

(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
2007年2月8日 (08.02.2007)

PCT

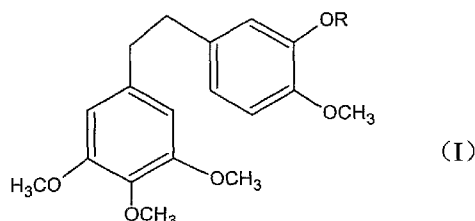
(10) 国际公布号
WO 2007/014524 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07F 9/08 (2006.01) A61K 31/09 (2006.01)
C07C 43/235 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2006/001918
- (22) 国际申请日: 2006年8月1日 (01.08.2006)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200510089004.2
2005年8月2日 (02.08.2005) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 浙江赛尔生物医学研究有限公司 (ZHE JIANG CELL BIOMEDICAL RESEARCH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省台州市天台县城关镇赤城路299号立钻大厦14楼, Zhejiang 317200 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 李亦平 (LI, Yiping) [US/CN]; 中国浙江省台州市天台县城关镇赤城路299号立钻大厦14楼, Zhejiang 317200 (CN)。 李宁 (LI, Ning) [CN/CN]; 中国浙江省台州市天台县城关镇赤城路299号立钻大厦14楼, Zhejiang 317200 (CN)。
- (74) 代理人: 北京律诚同业知识产权代理有限公司 (LECOME INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市海淀区知春路甲48号盈都大厦B16层, Beijing 100098 (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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,

[见续页]

(54) Title: ERIANIN SALTS, THEIR PREPARATION METHODS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THE SAME

(54) 发明名称: 毛兰素盐及其制备方法和包含其的药物组合物



(57) Abstract: The invention discloses erianin salts of formula (I) and their preparation methods, wherein R is a salt formed by the monovalence acid radical of inorganic oxy acid or organic acid with metal, ammonium salt or organic amine. The invention also discloses pharmaceutical compositions containing erianin salts. Compared with erianin, the solubility of said erianin salts is significantly increased, thereby enhancing bioavailability and exhibiting better antitumor activity.

(57) 摘要:

本发明涉及一类毛兰素盐及其制备方法, 所述毛兰素盐为具有如下通式 (I) 的化合物, 其中, R 为无机含氧酸或有机酸的一价酸根与金属、铵盐或有机胺所生成的盐。本发明还涉及包含毛兰素盐的药物组合物。与毛兰素相比, 所述毛兰素盐的溶解度大大提高, 可提高生物利用度, 从而更好的发挥抗肿瘤作用。

WO 2007/014524 A1



SK, SL, SM, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 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”。

毛兰素盐及其制备方法和包含其的药物组合物

技术领域

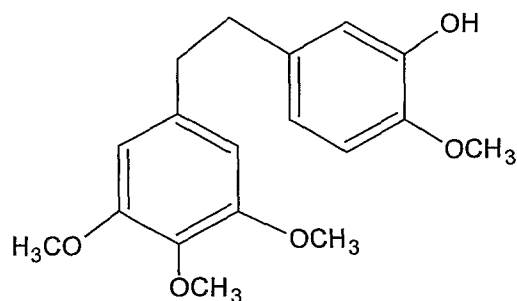
本发明涉及毛兰素盐及其制备方法。

5 本发明还涉及包含该类化合物的药物组合物。

背景技术

癌症已成为仅次于心血管疾病的人类第二类杀手。目前常用抗癌化疗与放疗的方法可造成对人体不利的严重毒副作用。国内外的专家已发现中药石斛具有抗肿瘤、抗衰老及扩张血管等作用，其乙醇提取物及其联苳类化合物具有不同
10 程度的体内抗肿瘤活性作用。石斛的活性成分已引起国内外的关注。

王天山等的研究结果（鼓槌石斛中化学成分对K562肿瘤细胞株生长抑制作用体外试验，天然产物研究与开发，1997，9(2)，1~3）表明，联苳类和菲类化合物对体外培养的鼠类L1210微管蛋白的聚集及有丝分裂、P₃₈₈细胞株、多种
15 人体肿瘤细胞株如A-549、MCF-7、HT-29、SKMEL-5、MLM、SK-OV-3、HL-60均有抑制作用。鼓槌石斛中的二氢联苳类和菲类化合物对肿瘤细胞株K₅₂₆的生长具有不同程度的抑制作用，尤以毛兰素（Erianin）的活性最强。毛兰素的化学结构式如下所示：



20 毛兰素

毛兰素对小鼠肝癌的作用最强，抑瘤率为50.82%。有关研究（中国药科大学学报，1994，25（3），188~189）还推测毛兰素的毒副作用远低于肿瘤化疗药物5FU。李运曼等的研究表明（毛兰素诱导人白血病HL-60细胞的凋亡，中国药理学报，2001，22(11)），毛兰素显著抑制人类白血病HL-60细胞的生长，
25 其抑制作用可能是通过诱导细胞凋亡和改变HL-60细胞的bcl-2和bax基因表达而实现的。

由于毛兰素的水溶性较低，在水中的溶解度仅为<1mg/ml，限制了其制剂性能和临床应用，因此有必要对能提高其水溶性的盐类进行研究。目前，尚没有关于毛兰素盐及其制备方法的文献报道。

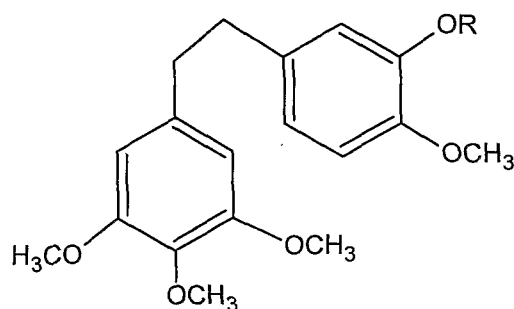
5 发明内容

本发明的一个目的在于提供一类毛兰素的药学上可接受的盐（以下，简称毛兰素盐）。本发明所提供的化合物具有较好的抗肿瘤活性，与毛兰素相比具有更好的水溶性，从而使得制剂方便，并且在体内有更高的生物利用度。

本发明的另一个目的在于提供毛兰素盐的制备方法。

10 本发明的再一个目的在于提供包含毛兰素盐的药物组合物。

根据本发明的一个目的，本发明提供了一类毛兰素盐，所述毛兰素盐为具有如下通式（I）的化合物：



(I)

15 其中：

R 为无机含氧酸的一价酸根与金属、铵盐或有机胺所生成的盐；

所述金属选自碱金属、碱土金属；

所述无机含氧酸选自磷酸、硫酸、亚硫酸、硝酸、碳酸、次氯酸、三氟乙酸、磺酸。

20 所述磺酸的通式为 R-SO₃H，其中 R 为烃基。所述磺酸包括但不限于苯磺酸、对甲苯磺酸、2-萘磺酸、甲基磺酸、乙基磺酸、2-羟乙基磺酸等。

所述碱金属包括钠、钾等；所述碱土金属包括镁、钙等。

所述有机胺选自三乙胺、3-(2-羟基)-胺、N-乙基哌啶、N,N-二乙基-哌嗪等。

25 所述毛兰素盐为毛兰素与上述酸发生酯化反应后，再与金属、铵盐或有机

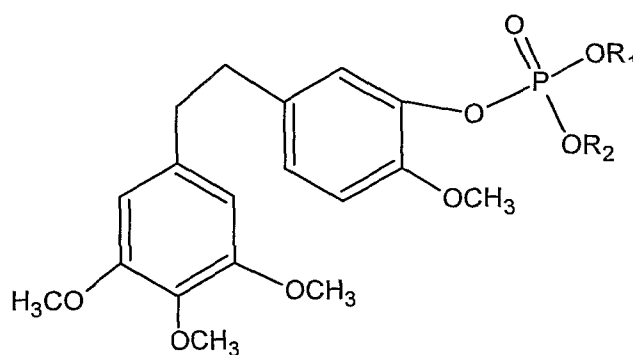
胺反应所生成的盐。

毛兰素盐可以作为毛兰素的前体药物，以增加水溶性，便于更好的被人体的吸收利用。

本发明所述的毛兰素无机含氧酸酯盐为毛兰素与上述无机含氧酸发生酯化反应后，再与金属、铵盐或有机胺反应所生成的盐。

更进一步的，所述毛兰素盐为毛兰素磷酸酯盐或毛兰素硫酸酯盐。

优选的，R 可以为磷酸根，当 R 为磷酸根时，所述毛兰素盐为毛兰素磷酸酯盐，其通式如 (II) 所示：



(II)

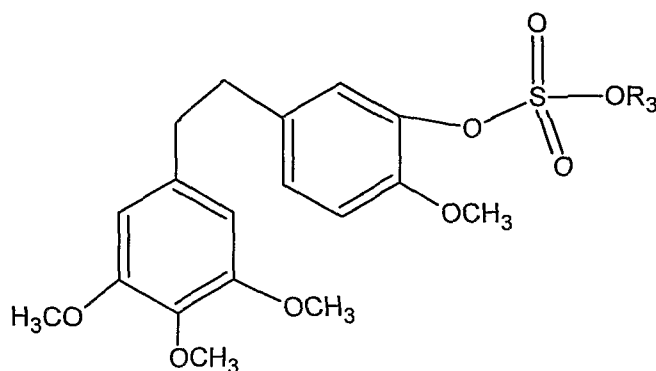
10

其中， R_1 、 R_2 为 H、Na、K 或 NH_4 ；

且 R_1 和 R_2 不同时为 H。

更优选的， R_1 、 R_2 均为 Na，即所述毛兰素磷酸酯盐为毛兰素磷酸酯二钠。

15 优选的，R 可以为硫酸根，当 R 为硫酸根时，所述毛兰素盐为毛兰素硫酸酯盐，其通式如 (III) 所示：



(III)

其中， R_3 为 Na、K 或 NH_4 。

最优的， R_3 为 Na，即毛兰素硫酸酯盐为毛兰素硫酸酯钠。

根据本发明的另一个目的，本发明提供了此类化合物的制备方法。

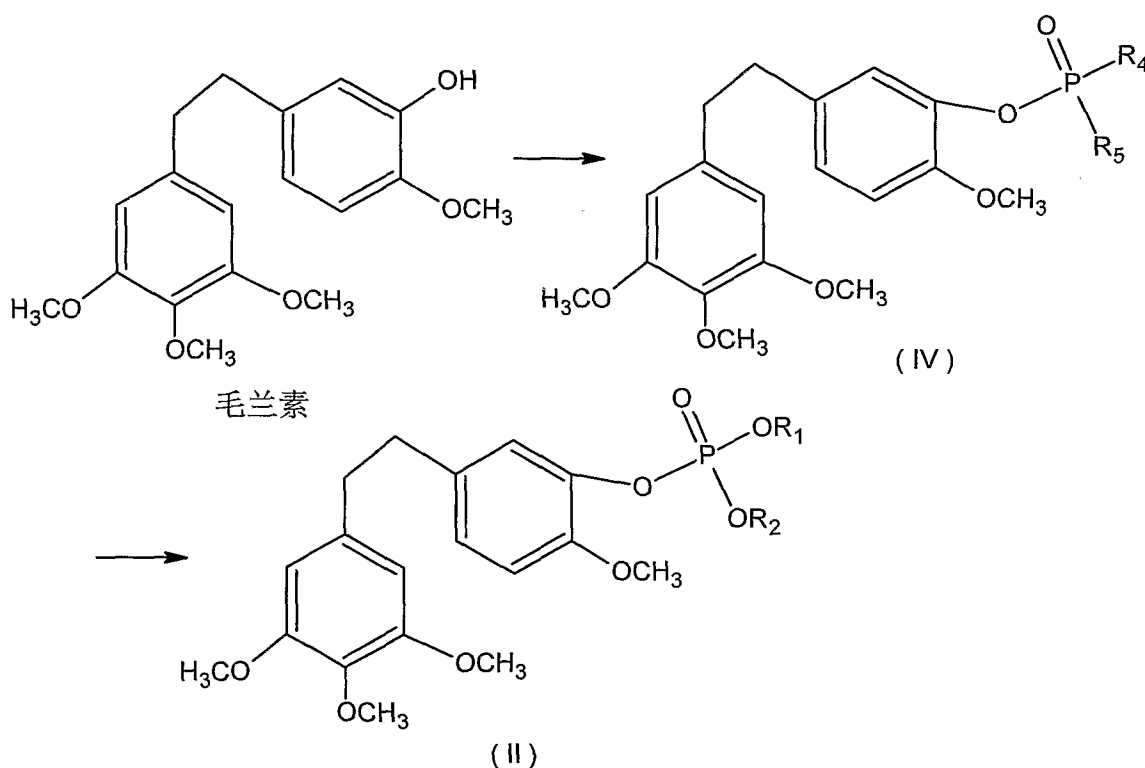
本领域技术人员可运用本领域的常规制备手段，以毛兰素为原料，制备上述通式 (I) 的化合物。本发明提供的制备方法如下所述：

