以 250 和 500mg/ 天 UnivestinTM 的治疗组均显示出血糖水平的显著下降。塞来昔布对血糖的作用较不显著。结果如表 15 和图 34 所示。

[0162] 再次地,如实施例 22 所述,对于血糖也以方差分析模型对每个治疗组对进行多重时候比较。仅有 500mg/ 天剂量的 UnivestinTM 与安慰剂组相比显示出统计学相关的显著性 (30 天后, $p = 0.028$; 90 天后, $p = 0.022$)。但 250g/ 天剂量的 UnivestinTM 与安慰剂相比血糖水平的变化显示出临床显著性。

[0163] 申请人相信于 2002 年 3 月 22 日提出的名为“Isolation of a DualCOX-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor from Acacia”(从金合欢分离双重 COX-2 和 5 脂氧合酶抑制剂)的第 10/104,477 号美国申请为分离自金合欢属植物的证明具有双重 COX-2 和 5-LO 特异性的组合物的最初报道,并且在 2002 年 3 月 1 日提出的名为“Identification of Free-B-ring Flavonoids as Potent COX-2 Inhibitors”(无取代 B 环类黄酮作为有效的 COX-2 抑制剂的鉴定)的第 10/091,362 号美国申请为无取代 B 环类黄酮结构和 COX-2 抑制活性之间相关性的最初报道。这些发现导致产生一种新型的两种特殊化合物——无取代 B

环类黄酮和黄烷——的混合物,该混合物用以制备此处所谓 UnivestinTM 的组合物,其可用于缓解关节疼痛和僵硬,改善活动能力和身体功能以及预防和治疗骨关节炎的病理症状和类风湿性关节炎。

[0164] 尽管不限于理论,仍相信该剂型的作用的确定的机制为对 COX-2 酶过氧化物酶活性和 5-LO 酶活性两者的直接的抑制,以及所有这些酶的 mRNA 生成的减少。UnivestinTM 还可用于预防和治疗 COX-2 和 5-LO 调节的疾病和病症,包括但不限于骨关节炎、类风湿性关节炎、月经痛、动脉硬化、心脏病发作、肥胖症、糖尿病、X 综合症、阿尔茨海默氏病、呼吸过敏反应、慢性静脉功能不全、痔疮、系统性红斑狼疮、牛皮癣、慢性紧张性头痛、偏头痛、炎症性肠疾病,由病毒、细菌和真菌引起的感染,晒伤、热灼伤、接触性皮炎、黑素瘤和癌瘤。最后,在人类临床试验中发现由于柔性和活动能力的改善以及身体活性的增加,UnivestinTM 可导致重量减轻以及降低血糖水平。

[0165] 本发明还指向包含本发明治疗剂的治疗组合物。直接的本发明的治疗剂可以任意合适的方法给药,包括例如非胃肠道、局部、口服或如通过注射或气雾剂皮下应用的局部给药。给药的特定方式视所要治疗的病症而定。预期本发明的给药可通过任何体液或体液所能达到的任何靶点或任何组织。在本发明的优选实施方案中,该药剂注射给药。这种注射剂可以局部给药至任何受疾病侵袭的区域。治疗组合物可以依赖于给药方法的各种单位剂量形式给药。例如,适于动物口服给药的单位剂量形式包括散剂、片剂、丸剂和胶囊剂。本发明治疗组合物的优选传递方法包括静脉给药和通过例如注射或局部应用的局部给药。本发明治疗剂可给药至任何动物,优选哺乳动物,更优选为人。

[0166] 对于传递的特定方式,本发明的治疗组合物可以制成包括如药物学可接受的赋形剂、佐剂和 / 或载体的其他成分的剂型。例如,本发明的组合物可在所要治疗的动物可以忍受的赋形剂中制成剂型。这种赋形剂的实例包括但不限于纤维素、二氧化硅、葡萄糖结合剂、蔗糖、淀粉羟乙酸钠、磷酸钙、硫酸钙、水、盐水、林格液、右旋糖溶液、甘露醇、汉克氏溶液 (Hank's solution),以及其他含水生理平衡盐溶液。也可使用非水载体如不挥发性油、芝麻油、油酸乙酯或甘油三酸酯。其他有用的组合物包括含有增粘剂的混悬剂,增粘剂如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。赋形剂还可含有少量添加剂,如提高等渗性和化学稳定性的物质。缓冲剂的实例包括磷酸盐缓冲剂、碳酸氢盐缓冲剂、三羟甲基氨基甲烷缓冲剂、组氨酸缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂和甘氨酸缓冲剂或它们的混合物。防腐剂的实例包括硫柳汞、m- 或 o- 甲酚、甲醛溶液和苯甲醇。标准组合物可为可注射液体或可被合适的液体吸收成为注射用混悬剂或溶液剂的固体。因此,在非液体组合物中,赋形剂可以含有右旋糖、人血清蛋白、防腐剂等,并可在给药之前向其中加入无菌水或盐水。

[0167] 在本发明的一个实施方案中,钙组合物还可包括佐剂或载体。佐剂为在预防和治疗与 COX 和 LO 通道有关的适应症中通常提高处方功能的典型物质。合适的佐剂包括但不限于弗氏佐剂;其他细菌细胞壁成分;基于铝的盐类;基于钙的盐类;硅石;硼、组氨酸、硫酸葡萄糖胺、硫酸软骨素、葡萄糖酸铜、多核苷酸;维生素 D、维生素 K、类霉素;鲨鱼和牛软骨;血清蛋白;病毒外壳蛋白;其他由细菌衍生的制剂;γ 干扰素;嵌段共聚物佐剂如 Hunter's Titermax 佐剂 (Vaxcel. TM., Inc. Norcross, Ga);Ribi 佐剂 (可从 Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont. 得到);和皂昔及其衍生物如 Quil A (可从 Superfos Biosector A/S, Denmark 得到)。载体为提高治疗组合物在所治疗动物中半衰期的典型化

合物。合适的载体包括但不限于聚合物控释组合物、生物可降解植入物、脂质体、细菌、病毒、油、酯和二醇类。

[0168] 本发明一实施方案为可缓慢释放本发明组合物至动物中的缓释剂型。如此处所使用的控释剂型在控释载体中含有本发明。合适的控释载体包括但不限于生物相容性聚合物、其他聚合物基体、胶囊、微胶囊、微粒、大丸剂制剂、渗透泵、扩散装置、脂质体、脂质球和头皮传递系统。本发明的其他控释剂型包括在向动物给药时在原位形成固体或凝胶的液体。优选的控释剂型为生物可降解的（即可生物侵蚀的）。

[0169] 治疗组合物一旦制成剂型，可储存在无菌小瓶中作为溶液剂、混悬剂、凝胶剂、乳剂、固体或脱水或冻干粉末；或直接与其他惰性载体制成胶囊和/或片剂用于口服。这种剂型可以即时可用的形式或在给药前需要立即复原的形式储存。给药包含用于全身传递的组合物的剂型的方式可以通过口服、皮下、肌内、静脉、鼻腔或阴道或直肠栓剂。

[0170] 治疗特定病症或病情有效的组合物的量视病症或病情的性质而定，该性质可由一般的临床技术确定。此外，可任选地采用体外或体内分析以帮助确定最优的剂量范围。剂型中所采用的精确的剂量视给药途径和 疾病或病情的严重程度或发展而定，并且应该由医师根据每个病人的情况确定。可以通过得自体外或动物试验系统的剂量反应曲线外推得出有效剂量。例如，易于通过给药分级剂量的组合物并观察所希望的效果确定组合物的有效量。

[0171] 本发明治疗方法包括向需要的患者内部或局部给药治疗有效量的包含无取代 B 环类黄酮和黄烷的组合物。混合物的纯度视获得化合物的方法学而定，为包括但不限于 0.01 到 100%。在优选的实施方案中，无取代 B 环类黄酮和黄烷混合物以及包含同样成分的药物组合物的剂量为一有效、无毒、选自 0.01 到 200mg/kg 体重范围内的量。本领域熟练技术人员通过使用常规临床试验即可确定所治疗特定疾病的最优剂量。

[0172] 下述实施例用于举例说明的目的，并非意图限制本发明的范围。

[0173] 实施例

[0174] 实施例 1. 金合欢和黄芩植物中有机和水提取物的制备

[0175] 将源自儿茶树皮、直萼黄芩根、黄芩根或 *Scutellaria lateriflora* 全株的植物材料研磨成粒径不大于 2mm 的颗粒。之后将干燥研细的植物材料 (60g) 转移至锥形瓶并加入甲醇：二氯甲烷 (1 : 1) (600mL)。振摇混合物一小时，过滤，将生物量再次用甲醇：二氯甲烷 (1 : 1) (600mL) 提取。合并有机提取液，真空蒸发得到有机提取物（见以下表 1）。有机提取之后，将该生物量风干并用超纯水 (600mL) 提取一次。过滤水溶液并冻干得到水提取物（见以下表 1）。

[0176] 表 1. 金合欢和黄芩物种中有机和水提取物的产率

[0177]

植物来源	数量	有机提取物	水提取物
儿茶树皮	60g	27.2g	10.8g
直萼黄芩根	60g	4.04g	8.95g
黄芩根	60g	9.18g	7.18g
<i>Scutellaria lateriflora</i> 全株	60g	6.54g	4.08g

[0178] 实施例 2. 儿茶、各种黄芩和其他植物的植物提取物对 COX-2 和 COX-1 过氧化物酶活性的抑制

[0179] 确定特定 COX-2 抑制剂的筛选方法由生物测定指导，并如下所述设计为测定酶的过氧化物酶活性：

[0180] 过氧化物酶测定。将寻找 COX-2 抑制剂的测定改进为配合高通量平台使用 (Raz.)。简而言之，将过氧化物酶缓冲液 (100mM TBS, 5mM EDTA, 1 μM 血红素, 1mg 肾上腺素, 0.094% 苯酚) 中的重组绵羊 COX-2 (Cayman) 与提取物 (1 : 500 稀释) 一起培养 15 分钟。加入 Quantablu (Pierce) 底物，并使之在 25°C 反应 45 分钟。之后应用 Wallac Victor2 读板器读出荧光值。结果如表 2 所示。

[0181] 表 2 所示为有机和水提取物对酶的抑制，该提取物源自 5 种植物物种，包括儿茶的树皮、两种黄芩的根和其他三种植物物种的提取物，其由结构相似的无取代 B 环类黄酮组成。数据显示为相对于仅单独为重组绵羊 COX-2 酶和底物的过氧化物酶活性百分率。有机提取物的抑制百分率范围为 30% 到 90%。

[0182] 表 2. 各物种对 COX-2 过氧化物酶活性的抑制

[0183]

植物来源	有机提取物对 COX-2 的抑制	水提取物对 COX-2 的抑制
儿茶 (树皮)	75%	30%
直萼黄芩 (根)	55%	77%
黄芩 (根)	75%	0%
Desmodium sambuense (全株)	55%	39%
蓝桉 (叶)	30%	10%
Murica nana (叶)	90%	0%

[0184] 将对 COX-1 和 COX-2 同种型的相对抑制进行比较需要得到这些酶的所有 IC₅₀ 值。IC₅₀ 值定义为特定抑制剂对酶活性相对于对照抑制率为 50% 时的浓度。在这些试验中，如表 3 所示，对 COX-2 和 COX-1 酶的 IC₅₀ 值各自在 6 到 50 μg/mL 和 7 到 80 μg/mL 变化。对 COX-2 和 COX-1 IC₅₀ 值的比较证明源自各种植物的有机提取物对所有这些酶都具有专一性。例如 Scutellaria lateriflora 的有机提取物显示其对 COX-2 相对 COX-1 的优先抑制的 IC₅₀ 值各自为 30 和 80 μg/mL。尽管某些提取物证实对 COX-2 优先抑制，而其他的并非如此。对 HTP 部分和纯化自该部分的化合物的检查对确定这些提取物和化合物抑制的真实专一性是必须的。

[0185] 表 3. 有机提取物对人和绵羊 COX-2 和 COX-1 的 IC₅₀ 值

[0186]

植物来源	IC50 人 COX-2 (μg/mL)	IC50 绵羊 COX-2 (μg/mL)	IC50 绵羊 COX-1 (μg/mL)
儿茶 (树皮)	3	6.25	2.5
直萼黄芩 (根)	未完成	10	10
黄芩 (根)	30	20	20
Desmodium sambuense (全株)	20	30	80
蓝桉 (叶)	未完成	50	50
Murica nana (叶)	5	6	7

[0187] 实施例 3. 活性提取物的 HTP 部分

[0188] 将自活性植物的提取物 (400mg) 装样至预填充的快速柱 (2cm ID × 8.2cm, 10g 硅胶) 中。将该柱以 Hitachi 高通量纯化 (HTP) 系统用梯度流动相进行洗脱，该梯度流动相为 (A) 50 : 50 的 EtOAc : 己烷和 (B) 甲醇，30 分钟内从 100% A 到 100% B，流速为 5mL/min。用宽波长 UV 检测器监控分离并采用 Gilson 馏分收集器将馏分以 1.9mL/ 孔收集至 96 深孔板上。将样品板在低真空度和离心下干燥。用 DMSO (1.5mL) 溶解每孔的样品，取部分

(100 μL) 进行 COX 抑制测定。

[0189] 将源自活性植物的水提取物 (750mg) 溶解于水 (5mL) 中, 通过 1 μm 的针头式过滤器过滤并转移至 4mL 高效液相色谱 (HPLC) 小瓶中。然后通过自动进样器将溶液注射到预填充的反相柱上 (C-18, 15 μm 粒径, 2.5cm ID × 10cm 接预柱)。将该柱以 Hitachi 高通量纯化 (HTP) 系统用梯度流动相进行洗脱, 该梯度流动相为 (A) 水和 (B) 甲醇, 20 分钟内从 100% A 到 100% B 并继之以 100% 的甲醇 5 分钟, 流速为 10mL/min。用宽波长 UV 检测器监控分离并采用 Gilson 镜分收集器将馏分以 1.9mL/ 孔收集至 96 深孔板上。冷冻干燥样品板。用超纯水 (1.5mL) 溶解每孔样品并取部分 (100 μL) 进行 COX 抑制测定。

[0190] 实施例 4. 源自金合欢属和黄芩属物种的 HTP 部分对 COX 过氧化物酶活性的抑制

[0191] 测定每个 HTP 部分抑制 COX-1 和 COX-2 重组酶的过氧化物酶活性的能力以进一步确定单独的生物活性有机提取物的特征。结果如图 1 和 2 所示, 该图描述源自有机提取物的 HTP 部分对 COX-2 和 COX-1 活性的抑制。该提取物如实施例 1 和 3 中所述分离自儿茶的树皮和黄芩的根, 并按照如实施例 2 所述进行测定。图 1 和 2 中描绘的曲线显示具有多重抑制峰, 提示每种提取物中具有多种活性成分。若干活性峰对 COX-2 特别具有选择性。其他黄芩物种包括直萼黄芩和 *Scutellaria lateriflora* 证实具有相似的抑制峰 (未显示数据)。然而, COX-1 和 COX-2 酶皆证实具有多重抑制峰, 其显示存在多于一种有助于形成原抑制曲线的分子。

