(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
2009 年 11 月 26 日 (26.11.2009)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2009/140886 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/7048 (2006.01) *A61K 9/12* (2006.01)
C07D 407/12 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2009/071511

(22) 国际申请日: 2009 年 4 月 28 日 (28.04.2009)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200810097680.8 2008 年 5 月 22 日 (22.05.2008) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **昆明制药集团股份有限公司 (KUNMING PHARMACEUTICAL CORP.)** [CN/CN]; 中国云南省昆明市高新技术开发区科医路 166 号, Yunnan 650106 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **朱华结 (ZHU, Huajie)** [CN/CN]; 中国云南省昆明市高新技术开发区科医路 166 号, Yunnan 650106 (CN)。 **金毅 (JIN, Yi)** [CN/CN]; 中国云南省昆明市高新技术开发区科医路 166 号, Yunnan 650106 (CN)。 **徐树光 (XU, Shuguang)** [CN/CN]; 中国云南省昆明市高新技术开发区科医路 166 号, Yunnan 650106 (CN)。 **杨兆祥 (YANG, Zhaoxiang)** [CN/CN]; 中国云南省昆明市高新技术开发区科医路 166 号, Yunnan 650106 (CN)。 **普俊学 (PU, Junxue)** [CN/CN]; 中国云南省昆明市高新技术开发区科医路 166 号, Yunnan 650106 (CN)。

(74) 代理人: **北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW)**; 中国北京市朝阳区建国门外大街 22 号赛特广场 7 层, Beijing 100004 (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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: A SCUTELLARIN DERIVATIVE, THE PREPARING PROCESS, THE PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND THE USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种灯盏花乙素衍生物及其制备方法、药物组合物和用途

(57) Abstract: A scutellarin derivative, 4', 5, 6-trimethoxy-scutellarin, the preparing process, the pharmaceutical composition and the use thereof are provided. The compound is obtained by methyl-etherification of scutellarin as starting material, then separating by silica gel column. The compound and the pharmaceutical composition thereof can be used for treating cardio-cerebrovascular disease, inflammation and tumor.

(57) 摘要:

本发明提供了一种灯盏花乙素衍生物，4', 5, 6-三甲氧基灯盏花乙素，其制备方法、药物组合物和用途。本发明化合物可以灯盏花乙素作为起始原料，经甲醚化反应后再经硅胶柱分离得到。本发明化合物及其药物组合物可用于治疗心脑血管疾病、炎症和肿瘤。

WO 2009/140886 A1

一种灯盏花乙素衍生物及其制备方法、药物组合物和用途

技术领域

本发明涉及一种新的灯盏花乙素衍生物、其制备方法以及含有该化合物的药物组合物，以及它们在心脑血管疾病、炎症和/或肿瘤等方面的应用。

背景技术

灯盏花又名灯盏细辛，属菊豆科短亭飞蓬类植物。灯盏花素是从灯盏花全株植物中分离提取出的以含灯盏花乙素为主（>90%），还含有少量灯盏花甲素的混合物（有效部位），灯盏花乙素又称野黄芩苷。灯盏花素具有活血化瘀、散寒解表、舒筋活络、祛风除湿之功效，临床上常用于治疗心脑血管疾病。目前临床中使用的灯盏花制剂，其有效成分一般都是利用乙醇和乙酸乙酯进行提取的主要含灯盏花乙素的制剂，灯盏花乙素在心脑血管疾病治疗方面已有许多文献报道。临床应用表明灯盏花乙素具有增加心脑血管血流量，降低血管阻力，抗血小板、红细胞凝聚，降低血液粘稠度等作用，疗效确切。还有大量的研究证实灯盏花乙素具有抗炎、抗氧化、蛋白激酶抑制剂、糖尿病、肾病、风湿、类风湿等疾病的治疗作用等。灯盏花素在临床上广泛用于治疗脑血栓、脑梗塞以及类型未定的中风后瘫痪、高血压、脑栓塞、多发性神经炎、慢性蛛网膜等脑血管意外所致瘫痪以及冠心病、心绞痛、治疗痛风性关节炎等症。

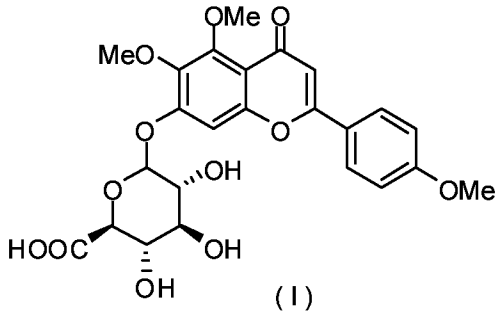
由于灯盏花乙素难溶于水，口服生物半衰期短，绝对生物利用度低，限制了它在医药领域中的应用。为了克服上述不利因素以及扩大其应用范围，人们对其进行改造，旨在寻找新型的活性化合物。文献报道（***Eur. J. Pharm. Sci*, 2006, 29, 5, 385-393**），在灯盏花乙素糖甙羧基上进行乙酯、苄酯和羟乙酰胺酯的前药合成，发现灯盏花乙素羟乙酰胺酯在缓冲溶液（**PH=4.2**）和水中的溶解度比灯盏花乙素分别提高了近 **10** 倍和 **35** 倍。

然而，现有的灯盏花乙素或其衍生物的溶解性能不好，生物利用度不高，治疗效果也不够理想。

发明内容

本发明人发现，通过在灯盏花乙素黄酮结构的酚羟基上引入甲基，可以获得一种新结构的灯盏花乙素衍生物。

因此，本发明的一个目的是提供一种新的灯盏花乙素衍生物，其结构如下列式（I）所示：



(I)

式（I）所示的灯盏花乙素衍生物还可以以其盐、尤其是药学上可接受的盐的形式出现，包括与无机碱或有机碱形成的盐。所述无机碱例如碱金属或碱土金属的碱性化合物，尤其是氢氧化钠（NaOH）、氢氧化钾（KOH）、氢氧化钙（$Ca(OH)_2$）等。所述有机碱例如胺，尤其是*L*-赖氨酸、*L*-精氨酸、三乙胺等。可以使用本领域公知的任何常规方法得到所述盐。