所述毛兰素磷酸酯盐的制备方法，包括下述步骤：

5 A1、使毛兰素与磷酸化剂，在缚酸剂的作用下，发生酚羟基的磷酸化反应，生成式 (IV) 的毛兰素磷酸化中间体，反应温度为 25 ~ 80°C，反应溶剂为惰性有机溶剂；

A2、使由步骤 A1 得到的反应液直接与碱反应，制备得到式 (II) 的毛兰素磷酸酯盐；

10 合成路线为：



式 (IV) 中的 R_4 、 R_5 为 Obu^t 、Cl、或 Br 等，其中， bu^t 代表叔丁基； R_1 、 R_2 为 H、Na、K 或 NH_4 ，且 R_1 和 R_2 不同时为 H。

15 以上两步反应可以是连续完成的，即由步骤 A1 反应得到的式 (V) 的中间体无须实行进一步的分离和纯化，就可直接进行下一步反应。

进一步的，上述制备方法的两个步骤为：

A1、毛兰素与过量的磷酸化剂，在缚酸剂的作用下，充分搅拌 2 ~ 12 小时，发生酚羟基的磷酸化反应，生成式 (IV) 的毛兰素磷酸化中间体，反应温

度为 25 ~ 80°C, 反应在惰性有机溶剂中进行;

A2、将由步骤 A1 得到的反应液减压蒸去溶剂, 在搅拌下将浓度为 1 ~ 6mol/L 的无机碱滴加到该反应液中, 然后在 0 ~ 90°C 的条件下继续搅拌 2 ~ 24 小时, 减压除去溶剂后即得化合物 (II) 的粗产物, 粗产物经重结晶溶剂重结晶后得毛兰素磷酸酯盐的纯品 (产率 79 ~ 95%, 熔点 266-269°C (分解))。

在步骤 A1 中:

所述磷酰化剂为选自 OPCl_3 、 OPBr_3 、 $(\text{Bu}^t\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$ 等的一种或多种五价磷卤化物。

所述缚酸剂为选自吡啶类、单烷基胺类、双烷基胺类、三烷基胺类等的一种或多种。

进一步的, 缚酸剂在充分搅拌下逐滴加入反应液中, 反应完成后, 用水洗涤, 分离, 有机层用无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏除去溶剂。

所述惰性有机溶剂为选自二氯甲烷、二氯乙烷、苯、四氯化碳、乙腈等的一种或多种。

在本发明的一个优选实施方式中, 步骤 A1 的反应温度为室温。

在步骤 A2 中:

在充分搅拌下将碱滴加到该反应液中之后, 优选在 30 ~ 80°C 的条件下继续搅拌 8 ~ 10 小时, 然后冷却反应液, 并经过滤除去不溶物, 减压下蒸馏除去大部分溶剂等一系列后处理得到固体粗产物, 经有机溶剂重结晶得到目标产物 (II)。

所述碱为选自 NaOH 、 KOH 、 NaOCH_3 、 KOCH_3 、 $\text{NaOCH}_2\text{CH}_3$ 、 KOCH_2CH_3 等的一种或多种, 碱的浓度可根据所需的量和体积配成 1 ~ 6mol/L。

所述目标产物 (II) 的重结晶溶剂为选用水、甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮等的一种或多种, 优选为甲醇-丙酮混合溶剂。

在本发明的一个优选实施方式中, 上述制备方法中, 在所述步骤 A1 中: 磷酰化剂为 OPCl_3 , 缚酸剂为三乙胺; 在所述步骤 A2 中: 碱为 NaOH 。

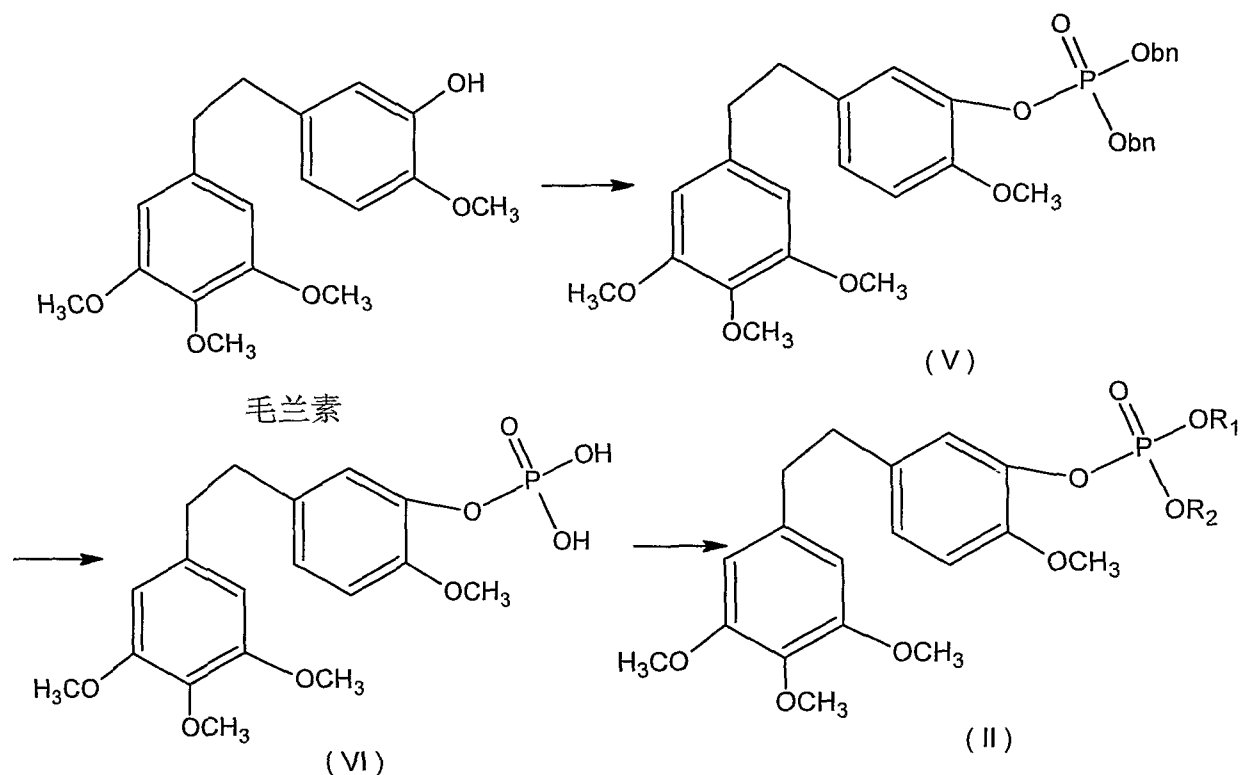
当毛兰素与诸如二苄基亚磷酸酯 ($(\text{BnO})_2\text{P}(\text{O})\text{H}$, bn 代表苄基) 的磷酰化剂反应时, 可生成中间体毛兰素磷酸二苄酯, 该中间体可先与 NaI 反应, 生成毛兰素的磷酸酯, 再与碱反应成盐。即, 本发明还提供了另一种毛兰素磷酸酯盐的制备方法, 其包括下述步骤:

B1、在惰性气体保护下，使毛兰素与二苄基亚磷酸酯，在缚酸剂的作用下，发生酚羟基的磷酸化反应，制备得到式(V)的化合物，反应温度为 $-40^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$ ，反应在惰性有机溶剂中进行；

B2、在惰性气体保护下，使式(V)的化合物与NaI在活性基保护剂的作用下发生反应，制备得到式(VI)的化合物，反应在惰性有机溶剂中进行；

B3、使式(VI)的化合物与碱反应，制备得到式(II)的化合物；

合成路线为：



式(V)中，bn代表苄基； R_1 、 R_2 为H、Na、K或 NH_4 ，且 R_1 和 R_2 不同时为H。

在步骤B1中：

所述二苄基亚磷酸酯为磷酸化剂。

所述缚酸剂为选自吡啶类、单烷基胺类、双烷基胺类、三烷基胺类等的一种或多种。在本发明的一个具体实施方式中，所述缚酸剂为二异丙基乙胺和二
15 甲氨基吡啶(DMAP)。