[0192] 实施例 5. 源自黄芩属有机提取物的活性无取代 B 环类黄酮的分离和纯化

[0193] 如实施例 1 所述分离自直萼黄芩根部的有机提取物 (5g) 装样至预填充快速柱 (120g 硅石, 40 μm 粒径 32–60 μm, 25cm × 4cm) 中, 并用梯度流动相进行洗脱, 该梯度流动相为 (A) 50 : 50 的 EtOAc : 己烷和 (B) 甲醇, 60 分钟内从 100% A 到 100% B, 流速为 15mL/min。以 10mL/ 馏分将馏分收集至试管中。真空蒸发溶剂并将每馏分中的样品溶于 1mLDMSO, 将 20 μL 等分试样转移至 96 孔浅盘板并测定 COX 抑制活性。基于 COX 测定结果, 将活性馏分 #31 到 #39 合并并蒸发。HPLC/PDA 和 LC/MS 进行分析显示主要的化合物保留时间为 8.9 分钟, MS 峰在 272m/e。将产物在 C18 半制备柱 (25cm × 1cm) 上进一步纯化, 梯度流动相为 (A) 水和 (B) 甲醇, 周期为 45 分钟, 流速为 5mL/ 分钟。收集 88 个馏分得到 5.6mg 浅黄色固体。采用 HPLC/PDA 和 LC/MS 通过与标准品进行比较以及 NMR 数据测定纯度。¹H NMR : δ ppm. (DMSO-d6) 8.088 (2H, m, H-3', 5'), 7.577 (3H, m, H-2', 4', 6'), 6.923 (1H, s, H-8), 6.613 (1H, s, H-3). MS : [M+1]⁺ = 271m/e。该化合物经鉴定为贝加因。贝加因对 COX-2 酶的 IC₅₀ 经测定为 10 μg/mL。

[0194] 使用制备 C-18 柱色谱, 使用标准化提取物分离鉴定其他无取代 B 环类黄酮。该提取物分离自黄芩的根 (批次 #RM052302-01), 且无取代 B 环类黄酮含量为 82.2%。如图 3 所示, 采用 HPLC/PDA/MS 洗脱出 11 种结构。参照图 3 可见, 所鉴定的 11 种化合物为贝加灵、沃贡宁 -7- 葡糖苷酸、木蝴蝶素 A 7- 葡糖苷酸、贝加因、沃贡宁、柯因 -7- 葡糖苷酸、5- 甲基 - 沃贡宁 -7 葡糖苷酸、黄芩素、去甲沃贡宁、柯因和木蝴蝶素 A。

[0195] 实施例 6. 经纯化的无取代 B 环类黄酮对 COX 的抑制

[0196] 得到若干无取代 B 环类黄酮并在 20 μg/mL 浓度下采用如实施例 2 所述的方法测定 COX-2 抑制活性。结果汇总于表 4。

[0197] 采用下述方法测定贝加因、贝加灵和分离自黄芩的根的标准化无取代 B 环类黄酮

提取物的 IC_{50} 。在测定中引入可断裂的过氧化物发色团以在花生四烯酸作为辅因子存在下可视化每种酶的过氧化物酶活性。典型地,该测定于 96 孔规格进行。取自 100% DMSO 中 10mg/mL 储备液的每种抑制剂一式三份在室温下采用下列浓度范围进行测定:0、0.1、1、5、10、20、50、100 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。向每孔中加入 pH7.5 的 100mM Tris-HCl 150 μL 和 22 μM 在三羧甲基氨基甲烷缓冲液中稀释的正铁血红素 10 μL 、在 DMSO 中稀释的抑制剂 10 μL 和 25 单位的 COX-1 或 COX-2 酶。在转台上将各成分混合 10 秒,之后加入 20 μL 2mM 的 N,N,N',N'-四甲基对亚苯基二胺二盐酸盐 (TMPD) 和 20 μL 1mMAA 以发动反应。振摇板 10 秒,之后,在于 570nm 处读取吸收值前温育 5 分钟。将抑制剂浓度对百分抑制率作图并通过沿等温线取最大值中点并与浓度在 x 轴相交确定 IC_{50} 。之后将 IC_{50} 标准化至测定中酶单位的数目。图 4、5 和 6 所示分别为贝加因、贝加灵和分离自黄芩的根的标准化无取代 B 环类黄酮提取物的剂量反应和 IC_{50} 结果。

[0198] 表 4. 纯化的无取代 B 环类黄酮对 COX 酶活性的抑制

[0199]

无取代 B 环类黄酮	COX-1 的抑制	COX-2 的抑制
贝加因	107%	109%
5,6-二羟基-7-甲氧基黄酮	75%	59%
7,8-二羟基黄酮	74%	63%
贝加灵	95%	97%
沃贡宁	16%	12%

[0200] 实施例 7. 分离自直萼黄芩(根)、黄芩(根)和木蝴蝶(种子)的活性提取物中无取代 B 环类黄酮的 HPLC 定量

[0201] 从 3 种不同的植物物种中分离的 5 种活性提取物中无取代 B 环类黄酮的存在和数量得以确定,并在表 5 中给出。应用 HPLC 对无取代 B 环类黄酮进行定量分析,使用 Luna C-18 柱 ($250 \times 4.5\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$),采用 1% 磷酸和乙腈梯度为 22 分钟内从 80% 到 20%。采用 UV 检测器在 254 纳米处检测无取代 B 环类黄酮,并通过与无取代 B 环类黄酮标准品比较基于保留时间加以鉴定。

[0202] 表 5. 活性植物提取物中的无取代 B 环类黄酮含量

[0203]

活性提取物	提取物重量	% 可提取自生物量	无取代 B 环类黄酮总量	提取物中 % 无取代 B 环类黄酮
直萼黄芩(水提取物)	8.95g	14.9%	0.2mg	0.6%
直萼黄芩(有机提取物)	3.43g	5.7%	1.95mg	6.4%
黄芩(水提取物)	7.18g	12.0%	0.03mg	0.07%
黄芩(有机提取物)	9.18g	15.3%	20.3mg	35.5%
木蝴蝶(有机提取物)	6.58g	11.0%	0.4mg	2.2%

[0204] 实施例 8. 儿茶有机提取物中的活性化合物的分离和纯化

[0205] 如实施例 1 所述提取自儿茶根部的有机提取物 (5g) 装样至预填充快速柱 (120g 硅石, $40 \mu\text{m}$ 粒径 $32-60 \mu\text{m}$, $25\text{cm} \times 4\text{cm}$) 中,并用梯度流动相进行洗脱,该梯度流动相为 (A) 50 : 50 的 EtOAc : 己烷和 (B) 甲醇,60 分钟内从 100% A 到 100% B,流速为 $15\text{mL}/\text{min}$ 。以 $10\text{mL}/\text{馏分}$ 将馏分收集至试管中。真空蒸发溶剂并将每馏分中的样品溶于 DMSO (1mL),将 $20 \mu\text{L}$ 等分试样转移至 96 孔浅盘板并测定 COX 抑制活性。基于 COX 测定结果,将活性馏分 #32 到 #41 合并并蒸发,得到 2.6g 固体。HPLC/PDA 和 LC/MS 进行分析显示两种主要的化合物的保留时间分别为 15.8 和 16.1 分钟。将产物在 C18 半制备柱 ($25\text{cm} \times 1\text{cm}$) 上进一步纯

化,产物装样量为 212.4mg,并用 (A) 水和 (B) 乙腈 (ACN),周期为 60 分钟,流速为 5mL/分钟的梯度流动相进行洗脱。收集 88 个馏分并分离得到两种活性化合物。化合物 1(11.5mg) 和化合物无 2(16.6mg)。用 HPLC/PDA 和 LC/MS 通过与标准品 (儿茶素和表儿茶素) 比较以及 NMR 数据测定纯度。

[0206] 化合物 1. ^{13}C NMR : δ ppm. (DMSO-d6) 27.84(C4), 66.27(C3), 80.96(C2), 93.78(C9), 95.05(C7), 99.00(C5), 114.48(C12), 115.01(C15), 118.36(C16), 130.55(C11), 144.79(C14), 155.31(C6), 156.12(C10), 156.41(C8). ^1H NMR : δ ppm. (DMSO-d6) 9.150(1H, s, OH), 8.911(1H, s, OH), 8.835(1H, s, OH), 8.788(1H, s, OH), 6.706(1H, d, J = 2Hz, H2'), 6.670(1H, d, J = 8.0Hz, H-6'), 6.578(1H, dd, J = 2.8Hz, H-5'), 5.873(1H, d, J = 2Hz, H8), 5.670(1H, d, J = 2Hz, H6), 4.839(1H, d, J = 4Hz, OH), 4.461(1H, d, J = 7.3Hz, H2), 3.798(1H, m, H3), 2.625(1H, m, H4b), 2.490(1H, m, H4a). MS : [M+1]⁺ = 291m/e。该化合物经鉴定为儿茶素。

[0207] 化合物 2. ^{13}C NMR : δ ppm. (DMSO-d6) 28.17(C4), 64.87(C3), 78.02(C2), 94.03(C9), 95.02(C7), 98.44(C5), 114.70(C12), 114.85(C15), 117.90(C16), 130.56(C11), 144.39(C14), 155.72(C6), 156.19(C10), 156.48(C8). ^1H NMR : δ ppm. (DMSO-d6) 9.083(1H, s, OH), 8.873(1H, s, OH), 8.777(1H, s, OH), 8.694(1H, s, OH), 6.876(1H, d, J = 2Hz, H2'), 6.646(2H, s, H-5', 6'), 5.876(1H, d, J = 2Hz, H8), 5.700(1H, d, J = 2Hz, H6), 4.718(1H, s, OH), 4.640(1H, d, J = 4.5Hz, H2), 3.987(1H, d, J = 4.5Hz, H3), 2.663(1H, dd, J = 4.6, 6.3Hz, H4b), 2.463(1H, dd, J = 4.6, 6.3Hz, H4a). MS : [M+1]⁺ = 291m/e。该化合物经鉴定为表儿茶素。

[0208] 采用如实施例 6 中所述的方法,图 7 和 8 所示为儿茶素和分离自儿茶树皮的标准黄烷提取物的剂量反应和 IC₅₀ 结果。表儿茶素对 COX-1 和 COX-2 酶的 IC₅₀ 值分别为 7 μg/mL 和 20 μg/mL。

[0209] 实施例 9. 源自儿茶的活性提取物的 HPLC 定量

[0210] 黄烷在分离自儿茶的有机和水提取物中的含量通过 HPLC 使用 PhotoDiode 阵列检测器 (HPLC/PDA) 以及 Luna C18 柱 (250mm × 4.6mm) 加以定量。使用乙腈梯度在 20 分钟周期内从 10% 到 30% CAN 并继之以 5 分钟 60% ACN 将黄烷由柱中洗脱。结果如表 6 所示。图 9 所示为 HPLC 提纯图。以儿茶素和表儿茶素为标准品基于保留时间对黄烷定量。两种主要黄烷的保留时间分别为 12.73 分钟和 15.76 分钟。

[0211] 表 6. 活性植物提取物中的无取代 B 环类黄酮含量

[0212]

自儿茶树皮中的活性提取物	提取物重量	%可提取自生物量	提取物中 % 黄烷
水提取物	10.8g	18.0%	0.998%
有机提取物	27.2g	45.3%	30.37%

[0213] 实施例 10. 儿茶和黄芩属物种有机提取物 COX 抑制活性的体外研究

[0214] 在基于细胞的系统内测定分离自儿茶和各种黄芩属物种的有机提取物的体外有效性和 COX-2 专一性以确定其抑制 AA 代谢物生成的能力。测定持续表达 COX-2 和 THP-1 的、表达 COX-1 的 HOSC 细胞系在 AA 存在下生成 PGE₂ 的能力。

[0215] COX-2 基于细胞的测定将 HOSC (ATCC#8304-CRL) 细胞培养至 80-90% 合生。将该

细胞胰蛋白酶化、洗涤并以 1×10^6 细胞 /mL 重悬浮于 10mL 组织培养培养基 (MEM) 中。将细胞悬浮液 (200 μ L) 加至 96 孔组织培养板上并在 37°C 及 5% CO₂ 条件下温育 2 小时。之后以含有 1ng/mL IL-1b 的新 HOSC 培养基代替该培养基并温育整夜。将培养基再次移除并代之以 190mL HOSC 培养基并在 15°C 温育 15 分钟。加入 HOSC 培养基中的花生四烯酸 (20mL, 100 μ M) 并在振荡器上于室温下温育 10 分钟。将上清液 (20 μ L) 转移至新板，该板含有 190 μ L/ 孔 100 μ M 在 ELISA 缓冲液中的吲哚美辛。如下所述，以 ELISA 对上清液进行测定。

[0216] COX-1 基于细胞的测定将 THP-1 细胞悬浮于 30mL 体积中 (5×10^5 细胞 /mL)。加入 TPA 至 TPA 最终浓度为 10nM 并温育 48 小时使细胞分化为巨噬细胞 (贴壁的)。将细胞重悬浮于 HBSS (25mL) 中并以 5×10^5 细胞 / 孔加至 200mL 容积的 96 孔板上。然后加入 RPMI 1640 (10 μ L) 中的 待测化合物并在 37°C 温育 15 分钟。接着加入 RPMI 1640 (20 μ L) 中的花生四烯酸并在振荡器上室温下温育 10 分钟。将上清液 (20 μ L) 加至含有吲哚美辛 (100 μ M) 的 ELISA 缓冲液 (190 μ L) 中。如下所述，以 ELISA 对上清液进行测定。

[0217] COX-2 全血检查采用静脉穿刺采集来自健康捐献者的外周血。将全血 (500 μ L) 与待测化合物和提取物在 37°C 下温育 15 分钟。加入脂多糖 (LPS, 自 E. coli 血清型 0111 :B4) 至最终浓度为 100 μ g/mL 并在 37°C 温育整夜。将血离心 (12,000xg) 并收集血浆。将血浆 (100 μ L) 加入甲醇 (400 μ L) 中沉淀蛋白。上清液用 ELISA 测定 PGE₂ 生成。该过程是对如 Brideau 等 (1996) Inflamm. Res. 45 :68-74 所述的方法的改进。

[0218] COX-1 全血检查在无抗凝血剂的试管中采集新鲜血液并立即在硅化微离心管中等分为 500 μ L 的等分试样。加入待测样品，涡旋并在 37°C 凝结 1 小时。离心样品 (12,000xg) 并收集血浆。将血浆 (100 μ L) 加入甲醇 (400 μ L) 中沉淀蛋白。上清液用 ELISA 测定 TXB₂ 生成。该过程是对如 Brideau 等 (1996) Inflamm. Res. 45 :68-74 所述的方法的改进。

[0219] ELISA 测定 4°C 下将 Immunolon-4 ELISA 板整夜以碳酸缓冲液 (pH9.2) 中的俘获抗体 0.5-4 μ g/mL 覆盖。洗涤板并以阻断缓冲液 (PBS+1% BSA) 室温下温育 2 小时。再次洗涤板，加入待测试样 (100 μ L) 并室温振荡下温育 1 小时。加入含有 0.5-4mg/mL 的结合过氧化物的次级抗体 50 μ L 并在室温振荡下温育 1 小时。然后将板洗涤三次并加入 TMB 底物 (100 μ L)。使板反应 30 分钟，之后加入 1M 磷酸 (100 μ L) 使反应停止。用 Wallac Victor 2 读板器在 450nm 处读板。

[0220] 细胞毒性使用测定受损细胞中乳酸脱氢酶释放的比色试剂盒 (Oxford Biochemical Research) 评价细胞毒性。按照制造商的指示完成测定。对纯化的黄烷及自儿茶中分离的标准化的提取物均加以测定。对所有被测化合物都未观察到细胞毒性。

[0221] 测定结果如表 7 所示。数据显示为 IC₅₀ 值以进行直接比较。参照表 5 可见 COX-1 的 IC₅₀ 值普遍低于 COX-2 的。此外，还对全血的 PGE₂ 生成 (该系统中为 COX-2 的测定) 或血栓素 B₂ (TXB₂) (COX-1 活化的测定) 的分化抑制进行测定。参照图 7 可见这些研究清楚证明在基于全血细胞的测定内具有 COX-2 抑制专一性。然而，在应用 THP-1 和基于 HOSC 的模型系统的试验中实际上却显示更大的 COX-1 选择性。此矛盾可能的原因是组成型地表达每种酶的永生细胞系和被诱导而表达 COX 酶的源自全血的原发细胞之间的基本区别。原发细胞是体内研究炎症的更相关的模型。此外，用以鉴定 COX-1 相对于 COX-2 活性的化合物在所有这些系统中有所不同，并因此无法直接进行比较。

