

(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:
2004年12月23日(23.12.2004)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2004/111027 A1

(51) 国际分类号⁷: C07D 311/36, 311/34, 311/26, 311/22, 311/04, 311/00, A61K 31/352, 31/35, 31/335, A61P 11/00

LTD.); 中国北京市海淀区知春路23号量子银座306室, Beijing 100083 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/000481

(22) 国际申请日: 2004年5月14日(14.05.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
03117865.0 2003年5月15日(15.05.2003) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 成都迪康药物研究所(CHENGDU DIKANG PHARMACEUTICAL INSTITUTE) [CN/CN]; 四川迪康科技药业股份有限公司(SICHUAN DIKANG SCI-TECH PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国四川省成都市犀浦高新西区迪康大道1号, Sichuan 611731 (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 徐学明(XU, Xueming) [CN/CN]; 袁崇军(YUAN, Chongjun) [CN/CN]; 王茹(WANG, Jia) [CN/CN]; 齐尚斌(QI, Shangbin) [CN/CN]; 中国四川省成都市人民南路四段51号, Sichuan 610041 (CN)。银海(YIN, Hai) [CN/CN]; 曾雁鸣(ZENG, Yanming) [CN/CN]; 冯丽霞(FENG, Lixia) [CN/CN]; 李建(LI, Jian) [CN/CN]; 中国四川省成都市犀浦高新西区迪康大道1号, Sichuan 611731 (CN)。

根据细则4.17的声明:

— 关于申请人在国际申请日有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))对除美国以外的所有指定国
— 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

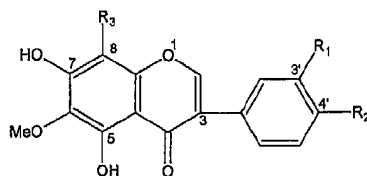
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(74) 代理人: 北京律诚同业知识产权代理有限公司
(LECOMTE INTELLECTUAL PROPERTY AGENT

(54) Title: THE ISOFLAVONE DERIVATIVES OF TECTORIDIN, THE PREPARATION THEREOF AND THE ANTI-VIRUS MEDICINES CONTAINING THE SAME AS THE EFFECTIVE CONSTITUENTS

(54) 发明名称: 鸢尾苷元的异黄酮类衍生物及其制备方法和以其为有效药用成分的抗病毒药物



(II)

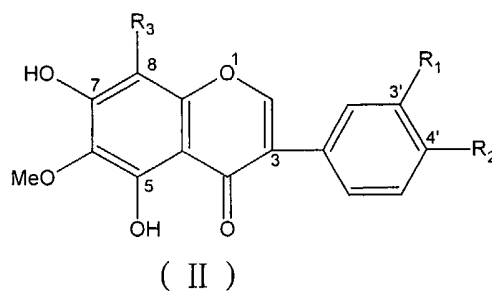
(57) Abstract: The present invention relates to the isoflavone derivatives of tectoridin demonstrated as formula (II), the preparation thereof and the anti-virus medicines containing the same as the effective constituents. Formula: (II); wherein R1 is H, NH2 or SO3M; R2 is OR'; R3 is H or -CH2NR'', wherein R' is H, -CH2COONa or -CH2CH2Nme2; NR'' is Formula (III) or -Nme2; M is H, Na, K or N+H(CH2CH2OH)3.

[见续页]



(57) 摘要

本发明涉及如式(II)所示结构的异黄酮类的鸢尾苷元化合物衍生物,其制备方法及其为有效药用成分的抗病毒药物。该化合物的结构如下:



式中 R1 为 H、NH₂ 或 SO₃M; R2 为 OR' ; R3 为 H 或 -CH₂NR'', 其中的

R' 为 H、-CH₂COONa 或 -CH₂CH₂NMe₂; NR'' 为  或 -NMe₂; M 为 H、Na、K 或 N⁺H(CH₂CH₂OH)₃。

鸢尾苷元的异黄酮类衍生物及其制备方法 和以其为有效药用成分的抗病毒药物

技术领域

5 本发明涉及的是一种鸢尾苷元化合物的衍生物，具体讲是化学名称为5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮类的鸢尾苷元化合物的衍生物，以及其制备方法，和以该衍生物为有效药用成分的抗病毒药物及相应的制备方法。

背景技术

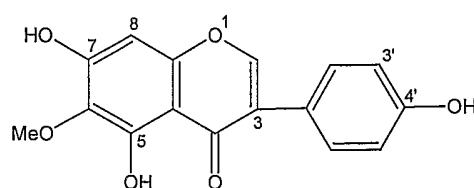
10 因流感病毒等多种病毒感染引起的上呼吸道感染、病毒性肺炎等疾病，一直都是一直都是一种常见并可导致死亡的多发性疾病。对这类呼吸道感染性疾病，目前主要多还是采用化学药物治疗。但耐药菌株和耐药病毒株的增加速度常超过化学抗生素药物发展的速度，已成为不容忽视的问题。利用和发扬天然药物的中药在这方面的优势，特别是从天然药物中提取和分离出的有效药用成分，和/

15 或在此基础上进一步开发改造成新的药用化合物，已日益受到重视。

孙远碧等人在“射干与鸢尾化学成分的比较鉴定”(《中药通报》1984,9(5)); 陈芳群在“川射干中黄酮成分的分离和鉴定”(《中草药》1990,22(2)); 许云龙等人在“黄射干的异黄酮类成分”(《云南植物研究》1999,21(1)); 吉文亮等人在“中药射干的化学与药理研究进展”(《国外医药·植物药分册》2000, 15(2))

20 和“射干中异黄酮提取工艺的研究”(《中药材》2000, 23(8))等许多研究和文献都报导，如式(I)所示结构的鸢尾苷元化合物，是广泛存在于具有抗病毒和抗菌、抗炎作用的鸢尾科植物，如鸢尾即川射干(*Iris tectorum Maxim*)、射干(*Belamcanda chinensis (L.) DC.*)、白射干(*Iris dichotoma pall.*)、扁竹根(*Iris japonica*)、黄射干(*I. Iris tectorum*)等中药中的多种黄酮类化合物成分中的一种异黄酮化合物。

25



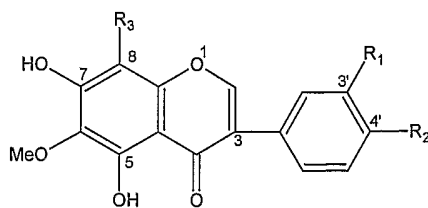
(I)

包括上述文献在内的许多文献报道的研究结果表明，中药鸢尾 (*Iris tectorum Maxim*) 所含的异黄酮部分具有显著的抗病毒、抗炎作用。鸢尾苷 (tectoridin) 是鸢尾中的主要有效成分 (含量约为 5%)，文献报道及药理研究均证实其有较强的抗病毒、抗炎作用。作为鸢尾苷水解产物的鸢尾苷元，结构如上述式(I)所示，文献及药理研究均证实其有更强的抗病毒、抗炎作用。但鸢尾苷及其苷元的水溶性非常差，限制了其临床运用，因此改善和提高其水溶性，是首先需要解决的一个问题。实验结果显示，通过制剂学研究解决其水溶性的效果并不理想，而通过对鸢尾苷、鸢尾苷元进行化学修饰，改变其化学结构，在保持甚至提高其有效药用作用的前提下，达到增加水溶性，增强疗效及扩大其可适用的药物制剂范围的目的，就是一条可行的措施。

发明内容

根据上述情况，本发明首先将提供一种在上述式(I)所示结构的鸢尾苷元化合物的基础上，通过对其进行化学修饰而得到的一系列衍生物，在至少保持了其原有的抗菌、抗病毒、抗炎及解热镇痛等药效作用的前提下，能大大改善和提高其水溶性，为扩大其在制药及其临床运用中的适用范围提供了极大的便利条件。在此基础上，本发明进一步还将提供以所说的鸢尾苷元化合物的衍生物作为有效药用成分的抗病毒药物，特别是以其为有效药用成分的注射型药物制剂。

本发明所说的鸢尾苷元化合物的衍生物，化学名称为 5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮类的衍生物，结构如式(II)所示：



(II)

其中：式中的 R1 为 H、NH₂ 或 SO₃M；

R2 为 OR' ；

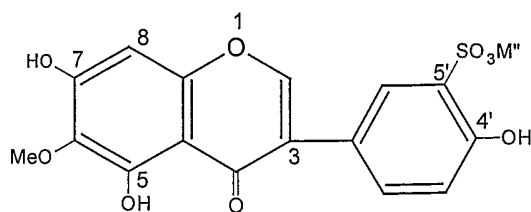
R3 为 H 或 -CH₂NR'' ；

其中的 R' 为 H、-CH₂COONa 或 -CH₂CH₂NMe₂；

NR'' 为  或 -NMe₂;

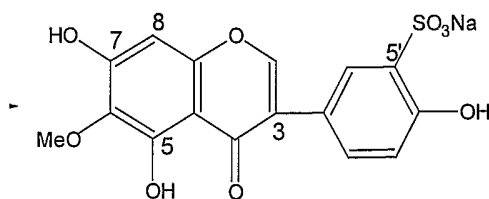
M 为 H、Na、K 或 N+H(CH₂CH₂OH)₃。

在上述通式 (II) 所示的化合物中, 一个典型的化合物是如式(III)所示的
R1 为 SO₃M'' 的磺酸类化合物, 其中 M'' 可以为 H、Na、K 或
5 -N+H(CH₂CH₂OH)₃。



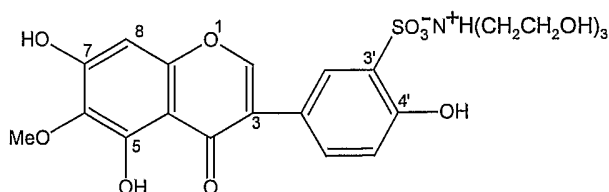
(III)

其中在通式 (III) 结构的化合物中的典型化合物为磺酸或磺酸盐类的化合物, 即 SO₃M'' 中的 M'' 为 H、Na 或 K, 结构如式(IV)所示:



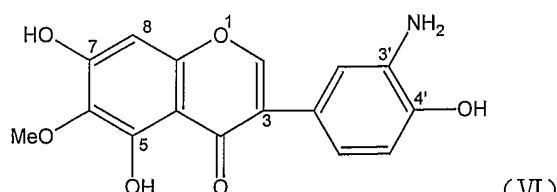
(IV)

在通式 (III) 结构中的另一个典型化合物, 是其中的磺酸基 R1 为
-SO₃-N+H(CH₂CH₂OH)₃, 结构如式(V)所示:



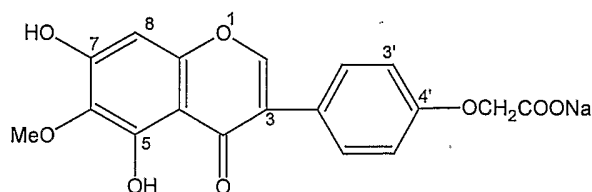
(V)

本发明所说通式 (II) 中还包括的一个典型化合物, 是其结构中的 R1 为
NH₂, R2 为 OH, R3 为 H, 结构如式(VI)所示:



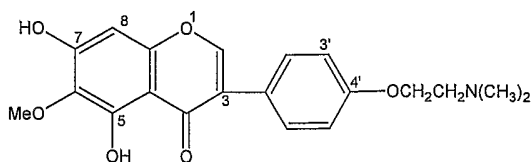
(VI)

作为本发明上述通式(II)中的再一个典型化合物,是结构中的R1为H, R2为-OCH₂COONa, R3为H, 结构如式(VII)所示:



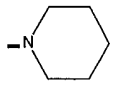
(VII)

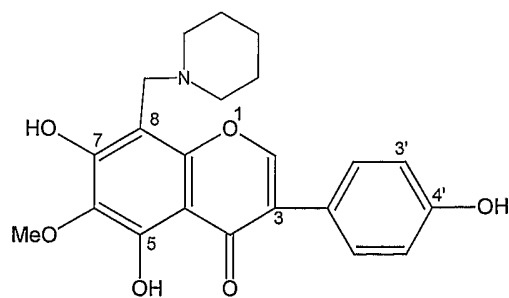
此外, 本发明所说上述通式(II)中的还有的一个典型化合物, 是式(II)结构中的R1和R3为H, R2为OCH₂CH₂NMe₂, 结构如式(VIII)所示:



(VIII)

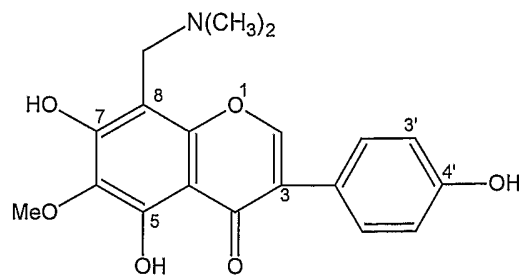
此外, 本发明上述通式(II)中的另一个典型化合物, 是式(II)结构中的

10 R1为H, R2为OH, R3为-CH₂NR'', 其中的NR''为 , 结构如式(IX)所示:



(IX)

此外, 在本发明所说上述通式(II)中的又一个典型化合物, 是式(II)结构中的R1为H, R2为OH, R3为-CH₂NMe₂, 结构如式(X)所示:



(X)

在上述所说的各典型化合物中，其中的式、(VI)、(VIII)、(IX)和(X)所示结构的化合物，还可以分别为其药学上可以接受的盐类化合物，如最常用的各相应的盐酸盐化合物。

本发明上述式(II)所示结构的化合物中，对于其具体取代基团和/或取代位置的不同，均可以由式(I)结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物为原料，根据对制取同类取代化合物的已知制备原则和方法，采用相应的不同方法制备得到。

