



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101921823 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 22

(21) 申请号 201010170409. X

(22) 申请日 2010. 05. 05

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号  
申请人 清华大学  
南开大学

(72) 发明人 饶子和 马明 姜智勇 李雪梅

(74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 11250

代理人 李红团

(51) Int. Cl.

C12Q 1/37(2006. 01)

A61K 31/201(2006. 01)

A61K 31/202(2006. 01)

A61P 31/14(2006. 01)

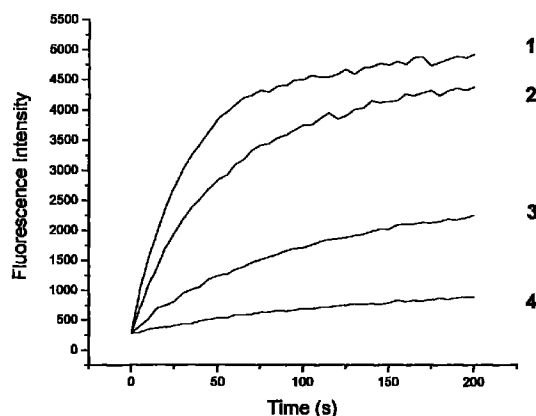
权利要求书 3 页 说明书 11 页 序列表 2 页  
附图 3 页

(54) 发明名称

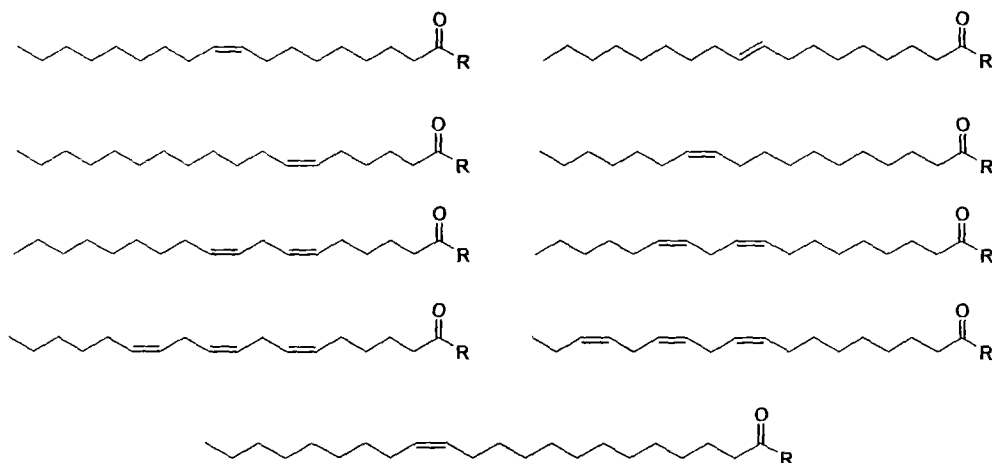
从中药中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法以及筛选得到的 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂

(57) 摘要

本发明提供了一种从中药中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法以及由此方法筛选出的抑制剂。筛选方法包括如下 :A. 测定来自单味中药的多种提取物的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性 ;B. 选择具有最好的体外抑制活性的一种提取物 ;和 C. 对步骤 B 所选择的提取物进行至少一轮的分离和选择。本发明筛选出的化合物对 SARS 冠状病毒主蛋白酶具有体外抑制活性,是极佳的可能上市的药物或潜在的药物前体。



1. 一种筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法,包括如下步骤:
  - A. 测定来自单味中药的多种提取物的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性;
  - B. 选择具有最好的体外抑制活性的一种提取物;和
  - C. 对步骤 B 所选择的提取物进行至少一轮的分离和选择,对每轮分离所得到的各种组分测定 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性,选择具有最好的体外抑制活性的一种组分进入下一轮的分离和选择,直至所述分离和选择得到的具有最好的体外抑制活性的组分是一种化合物,将该化合物作为 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述步骤 A 包括如下步骤:
  - (1). 向缓冲溶液中加入 SARS 冠状病毒主蛋白酶;
  - (2). 添加底物和待测物质到缓冲溶液中;和
  - (3). 测定待测物质的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 C 中所述的分离选自如下的一种或多种方法:超临界萃取、有机溶剂萃取、色谱分离、电泳分离和膜分离。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述提取物是有机溶剂提取物。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述有机溶剂选自芳香烃类溶剂、脂肪烃类溶剂、脂环烃类溶剂、卤化烃类溶剂、醇类溶剂、醚类溶剂、酯类溶剂、酮类溶剂、二醇衍生物类溶剂和其他有机溶剂。
6. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述有机溶剂选自醇类溶剂和酯类溶剂。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法,其中所述单味中药为巴豆 (fructus of Croton tiglium L.)。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述多种提取物为巴豆 95%乙醇总提取物、巴豆乙酸乙酯提取物和巴豆水相大孔树脂 95%乙醇提取物。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述巴豆 95%乙醇总提取物、巴豆乙酸乙酯提取物和巴豆水相大孔树脂 95%乙醇提取物的提取方法包括如下步骤:
  - (a). 将巴豆用 95%乙醇溶液回流提取,合并提取液,浓缩得浸膏,即为巴豆 95%乙醇总提取物;
  - (b). 称取一定量的步骤 (a) 中所得的浸膏,用双蒸水悬浮,用乙酸乙酯萃取多次,分离乙酸乙酯相和水相;合并水相,备用;合并每次乙酸乙酯萃取物,蒸除其中的乙酸乙酯,得到浓膏状乙酸乙酯相样品,即为巴豆乙酸乙酯提取物;和
  - (c). 蒸除步骤 (b) 中萃取后的水相部分的水中溶解的少量乙酸乙酯,用大孔树脂柱层析分离,依次用水和 95%乙醇溶液为流动相分别洗脱多次;弃去水洗部分,合并 95%乙醇溶液洗脱部分,蒸除其中的溶剂,得干膏状样品,即为巴豆水相大孔树脂 95%乙醇提取物。
10. 根据权利要求 9 的方法,其中所述底物为荧光标记底物。
11. 根据权利要求 10 的方法,其中所述荧光标记底物为 MCA-AVLQSGFRL (DNP) L-NH<sub>2</sub>。
12. 根据权利要求 1-11 任一项的方法筛选获得的 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂在制备用于治疗 and / 或预防 SARS 冠状病毒感染的药物中的应用。
13. 根据权利要求 12 的应用,其中所述 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂为符合如下不饱和和脂肪酸类结构通式的化合物:



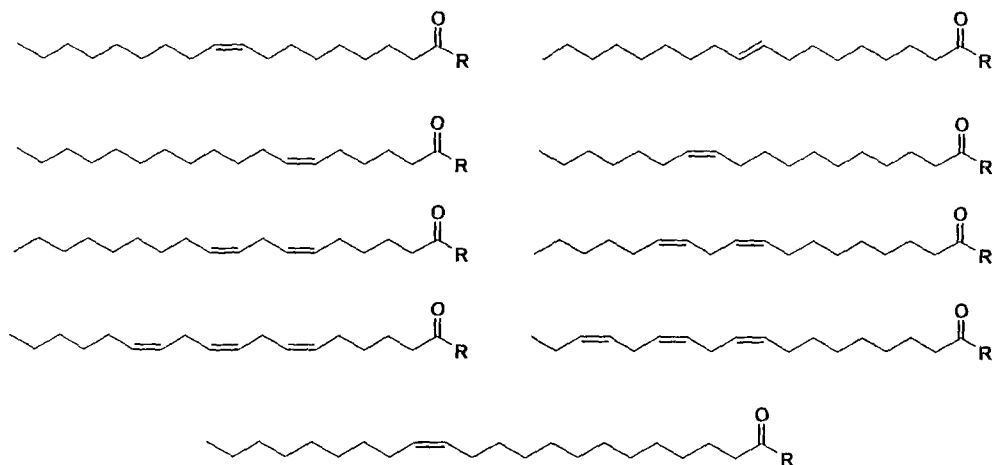
其中,各个 R 同时或独立地选自 :H、-OH、-ONa、-OK、-OSO<sub>3</sub>H、-OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-OAc、-OCH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>C  
H<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-Oglu 和 -Ogal。