[0222] 表 7. 有机提取物在细胞系统中对 COX 活性的抑制

[0223]

有机提取物的植物来源	基于细胞系的分析		全血检查	
	IC ₅₀ COX-2	IC ₅₀ COX-1	IC ₅₀ COX-2	IC ₅₀ COX-1
儿茶(树皮)	78 μ g/mL	22 μ g/mL	40 μ g/mL	>50 μ g/mL
直萼黄芩(根)	50 μ g/mL	18 μ g/mL	10 μ g/mL	>50 μ g/mL
黄芩(根)	82 μ g/mL	40 μ g/mL	20 μ g/mL	8 μ g/mL
<i>S. lateriflora</i> (全株)	60 μ g/mL	30 μ g/mL	8 μ g/mL	20 μ g/mL

[0224] 实施例 11 源自儿茶的儿茶素对 5- 脂氧合酶的抑制

[0225] 如上所述,与炎症反应相关的最重要的途径之一由非血基质、含铁的脂氧合酶 (5-L0、12-L0 和 15-L0) 产生,该酶催化分子氧加成至脂肪酸如 AA 上以生成过氧化物 5-、12- 和 15-HPETE,其然后转化为白三烯。明显的迹象显示自儿茶的黄烷提取物能提供一定程度的 5-L0 抑制,因此阻止 5-HPETE 的生成。脂氧合酶抑制剂筛选测定试剂盒 (CaymanChemical, Inc., Cat#760700) 被用以评价自儿茶的纯化的黄烷儿茶素是否直接在体外抑制 5-L0。在通过微孔过滤完成由磷酸到基于三羧甲基氨基甲烷的缓冲液的缓冲液更换后,源自大豆的 15-L0 通常用于试剂盒中以替代马铃薯 5-L0。该测定通过氧敏产色 (oxygen sensing chromagen) 检测过氧化氢的生成。简而言之,加入 0.17 单位 / μ L 的马铃薯 90 μ L、1.1mM 的 AA 20 μ L、氧敏产色剂 (oxygen-sensing chromagen) 100 μ L 以及加入 10 μ L 纯化的黄烷抑制剂至最终浓度在 0 到 500 μ g/mL 范围,以此一式三份进行测定。儿茶素抑制 5-L0 的 IC₅₀ 经测定为 1.38 μ g/mL / 酶单位。

[0226] 实施例 12. 儿茶标准化提取物的制备

[0227] 儿茶 (500mg 研细的干) 用以下溶剂系统提取。(1) 100% 水, (2) 80 : 20 水 : 甲醇, (3) 60 : 40 水 : 甲醇, (4) 40 : 60 水 : 甲醇, (5) 20 : 80 水 : 甲醇, (6) 100% 甲醇, (7) 80 : 20 甲醇 : THF, (9) 60 : 40 甲醇 : THF。将提取物真空下浓缩并干燥。采用应用 PhotoDiode 阵列检测器 (HPLC/PDA) 以及 250mm × 4.6mm C18 柱的 HPLC 对所有提取物中的化学成分进行鉴定。以儿茶素和表儿茶素作为标准品,基于保留时间和 PDA 数据定量该化学成分。结果如表 8 和图 9 所示。如表 6 所示,以 80% 甲醇 / 水溶剂提取产生的黄烷提取物的黄烷成分浓度最高。

[0228] 表 8. 自儿茶制备标准黄烷提取物的溶剂

[0229]

提取溶剂	提取物重量	%可提取自生物量	儿茶素总量	提取物中%儿茶素
100%水	292.8mg	58.56%	13mg	12.02%
水：甲醇(80：20)	282.9mg	56.58%	13mg	11.19%
水：甲醇(60：40)	287.6mg	57.52%	15mg	13.54%
水：甲醇(40：60)	264.8mg	52.96%	19mg	13.70%
水：甲醇(20：80)	222.8mg	44.56%	15mg	14.83%
100%甲醇	215.0mg	43.00%	15mg	12.73%
甲醇：THF(80：20)	264.4mg	52.88%	11mg	8.81%
甲醇：THF(60：40)	259.9mg	51.98%	15mg	9.05%

[0230] 实施例 13. 各种黄芩物种的标准化的无取代 B 环类黄酮提取物的制备

[0231] 直萼黄芩(500mg 研细的根)用 25mL 下述溶剂提取两次。(1)100%水,(2)80：20 水：甲醇,(3)60：40 水：甲醇,(4)40：60 水：甲醇,(5)20：80 水：甲醇,(6)100%甲醇,(7)80：20 甲醇：THF,(9)60：40 甲 醇：THF。将提取物合并,在真空下浓缩和干燥。采用应用 PhotoDiode 阵列检测器(HPLC/PDA)以及 250mm×4.6mm C18 柱的 HPLC 对所有提取物中的化学成分进行鉴定。以贝加因、贝加灵、黄芩配基和沃贡宁作为标准品,基于保留时间和 PDA 数据定量该化学成分。结果如表 9 所示。

[0232] 表 9. 黄芩无取代 B 环类黄酮提取物的定量

[0233]

提取溶剂	提取物重量	%可提取自生物量	类黄酮总量	提取物中%类黄酮
100%水	96mg	19.2%	0.02mg	0.20%
水：甲醇(80：20)	138.3mg	27.7%	0.38mg	0.38%
水：甲醇(60：40)	169.5mg	33.9%	0.78mg	8.39%
水：甲醇(40：60)	142.2mg	28.4%	1.14mg	11.26%
水：甲醇(20：80)	104.5mg	20.9%	0.94mg	7.99%
100%甲醇	57.5mg	11.5%	0.99mg	10.42%
甲醇：THF(80：20)	59.6mg	11.9%	0.89mg	8.76%
甲醇：THF(60：40)	58.8mg	11.8%	1.10mg	10.71%

[0234] 黄芩(1000mg 研细的根)用 50mL 如下甲醇和水混合物提取两次:(1)100%水,(2)70：30 水：甲醇,(3)50：50 水：甲醇,(4)30：70 水：甲醇,(5)100%甲醇。将提取物合并,在真空下浓缩和干燥。采用应用 PhotoDiode 阵列检测器(HPLC/PDA)以及 250mm×4.6mm C18 柱的 HPLC 对所有提取物中的化学成分进行鉴定。以贝加因、贝加灵、黄芩配基和沃贡宁作为标准品,基于保留时间和 PDA 数据定量该化学成分。结果如表 10 所示。

[0235] 表 10. 黄芩无取代 B 环类黄酮提取物的定量

[0236]

提取溶剂	提取物重量	%可提取自生物量	类黄酮总量	提取物中%类黄酮
100%水	277.5mg	27.8%	1mg	0.09%
水：甲醇(70：30)	388.6mg	33.9%	1.19mg	11.48%
水：甲醇(50：50)	304.3mg	30.4%	1.99mg	18.93%
水：甲醇(30：70)	293.9mg	29.4%	2.29mg	19.61%
100%甲醇	204.2mg	20.4%	2.73mg	24.51%

[0237] 实施例 14. 以自黄芩根部的标准化无取代 B 环类黄酮提取物和自儿茶树皮的标准黄烷提取物制剂型

[0238] 采用两种各自源自金合欢属和黄芩属的标准化提取物同一种或多种赋形剂共同制备此处谓之 Univestin™ 的一种新型组合物。下面给出制备这种组合物的通用实施例。该实施例中所用的金合欢属提取物含有>60%的总黄烷,为儿茶素和表儿茶素,黄芩属提

取物含有> 70% 无取代 B 环类黄酮, 其主要为贝加灵。黄芩属提取物包含如表 11 所属的其他少量无取代 B 环类黄酮。向组合物中加入一种或多种赋形剂。黄烷和无取代 B 环类黄酮的比例可以基于 COX-2 相对 5-L0 的抑制有关的适应症及特定需要以及产品效力的需要加以调节。赋形剂的数量可以根据每种成分的实际活性含量加以调节。用于产品的每个单独的批次的混合表必须根据单独批次成分的产品规格和 QC 结果生成。推荐活性成分范围为 2–5% 的附加量用以满足产品规格的需要。表 11 所示为用于一个批次的 Univestin™ 而生成的混合表 (Lot#G1702-COX-2)。

[0239] 含有无取代 B 环类黄酮含量为 82.2 % (贝加灵) 的黄芩根提取物 (38.5kg) (lot#RM052302-01); 总黄烷含量为 80.4 % 的儿茶树皮提取物 (6.9kg) (lot#RM052902-01); 以及赋形剂 (5.0kg 的 Candex) 被加以混合以得到混合比例为 85 : 15 的 Univestin™ 剂型 (50.4kg)。表 9 所示为该 Univestin™ 特定批次的无取代 B 环类黄酮和黄烷的含量 (Lot#G1702-COX-2), 其测定方法如实施例 7 和 9 所述。

[0240] 表 11. Univestin™ 剂型的无取代 B 环类黄酮和黄烷含量

[0241]

活性成分	% 含量
1. 类黄酮	
a. 贝加灵	62.5%
b. 少量类黄酮	
i. 沃贡宁 -7- 葡糖苷酸	6.7%
ii. 木蝴蝶素 A7- 葡糖苷酸	2.0%
iii. 贝加因	1.5%
iv. 沃贡宁	1.1%
v. 柯因 -7- 葡糖苷酸	0.8%
vi. 5- 甲基 - 沃贡宁 -7- 葡糖苷酸	0.5%
Vii. 黄芩配基	0.3%
viii. 去甲沃贡宁	0.3%
ix. 柯因	< 0.2%
x. 木蝴蝶素 A	< 0.2%
c. 无取代 B 环类黄酮总量	75.7%
2. 黄烷	
a. 儿茶素	9.9%
b. 表儿茶素	0.4%
c. 亚总黄烷	10.3%
3. 总活性成分	86%

[0242] 参见表 9 可知, 该 Univestin™ 的特定批次含有 86% 总活性成分, 包括 75.7% 无取代 B 环类黄酮和 10.3% 黄烷。采用该批次 Univestin™ (50.0kg) 生产两种不同剂量水平的胶囊形式最终产品: 125mg 每剂量 (60 胶囊) 和 250mg 每剂量 (60 胶囊)。如实施例 15 所述, 在人临床试验中评价最终产品。

[0243] 采用相同方法使用混合比例各自为 50 : 50 和 20 : 80 的源自黄芩根的标准化无取代 B 环类黄酮提取物和源自儿茶树皮的标准化黄烷提取物的结合制备另外两个批次的 Univestin™。

[0244] 实施例 15. 三种 Univestin™ 剂型剂量反应及 COX 酶抑制 IC₅₀ 值的测定

[0245] 如实施例 6 所述, 测定如实施例 14 所述制备的三种不同的 Univestin™ 剂型的 COX-1 和 COX-2 抑制作用。如图 11、12 和 13 所示, 所有三种剂型都显示出显著的 COX 酶活

性的剂量反应抑制。

[0246] 实施例 16. Univestin™ 剂型剂量反应及 COX 酶抑制 IC₅₀ 值的测定

[0247] 如实施例 14 所述, 使用混合比例 80 : 20 的源自黄芩根的标准化无取代 B 环类黄酮提取物和源自儿茶树皮的标准化黄烷提取物的结合制备一 Univestin™ 样品。将该样品在含有 THP-1 和 HT-29 细胞; 表达 COX-1、COX-2 和 5-LLO 的单核细胞细胞系的组织培养培养基中滴定。用于 LTB₄ (LTB₄; Neogen, Inc., Cat#406110) 的竞争性 ELISA 被用以评价 Univestin™ 对每个细胞系中 LTB₄ 的新合成水平的作用, 并作为 Univestin™ 对 5-LLO 通道抑制作用的测定。在 6 孔板中每孔加入 160,000 到 180,000 细胞并由此一式二份地进行该测定。Univestin™ 以 3、10、30 和 100 μg/mL 加入 THP-1 培养液中, 并在潮湿环境中, 5% CO₂ 且 37°C 条件下温育整夜 (~ 12–15 小时)。结果如图 14 所示, 其显示出将 Univestin™ 以 3 到 10 μg/mL 加入至 THP-1 培养液中几乎完全抑制了新的 LPS 诱导的 LTB₄ 的生成。

[0248] 向 HT-29 细胞中以 3 μg/mL 加入 Univestin™ 和另一已知的 5-LLO 抑制剂布洛芬并在潮湿环境中 5% CO₂ 和 37°C 条件下温育 48 小时。所有处理的细胞系都通过离心收获 (harvest) 并通过生理缓冲液中的温和少量 均质溶胞作用使之破裂。如图 15 所示, Univestin™ 抑制了 HT-29 细胞中 80% 的新合成 LTB₄ 的生成。而布洛芬在相同的时期内仅显示 LTB₄ 量的 20% 的减少。

[0249] 实施例 17. Univestin™ 相对于其他 NSAID 对 cox-2 而不是 cox-1 基因表达的分化抑制

[0250] 为确定 Univestin™ 是否在基因水平起效, 用脂多糖 (LPS) 刺激、如实施例 14 所述用 Univestin™、塞来昔布、布洛芬或对乙酰氨基酚处理分离的人、外周血单细胞 (PBMCs), 然后收获所产生的总 RNA 并用半定量 RT-qPCR 进行评价。特殊地, 该测定由在 6 孔板上加入每孔 130,000 细胞构成。然后用 10ng/mL LPS 刺激细胞, 并与 1、3、10、30 和 100 μg/mL 的 Univestin™ 以及 3 μg/mL 的塞来昔布、布洛芬和对乙酰氨基酚一同, 在潮湿环境中 5% CO₂ 和 37°C 条件下温育 18 小时。通过离心收获所有细胞处理状况并用 TRIzol® 试剂 (Invitrogen™ Life Technologies, Cat#15596-026) 及所推荐的 TRIzol® 试剂方案分离所产生的总 RNA。由莫洛尼氏白血病毒逆转译酶 (M-MLV RT; Promega Corp., Cat#M1701) 应用随机六聚物 (Promega Corp., Cat#C1181) 逆转译总 RNA。在 ABI Prism® 7700 序列检测系统上使用预反应的确认的 Assays-on-Demand 产品 (AOD, Applied Biosystems, Inc., Cat#4331182) 进行 qPCR 试验, 并用于 18S rRNA 内标和基因专一性分析。将基因特异性表达值标准化至其各自的 18S rRNA 基因表达值 (内参照) 并随后将未经 LPS 和药物处理的情况标准化至 100。处理情况为相对于该零情况。

[0251] Univestin™ 将 cox-2 的标准化的基因表达降低了超过 100 倍, 而 cox-1 的标准化的表达显示的变化不大。当以 3 μg/mL 的 Univestin™、塞来昔布、布洛芬或对乙酰氨基酚处理 PBMCs 时, 仅 Univestin™ 没有增加 cox-2 的基因表达。据信, 这是最初的在以无取代 B 环类黄酮和黄烷混合物治疗后使用半定量 RT-qPCR 技术的在疼痛和炎症通道中涉及 eicosinoids、细胞因子、趋化因子和其他基因的基因表达水平改变的报道。既以基于 ELISA 的测定评价蛋白质水平的改变又以酶功能测定评价酶功能的变化, 该工作成为相联的工作。作为这些试验的结果, 证实了在以 Univestin™ 治疗后的既是基因组的又是蛋白组的相联的效果。文献中引用的其他试验应用蛋白质特异性方法来推断而不是直接显示基因