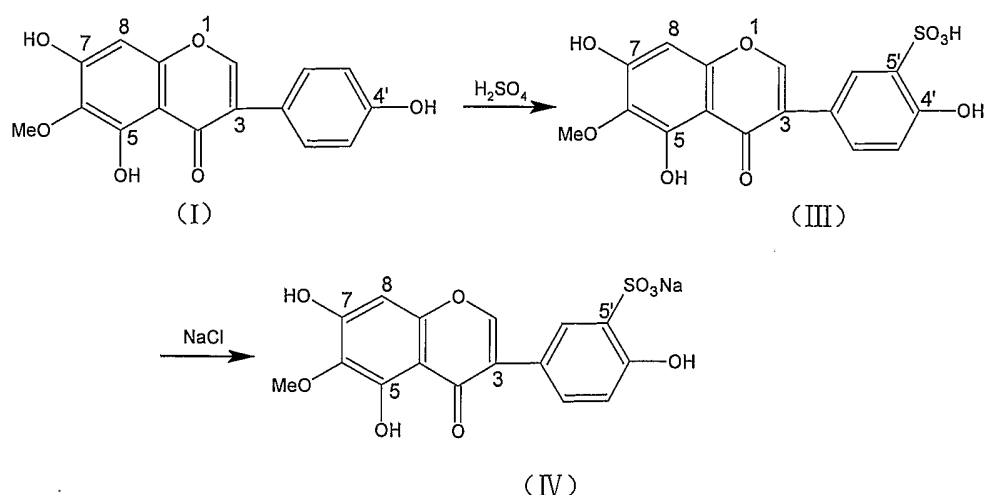
例如：作为本发明进行化学修饰原料使用的前体化合物，即上述式(I)结构的鸢尾苷元异黄酮化合物，除可以采用全合成的方式制备获得外，更方便易行的方式，是采用目前已有报导的方式，由前述的多种鸢尾科药用植物中提取并分离后得到。例如，一种可供参考的提取方式是：

鸢尾原生药干燥、粉碎成粗粉过20目筛，置于提取容器内，分别用为药材重量4倍的70%乙醇加热回流三次，每次时间1小时，趁热过滤，合并滤液。减压回收乙醇后，得比重1.2g/ml(50℃)的棕黄色浸膏状提取物，收得率为药材重量的49-51%。上述浸膏中加入95%乙醇搅拌均匀，混悬液沉淀，过滤，滤出物再加入95%乙醇搅拌均匀，重复操作2次，至滤液近无色，得鸢尾苷粗品。加入70%乙醇加热回流1小时，放置，析出淡黄色沉淀，滤出沉淀，用70%乙醇再重结晶二次，得无色结晶性粉末鸢尾苷，收得率为药材量的4.5%。

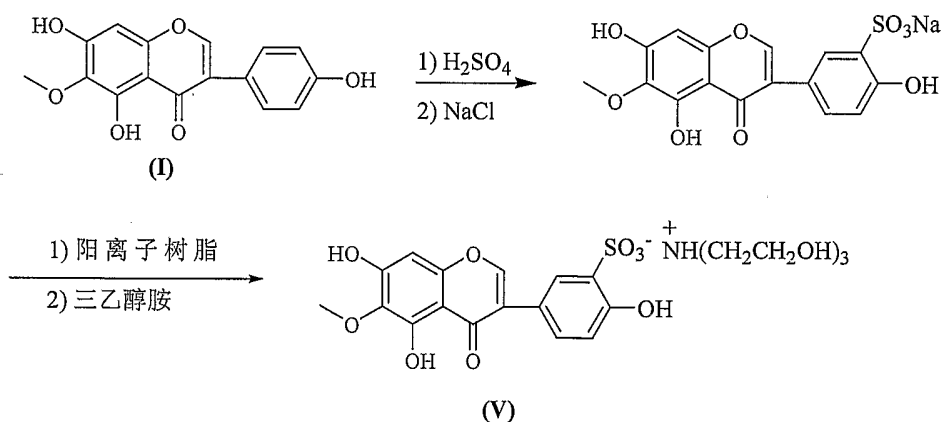
将该鸢尾苷200g置于圆底烧瓶中，加50%乙醇2000ml搅拌均匀后，加入浓盐酸200ml，摇匀并加热回流2小时，趁热过滤后静置，析出淡黄色细长针晶。过滤，结晶用400ml95%乙醇溶解，倾入800ml沸水中，放冷析出淡黄色细长针晶。过滤后再重结晶一次，60℃减压干燥，得式(I)结构异黄酮的鸢尾精品120g，为淡黄色细长针晶，得率为药材量的3%，含量>98%。

式(III)结构的衍生物，一般可以采用硫酸对式(I)的异黄酮化合物进行磺化反应，即可得到R1为SO₃H取代的产物。优选的方式之一是：称取鸢尾苷元1.0g，加入4.0ml浓硫酸搅拌溶解，室温下反应1.5~2小时，整个反应过程在无水条件进行，得到式(III)中的M'为H的磺酸衍生物产物。

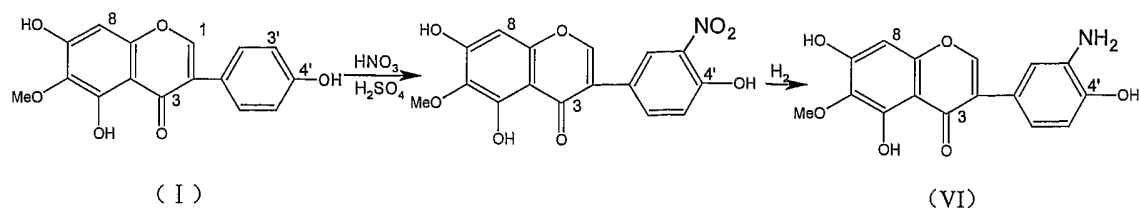
进一步用如NaCl或KCl等饱和盐类水溶液进行处理后，即可以得到上述式(IV)的相应磺酸钠或磺酸钾化合物。其两步合成路线如下：



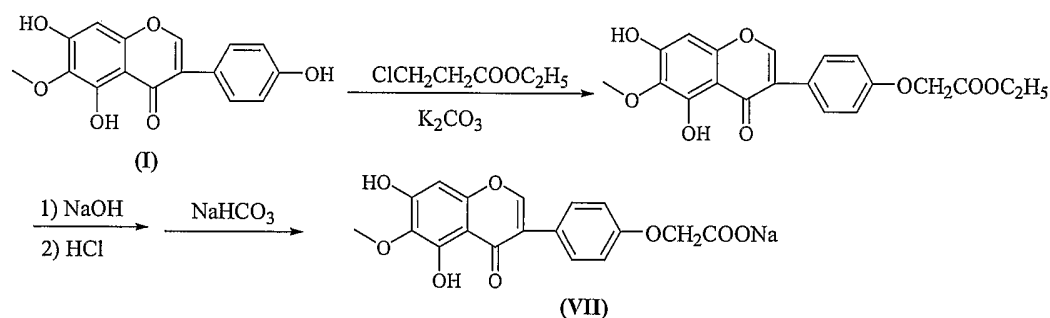
制备上述式 (V) 所示结构的鸢尾苷元化合物的方法, 可以采用将式 (I) 结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物为原料与浓硫酸混合, 在 40 - 90°C 优选为 60°C 下加热搅拌反应, 冷却后倾入饱和的氯化钠、其他碱金属的盐酸盐、氢溴酸盐或硝酸盐等的溶液中, 得 3'-磺酸钠中间产物, 将其悬浮于乙醇溶液中并加入强酸型阳离子树脂, 室温搅拌使全部溶解, 然后加入三乙醇胺, 再减压蒸去溶剂, 得到化合物 (V), 合成路线为:



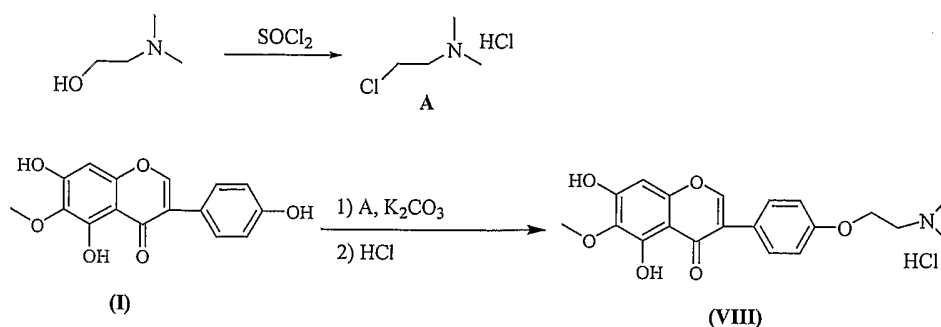
制备上述式 (VI) 所示结构的鸢尾苷元化合物的方法, 可以采用由式 (I) 结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物为原料, 在冰浴冷却下滴加硝酸和浓硫酸混酸的乙醇溶液 (即 (硝酸+硫酸)/乙醇), 得到 3'-硝基中间化合物, 然后将其溶于甲醇中, 在常压下以氢催化还原得到 3'-氨基取代的化合物 (VI), 并且可以进一步与药物中可以接受的酸反应得到式 (VI) 结构的相应盐类化合物, 合成路线为:



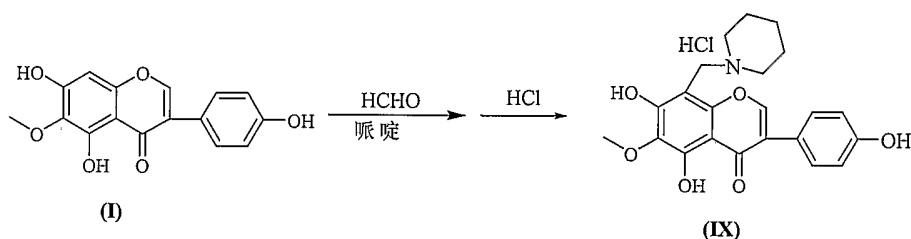
在制备上述式 (VII) 所示结构的鸢尾苷元化合物时, 可以将式 (I) 结构的
 5 异黄酮类鸢尾苷元化合物为原料与氯乙酸乙酯在丁酮和 DMF 混和溶剂中, 加入无水 K_2CO_3 和催化量的 NaI, 搅拌下回流反应后, 冷却至室温并滤除不溶物, 减压浓缩滤液, 残余物溶于适量水中, 再乙酸乙酯提取和水洗, 干燥后减压浓缩溶剂, flash 柱分离, 得 4'-酯醚中间产物, 用甲醇溶解后, 搅拌下滴加 NaOH 水溶液后进行常温水解反应完全, 再用酸调节至 pH3~4, 减压蒸除
 10 甲醇得絮状沉淀并溶于乙酸乙酯, 水洗、干燥, 浓缩后与 $NaHCO_3$ 反应制成钠盐, 得到化合物 (VII), 合成路线为:



对于上述式 (VIII) 所示结构的鸢尾苷元化合物的制备, 可以采用先将 β -二甲氨基乙醇于 $0^\circ C$ 条件下滴加入二氯亚砷并剧烈搅拌, 滴完后于 $35\sim 50^\circ C$ 搅拌
 15 反应, 然后用无水乙醇重结晶, 得中间产物 β -二甲胺基氯乙烷盐酸盐 A。然后将式 (I) 结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物为原料溶于丁酮、丙酮、DMF、THF 或二氧六环等溶剂, 加入无水 K_2CO_3 或 Na_2CO_3 和 DMF 及催化量的 NaI, 加热至回流, 可分成五批、每隔半小时加入上述中间产物 A, $80^\circ C$ 左右回流, 薄层板检测, 待却后过滤, 将滤液于旋转蒸发器上减压浓缩得粘状物, 适量水稀
 20 释 (约 10 倍重量的水) 后, 用乙酸乙酯提取, 提取液用水洗后干燥并出去溶剂, 得到化合物 (VIII), 并且可以进一步与药物中可以接受的酸反应得到式 (III) 结构的相应盐类化合物, 合成路线为:

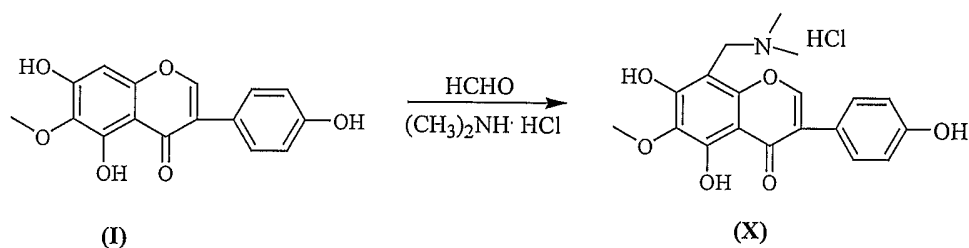


制备上述式 (IX) 所示结构的鸢尾苷元化合物的方法, 则可以将式 (I) 结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物原料、含量为 37% 重量的甲醛溶液、哌啶以及二氧六环、THF、甲醇或乙醇中的一种溶剂混和, 回流反应后冷却, 过滤得到化合物 (IX), 并且可以进一步与药物中可以接受的酸反应得到式 (III) 结构的相应盐类化合物, 合成路线为:



试验结果显示, 上述反应的位置选择性十分专一, 完全得到在 A 环上反应的产物, 与文献报道和预先设计的位置 (C 环) 不同。这提供了一种选择性在鸢尾苷元异黄酮 A 环上衍生化的方法, 有利于全面考察结构改造对活性的影响。而其他的反应多是在 C 环上进行衍生化。在此基础上, 采用类似方法可以得到上述式 (X) 所示结构的鸢尾苷元化合物。如:

将式 (I) 结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物原料、含量为 37% 重量的甲醛溶液、二甲胺的盐酸盐以及二氧六环、THF、甲醇或乙醇中的一种溶剂混和, 回流反应后待冷, 滤集沉淀得到化合物 (X), 并且可以进一步与药物中可以接受的酸反应得到式 (III) 结构的相应盐类化合物, 合成路线为:



以有效用量的上述式 (II) 所示结构的鸢尾苷元化合物的衍生物作为有效药

用成分,与药物中可接受的辅助添加成分和按现有的常规制备方式,可以制成为相应的可具有抗病毒作用的药物。在所说的这些用于抗病毒药物中,除可以按一般方式得到口服型制剂外,特别是由于上述已成为盐类形式的各化合物能具有满意的水溶性,因此尤为适宜制备成为具有抗病毒作用的注射型药物。例如,将上述各典型化合物按中国药典 2000 版二部凡例 X 页的溶解度实验方法进行了溶解性对比实验:称取研成细粉的供试样品,置于 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 一定量的溶剂中,每隔 5 分钟强力振摇 30 分钟内的溶解情况,并根据药典对各种溶解性能的定义进行判断。结果如表 1 所示。