14. 根据权利要求 12 的应用,其中所述 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂为 6 顺,9 顺-十八二烯酸 (isolinoic acid)。

15. 根据权利要求 12 的应用,其中所述 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂为具有与 6 顺,9 顺-十八二烯酸结构类似的不饱和脂肪酸化合物 :6 顺-十八烯酸、9 顺-十八烯酸、9 顺-十八烯酸钠盐、9 反-十八烯酸、11 顺-十八烯酸、13 顺-二十二烯酸、9 顺,12 顺-十八二烯酸、9 顺,12 顺,15 顺-十八三烯酸和 6 顺,9 顺,12 顺-十八三烯酸。

16. 一种用于治疗 and / 或预防 SARS 冠状病毒感染的药物组合物,包含治疗有效量的根据权利要求 1-11 任一项的方法筛选获得的 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂以及药学上可接受的载体。

17. 根据权利要求 16 的药物组合物,其中所述 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂为具有如下结构通式的不饱和脂肪酸类化合物以及药学上可接受的载体 :



其中,各个 R 同时或独立地选自 :H、-OH、-ONa、-OK、-OSO<sub>3</sub>H、-OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-OAc、-OCH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>C  
H<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-Oglu 和 -Ogal。

18. 根据权利要求 16 的药物组合物,其中所述 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂为 :6 顺,9 顺-十八二烯酸 (isolinoic acid)。

19. 根据权利要求 16 的药物组合物,其中所述 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂为与 6 顺,9 顺-十八二烯酸结构类似的不饱和脂肪酸化合物 :6 顺-十八烯酸、9 顺-十八烯

酸、9 顺 - 十八烯酸钠盐、9 反 - 十八烯酸、11 顺 - 十八烯酸、13 顺 - 二十二烯酸、9 顺, 12 顺 - 十八二烯酸、9 顺, 12 顺, 15 顺 - 十八三烯酸和 6 顺, 9 顺, 12 顺 - 十八三烯酸。

## 从中药中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法以及 筛选得到的 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及从中药中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法以及筛选得到的 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂。更具体而言,本发明涉及以 SARS 冠状病毒主蛋白酶的体外抑制活性测定为基础,从中药中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶的不饱和脂肪酸抑制剂的方法,以及由此导出的一系列不饱和脂肪酸类抑制剂。

### 背景技术

[0002] SARS(Severe Acute Respiratory Syndrome)为引起严重急性呼吸道综合症(非典型性肺炎)的简称,其病原体为冠状病毒属的一种病毒(Peiris J.Lancet,2003,361,1319-1325)。冠状病毒是正链 RNA 病毒。冠状病毒属隶属于冠状病毒科。在目前已知的正链 RNA 病毒中,它们的基因组是最大的(Siddell, S. G. Coronaviruses, toroviruses, and arteriviruses. in Topley & Wilson' s Microbiology and Microbia Infections, 10th edition, Vol. Virology (eds. Mahy, B. W. J. & ter Meulen, V.) 823-856 (Hodder Arnold, London, 2005))。这个属含有约 26 个种;按照它们的自然宿主、基因序列以及血清型关系,这个属又可以被分为三个组群(group):其中第一组群有 TGEV, Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus(猪传染性胃肠炎病毒)等;第二组群有 SARS 冠状病毒, MHV(鼠肝炎病毒)等;第三组群有 AIBV, Avian Infectious Bronchitis Virus(禽传染性支气管炎病毒)等(Spaan, W J M. Cavanagh, D. Coronaviridae. in Virus taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. 945-62 (Elsevier-Academic Press., London, 2004))。

[0003] SARS 冠状病毒 2/3 到 3/4 的基因组编码了两个复制酶多蛋白(replicase polyproteins) ppla 和 pplab, 它们只有在病毒编码的蛋白酶切割成独立亚基之后才能使病毒完成正常转录、复制功能。SARS 冠状病毒主要蛋白酶(main protease, 简称主蛋白酶)在这个过程中起主要作用。如果能够抑制 SARS 冠状病毒主蛋白酶的水解作用,那么将会有效地抵御 SARS 冠状病毒对人体的侵染。因此, SARS 冠状病毒的主蛋白酶是抗 SARS 药物筛选的一个主要靶标。

[0004] 2003 年爆发的 SARS 病毒感染在全世界造成 8096 例病例, 774 例死亡。虽然到今天为止未再发生感染,但不排除 SARS 及其变种卷土重来的可能性。2003 年 SARS 病毒感染时已有用中药预防或救治的先例。我国传统中药是大量天然产物的重要来源,天然产物具有结构的多样性和生物活性的多样性。天然产物及其衍生物在以往的疾病治疗中发挥了无可限量的作用,也是当今药物研发过程中最具潜力的资源之一(Newman D J, Gragg G M, Snader K M. Nat Prod Rep., 2000, 17, 215-234; Lee K H. J Nat Prod., 2004, 67, 273-283)。现在对中药等传统药物、海洋生物以及微生物代谢过程中的天然产物研究方兴未艾,每年都会有大量结构新颖的化合物被发现提供出来,这些新颖化合物是合成方法所无法实现的药物和药物先导化合物的重要源泉,在新药和先导化合物的发现中起着重要作用。中药在我国已有数千年应用的历史,是一个伟大的宝库,因此从中药等天然产物中进行重要病毒

或重要疾病相关靶蛋白抑制剂的筛选是很有必要的。

[0005] 目前还没有以 SARS 冠状病毒主蛋白酶的体外抑制活性测定为基础,从泻下类中药例如巴豆中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的应用报道。本发明应用 SARS 冠状病毒主蛋白酶的体外酶活筛选方法,提供了一种从中药例如巴豆中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂如 6 顺,9 顺-十八二烯酸 (isolinoic acid) 及其衍生物的方法。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法,包括如下:A. 测定来自单味中药的多种提取物的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性;B. 选择具有最好的体外抑制活性的一种提取物;和 C. 对步骤 B 所选择的提取物进行至少一轮的分离和选择,对每轮分离所得到的各种组分测定 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性,选择具有最好的体外抑制活性的一种组分进入下一轮的分离和选择,直至所述分离和选择得到的具有最好的体外抑制活性的组分是一种化合物,将该化合物作为 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂。

[0007] 在一个优选的实施方案中,所述步骤 A 中的测定来自单味中药的多种提取物的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性的方法包括如下步骤:(1). 向缓冲溶液中加入 SARS 冠状病毒主蛋白酶;(2). 添加底物和待测物质到缓冲溶液中;和 (3). 测定待测物质的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性。

[0008] 在另一个优选的实施方案中,所述步骤 C 中的分离采用选自如下的一种或多种方法:超临界萃取、有机溶剂萃取、色谱分离、电泳分离和膜分离。

[0009] 在另一个优选的实施方案中,所述提取物是有机溶剂提取物。

[0010] 在一个进一步优选的实施方案中,所述有机溶剂选自芳香烃类溶剂、脂肪烃类溶剂、脂环烃类溶剂、卤化烃类溶剂、醇类溶剂、醚类溶剂、酯类溶剂、酮类溶剂、二醇衍生物类溶剂和其他有机溶剂。

[0011] 在一个更进一步优选的实施方案中,所述有机溶剂进一步选自醇类溶剂和酯类溶剂。

[0012] 在另一个优选的实施方案中,所述单味中药为巴豆 (fructus of *Croton tiglium*L.)。

[0013] 在另一个优选的实施方案中,所述来自单味中药的多种提取物为巴豆 95%乙醇 (乙醇浓度以 v/v 计) 总提取物、巴豆乙酸乙酯提取物和巴豆水相大孔树脂 95%乙醇提取物。