表达。结果如图 16 和 17 所示。

[0252] 实施例 18. 通过体内小鼠耳肿胀模型对 Univestin™ 有效性的评价

[0253] 为测定 Univestin™ 是否可用于体内治疗炎症, 将如实施例 14 所述制备的该组合物在以 AA 处理其耳部前一天向 4-5 周龄的 ICR 小鼠 (Harlan Labs) 口腔灌服。受试小鼠饲以悬浮于橄榄油中的 Univestin™ 50、100 和 200mg/kg 的剂量当量, 而对照小鼠仅饲以橄榄油。之后的一天, 向小鼠的一只耳朵上涂敷 330mM 的 95% 乙醇中的 AA 20 μL, 而向另一只耳朵上涂以乙醇作为对照。如图 18 所示, 以 Univestin™ 处理的小鼠显示出循 Univestin™ 剂量增加的可测量的剂量反应。参照图 18 可知, 与无 (minus) Univestin™ 对照相比, 200mg/kg 的剂量减少肿胀达 50%。Univestin™ 的 50mg/kg 剂量与另一强效抗炎药吲哚美辛的 50mg/kg 剂量同样有效。

[0254] 实施例 19. 通过体内小鼠踝关节肿胀模型对 Univestin™ 有效性的评价

[0255] 由于 Univestin™ 的设计目的是靶向于关节疼痛, 将 100mM 的 95% 乙醇中的 AA 溶液 20 μL 注射入 4-5 周龄的 ICR 小鼠 (Harlan Labs) 的后踝关节以产生肿胀。受试组在约 12 小时之前饲以悬浮于橄榄油中的 Univestin™ 100mg/kg, 而另一组未饲以 Univestin™。对照组包括未接收花生四烯酸注射的小鼠 (阴性对照) 以及注射 95% 乙醇未注射 AA 的小鼠 (载体对照)。这些组也没有饲以 Univestin™。结果如图 19 所示。参照图 19 可见, 与对照组相以及未处理的花生四烯酸注射组相比, 注射 AA 的饲以 Univestin™ 的小鼠显示出肿胀的背景水平。该结果证实了 Univestin™ 对于减少关节肿胀的有效性、作用的部位。

[0256] 实施例 20. 无取代 B 环类黄酮和黄烷对减轻膝盖和 / 或臀部类风湿性关节炎或骨关节炎引起的疼痛的有效性的临床评价

[0257] 本临床试验为单中心、随机、双盲、安慰剂对照试验。60 位患有膝盖和 / 或臀部类风湿性关节炎或骨关节炎受试者 (n = 60) 随机分至以下四组中的一组 :

[0258] A0 安慰剂 n = 15 安慰剂

[0259] A1 剂量 1 n = 15 Univestin™ 250mg/ 天 (125mg b. i. d.)

[0260] A2 剂量 2 n = 15 Univestin™ 500mg/ 天 (250mg b. i. d.)

[0261] A3 阳性 (active) 对照 n = 15 塞来昔布 200mg/ 天 (100mg b. i. d.)

[0262] 如实施例 14 中所述制备 Univestin™。该特定批次的 Univestin™ (lot#G1702-COX-2) 含有 86% 总活性成分, 包括 75.5% 无取代 B 环类黄酮和 10.3% 黄烷。塞来昔布, 也称为 Celebrex™, 是为 COX-2 选择性抑制剂的处方药的商标名称。

[0263] 受试者按性别搭配, 并招募自 40 到 75 岁年龄之间。治疗包括按照上述剂量表口服给药 90 天的安慰剂或活性化合物 (Univestin™ 或塞来昔布)。服用 NSAID 的受试者在开始试验前接受 2 周的洗净期。不限制身体活动度, 也未给予受试者任何膳食建议。受试者可自由在任何时间以任何原因退出试验。治疗的有效性在口服给药的 30、60 和 90 天由医生使用 Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC) 骨关节炎指数 (参见 Lingard 等 (2001) J. Bone & Joint Surg. 83 :1856-1864; Soderman 和 Malchau (2000) Acta Orthop. Scand. 71 (1) :39-46)。该方案经蒙特利尔大学的 IRB 委员会检阅并批准。

[0264] WOMAC 优选于医生的办公室对受试者实施。受试者被要求在医生办公室的候诊室亲自或通过代理人阅读并回答一调查表或由项目人员通过电话询问并将数据转录至计算机数据库。这在病人间提供了稳定的环境, 减少了由于病人间不同的家庭环境产生偏见的

可能性。组之间所有测量的差别通过偏差和 Tukey 氏最小显著差的单因素方差分析进行评价用于多重比较。

[0265] 分配给所有的问题—0 到 4 的视疼痛、僵硬或受损功能严重性而定的权重。然后将这些值转化为标准化至 100 的百分比并作为 WOMAC 分值报告。值越高提示损伤越大。在治疗前（基线）和治疗后 30、60 和 90 天时与 200mg 每天的塞来昔布以及安慰剂进行比较，250mg 和 500mg 每天 Univestin™ 的疼痛、僵硬和功能的平均 WOMAC 指数分值如表 12 所示。分数越低，患者的疼痛和僵硬越小，功能越好。

[0266] 表 12. 基线和 30、60 及 90 天的 WOMAC 指数得分

[0267]

WOMAC 指数	Univestin™250		Univestin™500		塞来昔布 200		安慰剂	
	平均值	标准偏 差	平均值	标准偏 差	平均值	标准偏 差	平均 值	标 准 偏 差
疼痛-基线	54.33	19.9	60.33	23.34	55	22.28	49.33	15.1
疼痛-30 天	41.33	19.22	36	22.93	50	23.09	41.67	15.55
疼痛-60 天	40.71	16.62	40.77	19.77	30	16.46	57.31	16.66
疼痛-90 天	41.79	16.36	27.69	21.57	31.67	16.42	50	14.43
僵硬-基线	63.33	26.92	61.67	23.84	47.5	21.75	46.67	21.37
僵硬-30 天	41.67	16.14	44.17	21.06	39.42	18.29	59.17	20.85
僵硬-60 天	37.5	18.99	39.42	19.66	37.5	29.76	46.15	24.68
僵硬-90 天	39.29	20.72	28.85	21.28	29.17	25.19	49.04	18.01
功能-基线	58.41	22.74	62.92	17.68	49.38	10.33	52.82	8.29
功能-30 天	42.09	14.51	47.59	17.18	48.43	9.29	51.88	14.8
功能-60 天	41.47	7.75	41.59	7.34	41.23	9.12	49.64	7.16
功能-90 天	42.44	17.08	38.12	13.21	44.41	11.06	50.95	12.73

[0268] 表 13 所示为疼痛、僵硬和功能 WOMAC 分值的平均绝对变化。它们表示为基线与 30、60 和 90 天给出的分值之间的差别。分值越是负值，改善越大。

[0269] 表 13. 在 30、60 和 90 天时 WOMAC 得分的平均绝对变化

[0270]

绝对变化	Univestin™250		Univestin™500		塞来昔布 200		安慰剂	
	平均	标准偏差	平均	标准偏差	平均	标准偏差	平均	标准偏差
疼痛-30 天	-13	24.41	-24.33	18.7	-4.23	15.92	-7.67	26.98
疼痛-60 天	-14.64	26.85	-17.31	35.27	-22.31	22.51	5	13.54
疼痛-90 天	-13.57	22.91	-30.38	21.06	-16.67	21.36	-2.31	15.89
僵硬-30 天	-21.67	24.31	-17.5	18.18	-8.65	20.66	12.5	29.88
僵硬-60 天	-28.57	27.05	-21.15	33.61	-9.62	29.82	-1.92	30.55
僵硬-90 天	-26.79	27.67	-31.73	20.17	-13.54	37.48	-0.96	26.74
功能-30 天	-16.32	19.58	-15.33	18.28	-0.37	6.86	-0.94	14.05
功能-60 天	-18.11	24.36	-21.4	19.79	-6.97	13.66	-3.49	11.81
功能-90 天	-17.13	23.69	-24.87	23.25	-2.78	8.34	-2.18	11.27

[0271] * 这些数据仅包括完成试验的受试者。

[0272] 临床试验中,很难由于数据中出现严重的偏差而把标准偏差归咎于一组平均值。更合理地,由于其给出平均值的下限和上限,且区间越窄对平均值的估计越精确,因此优选平均值的置信限。置信限以置信系数表示。95%的置信区间是在本类型统计分析中描述平均值最经常使用的区间。这并不意味着真实的平均值落在该区间的可能性为 95%。作为替代,置信水平与计算该区间的方法有关。置信系数仅为可预期包含该真实平均值的给定大小的样本的部分。即,对于 95% 的置信区间,如果采集了许多样本并由此计算置信区间,最后约 95% 的该区间可包含该真实平均值。因此,在 30、60 和 90 天用 95% 置信区间计算疼痛、僵硬和功能的 WOMAC 分值。

[0273] 选择基于 5 分 Likert 量表范围为 1 到 5 之间的 WOMAC 分值的原始 / 未标准化的分值代表最终的疼痛、僵硬和受损功能指数(图 20-31)。为达到均一(见表 12 和 13)并增强对改变大小的认识,在其他部分采用至 0 到 100 尺度的标准化。然而,考虑到所有的数字基于同样的 1-5 分量表,对原始数据作图,原因是由于其更准确地反应了从患者调查表得到这些分值所使用的方法。换句话说,由于为患者提供了 1 到 5 之间的选择,相对于未反映患者对可能的回答范围的理解的标准化的或变形的 0 到 100 的分值,该表现法更好地反映了患者的回答。

[0274] 存在基于患者的反应显示出由 250 和 500mg/天的 Univestin™ 在 90 天的治疗期间减少疼痛的疼痛指数的明显趋势。相对于未减少疼痛的安慰剂,塞来昔布同样在该相同的时期内减少了疼痛。然而,由于其置信区间与安慰剂的严重重叠,塞来昔布对僵硬的减少似乎不如两种剂量的 Univestin™ 有效。最后,两种剂量的 Univestin™ 都显著改善了功能的损伤,而塞来昔布相对于安慰剂未能显示出显著的改善。图示包含所有受试者,即使其未完成试验。然而,基于进行 WOMAC 测定时在场的受试者的数目所有置信区间有效,因此该趋

势有效。如图 20 到 31 以这些数据作图。

[0275] 实施例 21. 无取代 B 环类黄酮和黄烷由于功能的改善对 BMI 和体重减轻有效性的临床评价

[0276] 临床试验期间进行的其他测定为身高和体重。所有组的所有受试者（见实施例 20）在治疗 30 和 90 天时测量身高和体重。为了使 BMI 和体重减轻的结果不产生偏倚，不给予受试者任何膳食或锻炼上的建议。表 14 所示为发生于治疗 30 和 90 天后的体重和 BMI 变化。

[0277] 表 14. 在 30 和 90 天时的平均重量 (kg) 和 BMI (kg/m^2) 变化

[0278]

	组							
	Univestin™ 250		Univestin™ 500		塞来昔布 200		安慰剂	
	平均	标准偏差	平均	标准偏差	平均	标准偏差	平均	标准偏差
重量-30 天	-3.60	3.76	-2.40	3.31	-2.00	3.08	-0.60	1.99
重量-90 天	-5.36	3.43	-4.15	4.81	-3.17	4.88	-0.08	1.50
BMI-30 天	-1.28	1.33	-0.80	1.13	-0.68	1.06	-0.20	0.64
BMI-90 天	-1.84	1.14	-1.39	1.64	-1.07	1.67	-0.02	0.54

[0279] 基于这些数据，Univestin™ 的 250mg/ 天剂量在产生最大量的体重减轻和 BMI 变化，其后为 Univestin™ 的 500mg/ 天剂量和塞来昔布。安慰剂对体重或 BMI 没有影响。

[0280] 相信文献中没有任何其他的抗炎化合物用以达到体重减轻和改变 BMI 的报道。尽管没有给予受试者任何锻炼上的建议，治疗后，特别是采用 Univestin™ 治疗后，取得了可以允许他们更多地按照其本身的意愿运动的更大的机能能力。作为选择，Univestin™ 可增加热产生、脂肪分解，或导致膳食中的脂肪或糖类利用不足。图 32 和 33 所示为 Univestin™ 治疗 30 和 90 天后的 BMI 和体重。

[0281] 实施例 22. 无取代 B 环类黄酮和黄烷由于功能的改善的血糖减轻有效性的临床评价

[0282] 在治疗 0(基准)、30 天和 90 天后同样测定血糖（见实施例 20）。这些测定以毫摩尔每升报道。该数据也显示为 mg/dL。表 15 所示为以 250 和 500mg/ 天 Univestin™ 治疗 30 和 90 天后的血糖水平。

[0283] 表 15. 治疗 30 和 90 天后的血糖变化

[0284]

组									
	Univestin™250			Univestin™500			安慰剂		
	mmol/L	mg/dL	标准偏差	mmol/L	mg/dL	标准偏差	mmol/L	mg/dL	标准偏差
葡萄糖—基线	5.24	94.32	0.74	5.09	91.62	0.67	4.82	86.76	0.80
葡萄糖—30 天	5.10	91.80	0.71	4.75	85.50	0.55	5.08	91.44	0.54
葡萄糖—90 天	4.88	87.84	0.72	4.034	78.12	0.36	4.71	84.78	0.56
90 天的变化率	-7.52			-12.79			0.94		

[0285] 这些数据显示 Univestin™ 的 250 和 500mg/ 天剂量都随时间有效降低血糖。该效果可或不与上述观察到的体重减轻或假定的由于功能受损得到改善的活动性增加相关。也可能 Univestin™ 直接发生作用, 通过降低葡萄糖耐受性或通过更有效利用糖类改善葡萄糖代谢。

