

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2014 年 4 月 3 日 (03.04.2014)



(10) 国际公布号  
WO 2014/048070 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/352 (2006.01) A61P 39/00 (2006.01)  
A61K 31/7048 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)  
A61P 7/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/001169

(22) 国际申请日: 2013 年 9 月 27 日 (27.09.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201210369803.5 2012 年 9 月 27 日 (27.09.2012) CN

(71) 申请人: 香港科技大学 (THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙清水湾, Hong Kong (CN)。加利福尼亚大学董事会 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) [US/US]; 美国加利福尼亚州奥克兰富兰克林街 1111 号 12 楼, California 94607-5200 (US)。

(72) 发明人: 余辉 (YU, Hui); 中国香港特别行政区九龙清水湾香港科技大学, Hong Kong (CN)。李贻昆 (LEE, Yi Kuen); 中国香港特别行政区九龙清水湾香港科技大学, Hong Kong (CN)。张莉 (ZHANG, Li Wendy); 中国香港特别行政区九龙清水湾香港科技大学, Hong Kong (CN)。郑玉忠 (ZHENG, Yuzhong); 中国香港特别行政区九龙清水湾香港科技大学, Hong Kong (CN)。丁显廷 (DING, Xianting); 美国加利福尼亚州洛杉矶韦斯特伍德广场 420 号加州大学洛杉矶分校工程与应用科学学院 IV, California 90095-1597 (US)。詹华强 (TSIM, Karl Wah-Keung); 中国香港特别行政区九龙

清水湾香港科技大学, Hong Kong (CN)。何志明 (HO, Chih-Ming); 美国加利福尼亚州洛杉矶韦斯特伍德广场 420 号加州大学洛杉矶分校工程与应用科学学院工程学院 IV, California 90095-1597 (US)。

(74) 代理人: 北京天昊联合知识产权代理有限公司 (TEE & HOWE INTELLECTUAL PROPERTY ATTORNEYS); 中国北京市东城区建国门内大街 28 号民生金融中心 D 座 10 层丁业平, Beijing 100005 (CN)。

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

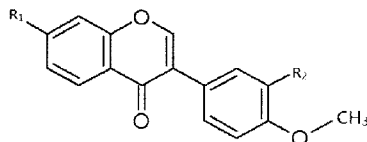
(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI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

本国际公布:

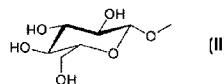
— 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。

(54) Title: COMPOSITION FOR PROMOTING ERYTHROPOIESIS AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 一种用于促进红细胞生成的组合物及其用途



(I)



(II)

(57) Abstract: The present invention provides a composition for promoting erythropoiesis and uses thereof. The composition comprises two or more flavonoid compounds as active ingredients. The flavonoid compound is represented by formula I. R<sub>1</sub> is hydroxy or (II); R<sub>2</sub> is H or hydroxy. In preparing the composition, the flavonoid compound is used in a purified form. The composition of the invention has good synergistic effects on enhancing the transcriptional activity of HRE to promote erythropoiesis and preventing and treating anemia and/or anoxia, significantly reducing the amount of each component, and has low prices and toxic side effects.

(57) 摘要: 本发明提供了一种用于促进红细胞生成的组合物及其用途。本发组合物含有两种以上的作为活性成分的类黄酮化合物; 其中所述的类黄酮化合物由下式 I 所示。其中, R<sub>1</sub> 为羟基或 (II); R<sub>2</sub> 为 H 或羟基; 并且在制备所述的组合物时, 所述的类黄酮化合物是以纯化的形式使用的。本发明的组合物对增强 HRE 的转录活性、从而促进红细胞生成、以及预防和治疗贫血和/或缺氧症具有良好的协同效果, 显著地降低了各组分的用量, 价格低廉且毒副作用小。

WO 2014/048070 A1

## 一种用于促进红细胞生成的组合物及其用途

5           本申请要求于 2012 年 9 月 27 日提交的中国发明专利申请  
201210369803.5 的优先权。

### 技术领域

10           本发明属于制药领域，具体而言，涉及一种用于促进红细胞生成、  
以及预防和治疗贫血和/或缺氧症的药物组合物或膳食补充用组合物  
及其用途。

### 背景技术

15           红细胞主要在人体的骨髓（bone marrow）（特别是红骨髓）内  
生成，骨髓中的干细胞先分化为红细胞原祖细胞，在促红细胞生成素  
（erythropoietin，也称为红细胞生成素）的作用下形成成熟的红细胞。  
人体中的促红细胞生成素是由肾脏和肝脏分泌的一种激素样物质。

20           贫血是指人体外周血中红细胞容积的减少，低于正常范围下限的  
一种常见的临床症状。贫血包括化疗诱导性贫血（CIA）和肾性贫血  
等。其中，在化疗诱导性贫血中，化疗药物在杀灭大量癌细胞的同时，  
也杀伤了正常组织细胞而引起不同程度的骨髓抑制作用，因此化疗药  
物是通过抑制骨髓造血细胞而引起贫血。超过 60% 的癌症病人接受化  
疗后都患有贫血，严重地降低了病人的机体功能和生活质量。大多数  
化疗药物会引起胃部不适，造成病人呕吐和恶心，严重影响食欲并导  
25           致病人体重减轻，原因之一就是化疗诱导性贫血(CIA)。肾性贫血是  
指各种因素造成肾脏促红细胞生成素产生不足或尿毒症血浆中一些  
毒素物质干扰红细胞的生成和代谢而导致的贫血，是慢性肾功能不全  
发展到终末期常见的并发症。病人体内红细胞生成减少、红细胞寿命  
缩短以及红细胞丢失增加，影响病人的血液代谢循环。通常治疗化疗  
30           诱导性贫血和肾性贫血的方法为输血和透析，但是输血可能会带来严

重的临床或亚临床副作用，病人在接受治疗的过程中也会遭受极大的痛苦。

缺氧（hypoxia，或称为缺氧症）是指因组织的氧气供应不足或用氧障碍，而导致组织的代谢、功能和形态结构发生异常变化的病理过程。缺氧症一般表现为：头晕、头痛、耳鸣、眼花、四肢软弱无力；或者产生恶心、呕吐、心慌、气短、呼吸急促、心跳快速无力。红细胞是脊椎动物体内通过血液运送氧气的最主要的媒介，因此增加机体内红细胞的量可以有效改善缺氧状态（参见参考文献：“促红素治疗新生儿缺氧缺血性脑病疗效分析，郭志梅等，临床军医杂志，2008，5”及“EPO对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤NSE表达的影响，刘青，曾志等，暨南大学学报：自然科学与医学版，2011，6”）。