[0014] 在一个进一步优选的实施方案中,所述巴豆 95%乙醇总提取物、巴豆乙酸乙酯提取物和巴豆水相大孔树脂 95%乙醇提取物的制备方法包括如下:(a). 取一定量的巴豆,用 95%乙醇溶液回流提取多次,合并提取液,浓缩得浸膏,即为巴豆 95%乙醇总提取物;(b). 称取一定量的步骤 (a) 中所得的浸膏,用双蒸水悬浮,用乙酸乙酯萃取多次,分离乙酸乙酯相和水相;合并水相,备用;合并每次乙酸乙酯萃取物,蒸除其中的乙酸乙酯,得到干膏状乙酸乙酯相样品,即为巴豆乙酸乙酯提取物;和 (c). 蒸除步骤 (b) 中萃取后的水相部分的水中溶解的少量乙酸乙酯,用大孔树脂柱层析分离,依次用水和 95%乙醇溶液为流动相分别洗脱多次;弃去水洗部分,合并 95%乙醇溶液洗脱部分,蒸除其中的溶剂,得干膏状样

品,即为巴豆水相大孔树脂 95%乙醇提取物。

[0015] 在一个进一步优选的实施方案中,所述底物为荧光标记底物。

[0016] 在一个更进一步优选的实施方案中,所述荧光标记底物为 MCA-AVLQSGFRL (DNP) L-NH<sub>2</sub>。

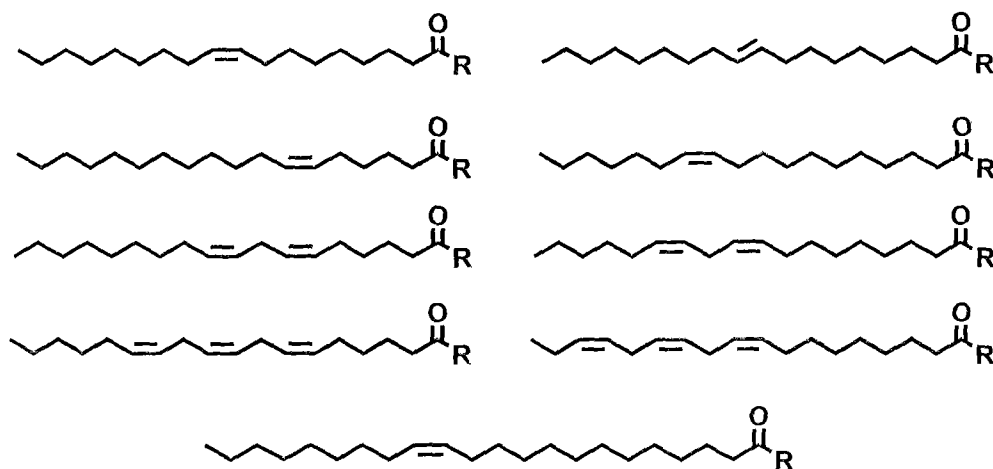
[0017] 本发明的另一个目的是提供根据上述任何一个实施方案所描述的方法筛选获得的 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂在制备用于治疗 and / 或预防 SARS 冠状病毒感染的药物中的应用。

[0018] 在一个优选的实施方案中,所述 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂为 6 顺,9 顺-十八二烯酸 (isolinoic acid)。

[0019] 在一个优选的实施方案中,所述 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂为由 6 顺,9 顺-十八二烯酸 (isolinoic acid) 导出的 6 顺-十八烯酸 (petroselinic acid)、9 顺-十八烯酸 (oleic acid)、9 顺-十八烯酸钠盐 (sodium oleate)、9 反-十八烯酸 (elaidic acid)、11 顺-十八烯酸 (cis-vaccenic acid)、13 顺-二十二烯酸 (erucic acid)、9 顺,12 顺-十八二烯酸 (linoleic acid)、9 顺,12 顺,15 顺-十八三烯酸 (linolenic acid) 和 6 顺,9 顺,12 顺-十八三烯酸 ( $\gamma$ -linolenic acid)。

[0020] 本发明的又一个目的是提供具有如下结构通式的不饱和脂肪酸类化合物在制备用于治疗 and / 或预防 SARS 冠状病毒感染的药物中的应用:

[0021]



[0022] 其中,各个 R 同时或独立地选自 :H、-OH、-ONa、-OK、-OSO<sub>3</sub>H、-OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-OAc、-OCH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-Oglu 和 -Ogal。

[0023] 在一个优选的实施方案中,所述不饱和脂肪酸类化合物为 6 顺,9 顺-十八二烯酸、6 顺-十八烯酸、9 顺-十八烯酸、9 顺-十八烯酸钠盐、9 反-十八烯酸、11 顺-十八烯酸、13 顺-二十二烯酸、9 顺,12 顺-十八二烯酸、9 顺,12 顺,15 顺-十八三烯酸和 6 顺,9 顺,12 顺-十八三烯酸。

[0024] 本发明的再一个目的是提供一种用于治疗 and / 或预防 SARS 冠状病毒感染的药物组合物,包含治疗有效量的上述方法筛选获得的 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂以及药学上可接受的载体。

[0025] 在本发明的上下文中,所述 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性的测定方法具体包括如下:(1). 向缓冲溶液如含 50mM Tris-HCl, pH 7.3、1mM EDTA 的缓冲溶液中加入

SARS 冠状病毒主蛋白酶 ;(2). 添加底物和待测物质到缓冲溶液中 ;和 (3). 测定待测物质的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性 ;其中所述缓冲溶液可含有或不含有 DTT ;底物包括但不限于显色、发荧光或化学发光的底物,优选发荧光的底物,例如荧光标记的底物 MCA-AVLQSGFRL(DNP)L-NH<sub>2</sub> ;可通过包括但不限于比色、荧光读数或化学发光读数的方法测定待测物质的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性 ;加入缓冲溶液中的 SARS 冠状病毒主蛋白酶、待测物质和底物的浓度可根据具体情况由本领域技术人员进行确定,例如 SARS 冠状病毒主蛋白酶的浓度可为 0.5 μ M,当待测物质为混合物时,可为 10-100 μ g/mL,当待测物质为单一化合物时,可为 200 μ M,底物浓度可为 16 μ M ;在通过荧光读数测定待测物质的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性时,激发波长和发射波长可分别为 320nm 和 405nm,温度可保持在 298K,可每 2 秒钟记录一次荧光读数。

[0026] 在本发明的上下文中,所述分离采用选自如下的一种或多种方法 :超临界萃取、有机溶剂萃取、色谱(层析)分离、电泳分离和膜分离,其中超临界萃取包括但不限于二氧化碳超临界萃取 ;有机溶剂萃取包括但不限于醇类溶剂萃取和酯类溶剂萃取,例如正丁醇萃取和乙酸乙酯萃取 ;色谱(层析)分离包括但不限于吸附色谱(层析)分离、凝胶过滤色谱(层析)分离、离子交换色谱(层析)分离、疏水色谱(层析)分离和 HPLC 分离 ;电泳分离包括但不限于滤纸电泳、薄膜电泳、粉末电泳、细丝电泳、凝胶电泳和毛细管电泳 ;膜分离可采用无机膜和有机膜,无机膜包括但不限于陶瓷膜和金属膜,有机膜包括但不限于醋酸纤维素膜、芳香族聚酰胺膜、聚醚砜膜、聚氟聚合物膜。