所述惰性气体为氩气、氮气、或一氧化碳等。在本发明的一个具体实施方式中，所述惰性气体为氩气。

所述惰性有机溶剂为选自二氯甲烷、二氯乙烷、苯、四氯化碳、乙腈等的

一种或多种。在本发明的一个具体实施方式中，所述惰性有机溶剂为乙腈和四氯化碳。

在步骤 B2 中：

所述惰性气体为氩气、氮气、或一氧化碳等。在本发明的一个具体实施方式中，所述惰性气体为氩气。

所述惰性有机溶剂为选自二氯甲烷、二氯乙烷、苯、四氯化碳、乙腈等的一种或多种。在本发明的一个具体实施方式中，所述惰性有机溶剂为乙腈。

所述活性基保护剂为三甲基氯硅烷等。

在步骤 B3 中：

所述碱为选自 NaOH、KOH、NaOCH₃、KOCH₃、NaOCH₂CH₃、KOCH₂CH₃ 等的一种或多种。在本发明的一个具体实施方式中，所述碱为甲醇钠。

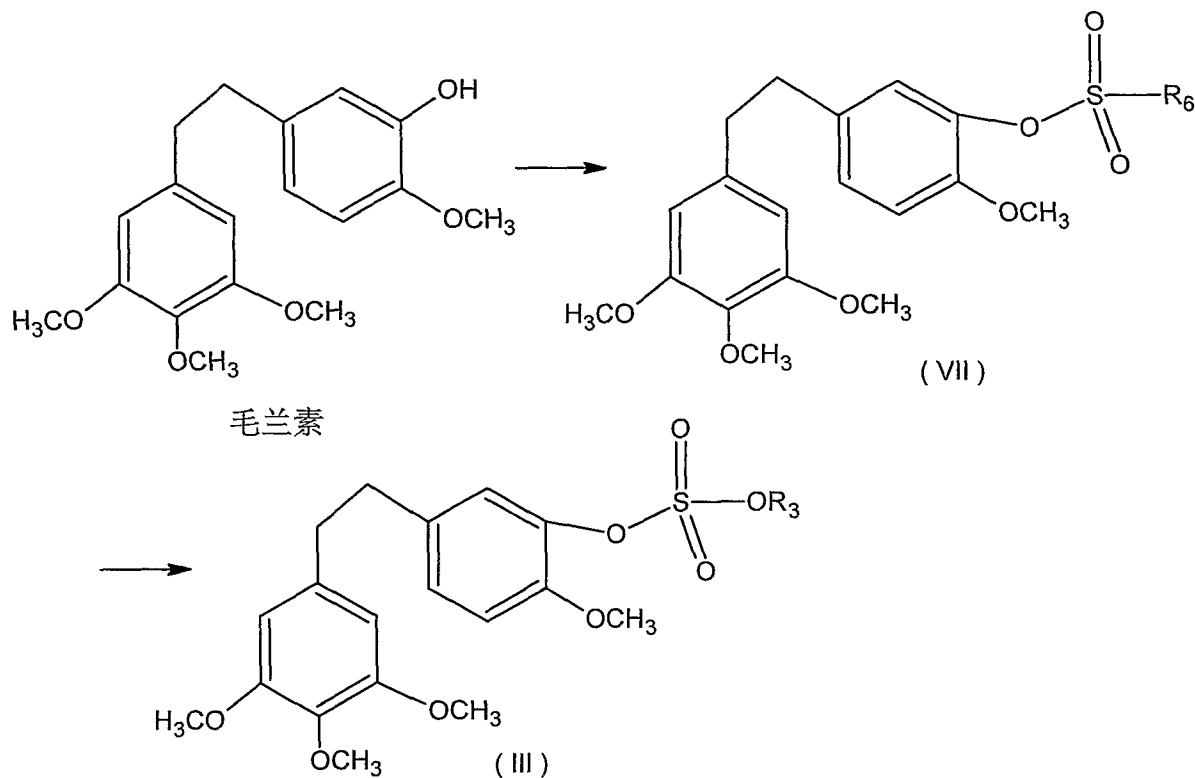
在本发明的一个优选实施方式中，由毛兰素合成中间体 (V) 时，在氩气保护下，毛兰素溶于乙腈中，在 -25℃，加入 CCl₄ 并搅拌 5 分钟，用针筒滴加二异丙基乙胺和二甲氨基吡啶，1 分钟后滴加二苄基亚磷酸酯，控制反应温度在 -10℃ 以下。由中间体 (V) 生成毛兰素的磷酸酯时，氩气保护下，中间体 (V) 和 NaI 溶于乙腈溶液中，强烈搅拌下，慢慢加入三甲基氯硅烷，搅拌 20 分钟，制备得到毛兰素磷酸酯 (VI)。使毛兰素磷酸酯 (VI) 与甲醇钠反应，得到无色晶体 (II)。

所述毛兰素硫酸酯盐的制备方法，包括下述步骤：

C1、使毛兰素与卤磺酸，在缚酸剂的作用下，发生酚羟基的硫酸化反应，生成式 (VI) 的毛兰素硫酸化中间体，反应温度为 -5~-10℃，反应溶剂为惰性有机溶剂；

C2、使由步骤 C1 得到的反应液直接与碱反应，制备得到式 (III) 的毛兰素硫酸酯钠盐；

合成路线为：



式 (VII) 中的 R₆ 为 Cl 或 Br 等; R₃ 为 Na、K 或 NH₄。

具体地说, 上述制备方法包括的两个步骤为:

C1、毛兰素与卤磺酸, 在缚酸剂的作用下, 充分搅拌 1~10 小时, 发生
5 酚羟基的硫酸化反应, 生成式 (V) 的毛兰素硫酸化中间体, 反应温度为
-5~-10°C, 反应溶剂为惰性有机溶剂;

C2、在充分搅拌下, 用浓度为 5~15mol/L 的碱将由步骤 C1 得到的反应
液的 pH 调至 8~12, 冷却后过滤, 用无水乙醚洗, 干燥后将固体产物溶解在
甲醇中过柱, 溶剂抽干后得毛兰素硫酸酯钠盐, 反应温度为室温。

10 关于步骤 C1:

所述卤磺酸为氯磺酸或溴磺酸。

所述缚酸剂为选自吡啶类、单烷基胺类、双烷基胺类、三烷基胺类等的一
种或多种。

15 所述惰性有机溶剂为选自二氯甲烷、二氯乙烷、苯、四氯化碳等的一种或
多种。

进一步的, 步骤 C1 为: 在圆底烧瓶中加入毛兰素, N、N-二甲基苯胺,
并加入与 N、N-二甲基苯胺等体积的二氯甲烷, 在冰盐水浴中搅拌(-5~-10°C),
然后逐滴加入氯磺酸, 加完后在盐水浴中继续搅拌 1 小时。

关于步骤 C2:

所述碱为选自 NaOH、KOH、NaOCH₃、KOCH₃、NaOCH₂CH₃、KOCH₂CH₃ 等的一种或多种，碱的浓度可根据所需的量和体积进行相应的调节。

进一步的，步骤 C2 为：移去盐水浴，在室温下搅拌 24 小时；用 10mol/L 的 NaOH 溶液在搅拌下将反应液的 pH 值调至 10，冷却后过滤，用无水乙醚洗，干燥后将固体产物溶解在甲醇中过柱，溶剂抽干后得毛兰素硫酸酯钠盐。

在本发明的一个优选实施方式中，上述制备方法中，步骤 C1 中：所述卤磺酸为氯磺酸、所述缚酸剂为 N、N-二甲基苯胺，惰性有机溶剂为二氯甲烷；步骤 C2 中：碱为氢氧化钠。

根据本发明的再一个方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含有效治疗量的毛兰素盐，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

进一步的，所述药物组合物为注射给药制剂或口服给药制剂。

以毛兰素盐为药效成分，添加药学上可接受的药用辅料并通过本领域的常规方法可以制备用于本发明的药物制剂。本药物制剂的剂型可以是：口服给药的剂型诸如片剂、胶囊（包括硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊和微囊）、粉剂、颗粒剂和糖浆剂；非口服给药的剂型诸如注射剂、栓剂、丸剂、凝胶剂和贴剂。除这些常规剂型外，还可以将口服的速释固体制剂（例如片剂、颗粒剂等）和用于口服或非口服给药的缓释制剂（片剂、颗粒、精细颗粒、丸剂、胶囊、糖浆、乳剂、悬浮液、溶液）用于本发明，通过常规方法也可以制备这些制剂。本发明中的制剂可以是包衣或未包衣的形式，视需要而定。本发明优选的是将毛兰素盐用于注射给药的剂型。

本发明中的药用辅料包括用于固体制剂的赋形剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂、稳定剂、发泡剂、包衣剂等，或用于半固体制剂、液体制剂的溶剂、增溶剂、悬浮剂、等渗剂、缓冲剂、润肤剂、乳化剂等，此外，也可以根据需要使

用其它药用添加剂诸如防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂和矫味剂等。根据所治疗的对象、剂型、给药方法等可以对本发明药物制剂的剂量进行合适的选择。

与毛兰素相比，本发明所述毛兰素盐的水溶性大大提高，因而制剂更容易，并且可以提高体内的生物利用度，更好地发挥抗肿瘤作用。本发明所述的癌症泛指所有恶性肿瘤。

药效学试验表明：毛兰素磷酸酯二钠具有明显的抗肿瘤作用，每天给药和隔天给药的方式对抗肿瘤的作用同样有效，这说明毛兰素磷酸酯二钠是一种高效，低毒的抗肿瘤化合物。毛兰素磷酸酯二钠与其它化疗药物联用可以明显增加化疗药物对肿瘤的杀伤作用。

5 安全性评价结果表明：毛兰素磷酸酯二钠的 LD_{50} 值为 1243.0377 mg/kg，说明毛兰素磷酸酯二钠具有很好的临床用药安全性。

本发明提供的毛兰素盐及其制备方法具有以下优点：

1、本发明所述的毛兰素盐具有比毛兰素更好的水溶性，因而对于制剂更方便，例如可以制备高浓度的注射剂型，并且可以提高药物在体内的生物利用度。

2、本发明所述的毛兰素盐具有高效、低毒的抗癌作用。

3、本发明的制备方法中，所用试剂都是便宜易得的普通化学工业产品；合成路线短；操作方法简便，适宜于工业规模生产。

15 为了更好地理解本发明的本质，下面结合附图通过对本发明较佳实施方式的描述，详细说明但不限制本发明。

附图的简要说明

图 1 为本发明制备的毛兰素磷酸盐的 1H NMR 核磁共振图谱；

图 2 为本发明制备的毛兰素磷酸盐的 ^{13}C NMR 核磁共振图谱；

20 图 3 为本发明制备的毛兰素磷酸盐的红外图谱；

图 4 为本发明制备的毛兰素磷酸盐的质谱图谱。

发明的具体实施方式

25 本发明所用的毛兰素由浙江赛尔生物医学研究有限公司提供，其制备方法可从下述两种方法中加以选择；本发明所用的其它试验材料如无特别说明，均为市售购买产品。以下，具体说明毛兰素的两种制备方法：