表 1 溶解性能对比试验结果

化 合 物	溶质: 水 (mg/ml)
化合物 (I)	0.1mg/ml
化合物 (IV)	67mg/ml
化合物 (V)	70mg/ml
化合物 (VI)	8mg/ml
化合物 (VII)	15mg/ml
化合物 (VIII)	10mg/ml
化合物 (IX)	8mg/ml
化合物 (X)	9mg/ml

表 1 的结果显示,经本发明化学修饰后的多种结构形式的异黄酮鸢尾苷元化合物衍生物 (II),由于在引入了许多易于成盐和/或亲水性的基团,从而使该类衍生物的水溶性大为提高,有利于其在制药和临床上的应用,也有利于提高其在体内的吸收和生物利用度。

以此为基础,在制备上述的注射型药物制剂时,为进一步保证和提高上述式(II)结构鸢尾苷元化合物衍生物在注射液中的溶解稳定性能,制备时还可以在注射液中按允许的用量使用在注射剂药物中可接受的助溶剂成分。其中,经试验结果显示有效且方便的可供参考的优选方式之一,是在所说的注射型制剂中,添加为注射液总量的重量/体积比为 2-15%的葡萄糖作为助溶剂,利用葡萄糖中的多羟基与式(II)结构的异黄酮结构缔合形成氢键,从而大大增加了其在水中的溶解度。

以上述式(IV)结构的鸢尾苷元磺酸钠为例,其在室温下的水溶解度仅为

20mg/ml (2%), 达不到用药浓度; 加热至 60-100℃后的水溶解度可增至 50-60mg/ml(5-6%), 冷却至室温后又析出沉淀。但在注射液中加入 4%的葡萄糖后, 能够保持在室温和低温(0℃-5℃)下放置保持澄清, 而且可以用水或糖盐水任意稀释, 不出混浊。因此其不但可供肌肉注射, 还可加入糖和/或盐水中用于静脉注射。这就表明了葡萄糖在增加上述式(IV)鳶尾苷元磺酸钠在水中的溶解度的同时, 还能大大提高注射制剂药物的稳定性。

例如, 在制备以上述鳶尾苷元的异黄酮类衍生物(II)为有效药物成分的注射剂药物时可作为实施例之一的一种方法, 可以采用将鳶尾苷元衍生物(II) 5-80 重量份和注射用葡萄糖 20-150 重量份, 溶解于 700~800 重量份的注射用水中, 溶解完全后再加入注射用水补足至相当于 1000 重量份的总体积, G4 垂熔玻砂漏斗过滤后, 经常规封装和灭菌处理, 即得到淡黄色澄明液体的注射液, 其中的葡萄糖含量 2-15%, 有效药物成分(II)的含量为 5-80mg/ml。

以下通过具体实施方式的实例再对本发明的上述内容作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。在不脱离本发明上述技术思想情况下, 根据本领域普通技术知识和惯用手段做出的各种替换或变更, 均包括在本发明的范围内。

附图的简要说明

图 1 是式(III) 鳶尾苷元磺酸钠化合物的 IR 图谱

图 2 是式(III) 鳶尾苷元磺酸钠化合物的 ¹HNMR 图谱

发明的具体实施方式

【实施例 1】化合物(IV)的制备

取式(II)结构的鳶尾苷元 120g, 加浓 H₂SO₄ 480ml, 搅拌至全溶, 放置反应 1.5 小时, 然后缓缓倾入饱和氯化钠水溶液 5000ml 中, 边加边搅, 析出大量白色沉淀, 过滤。沉淀物加水 3000ml 并水浴加热至全部溶解, 趁热过滤、析晶、过滤, 得淡黄色片晶。结晶加水 1000ml, 再水浴加热至全溶后, 趁热过滤、析晶、过滤。沉淀物于 60℃减压干燥, 得式(IV)结构的鳶尾苷元磺酸钠精品 150g, 为淡黄色细长针状结晶, 含量 > 98%。

对所得的式(IV)结构鳶尾苷元磺酸钠产品进行的光谱测试数据如下:

IR(KBr 压片, cm^{-1}): 3465(s), 1654(s), 1622(s), 1575(s), 1494, 1465(s), 1436, 1367, 1340, 1278, 1165(s), 1095(s), 1070, 1031(s), 993, 833, 815, 767, 731, 667, 632, 567, 543, 509, 459;

^1H NMR(D_2O 为溶剂, TMS 内标, δ Hppm): 7.88(s,1H), 7.74(s,1H),
5 7.25(d,1H), 6.94(d,1H), 6.21(s,1H), 3.70(s,3H)。

【实施例 2】化合物 (V) 的制备

原料 300mg (1mmol) 与浓硫酸 5ml 混合, 在 60°C 加热搅拌 3h, 冷却, 倾入 20ml 饱和氯化钠溶液中。静置, 过滤, 所得固体用 5% 的氯化钠溶液重
10 结晶, 得淡黄色晶体的中间产物 283mg, 产率 70%。

上述中间产物 150mg (0.294mmol) 悬浮于 5ml 乙醇中, 加入过量的预先处理过的强酸型阳离子树脂, 室温下搅拌 1h, 悬浮固体全部溶解。过滤, 树脂用丙酮洗涤。向滤液中加入 55mg 三乙醇胺, 减压蒸去溶剂, 加入二氯甲烷和丙酮处理得粉状固体的化合物 (V), 产率: 90%。熔点: $155 - 159^\circ\text{C}$ 。在水中
15 的溶解度大于 50mg/ml。

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ : 7.92 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.32 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 7.00 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 6.27 (s, 1H), 3.96 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 6H), 3.74 (s, 3H), 3.47 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 6H)。

^{13}C NMR (100MHz, D_2O) δ : 182.4, 159.0, 156.5, 155.7, 155.0, 154.1, 135.8,
20 133.2, 130.3, 124.1, 123.2, 119.6, 106.9, 96.9, 62.8, 57.8, 57.5。

IR cm^{-1} (KBr): 3356 (OH, NH), 3151, 1655 ($\text{C}=\text{O}$), 1612, 144, 1291, 1168, 1090。

ESI MS: 379.1 $[\text{M}-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3]^-$ 。

元素分析: $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_{12}\text{S}$ (%): C 49.84, H 5.22, N 2.71; 计算值: C 49.90,
25 H 5.14, N 2.65。

【实施例 3】化合物 (VI) 的制备

将鸢尾苷元异黄酮 (I) (以下均简称原料) 300mg (1.0mmol) 溶于 5ml 乙醇中, 冰浴冷却下滴加硝酸 (68%) 210mg 和浓硫酸 500mg 混酸的乙醇溶液
30 (3ml), 然后搅拌 24h。过滤即得硝化产物 170mg, 产率 49%。

熔点: >200 °C。

ESI MS: 346.1 (M+1) + ; 344.1 (M-1) - 。

将上述硝基化合物 150mg 溶于 4ml 甲醇中, 加入 30mg 10% Pd/C, 常压下氢解完全 (5h)。过滤, 减压除去甲醇后产物溶于 5ml 乙酸乙酯中, 加入乙酸乙酯的 HCl 溶液至酸性 (pH = 2 - 3)。过滤得式 (VI) 结构的盐酸盐产物, 产率 80%。熔点: >250 °C。在水中的溶解度大于 1mg/ml。

相关的结构检测数据:

1H NMR (400MHz, DMSO) δ : 12.94 (s, 1H), 10.78 (br.s, 1H), 10.58 (br.s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.25 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.03 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 3.76 (s, 3H)。

13C NMR (100MHz, DMSO) δ : 180.5, 157.9, 154.7, 153.4, 152.9, 150.4, 131.7, 128.0, 123.6, 122.0, 121.6, 121.2, 116.0, 105.0, 94.2, 60.2。

IR cm⁻¹(KBr): 3421 (OH, NH), 3079, 1645 (C=O), 1619, 1518, 1474, 1284。

ESI MS: 316.1 (M+1) + ; 314.1 (M-1) - 。

元素分析: C₁₆H₁₄ClNO₆ (%): C 54.35, H 4.15, N 4.35; 计算值: C 54.63, H 4.01, N 3.98。

【实施例 4】化合物 (VII) 的制备

原料 300mg (1mmol)、氯乙酸乙酯 135mg (1.1mmol)、丁酮 8 ml、少许 5% 体积的 DMF 混和, 加入无水 K₂CO₃ 207.3mg (1.5mmol) 和催化量 (约 5mol%) 的 NaI, 搅拌下回流 8h。冷至室温, 滤除不溶物, 减压浓缩滤液, 残余物溶于适量水中, 乙酸乙酯提取, 水洗两次, 干燥, 减压浓缩溶剂, 快速柱层析柱分离, 得淡黄色固体中间产物, 产率: 39.3%。熔点: 164~167 °C。

1H NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 12.85 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.36 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.86 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.35 (s, 1H), 5.51 (s, 1H), 4.81 (s, 2H), 4.31 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.98 s, 3H), 1.33 (t, J= 7.2Hz, 3H)。

ESI MS: 387.2 (M+1) + 。

上述中间产物 125mg (0.32mmol) 用甲醇 4ml 溶解, NaOH 64.8mg (1.6mmol) 配成水溶液 (1mmol/ml), 搅拌下滴加到上述甲醇溶液, 常温下反应 24h, 使水解完全, 溶液用稀盐酸调节至 pH3~4, 减压蒸除甲醇, 生成的白色絮状沉淀溶

于乙酸乙酯，水洗，干燥，浓缩，与 NaHCO₃ 反应制成化合物 (VII) 的钠盐，产率 80 %。熔点：>250 °C。在水中的溶解度大于 2mg/ml。

¹H NMR (400MHz, DMSO) δ : 9.24 (s, 1H), 10.58 (br.s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.24 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.72 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.47 (s, 1H), 4.38 (s, 2H), 3.78 (s, 3H)。

¹³C NMR (50MHz, DMSO) δ : 180.7, 170.3, 158.9, 158.2, 154.2, 152.9, 152.6, 132.2, 130.0, 122.3, 120.7, 115.4, 105.5, 92.2, 68.5, 60.1。

IR cm⁻¹(KBr): 3420 (OH), 1655(C=O), 1614, 1422, 1290, 1176。

ESI MS: 359.1 (M-Na+2) +, 357.0 (M-Na) -。

元素分析: C₁₈H₁₃NaO₈ (%): C 56.82, H 3.32; 计算值: C 56.85, H 3.45。

【实施例 5】化合物 (VIII) 的制备

将二氯亚砷 14.5ml (0.12mol) 置干燥圆底烧瓶中，冰水浴冷却下用滴液漏斗缓慢滴加 β -二甲氨基乙醇，剧烈搅拌。滴加完毕得褐色粘状物，35~50 °C 搅拌 1h，加入 50ml 无水乙醇重结晶，得 β -二甲胺基氯乙烷盐酸盐中间产物。适量无水乙醇及乙醚洗涤，密封保存备用。

原料 150mg (0.5mmol) 溶于 15ml 丁酮，加入无水 K₂CO₃ 214mg (1.55mmol)，DMF 0.5ml，催化量 (约 5mol%) 的 NaI，加热至回流，分次加入 (可分成五批、每隔半小时加入) 上述中间产物 115.3mg (0.8mmol)，80 °C 左右回流 48h，待冷，滤除不溶物，滤液在旋转蒸发器上减压浓缩至干，得粘状物。适量 (10 倍重量) 水稀释后，乙酸乙酯提取，水洗，干燥，浓缩，得黄色固体产品的化合物 (VIII)，产率 46.5 %。按一般方法制得盐酸盐。熔点：190 °C 软化，235 °C 分解。在水中的溶解度大于 2mg/ml。

¹H NMR (400MHz, DMSO) δ : 12.98 (s, 1H), 10.57 (br.s, 1H), 9.69 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.41 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.84 (d, J=8.1Hz, 2H), 4.54 (t, J=5.2Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.58 (t, J=4.8Hz, 2H), 2.89 (s, 6H)。

¹³C NMR (50MHz, DMSO) δ : 180.9, 157.8, 157.2, 157.0, 154.8, 153.0, 132.2, 130.3, 122.4, 121.1, 115.4, 106.5, 92.4, 64.4, 60.5, 55.2, 43.2。

IR cm⁻¹(KBr): 3418 (OH, NH), 1656 (C=O), 1614, 1515, 1460, 1272。

ESI MS: 372.1 (M+1) +。

元素分析: C₂₀H₂₂ClNO₆ (%): C 58.85, H 5.78, N 3.64; 计算值: C 58.90,

H 5.44, N 3.43。

【实施例 6】化合物 (IX) 的制备

原料 300mg (1.0mmol)、含量为 37%重量的甲醛溶液 81mg (1.0mmol)、哌啶 (2 当量) 和二氧六环 5ml 混和, 回流 3h。冷却, 过滤得淡黄色固体产物(IX)。在乙醇中加入适量浓盐酸得相应盐酸盐, 产率: 90%。熔点: 245 °C 分解。在水中的溶解度小于 1mg/ml。

¹H NMR (400MHz, DMSO) δ : 13.43 (s, 1H), 11.26 (s, 1H), 10.03 (br.s, 1H), 9.74 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.38 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.86 (d, J=8.4Hz, 2H), 4.30 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.45-3.38 (m, 2H), 2.97 (m, 2H), 1.78-1.63 (m, 4H), 1.38-1.36 (m, 1H), 1.07-1.04 (m, 1H)。

¹³C NMR (50MHz, DMSO) δ : 181.0, 157.9, 157.1, 154.3, 152.4, 131.1, 130.2, 122.1, 120.9, 115.4, 105.0, 95.5, 80.5, 56.2, 52.1, 48.2, 22.4, 21.2, 18.8。

IR cm⁻¹(KBr): 3197 (OH, NH), 2954, 1652 (C=O), 1585, 1515, 1458, 1374, 1226。

ESI MS: 398.0 (M+1)⁺; 396.2 (M-1)⁻。

元素分析: C₂₂H₂₄ClNO₆ (%): C 60.50, H 5.74, N 3.54; 计算值: C 60.90, H 5.58, N 3.23。

【实施例 7】化合物 (X) 的制备

原料 150mg (0.5mmol), 含量为 37%重量的甲醛溶液 40.5mg (0.5mmol), 二甲胺的盐酸盐 61.2mg (0.75mmol)和二氧六环 2ml 混和, 70~80 °C 回流 10h, 待冷, 滤集不溶物, 得到化合物 (X)。在酸性 (盐酸 pH=2~3) 条件下用乙醇重结晶, 得产品的盐酸盐, 产率: 38.7%。熔点: 248 °C 分解。在水中的溶解度大于 2mg/ml。此反应产物的位置选择性与上述化合物 (VII) 的相同。