[0027] 在本发明的上下文中,所述有机溶剂包括但不限于 :①芳香烃类溶剂 :如苯、甲苯、二甲苯等 ;②脂肪烃类溶剂 :如戊烷、己烷、辛烷等 ;③脂环烃类溶剂 :如环己烷、环己酮、甲苯环己酮等 ;④卤化烃类溶剂 :如氯苯、二氯苯、二氯甲烷等 ;⑤醇类溶剂 :如甲醇、乙醇、异丙醇等 ;⑥醚类溶剂 :如乙醚、环氧丙烷等 ;⑦酯类溶剂 :醋酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯等 ;⑧酮类溶剂 :丙酮、甲基丁酮、甲基异丁酮等 ;⑨二醇衍生物类溶剂 :如乙二醇单甲醚、乙二醇单乙醚、乙二醇单丁醚等 ;⑩其他有机溶剂 :如乙腈、吡啶、苯酚等 ;优选醇类和 / 或酯类溶剂 ;更优选乙醇和 / 或乙酸乙酯。

[0028] 在本发明的上下文中,所述巴豆 95%乙醇总提取物、巴豆乙酸乙酯提取物和巴豆水相大孔树脂 95%乙醇提取物的制备方法具体如下 :(a). 取一定量(如 500 克)的巴豆,用 95%乙醇溶液(如 4500 毫升)回流提取 3 次,合并提取液,浓缩得浸膏,即为巴豆 95%乙醇总提取物 ;(b). 称取一定量(如 10 克)的步骤 (a) 中所得的浸膏,用双蒸水(如 150 毫升)悬浮,用乙酸乙酯(如 650 毫升)萃取 3 次,分离乙酸乙酯相和水相 ;合并水相,备用 ;合并每次乙酸乙酯萃取物,蒸除其中的乙酸乙酯,得到干膏状乙酸乙酯相样品,即为巴豆乙酸乙酯提取物 ;和 (c). 蒸除步骤 (b) 中萃取后的水相部分的水中溶解的少量乙酸乙酯,用大孔树脂柱层析分离,依次用水和 95%乙醇溶液为流动相洗脱,水(如 250 毫升)洗脱例如 8 次,95%乙醇(如 300 毫升)洗脱例如 5 次 ;弃去水洗部分,合并 95%乙醇溶液洗脱部分,蒸除其中的溶剂,得干膏状样品,即为巴豆水相大孔树脂 95%乙醇提取物。

[0029] 本发明选取 SARS 冠状病毒中晶体结构已知的主蛋白酶,对我国传统中药巴豆进行活性成分筛选,是从一种新的角度去研究中药学、天然产物化学和生物学,是运用各种交叉学科对中医药现代化的宝贵尝试。由于巴豆中所含的成分是相当复杂的,必须运用各种色谱方法对其粗提物进行分离纯化,目的是去除对 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外活性测定



中的干扰因素如蛋白、无机盐等,保留成药性较好的小分子并使之尽量集中,提高相对浓度。本发明不仅提供了可以实现这一目的制备技术方案,而且对筛选有抑制活性的样品,用各种色谱、波谱方法分离、鉴定了其中小分子抑制剂 6 顺,9 顺-十八二烯酸。通过购买与 6 顺,9 顺-十八二烯酸结构相似、双键数量和位置不同的脂肪酸类化合物,并用酶活筛选对它们的抑制活性加以验证,我们又得到了几种强有力的抑制剂。最后我们对这些抑制剂的结构特点进行分析,得到了具有特定结构骨架的结构式,符合这些结构式的化合物很可能具有对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性。

[0030] 目前,基于 SARS 冠状病毒主蛋白酶晶体结构为基础进行的药物筛选,所发现的小分子抑制剂绝大多数为 SARS 冠状病毒主蛋白酶底物类似物及其衍生物 (Dariusz P, Marcin H, Marcin G. Chem. Biol. Drug. Res., 2007, 69, 269-279; Haitao Y, Wenqing X, Xiaoyu X. PLOS Biology, 2005, 3, 1742-1752), 这类多肽类抑制剂不仅造价昂贵,而且口服利用度低,在血液中的半衰期短,对制服 SARS 感染发病带来了难度。本发明筛选出的抑制剂-6 顺,9 顺-十八二烯酸,以及由此导出的不饱和脂肪酸衍生物,分子结构中不含肽键,其对 SARS 冠状病毒主蛋白酶在 25  $\mu$  M 时仍具有体外抑制活性,考虑到它们大多为常用中药中的天然产物,其毒性及代谢吸收特性较多肽类等其它合成化合物具有不可比拟的优越性,是极佳的可能上市的药物或潜在的药物前体。这为进一步的药物设计和筛选提供了宝贵的依据和参考。

#### 附图说明

[0031] 图 1:本发明的巴豆的各种提取物对 SARS 冠状病毒主蛋白酶的抑制活性曲线图;其中,1 为对照曲线,2、3、4 分别为巴豆水相大孔树脂 95%乙醇提取物、巴豆 95%乙醇总提取物、巴豆乙酸乙酯提取物的抑制曲线,样品浓度均为:100  $\mu$  g/mL。

[0032] 图 2:本发明的巴豆乙酸乙酯提取物进一步分离组分 a1-a5 的抑制曲线图;其中,1 为对照,2、3、4、5、6 分别为 a2、a1、a3、a5、a4 的抑制曲线,样品浓度均为:10  $\mu$  g/mL。

[0033] 图 3:本发明的巴豆乙酸乙酯提取物 a4 部分进一步分离组分 b1 和 b2 的抑制曲线图;其中,1 为对照,2、3 分别为 b2、b1 的抑制曲线,样品浓度均为:10  $\mu$  g/mL。

[0034] 图 4:化合物 1 的 HMBC 图谱导出的氢和碳原子之间的相关关系。

[0035] 图 5:化合物 1(6 顺,9 顺-十八二烯酸)的抑制曲线图;其中 1 为对照,2 为化合物 1,浓度为:10  $\mu$  g/mL。

[0036] 图 6:各种不饱和脂肪酸抑制剂的抑制曲线图。其中,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 分别为对照曲线、9 顺-十八烯酸钠盐、6 顺,9 顺,12 顺-十八三烯酸、9 顺,12 顺,15 顺-十八三烯酸、6 顺,9 顺-十八二烯酸、9 顺,12 顺-十八二烯酸、9 顺-十八烯酸、9 反-十八烯酸、11 顺-十八烯酸、6 顺-十八烯酸、13 顺-二十二烯酸。抑制剂浓度均为 50  $\mu$  M。