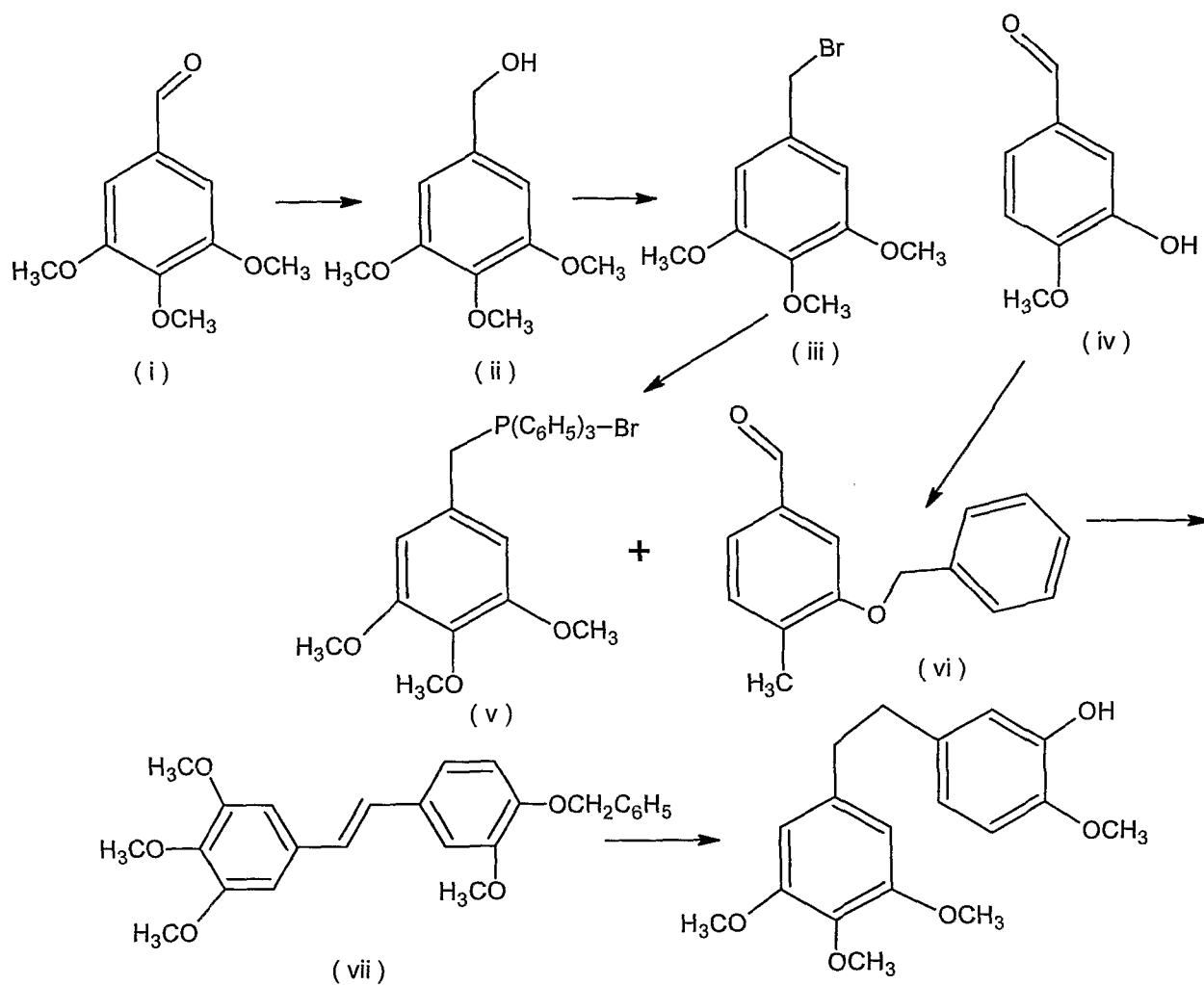
(一) 从石斛中提取毛兰素的方法

参照中国专利申请 03115752.1，应用超临界 CO_2 萃取和柱层析法以无水乙醇、甲醇、丙酮等为夹带剂，以 CO_2 等为提取介质从兰科植物石斛中提取

抗肿瘤成分毛兰素；对所得的粗提物再以石油醚：醋酸乙酯溶液为洗脱剂进行硅胶柱柱层析分离及重结晶等步骤获得精提物，达到供人体注射用的标准。

(二) 毛兰素的化学合成方法

参照中国专利申请 200510083055.4 中描述的方法，以 3,4,5-三甲氧基苯甲
5 醛 (i) 和异香兰素 (iv) 为起始原料，制备毛兰素的合成路线如下所示：



具体包括以下步骤：

1、3,4,5-三甲氧基苯甲醇 (ii) 的制备

250ml 的三颈瓶中，加入 3,4,5-三甲氧基苯甲醛 (i) 15g (76.45mmol)，
10 200ml 的无水乙醇，加热 40℃ 溶解，再加入硼氢化钠 1.48g (38.23mmol)，加
热回流 45min 后，TLC 检测，反应完全后，冷却至室温，加入去离子水 10ml
(555.8mmol)，淬灭后，抽滤，滤渣用 20ml 无水乙醇洗涤，合并滤液后，用
旋转蒸发仪浓缩至干，加入 100ml 二氯甲烷溶解，用 2N 氢氧化钠溶液 50ml
× 2 洗涤，再用去离子水 50ml × 2 洗涤，加入适量的无水硫酸镁干燥过夜。过

滤，用 20ml 二氯甲烷洗涤滤渣，合并滤液，用旋转蒸发仪浓缩至干，得 3,4,5-三甲氧基苯甲醇 (ii)，无色油状物 14.05g，收率 92.72%。

得到的产物不需要进一步纯化，即可进行下一步反应。若想得到纯品可以减压蒸馏，收集 BP216 - 218°C/12mmHg 的馏分。

5 2、3,4,5-三甲氧基苄溴 (iii) 的制备

3,4,5-三甲氧基苯甲醇 (ii) 14.05g (70.89mmol)，用 100ml 二氯甲烷溶解，加入到 250ml 的三颈瓶中，三溴化磷 6.73ml (70.89mmol) 溶于 25ml 二氯甲烷中，缓慢滴加到反应液中，室温反应 50min 后，冰浴冷却，缓慢滴加 18ml 去离子水 18ml (1.0mol)，淬灭反应。然后再用 100 ml × 2 去离子水洗涤，无水硫酸镁干燥，过滤，用 20ml 二氯甲烷洗涤滤渣，合并滤液，用旋转蒸发仪浓缩至干，真空干燥，得 3,4,5-三甲氧基苄溴 (iii)，淡黄色固体 16.05g，收率 84.44%。

得到的产物不需要进一步纯化，即可进行下一步反应。若想得到纯品可以用乙酸乙酯：正己烷=1：3 重结晶，得到白色片状晶体。

15 3、3,4,5-三甲氧基苄溴三苯基膦盐 (v) 的制备

3,4,5-三甲氧基苄溴 (iii) 16.05g (61.47mmol) 溶于 150ml 甲苯中，加入到 250ml 的三颈瓶中，加入三苯基膦 16.12g (61.47mmol)，立即溶解，加热回流 1hr，有白色固体析出，冷却到室温，抽滤，滤饼用 30ml 甲苯洗涤，真空干燥后，得 3,4,5-三甲氧基苄溴三苯基膦盐 (v)，白色粉末固体 27.81g，收率为 86.44%。

得到的产物不需要进一步纯化，即可进行下一步反应。若想得到纯品可以用丙酮洗涤固体，得白色粉末固体。

4、苄基保护异香兰素 (vi) 的制备

250ml 三颈瓶中，加入异香兰素 (iv) 15g (98.59mmol)，200ml 无水乙醇，加热到 40°C 溶解，加入碳酸钾 9g (65.07mmol)，搅拌下加入氯化苄 15ml (130.13mmol)，加热回流 1hr，TLC 检测反应完全后，冷却到 50°C，趁热过滤，滤液放入冰箱中冷却过夜，晶体析出，抽滤，滤饼用 30ml 无水乙醇洗涤，真空干燥后，得苄基保护异香兰素 (vi)，白色针状晶体 19.72g，收率为 82.56%。

得到的产物不需要进一步纯化，即可进行下一步反应。若想得到纯品可以用无水乙醇重结晶，得到白色柱状晶体。

5、顺反异构体 (vii) 的制备

250ml 三颈瓶中，加入 3,4,5-三甲氧基苄溴三苯基磷盐 (v) 20.00g (38.21mmol)，150ml 四氢呋喃，搅拌悬浮液，苄基保护异香兰素 (vi) 10.00g (41.27mmol) 溶于 70ml 四氢呋喃，放入 100ml 的滴液漏斗中。反应瓶中加入 5 固体叔丁醇钾 7.46g (66.49mmol)，反应体系变为血红色，室温搅拌 5min，冰浴冷却，缓慢滴加苄基保护异香兰素的溶液，20min 滴完，再室温搅拌 30min，TLC 检测反应完全后，倒入 500ml 的分液漏斗中，加入 140ml 去离子水后，溶液分层，加入乙醚 300ml × 2 萃取，合并乙醚层，用无水硫酸镁干燥，过滤，滤饼用 50ml 乙醚洗涤，滤液旋转蒸发仪浓缩至干，得油状物 25g，加入 20ml 10 无水乙醇固化，抽滤得淡黄色固体 12.50g，收率为 80.48%。

6、顺反异构体 (vii) 的重结晶

50ml 的圆底烧瓶中，加入顺反异构体 (vii) 12.50g (30.75mmol)，加入 20ml 无水乙醇，加热部分固体溶解后，室温搅拌，抽滤，滤饼用 10ml 的无水乙醚洗涤后，红外灯干燥，得纯顺反异构体 (vii) 9.27g，淡黄色粉末固体，15 收率为 74.16%。

7、毛兰素的制备

250ml 的三颈瓶中，加入纯顺反异构体 (vii) 5.14g (12.56mmol)，溶于 100ml 乙酸乙酯和 60ml 无水乙醇中，淡黄色溶液，加入 5% 钯炭 0.50g 后，搅拌下通氢气，室温搅拌 3hr，过滤，得无色滤液，旋转蒸发仪浓缩至干，得油20 状物 4.05g，毛兰素粗品，收率为 100%。

8、毛兰素的精制

500ml 的圆底烧瓶中，加入毛兰素粗品 4.05g (12.72mmol)，用 20ml 无水乙醚溶解，若有不溶物，过滤除去，室温静止，有晶体析出，放置过夜，溶剂挥发完全，大量白色晶体析出。过滤，滤饼用乙醚洗涤，白色晶体 3.56g，25 收率为 100%。

毛兰素盐的制备

【实施例 1】毛兰素磷酸酯二钠的制备 (直接转化成钠盐)

1、磷酸化反应

在 100ml 圆底烧瓶中，加入三氯氧磷 4.4ml (47.4mmol) 和二氯甲烷 25ml，30 滴加入毛兰素 5g (15.7 mmol) 于 10ml 二氯甲烷的溶液。滴完后，搅拌 5 分

钟。滴加入三乙胺 3.3ml (23.8mmol) 于 5ml 二氯甲烷的溶液。室温搅拌 3hr, TLC 检测, 反应完全后, 加入 100ml 冷水淬灭。充分振荡分出有机相; 再用水 50ml×2 洗涤, 二氯甲烷萃取水层后合并有机层, 用适量无水硫酸钠干燥过夜; 抽滤, 滤液减压蒸去溶剂, 得粘稠液体, 即为粗酰氯。

5 2、成盐反应

用冰浴冷却粗酰氯, 搅拌下加入 2mol/L 的 NaOH 溶液, 直到混合液 pH 值在 8~10 之间, 50°C~80°C 搅拌 8 小时。过滤除去不溶物, 减压蒸去大部分溶剂, 冷却析晶得白色固体, 为毛兰素磷酸酯二钠盐粗品。粗品用乙醇加热溶解, 趁热过滤除去不溶固体, 滤液冷却析晶得到毛兰素磷酸酯二钠盐纯品约 6.0 克, 10 为白色结晶产品, 产率 86%。m.p. 266-269°C (分解); 在水中的溶解度: 200mg/ml。

3、物理性质鉴定: 制备得到的产物的核磁共振、红外和质谱分析结果见图 1~图 4。

¹H NMR (D₂O): δ 2.77(d, 1H, J=13.7Hz, H-1 α'), 2.81(d, 1H, J=13.7 Hz, H-1 α), 3.67(s, 3H, 4'=OCH₃), 3.69 (s, 6H, 3,5-OCH₃), 3.75(s, 3H, 4-OCH₃), 6.47 (s, 2H, H-2,6), 6.77(d, 1H, J=8.36Hz, H-5'), 6.79(d, 1H, J=8.36Hz, H-6'), 7.27(d, 1H, J=1.8 Hz, H-2')。

¹³C NMR(D₂O): δ 152.27, 148.05, 148.00, 143.35, 139.54, 135.14, 134.71, 122.32, 120.63, 120.62, 112.89, 106.21, 61.01, 56.30, 56.09, 37.590, 36.70;

20 IR(KBr): ν 3852w, 3385s, 2938m, 2839m, 1588m, 1509m, 1464m, 1420m, 1273m, 1124s, 987m, cm⁻¹。

ESIMS: m/z: 396.9(M⁺). Calc. 441.97 for C₁₈H₂₂O₈PNa₂。

【实施例 2】 毛兰素磷酸酯二钠的制备 (需生成磷酸酯中间体)