当前临床治疗化疗诱导性贫血和肾性贫血以及缺氧症最有效的药物为红细胞生成刺激物（ESAs），主要为人工重组促红细胞生成素（recombinant EPO, rHuEPO），促红细胞生成素（EPO）是哺乳动物调节红细胞生成的主要调控因子，主要由肾脏和肝脏产生，在缺氧状态下如果无法提升血液中的EPO含量将会导致贫血的发生。EPO的合成表达主要受缺氧诱导因子（HIF）的调控，HIF对于红细胞生成、血管再生、细胞代谢等多种过程都具有调节作用。在缺氧环境下，HIF选择性地结合到EPO基因的低氧响应元件（HRE）上，进而引发EPO基因的转录表达。有关可参见参考文献：“Flavonoids from radix astragali induce the expression of erythropoietin in cultured cells: a signaling mediated via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , Ken Y.Z. Zheng et al, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59, 1697-1704”。

ESAs治疗化疗诱导性贫血和肾性贫血主要通过皮下注射EPO来增加病人的红细胞水平，可以有效减少病人的输血次数。许多临床试验表明皮下注射剂量为5000 IU/天的人工重组促红细胞生成素可以有效的增加红细胞水平并减少病人的输血次数。目前市面上有多种基于EPO的药物，美国Amgen公司(位于美国加州Thousand Oaks市)拥有多项关于EPO的专利，其产品之一Epogen<sup>®</sup> (epoetin alfa)是目前被最

广泛使用的 EPO 药物。但是 EPO 的应用面临着费用高昂以及严重副作用的问题，如心脏疾病、血块形成、高血压、过敏反应等。美国食品药品监督管理局(FDA)多次发布关于控制 ESAs 剂量使用的报告来提高 EASs 使用的安全性。因此开发一种价格低廉、毒副作用小的药物，对于减轻癌症病人和肾病病人的痛苦具有非常重要的意义。

中药应用在贫血治疗上有悠久的历史，作为纯天然植物药物，中药补血配方通常无毒副作用，可以长期服用。在用于贫血治疗的中药补血配方，经常使用黄芪作为主要成分进行配制。黄芪的药用迄今已有 2000 多年的历史，具有补气生血的功效。黄芪含皂甙、蔗糖、多糖、多种氨基酸、叶酸及硒、锌、铜等多种微量元素，具有许多生物学和医学功效，如保肝、生血、抗氧化、抗高血压、增强免疫等。但是由于中药的成分复杂，通常有几十种甚至上百种的化合物组成，难以对其进行药理学研究和优化。中药的药材质量控制也是尤其重要，产地、气候、年份等因素都能影响中药材的质量，从而影响药物的有效性和稳定性。尽管在国内市面上有许多治疗贫血的中药药品，但是其治疗效果也是良莠不齐，因此对中药进行优化，解决质量控制等难题对于中药的开发和推广具有重要的意义。

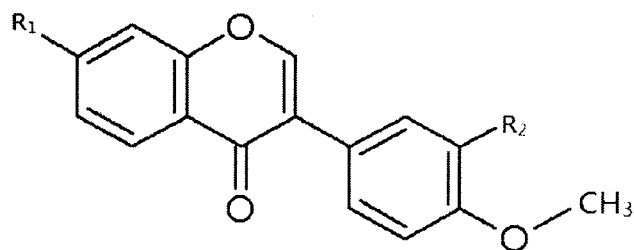
最近的研究表明，黄芪中的类黄酮成分能够有效刺激肾细胞中促红细胞生成素的表达，从而提高血液中的红细胞水平来改善和治疗贫血。其中主要的四种具有促进促红细胞生成素表达的类黄酮化合物为刺芒柄花素、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷。最近的研究表明，几种从黄芪中分离的类黄酮化合物在单独使用时可以增强细胞低氧反应元件（HRE）的转录活性，从而促进促红细胞生成素的表达来提高血液中的红细胞水平（参见参考文献：“Flavonoids from radix astragali induce the expression of erythropoietin in cultured cells: a signaling mediated via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , Ken Y.Z. Zheng et al, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59, 1697-1704”）。但是目前的各类黄酮化合物在单独使用时存在药效有限且使用剂量较大的缺陷。

## 发明内容

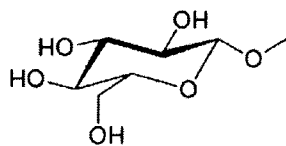
为解决上述现有技术中存在的问题，本发明提供了一种用于促进红细胞生成的组合物及其用途。

具体而言，本发明提供：

- 5 (1) 一种用于促进红细胞生成的组合物，其含有两种以上的作为活性成分的类黄酮化合物；其中所述的类黄酮化合物由下式 I 所示：



式 I,



10 其中， $R_1$  为羟基或

$R_2$  为 H 或羟基；

并且在制备所述的组合物时，所述的类黄酮化合物是以纯化的形式使用的。

- 15 (2) 根据 (1) 所述的组合物，其中，所述的组合物包含毛蕊异黄酮以及选自刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷中的至少一种。

(3) 根据 (2) 所述的组合物，其中，所述的组合物包含毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷。

(4) 根据 (3) 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷的摩尔比为 (0.016-2) : (0.016-2)。

- 20 (5) 根据 (4) 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷的摩尔比为 1:1。

(6) 根据 (2) 所述的组合物，其中，所述的组合物包含毛蕊异黄酮和芒柄花苷。

- 25 (7) 根据 (6) 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮和芒柄花苷的摩尔比为 (0.016-2) : (0.016-2)。

(8) 根据(7)所述的组合物, 其中, 所述的毛蕊异黄酮和芒柄花苷的摩尔比为 1:1。

(9) 根据(2)所述的组合物, 其中, 所述的组合物包含毛蕊异黄酮、刺芒柄花素和芒柄花苷。

5 (10) 根据(9)所述的组合物, 其中, 所述的毛蕊异黄酮、刺芒柄花素和芒柄花苷的摩尔比为 (4-6) : (0.5-1.5) : (20-30)。

(11) 根据(10)所述的组合物, 其中, 所述的毛蕊异黄酮、刺芒柄花素和芒柄花苷的摩尔比为 5:1:25。

10 (12) 根据(2)所述的组合物, 其中, 所述的组合物包含毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷。

(13) 根据(12)所述的组合物, 其中, 所述的毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷的摩尔比为 (4-6):(0.5-1.5):(0.5-1.5):(0.5-1.5)。

15 (14) 根据(13)所述的组合物, 其中, 所述的毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷的摩尔比为 5:1:1:1。

(15) 根据(1) - (14) 中任意一项所述的组合物, 其中, 所述的组合物为药物组合物或膳食补充用组合物, 并包含药用辅料。

(16) 根据(15)所述的组合物, 其中, 所述的组合物的剂型为口服液。

20 (17) 根据(1) - (16) 中任意一项所述的组合物在制备用于促进红细胞生成的药物或膳食补充剂中的用途。

(18) 根据(17)所述的用途, 其中, 所述的药物或膳食补充剂用于预防 and/或治疗缺氧症和/或贫血。

25 本发明的组合物与现有技术相比具有以下优点和积极效果:

本发明的组合物对增强HRE的转录活性、从而促进红细胞生成、以及预防和治疗贫血和/或缺氧症具有良好的协同效果, 并且显著地降低了各活性组分的用量, 价格低廉且毒副作用小。例如, 在本发明的一个优选的组合物中, 甚至能增加约3倍的HRE转录活性。HRE转录活性的增强能够直接刺激EPO的表达, 从而达到促进红细胞生成、

30

以及预防并治疗贫血和缺氧症的目的。相比各活性组分单独作用和黄芪水提液的作用效果，本发明的组合物能够提升其2倍的药效，并且所需剂量可低至约 $0.6\mu\text{M}$ ，不到先前的1/10。

## 5 附图说明

图 1 为比较例 1 中的黄芪水提液成分作用于 pHRE-Luc 转染的 HEK 293T 肾细胞时，对 HRE 转录活性的影响的示意图；

图 2 为比较例 2 中的 4 种化合物单独作用于 pHRE-Luc 转染的 HEK 293T 肾细胞时，对 HRE 转录活性的影响的示意图；

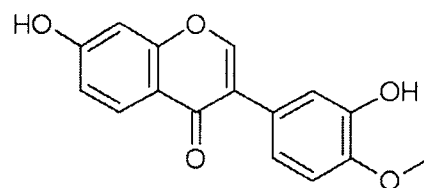
10 图 3 为试验例 1 中的 pHRE-Luc 载体的图谱示意图。

## 具体实施方式

以下通过具体实施方式的描述并参照附图对本发明作进一步说明，但这并非是对本发明的限制，本领域技术人员根据本发明的基本思想，可以做出各种修改或改进，但是只要不脱离本发明的基本思想，均在本发明的范围之内。

本文中所述的治疗是指为使有生命的人体或者动物体恢复或获得健康或减少痛苦，进行阻断、缓解（或改善）或者消除病因或病灶的过程。

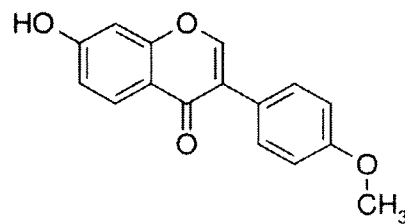
20 本文中所述的毛蕊异黄酮的英文名称为 Calycosin 或 7,3'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone；分子式为  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ；分子量为 284.26348；毛蕊异黄酮的化学式如下化学式 II 所示：



化学式II

25 目前毛蕊异黄酮已知的药理作用如下：（1）提高免疫功能；（2）增强抗氧化、抗辐射和抗癌作用；（3）保护心脑血管、肝脏、肾脏和肺脏作用；（4）保护脑细胞、提高记忆力；（5）抗菌及抑制病毒作用；（6）降血脂、降血糖、减少糖尿病并发症等。

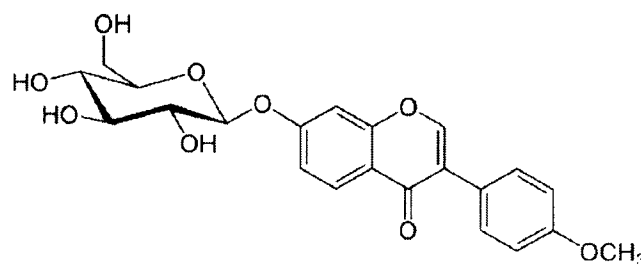
本文中所述的刺芒柄花素也称为 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮、芒柄花黄素；英文名称为 Formononetin、7-Hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)chromone、7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavone、或 Dadein 4'-methyl ether；CAS 编号为 485-72-3；分子式为  $C_{16}H_{12}O_4$ ；分子量为 268.26；刺芒柄花素的化学式如下化学式 III 所示：



化学式III

刺芒柄花素易溶于甲醇、乙酸乙酯、乙醚、稀碱溶液，难溶于水。可以从植物中提取刺芒柄花素，也可通过化学方法合成。例如，合成方法可参见参考文献：“J.Agric.Food Chem.. EN;9.1994,42,1869-1871”。目前刺芒柄花素已知的药理作用如下：（1）抗癌作用：可防治乳腺癌、前列腺癌以及结肠癌；（2）雌激素作用：能增加小鼠等动物子宫的重量，但雌激素作用是很弱的，作用不及同类的异黄酮染料木素(金雀异黄素)、大豆黄素；（3）对 Triton WR-1339 引起的雄性白化病大鼠高血脂有降血脂作用；（4）临床用作利尿剂。

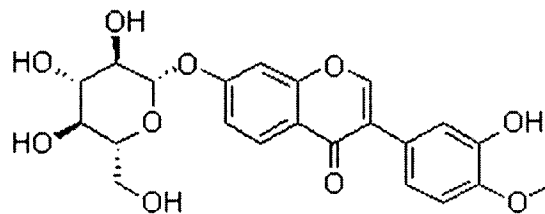
本文中所述的芒柄花苷也称为刺芒柄花素-7-葡萄糖甙；英文名称为 Ononin、或 Formononetin-7-O-beta-D-glucopyranoside；CAS 号为 486-62-4；分子式为  $C_{22}H_{22}O_9$ ；分子量为 430.40；芒柄花苷的化学式如下化学式 IV 所示：



化学式IV

本文中所述的毛蕊异黄酮苷也称为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮-7-O-β-D 葡萄糖苷；英文名为 Calycosin-7-glucoside、

Calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucoside、3',7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavone-7-beta-D-glucopyranoside、Calycosin 7-O-beta-D-glucoside、Calycosin 7-beta-D-glucopyranoside、或 Calycosin-7-O-beta-D-glucopyranoside；  
分子量为 446.40；CAS 号为 20633-67-4，毛蕊异黄酮苷的化学式如下化学式 V 所示：

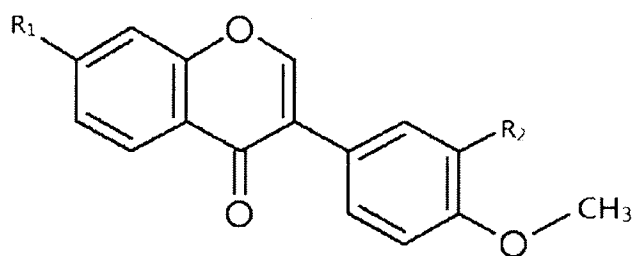


化学式 V

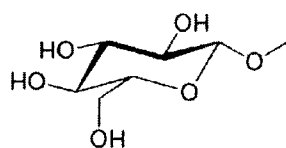
本发明的目的在于提供一种含有类黄酮化合物的组合物及其用途。

本发明人通过实验发现：当将毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷中的两种或多种进行组合时，所得到的组合物的各组分显示出了出人意料的协同作用，所得到的组合物在提高血液中的红细胞水平方面的效果优于各组分单独使用的效果。在此发现的基础上，本发明人进一步得到了本发明的技术方案。