#### 具体实施方式

[0037] 本发明将根据下列实施例进行更具体的说明。然而,本发明的保护范围并不受限于下列的实施例。

[0038] 实施例 1. SARS 冠状病毒主蛋白酶的表达、纯化



- [0077] 290 295 300
- [0078] Phe Gln
- [0079] 305
- [0080] 1. 1SARS 冠状病毒主蛋白酶的表达载体构建
- [0081] 具体步骤包括：
- [0082] 1. 1. 1 利用北京华大基因中心提供的编号为 BJ01 的 SARS 病毒毒株的 cDNA 文库，用 PCR 技术进行体外扩增，
- [0083] 正向引物：5' -CGGGATCCAGTGGTTTTAGGAAAATG-3'
- [0084] 反向引物：5' -CCGCTCGAGTCATTGGAAGGTAACACCAGA-3'
- [0085] 1. 1. 2 经 PCR 扩增的基因片段经 BamHI 和 XhoI 双酶酶切后，用琼脂糖凝胶电泳回收大小为 1kb 左右的片段；
- [0086] 1. 1. 3 将回收片段与 T 载体进行连接，然后用连接产物转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞，并涂在 LB 平板 (含 100mg/L 氨苄青霉素) 上，培养过夜；
- [0087] 1. 1. 4 从平板上挑取多个单克隆，分别接种于装有约 5mL 的 LB 的试管 (该 LB 溶液中加入氨苄青霉素，使其终浓度为 100mg/L) 中，培养过夜，然后用质粒提取试剂盒 (博大泰克公司 B 型质粒小量快速提取试剂盒) 提取质粒，并用 BamHI 和 XhoI 酶切，然后用琼脂糖凝胶回收大小约为 1kb 左右的目标基因片段；
- [0088] 1. 1. 5 将目标载体 pGEX-4T-1 (购自 Pharmacia 公司) 用 BamHI 和 XhoI 酶切，然后用琼脂糖凝胶回收酶切的片段；
- [0089] 1. 1. 6 将 (1. 1. 4) 和 (1. 1. 5) 获得的片段连接 (将酶切回收后的目标基因片段和目标载体片段按照摩尔数 3 : 1-6 : 1 的比率混合，按照 Takara DNA Ligation 的要求在 16 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟 -18 小时)，转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，涂在 LB 平板 (含 100mg/L 氨苄青霉素) 上培养过夜。将筛选到的阳性克隆，用于鉴定和测序。
- [0090] 测序结果表明，SARS 冠状病毒的主蛋白酶的编码基因已被正确地克隆到 pGEX-4T-1 载体中。
- [0091] 1. 2SARS 冠状病毒主蛋白酶的表达与纯化
- [0092] 包括步骤：
- [0093] 1. 2. 1 将上述步骤 1. 1 中得到的含有编码 SARS 冠状病毒主蛋白酶基因的 pGEX-4T-1 载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 的菌株，并用 LB 平板 (含 100mg/L 氨苄青霉素) 筛选阳性克隆；
- [0094] 1. 2. 2 在 (1. 2. 1) 中所述的 LB 平板上挑取阳性克隆 (在含有氨苄青霉素的 LB 平板上生长出来的单克隆)，培养过夜，然后转入 1L 的 LB 培养基 (含 100mg/L 氨苄青霉素)，当 OD<sub>600</sub> 达到 0. 6-0. 8 时，加入 1mM 左右的 IPTG，在 16 $^{\circ}$ C 培养 12 小时左右；
- [0095] 1. 2. 3 5000-8000rpm 离心 10-15 分钟收集细胞，然后冰浴超声破菌 20-30 分钟；破菌液 13000rpm-15000rpm 离心 20-40 分钟后收集上清液；
- [0096] 1. 2. 4 将上清液加入 PBS 预平衡的 GST 亲和层析柱 (GE 公司) 中，用 PBS 淋洗 20-30 个柱床体积去除杂蛋白，最后加入 2ml 0. 1mg/ml 左右的人类鼻病毒 3C 蛋白酶，在 4 $^{\circ}$ C 酶切 12-20 小时，之后收集 SARS 冠状病毒主蛋白酶；

[0097] 1.2.5 将 (1.2.4) 获得的 SARS 冠状病毒主蛋白酶再用 Mono Q(GE 公司) 阴离子交换层析进行纯化。

[0098] 实施例 2. 制备巴豆提取物

[0099] 取 500 克干燥粉碎的巴豆药材,用 4500 毫升 95%乙醇回流提取,提取 3 次,每次 2 小时,合并提取液,浓缩得浸膏(即巴豆 95%乙醇总提取物);

[0100] 称取此浸膏 10 克,用 150 毫升双蒸水悬浮,倾入 1000 毫升分液漏斗中,用乙酸乙酯萃取,每次萃取用乙酸乙酯 650 毫升,充分振摇,静置 6 小时分层,共萃取 3 次,分离乙酸乙酯相和水相,合并水相,备用,合并每次乙酸乙酯萃取物,乙酸乙酯萃取物用 EYELAN1001 型旋转蒸发器蒸除溶剂,得浓膏状巴豆乙酸乙酯萃取样品(即巴豆乙酸乙酯提取物),备用;

[0101] 萃取后的水相部分用 EYELA N1001 型旋转蒸发器蒸除水中溶解的少量乙酸乙酯,用 HP-20 型大孔树脂柱层析分离(使用 170 毫升的大孔树脂,玻璃柱规格 30×300mm),依次用水、95%乙醇为流动相洗脱,其中水洗脱 8 次,每次洗脱 250 毫升,弃去水洗部分,95%乙醇洗脱 5 次,每次洗脱 300 毫升,合并 95%乙醇洗脱部分,将 95%乙醇洗脱部分使用 EYELA N1001 型旋转蒸发器蒸除溶剂,得干膏状巴豆水相大孔树脂 95%乙醇洗脱样品(即巴豆水相大孔树脂 95%乙醇提取物),备用。

[0102] 实施例 3. 从巴豆提取物中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂

[0103] 对上述乙酸乙酯萃取样品、水相大孔树脂 95%乙醇洗脱样品和巴豆 95%乙醇总提取物进行 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性实验,抑制曲线见图 1。测定方法具体包括如下:(1). 向含 50mM Tris-HCl, pH 7.3、1mM EDTA 的缓冲溶液中加入 SARS 冠状病毒主蛋白酶,终浓度为 0.5 μM,然后在不同的含有此蛋白的缓冲溶液中分别加入巴豆乙酸乙酯萃取样品、水相大孔树脂 95%乙醇洗脱样品和 95%乙醇总提取物,它们的浓度均为 100 μg/mL;(2). 添加底物 MCA-AVLQSGFRL(DNP)L-NH<sub>2</sub> 到缓冲溶液中,终浓度为 16 μM;和(3). 测定待测物质的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性,其中对照曲线为只加蛋白和底物、不加巴豆各个分段样品的测定曲线,曲线越低说明抑制作用越强。

[0104] 由图 1 的抑制曲线可知巴豆的乙酸乙酯萃取样品部分抑制活性最好。将乙酸乙酯萃取部分用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(制造商:北京慧德益科技有限责任公司)分离,以氯仿-甲醇(1:1)为流动相洗脱,共接收合并了 5 个部分,为 a1-a5。对这 5 个部分进行 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性实验,体外抑制活性曲线见图 2。测定方法具体包括如下:(1). 向含 50mM Tris-HCl, pH 7.3、1mM EDTA 的缓冲溶液中加入 SARS 冠状病毒主蛋白酶,终浓度为 0.5 μM,然后在不同的含有此蛋白的缓冲溶液中分别加入 a1-a5 样品,它们的浓度均为 10 μg/mL;(2). 添加底物 MCA-AVLQSGFRL(DNP)L-NH<sub>2</sub> 到缓冲溶液中,终浓度为 16 μM;和(3). 测定待测物质的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性,其中对照曲线为只加蛋白和底物、不加 a1-a5 样品的测定曲线,曲线越低说明抑制作用越强。

[0105] 由图 2 可知 a4 部分的抑制活性最好。将 a4 部分用硅胶薄层色谱制备,用石油醚:丙酮=5:1 为展开剂,将 a4 分为两个部分, b1 和 b2。对这两个部分进行 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性实验,体外抑制活性曲线见图 3。测定方法具体包括如下:(1). 向含 50mM Tris-HCl, pH 7.3、1mM EDTA 的缓冲溶液中加入 SARS 冠状病毒主蛋白酶,终浓度为 0.5 μM,然后在不同的含有此蛋白的缓冲溶液中分别加入 b1、b2 样品,它们的浓度均

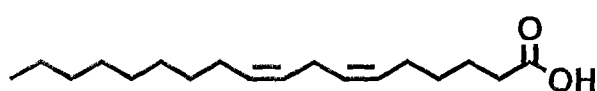
为  $10 \mu\text{g/mL}$ ; (2). 添加底物 MCA-AVLQSGFRL(DNP)L-NH<sub>2</sub> 到缓冲溶液中, 终浓度为  $16 \mu\text{M}$ ; 和 (3). 测定待测物质的 SARS 冠状病毒主蛋白酶体外抑制活性, 其中对照曲线为只加蛋白和底物、不加 b1 和 b2 样品的测定曲线, 曲线越低说明抑制作用越强。