本发明的另一个目的是提供本发明所述的式（I）灯盏花乙素衍生物的制备方法，包括如下步骤：

a)、将灯盏花素溶于有机溶剂中；

b)、向上述有机溶剂中加入甲醚化反应试剂和碱，于 0～40℃、优选室温下搅拌；

c)、步骤 b)反应得到的产物经分离提取得到式（I）的灯盏花乙素衍生物。

在本发明的上下文中，室温是指 15-25℃范围内的任意温度。

为了描述上的便利，下文中式（I）化合物（化学名称为 4',5,6-三甲氧基灯盏花乙素）也可简称为 A1。

本发明的又一个目的是提供一种用于预防、改善或治疗心脑血管疾病、炎症和/或肿瘤的药物组合物，其特征在于所述药物组合物包含治疗有效量的本发明所述的式(I)灯盏花乙素衍生物或其药学上可接受的盐作为活性组分，还包含药学上可接受的载体。

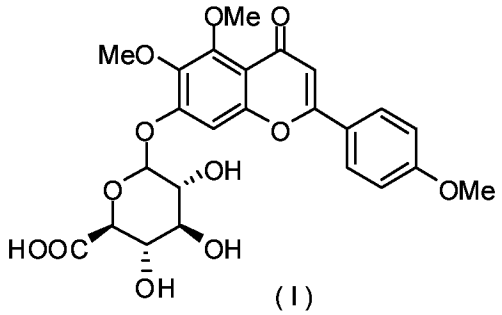
本发明的再一个目的是提供本发明所述的式（I）灯盏花乙素衍生物或其药学上可接受的盐在制备预防、改善或治疗心脑血管疾病、炎症和/或肿瘤的药物中的用途。

本发明的化合物 A1 溶解性能好，生物利用度高，疗效确切，因此本发明的化合物 A1 或含有该化合物 A1 的药物组合物可以取代现有的灯盏花乙素或其衍生物而有效地用于心脑血管疾病、炎症和/或肿瘤等的预防、改善和治疗。

此外，通过采用工业化植物提取原料灯盏花素作为起始原料，经甲醚化反应后经硅胶柱分离即可得到本发明的化合物 A1。因此，本发明的灯盏花乙素衍生物（A1）制备方法简便，具有反应条件温和、成本较低、易于操作及适宜于工业化生产等优点，经济效益尤其显著。

具体实施方式

在本发明的一些实施方案中，提供一种新的灯盏花乙素衍生物，其结构如式（I）所示:



(I)

式（I）所示的灯盏花乙素衍生物还可以以其盐、尤其是药学上可接受的盐的形式出现，包括与无机碱或有机碱形成的盐。所述无机碱例如碱金属或碱土金属的碱性化合物，尤其是氢氧化钠（NaOH）、氢氧化钾（KOH）、氢氧化钙（$Ca(OH)_2$）等。所述有机碱例如胺，尤其是 *L*-赖氨酸、*L*-精氨酸、三乙胺等。可以使用本领域公知的任何常规方法得到所述盐。

在本发明的另一些实施方案中，提供本发明所述的式（I）灯盏花乙素衍生物（A1）的制备方法，包括如下步骤:

a)、将灯盏花素溶于有机溶剂中;

b)、向上述有机溶剂中加入甲醚化反应试剂和碱，于 0～40℃、优选室温下搅拌;

c)、步骤 b)反应得到的产物经分离提取得到 A1。

在本发明的一些优选实施方案中，步骤 a）中所述的有机溶剂可以是单一溶剂，也可以是两种或更多种溶剂的混合溶剂。所述有机溶剂可以选自 N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、二氯甲烷、二氯乙烷及其任意组合。所述有机

溶剂的量也没有特别的限制，只要能够充分溶解灯盏花素即可，优选按照每克灯盏花素所需要的溶剂的毫升量计算，所述溶剂的用量为 10－100 毫升每克灯盏花素，更优选 20－80 毫升每克灯盏花素，最优选 30－50 毫升每克灯盏花素。

在一些具体实施方案中，步骤 a）通过将灯盏花素溶于 N,N-二甲基甲酰胺（DMF）和二氯甲烷的混合溶剂、更优选 N,N-二甲基甲酰胺（DMF）和二氯甲烷按体积比 10:1－10:5、优选 10:2－10:4、更优选 10:3 得到的混合溶剂中来进行。作为替代方案，可以用二甲基亚砜（DMSO）替代 N,N-二甲基甲酰胺（DMF），以及/或者用二氯乙烷替代二氯甲烷，其它类似的替换也是可以的。

在本发明的一些优选实施方案中，步骤 b)中所述的甲醚化反应试剂没有特殊限制，例如可以选自卤代甲烷、硫酸二甲酯和碳酸二甲酯，优选卤代甲烷，例如碘甲烷、溴甲烷等，最优选碘甲烷。所述甲醚化反应试剂的用量按摩尔比相对于反应底物为 1－10:1，优选 3－5:1，更优选 4:1。

在本发明的一些优选实施方案中，步骤 b)中所述的碱没有特殊限制，优选为 M_2CO_3 或 $MHCO_3$，其中 M 为钠 Na、K 或 Li，用量按摩尔比相对于反应底物为 1－15:1，优选 3－10:1，更优选 5－8:1。

在本发明的一些优选实施方案中，步骤 c)中所述的分离提取可以通过色谱法进行，例如在硅胶或氧化铝柱中进行色谱分离，其中以氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、石油醚或它们的混合物为洗脱剂。在一些具体实施方案中，步骤 c)为将步骤 b)反应得到的产物以体积比为 1－15:1、优选 3－10:1、更优选 6－8:1 的乙酸乙酯/甲醇为洗脱剂用硅胶柱分离提取得到 A1。

本发明的化合物 A1 或其药学上可接受的盐可以配制为药物组合物并以适合于所选择的给药途径例如口服或肠胃外、静脉内、肌肉内、局部或皮下途径的各种形式施用于哺乳动物例如人患者。

因此，在本发明的又一些实施方案中，提供一种用于预防、改善或治疗心脑血管疾病、炎症和/或肿瘤的药物组合物，其特征在于所述药物组合物包含治疗有效量的权利要求 1 所述的式（I）灯盏花乙素衍生物或其药学上可接受的盐作为活性组分，还包含药学上可接受的载体。

在本发明中，所述药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体，

如赋形剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、抗氧化剂、包衣剂、着色剂、芳香剂、表面活性剂等。