具体而言，本发明提供了一种用于促进红细胞生成的组合物，其含有两种以上的作为活性成分的种类黄酮化合物；其中所述的类黄酮化合物由下式 I 所示：



式 I,



其中， $R_1$  为羟基或

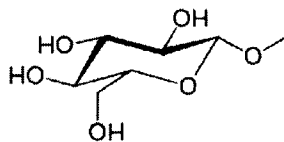
$R_2$  为 H 或羟基；

并且在制备所述的组合物时,所述的类黄酮化合物是以纯化的形式使用的。

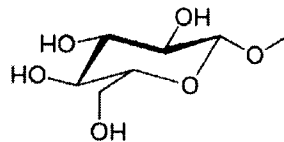
所述的类黄酮化合物的纯化形式可商购得到(例如可得自四川维克奇生物技术有限公司),也可使用本领域已知的纯化方法进行制备。

5 其中,特别说明的是,式 I 中,当  $R_1$  为羟基,  $R_2$  为 H 时,所述的类黄酮化合物为刺芒柄花素;

式 I 中,当  $R_1$  为羟基,  $R_2$  为羟基时,所述的类黄酮化合物为毛蕊异黄酮;



10 式 I 中,当  $R_1$  为 ,  $R_2$  为 H 时,所述的类黄酮化合物为芒柄花苷;



式 I 中,当  $R_1$  为 ,  $R_2$  为羟基时,所述的类黄酮化合物为毛蕊异黄酮苷。

在本发明的组合物中,毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷的使用浓度可以分别为 0.016-10  $\mu$ M。

15 优选的是,本发明的组合物包含毛蕊异黄酮、以及选自刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷中的至少一种。

优选的是,本发明的组合物包含毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷。更优选的是,所述的毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷的摩尔比为 (0.016-2):(0.016-2),更优选为 1:1。

20 优选的是,本发明的组合物包含毛蕊异黄酮和芒柄花苷。更优选的是,所述的毛蕊异黄酮和芒柄花苷的摩尔比为 (0.016-2):(0.016-2),更优选为 1:1。

25 优选的是,本发明的组合物包含毛蕊异黄酮、刺芒柄花素和芒柄花苷。更优选的是,所述的毛蕊异黄酮、刺芒柄花素和芒柄花苷的摩尔比为 (4-6):(0.5-1.5):(20-30),更优选为 5:1:25。

优选的是,本发明的组合物包含毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷。更优选的是,所述的毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、

芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷的摩尔比为 (4-6) : (0.5-1.5) : (0.5-1.5) : (0.5-1.5)，更优选为 5:1:1:1。

优选的是，本发明的组合物中还可包含其它活性成分，如，维生素 C。

5 优选的是，本发明的组合物为药物组合物或膳食补充用组合物，并包含药用辅料。

本领域技术人员可以根据需要对药用辅料的种类和用量进行选择，以制成所需的药物或膳食补充剂。本发明的组合物中可采用本领域公知的药用辅料，包括但不限于（例如）参考文献：“《药剂学》  
10 （第四版），毕殿洲主编，人民卫生出版社 2001 年出版”中所披露的药用辅料。

所述的药用辅料包括本领域已知的可药用载体，例如聚乙二醇类、聚维酮类、表面活性剂类（如泊洛沙姆 188）、有机酸类（如酒石酸、琥珀酸等）、糖类（如右旋糖、半乳糖、蔗糖等）与醇类（甘露醇、山梨醇、木糖醇等）、纤维素（如乙基纤维素、羧甲基纤维素等）、聚丙烯酸树脂类等。  
15

本发明的组合物可以口服或者非口服的形式施用。本领域技术人员能够理解的是，施用量根据年龄、体重、症状、治疗效果、施用方法、处理时间等而不同。口服施用时可采用固体、液体等形式，非口服施用时可采用注射剂等形式。  
20

用于口服的固体形式可包括片剂、丸剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂等，本领域技术人员可以根据需要选择采用下述辅料进行制备：填充剂（如淀粉、糊精、乳糖、甘露醇、微晶纤维素等）、吸收剂（如硫酸钙、磷酸氢钙等）、湿润剂（如水、乙醇等）、粘合剂（如羟甲基纤维素、聚维酮、淀粉浆等）、崩解剂（如交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮等）、润滑剂（如硬脂酸、滑石粉、聚乙二醇、微粉硅胶等）、矫味剂（如甜味剂（如蔗糖、甜菊甙、阿斯帕坦等）、芳香剂（如香料和香精等）等）、着色剂（如甜菜红、焦糖、柠檬黄等）等。  
25

用于口服的液体形式（口服液）包括溶液剂、乳剂、混悬剂、糖浆剂等，本领域技术人员可以根据需要选择采用下述辅料进行制备：  
30

溶剂（如水、甘油、二甲基亚砷（DMSO）、乙醇、丙二醇、聚乙二醇、脂肪油、液体石蜡、醋酸乙酯等）、矫味剂（如甜味剂（如蔗糖、甜菊甙、阿斯帕坦等）、芳香剂（如香料和香精）等）、着色剂（如甜菜红、焦糖、柠檬黄等）、防腐剂（尼泊金类、苯甲酸与苯甲酸钠、山梨酸等）、润湿剂（如聚山梨酯类、聚氧乙烯脂肪醇醚类等）、助悬剂（如甘油、胶树类、纤维素类、硅藻土等）、乳化剂（如表面活性剂类等）等。

优选的是，本发明的组合物的剂型为口服液。

本发明还提供了上述任意一项所述的组合物在制备用于促进红细胞生成的药物或膳食补充剂中的用途。优选的是，所述的药物或膳食补充剂用于改善和/或治疗缺氧症和/或贫血（更优选为化疗诱导性贫血和肾性贫血）。

以下通过例子的方式进一步解释或说明本发明内容，但这些例子不应被理解为对本发明保护范围的限制。

在以下例子中，毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷、毛蕊异黄酮苷均可购自四川维克奇生物技术有限公司。

#### 试验例 1：构建 EPO 表达调控的离体研究模型

本试验例采用的是转染了 pHRE-Luc 载体的 HEK293T 细胞作为 EPO 表达调控的离体研究模型。转染了 pHRE-Luc 载体的 HEK293T 细胞的构建过程可参见参考文献：“Flavonoids from radix astragali induce the expression of erythropoietin in cultured cells: a signaling mediated via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ”, Ken Y.Z. Zheng et al, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59, 1697-1704”，具体如下：

从美国标准生物品收藏中心（American Type Culture Collection（ATCC），位于美国维吉尼亚州 Manassas 市）获得人胚肾细胞 (HEK)293T 细胞系，将上述细胞加入至细胞培养液（含有 10%（v/v）的胎牛血清（FBS）、100 U/ml 的青霉素以及 100 U/ml 的链霉素的