25 1、毛兰素磷酸二苄酯的合成

在干燥的三颈瓶中, 氩气保护, 毛兰素 (20g, 63.2mmol) 溶于 200ml 乙腈中, 搅拌, 冷却到 -25°C, 加入 CCl₄ (35ml, 316mmol), 搅拌 5 分钟, 用针筒滴加二异丙基乙胺 (23.13ml, 133mmol), 然后滴加 DMAP (772mg, 6.32mmol), 1 分钟后滴加二苄基亚磷酸酯 (20.33ml, 92mmol), 控制反应温 30 度在 -10°C 以下, 1hr 后用 TLC 检测, 若反应完全, 加入 50ml 0.5M 的 KH₂PO₄,

用乙酸乙酯 100ml×3 萃取，合并有机层，用 100ml 水，100ml 饱和 NaCl 洗，干燥，过滤。抽干溶剂，得到黄色油状物。柱层析（乙酸乙酯：己烷=2：3），用乙酸乙酯己烷重结晶，得到无色针状物，即为毛兰素磷酸二苄酯。m.p 73℃。

2、毛兰素磷酸酯钠盐的制备

5 氩气保护下，毛兰素磷酸二苄酯(20.5g, 35.6mmol)和 NaI(10.7g, 71mmol)的 100ml 乙腈溶液中，强烈搅拌下，慢慢加入三甲基氯硅烷(9.02ml, 71mmol)，搅拌 20 分钟，TLC 检测没有原料点，加入水（刚好可以溶解盐），加入 10% 硫代硫酸钠 2ml，分离有机相，水层用乙酸乙酯 50ml×4 萃取，合并有机层，真空浓缩，得到黄色泡沫状物。

10 泡沫状物用 100ml 甲醇溶解，加入 95%甲醇钠(4.1g, 71mmol)，搅拌 9h，甲醇真空抽干，固体用水-丙酮和甲醇-丙酮重结晶，得到白色固体，m.p. 266-269℃，即为毛兰素磷酸酯二钠。

对毛兰素磷酸酯二钠的物理性质测定结果同实施例 1。由分析结果可见，按照本发明方法制备获得了毛兰素磷酸酯二钠的成品。

15

【实施例 3】 毛兰素硫酸酯盐的制备

在 250ml 圆底烧瓶中加入毛兰素 10mmol，N、N-二甲基苯胺 75mmol，并加入与 N、N-二甲基苯胺等体积的 CH₂Cl₂，在冰盐水浴中搅拌（-5~-10℃），然后逐滴加入氯磺酸 12.5mmol。加完后在盐水浴中继续搅拌 1h。然后移去盐
20 水浴，在室温下搅拌 24h。用 10mol/l 的 NaOH 在搅拌下将反应液调 pH 至 10，冷却（或冰柜中冷却）后过滤。并用无水乙醚洗。干燥后将固体产物溶解在甲醇中过柱。溶剂抽干后得毛兰素硫酸酯钠盐。白色固体（易吸水）。

物理性质鉴定：

25 ¹H NMR (D₂O): δ 2.79(d, 1H, J=13.7Hz, H-1 α'), 2.80(d, 1H, J=13.7 Hz, H-1 α), 3.67(s, 3H, 4'=OCH₃), 3.74 (s, 6H, 3,5-OCH₃), 3.75(s, 3H, 4-OCH₃), 6.55 (s, 2H, H-2,6), 6.58(d, 1H, J=8.36Hz, H-5'), 6.85(d, 1H, J=8.36Hz, H-6'), 7.33(d, 1H, J=1.8 Hz, H-2').

¹³C NMR(D₂O): δ 152.27, 148.05, 148.00, 143.35, 139.54, 135.14, 134.71, 122.32, 120.63, 114.33, 108.03, 106.21, 61.01, 56.30, 56.09, 37.590, 36.70;

30 IR(KBr): ν 3539s, 3433m, 3001w, 2939m, 2841m, 1589s, 1508s, 1466m,

1422m, 1330m, 1262m, 1242s, 1174m, 1131s, 1014m, 619m, cm^{-1} .

ESIMS: m/z : 398.427 (M⁺). Calc. 421.46 for $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{SNa}$.

毛兰素盐的安全性评价

5 【实施例 4】毛兰素磷酸酯二钠的 LD50 测定

一、实验材料

实验动物: 昆明小鼠, 上海斯莱克实验动物中心提供, 体重 18~22g, 雌雄各半。

10 试剂: 0.9% NaCl, 毛兰素磷酸酯二钠: 浙江赛尔生物医学研究有限公司提供, 依上述方法制备, 苦味酸

器材: 1ml 一次性注射器

二、实验方法和步骤

1. 实验动物: 选用 KM 小鼠, 每组 10 只, 雌雄各半, 共设 7 组。用苦味酸标记。

15 2. 每组分别按体重以 1300 mg/kg、1250 mg/kg、1200 mg/kg、1150 mg/kg、1100mg/kg、1050mg/kg、1000mg/kg 尾静脉注射给药。

3. 给药后 0.25h、0.5h、1h、2h、4h、24h 分别观察一次, 记录死亡率。以后每天观察 1 次, 记录死亡率 (表 1), 持续 14 天, 第 15 天处死未死亡的小鼠, 进行病理解剖。

20

表 1 剂量—死亡率数据表

剂量 (mg/kg)	死亡数						总死亡 率	
	小时	天						
	0—4	1	2	3	4	5		6
1300		6		1				7
1250	1	3	2					6
1200	1					1		3
1150		1						1
1100		3						3
1050		1						1
1000								0

四、实验结果:

APLD₅₀ = 1243.0377 mg/kg 置信区间为: 1049.9757 ≤ LD₅₀ ≤ 1471.5984

对实验过程中死亡的小鼠进行解剖后没有明显病变; 14 天处死存活小鼠并进行病理解剖, 没有出现病理变化。

- 5 说明 3,4,5,4'-四甲氧基二苯乙烷-3'-O-磷酸二钠盐毒性很低, 具有很好的临床用药安全性。

毛兰素盐的抗肿瘤药效学试验

【实施例 5】 毛兰素磷酸酯二钠在抗肿瘤中的应用

10 1、试验样品

样品: 毛兰素的磷酸酯二钠 (AP, 按实施例 1 制得) 用生理盐水配制为所需浓度。

对照品: 注射用环磷酰胺 (CTX), 上海华联制药有限公司, 批号: 020806。配制时用生理盐水溶解。

15 2、动物和瘤株

昆明种小鼠 50 只, 雌性, 体重 19±1g, 由上海医药工业研究院动物房提供。

S180 腹水瘤小鼠 2 只, 由上海医药工业研究院动物房提供。

3、试验方法

- 20 S180 腹水瘤小鼠, 无菌条件下抽取腹水, 记数细胞, 用生理盐水稀释为 1-2 × 10⁷ 个/ml, 按 0.2ml/只给小鼠腋下皮下接种。次日将小鼠随机均分为 5 组, 每组 10 只。

给药剂量 (mg/kg./d):

AP 25mg/kg 、 75 mg/kg 、 225 mg/kg

- 25 给药途径: 静脉注射

对照品环磷酰胺采用静脉注射途径给药, 剂量为 30mg/kg × 9d。

另设空白对照组。

动物接种次日开始按体重给药, 灌胃 0.5ml/20g, 连续 9 天, 根据体重给药, 接种后第 10 天处死, 取瘤块称重, 计算抑瘤率。

- 30 结果判定根据以下公式:

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组瘤重} - \text{给药组瘤重}}{\text{对照组瘤重}} \times 100\%$$

4、结果

5 实验期间各组均未见死亡。

表 2、AP 抑制 S180 荷瘤小鼠实验结果

样品	剂量 mg/kg	给药 途径	动物数 (只)	体重 0d (g)	体重 10d (g)	瘤重	抑瘤 率%
AP	25	i.v	10/10	18.37±1.58	22.93±1.28	1.42±0.26	42
AP	75	i.v	10/10	18.41±1.74	22.75±2.25	0.82±0.20	67
AP	225	i.v	10/10	19.65±1.26	22.01±3.46	0.69±0.08	72
CTX	30	i.v	10/10	19.78±1.20	19.58±2.54	0.41±0.17	83
Control			10/10	20.29±1.60	23.34±1.87	2.45±0.27	

工业应用性

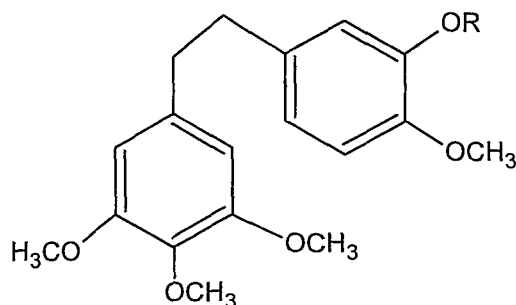
10 本发明所述的毛兰素盐具有比毛兰素更好的水溶性，因而对于制剂更方便，可以提高药物在体内的生物利用度，并且具有高效、低毒的抗癌作用。

本发明所述的毛兰素盐的制备方法中，所用试剂都是便宜易得的普通化学工业产品；合成路线短；操作方法简便，适宜于工业规模生产。

15 以上对本发明较佳实施方式的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或变形，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、一类毛兰素盐，其特征在于，所述毛兰素盐为具有如下通式 (I) 的化合物：



(I)

其中：

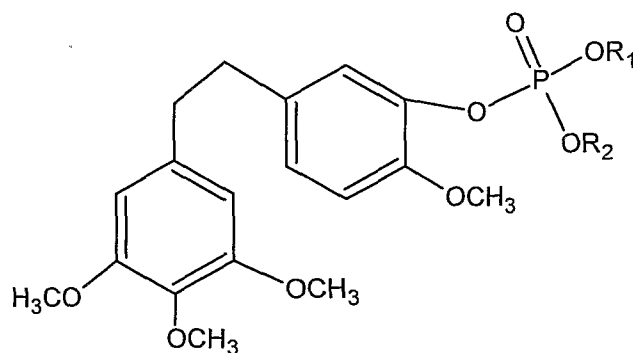
R 为无机含氧酸的一价酸根与金属、铵盐或有机胺所生成的盐；

所述金属选自碱金属、碱土金属；

10 所述无机含氧酸选自磷酸、硫酸、亚硫酸、硝酸、碳酸、次氯酸、三氟乙酸。

2、权利要求 1 所述的毛兰素盐，其特征在于，所述毛兰素盐为毛兰素磷酸酯盐或毛兰素硫酸酯盐。

15 3、权利要求 2 所述的毛兰素盐，其特征在于，所述毛兰素盐为毛兰素磷酸酯盐，其通式如 (II) 所示：



(II)