¹H NMR (400MHz, DMSO) δ : 13.40 (s, 1H), 11.32 (br.s, 1H), 10.23 (br.s, 1H), 9.74 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.38 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.85 (d, J=8.4Hz, 2H), 4.34 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.77 (s, 6H)。

¹³C NMR (100MHz, DMSO) δ : 181.0, 157.9, 156.9, 154.3, 154.2, 152.3, 131.1, 130.2, 122.2, 120.9, 115.4, 105.0, 95.9, 60.6, 48.6, 42.3。

IR cm⁻¹(KBr): 3145 (OH, NH), 1656 (C=O), 1577, 1462, 1379, 1223。

ESI MS: 357.9 (M+1)⁺; 356.2 (M-1)⁻。

元素分析: C₁₉H₂₀ClNO₆ (%): C 57.99, H 5.11, N 3.85; 计算值: C 57.95, H 5.12, N 3.56。

5

【实施例 8】各种剂型药物的制备

1. 注射液的制备

添加为注射液总量的重量/体积比为 2~15%的葡萄糖作为助溶剂, 利用葡萄糖中的多羟基与异黄酮基缔合形成氢键, 从而大大增加了其在水中的溶解度。

鸢尾苷元磺酸钠为例, 其在室温下的水溶解度仅为 20mg/ml (2%), 达不到用药浓度; 加热至 60-100℃后的水溶解度可增至 50-60mg/ml(5-6%), 冷却至室温后又析出沉淀。但在注射液中加入 2-15%的葡萄糖后, 能够保持在室温和低温 (0℃-5℃) 下放置保持澄清, 而且可以用水或糖盐水任意稀释, 不出混浊。因此其不但可供肌肉注射, 还可加入糖和/或盐水中用于静脉注射。这就表明了葡萄糖在增加鸢尾苷元磺酸钠在水中的溶解度的同时, 还能大大提高注射制剂药物的稳定性。

称取鸢尾苷元磺酸钠 100g, 注射用葡萄糖 150g, 溶解于 1500ml 注射用水中, 待溶解完全后加入注射用水至体积 2000ml, 用 G4 垂熔玻砂漏斗过滤后, 滤液以常规方式封装于安瓿瓶中, 并按常规方式作灭菌处理。所得注射液为淡黄色的澄明液体。

称取式 (V) 化合物 100g, 注射用葡萄糖 100g, 溶解于 1500ml 注射用水中, 待溶解完全后加入注射用水至体积 2000ml, 用 G4 垂熔玻砂漏斗过滤后, 滤液以常规方式封装于安瓿瓶中, 并按常规方式作灭菌处理。所得注射液为淡黄色的澄明液体。

称取鸢尾苷元磺酸钠 100g, 注射用葡萄糖 80g, 溶解于 1500ml 注射用水中, 待溶解完全后加入注射用水至体积 2000ml, 用 G4 垂熔玻砂漏斗过滤后, 滤液以常规方式封装于安瓿瓶中, 并按常规方式作灭菌处理。所得注射液为淡黄色的澄明液体, 然后置于冷冻干燥机中进行冻干 15-28 小时, 即得到黄色疏松的冻干粉针。

2. 口服制剂的制备

包括：片剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、丸剂、滴丸和微丸、各种溶液剂等。

作为固体口服制剂散剂是各种剂型的基础，因为我们合成产生的衍生物都是淡黄色到黄色固体，进行烘干然后粉碎成细粉（指全部能通过五号筛，含有能通过六号筛不少于 95% 的粉末。）然后过筛、加入适量辅料滑石粉增加其流动性，分装，即得。

颗粒剂的制备：把药物与辅料粉碎后进行充分的混合，然后加入适当的粘合剂进行制粒，干燥，整粒，分装，即可。

胶囊剂的制备：胶囊剂分为软胶囊和硬胶囊，硬胶囊是采用药物的粉末或者是颗粒进行装胶囊制得，软胶囊是把药液密封于球形或软质胶囊材料中。采用合适的材料干明胶：甘油：水=1：0.4：混合均匀，调配好作为软胶囊的囊壁，溶液药物 PH 值调到 4.5-7.5，也可采用固体药物粉末需要通过 80 目筛，然后滴制法或压制法制备软胶囊。另外，可以制成肠溶胶囊。

另外，按照常规制剂的程序，选用不同的辅料如：乙烯-醋酸乙烯共聚物 (EVA)、聚丙烯等，作为缓控释可以制成缓、释控释的制剂骨架。如将鳶尾苷元衍生物药物制成微囊，然后装入普通空胶囊中，可以成为按照需要进行药物释放的产品。

滴丸或微丸：滴丸的优点是发挥药效迅速，生物利用度高，副作用小，液体药物制成固体滴丸便于服用和运输，增加药物稳定性，生产设备简单，操作容易，重量差异小，成本低无粉尘，根据需要可以制成内服、外用、缓释、控释或局部治疗等多种类型的滴丸剂。

取药物基质，如：聚乙二醇类、硬脂酸加热后，将药液与基质混合均匀，置于滴丸机中保温，然后滴制到适当的冷凝剂中盛碗，洗除冷凝剂干燥整理，经过质检后包装。

片剂：

包括普通压制片、咀嚼片、泡腾片、多层片、缓释片、控释片，包衣片（糖衣片、薄膜衣片、肠溶衣片）、分散片、口含片、舌下片等

鳶尾苷元衍生物 50g，淀粉、糖粉 950g，将以上原辅料进行粉碎、过筛、混合均匀，加入适量的粘合剂形成软材，过筛，成为颗粒，干燥整粒，加入崩解剂、润滑剂充分混合，然后压片，包衣，质检，包装。

缓释片控释片

将鳶尾苷元衍生物 50g, 加入骨架剂聚乙烯稀、聚丙烯混合均匀, 压片, 按照普通的制剂方法, 制成缓释片 1000 片。药物缓缓释放, 在药物释放完后, 骨架随着粪便排出体外。

5 3. 外用制剂的制备:

包括有: 洗剂、滴眼剂、喷雾剂、眼膏剂、凝胶剂、栓剂、搽剂、软膏剂、滴鼻剂、滴耳剂、膜剂, 透皮贴剂等。

眼膏剂将衍生物作为原料粉碎成极细粉(指全部能通过七号筛, 含有能通过八号筛不少于 95% 的粉末。)加入适量基质, 制备成眼用凝胶或者眼药膏。

10 外用散剂的原辅料粉碎成最细粉(指全部能通过六号筛, 含有能通过七号筛不少于 95% 的粉末。)一般作为外敷用的散剂可以杀灭病毒, 或者预防病毒感染。

滴眼剂: 将鳶尾苷元衍生物 20g 进行配液加入 PH 值调节剂磷酸盐缓冲液, 调节 PH 值为 5.9-8.0 之间, 加入渗透压调节剂适量葡萄糖, 调节渗透压相当
15 于 0.6-1.5% 氯化钠的渗透压, 加入少量聚乙二醇粘度调节剂, 加水 980g 配液后进行过滤, 将滤液灭菌后无菌操作分装入瓶即可。

喷雾剂、滴鼻剂、滴耳剂与滴眼剂的制备方法相似, 只不过对于渗透压、ph 值要求不是很严格。

软膏剂、搽剂

20 把鳶尾苷元衍生物 40g 粉碎成最细粉, 采用水溶性基质聚乙二醇 600 和 2000 为基质 960g (配比为 4: 6) 加热混合均匀后, 质检分装, 可以得到有一定稠度的半固体外用制剂。

凝胶剂

25 把鳶尾苷元衍生物 40g 粉碎, 溶解在水中, 把水溶性基质卡波普制成水凝胶基质, 然后与药物混合加水到 1000ml, 质检分装, 可以得到透明或半透明的凝胶剂。

栓剂

30 把鳶尾苷元衍生物 40g 粉碎成最细粉, 采用水溶性基质聚乙二醇 600 和 18000 为基质 960g (配比为 4: 6) 加热混合均匀后, 倒入涂有液体石蜡的模具中, 冷却成型, 质检包装, 可以得到符合规定的融变时限的固体外用制剂。

涂膜剂

把鳶尾苷元的衍生物和高分子成膜材料聚乙稀缩甲乙醛（按照 4: 96）共同溶解在乙醇里制成了可以涂布成膜的外用制剂。

透皮贴剂

- 5 首先把鳶尾苷元衍生物 60g 粉碎成细粉加水成为溶液，再把水溶性聚合物 PVA、PVP 加水混合均匀后，与药物水溶液混合形成凝胶药库，质检分剂量，同时把压敏胶丙烯酸涂布在背衬材料聚丙烯上可以得到粘胶层，分割成大于药库面积，然后与凝胶药库复合，再在表面加上一层防粘材料聚乙稀高聚物，包装形成透皮贴剂。

10

【实施例 9】鳶尾苷元磺酸钠的急性毒性实验和抗病毒药效实验

以上述得到的式(IV) 鳶尾苷元磺酸钠注射液（50mg/ml）为实验样品，进行了下述各项实验：

一、急性毒性试验

- 15 以体重 18~20g 雌雄各半的小鼠为试验动物，分别以肌肉注射、经脉注射和腹腔注射方式给药。肌肉注射（im）给药为以 0.2ml/10g（500mg/kg）分别注射于双侧后腿肌肉处；静脉注射（iv）为分组均以尾静脉给药，各组剂量分别是 841.5mg/kg、781.25mg/kg、725.25mg/kg、673.25mg/kg、625.0mg/kg 和 580.2mg/kg；腹腔注射（ip）给药剂量为 0.4mg/10g（即相当于 1000mg/kg）。
20 分别观察各组实验动物给药后的毒性反应情况及死亡情况，每天 1 次，至 14 天。发现死亡动物立即解剖观察。用半数效量概率单位法（加权直线回归法）测定半数致死剂量。实验结果：1. 肌肉注射给药的试验动物精神状态、被毛、饮食饮水、生长发育等各项反应均未见异常，注射后的 14 天内，20 只小鼠无 1 只死亡，故一次肌肉注射给药的小鼠最大耐受量为 500mg/kg，半数致死量应
25 在 500mg/kg 以上。2. 经脉注射给药试验动物 LD₅₀=725.81mg/kg，95%可信限为 669.92mg/kg ~ 785.53mg/kg；中试产品用序贯法测定的 LD₅₀ =868.2mg/kg，LD₅₀ 的 95%可信限为 798.2 ~ 944.4mg/kg。3. 腹腔注射试验动物的 14 天内无 1 只死亡，一次腹腔注射给药的小鼠最大耐受量为 1000mg/kg。

- 30 三种给药途径的急性毒性试验结果表明，作为试验样品的上述抗病毒注射液的毒性较低，im 和 ip 给药均测不出 LD₅₀，最大耐受量分别为 500mg/kg 和

1000mg/kg; iv 的 LD₅₀ 为 725.81mg/kg 和 868.2mg/kg。

二、体外抗病毒实验

试验药物为本发明的上述注射液样品; 对照药物为注射用穿琥宁 (40mg/ml) (批号 000501, 成都制药三厂生产); 空白对照为 Hanks 液 (四川省人民医院检验科病毒实验室提供)。

实验用的细胞株为: Hep-2、HL16C 细胞 (均由汕头华茵生物工程应用研究所细胞工程研究室提供)。病毒株为: 腺病毒 ADV3 型, ADV7 型, 呼吸道合胞病毒 (RSV), 流感病毒 (Flu·V) 甲 1、甲 3 型, 及柯萨奇 B 组病毒 (CoxBV) 混全株 (分别由首都儿科研究所、中国预防医科院病毒研究所和四川省卫生防疫站提供), 试验前分别测 TCID₅₀。

实验方法:

1. 细胞毒性试验

取试验样品注射液、注射用穿琥宁, 用 Hanks 液分别从 10mg/ml 作倍比稀释, 二种稀释后的药液即为 10mg/ml、5mg/ml、2.5mg/ml、1.25mg/ml。取以上二种药物 4 种不同浓度药液分别接种 Hep-2、Z-HL16C 细胞, 同步设细胞对照加足 2% 小牛血清 Eagles 维持液, 置 37℃ 温箱, 逐日观察以上细胞毒性反应。细胞毒性试验结果如表 2 所示。

表 2 细胞毒性试验结果

药 物	病 毒	药物浓度 (mg/ml)				病 毒 对 照	对 照 细 胞
		10	5	2.5	1.25		
试验样品	Hep-2	-	-	-	-	-	-
	Z-HL16C	-	-	-	-	-	-
穿琥宁	Hep-2	-	-	-	-	-	-
	Z-HL16C	-	-	-	-	-	-
空白对照 (Hanks 液)	Hep-2	-	-	-	-	-	-
	Z-HL16C	-	-	-	-	-	-

(注: “-” 表示细胞无任何毒性反应)

表 2 的结果显示, 各剂量组 (10~1.25mg/ml) 的试验样品药液和对照药穿琥宁, 以及空白对照 (Hanks 液), 对 Hep-2 和 Z-HL16C 细胞均无任何毒性反应。

2. 抗病毒试验

取 100TCID₅₀ADV3、ADV7、Flu·V 甲 1、甲 3 型、CoxBV 及 RSV 病毒分别接种 Hep-2 和 Z-HL16C 细胞 (Flu·V、甲 1、甲 3 型接种 Z-HL16C 细胞), 等吸附 30 分钟后, 洗去病毒液分别加入试验样品和穿琥宁无毒界限药液, (即 10mg/ml、5mg/ml、2.5mg/ml、1.25mg/ml) 同时设病毒对照、细胞对照、空白对照 (Hanks 液) 同步与以上药物同时进行。细胞维持液为 2% 小牛血清 Eagles 液, 置 37℃ 培养箱内, 每天观察 Hep-2、Z-HL16C 细胞病变, 记录各细胞管病变情况。抗 RSV 试验, 接种病毒和无毒界线药物后, 平放 37℃ 培养箱 24 小时后, 移放 35℃ 旋转培养器 (12 转/分)、逐日观察细胞病变。细胞管出现 PH 下降, 应立即进行换液。试验中凡病毒对照出现 2+~3+ 病变, 细胞对照管, 形态正常, 生长良好, 可终止该试验。试验结果如表 3 所示。