DMEM 培养基) 中, 放入 37℃ 恒温培养箱, 控制二氧化碳浓度在 5% (v/v), 培养 24 小时。

人类促红细胞生成素 (EPO) 基因中获取的缺氧反应元件(HRE) (5'-TCG AGG CCC TAC GTG CTG TCT CAC ACA GCC TGT CTG ACG-3') 含有高度保守的缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 结合靶点 (5'-TAC GTG-3')。将6个HRE序列合成并从头到尾串联克隆到pBI-GL载体 (可得自位于美国San Jose市的BD Biosciences Clontech公司) 中 (具体步骤可参照以下文献: "Generation of bidirectional hypoxia/HIF-responsive expression vectors to target gene expression to hypoxic cells. Post, D.E., and Van-Meir, E.G., 2001. Gene Therapy 8, 1801-1807"), 从而得到pHRE-Luc载体 (参见图3), 其中所述的pBI-GL载体本身具有一个报告基因: 萤火虫荧光素酶基因 (firefly luciferase gene)。通过磷酸钙细胞转染技术, 将该pHRE-Luc转染到培养的 HEK293T 细胞中 (具体步骤可参照以下文献: "Regulation of a transcript encoding the proline-rich membrane anchor of globular muscle acetylcholinesterase: the suppressive roles of myogenesis and innervating nerves. Xie, H.Q., et al., 2007. Journal of Biological Chemistry, 282, 11765-11775." ), 转染效率高于80%。

## 实施例1

将毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷分别用 DMSO 溶解, 配制成各自的 DMSO 母液 (每种 DMSO 母液可分别为 3 种浓度: 50μM、500μM、5mM, 用来配制不同的终浓度, 以提高实验精度)。针对表1所示的每种本发明组合物, 按照其组分及终浓度, 计算并量取所需体积的 DMSO 母液, 合并、并用试验例1所述的细胞培养液稀释至300微升, 用于下述3次平行实验。将所得的组合物溶液作用于试验例1构建的转染后的 HEK293T 细胞上后, 测量所引起的荧光素酶活性变化, 具体步骤如下:

将转染后的 HEK293T 细胞种于24孔培养板, 每个孔中细胞数为3万个, 细胞培养液体积为500微升, 于一天后吸走原有的细胞培养液,

加入400微升新鲜的细胞培养液，3小时后再加入上述含有本发明组合物的细胞培养液100微升，从而每孔总体积为500微升，并且每种组合物中的各组分在该500微升细胞培养液中的浓度为表1所示的终浓度。每种组合物重复3次。施加本发明组合物两天后，将细胞裂解，每个孔中加入300微升的裂解试剂（裂解试剂是含有0.2%Triton X-100和1mM二硫苏糖醇和100mM磷酸钾的缓冲液（pH7.8）），振摇十分钟后收集细胞溶解液，溶解液用离心机离心10分钟，转速为13,500rpm，收集上清液测量其荧光强度，细胞裂解液中荧光素酶活性变化由FLUOstar OPTIMA（可得自位于德国Ortenberg市的BMG Labtech公司）测定，其荧光强度由蛋白含量进行内标，蛋白含量由Bradford方法测得，所用试剂盒可得自位于美国加利福尼亚州Hercules市的Bio-Rad Laboratories公司，该测量数值可反映药物作用对HRE的转录活性的影响。其中对照组为不添加任何药物的细胞响应，采用((实验组的荧光强度-对照组的荧光强度)/对照组的荧光强度)×100%来评价药物的作用效果。

具体结果参见表1。

表1 本发明组合物对HRE的转录活性的影响

| 编号 | 组合物中各组分的终浓度 (μM) |       |       |        | pHRE-Luc<br>活性值 (%) |
|----|------------------|-------|-------|--------|---------------------|
|    | 毛蕊异黄酮            | 刺芒柄花素 | 芒柄花苷  | 毛蕊异黄酮苷 |                     |
| 1  | 2                | 2     | 0     | 0      | 63.1±4.34           |
| 2  | 0.4              | 0     | 0.4   | 0      | 41.6±1.02           |
| 3  | 2                | 0     | 2     | 0      | 91.1±8.45           |
| 4  | 0.08             | 0     | 0     | 0.08   | 26.4±11.29          |
| 5  | 0.4              | 0     | 0     | 0.4    | 56.2±17.46          |
| 6  | 2                | 0     | 0     | 2      | 129.4±15.14         |
| 7  | 0.4              | 0     | 0.016 | 10     | 243.9±55.52         |
| 8  | 0.4              | 0     | 0.08  | 2      | 100.2±31.49         |
| 9  | 10               | 0     | 0.016 | 0.016  | 104.8±18.71         |
| 10 | 0.08             | 0.4   | 0     | 0.4    | 74.4±1.87           |
| 11 | 0.4              | 0.08  | 0     | 0.08   | 77.1±8.16           |

|    |       |       |       |       |             |
|----|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 12 | 0.4   | 0.08  | 0     | 10    | 262.9±49.33 |
| 13 | 0.08  | 0.016 | 0.4   | 0     | 214.8±40.05 |
| 14 | 0.4   | 10    | 0.08  | 0     | 121.1±28.36 |
| 15 | 2     | 0.016 | 0.4   | 0     | 189.6±34.98 |
| 16 | 0.4   | 0.08  | 0.08  | 0.08  | 333.4±20.03 |
| 17 | 0.08  | 0.08  | 0.08  | 0.016 | 126.2±50.24 |
| 18 | 10    | 10    | 0.08  | 0.4   | 236.2±37.68 |
| 19 | 2     | 0.08  | 2     | 10    | 141.4±44.82 |
| 20 | 0.4   | 10    | 0.08  | 2     | 132.2±61.10 |
| 21 | 0.4   | 0.016 | 10    | 0.4   | 141.1±63.32 |
| 22 | 10    | 0.016 | 0.4   | 0.08  | 196.0±50.63 |
| 23 | 0.4   | 0.4   | 0.08  | 2     | 174.9±50.46 |
| 24 | 0.4   | 0.08  | 0.08  | 10    | 232.8±38.28 |
| 25 | 0.08  | 0.016 | 2     | 0.4   | 38.9±10.48  |
| 26 | 0.4   | 0.016 | 0.08  | 0.4   | 40.4±18.15  |
| 27 | 0     | 0.08  | 0.4   | 2     | 146.6±14.52 |
| 28 | 2     | 0.08  | 0.4   | 0.016 | 143.2±30.45 |
| 29 | 0.4   | 10    | 0.016 | 0.016 | 192.9±14.14 |
| 30 | 0.08  | 0.08  | 0.4   | 0     | 74.7±11.49  |
| 31 | 0.016 | 0.016 | 0.4   | 0.08  | 103.1±4.56  |
| 32 | 10    | 10    | 10    | 0.4   | 108.1±10.28 |
| 33 | 0.016 | 0.4   | 0.08  | 10    | 92.4±53.66  |
| 34 | 2     | 0     | 2     | 0.08  | 86.9±31.50  |
| 35 | 10    | 0     | 0     | 10    | 216.2±46.98 |
| 36 | 0.08  | 10    | 0.08  | 2     | 266.2±83.82 |
| 37 | 0.4   | 0.08  | 0.016 | 0.016 | 69.9±10.68  |
| 38 | 0.4   | 0.016 | 0.08  | 2     | 153.7±4.95  |
| 39 | 0.4   | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 79.6±15.55  |
| 40 | 0.4   | 2     | 0.08  | 0.4   | 115.7±21.49 |