本发明的药物组合物可以按照制剂的常规制备方法制成包括口服剂、注射制剂或喷雾剂（例如鼻喷雾剂）的常规制剂。根据药物组合物的不同剂型可选择相应的载体，根据制剂制备方面的现有常规技术可以实现相应剂型的制备，必要时还可进行包衣。

例如，本发明的化合物 A1 或其药学上可接受的盐可以与药学上可接受的载体(例如惰性稀释剂)组合进行全身性施用，例如口服。可以将它们封入硬壳或软壳明胶胶囊中、可以压成片或者可以直接加入到患者饮食的食物中。对于口服治疗给药，可以使所述活性化合物与一种或更多种载体组合并以片剂、口含片剂、锭剂、胶囊、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂等形式使用。

片剂、锭剂、丸剂、胶囊等也可以含有下列成分：粘合剂，例如黄蓍胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂，例如磷酸二钙；崩解剂，例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸等；润滑剂，例如硬脂酸镁；以及甜味剂，例如蔗糖、果糖、乳糖或阿斯巴甜；或者调味剂，例如薄荷、冬青油；或者可以加入其它香料。当单位剂型是胶囊时，除了上述类型的物质之外，还可以含有液体载体，例如植物油或聚乙二醇。可以存在多种其它物质作为包衣或者用以改变固体单位剂型的物理形式。例如，片剂、丸剂或胶囊可以包覆有明胶、蜡、虫胶或糖等。糖浆剂或酏剂可以含有活性化合物、作为甜味剂的蔗糖或果糖、作为防腐剂的对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、染料和例如樱桃香料或桔子香料的调味剂。应当注意，在制备任意单位剂型中使用的任何物质应该是药学可接受的并且在所使用的量内基本上是无毒的。此外，可以将活性化合物加入到持续释放制剂和装置中。

也可以通过输注或注射来静脉内或腹膜内施用活性化合物。可以在水中制备活性化合物或其盐的溶液，任选地与无毒表面活性剂混合。还可以在丙三醇、液态聚乙二醇、三醋精及其混合物中以及在油中制备分散体。在普通的储存和使用条件下，这些制剂含有防腐剂，以预防微生物的生长。

适于注射或输注的药物剂型可包括含有活性成分的无菌水溶液或分散体或无菌粉末，其适合于临时制备无菌的可注射或可输注溶液或分散体，任选地包封在脂质体内。在所有情况下，最终的剂型在制备和储存的

条件下应该是无菌的、流动的和稳定的。液体载体或媒介物可以是溶剂或包含例如水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇、液态聚乙二醇等)、植物油、无毒甘油酯及其合适的混合物的液态分散介质。例如可以通过形成脂质体、在分散体情况下保持所需的粒径或使用表面活性剂维持适当的流动性。可以通过多种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞等)来预防微生物的作用。在许多情况下，优选包含等渗剂，例如糖、缓冲剂或氯化钠。可以通过在可注射组合物中使用延迟吸收剂例如单硬脂酸铝和明胶来延长该组合物的吸收。

通过根据需要在合适溶剂中使所需量的活性化合物与如上列举的多种其它成分混合，随后过滤杀菌，来制备无菌可注射溶液。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，得到活性成分加上存在于前述无菌过滤溶液中的任意额外的所希望成分的粉末。

对于局部给药，可以以纯净形式即当其是液体时施用本发明的化合物。然而，通常希望将本发明的化合物与皮肤病学可接受的载体组合作为可以是固体或液体的组合物或制剂施用于皮肤。

可用的固体载体包括细碎的固体，例如滑石、粘土、微晶纤维素、二氧化硅、氧化铝等。可用的液体载体包括水、二甲基亚砜(DMSO)、醇或二醇或者水-醇/二醇共混物，本发明的化合物可以溶于其中或者任选地借助于无毒表面活性剂以有效水平分散于其中。可以加入佐剂例如芳香剂以及另外的抗微生物剂，以便使性能对于给定的用途而言最优化。可以由吸收垫施加所得的液体组合物、用来浸渍绷带和其它敷料或者使用泵式喷雾器或气雾剂喷雾器将其喷到受影响的区域。优选以鼻喷雾剂的形式使用。

还可以随同液体载体一起使用增稠剂例如合成聚合物、脂肪酸、脂肪酸的盐和酯、脂肪醇、改性纤维素或改性矿物质，以形成用于直接涂敷到使用者皮肤上的可铺展的糊、凝胶、软膏、皂等。

本发明的药物组合物和制剂优选含有基于所述药物组合物和制剂的总重量为至少 0.1wt%、优选 0.5wt%～99.5wt%、更优选 1.0 wt%～90.0wt%的活性化合物。所述药物组合物和制剂的百分比可以改变并且可以有利地为给定单位剂型重量的约 2%到约 60%。

本发明的药物组合物可按照各种制剂类型的常规方法使用，使用剂量可

根据用药途径、患者年龄、体重、所治疗疾病的类型和严重程度等变化，如口服途径每次服用剂量在 10mg—100mg 活性化合物，每天剂量在 20mg-300mg 活性化合物；注射途经每次 5mg-80mg 活性化合物，每天 1-2 次。按照患者个体情况用药，通常每天治疗剂量口服 50mg-200mg 活性化合物、注射剂量：20mg-100mg 活性化合物、预防口服用药为：15mg-60mg 活性化合物。

在本发明的再一实施方案中，提供本发明所述的式（I）灯盏花乙素衍生物或其药学上可接受的盐在制备预防、改善或治疗心脑血管疾病、炎症和/或肿瘤的药物中的用途。

所述心脑血管疾病例如脑血栓、脑梗塞以及类型未定的中风后瘫痪、高血压、脑栓塞、慢性蛛网膜等脑血管意外所致瘫痪以及冠心病、心绞痛等。

所述炎症例如多发性神经炎、治疗痛风性关节炎等。

所述肿瘤包括良性肿瘤和恶性肿瘤，例如腺瘤、脂肪瘤、骨瘤、皮肤癌、胃癌、肠癌和肺癌等。

本发明人采用两种与人类疾病相近的动物模型，测定多种药效学指标，综合评价 A1 对急性心脑缺血的影响。动物实验结果表明，A1 在实验条件下，对心肌缺血有明显保护作用，A1 高剂量组 40mg/kg 显示出了比 40mg/kg 灯盏花素片和 50mg/kg 的尼莫地平片还要好的作用。大剂量使用本发明化合物时，也没有发现该化合物的毒副作用，证明其用药安全。