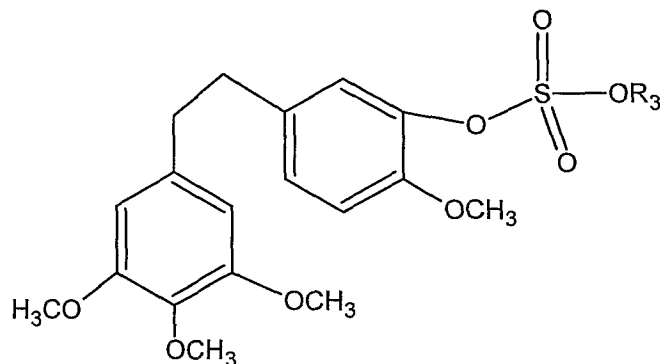
其中， R_1 、 R_2 为 H、Na、K 或 NH_4 ；

且 R_1 和 R_2 不同时为 H。

20 4、权利要求 3 所述的毛兰素盐，其特征在于，式 (II) 中 R_1 为 Na、 R_2

为 Na，所述毛兰素盐为毛兰素磷酸酯二钠。

5、权利要求 2 所述的毛兰素盐，其特征在于，所述毛兰素盐为毛兰素硫酸酯盐，其通式如 (III) 所示：



(III)

其中， R_3 为 Na、K 或 NH_4 。

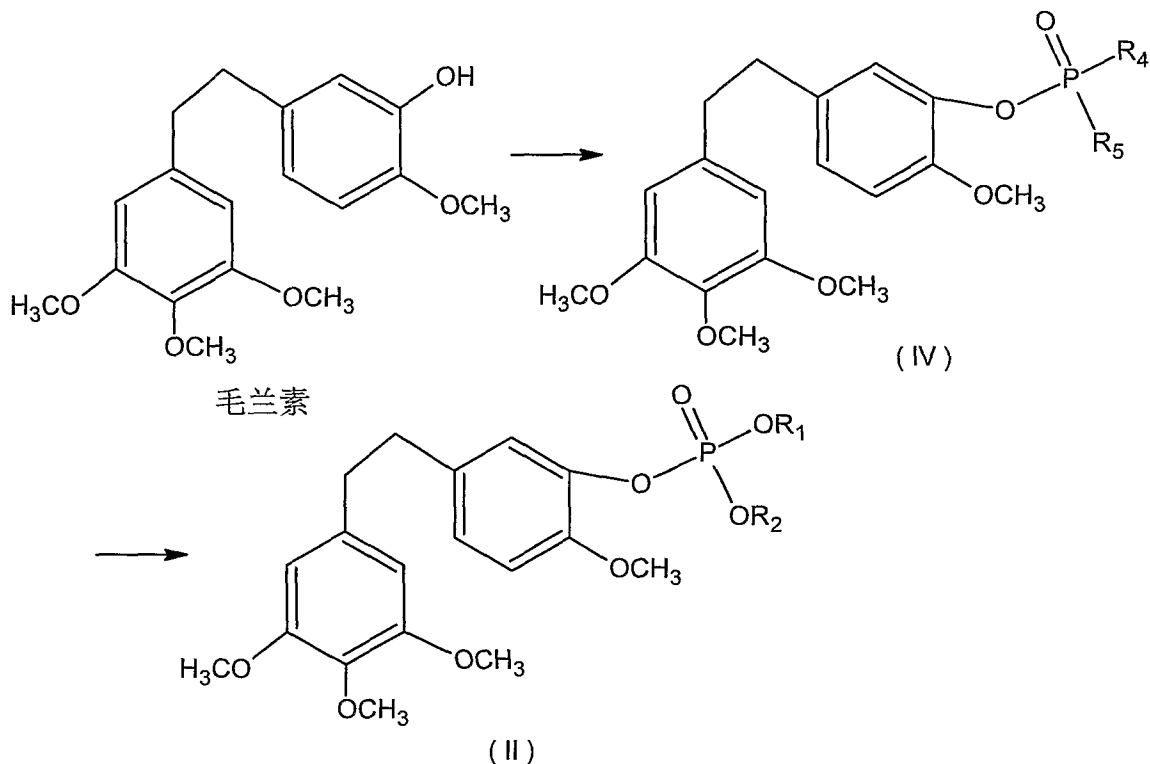
6、权利要求 5 所述的毛兰素盐，其特征在于，式 (III) 中 R_3 为 Na，所述毛兰素盐为毛兰素硫酸酯钠。

7、毛兰素盐的制备方法，其特征在于，包括下述步骤：

10 A1、使毛兰素与磷酸化剂，在缚酸剂的作用下，发生酚羟基的磷酸化反应，生成式 (IV) 的毛兰素磷酸化中间体，反应温度为 $25 \sim 80^\circ C$ ，反应溶剂为惰性有机溶剂；

A2、使由步骤 A1 得到的反应液直接与碱反应，制备得到式 (II) 的毛兰素磷酸酯盐；

15 合成路线为：



式 (IV) 中的 R_4 、 R_5 为 Obu^t 、 Cl 、或 Br ，其中 bu^t 代表叔丁基；

R_1 、 R_2 为 H 、 Na 、 K 或 NH_4 ，且 R_1 和 R_2 不同时为 H 。

8、权利要求 7 所述的制备方法，其特征在于，

5 在步骤 A1 中：

所述磷酸化剂为选自 OPCl_3 、 OPBr_3 、 $(\text{Bu}^t\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$ 的一种或多种；

所述缚酸剂为选自吡啶类、单烷基胺类、双烷基胺类、三烷基胺类的一种或多种；

10 所述惰性有机溶剂为选自二氯甲烷、二氯乙烷、苯、四氯化碳、乙腈的一种或多种；

在步骤 A2 中：

所述碱为选自 NaOH 、 KOH 、 NaOCH_3 、 KOCH_3 、 $\text{NaOCH}_2\text{CH}_3$ 、 KOCH_2CH_3 的一种或多种。

9、权利要求 7 所述的制备方法，其特征在于，

15 在所述步骤 A1 中：磷酸化剂为 OPCl_3 ，缚酸剂为三乙胺；

在所述步骤 A2 中：碱为 NaOH 。

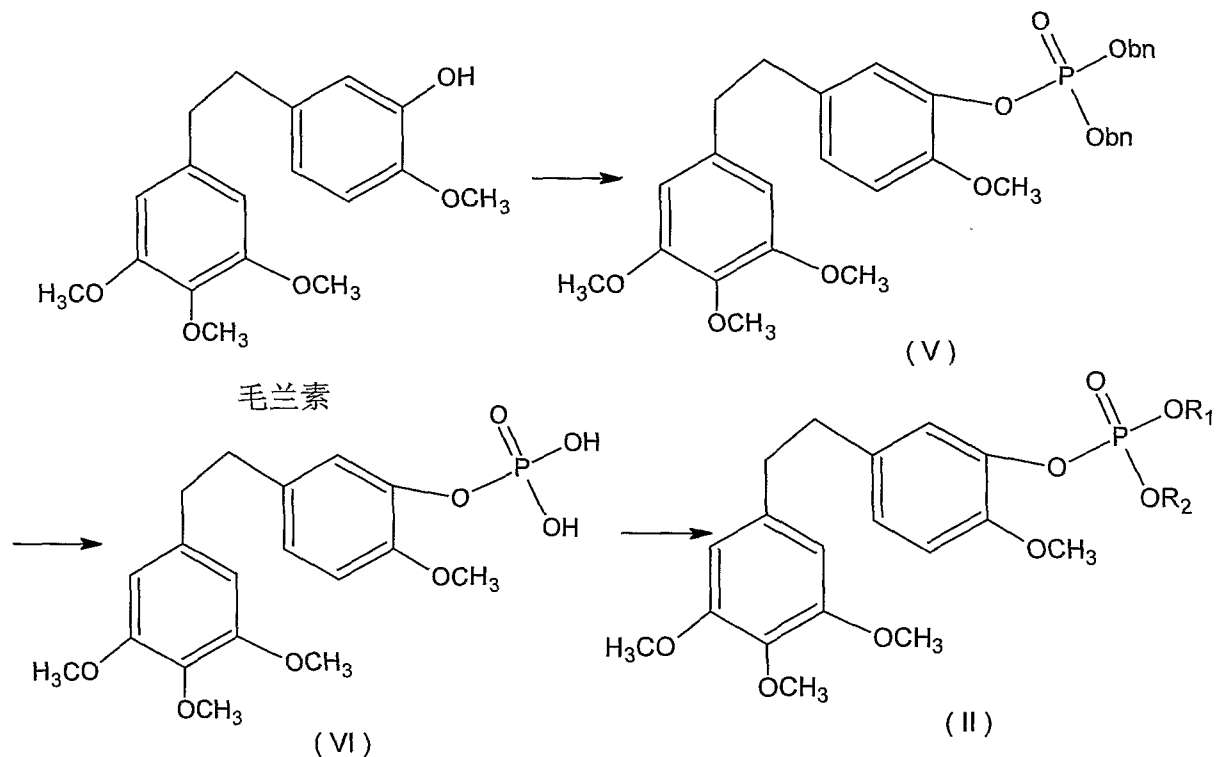
10、毛兰素盐的制备方法，其特征在于，包括下述步骤：

B1、在惰性气体保护下，使毛兰素与二苄基亚磷酸酯，在缚酸剂的作用下，发生酚羟基的磷酸化反应，制备得到式 (V) 的化合物，反应温度为 $-40^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$ ，反应在惰性有机溶剂中进行；