|    |       |       |       |       |             |
|----|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 41 | 0.4   | 0.4   | 0.08  | 10    | 159.8±2.22  |
| 42 | 0.016 | 0.08  | 0.4   | 2     | 106.8±2.58  |
| 43 | 0.4   | 0.08  | 0.4   | 0.016 | 84.8±24.49  |
| 44 | 0.4   | 10    | 0.016 | 0.4   | 184.3±12.51 |
| 45 | 0.4   | 10    | 0.016 | 0.08  | 207.3±43.85 |
| 46 | 2     | 0.08  | 0.016 | 10    | 166.7±34.33 |
| 47 | 10    | 0.016 | 0.016 | 0.08  | 200.6±47.35 |
| 48 | 0.08  | 0.016 | 0.4   | 0.016 | 107.0±44.09 |
| 49 | 0.4   | 10    | 0.016 | 0.4   | 141.3±33.43 |
| 50 | 0.4   | 0.016 | 10    | 10    | 178.7±21.28 |
| 51 | 0.08  | 10    | 0.08  | 0.4   | 115.8±32.33 |
| 52 | 0.4   | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 84.2±6.05   |
| 53 | 0.4   | 0.08  | 0.08  | 0.08  | 61.7±5.80   |
| 54 | 2     | 0.08  | 2     | 2     | 187.4±11.40 |
| 55 | 2     | 0.016 | 0.08  | 0.08  | 128.8±31.32 |
| 56 | 2     | 0.016 | 0.4   | 0.08  | 168.1±37.74 |
| 57 | 0.4   | 0.4   | 2     | 2     | 171.7±8.75  |
| 58 | 0     | 0.08  | 0.4   | 0.08  | 24.6±13.56  |
| 59 | 2     | 0.08  | 2     | 0.016 | 97.2±19.15  |
| 60 | 0.4   | 2     | 0.016 | 0.4   | 67.9±6.46   |
| 61 | 0.4   | 2     | 0.016 | 0.4   | 86.9±15.39  |
| 62 | 2     | 0.08  | 0.4   | 0.4   | 72.7±31.66  |
| 63 | 0.016 | 2     | 0.08  | 0.08  | 66.9±33.31  |
| 64 | 0.4   | 2     | 0.016 | 2     | 167.7±33.41 |
| 65 | 0.4   | 2     | 0.08  | 0.4   | 128.9±15.47 |
| 66 | 2     | 0.016 | 0.08  | 2     | 182.6±10.92 |

在上表中，浓度为0表示的是在该组合物中不含有相应的化合物。

从表1可以看出，本发明组合物能够有效地提高HRE转录活性。

更进一步而言，由毛蕊异黄酮以及刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷中的至少一种组成的组合物能够有效的提高HRE转录活性。

其中，由毛蕊异黄酮和芒柄花苷组成的组合物（摩尔比1:1），以及由毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷组成的组合物（摩尔比1:1），最高均能够提高约一倍的HRE转录活性。

此外，由毛蕊异黄酮以及刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷中的两种组成的组合物最高均能够提高约两倍的HRE转录活性。特别是，由0.08 $\mu$ M毛蕊异黄酮以及0.016 $\mu$ M刺芒柄花素和0.4 $\mu$ M芒柄花苷组成的组合物（摩尔比为5:1:25），可以提高215%的HRE转录活性，并且摩尔浓度总和仅为约0.6 $\mu$ M。

此外，由毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷组成的组合物能够提高约1~3倍的HRE转录活性。特别是，由0.4 $\mu$ M毛蕊异黄酮、0.08 $\mu$ M刺芒柄花素、0.08 $\mu$ M芒柄花苷和0.08 $\mu$ M毛蕊异黄酮苷组成的组合物（摩尔比为5:1:1:1），可以提高333%的HRE转录活性，并且摩尔浓度总和仅为约0.6 $\mu$ M。

#### 比较例1

配制黄芪水提液的母液：将黄芪与水按重量比1:8进行混合，煎煮两次，每次煎煮2小时，合并两次所得的水煎液，将得到的水提液干燥得到粉末状固体，使用时将该粉末按照相应浓度溶解于试验例1所述的细胞培养液中。根据与实施例1相同的方法测量所引起的荧光素酶活性变化。其中终浓度分别为：0.01、0.1、0.3、0.5、1、1.5、10 mg/ml。具体结果参见图1。从图1可以看出，为了取得较好的提高HRE转录活性的效果，所需采用的黄芪水提液成分的有效浓度偏高，基本为1~10 mg/mL（其中，当黄芪水提液成分的终浓度为10mg/mL时，可测得其中含有毛蕊异黄酮约6.9 $\mu$ M、刺芒柄花素约5.6 $\mu$ M、芒柄花苷约1.6 $\mu$ M和毛蕊异黄酮苷约5.13 $\mu$ M，总和为约19 $\mu$ M），并且在此高浓度下，所提高的HRE转录活性也有限，最高才能提高约80%的HRE转录活性。

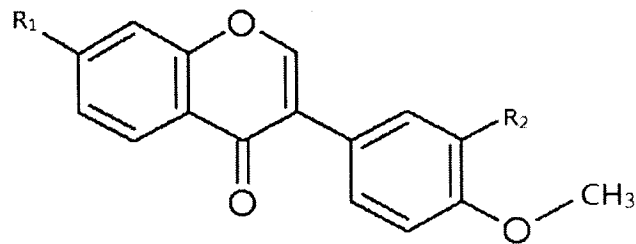
## 比较例2

配制毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷的DMSO母液，使用时将所得母液按照相应浓度溶解于试验例1所述的细胞培养液中，根据与实施例1相同的方法测量所引起的荧光素酶活性变化。其中终浓度分别为：0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 $\mu$ M。具体结果参见图2。从图2可以看出，各组分单独使用时，为了取得较好的提高HRE转录活性的效果，所需采用的有效终浓度偏高，基本为1~30 $\mu$ M，并且在此高浓度下，所提高的HRE转录活性也有限，最高才能提高约80%的HRE转录活性。在低于1 $\mu$ M的浓度下，所提高的HRE转录活性普遍偏低。

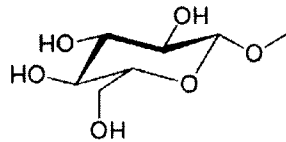
综上所述，由上述实施例和比较例的结果可以看出，本发明的组合物对增强HRE的转录活性、从而促进红细胞生成、以及预防和治疗贫血和/或缺氧症具有良好的协同效果，并且显著地降低了各活性组分的用量。

# 权利要求书

1. 一种用于促进红细胞生成的组合物，其含有两种以上的作为活性成分的类黄酮化合物；其中所述的类黄酮化合物由下式 I 所示：



式 I,



其中， $R_1$  为羟基或

$R_2$  为 H 或羟基；

并且在制备所述的组合物时，所述的类黄酮化合物是以纯化的形式使用的。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中，所述的组合物包含毛蕊异黄酮以及选自刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷中的至少一种。