下面具体描述 A1 的制备方法，A1 的药理学作用以及本发明药物组合物的常规制剂的制备方法。通过下面的描述，本领域技术人员将更加全面地理解本发明，但是本发明绝不仅限于此。

制备实施例 4',5,6-三甲氧基灯盏花乙素（A1）的制备

将 5 克（10.8mmol）灯盏花素（昆明制药集团股份有限公司生产）溶解于 100 毫升体积比为 10:2 的 DMF 和二氯甲烷混合溶剂中，加入 4.6 克碘甲烷和 7.5 克（54mmol）碳酸钾，于室温下搅拌 2 天，TLC（薄层层析法）显示反应已完全，加入 50 毫升 1N 盐酸，并用 50 毫升乙酸乙酯萃取 3 次，合并有机相，用无水硫酸钠干燥，旋干有机溶剂，并用硅胶柱（乙酸乙酯：甲醇 = 10：1）分离，得淡黄色固体 3.1 克，产率为 60％。H^1NMR（400MHz，$CDCl_3$）δ7.78 (d, 2H), 6.92 (d, 2H), 6.60 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 4.94 (d, 1H), 4.01

(d, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.47-3.67 (m, 5H); C^{13}NMR（100MHz，$CDCl_3$）δ181.76, 181.68, 168.14, 163.59, 163.54, 161.79, 155.15, 152.38, 152.10, 151.62, 132.25, 127.28, 122,17, 113.62, 105.97, 102.82, 100.13, 93.63, 75.02, 74.77, 71.90, 70.31, 60.00, 54.63, 51.54; MS(ESI) M^+ 504

实验例一 A1 对心脑血管缺血保护作用的药理学研究

大量的药理研究证明，灯盏花素具有扩张脑血管，降低脑血管阻力，增加脑血流量，改善微循环，提高血脑屏障通透性，增强机体巨噬细胞吞噬免疫作用，对抗垂体后叶素所至脑缺血缺氧，并能对抗由二磷酸腺苷（ADP）引起的血小板凝聚作用。灯盏花素在临床上广泛用于治疗脑血栓、脑梗塞以及类型未定的中风后瘫痪、高血压、脑栓塞、多发性神经炎、慢性蛛网膜等脑血管意外所致瘫痪以及冠心病、心绞痛、治疗痛风性关节炎等症。

下面通过动物药理学实验来说明本发明化合物 A1 的活性，并且通过与灯盏花素及尼莫地平的对比研究来说明其显著的治疗效果。

选择与人类疾病相近且重复性好的动物模型，是评价药物治疗效果的基础。下面的生物实验中采用两种与人类疾病相近的动物模型，测定多种药效学指标，综合评价 A1 对心脑缺血的作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

上述制备实施例合成的 A1 纯品。市售灯盏花素片，20mg/片，批号 20070418，由云南省药物研究所制药厂生产。尼莫地平（尼达尔片），20mg/片，天津市中央药业有限公司生产，批号 070301。以上样品均用 0.5%羧甲基纤维素钠（CMC-Na）配制成所需浓度的混悬液供大鼠灌胃用。

红四氮唑（TTC），进口，AMRESCO 分装，批号 0765，上海生工出品。腺苷二磷酸钠（ADP），批号 A2754，Sigma 公司生产，进口分装，北京鼎国生物技术发展中心出品。

AST（血清天冬氨酸转氨酶）（紫外动力学法，批号 0704151）、LDH（（血清）乳酸脱氢酶）（紫外动力学法，批号 0704102、CK-MB（心肌型肌酸激酶同功酶）（选择性抑制动力学法，批号 100412）、TT（凝血酶时间）（批号 0504052）、PT（凝血酶原时间）（批号 0604161）、APTT（活化部分凝血活酶时间）（批号 0604131）及 FIB（纤维蛋白原）（批号 060405）测定试剂盒，均

为四川迈克科技有限公司出品。

1.2 动物

清洁级 SD 大鼠，雄性，体重 240～385g，合格证号：SCXK(沪)2003-0002，来源于上海西普尔—必凯实验动物有限公司，由昆明医学院实验动物中心代购。

1.3 仪器

TM1024 全自动生化分析仪，日本东京株式会社；Centrifuge 5810R 型冷冻离心机，德国 eppendoff 公司；BS110 型电子分析天平，赛多利斯公司；Millipore 超纯水处理系统，美国 Millipore 公司；6951D 型心电机，上海光电公司；C2000-4 血凝仪及 LBY-NS 血小板聚集仪，北京普利生集团。

1.4 统计

结果以 $\overline{X}$±SD 表示，正态分布数据用 t 检验，偏态分布数据用秩和检验。

2 方法

2.1 大鼠冠状动脉结扎心肌缺血实验

2.1.1 实验分组及造型：

雄性 SD 大鼠，330～385g，按体重随机分为：空白组、模型组、灯盏花素片 40mg/kg 组、A1 20mg/kg 组及 A1 40mg/kg 组。各组动物按剂量每日灌胃给药一次，连续 5 天，空白组和模型组给予等容量 0.5%CMC-Na 10ml/kg 体重。末次给药后 30min，用 12%水合氯醛腹腔注射 350mg/kg 麻醉动物，行开胸手术暴露心脏，于肺动脉圆锥及左心房间找出冠状动脉左前降支，距根部 2～3mm 处结扎，快速心脏复位关闭胸腔。假手术组仅置线头而不结扎。

2.1.2 检测指标：

分别记录结扎前及结扎后 5 分、30 分、1h、2h、4h 和 24h 肢体Ⅱ导联心电图，测量 S-T 段（J 点）变化值。待记录 24h 心电图后，颈动脉插管取血二份：一份分离血清按试剂盒方法测定 AST、LDH 及 CK-MB 的活性；一份用 3.8%枸橼酸钠以 1:9 抗凝，1000rpm 离心 5min 制备富血小板血浆（PRP），3500rpm 离心 10min 制备贫血小板血浆 （PPP）。按比浊法测定 ADP-2Na 诱导的血小板聚集率，ADP 的终浓度为 6mol/L；按试剂盒方法分别测定 TT、PT、APTT 及 FIB。取血后迅速摘出心脏，置于冰生理盐水中泵出心腔内积血，去掉心房及脂肪组织，吸干水分称取心室重，随后沿冠状切成 5 片，在 1%TTC