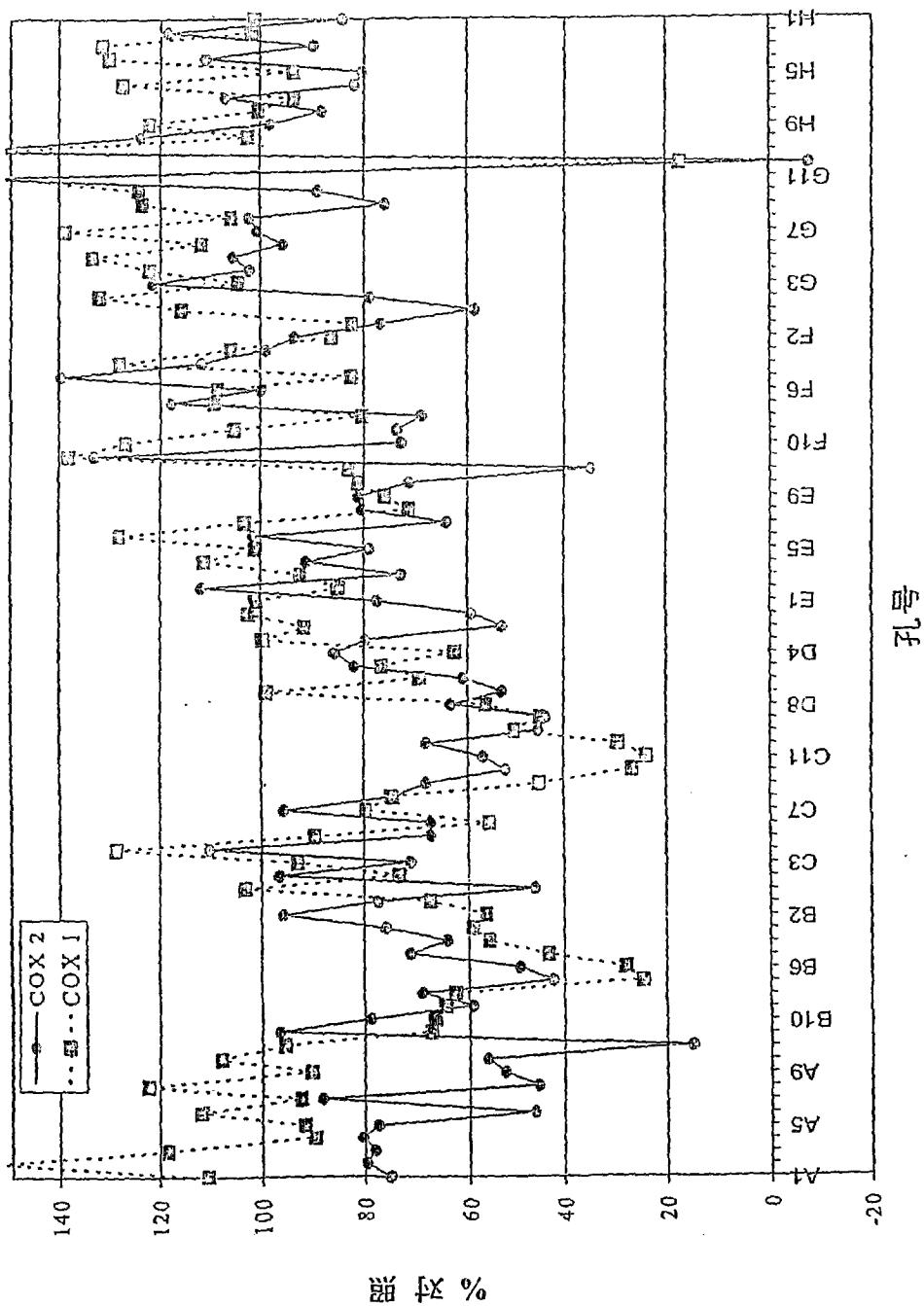


图 1

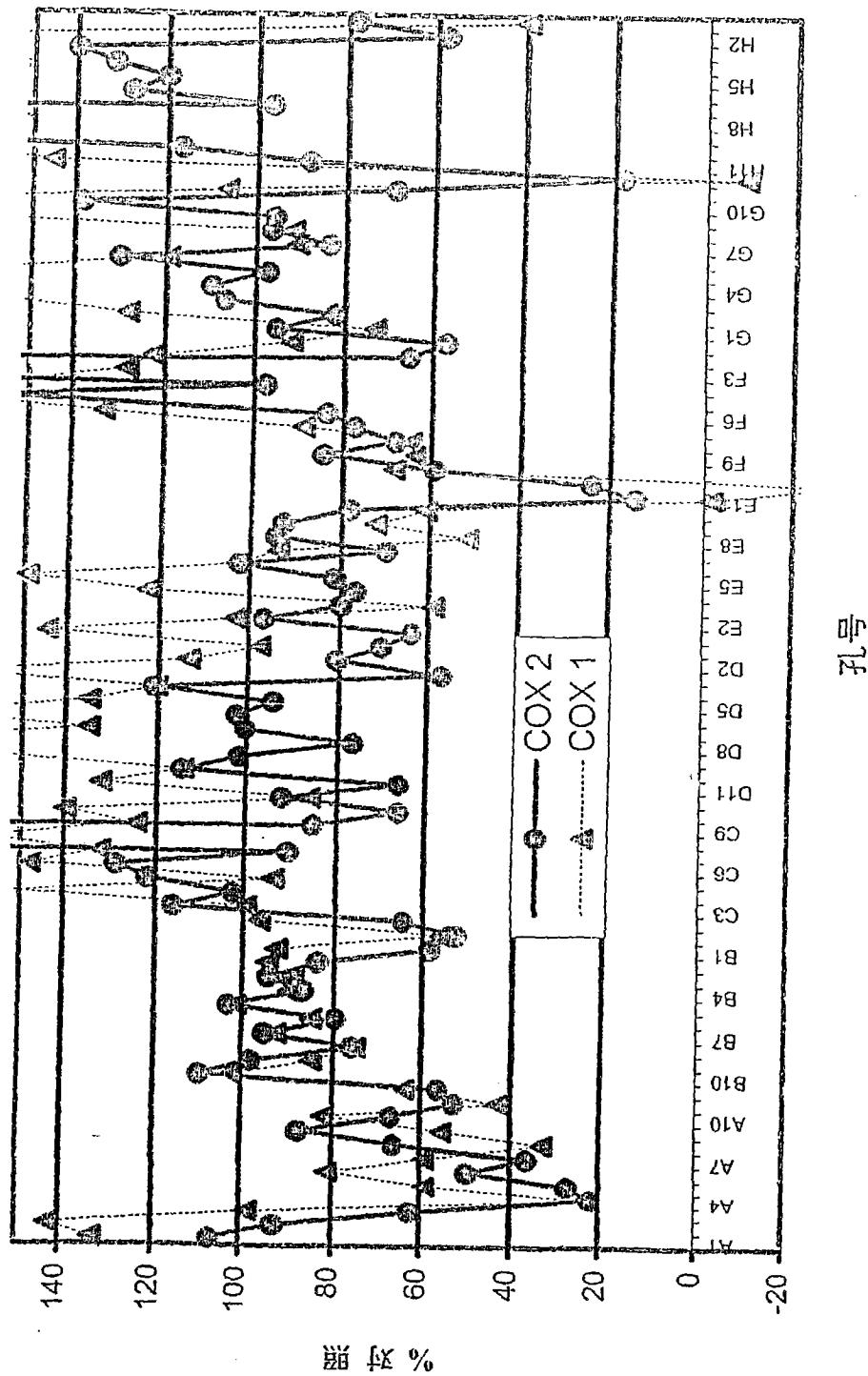


图 2

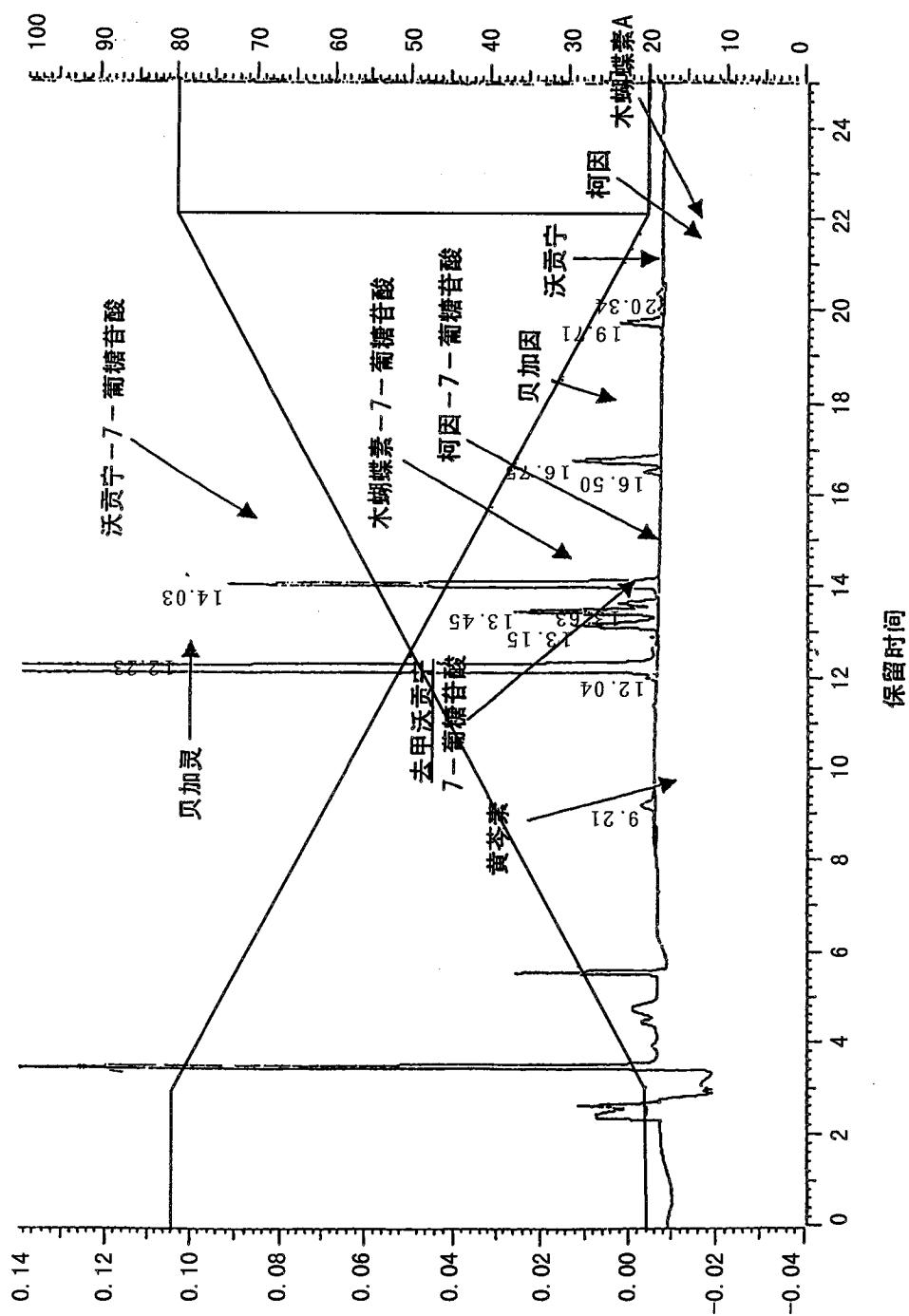


图 3

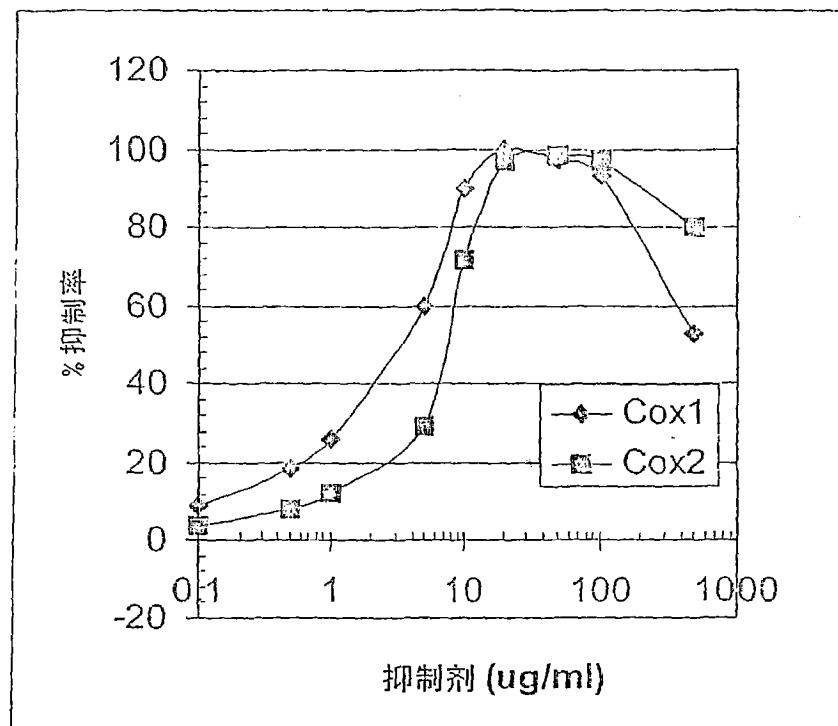


图 4

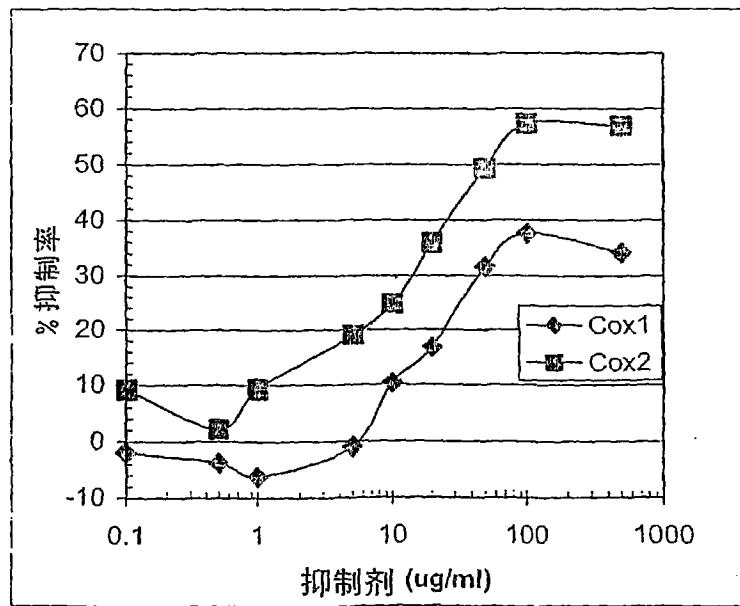


图 5

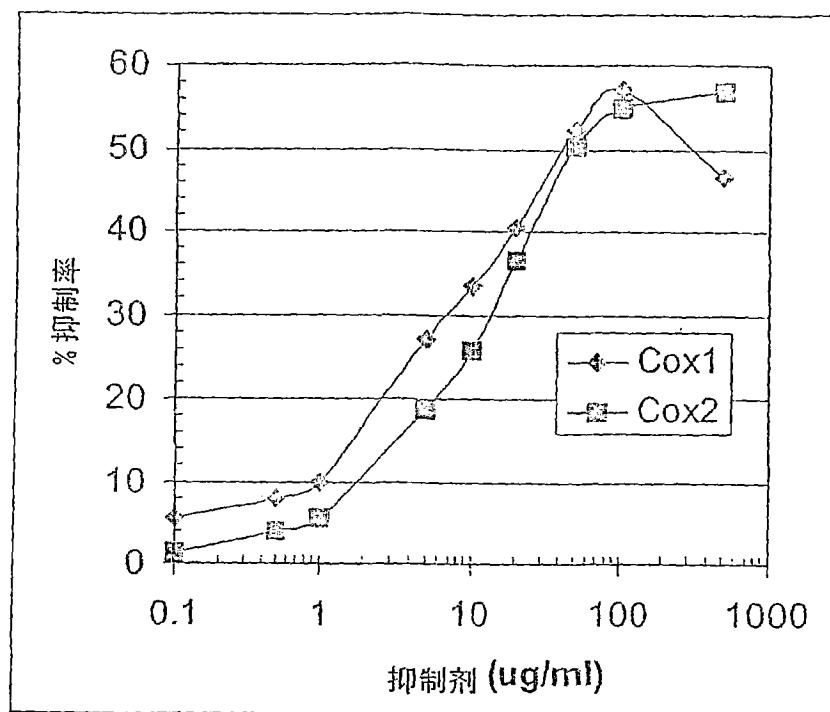


图 6

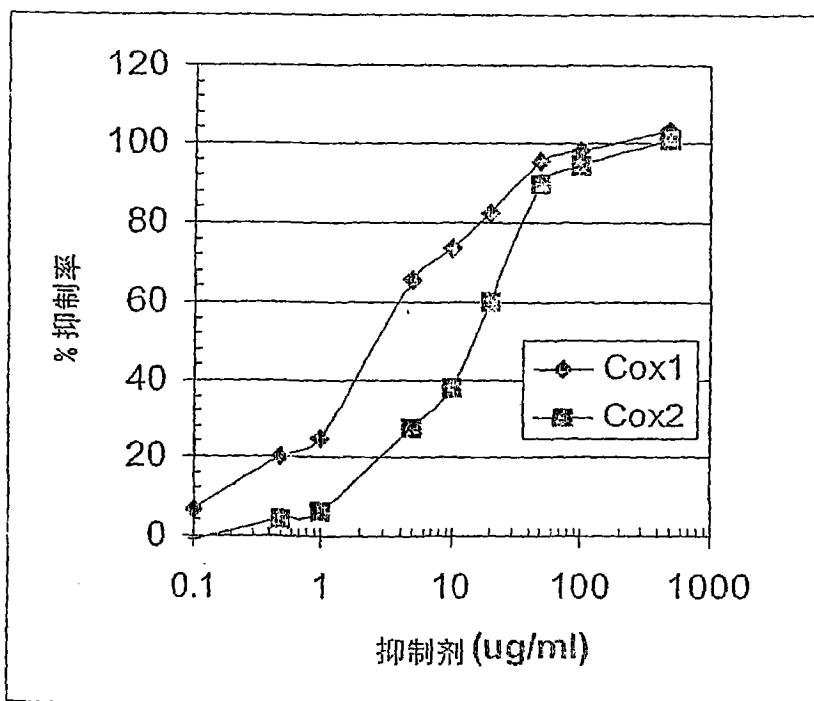


图 7

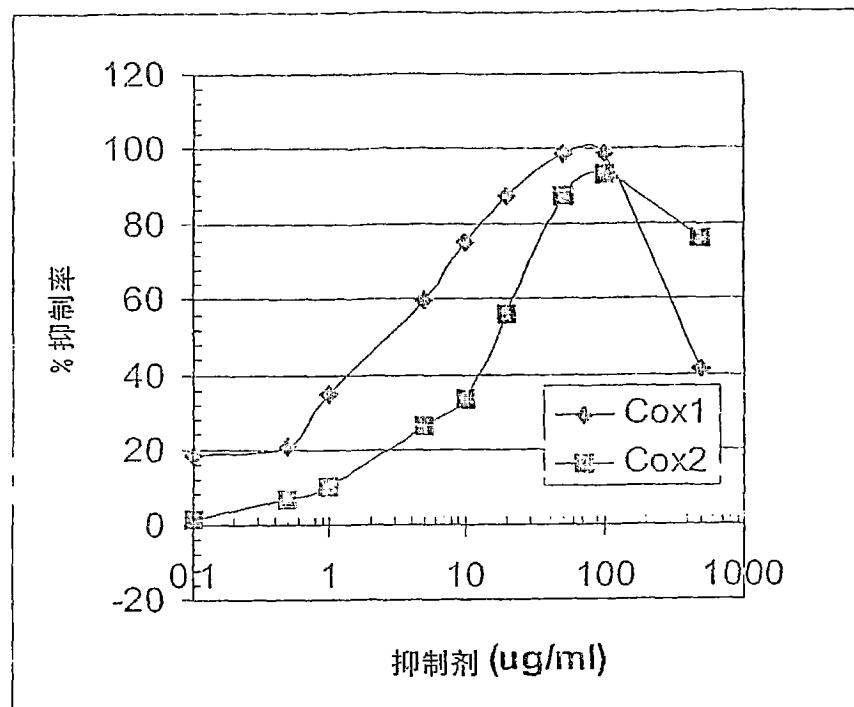