[0106] 由图 3 可知 b1 部分活性较强, 将 b1 部分用 HPLC 纯化 (HPLC 分析和制备条件均为: 从 0 分钟到 15 分钟, 流动相为甲醇: 水 = 85 : 15; 从 15 到 45 分钟, 流动相配比从甲醇: 水 = 85 : 15 梯度升到甲醇: 水 = 100 : 0, 检测波长均为 210nm, 其中分析时流速为 1ml/min, 制备时流速为 3ml/min。分析柱规格为 YMC-Pack ODS-A, AA12S11-1546WT, A-302-10,  $150 \times 4.6\text{mm}$  I. D., S-10  $\mu\text{m}$ 。制备柱规格为 YMC-Pack ODS-A, AA12S11-1510WT, A-322-10,  $150 \times 10\text{mm}$  I. D., S-10  $\mu\text{m}$ ), 最终得到化合物 1 (6.5mg)。

[0107] 对化合物 1 分别作了 NMR 和 GC-MS 测定, 数据如下:

[0108] 化合物 1: 无色油状物。GC-MS  $m/z$  352  $[\text{M}+\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$ . <sup>1</sup>H NMR (氯仿-d, 600MHz)  $\delta$  5.30-5.41 (4H, m, H-6, 7, 9, 10), 2.77 (2H, t, J = 6.8Hz, H-8), 2.35 (2H, t, J = 6.9Hz, H-2), 2.05 (4H, q, J = 6.9Hz, H-5, 11), 1.62 (2H, quintet, J = 6.9Hz, H-3), 1.24-1.40 (14H, m, H-4, 12, 13, 14, 15, 16, 17), 0.89 (3H, t, J = 6.8Hz, H-18). <sup>13</sup>CNMR (氯仿-d, 150MHz)  $\delta$  180.5 (C-1), 34.2 (C-2), 24.8 (C-3), 27.3 (C-5), 130.3 (C-6), 128.1 (C-7), 25.7 (C-8), 128.0 (C-9), 130.1 (C-10), 27.2 (C-11), 22.6, 29.1-29.7, 31.6 (C-4, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 14.1 (C-18)。为了确定双键的位置, 又进行了 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、HMQC 和 HMBC 实验。在 HMBC 实验中, 2 位氢与 4 位碳的相关、5 位氢与 4 位碳的相关以及 2 位氢与 3 位碳的相关充分证明两个双键的位置在 6 位和 9 位 (见图 4)。其 NMR 数据与 6 顺, 9 顺-十八二烯酸数据 (Gunstone, F D, Pollard, M R, Scrimgeour, C M, Vedanayagam, H S. Chemistry and Physics of Lipids, 1977, 18, 115-129.) 完全一致, 因此确认化合物 1 为 6 顺, 9 顺-十八二烯酸 (isolinoic acid)。

[0109]



**C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>**  
**Exact Mass: 280.24**  
**Mol. Wt.: 280.45**  
**C, 77.09; H, 11.50; O, 11.41**

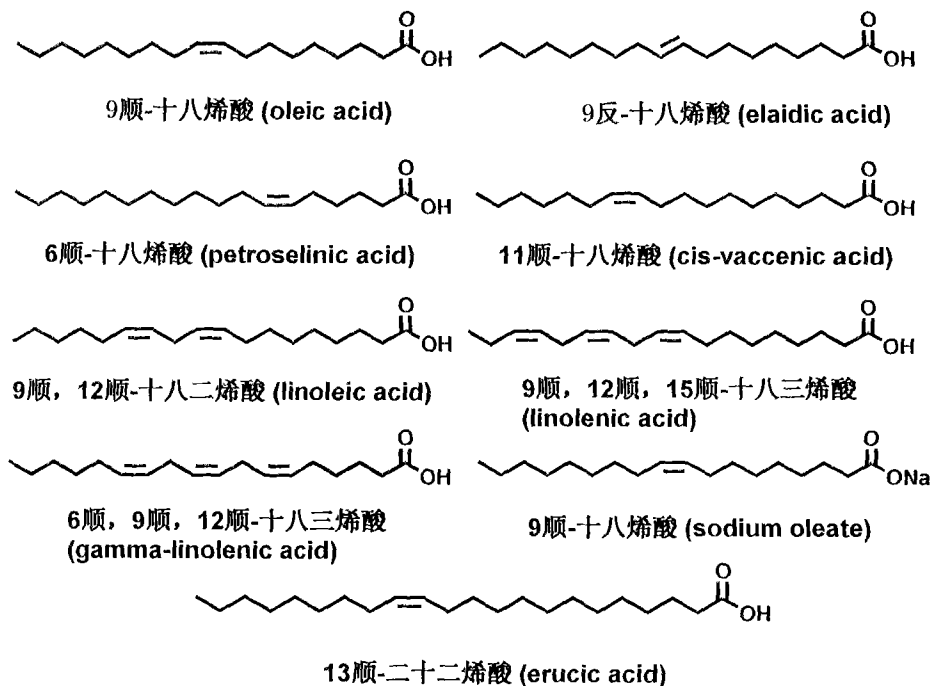
[0110] 我们对上述得到的化合物 1 (6 顺, 9 顺-十八二烯酸) 进行了 SARS 冠状病毒主蛋白酶的体外抑制活性测定, 测定按照如下步骤进行: 在缓冲溶液 (50mM Tris-HCl (pH 7.3), 1mM EDTA 中加入 SARS 主蛋白酶 (终浓度  $0.5 \mu\text{M}$ ), 6 顺, 9 顺-十八二烯酸 (终浓度为  $10 \mu\text{g/mL}$ ), 迅速加入荧光标记底物 (MCA-AVLQ ↓ SGFRL(DNP)L-NH<sub>2</sub>, 终浓度  $16 \mu\text{M}$ )。激发波长和发射波长分别为 320nm 和 405nm, 温度保持在 298K, 每 2 秒钟记录一次荧光读数 (结果示于图 5) (对照曲线为只加蛋白和底物、不加 6 顺, 9 顺-十八二烯酸的测定曲线, 曲线越低说明抑制作用越强)。由图 5 可知 6 顺, 9 顺-十八二烯酸具有很好的抑制活性, 是巴豆中对 SARS 冠状病毒主蛋白酶起抑制作用的主成分。

[0111] 实施例 4. 具有 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制活性的其他不饱和脂肪酸以及几类抑制剂结构通式的导出

[0112] 通过分析我们分离得到的抑制剂 6 顺, 9 顺-十八二烯酸的结构, 我们购买了其他的不饱和脂肪酸: 6 顺-十八烯酸 (上海 Sigma-aldrich 公司)、9 顺-十八烯酸 (天津 Alfa-aesar 公司)、9 顺-十八烯酸钠盐 (上海 Sigma-aldrich 公司)、9 反-十八烯酸 (天

津 Alfa-aesar 公司)、11 顺-十八烯酸(上海 Sigma-aldrich 公司)、13 顺-二十二烯酸(上海 Sigma-aldrich 公司)、9 顺,12 顺-十八二烯酸(北京百灵威科技有限公司)、9 顺,12 顺,15 顺-十八三烯酸(北京百灵威科技有限公司)和 6 顺,9 顺,12 顺-十八三烯酸(北京百灵威科技有限公司)来进行抑制活性筛选。它们的结构如下:

[0113]