表 3 的结果显示, 本发明试验样品注射液 10mg/ml 药液对 ADV3、ADV7、CoxBV、Flu·V 甲 1 及 RSV 的致细胞病变具有抑制作用, 对 Flu·V 甲 3 有部分抑制作用。5mg/ml 药液对 Flu·V 甲 1、RSV 的致细胞病变具有抑制作用, 对 ADV3、CoxBV 有部分抑制作用。2.5mg/ml 药液对 Flu·V 甲 1 有抑制作用。穿琥宁 10mg/ml 药液对 ADV3.7、CoxBV、Flu·V 甲 1 及 RSV 的致细胞病变具有抑制作用。其它浓度药液及空白对照各管均不能抑细胞病变。

表 3 抗病毒试验报告

药 物	病 毒	药物浓度 (mg/ml)				病毒对照	对照细胞
		10	5	2.5	1.25		
试验样品	AdV ₃	-	1+	2+	3+	3+	-
	AdV ₇	-	2+	3+	3+	3+	-
	CoxBV	-	1+	2+	3+	3+	-
	Flu·V 甲 ₁	-	-	-	2+	3+	-
	Flu·V 甲 ₃	1+	2+	2+	3+	3+	-
	RSV	-	-	2+	3+	3+	-
穿琥宁	AdV ₃	-	2+	2+	3+	3+	-
	AdV ₇	-	2+	2+	3+	3+	-
	CoxBV	-	2+	2+	3+	3+	-
	Flu·V 甲 ₁	-	2+	2+	3+	3+	-
	Flu·V 甲 ₃	2+	2+	2+	3+	3+	-
	RSV	-	2+	3+	3+	3+	-
空白对照 (Hanks 液)	AdV ₃	3+	3+	3+	3+	3+	-
	AdV ₇	3+	3+	3+	3+	3+	-
	CoxBV	3+	3+	3+	3+	3+	-
	Flu·V 甲 ₁	3+	3+	3+	3+	3+	-
	Flu·V 甲 ₃	3+	3+	3+	3+	3+	-
	RSV	3+	3+	3+	3+	3+	-

(注: “-” 表示细胞无病变。1+--3+ 表示细胞病变程度。)

上述的实验结果表明,在感染 100TCID₅₀ 病毒的情况下,本发明试验样品注射液 10mg/ml 浓度下对腺病毒 3 型、腺病毒 7 型、柯萨奇 B 组病毒、流感病毒甲 1、甲 3 型及呼吸道合胞病毒均有不同程度的抑制作用,对流感病毒甲 1 及呼吸道合胞病毒抑制作用效果较好。对照药物穿琥宁 10mg/ml 的药液对腺病毒 3 型、腺病毒 7 型、柯萨奇 B 组病毒、流感病毒甲 1、甲 3 型及呼吸道合胞病毒均有抑制作用。实验结果已提示,本发明的试验样品注射液对流感病毒甲 1 型及呼吸道合胞病毒的抑制作用均可优于目前已有使用的注射用穿琥宁药物。

10 【实施例 10】抗病毒药效实验

以上述的各例典型鸢尾昔元衍生物作为试验药物样品,进行了下述各项药效实验。

一、抗病毒实验

各试验药物为本发明的衍生物制成的注射液样品,和口服胶囊、颗粒、片剂、溶液剂及滴眼剂、搽剂、乳膏、洗剂、滴眼剂等外用剂;对照药物为注射用穿琥宁(40mg/ml)(成都制药三厂生产);病毒唑空白对照为 Hanks 液(四川省人民医院检验科病毒实验室提供)。

实验用的细胞株为: Hep-2、Z-HL16C 细胞(均由第四军医大学细胞工程研究室提供)。病毒株为:腺病毒 ADV3 型,ADV7 型,呼吸道合胞病毒(RSV),流感病毒(Flu·V)甲 1、甲 3 型,及柯萨奇 B 组病毒(CoxBV)混全株(分别由中国预防医科院病毒研究所和四川省卫生防疫站提供),试验前分别测 TCID₅₀。

实验方法:

1. 细胞毒性试验

将试验样品注射剂、口服胶囊、颗粒、片剂、丸剂,滴眼液、眼膏剂等外用制剂进行溶解,配制成需要的浓度,注射用穿琥宁,用 Hanks 液分别从 10mg/ml 作倍比稀释,稀释后的药液即为 10mg/ml、5mg/ml、2.5mg/ml、1.25mg/ml。取以上二种药物 4 种不同浓度药液分别接种 Hep-2、Z-HL16C 细胞,同步设细胞对照加足 2%小牛血清 Eagles 维持液,置 37℃温箱,逐日观察以上细胞毒性反应。细胞毒性试验结果如表 2 所示。

表 4 细胞毒性试验结果

药 物	细 胞	药物浓度 (mg/ml)				对 照 细 胞
		8	5	2.5	1.25	
化合物 (V)	Hep-2	-	-	-	-	-
	Z-HL ₁₆ C	-	-	-	-	-
化合物 (VI)	Hep-2	-	-	-	-	-
	Z-HL ₁₆ C	-	-	-	-	-
化合物 (VII)	Hep-2	-	-	-	-	-
	Z-HL ₁₆ C	-	-	-	-	-
化合物 (VIII)	Hep-2	-	-	-	-	-
	Z-HL ₁₆ C	-	-	-	-	-
化合物 (IX)	Hep-2	-	-	-	-	-
	Z-HL ₁₆ C	-	-	-	-	-
化合物 (X)	Hep-2	-	-	-	-	-
	Z-HL ₁₆ C	-	-	-	-	-
空白对照 (Hanks 液)	Hep-2	-	-	-	-	-
	Z-HL ₁₆ C	-	-	-	-	-

(注:“-”表示细胞无任何毒性反应)

表 4 的结果显示,各剂量组(8~1.25mg/ml)的试验样品药液和对照药穿琥宁,以及空白对照(Hanks 液),对 Hep-2 和 Z-HL16C 细胞均无任何毒性反应。

2. 抗病毒试验

取 100TCID₅₀ADV3、ADV7、Flu·V 甲 1、甲 3 型、CoxBV 及 RSV 病毒分别接种 Hep-2 和 Z-HL16C 细胞(Flu·V、甲 1、甲 3 型接种 Z-HL16C 细胞),等吸附 30 分钟后,洗去病毒液分别加入试验样品和穿琥宁无毒界限药液,(即 8mg/ml、5mg/ml、2.5mg/ml、1.25mg/ml)同时设病毒对照、细胞对照、空白对照(Hanks 液)同步与以上药物同时进行。细胞维持液为 2%小牛血清 Eagles 液,置 37℃培养箱内,每天观察 Hep-2、Z-HL16C 细胞病变,记录各细胞管病变情况。抗 RSV 试验,接种病毒和无毒界线药物后,平放 37℃培养箱 24 小时后,移放 35℃旋转培养器(12 转/分)、逐日观察细胞病变。细胞管出现 PH 下降,应立即进行换液。试验中凡病毒对照出现 2+~3+病变,细胞对照管,形态正常,生长良好,可终止该试验。试验结果如表 5 所示。

表 5 的结果显示,本发明试验样品注射液 10mg/ml 药液对 ADV3、ADV7、CoxBV、Flu·V 甲 1 及 RSV 的致细胞病变具有抑制作用,对 Flu·V 甲 3 有部分抑制作用。5mg/ml 药液对 Flu·V 甲 1、RSV 的致细胞病变具有抑制作用,对 ADV3、CoxBV 有部分抑制作用。2.5mg/ml 药液对 Flu·V 甲 1 有抑制作用。穿琥宁 8mg/ml 药液对 ADV3.7、CoxBV、Flu·V 甲 1 及 RSV 的致细胞病变具有抑制作用。其它浓度药液及空白对照各管均不能抑细胞病变。

表5 抗病毒试验报告

药 物	病 毒	药物浓度 (mg/ml)				病毒 对照	对照 细胞
		8	5	2.5	1.25		
化合物 (V)	AdV ₃	-	1+	1+	2+	3+	-
	AdV ₇	-	1+	2+	2+	3+	-
	CoxBV	-	1+	1+	3+	3+	-
	Flu • V _{甲1}	-	-	-	2+	3+	-
	Flu • V _{甲3}	-	1+	2+	3+	3+	-
	RSV	-	-	2+	3+	3+	-
	HSV-1	-	-	-	1+	3+	-
	VZV	-	1+	1+	1+	3+	-
化合物 (VI)	AdV ₃	-	1+	2+	3+	3+	-
	AdV ₇	-	2+	2+	3+	3+	-
	CoxBV	-	2+	2+	2+	3+	-
	Flu • V _{甲1}	-	-	-	2+	3+	-
	Flu • V _{甲3}	1+	2+	2+	3+	3+	-
	RSV	-	-	2+	3+	3+	-
	HSV-1	-	1+	2+	3+	3+	-
	VZV	-	2+	2+	3+	3+	-
化合物 (VII)	AdV ₃	-	1+	1+	2+	3+	-
	AdV ₇	-	2+	3+	3+	3+	-
	CoxBV	-	1+	2+	3+	3+	-
	Flu • V _{甲1}	-	-	-	2+	3+	-
	Flu • V _{甲3}	1+	2+	2+	3+	3+	-
	RSV	-	-	2+	3+	3+	-
	HSV-1	-	1+	1+	1+	3+	-
	VZV	-	1+	1+	2+	3+	-
化合物 (VIII)	AdV ₃	-	1+	2+	3+	3+	-
	AdV ₇	-	2+	3+	3+	3+	-
	CoxBV	-	1+	2+	3+	3+	-
	Flu • V _{甲1}	-	-	-	2+	3+	-
	Flu • V _{甲3}	1+	2+	2+	3+	3+	-
	RSV	-	-	2+	3+	3+	-
	HSV-1	-	1+	1+	2+	3+	-
	VZV	-	-	2+	2+	3+	-
化合物 (IX)	AdV ₃	-	1+	3+	3+	3+	-
	AdV ₇	-	2+	3+	2+	3+	-
	CoxBV	-	1+	2+	3+	3+	-
	Flu • V _{甲1}	-	-	-	2+	3+	-
	Flu • V _{甲3}	1+	2+	2+	3+	3+	-
	RSV	-	-	2+	2+	3+	-
	HSV-1	-	-	2+	2+	3+	-
	VZV	1+	2+	2+	3+	3+	-
化合物 (X)	AdV ₃	-	1+	2+	3+	3+	-
	AdV ₇	-	2+	3+	3+	3+	-
	CoxBV	-	1+	3+	3+	3+	-
	Flu • V _{甲1}	-	-	-	2+	3+	-
	Flu • V _{甲3}	1+	2+	2+	3+	3+	-
	RSV	-	-	2+	3+	3+	-
	HSV-1	-	1+	2+	3+	3+	-
	VZV	-	-	1+	2+	3+	-
利巴韦林	AdV ₃	-	1+	2+	3+	3+	-
	AdV ₇	-	2+	3+	3+	3+	-
	CoxBV	-	2+	2+	3+	3+	-
	Flu • V _{甲1}	-	1+	1+	3+	3+	-
	Flu • V _{甲3}	1+	3+	3+	3+	3+	-

穿琥宁	RSV	-	-	2+	3+	3+	-
	HSV-1	-	1+	2+	3+	3+	-
	VZV	-	1+	2+	3+	3+	-
	AdV ₃	-	2+	2+	3+	3+	-
	AdV ₇	-	2+	2+	3+	3+	-
	CoxBV	-	2+	2+	3+	3+	-
	Flu · V _{甲1}	-	2+	2+	3+	3+	-
	Flu · V _{甲3}	2+	2+	2+	3+	3+	-
	RSV	-	2+	3+	3+	3+	-
	HSV-1	1+	2+	3+	3+	3+	-
空白对照 (Hanks 液)	VZV	1+	2+	3+	3+	3+	-
	AdV ₃	3+	3+	3+	3+	3+	-
	AdV ₇	3+	3+	3+	3+	3+	-
	CoxBV	3+	3+	3+	3+	3+	-
	Flu · V _{甲1}	3+	3+	3+	3+	3+	-
	Flu · V _{甲3}	3+	3+	3+	3+	3+	-
	RSV	3+	3+	3+	3+	3+	-
	HSV-1	3+	3+	3+	3+	3+	-
	VZV	3+	3+	3+	3+	3+	-

(注:“-”表示细胞无病变。1+~3+表示细胞病变程度。)

上述的实验结果表明,在感染 100TCID₅₀ 病毒的情况下,本发明试验样品注射液 10mg/ml 浓度下对腺病毒 3 型(ADV3)、腺病毒 7 型(ADV7)、柯萨奇 B 组病毒(CoxBV)、流感病毒甲 1、(Flu · V_{甲1}) 甲 3 型(Flu · V_{甲3} 型)及呼吸道合胞病毒(RSV)均有不同程度的抑制作用,对流感病毒甲 1 及呼吸道合胞病毒抑制作用效果较好。对照药物穿琥宁 10mg/ml 的药液对腺病毒 3 型、腺病毒 7 型、柯萨奇 B 组病毒、流感病毒甲 1、甲 3 型及呼吸道合胞病毒均有抑制作用。实验结果已提示,本发明的试验样品对流感病毒甲 1 型及呼吸道合胞病毒的抑制作用均可优于目前已有使用的注射用穿琥宁和利巴韦林。

3. 抗 SARS 病毒试验

采用北京 SARS 流行期间病人肺组织分离的病毒 BJ01 株和 Vero-E6 细胞,研究鳕尾萆元衍生物对 Vero-E6 细胞的毒性和对 Vero-E6 细胞内冠状病毒的抑制作用。

3.1 试验材料

(1) 受试药: 将上述各鳕尾萆元衍生物配制成注射液即迪康抗病毒注射液(50mg/2ml), 由四川迪康科技药业股份有限公司提供, 批号: 20030301。

(2) 阳性对照药物: 利巴韦林(病毒唑)注射液, 0.1g/ml, 山东新华制药股份有限公司生产, 批准文号: H19993063, 生产批号: 02100020。临床用途: 用于呼吸道胞病毒引起的病毒性肺炎与支气管炎。临床成人日用量为一次

0.5g, 一日 2 次。

(3) 细胞: Vero-E6 细胞, 本室细胞库保存。用含 10 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37℃ 5%CO₂ 培养箱培养, 2-3 天, 传代一次。