溶液中避光于 37℃ 孵育染色 10min。经染色后，正常心肌组织呈红色，而梗死组织呈白色，将梗塞部位剪下称重，计算坏死部分占心室重的百分比为心肌梗塞范围。

2.2 大鼠 MCAO（中脑动脉闭塞）局灶性脑缺血实验

2.2.1 实验分组及造型:

雄性 SD 大鼠，体重 240－290g，分组及剂量同前，另设一阳性对照药尼莫地平 50mg/kg 组。各组动物每日按剂量灌胃给药一次，连续 5 天。末次灌胃后 30min，用 12%水合氯醛腹腔注射 350mg/kg 麻醉动物，左侧卧位，沿右耳眼线中点切开皮肤，分离颞肌，绞断颧骨，在颧骨根前方用牙科钻钻孔，暴露 MCA，在大脑下静脉和嗅束间用针挑起，断之，棉球压迫止血后，分层缝合肌肉和皮肤。假手术组除了不挑断 MCA 外，其余步骤相同。

2.2.2 观察指标:

动物于造模后 6h 及 24h 根据运动等行为表现进行神经功能评分，以此作为脑功能障碍指标。评分采用盲法，即评分者不知道给药的情况，评分标准如下:

症　　状	行为障碍评分
提鼠尾离开地面约一尺，手术对侧前肢出现腕屈曲，肘屈曲，肩内旋或有腕，肘屈曲又有内旋。	1－4
将动物置于平地面上，分别推双肩向内侧，检查阻力。	1－3
将动物置于金属网面上，观察两前肢的张力。	1－3
将动物置于平地面上，观察有无转圈。	1－2
满分	12

以上标准满分为 12 分，分数越高，表明动物行为障碍越严重。

造模 24h，经神经功能评分后，颈动脉插管取血，一份分离血清按试剂盒方法测定 AST 及 LDH 的活性;一份用 3.8%枸橼酸钠以 1:9 抗凝，1000rpm 离心 5min 制备富血小板血浆（PRP），3500rpm 离心 10min 制备贫血小板血浆（PPP）。按比浊法测定 ADP-2Na 诱导的血小板聚集率，ADP 的终浓度为 6mol/L; 按试剂盒方法分别测定 TT、PT、APTT 及 FIB。取血后快速断头取脑，放入冰生理盐水中去除嗅球、小脑和低位脑干，吸干水分称取脑重，沿冠状切成 5 片，置入 5ml 含有 4%TTC 及 1mol/L$K_2HPO_4$0.1ml 的溶液中，避

光于 37℃温孵 30min，其间每隔 7-8min 翻动一次，经染色后，正常脑组织呈玫瑰红色，而梗死组织呈白色，将梗塞部位剪下称重，以重量求面积法计算梗死组织重量占双侧大脑半球重的百分比作为脑梗塞范围。

3 结果

3.1 对大鼠冠状动脉结扎心肌缺血的影响

3.1.1 对心肌缺血心电图 S-T 段的影响:

模型组大鼠结扎冠状动脉后，心电图上 S-T 段（J 点）明显升高或下降，而假手术组则变化不大，表明实验造模成功。A1 高剂量组能明显减少各时间点 S-T 段的变化，表明对心肌缺血时的心电图有明显改善作用；A1 低剂量组仅对缺血 5 min、30min 和 24h 的心电图有改善作用。结果见表 1。

表 1 A1 对心肌缺血大鼠心电图 S-T 段的影响

组 别	剂量 (/kg)	动物数 (只)	结 扎 后 ST 段 变 化 （X±SD，mv）					
			5min	30min	1h	2h	4h	24h
假手术	10ml	10	0.06±0.06	0.05±0.05	0.04±0.05	0.06±0.04	0.06±0.05	0.01±0.02
模 型	10ml	11	$0.37\pm0.12^{\Delta\Delta}$	$0.24\pm0.09^{\Delta\Delta}$	$0.14\pm0.08^{\Delta\Delta}$	$0.16\pm0.08^{\Delta\Delta}$	$0.16\pm0.10^{\Delta\Delta}$	$0.18\pm0.14^{\Delta\Delta}$
灯盏花素片	40mg	12	$0.15\pm0.14^{**}$	$0.09\pm0.08^{**}$	$0.07\pm0.06^{*}$	$0.07\pm0.07^{**}$	$0.08\pm0.06^{*}$	$0.02\pm0.03^{**}$
A1	40mg	12	$0.14\pm0.12^{**}$	$0.06\pm0.06^{**}$	$0.05\pm0.04^{**}$	$0.05\pm0.04^{**}$	$0.06\pm0.05^{*}$	$0.02\pm0.03^{**}$
A1	20mg	11	$0.17\pm0.11^{**}$	$0.12\pm0.09^{**}$	0.11±0.08	0.11±0.07	0.11±0.08	$0.07\pm0.08^{*}$

与假手术组相比：$^{\Delta\Delta}P<0.01$；与模型组相比：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

3.1.2 对心肌缺血大鼠心肌酶学的影响:

模型组大鼠血清 AST、LDH 及 CK-MB 活性有不同程度的增高，尤以 CK-MB 及 LDH 活性增高更明显，表明心肌损伤造模成功。A1 两种剂量均能明显降低 CK-MB 和 LDH 的释放，并具有降低 AST 的趋势，表明减轻心肌细胞损伤作用显著；两个给药组大鼠的心肌梗塞范围均显著小于模型对照组，与模型组相比分别缩小 60.87%和 45.65%。结果见表 2。

表 2 A1 对大鼠心肌梗塞范围和酶学的影响

组 别	剂 量 (/kg)	动物数 (只)	心 肌 酶 学（X±SD，ku/L） AST	LDH	CK-MB	心肌梗塞范围 （X±SD，%）	缩小率
假手术	10ml	10	0.52±0.21	0.82±0.21	0.65±0.26	0.19±0.27	—
模 型	10ml	11	0.72±0.35	1.08±0.27$^{\Delta}$	2.06±1.30$^{\Delta\Delta}$	6.44±3.62$^{\Delta\Delta}$	—
灯盏花素片	40mg	12	0.68±0.33	0.94±0.42	0.92±0.64*	3.09±1.58*	52.02
A1	40mg	12	0.61±0.20	0.61±0.24**	0.80±0.68*	2.52±2.16*	60.87
A1	20mg	11	0.61±0.26	066±0.32**	0.71±0.45**	3.50±2.68*	45.65