B2、在惰性气体保护下，使式 (V) 的化合物与 NaI 在活性基保护剂的作用下发生反应，制备得到式 (VI) 的化合物，反应在惰性有机溶剂中进行；

B3、使式 (VI) 的化合物与碱反应，制备得到式 (II) 的化合物；

合成路线为：



式 (V) 中的 bn 代表苄基； R_1 、 R_2 为 H、Na、K 或 NH_4 ，且 R_1 和 R_2 不同时为 H。

11、权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于，

在步骤 B1 中：

所述缚酸剂为选自吡啶类、单烷基胺类、双烷基胺类、三烷基胺类、二甲氨基吡啶的一种或多种；

15 所述惰性气体为氩气、氮气、或一氧化碳；

所述惰性有机溶剂为选自二氯甲烷、二氯乙烷、苯、四氯化碳、乙腈的一种或多种；

在步骤 B2 中：

所述惰性有机溶剂为选自二氯甲烷、二氯乙烷、苯、四氯化碳、乙腈的一种或多种；

在步骤 B3 中：

所述碱为选自 NaOH、KOH、NaOCH₃、KOCH₃、NaOCH₂CH₃、KOCH₂CH₃ 的一种或多种。

12、权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于，

在所述步骤 B1 中：所述缚酸剂为二异丙基乙胺和二甲氨基吡啶，惰性气体为氩气；

10 在所述步骤 B2 中：惰性气体为氩气，活性基保护剂为三甲基氯硅烷，惰性有机溶剂为乙腈和/或四氯化碳；

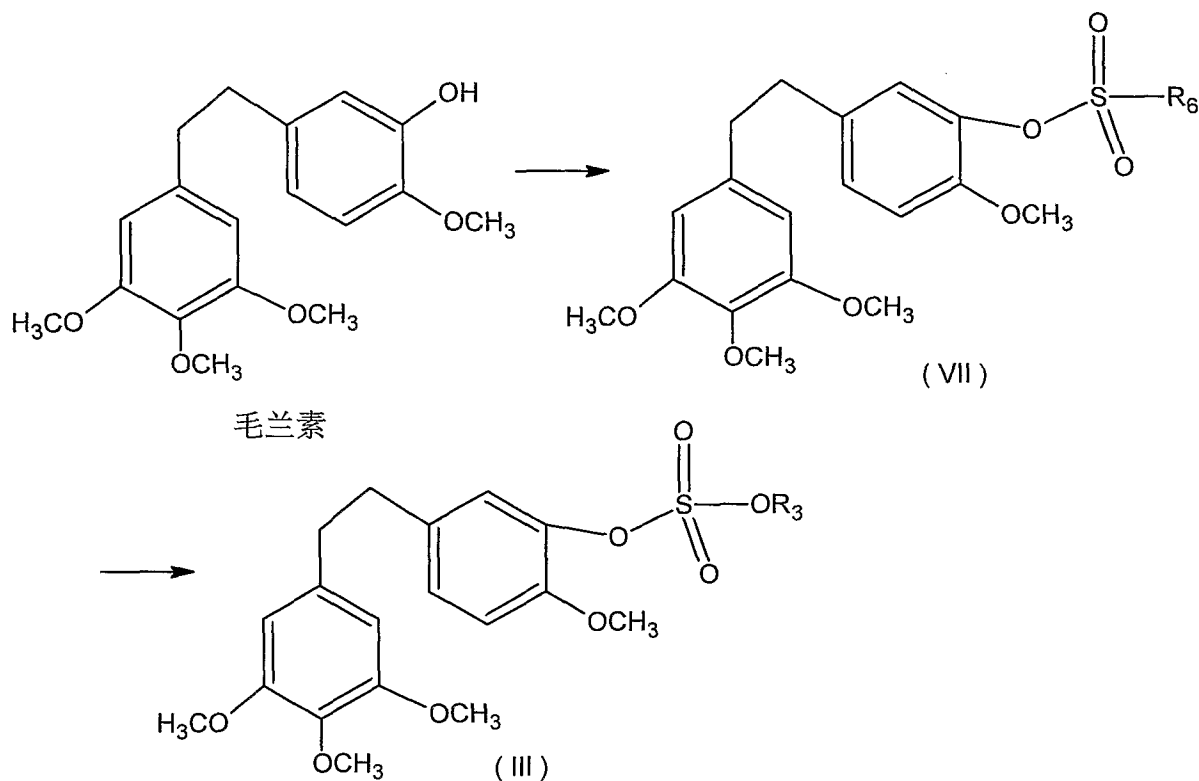
在所述步骤 B3 中：碱为甲醇钠。

13、毛兰素盐的制备方法，其特征在于，包括下述步骤：

15 C1、使毛兰素与卤磺酸，在缚酸剂的作用下，发生酚羟基的硫酸化反应，生成式 (VI) 的毛兰素硫酸化中间体，反应温度为 -5~-10℃，反应溶剂为惰性有机溶剂；

C2、使由步骤 C1 得到的反应液直接与碱反应，制备得到式 (III) 的毛兰素硫酸酯钠盐；

合成路线为：



式 (VII) 中的 R_6 为 Cl 或 Br; R_3 为 Na、K 或 NH_4 。

14、权利要求 13 所述的制备方法, 其特征在于,

在步骤 C1 中:

5 所述卤磺酸为氯磺酸或溴磺酸;

所述缚酸剂为选自吡啶类、单烷基胺类、双烷基胺类、三烷基胺类的一种或多种;

所述惰性有机溶剂为选自二氯甲烷、二氯乙烷、苯、四氯化碳的一种或多种;

10 在步骤 C2 中:

所述碱为选自 NaOH、KOH、 $NaOCH_3$ 、 $KOCH_3$ 、 $NaOCH_2CH_3$ 、 $KOCH_2CH_3$ 的一种或多种。

15、权利要求 13 所述的制备方法, 其特征在于,

15 在所述步骤 C1 中: 卤磺酸为氯磺酸, 缚酸剂为 N、N-二甲基苯胺, 惰性有机溶剂为二氯甲烷;