(4) 病毒株: 冠状病毒, 2003 年 2 月 SARS 病流行期间, 从北京病人肺组织
5 中分离, 命名为 BJ01 株。

(5) 试剂: DMEM 培养基和胎牛血清, GibcoBRL 公司产品, 批号分别为 31600-026 和 16000-36。

(6) 仪器: 96 孔细胞培养板, Coming 公司。生物倒置显微镜 XDS-1B 型, 重庆光学仪器厂。

10 3.2 方法和结果

(1) 药品的配制方法

受试药: 鸢尾苷元衍生物, 为淡黄色液体, 4℃ 冰箱保存。阳性对照药配制成 10mg/ml 母液。使用时用细胞生长液配制成所需浓度。

鸢尾苷元衍生物对细胞的毒性试验

15 每毫升 30-40 万个 Vero-E6 细胞接种 96 孔细胞培养板, 每孔 0.1ml, 置 37℃ 5%CO₂ 培养箱培养 18 小时, 加入不同浓度的测试药, 每个浓度 4 孔, 每孔 0.4ml, 同时设无药物细胞对照组, 培养 4-5 天, 以观察细胞病变(CPE) 为指标, 第五天在倒置显微镜下观察 CPE, 完全病变为 4; 75%为 3; 50%为 2; 25%为 1; 无病变为 0。试验重复二次。按照 REED-MUENCHy 方法计算半数
20 有毒浓度(TD50) 和最大无毒浓度(TD0), 结果见表 6。

表 6 鸢尾苷元衍生物注射液对 Vero-E6 细胞的毒性

药 物 稀 释 度	药 物 浓 度 mg/ml	病 变 孔 数 / 细 胞 孔 数	
		鸢尾苷元衍生物	细胞对照组
1: 2	4	3/4	0/4
1: 4	2	2/4	0/4
1: 8	1	0/4	0/4
1: 16	0.5	0/4	0/4
1: 32	0.25	0/4	0/4

由表 6 计算可知, 迪康抗病毒注射液对 Vero-E6 细胞最大无毒浓度(TD0)为 1mg/ml, 半数中毒浓度(TD50)为 2.34mg/ml。说明鸢尾苷元衍生物对 Vero-E6 细胞的毒性比较小, 安全性较好。

4. 鸢尾苷元衍生物对冠状病毒的抑制试验(细胞病变法)

- 5 将 Vero-E6 细胞接种到 96 孔培养板, 37℃培养到单层, 弃掉生长液。将冠状病毒 BJ01 株第 4 代病毒液用 DMEM 维持液稀释为 100 个 TCID₅₀/0.1ml, 每孔 0.1ml 接种 Vero-E6 细胞, 吸附 2 小时, 弃掉病毒液。设立正常细胞对照组、病毒对照组和阳性药物对照组。置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养, 每天观察细胞病变, 观察 5 天, 记录 CPE, 试验重复两次, 结果基本一致。按
- 10 REED-MUENCH 方法计算半数有效浓度(IC₅₀), 治疗指数(TI), 结果见表 7。

表 7 鸢尾苷元衍生物对冠状病毒的抑制作用

药物 稀释度	药物浓度 mg/ml	病变孔数/细胞孔数			
		鸢尾苷元 衍生物	病毒对照	阳性对照 药	正常细胞对 照
1: 1	1	0/4	4/4	0/4	0/4
1: 2	0.5	1/4	4/4	1/4	
1: 4	0.25	1/4	4/4	2/4	
1: 8	0.125	1/4	4/4	2/4	
1: 16	0.0625	2/4	4/4	3/4	
1: 32	0.03125	4/4	4/4	4/4	

由表 7 计算可知, 鸢尾苷元衍生物浓度 0.0976mg/ml 对冠状病毒具有抑制作用。

四、结论如下::

- 15 表 8 鸢尾苷元衍生物对 Vero-E6 细胞的毒性和对冠状病毒抑制作用总结表

药物名称	TD ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)
化合物 IV	4.34	0.0976
化合物 V	4.52	0.0968
化合物 VI	3.85	0.1200

化合物VII	4.20	0.1015
化合物VIII	3.45	0.1120
化合物IX	2.89	0.1251
化合物X	3.95	0.1187

上述的试验结果表明:

(1) 本发明的鸢尾苷元衍生物对 Vero-E6 细胞的毒性: 鸢尾苷元衍生物加入 Vero-E6 细胞培养 5 天, 以细胞病变为指标, 半数中毒浓度(TD50) 为 2.34mg/ml, 最大无毒浓度(TD0) 为 1mg/ml。

(2) 鸢尾苷元衍生物在 Vero-E6 细胞内对冠状病毒具有抑制作用: 鸢尾苷元衍生物注射液加入 Vero-E6 细胞培养 5 天, 半数有效浓度(IC50) 为 0.0976mg/ml, 鸢尾苷元衍生物注射液对冠状病毒的最小治疗指数为 23.98。

5. 对禽流感 H5N1 和 H9N2 亚型病毒的杀灭效果试验

以上述各实施例的鸢尾苷元衍生物作为试验药物, 进行了下述体外杀灭禽流感病毒(AIV) 的试验。

(1) 材料与方法

1.1 受试药

各实施例的鸢尾苷元衍生物溶液(淡黄色液体, 每毫升含 30mg 生药)。

1.2 禽流感病毒

毒株为 A/Goose/GuangDong/1/96(H5N1) 、 A/Chicken/Shandong/6/96

(H9N2), 由依托于中国农业科学院哈尔滨兽医研究所的农业部动物流感重点开放实验室保存。

1.3 鸡胚

10 日龄 SPF 鸡胚, 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

1.4 预备试验

1.4.1 病毒 EID50 的测定

将禽流感 H5、H9 亚型病毒 10 倍系列稀释, 接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 每个稀释度 5 枚鸡胚(0.1ml/胚), 测定病毒的半数感染剂量(EID50)。

1.4.2 受试药母液的调制

上述的各鳕尾昔元衍生物为母液，每毫升含 30mg 生药。

1.4.3 受试药对鸡胚的最大无毒剂量

将每毫升 30mg、15mg、7.5mg、3.75mg、1.875mg、0.9375mg、0.46875mg、0.234375mg、0.1171875mg 生药的受试药溶液分别接种 10 日龄 SPF 鸡胚，第 5 个稀释度接种 5 枚鸡胚(0.1ml/胚)。将接种的鸡胚置 37℃温箱中培养 96 小时。24 小时死亡的鸡胚去掉，记录鸡胚死亡情况。

1.5 受试药对病毒的杀灭率试验

采用 Klein-Defors 悬浮方法进行受试药对强、弱两种禽流感病毒的杀灭试验，以灭菌生理盐水对受试药进行 10 倍系列稀释，接种并检测感染鸡胚情况。

10 1.5.1 病毒悬液的制备

分别将禽流感 H5、H9 亚型病毒制成 107.63EID50/0.1ml、108.17EID50/0.1ml 病毒悬液。

1.5.2 受试药的配制

以上述的各鳕尾昔元衍生物为原料，做杀灭试验时用灭菌生理盐水稀成所 15 需的浓度。

1.5.3 Klein-Defors 悬浮杀灭试验

分别取 107.63EID50 禽流感 H5 亚型病毒悬液、108.17EID50H9 亚型病毒悬液与浓度为每毫升含 30mg、15mg、7.5mg、3.75mg、3.0mg、1.875mg、1.5mg、0.75mg、0.375mg 生药的鳕尾昔元衍生物按 1: 9 混合，在 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下作用 20 5 分钟后，再用灭菌生理盐水做 10 倍递进稀释。对照组用灭菌生理盐水代替消毒液，同法处理；稀释液接种 10 日龄 SPF 鸡胚，每个稀释度接种 5 枚鸡胚(0.1ml/胚)。将接种的鸡胚置 37℃温箱中培养，记录鸡胚死亡情况。24 小时以内死亡的鸡胚去掉，24 小时以后的死胚及时取出，至 96 小时全部取出，逐个取尿囊液做血凝(HA) 试验，血凝试验阳性者判为鸡胚感染。

25 按照鸡胚感染的结果，按下列方程式计算试验组和对照组鸡胚感染的阳性率、样本含 EID50 与杀灭率。

阳性率=血凝阳性鸡胚数/接种鸡胚数；样本含 EID50 量的对数= $L-d(S-0.5)$

(L 为最低稀释倍数的对数；d 为稀释度间对数的差；S 为各稀释列阳性率之和。)

30 病毒杀灭率=(对照样本含 EID50 量-试验样本含 EID50 量/对照样本含

EID50 量 $\times 100\%$)

(2) 试验结果

2.1 受试药对鸡胚的最大无毒剂量

5 用灭菌生理盐水稀释的每毫升含 30mg、15mg、7.5mg、3.75mg、1.875mg、0.9375mg、0.46875mg、0.234375mg、0.1171875mg 生药的鳶尾昔元衍生物注射鸡胚，试验结果显示不同浓度药物接种鸡胚后不引起鸡胚死亡，表明受试药原液及原液的各种稀释度药物对鸡胚无眼观毒害作用。结果如表 9 所示。

表 9 受试药对鸡胚的最大无毒剂量

	各个鳶尾昔元衍生物不同浓度 mg/ml								
	30	15	7.5	3.75	1.875	0.938	0.469	0.234	0.117
鸡胚死亡情况	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

注：分子为死亡胚数，分母为接胚数

10 2.2 受试药对禽流感病毒的杀灭作用

用灭菌生理盐水稀释的每毫升 30mg、15mg、7.5mg、3.75mg、3.0mg、1.875mg、1.5mg、0.75mg、0.375mg 的鳶尾昔元衍生物与 107.63EID50 禽流感 H5 亚型病毒液作用 5 分钟，分别测定杀灭病毒率，各稀释浓度的鳶尾昔元衍生物与 108.17EID50 禽流感 H9 亚型病毒作用 5 分钟，分别测定杀灭病毒率。

15 结果见表 10。

表 10 不同浓度的鳶尾昔元衍生物对禽流感 H5N1、H9N2 亚型病毒的杀灭作用

鳶尾昔元衍生物 mg/ml										
样 品	病毒名称	30	15	7.5	3.75	3.0	1.875	1.5	0.75	0.375
化合物 IV	H5 亚型	100%	99.99%	99.99%	99.99%	93.23%	32.39%	32.39%	0	0
	H9 亚型	100%	100%	99.99%	99.99%	99.00%	68.37%	32.39%	0	0
化合物 V	H5 亚型	100%	99.99%	99.99%	99.99%	92.53%	32.40%	32.40%	0	0
	H9 亚型	100%	100%	99.98%	99.98%	98.60%	67.35%	31.69%	0	0
化合物 VI	H5 亚型	95.98%	95.98%	95.98%	95.98%	91.50%	29.32%	39.32%	0	0
	H9 亚型	96.99%	96.99%	96.99%	96.99%	94.55%	58.37%	28.39%	0	0
	H5 亚型	99.87%	99.87%	99.87%	99.87%	92.30%	45.19%	45.19%	0	0

VII	H9 亚型	99.25%	99.25%	99.25%	99.25%	98.00%	58.31%	28.85%	0	0
化合物	H5 亚型	99.56%	99.56%	99.56%	99.56%	91.13%	30.30%	30.30%	0	0
VIII	H9 亚型	99.69%	99.69%	99.69%	99.69%	94.00%	65.34%	32.19%	0	0
化合物	H5 亚型	95.21%	95.21%	95.21%	95.21%	92.41%	30.52%	30.52%	0	0
IX	H9 亚型	98.20%	98.20%	96.41%	96.41%	93.00%	41.41%	31.39%	0	0
化合物	H5 亚型	98.96%	98.96%	98.96%	98.96%	91.01%	28.69%	28.69%	0	0
X	H9 亚型	99.95%	100%	99.99	99.99%	99.00%	68.37%	32.39%	0	0

上述试验结果显示：采用 Klein-Defors 悬浮杀灭与感染试验方法，研究鸢尾苷元衍生物在不同浓度下，分别与禽流感 H5N1 和 H9N2(9: 1) 在体外直接接触作用 5 分钟，以此来检测体外该受试药对禽流感病毒的杀灭效果。结果表明，鸢尾苷元衍生物每毫升含 3.0mg 生药的浓度时与禽流感病毒作用 5 分钟，有一定的杀病毒作用；每毫升含 3.75-30mg 生药的浓度范围内与禽流感病毒作用 5 分钟，对病毒的杀灭率可达到 95% 以上，有良好的杀病毒作用。

安全性试验显示，母液系列稀释接种鸡胚，不引起鸡胚死亡，表明受试药母液及原液的各种稀释度药物以对鸡胚无眼观毒害作用。

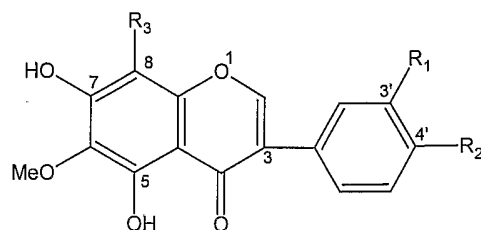
10 工业应用性

经本发明化学修饰后所得到的式(II)结构形式的鸢尾苷元化合物衍生物，在保持了与其前体原料，即原始提取得到的鸢尾苷元化合物相当的抗病毒、抗炎作用的前提下，能极大地提高了其水溶性及化学稳定性，且制备方法简便，成本低廉，安全可靠，无需特殊设备，也无“三废”污染。由于中药的成分复杂，质量稳定性难以控制，因此本发明提供的鸢尾苷元的异黄酮化合物衍生物，对于扩大其在制药及临床上的使用范围，特别是在能将其制备成具有抗病毒、抗炎作用的注射液方面，具有重要的积极意义和良好的发展前景。

以上对本发明的详细描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变和变形，只要不脱离本发明的精神，均应属于本发明所附权利要求的范围。

权利要求书

1. 化学名称为 5,7,4' -三羟基-6-甲氧基异黄酮类的鸢尾苷元化合物的衍生物, 结构如式(II)所示:



(II)

其中: 式中的 R1 为 H、NH₂ 或 SO₃M;

R2 为 OR' ;