图 8

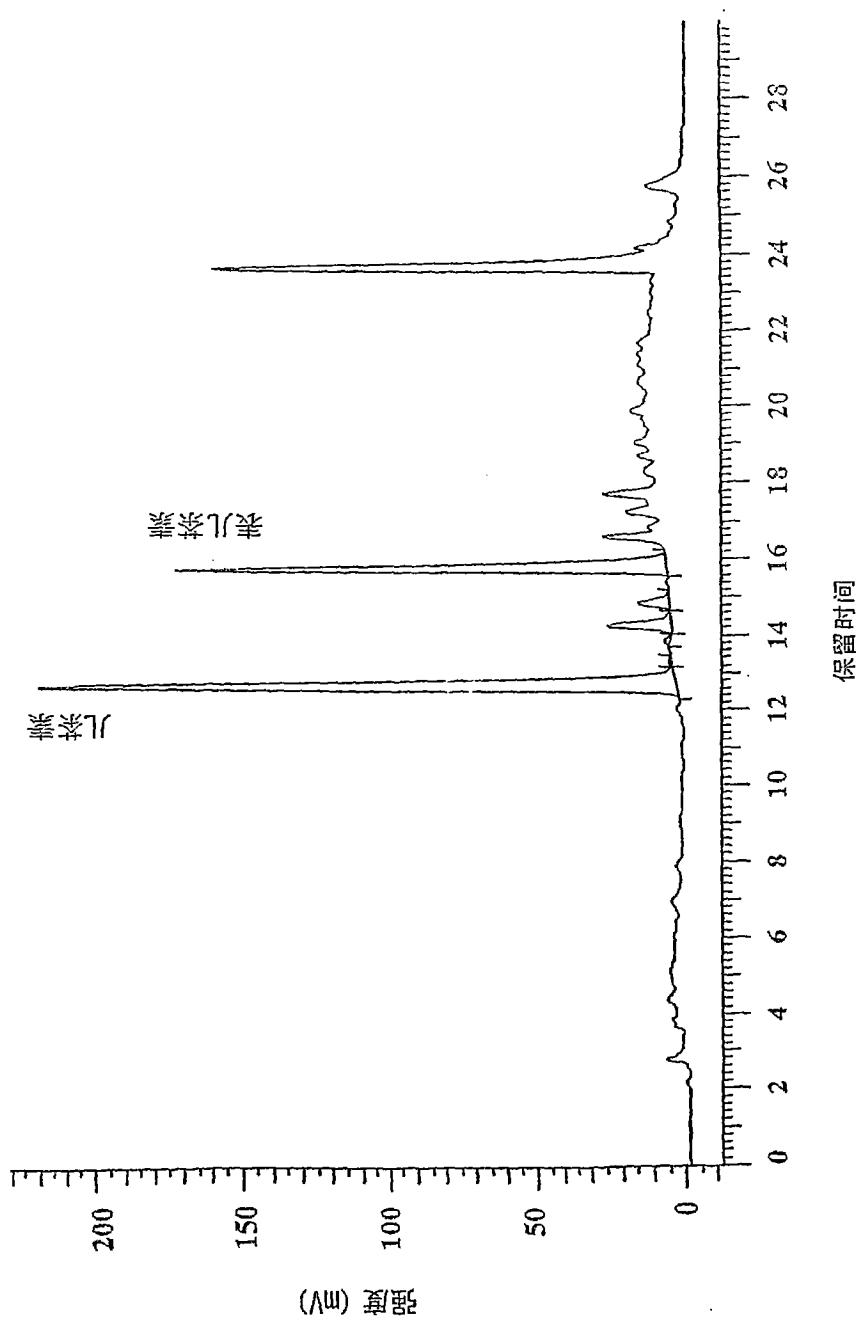


图 9

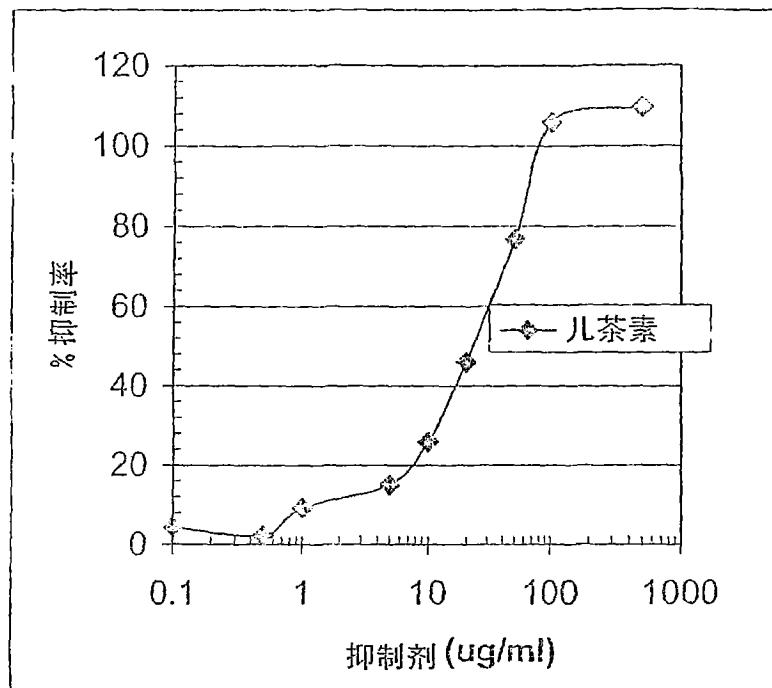


图 10

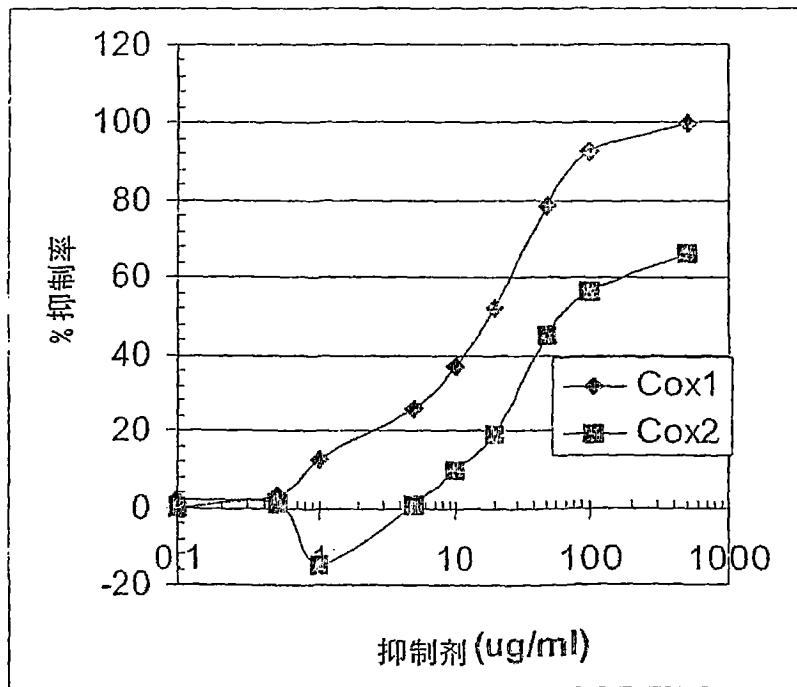


图 11

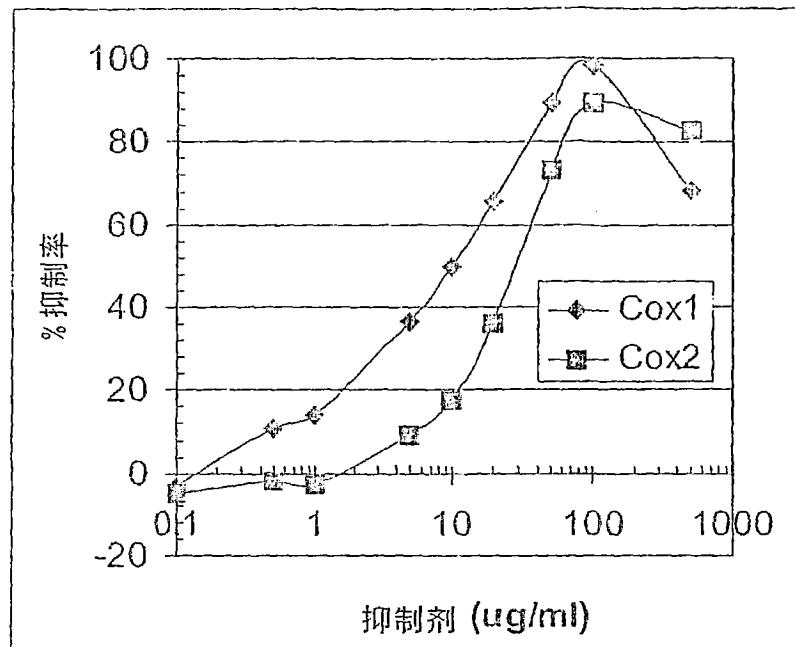


图 12

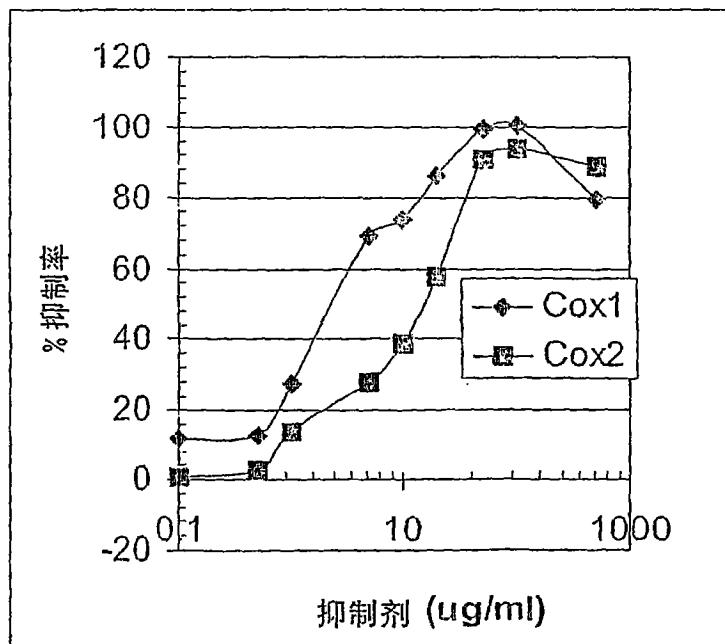


图 13

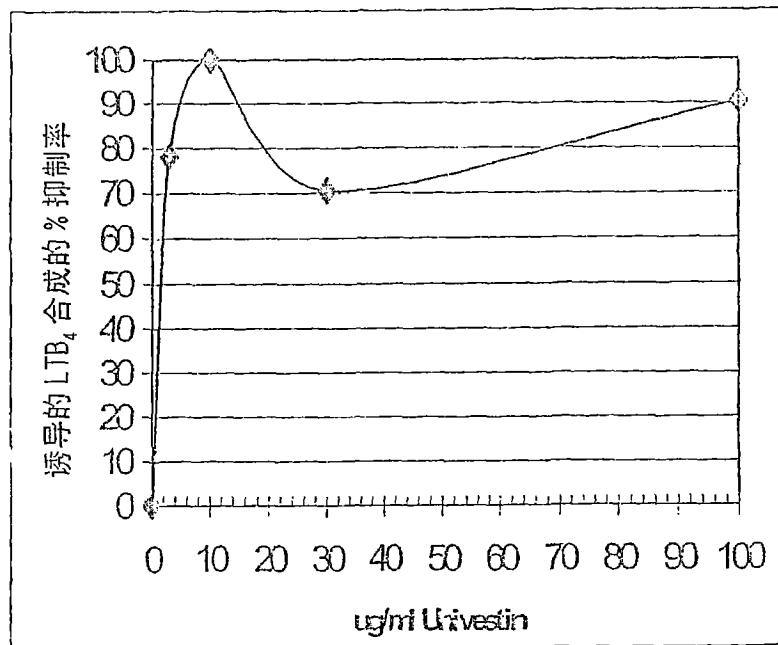


图 14

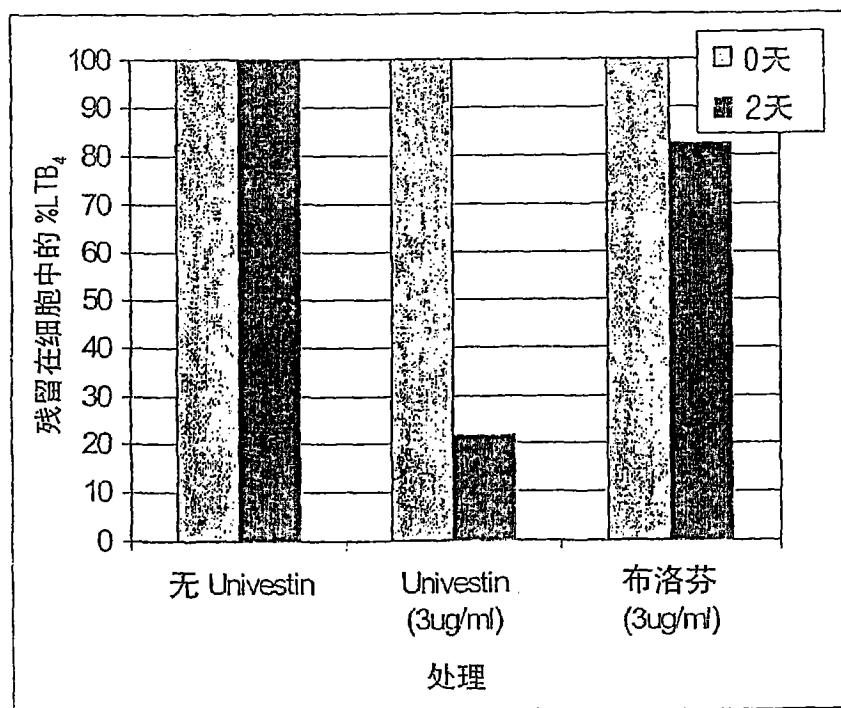


图 15