3. 根据权利要求 2 所述的组合物，其中，所述的组合物包含毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷。

4. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷的摩尔比为 (0.016-2) : (0.016-2)。

5. 根据权利要求 4 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷的摩尔比为 1:1。

6. 根据权利要求 2 所述的组合物，其中，所述的组合物包含毛蕊异黄酮和芒柄花苷。

5 7. 根据权利要求 6 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮和芒柄花苷的摩尔比为  $(0.016-2) : (0.016-2)$ 。

8. 根据权利要求 7 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮和芒柄花苷的摩尔比为 1:1。

10 9. 根据权利要求 2 所述的组合物，其中，所述的组合物包含毛蕊异黄酮、刺芒柄花素和芒柄花苷。

10. 根据权利要求 9 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮、刺芒柄花素和芒柄花苷的摩尔比为  $(4-6) : (0.5-1.5) : (20-30)$ 。

15 11. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮、刺芒柄花素和芒柄花苷的摩尔比为 5:1:25。

20 12. 根据权利要求 2 所述的组合物，其中，所述的组合物包含毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷。

13. 根据权利要求 12 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷的摩尔比为  $(4-6) : (0.5-1.5) : (0.5-1.5) : (0.5-1.5)$ 。

25 14. 根据权利要求 13 所述的组合物，其中，所述的毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、芒柄花苷和毛蕊异黄酮苷的摩尔比为 5:1:1:1。

30 15. 根据权利要求 1-14 中任意一项所述的组合物，其中，所述的组合物为药物组合物或膳食补充用组合物，并包含药用辅料。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物，其中，所述的组合物的剂型为口服液。