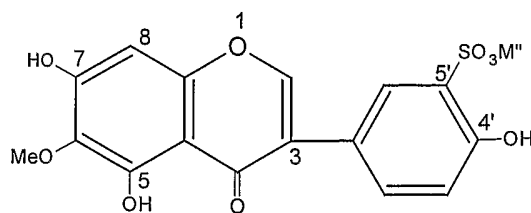
R3 为 H 或 -CH₂NR'' ;

其中 R' 为 H、-CH₂COONa 或 -CH₂CH₂NMe₂;

NR'' 为  或 -NMe₂;

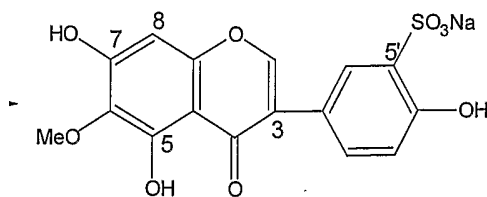
M 为 H、Na、K 或 N⁺H(CH₂CH₂OH)₃。

2. 如权利要求 1 所述的鸢尾苷元化合物的衍生物, 其特征是所说的式(II)结构中的 R1 为 SO₃M'', 其中 M'' 可以为 H、Na、K 或 -N⁺H(CH₂CH₂OH)₃, 结构如式(III)所示:



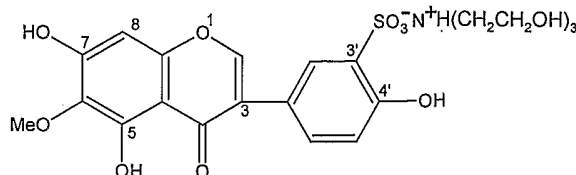
(III)

3. 如权利要求 2 所述的鸢尾苷元化合物的衍生物, 其特征是所说的式(III)结构中的 M'' 为 Na, 结构如式(IV)所示:



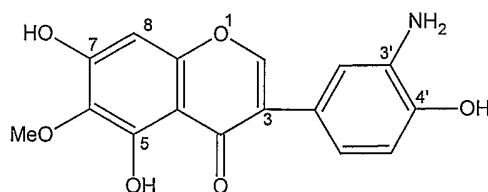
(IV)

4. 如权利要求 2 所述的鸢尾苷元化合物的衍生物,其特征是所说的式(III)结构中的 R1 为 $-\text{SO}_3^-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$, 结构如式(V)所示:



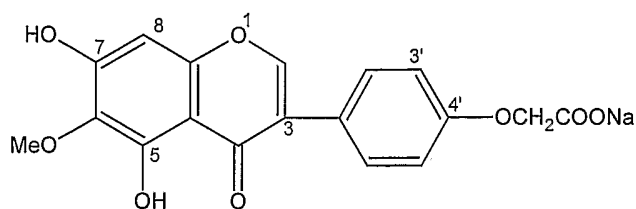
(V)

5. 如权利要求 1 所述的鸢尾苷元化合物的衍生物,其特征是所说的式(II)结构中的 R1 为 NH_2 , R2 为 OH , R3 为 H , 结构如式(VI)所示:



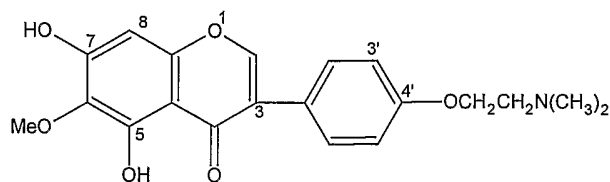
(VI)

6. 如权利要求 1 所述的鸢尾苷元化合物的衍生物,其特征是所说的式(II)结构中的 R1 为 H , R2 为 $-\text{OCH}_2\text{COONa}$, R3 为 H , 结构如式(VII)所示:



(VII)

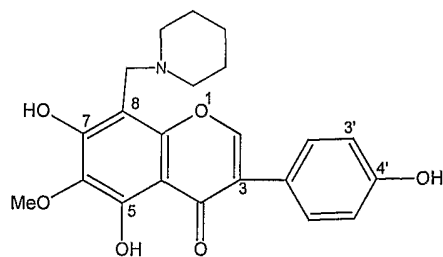
7. 如权利要求 1 所述的鸢尾苷元化合物的衍生物,其特征是所说的式(II)结构中的 R1 和 R3 为 H , R2 为 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$, 结构如式(VIII)所示:



(VIII)

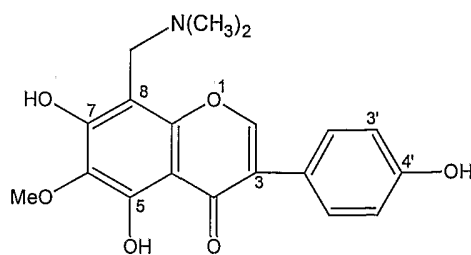
8. 如权利要求 1 所述的鸢尾苷元化合物的衍生物,其特征是所说式(II)

结构中的 R1 为 H, R2 为 OH, R3 为 $-\text{CH}_2\text{NR}''$, 其中 NR'' 为 , 结构如式(IX)所示:



(IX)

- 5 9. 如权利要求 1 所述的鸢尾苷元化合物的衍生物, 其特征是所说式(II)结构中的 R1 为 H, R2 为 OH, R3 为 $-\text{CH}_2\text{NMe}_2$, 结构如式(X)所示:

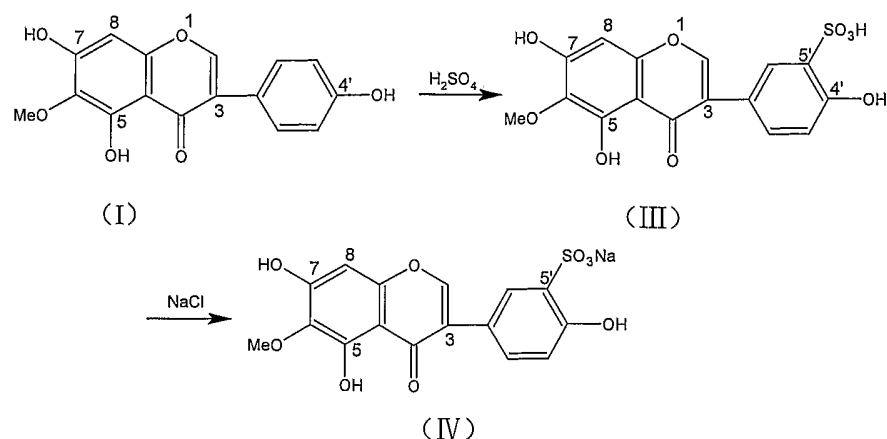


(X)

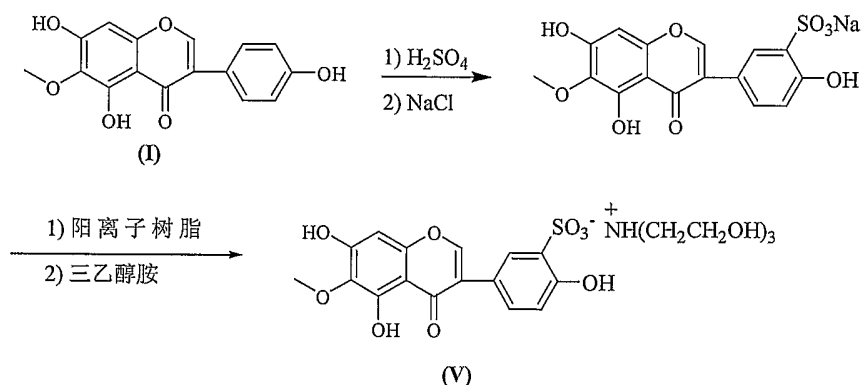
- 10 10. 如权利要求 5、7、8 或 9 所述的鸢尾苷元化合物的衍生物, 其特征是所说结构的化合物为其药学上可以接受的盐类化合物。

11. 如权利要求 10 所述的鸢尾苷元化合物的衍生物, 其特征是所说的盐类化合物为盐酸盐。

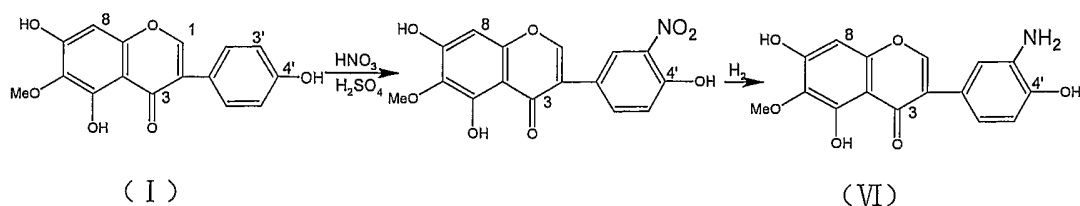
- 15 12. 制备上述通式(III)中的 R1 为磺酸或磺酸盐类的鸢尾苷元化合物的方法, 其特征是以式(I)的异黄酮类鸢尾苷元化合物为原料, 与硫酸经磺化反应得到式(III)中的 M'' 为 H 的磺酸衍生物产物, 进一步用如 NaCl 或 KCl 等饱和盐类水溶液进行处理后, 即可以得到上述式(IV)的相应磺酸钠或磺酸钾化合物, 合成路线为:



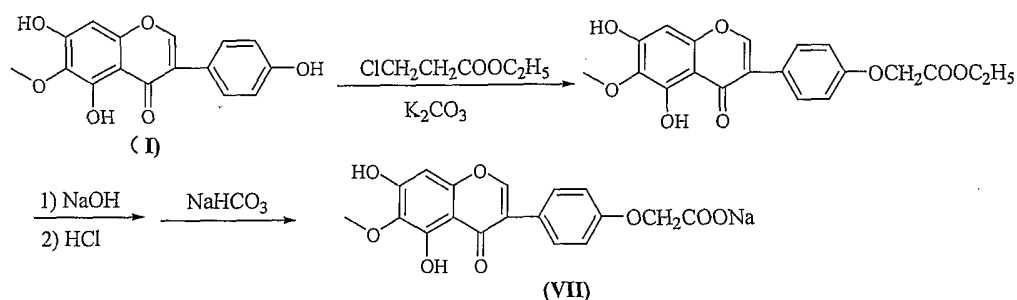
13. 制备上述式 (V) 所示结构的鸢尾苷元化合物的方法, 其特征是以式(I)结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物为原料与浓硫酸混合, 在 40-90°C 加热搅拌反应, 冷却后倾入饱和的氯化钠或其他碱金属的盐酸盐、氢溴酸盐或硝酸盐溶液中, 得 3'-磺酸钠中间产物, 将其悬浮于乙醇溶液中并加入强酸性阳离子树脂室温搅拌使全部溶解, 然后加入三乙醇胺, 再减压蒸去溶剂, 得到化合物 (V), 合成路线为:



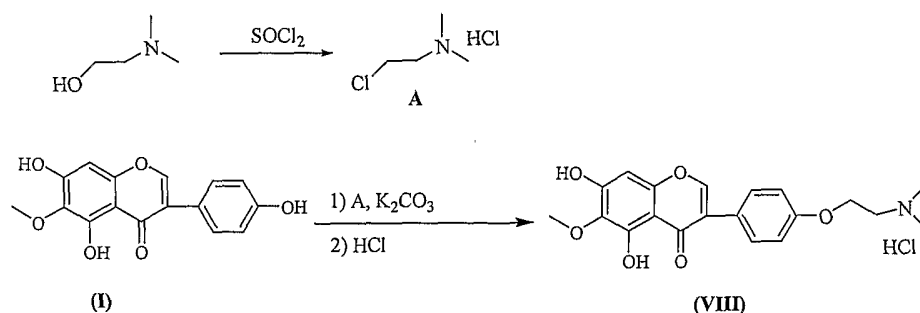
14. 制备上述式 (VI) 所示结构的鸢尾苷元化合物的方法, 其特征是以式(I)结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物为原料, 在冰浴冷却下滴加硝酸和浓硫酸混酸的乙醇溶液, 得到 3'-硝基中间化合物, 然后将其溶于甲醇中, 在常压下以氢催化还原得到 3'-氨基取代的化合物 (VI), 并且可以进一步与药物中可以接受的酸反应得到式 (VI) 结构的相应盐类化合物, 合成路线为:



15. 制备上述式 (VII) 所示结构的鸢尾苷元化合物的方法, 其特征是将式 (I) 结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物为原料与氯乙酸乙酯在丁酮和 DMF 混和溶剂中, 加入无水 K_2CO_3 和催化量的 NaI, 搅拌下回流反应后, 冷却至室温并滤除不溶物, 减压浓缩滤液, 残余物溶于适量水中, 再乙酸乙酯提取和水洗, 干燥后减压浓缩溶剂, flash 柱分离, 得 4'-酯醚中间产物, 用甲醇溶解后, 搅拌下滴加 NaOH 水溶液后进行常温水解反应完全, 再用酸调节至 pH3~4, 减压蒸除甲醇得絮状沉淀并溶于乙酸乙酯, 水洗、干燥, 浓缩后与 $NaHCO_3$ 反应制成钠盐, 得到化合物 (VII), 合成路线为:

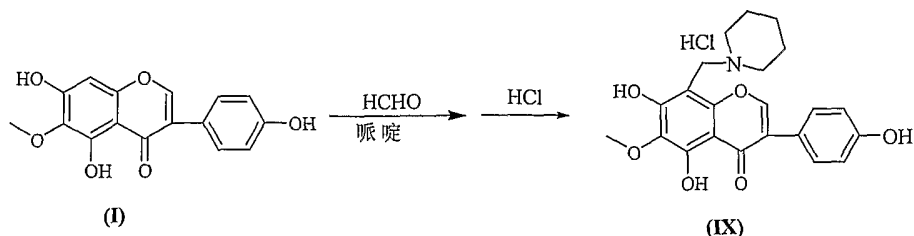


16. 制备上述式 (VIII) 所示结构的鸢尾苷元化合物的方法, 其特征是先将 β -二甲氨基乙醇于 $0^\circ C$ 条件下滴加入二氯亚砷并剧烈搅拌, 滴完后于 $35\sim 50^\circ C$ 搅拌反应, 然后用无水乙醇重结晶, 得中间产物 β -二甲氨基氯乙烷盐酸盐 A, 将式 (I) 结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物为原料溶于丁酮、丙酮、DMF、THF 或二氧六环中, 加入无水 K_2CO_3 或 Na_2CO_3 以及 DMF 及催化量的 NaI, 加热至回流, 分次加入上述中间产物 A, $80^\circ C$ 左右回流, 冷却后过滤, 将滤液浓缩得粘状物, 适量水稀释后, 用乙酸乙酯提取, 提取液用水洗后干燥并出去溶剂, 得到化合物 (VIII), 并且可以进一步与药学上可以接受的酸反应得到式 (VIII) 结构的相应盐类化合物, 合成路线为:

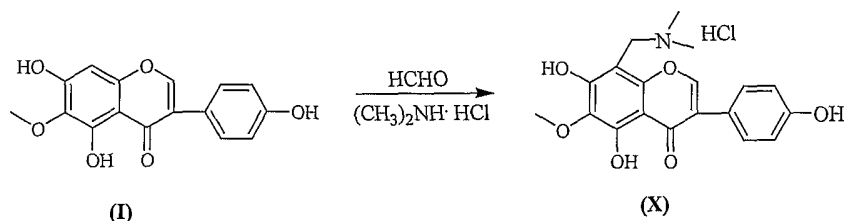


17. 制备上述式 (IX) 所示结构的鸢尾苷元化合物的方法, 其特征是将式 (I) 结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物原料、重量百分比为 37% 的甲醛溶液、

哌啶以及二氧六环、THF、甲醇或乙醇中的一种混和，回流反应后冷却，过滤得到化合物 (IX)，并且可以进一步与药学上可以接受的酸反应得到式 (IX) 结构的相应盐类化合物，合成路线为：



5. 18. 制备上述式 (X) 所示结构的鸢尾苷元化合物的方法，其特征是将式 (I) 结构的异黄酮类鸢尾苷元化合物原料、重量百分比为 37% 的甲醛溶液、二甲胺的盐酸盐以及二氧六环、THF、甲醇或乙醇中的一种混和，回流反应后待冷，滤集沉淀得到化合物 (X)，并且可以进一步与药物中可以接受的酸反应得到式 (X) 结构的相应盐类化合物，合成路线为：



19. 用于抗病毒的药物，其特征是以有效用量的式 (II) 所示结构的鸢尾苷元化合物的衍生物为有效药用成分，与药物中可接受的辅助添加成分共同组成。

- 15 20. 如权利要求 19 所述的用于抗病毒的药物，其特征是所说的药物为注射型制剂。

21. 制备以鸢尾苷元化合物衍生物 (II) 为有效药物成分的注射剂药物的方法，其特征是将鸢尾苷元衍生物 (II) 5-80 重量份和注射用葡萄糖 20-150 重量份，溶解于 700~800 重量份的注射用水中，溶解完全后再加入注射用水补足至相当于 1000 重量份的总体积，G4 垂熔玻砂漏斗过滤后，经常规封装和灭菌处理，得到淡黄色澄明液体的注射液，使其中的葡萄糖含量 2-15%，有效药物成分的含量为 5-80mg/ml。

20

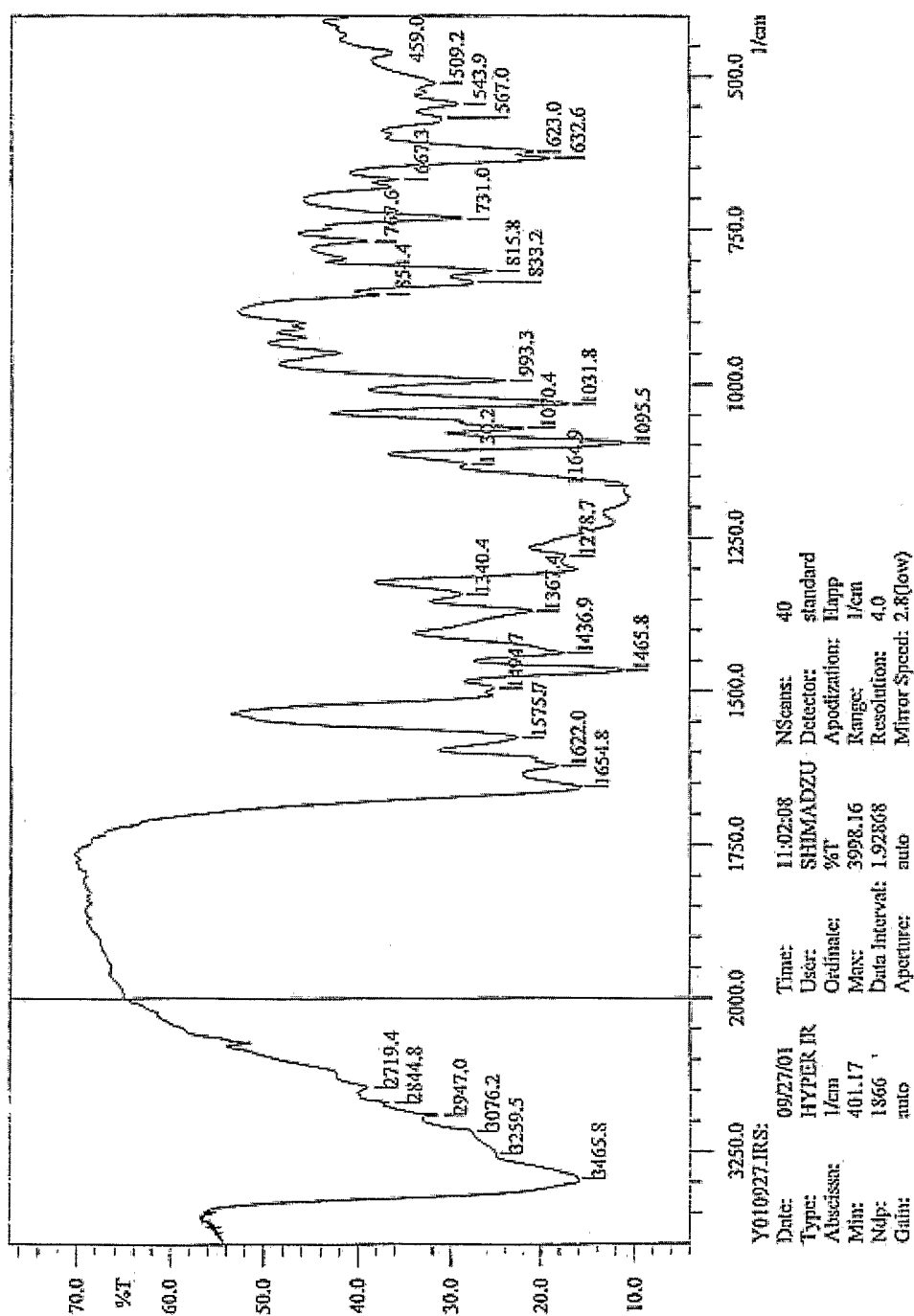
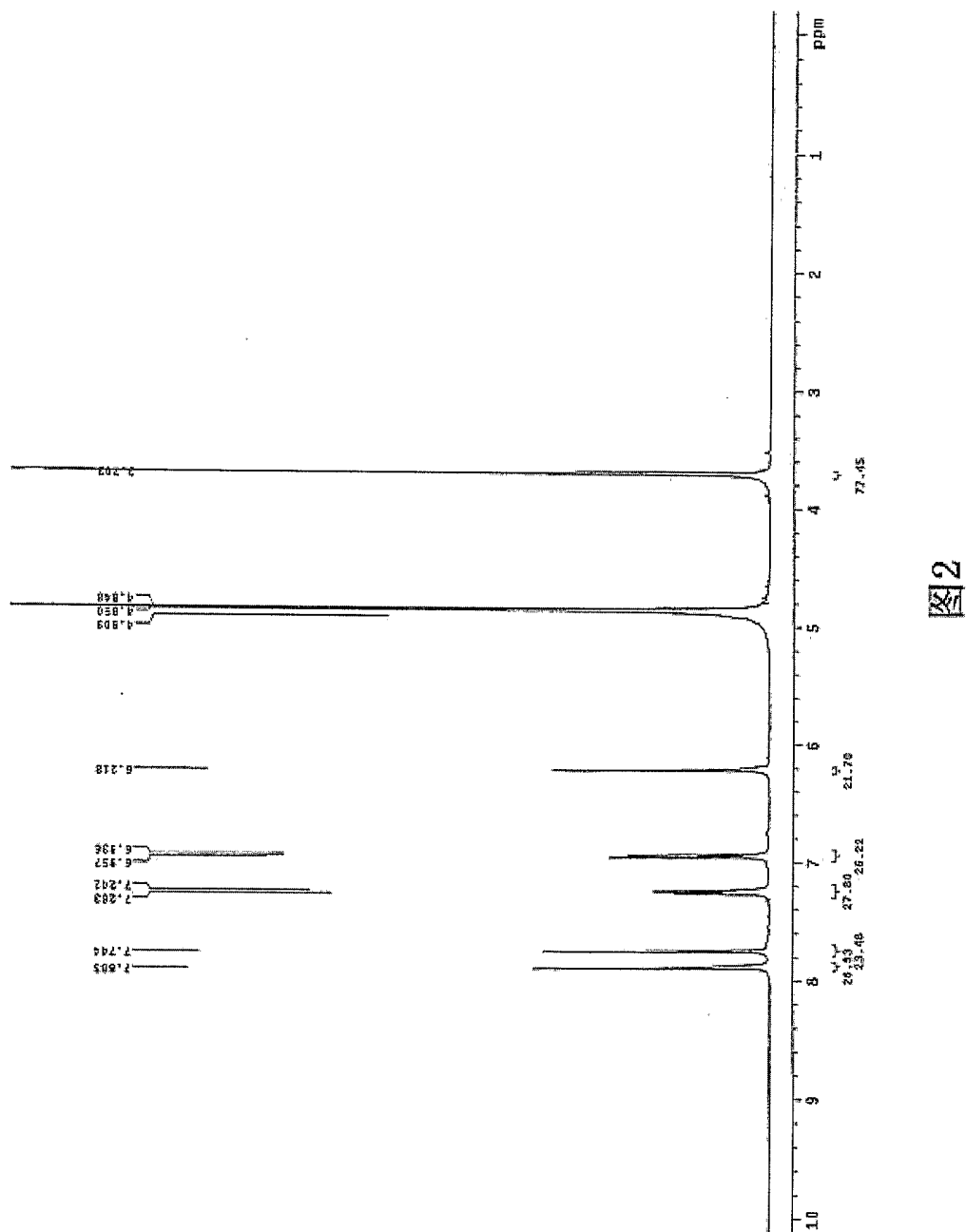


图 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000481

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D311/36, C07D311/34, C07D311/26, C07D311/22, C07D311/04, C07D311/00,
A61K31/352, A61K31/35, A61K31/335, A61P11/00

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)

IPC7: C07D311, A61K31, A61P11

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)

EPODOC, WPI, PAJ, CNPAT, CNKI, CA, STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US6541613B2	1-21
X	CHEMISTRY ABSTRACT Vol 116:191100	1
A	US4772627	1-21
A	US4352792	1-21

☐ 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 14/8/2004	Date of mailing of the international search report 14 · OCT 2004 (14 · 10 · 2004)
Name and mailing address of the ISA/ 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088, Beijing, China	Authorized officer Li Yantao Telephone No. (86-10)82803216
Facsimile No. (86-10)62019451	



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2004/000481

Patent document cited in report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US6541613B2	1/4/2003	US2002111466A	15/8/2002
US4772627	20/9/1988	EP0129893A	2/1/1985
		EP19840107236	23/6/1984
		JP60008220A	17/1/1985
		JP5006531B	26/1/1993
		JP1801389C	12/11/1993
		JP61000012A	6/1/1986
		DE3485000D	10/10/1991
US4352792	5/10/1982	IE800711L	10/10/1980
		FI801050A	11/10/1980
		NO801024A	13/10/1980
		DK152980A	15/10/1980
		AU5715780A	16/10/1980
		JP55147272A	17/11/1980
		BR8002191A	25/11/1980 你
		ZA8002139A	29/4/1981
		GR67731A	16/9/1981
		CU35257A	28/3/1982
		IL59770A	31/7/1984
		NZ193316A	31/7/1984
		AU538214B	2/8/1984
		DE3069488D	29/11/1984
		PH17987A	28/2/1985
		IE49670B	13/11/1985
		JP1117879A	10/5/1989

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000481

A. 主题的分类

C07D311/36, C07D311/34, C07D311/26, C07D311/22, C07D311/04, C07D311/00,

A61K31/352, A61K31/35, A61K31/335, A61P11/00

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)

IPC7: C07D311, A61K31, A61P11

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))

EPODOC, WPI, PAJ, CNPAT, CNKI, CA, STN 国际联机

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US6541613B2	1-21
X	CHEMISTRY ABSTRACT Vol 116:191100	1
A	US4772627	1-21
A	US4352792	1-21

☐ 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, 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

14 日 8 月 2004 年

国际检索报告邮寄日期

14 · 10 月 2004 (14 · 10 · 2004)

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

李 涛

电话号码: (86-10)82803216

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2004/000481

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US6541613B2	1 日 4 月 2003 年	US2002111466A	15 日 8 月 2002 年
US4772627	20 日 9 月 1988 年	EP0129893A	2 日 1 月 1985 年
		EP19840107236	23 日 6 月 1984 年
		JP60008220A	17 日 1 月 1985 年
		JP5006531B	26 日 1 月 1993 年
		JP1801389C	12 日 11 月 1993 年
		JP61000012A	6 日 1 月 1986 年
		DE3485000D	10 日 10 月 1991 年
US4352792	5 日 10 月 1982 年	IE800711L	10 日 10 月 1980 年
		FI801050A	11 日 10 月 1980 年
		NO801024A	13 日 10 月 1980 年
		DK152980A	15 日 10 月 1980 年
		AU5715780A	16 日 10 月 1980 年
		JP55147272A	17 日 11 月 1980 年
		BR8002191A	25 日 11 月 1980 年
		ZA8002139A	29 日 4 月 1981 年
		GR67731A	16 日 9 月 1981 年
		CU35257A	28 日 3 月 1982 年
		IL59770A	31 日 7 月 1984 年
		NZ193316A	31 日 7 月 1984 年
		AU538214B	2 日 8 月 1984 年
		DE3069488D	29 日 11 月 1984 年
		PH17987A	28 日 2 月 1985 年
		IE49670B	13 日 11 月 1985 年
		JP1117879A	10 日 5 月 1989 年