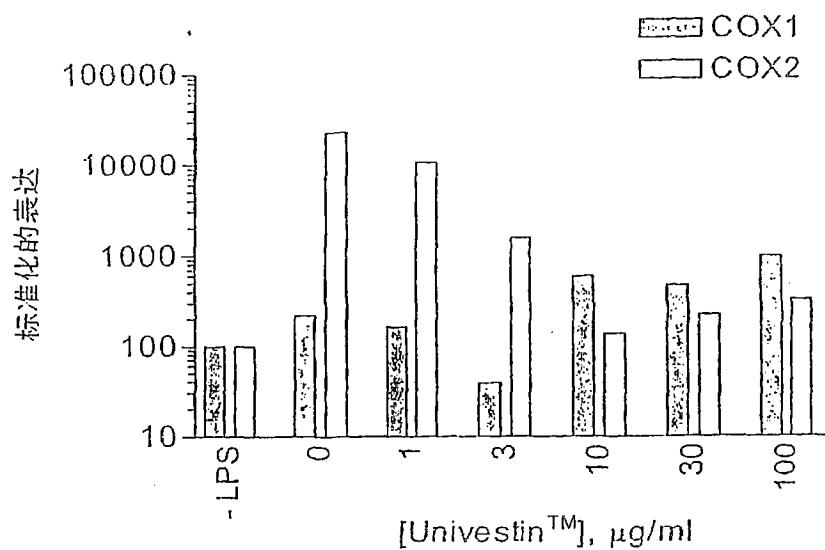


图 16

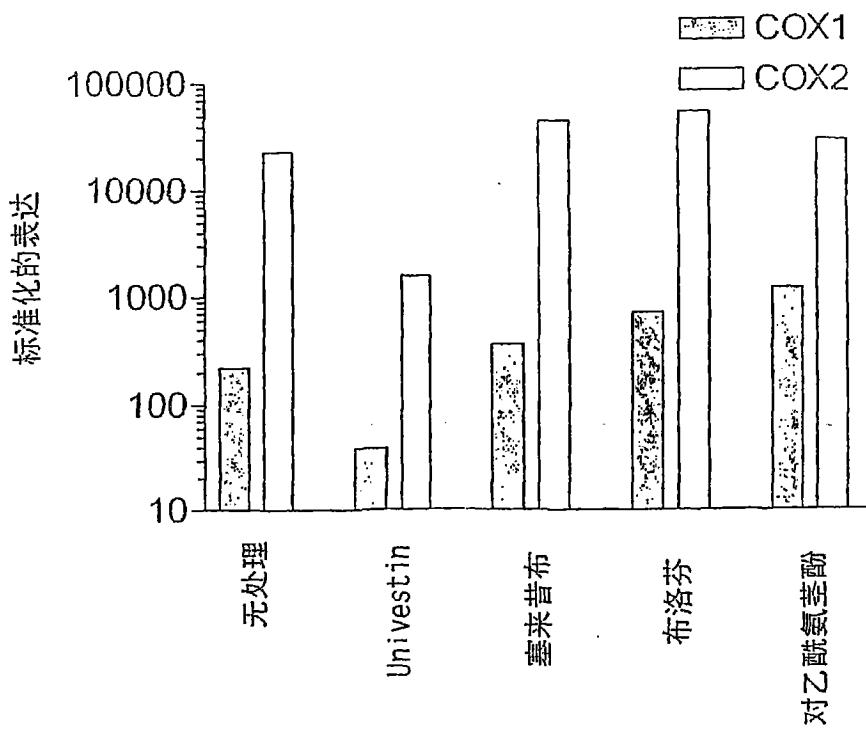


图 17

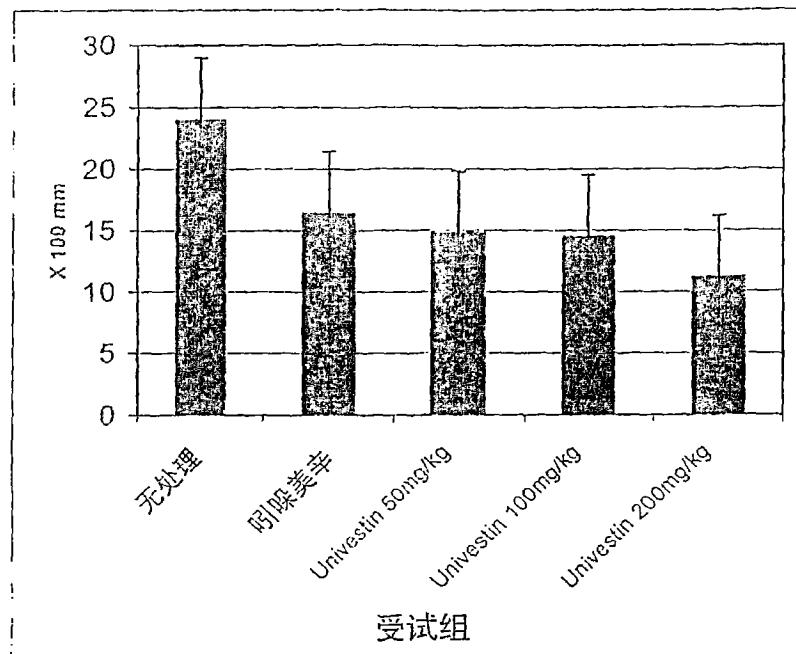


图 18

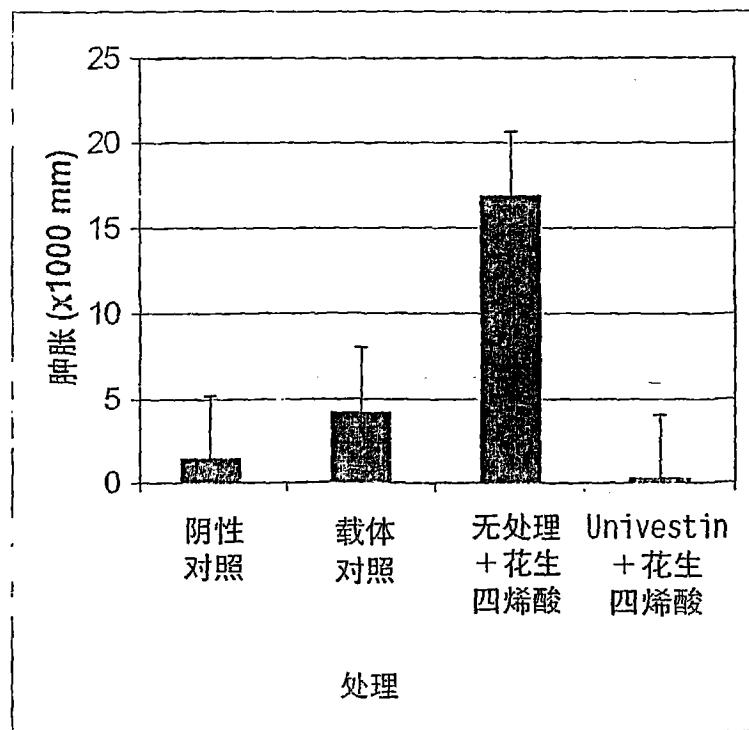


图 19

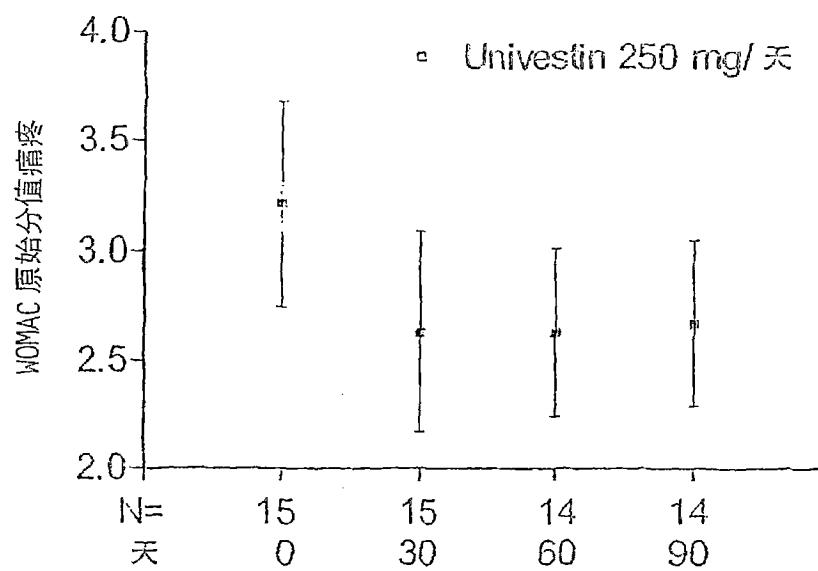


图 20

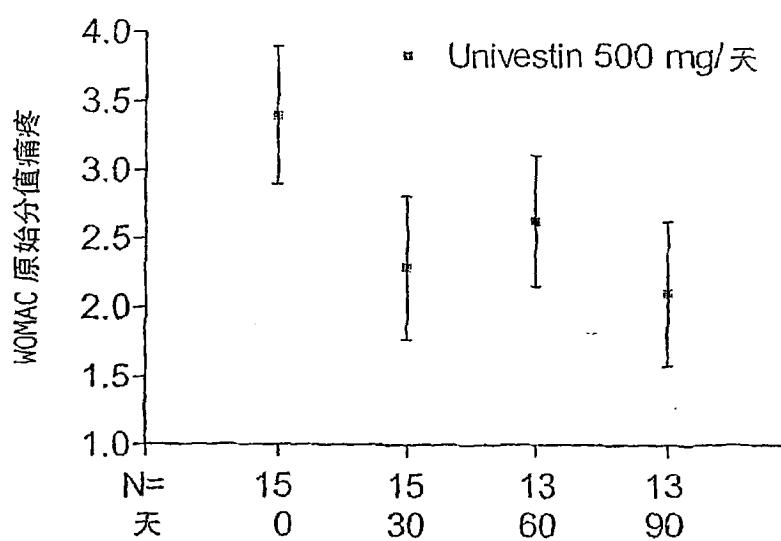
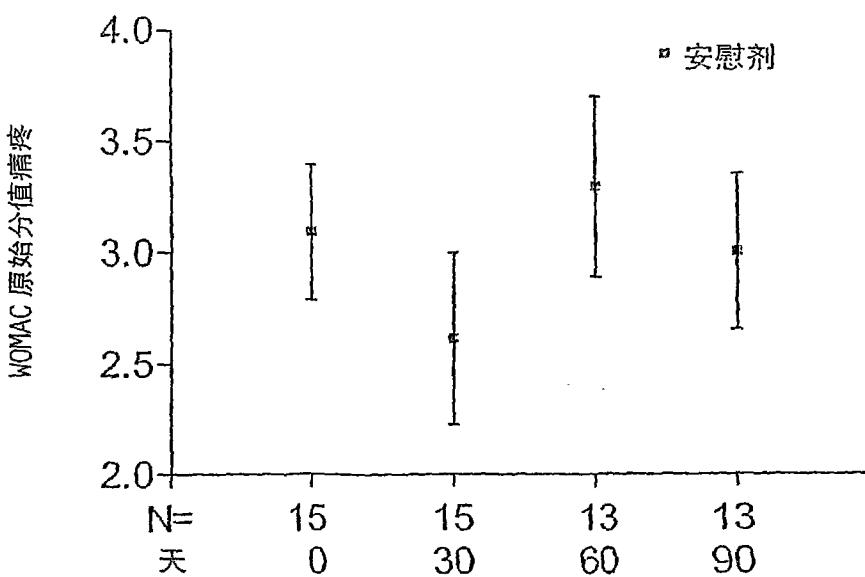
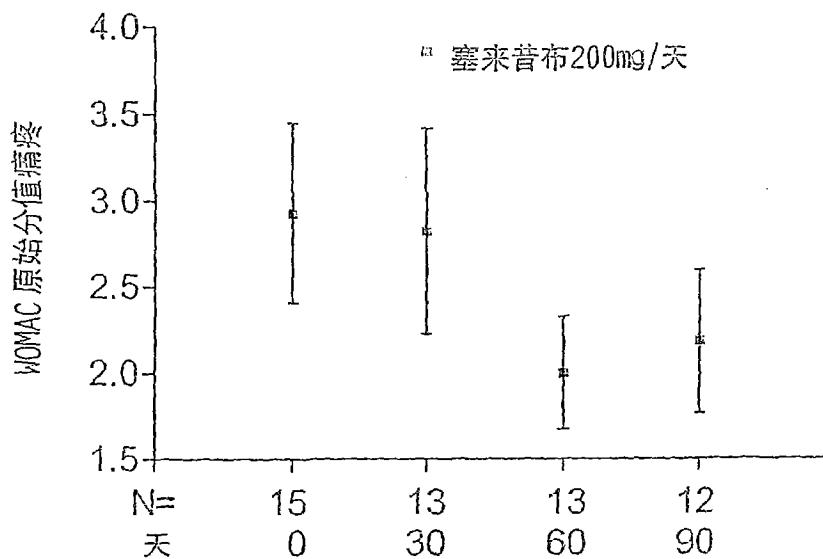