与假手术组相比：$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$；与模型组相比：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

3.1.3 对冠状动脉结扎心肌缺血大鼠血小板聚集及凝血的影响：

大鼠冠状动脉结扎致心肌缺血造模后，血小板聚集率明显升高，ATPP 时间有缩短趋势，纤维蛋白原的含量明显增加。各给药组能明显抑制 ADP 诱导的血小板聚集，并有延长 TT、APTT 时间的趋势，A1 还具有降低纤维蛋白原含量的趋势。结果见表 3。

表 3 A1 对冠状动脉结扎致心肌缺血大鼠血凝及血小板聚集的影响

组 别	剂量 (/kg)	动物数 （只）	血凝指标 TT （s）	PT (s)	APTT (s)	FIB (g/L)	血小板聚集率 （%）
假手术	10ml	10	77.14±25.12	23.74±6.65	85.95±30.16	3.57±0.49	49.00±6.34
模 型	10ml	11	72.37±40.79	24.56±4.96	56.58±41.58	4.75±1.19$^{\Delta\Delta}$	57.50±4.00$^{\Delta\Delta}$
灯盏花素片	40mg	12	92.49±34.44	26.58±3.81	69.74±33.82	3.90±0.96	48.93±7.22**
A1	40mg	12	93.04±35.64	25.75±5.26	75.96±35.87	3.95±0.84	48.22±5.55**
A1	20mg	11	92.41±42.37	25.90±3.51	78.17±28.14	4.77±1.11	51.20±7.41*

与假手术组相比：$^{\Delta}P<0.05$,$^{\Delta\Delta}P<0.01$；与模型组相比：$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

3.2 对 MCAO 致局灶性脑缺血大鼠的影响

3.2.1 对 MCAO 大鼠神经功能障碍及脑梗塞范围的影响:

大鼠 MCAO 造模后，活动减少，出现不同程度的运动障碍，模型组与假手术组相比差异显著。各给药组均能明显改善 MCAO 大鼠的神经功能障碍，缩小脑梗塞的范围，A1 分别缩小 64.64% 、59.10%。结果见表 4。

表 4 A1 对 MCAO 大鼠神经功能障碍及脑梗塞范围的影响

组别	剂量 (/kg)	动物数 (只)	脑梗塞范围 (X±SD，%)	缩小率	行为学评分（X±SD，分） 6h	24h
假手术	10ml	10	0.04±0.09	-	0.6±0.97	0.60±1.08
模 型	10ml	11	5.77±2.59$^{\Delta\Delta}$	-	8.73±1.01$^{\Delta\Delta}$	7.54±1.29$^{\Delta\Delta}$
尼莫地平	50mg	12	2.27±2.56**	60.66	6.50±1.68**	4.83±1.40**
灯盏花素片	40mg	11	2.70±1.42**	53.21	6.27±1.01**	5.18±1.33**
A1	40mg	12	2.04±1.43**	64.64	5.75±1.42**	4.25±1.60**
A1	20mg	12	2.36±1.81**	59.10	6.42±1.62**	4.92±1.31**

与假手术组相比：$^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与模型组相比：$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$。

3.2.2 对 ADP 诱导的 MCAO 大鼠血小板聚集及凝血的影响

大鼠 MCAO 造模后，血小板聚集率明显增加，凝血时间有所缩短而纤维蛋白原的含量有增加的趋势。两种样品均能明显抑制由 ADP 诱导的血小板聚集，并具有降低纤维蛋白原含量的趋势，A1 有延长 APTT 时间、有延长 TT 时间的趋势。结果见表 5。

表 5 A1 对 MCAO 大鼠血凝及血小板聚集的影响（X±SD）

组别	剂量 (/kg)	动物数（只）	血凝指标 TT (s)	PT (s)	APTT (s)	FIB (g/L)	血小板聚集率（%）
假手术	10ml	10	87.96±29.56	28.02±5.49	81.63±39.80	3.70±0.58	46.30±10.97
模 型	10ml	11	71.58±35.64	25.82±7.79	57.86±32.72	4.50±1.40	60.38±9.28$^{\Delta\Delta}$
尼莫地平	50mg	12	88.55±32.24	23.38±8.23	61.02±44.79	3.52±1.14	54.15±7.76

灯盏花素片	40mg	11	98.07±36.83	26.78±3.51	74.79±26.26	3.24±0.90*	49.5±6.80**
A1	40mg	12	62.04±40.80	23.43±8.66	75.15±27.41	3.59±0.76	52.38±5.24*
A1	20mg	12	95.55±24.80	25.56±5.30	62.48±29.08	3.38±1.07	50.52±4.07**

与假手术组相比：$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$；与模型组相比：*P＜0.05,**P＜0.01。

3.2.3 对 MCAO 大鼠血清 AST、LDH 及体重的影响

模型组大鼠血清 AST 及 LDH 活性明显增高而手术后 24h 体重显著下降，两给药组均能明显降低 LDH 的释放，A1 还能明显降低 AST 活性，能明显对抗造模大鼠的体重减轻，表明两样品减轻脑组织损伤作用显著。结果见表 6。

表 6 A1 对 MCAO 大鼠血清 AST、LDH 及体重的影响

组别	剂量 (/kg)	动物数（只）	体重（X±SD，g）				血清酶（X±SD，u/L））	
			给药前	手术前	术后 6h	术后 24h	AST	LDH
假手术	10ml	10	258.0±15.5	269.5±16.6	258.0±15.8	255.5±16.6	156.0±51.0	566.1±191.2
模 型	10ml	11	257.3±10.1	267.7±9.6	252.3±7.5	240.0±8.7$^{\Delta}$	246.6±121.5$^{\Delta}$	907.1±256.7$^{\Delta\Delta}$
尼莫地平	50mg	12	259.6±14.5	265.8±12.9	257.1±11.4	249.6±10.5*	198.6±118.2	536.7±262.8**
灯盏花素片	40mg	11	259.1±13.0	267.7±19.4	256.8±15.7	247.3±15.4	244.3±183.6	719.5±133.4*
A1	40mg	12	256.3±13.3	265.8±12.4	253.8±12.1	244.2±12.2	152.9±33.0*	472.0±231.9**
A1	20mg	12	257.9±11.6	268.8±12.4	258.3±11.9	250.0±15.1*	171.2±71.6	571.1±287.5**