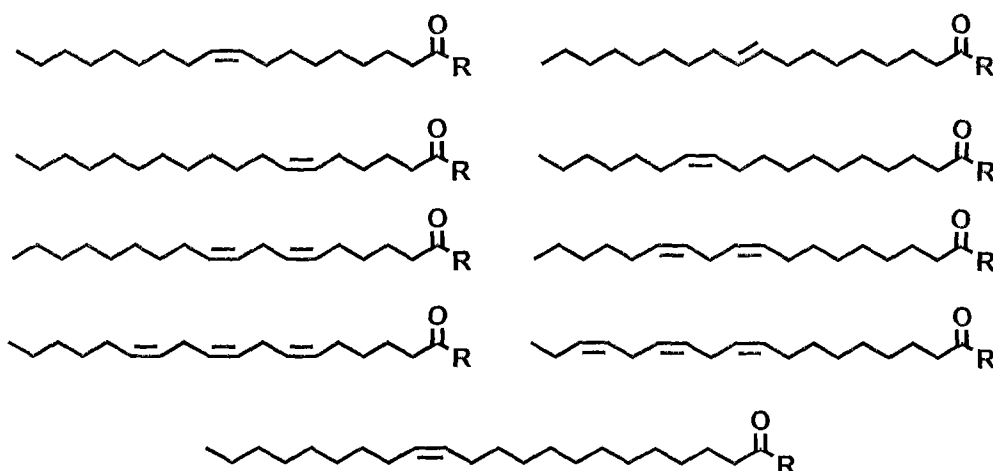


[0114] 对上述九个化合物进行 SARS 冠状病毒主蛋白酶的体外抑制活性测定,结果见图 6。测定按照如下步骤进行:在缓冲溶液(50mM Tris-HCl(pH 7.3),1mMEDTA(含或不含 DTT))中加入 SARS 主蛋白酶(终浓度 0.5 μM),在不同含有此蛋白的缓冲溶液中分别加入 9 顺-十八烯酸钠盐、6 顺,9 顺,12 顺-十八三烯酸、9 顺,12 顺,15 顺-十八三烯酸、6 顺,9 顺-十八二烯酸、9 顺,12 顺-十八二烯酸、9 顺-十八烯酸、9 反-十八烯酸、11 顺-十八烯酸、6 顺-十八烯酸、13 顺-二十二烯酸(终浓度均为 50 μM),迅速加入荧光标记底物(MCA-AVLQ ↓ SGFRL(DNP)L-NH<sub>2</sub>,终浓度 16 μM)。激发波长和发射波长分别为 320nm 和 405nm,温度保持在 298K,每 2 秒钟记录一次荧光读数。对照曲线为只加蛋白和底物、不加任何抑制剂时的测定曲线,曲线越低说明抑制作用越强。

[0115] 由图 6 结果可知,上述九个不饱和脂肪酸化合物对 SARS 冠状病毒主蛋白酶均具有不同程度的抑制作用,有的甚至抑制活性比 6 顺,9 顺-十八二烯酸更强。比较一下它们的化学结构可以发现,它们结构中存在着数目、位置、顺反构型不同的双键。

[0116] 符合如下结构通式的化合物对 SARS 冠状病毒主蛋白酶具有抑制作用:

[0117]



[0118] 其中,各个 R 同时或独立地选自 :H、-OH、-ONa、-OK、-OSO<sub>3</sub>H、-OPo<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-OAc、-OCH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-Oglu 和 -Ogal。因为 R 代表的化学基团只影响整个化合物的溶解性质,主要的抑制活性仍由脂肪酸的链状结构决定,所以符合这个结构通式的化合物对 SARS 冠状病毒主蛋白酶具有抑制作用。

[0119] 由于具有各种 R 取代基的化合物在体内代谢时可能会转化为游离羟基的化合物,而且本申请筛选的化合物具有结构的多样性和代表性,因此具有这个通式的化合物应该落入本发明的保护范围之内。

[0120] 本文中涉及的各种实验用品(包括但不限于:化学试剂、生物制品、细胞、生物体、仪器等)之中,对于那些特殊的或不易获得的,文中均已注明了制造商、参考文献或详细的制备方法;未经特别说明的,均为常规实验用品,在本申请日之前,可以通过各种方式(例如购买、自行制备等)很方便地获得。

[0121] 应当理解,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,本领域的普通技术人员可以在形式和细节上对其做出各种改变和改进,而这些均被认为落入本发明的保护范围中。

## 序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所、清华大学、南开大学

<120> 从中药中筛选 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂的方法以及筛选得到的 SARS 冠状病毒主蛋白酶抑制剂

<160>2

<210>1

<211>306

<212>prt

<213>SARS 冠状病毒 (SARS Coronavirus)

<400>1

Ser	Gly	Phe	Arg	Lys	Met	Ala	Phe	Pro	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Gly	Cys	1	5	10	15
Met	Val	Gln	Val	Thr	Cys	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Asn	Gly	Leu	Trp	Leu	20	25	30	
Asp	Asp	Thr	Val	Tyr	Cys	Pro	Arg	His	Val	Ile	Cys	Thr	Ala	Glu	Asp	35	40	45	
Met	Leu	Asn	Pro	Asn	Tyr	Glu	Asp	Leu	Leu	Ile	Arg	Lys	Ser	Asn	His	50	55	60	
Ser	Phe	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Asn	Val	Gln	Leu	Arg	Val	Ile	Gly	His	65	70	75	80
Ser	Met	Gln	Asn	Cys	Leu	Leu	Arg	Leu	Lys	Val	Asp	Thr	Ser	Asn	Pro	85	90	95	
Lys	Thr	Pro	Lys	Tyr	Lys	Phe	Val	Arg	Ile	Gln	Pro	Gly	Gln	Thr	Phe	100	105	110	
Ser	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Asn	Gly	Ser	Pro	Ser	Gly	Val	Tyr	Gln	Cys	115	120	125	
Ala	Met	Arg	Pro	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Gly	Ser	Phe	Leu	Asn	Gly	Ser	130	135	140	
Cys	Gly	Ser	Val	Gly	Phe	Asn	Ile	Asp	Tyr	Asp	Cys	Val	Ser	Phe	Cys	145	150	155	160
Tyr	Met	His	His	Met	Glu	Leu	Pro	Thr	Gly	Val	His	Ala	Gly	Thr	Asp	165	170	175	
Leu	Glu	Gly	Lys	Phe	Tyr	Gly	Pro	Phe	Val	Asp	Arg	Gln	Thr	Ala	Gln	180	185	190	



---

Ala Ala Gly Thr Asp Thr Thr Ile Thr Leu Asn Val Leu Ala Trp Leu  
195 200 205

Tyr Ala Ala Val Ile Asn Gly Asp Arg Trp Phe Leu Asn Arg Phe Thr  
210 215 220

Thr Thr Leu Asn Asp Phe Asn Leu Val Ala Met Lys Tyr Asn Tyr Glu  
225 230 235 240