5           17. 根据权利要求 1-16 中任意一项所述的组合物在制备用于促进红细胞生成的药物或膳食补充剂中的用途。

18. 根据权利要求 17 所述的用途，其中，所述的药物或膳食补充剂用于预防和/或治疗缺氧症和/或贫血。

10

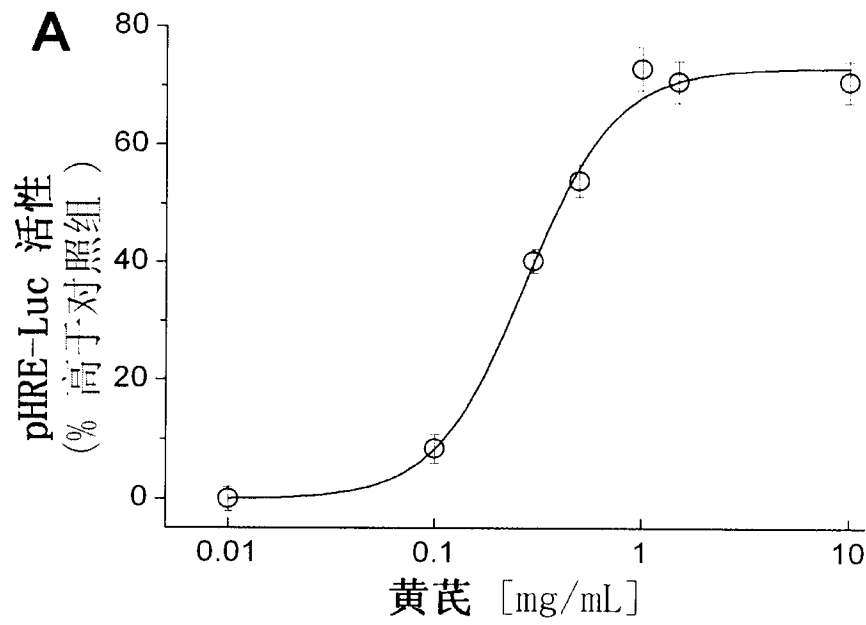


图 1

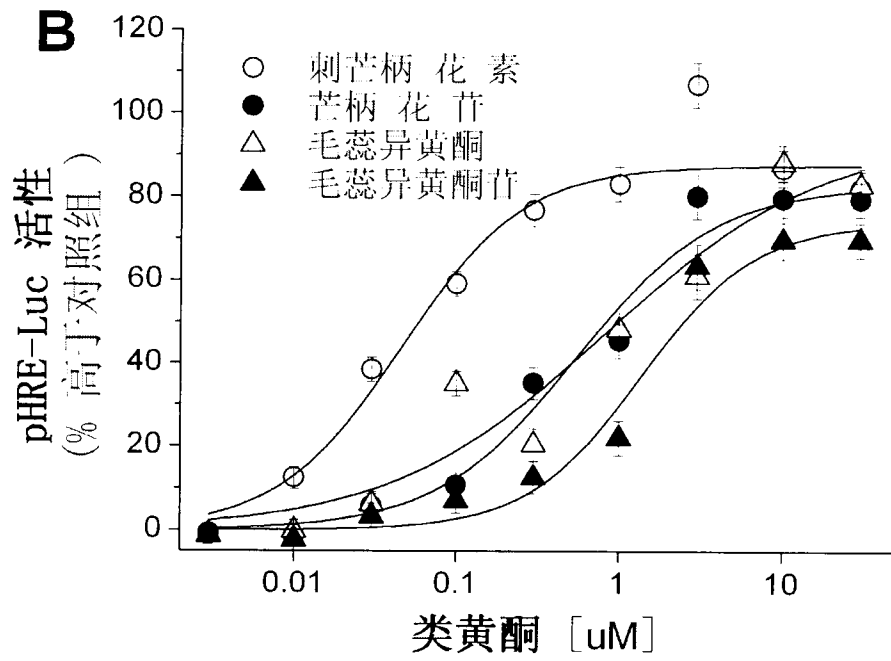


图 2

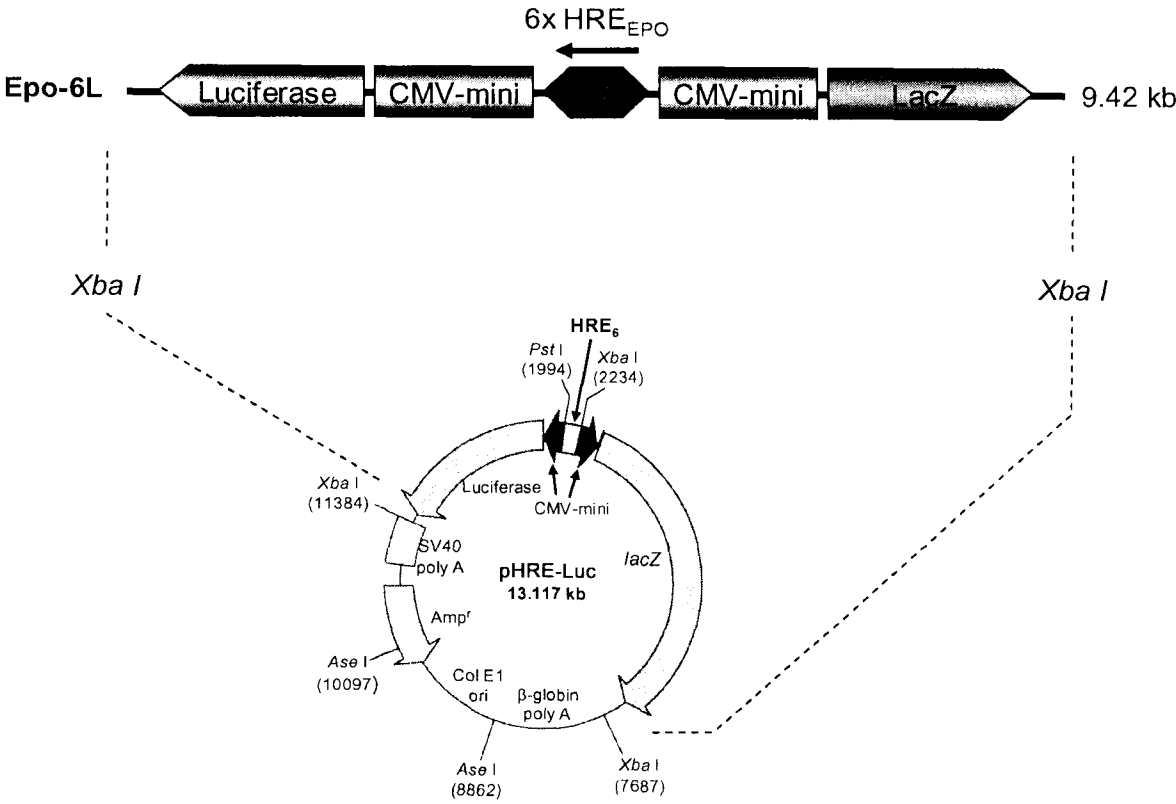


图 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2013/001169**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

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

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

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, REGISTRY, CAPLUS: Calycosin, Cyclosin, biochanin B, Formononetin, Ononin, erythrocyte, Erythropoietin, hematopoietic, hypoxia, Anemia etc.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | CN 101780069 A (GUANGZHOU CONSUN MEDICINE R & D CO., LTD.), 21 July 2010(21.07.2010), claims 1-4, description, paragraphs 0012-0014, 0031 and 0033, and embodiments 4, 6 and 9                                                                                                                                 | 1-5, 15, 16           |
| X         | ZHENG, K.Y.Z. et al., Flavonoids from Radix astragali Induce the Expression of Erythropoietin in Cultured Cells: A Signaling Mediated via the Accumulation of Hypoxia-Inducible Factor-1α. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, 2011, 59 (5), 1697-1704, ISSN: 0021-8561, 10 February 2011 (10.02.2011) | 1-18                  |
| X         | CN 1690056 A (PEKING UNIVERSITY), 02 November 2005 (02.11.2005), claim 10, and description, embodiment 3                                                                                                                                                                                                       | 1-18                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                              |
| “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                     |
| “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | “&” document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search<br>17 December 2013 (17.12.2013)                                                                                                                         | Date of mailing of the international search report<br><b>02 January 2014 (02.01.2014)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN:<br>State Intellectual Property Office of the P. R. China<br>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao<br>Haidian District, Beijing 100088, China<br>Facsimile No.: (86-10) 62019451 | Authorized officer<br><b>XIAO, Ying</b><br>Telephone No.: (86-10) <b>62411195</b>         |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2013/001169**

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date | Patent Family    | Publication Date |
|--------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| CN 101780069 A                             | 21.07.2010       | WO 2010081264 A1 | 22.07.2010       |
|                                            |                  | KR 120014751 B1  | 21.12.2012       |
|                                            |                  | KR 20100103539 A | 27.09.2010       |
|                                            |                  | US 2011053872 A1 | 03.03.2011       |
|                                            |                  | EP 2380570 A1    | 26.10.2011       |
|                                            |                  | JP 2011527284 A  | 27.10.2011       |
|                                            |                  | HK 1145454 A0    | 21.04.2011       |
|                                            |                  | CN 101780069 B   | 22.08.2012       |
| CN 1690056 A                               | 02.11.2005       | None             |                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2013/001169**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/352 (2006.01) i

A61K 31/7048 (2006.01) i

A61P 7/06 (2006.01) i

A61P 39/00 (2006.01) i

A23L 1/30 (2006.01) i

# 国际检索报告

国际申请号

**PCT/CN2013/001169**

## A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, REGISTRY, CAPLUS: 毛蕊异黄酮, Calycosin, 毛蕊异黄酮苷, Cyclosin, 鹰嘴豆芽素 B, biochanin B, 芒柄花素, Formononetin, 芒柄花苷, Ononin, 红细胞, 造血, 生血, 缺氧, 贫血, Erythropoietin, hematopoietic, hypoxia, Anemia 等

## C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 相关的权利要求     |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| X    | CN 101780069 A (广州康臣药物研究有限公司) 21.7 月 2010 ( 21.07.2010)<br>权利要求 1-4, 说明书第 0012-0014、0031、0033 段, 实施例 4、6、9.                                                                                                                                                                                                       | 1-5, 15, 16 |
| X    | Zheng, Ken Y. Z. 等. Flavonoids from Radix astragali Induce the Expression of Erythropoietin in Cultured Cells: A Signaling Mediated via the Accumulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ . Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59 (5), 1697-1704. ISSN: 0021-8561. 10.2 月 2011 (10.02.2011). | 1-18        |
| X    | CN 1690056 A (北京大学) 02.11 月 2005 (02.11.2005) 权利要求 10, 说明书实验例 3.                                                                                                                                                                                                                                                  | 1-18        |

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

17.12 月 2013 (17.12.2013)

国际检索报告邮寄日期

**02.1 月 2014 (02.01.2014)**

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

**肖瑛**

电话号码: (86-10) **62411195**

**国际检索报告**  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2013/001169**

| 检索报告中引用的<br>专利文件 | 公布日期       | 同族专利             | 公布日期       |
|------------------|------------|------------------|------------|
| CN 101780069 A   | 21.07.2010 | WO 2010081264 A1 | 22.07.2010 |
|                  |            | KR 120014751 B1  | 21.12.2012 |
|                  |            | KR 20100103539 A | 27.09.2010 |
|                  |            | US 2011053872 A1 | 03.03.2011 |
|                  |            | EP 2380570 A1    | 26.10.2011 |
|                  |            | JP 2011527284 A  | 27.10.2011 |
|                  |            | HK 1145454 A0    | 21.04.2011 |
|                  |            | CN 101780069 B   | 22.08.2012 |
| CN 1690056 A     | 02.11.2005 | 无                |            |

**A. 主题的分类**

A61K 31/352 (2006.01) i

A61K 31/7048 (2006.01) i

A61P 7/06 (2006.01) i

A61P 39/00 (2006.01) i

A23L 1/30 (2006.01) i