与假手术组相比：$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$；与模型组相比：*P＜0.05,**P＜0.01。

4.结论

发明人采用两种与人类疾病相近的动物模型，测定多种药效学指标，综合评价两种样品对急性心脑缺血的影响。结果表明，A1 能明显改善冠状动脉结扎致心肌缺血大鼠的心电图变化，降低血清 CK-MB 及 LDH 的活性，缩小心肌梗死范围，抑制血小板聚集，并具有延长凝血时间和降低纤维蛋白原的趋势，提示其对心肌缺血有明显保护作用。A1 不仅可以减少 MCAO 大鼠脑

梗塞范围，使行为障碍程度得到明显改善，血清中 LDH 及 AST 的活性明显降低；同时还能明显抑制 ADP 诱导的血小板聚集，并有一定的抗凝趋势，从而抑制血栓形成。研究结果表明，A1 对心脑缺血具有显著保护作用。

在所采用的两种缺血性心脑血管疾病模型上，A1 在实验条件下，对心肌缺血有明显保护作用，A1 高剂量组显示出了比 40mg/kg 灯盏花素片和 50mg/kg 的尼莫地平片还好的作用。

实验例二　本发明化合物 A1 和灯盏花乙素的溶解性比较研究

表 7　本发明化合物 A1 和灯盏花乙素的溶解性比较

化合物	H_2O	MeOH	95%EtOH	n-BuOH	0.01N NaOH
灯盏花乙素	极微溶解	略溶	略溶	略溶	溶解
A1	微溶	溶解	溶解	溶解	溶解

注：极易溶解、易溶、溶解、略溶、微溶、极微溶解、几乎不溶和不溶的定义按照 2005CP 规定。

从表 7 可以看出，本发明化合物 A1 较之灯盏花乙素，生物理化性质明显改善，即水溶性和脂溶性都有明显的改善，进而可以明显提高其生物利用度，提高疗效。

通过下面的实施例说明本发明化合物在制备药物制剂上的应用。

制剂制备实施例 1：A1 冻干粉针剂的制备

原料配方：（制备 1000 支，产品规格：50mg/支）

4’,5,6-三甲氧基灯盏花乙素　　50g

甘露醇　　100g

制备方法具体如下：

按配方称取前述制备实施例中制备的 4’,5,6-三甲氧基灯盏花乙素，加注射用水 1000ml，搅拌、并用 0.01NNaOH 调节使溶解，溶解后加入甘露醇 100g ，搅拌使溶解完全，加注射用水至总配液量 2000ml ，加入总配液量 1%的针用活性炭，吸附 30 分钟，先用滤纸加砂棒过滤除去活性炭，滤液经过 0.45μm 的滤膜过滤等处理后，在 100 级条件下，用 0.2μm 以下的滤膜精滤。

精滤液送入灌装机，灌装 2.0ml/支，半压塞，送入冷冻真空干燥机，快速冷至零下 40℃，保持 2 小时，抽真空至约 1Pa 以下，逐步缓慢升温至 30℃，保持 2 小时。压塞，取出制品，扎盖、包装、检验合格得成品 1000 支。

制剂制备实施例 2：A1 滴丸的制备

原料配方：（制备 1000 丸，产品规格：40mg/丸）

A1	40 克
聚乙二醇-6000	200 克

制备方法具体如下：

称取 200 克聚乙二醇-6000 于 100℃左右水浴中熔化，熔化后 65-75℃恒温。称取粉碎过的 A1 40 克，并将其在搅拌下逐渐加入到聚乙二醇-6000 的恒温液中，充分搅拌使混合均匀，送至滴丸机的贮药罐内。于 65-80℃恒温、搅拌混合均匀后即可滴制。二甲硅油或液体石蜡为冷凝液，冷却液液温为 3.5-11℃，滴速控制在 60－80 滴/分钟。滴制完毕，取出，吸去表面硅油或石蜡油，在室温条件下自然干燥定型后，在 50±2℃干燥制得 A1 口服滴丸。

制剂制备实施例 3：A1 片剂的制备

原料配方：（制备 1000 片，产品规格：10mg/片）

A1	10 克
乳　　糖	18 克
低取代羟丙基纤维素(L-HPC)	50 克
羧甲基淀粉钠(CMS-Na)	5 克
乙 醇	30 毫升
水	54 毫升
微粉硅胶	5 克

制备方法具体如下：

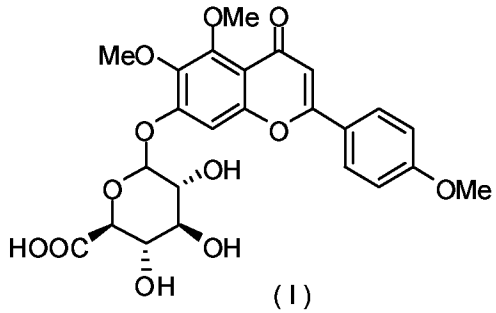
按比例称取粉碎过的 A1、乳糖、低取代羟丙基纤维素、羧甲基淀粉钠等，按常规工艺处理后，混合均匀，加入适宜乙醇作润湿剂制备软材，制粒，干燥，整粒，取颗粒检查合格后，加入助流剂微粉硅胶，混合均匀后压片。质

量检查合格后分装，贴签，包装即得 A1 口腔崩解片。

以上实施例只是用于进一步说明本发明，而不是用来限制本发明的保护范围。凡是在本发明保护范围内所做出的具体实施方式及应用上的各种变动，都属于本发明的保护范围。

权 利 要 求

1、一种式（I）的灯盏花乙素衍生物或其药学上可接受的盐:



（I） 。

2、权利要求 1 所述的式（I）灯盏花乙素衍生物的制备方法，其特征在于包括如下步骤:

a)、将灯盏花素溶于有机溶剂中;

b)、向上述有机溶剂中加入甲醚化反应试剂和碱，于 0～40℃、优选室温下搅拌;

c)、步骤 b)反应得到的产物经分离提取得到式（I）的灯盏花乙素衍生物。

3、根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于所述步骤 a)中的有机溶剂选自 N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、二氯甲烷、二氯乙烷及其任意组合。

4、根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于所述有机溶剂是 N,N-二甲基甲酰胺和二氯甲烷按体积比 10:1－10:5、优选 10:2－10:4、更优选 10:3 得到的混合溶剂。

5、根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于所述有机溶剂是二甲基亚砜和二氯乙烷按体积比 10:1－10:5、优选 10:2－10:4、更优选 10:3 得到的混合溶剂。

6、根据权利要求 2～5 中任一项所述的制备方法，其特征在于所述步骤 a)中有机溶剂的用量为 10－100 毫升每克灯盏花素、优选 20－80 毫升每克灯盏花素、更优选 30－50 毫升每克灯盏花素。

7、根据权利要求 2～6 中任一项所述的制备方法，其特征在于步骤 b)中所述甲醚化反应试剂选自卤代甲烷、硫酸二甲酯和碳酸二甲酯，优选卤代甲烷，例如碘甲烷、溴甲烷等，最优选碘甲烷，其用量按摩尔比相对于反应底

物为 1－10:1，优选 3－5:1，更优选 4:1。

8、根据权利要求 2～7 中任一项所述的制备方法，其特征在于步骤 b)中所述碱为 M_2CO_3 或 $MHCO_3$，其中 M 为 Na、K 或 Li，所述碱的用量按摩尔比相对于反应底物为 1－15:1，优选 3－10:1，更优选 5－8:1。

9、根据权利要求 2～9 中任一项所述的制备方法，其特征在于步骤 c)为：以体积比为 1－15:1、优选 3－10:1、更优选 6－8:1 的乙酸乙酯/甲醇用硅胶柱分离得到式（I）的灯盏花乙素衍生物。

10、一种用于预防、改善或治疗心脑血管疾病、炎症和/或肿瘤的药物组合物，其特征在于所述药物组合物包含治疗有效量的权利要求 1 所述的式（I）灯盏花乙素衍生物或其药学上可接受的盐作为活性组分，还包含药学上可接受的载体。

11、根据权利要求 10 所述的药物组合物，其特征在于按照制剂的常规制备方法制成包括口服剂、注射制剂或鼻喷雾剂的常规制剂。

12、权利要求 1 所述的式（I）的灯盏花乙素衍生物或其药学上可接受的盐在制备预防、改善或治疗心脑血管疾病、炎症和/或肿瘤的药物中的用途。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2009/071511

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See 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, C07D

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 (Cprs), CNKI Full-Text database(CN), Chinese Medicine Abstract(CN), WPI, EPODOC, PAJ, EMBASE, CA, STN: scutellarin, breviscapine, methyl-etherification etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Liu Liyan et al. MYTHYLATION OF SCUTELLARIN. JOURNAL OF CHENGDE MEDICAL COLLEGE, 1999, 16 (3): 217-218 (Chinese).	1-11
X	CA 87:197283 & Morita, Naokata et al. Clerodendroside, a new glycoside from the leaves of Clerodendron trichotomum Thunb. var. fargesii Rehd. (Verbenaceae). Yakugaku Zasshi, 1977, 97(9): 976-9 (Japanese). see CA abstract.	1, 10-12
A	Li, Guangyao et al. Studies on chemical constituents of Frullania muscicola. Zhongcaoyao, 2001, 32 (8): 678-681 (Chinese). ISSN: 0253-2670.	1-12
A	WO2008028336A1 (SHANGHAI GLORIAYX BIOPHARMACEU et al) 13 March 2008 (13.03.2008). see the whole document.	1-12
PA	CN101220065A (SHENYANG PHARMACEUTICAL UNIVER) 16 July 2008 (16.07.2008). see the whole document.	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 July 2009 (20.07.2009)	**06 Aug. 2009 (06.08.2009)**
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer XIAO, Ying Telephone No. (86-10)62411195

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2009/071511

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO2008028336A1	13.03.2008	None	
CN101220065A	16.07.2008	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2009/071511

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7048 (2006.01) i

C07D407/12 (2006.01) i

A61K 9/00 (2006.01) i

A61K 9/08 (2006.01) i

A61K 9/12 (2006.01) i

A61P29/00 (2006.01) i

A61P 9/00 (2006.01) i

A61P35/00 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2009/071511

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类表(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, C07D

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 (Cprs), CNKI 全文数据库(CN), 中国药学文摘数据库(CN), WPI, EPODOC, PAJ, EMBASE, CA, STN: 灯盏花乙素, 野黄芩素, 甲醚化, scutellarin, breviscapine, methyl-etherification 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	刘丽艳 等. 野黄芩甙的甲基化. 承德医学院学报, 1999, 16 (3): 217-218 (中文).	1-11
X	CA 87:197283 & Morita, Naokata 等. Clerodendroside, a new glycoside from the leaves of Clerodendron trichotomum Thunb. var. fargesii Rehd. (Verbenaceae). Yakugaku Zasshi, 1977, 97(9): 976-9 (日文). 见 CA 摘要.	1, 10-12
A	李光耀 等. 盔瓣耳叶苔化学成分研究. 中草药, 2001, 32 (8): 678-681 (中文). ISSN: 0253-2670.	1-12
A	WO2008028336A1 (上海格鲁奥丽生物医药技术有限公司 等) 13. 3 月 2008 (13.03.2008) 见全文.	1-12
PA	CN101220065A (沈阳药科大学) 16.7 月 2008 (16.07.2008) 见全文.	1-12

☐ 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

"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	国际检索报告邮寄日期
20.7 月 2009 (20.07.2009)	**06.8 月 2009 (06.08.2009)**

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 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/CN2009/071511

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO2008028336A1	13.03.2008	无	
CN101220065A	16.07.2008	无	

A. 主题的分类

A61K31/7048 (2006.01) i
C07D407/12 (2006.01) i
A61K 9/00 (2006.01) i
A61K 9/08 (2006.01) i
A61K 9/12 (2006.01) i
A61P29/00 (2006.01) i
A61P 9/00 (2006.01) i
A61P35/00 (2006.01) i