图 21



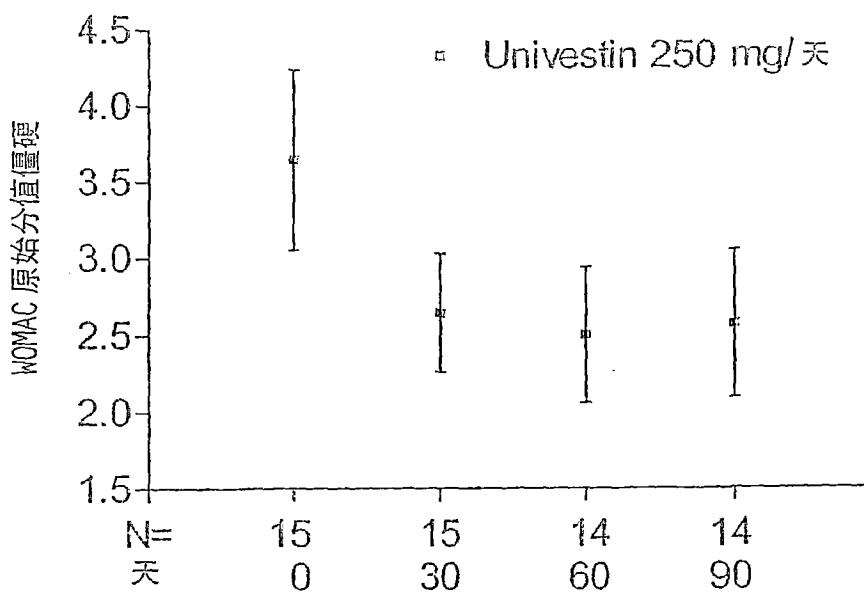


图 24

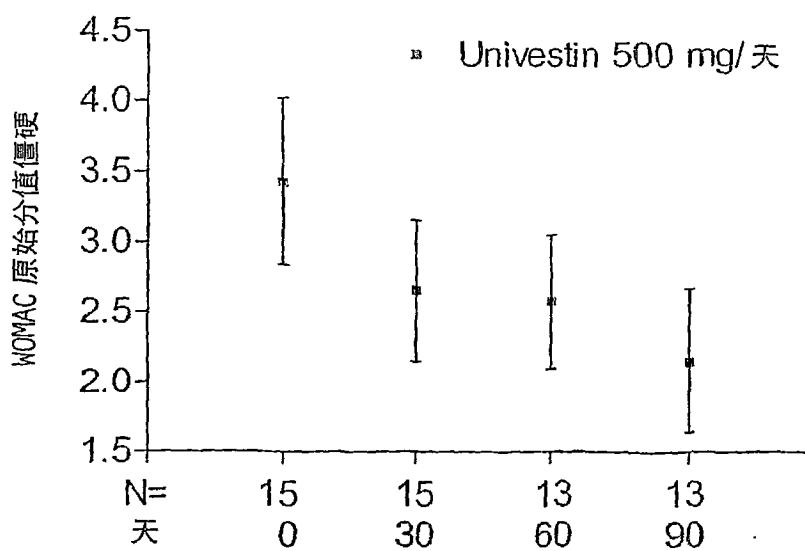


图 25

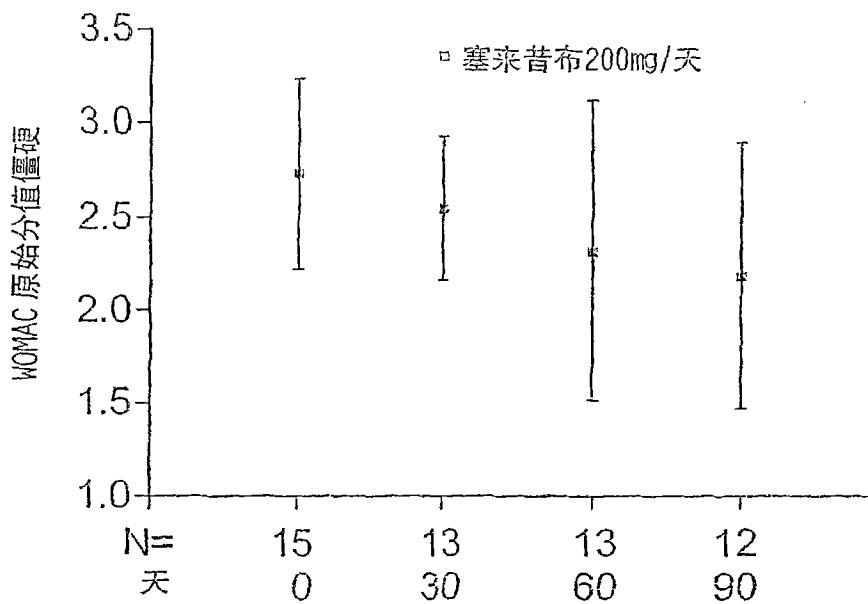


图 26

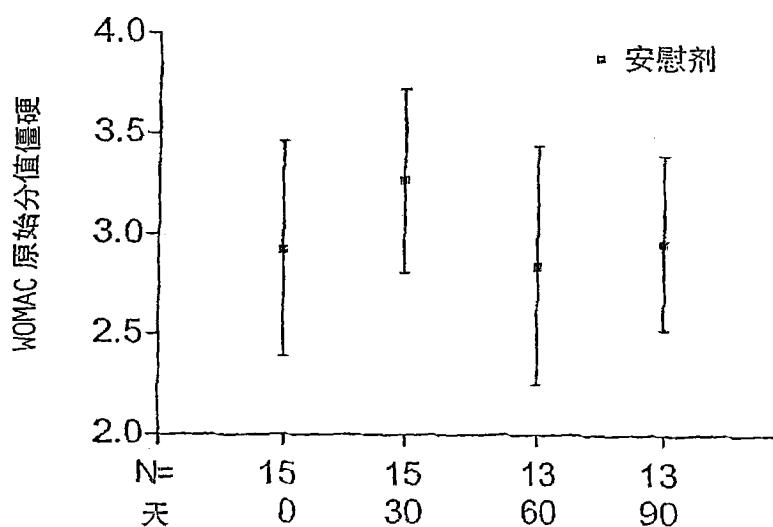


图 27

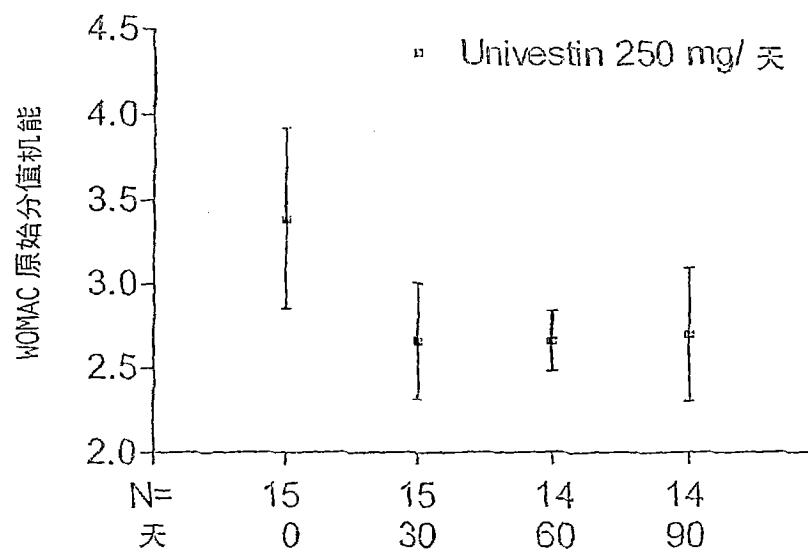


图 28

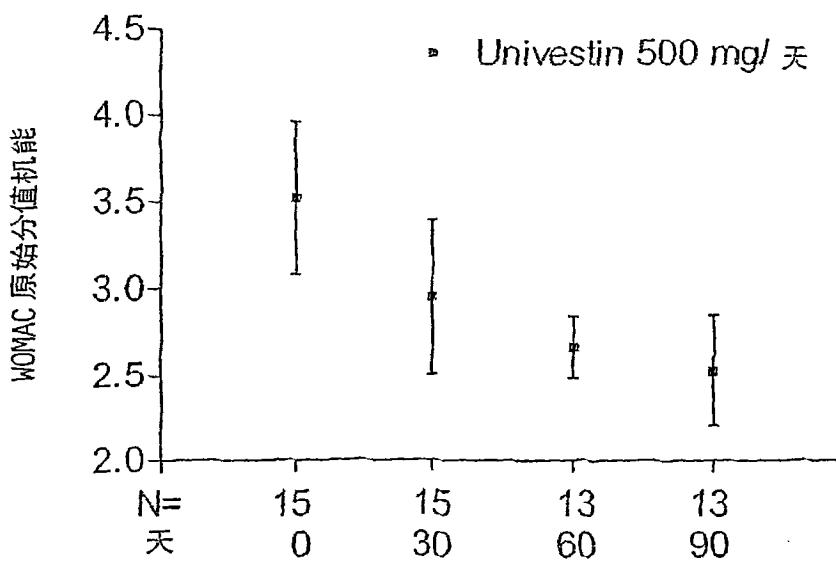


图 29

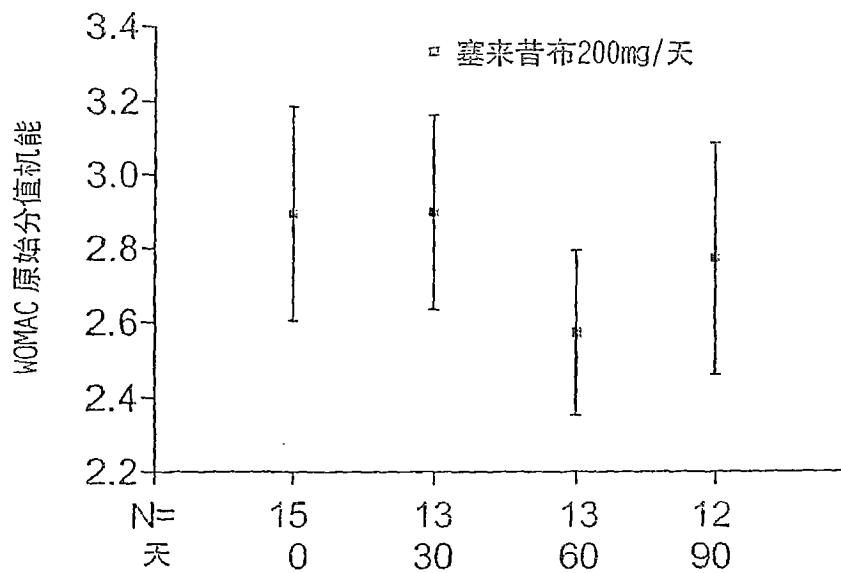


图 30

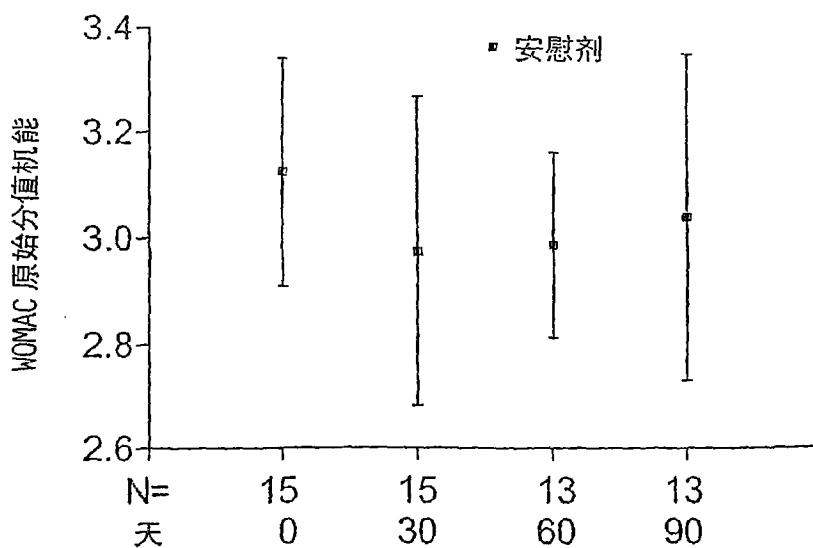


图 31

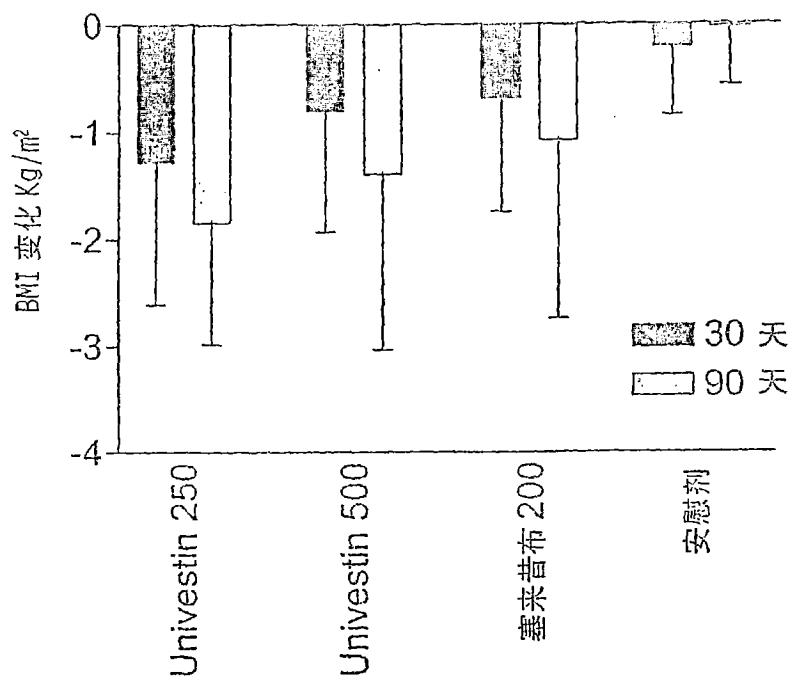


图 32

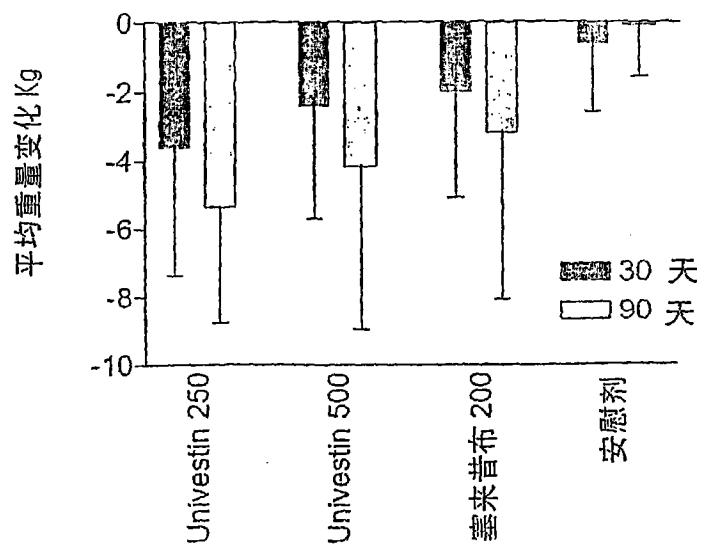


图 33

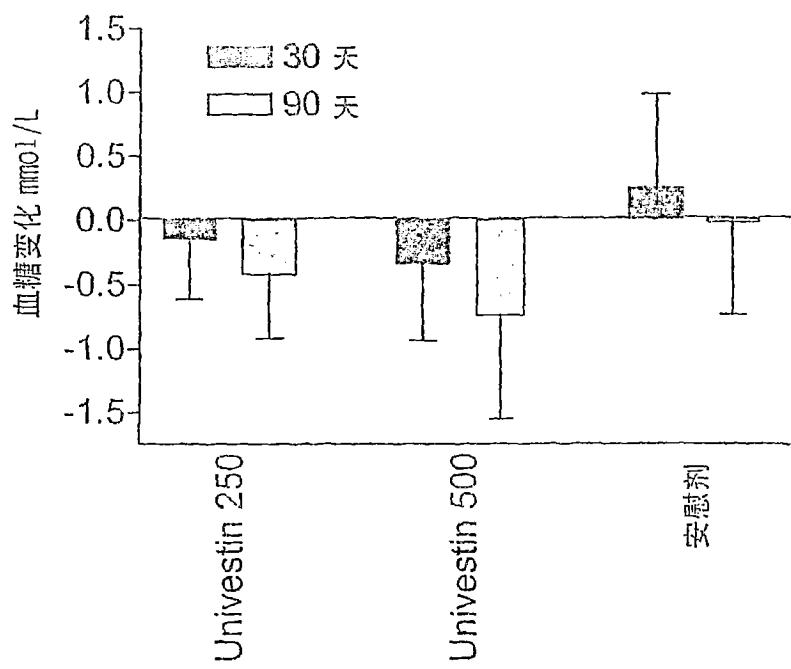


图 34