Pro Leu Thr Gln Asp His Val Asp Ile Leu Gly Pro Leu Ser Ala Gln  
245 250 255

Thr Gly Ile Ala Val Leu Asp Met Cys Ala Ala Leu Lys Glu Leu Leu  
260 265 270

Gln Asn Gly Met Asn Gly Arg Thr Ile Leu Gly Ser Thr Ile Leu Glu  
275 280 285

Asp Glu Phe Thr Pro Phe Asp Val Val Arg Gln Cys Ser Gly Val Thr  
290 295 300

Phe Gln  
305

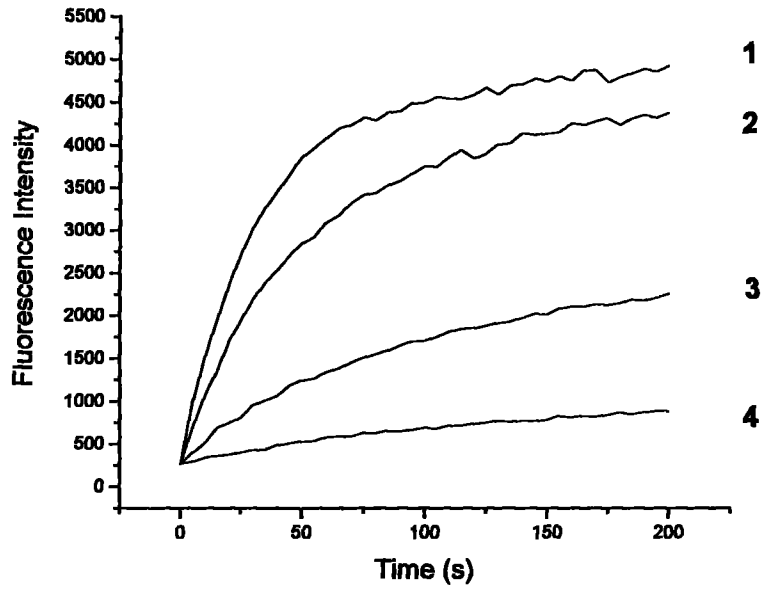


图 1

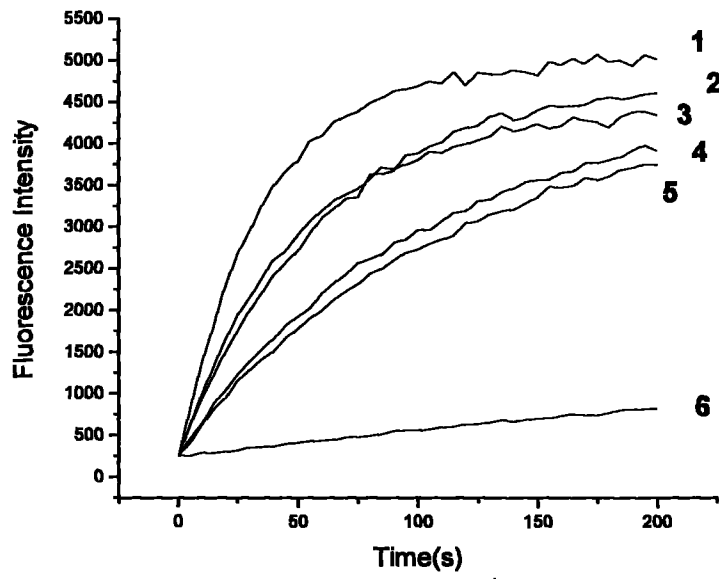


图 2

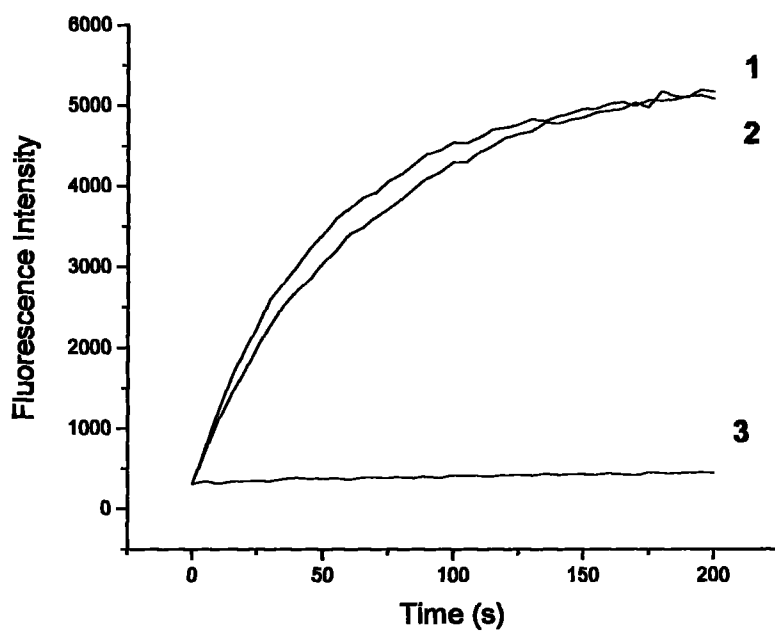


图 3

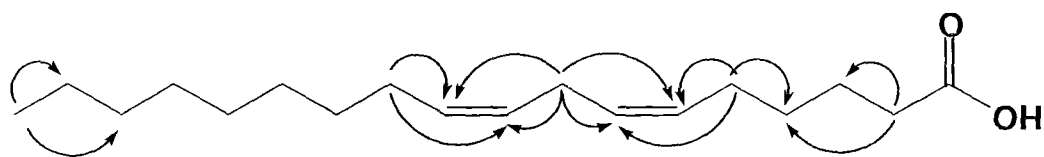


图 4

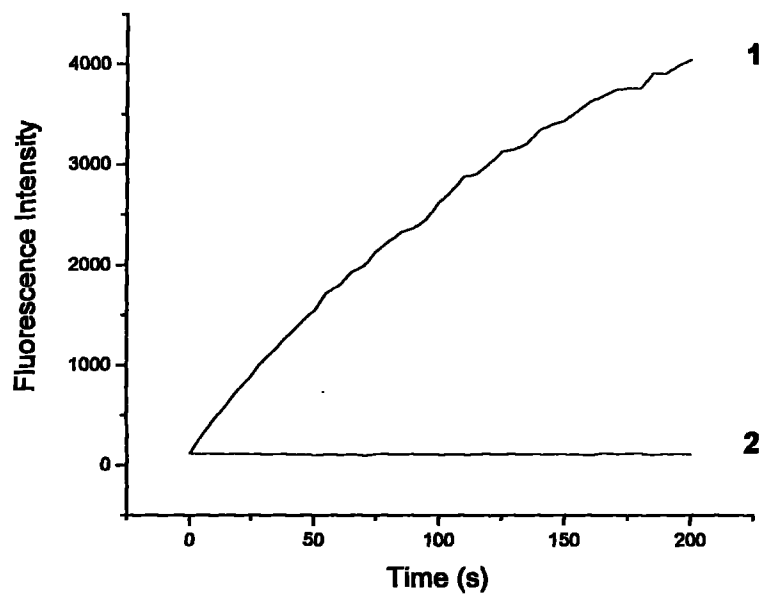


图 5

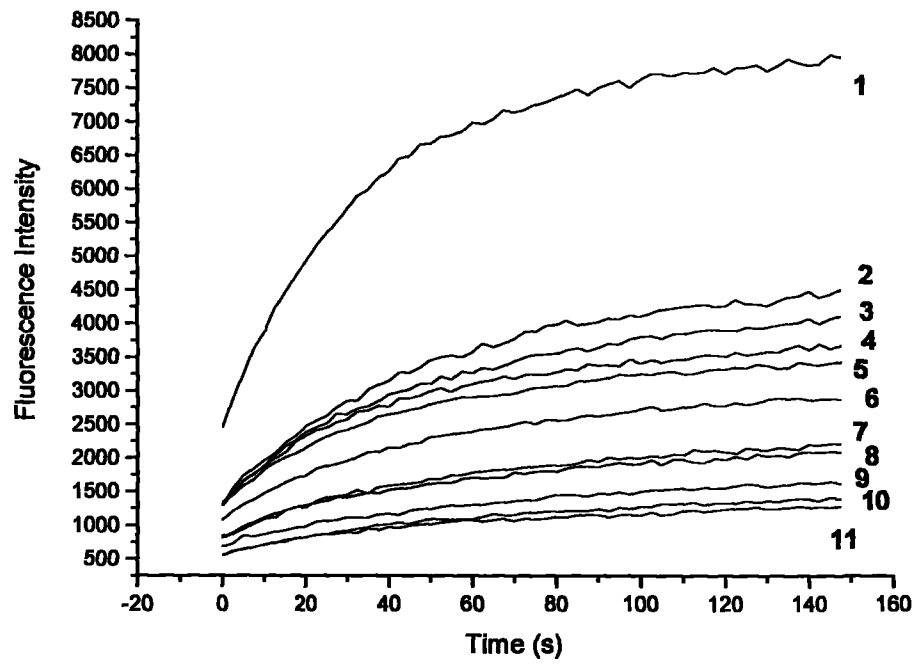


图 6