在所述步骤 C2 中: 碱为氢氧化钠。

16、一种药物组合物, 其包含

治疗有效量的权利要求 1~6 之一所述毛兰素盐；以及
药学上可接受的载体和/或赋形剂。

17、权利要求 16 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物为注射给药制剂或口服给药制剂。

5 18、权利要求 1 所述毛兰素盐在制备抗肿瘤药物中的应用。

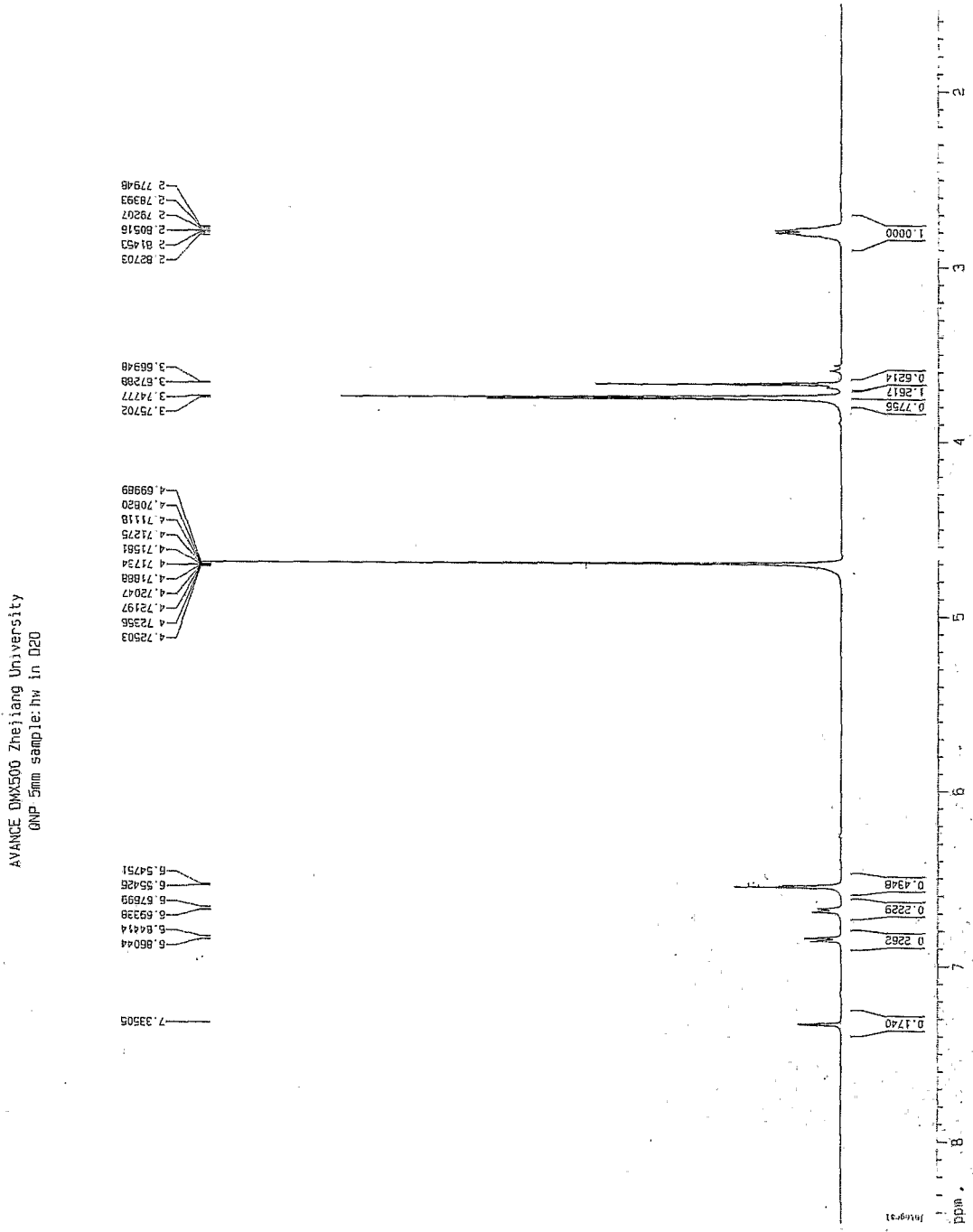


图 1

STATE ZHEJIANG UNIVERSITY
JIP 5mm sample1: 2005 03 22 19 020

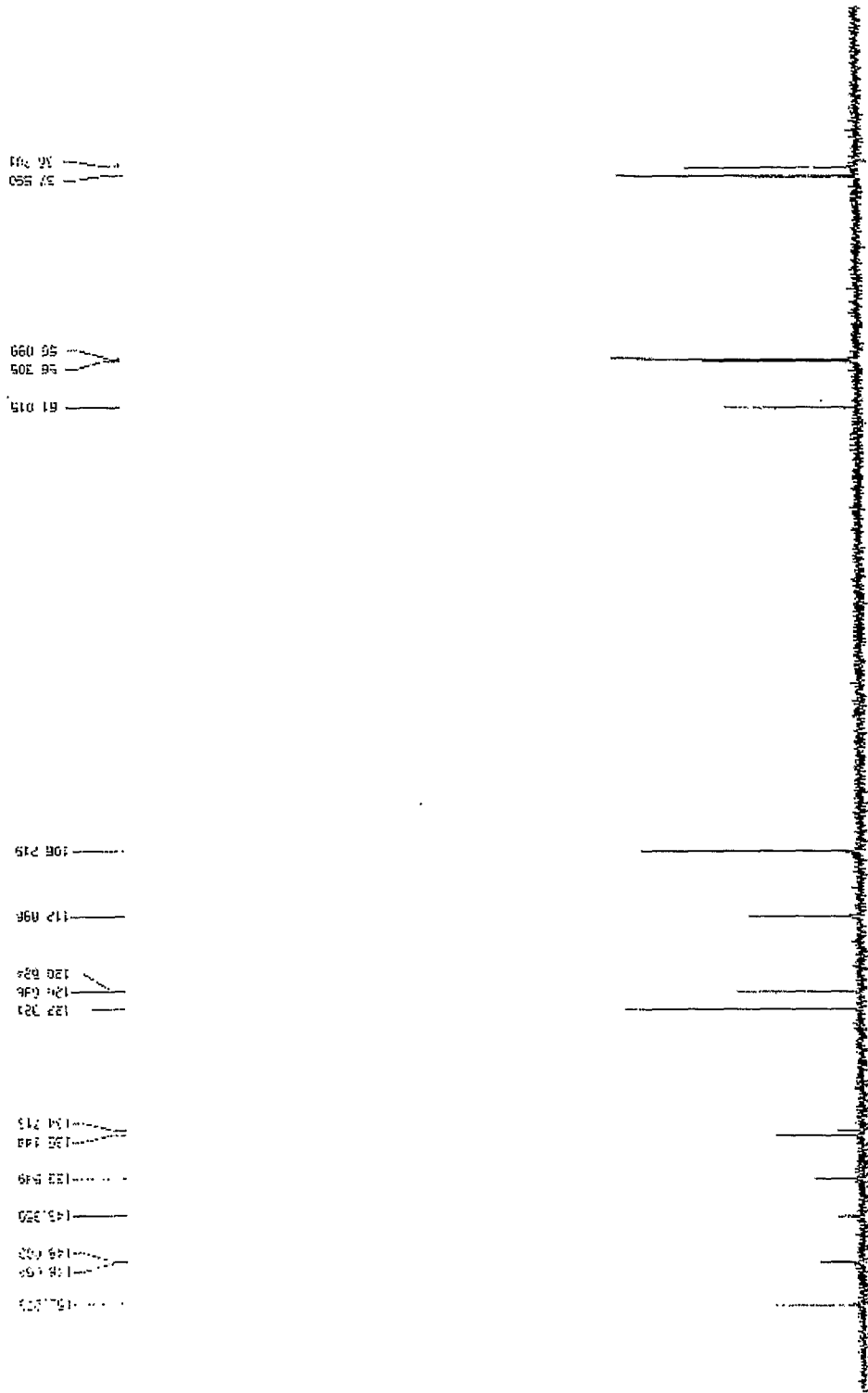


图 2

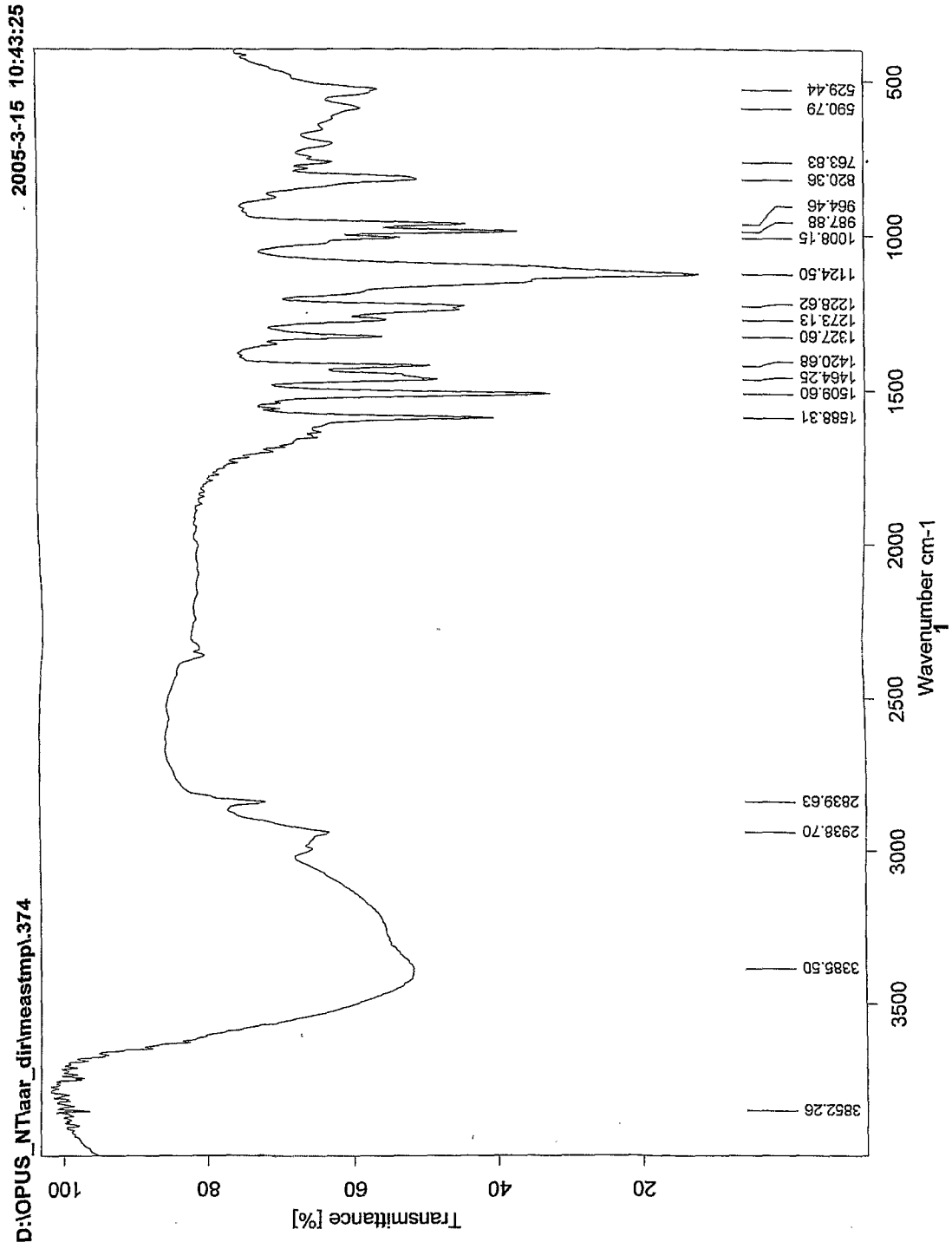


图 3

Display Report

Analysis Info

Analysis Name nong904-.d
Method Copy of start.MS
Sample Name Default
Comment

Acquisition Date 09/03/04 16:33:18
Operator Administrator
Instrument Esquire-LC_00075

Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	m/z
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	100.00 m/z	Scan End	900.00 m/z
Capillary Exit	-39.8 Volt	Skim 1	-28.9 Volt	Trap Drive	44.5
Accumulation Time	2338 μ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	On

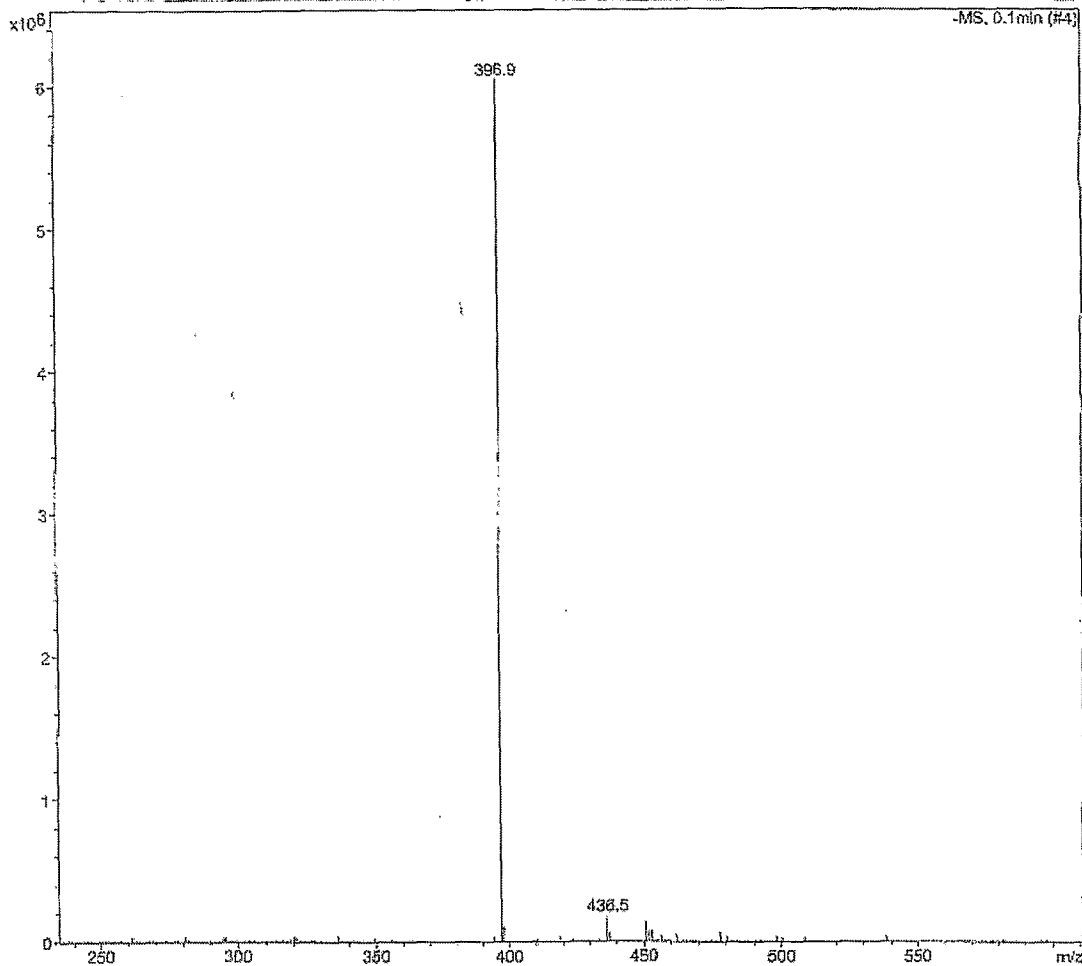


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2006/001918

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <p style="text-align: center;">See extra sheet</p> 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) <p style="text-align: center;">C07F 9 C07C43 A61K31 A61P35</p> 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) <p style="text-align: center;">CNPAT, EPODOC, WPI, PAJ, CNKI, CAPLUS, REGISTRY (STN)</p>				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	Wang, Tianshan et al., "In vitro inhibition of leukemia K ₅₆₂ cells growth by constituents from Dendrobium chrysotoxum", Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa, 1997, Vol.9, No.2:1-3	1-18		
A	Nandy, Partha. et al., "Quantitative structure-activity relationship analysis of combretastatins: a class of novel antimetabolic agents", Pharmaceutical Research, 1991, Vol.8, No.6:776-81, see the compound 15	1-18		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> * 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 </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "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 </td> </tr> </table>			* 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
* 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 <p style="text-align: center;">11. Oct 2006 (11.10.2006)</p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">16 · NOV 2006 (16 · 11 · 2006)</p>		
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 <div style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 2px;">Xu Chi</div> Telephone No. 86-10-62085562		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.


PCT/CN2006/001918

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07F 9/08 (2006.01) i
C07C 43/235 (2006.01) i
A61K 31/09 (2006.01) i
A61P 35/00 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2006/001918

<p>A. 主题的分类</p> <p style="text-align: center;">参见附加页</p> <p>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</p>											
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p style="text-align: center;">C07F 9 C07C43 A61K31 A61P35</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p style="text-align: center;">CNPAT, EPODOC, WPI, PAJ, CNKI, CAPLUS, REGISTRY (STN)</p>											
<p>C. 相关文件</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">类 型*</th> <th style="width: 60%;">引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th style="width: 30%;">相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>王天山等人, “鼓槌石斛中化学成分对 K₅₆₂ 肿瘤细胞株生长抑制作用体外试验”, 天然产物研究与开发, 1997 年, 第 9 卷, 第 2 期: 1-3</td> <td style="text-align: center;">1-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>Nandy, Partha.等人, “Quantitative structure-activity relationship analysis of combretastatins: a class of novel antimetabolic agents”, Pharmaceutical Research, 1991 年, 第 8 卷第 6 期: 776-81 页, 参见化合物 15</td> <td style="text-align: center;">1-18</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	王天山等人, “鼓槌石斛中化学成分对 K ₅₆₂ 肿瘤细胞株生长抑制作用体外试验”, 天然产物研究与开发, 1997 年, 第 9 卷, 第 2 期: 1-3	1-18	A	Nandy, Partha.等人, “Quantitative structure-activity relationship analysis of combretastatins: a class of novel antimetabolic agents”, Pharmaceutical Research, 1991 年, 第 8 卷第 6 期: 776-81 页, 参见化合物 15	1-18
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
A	王天山等人, “鼓槌石斛中化学成分对 K ₅₆₂ 肿瘤细胞株生长抑制作用体外试验”, 天然产物研究与开发, 1997 年, 第 9 卷, 第 2 期: 1-3	1-18									
A	Nandy, Partha.等人, “Quantitative structure-activity relationship analysis of combretastatins: a class of novel antimetabolic agents”, Pharmaceutical Research, 1991 年, 第 8 卷第 6 期: 776-81 页, 参见化合物 15	1-18									
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>											
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “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</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “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</p> <p>“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 “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</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “&” 同族专利的文件</p> <p>“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</p>											
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p style="text-align: center;">11.10 月 2006 (11.10.2006)</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p style="text-align: center;">16 . 11 月 2006 (16 . 11 . 2006)</p>									
<p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)</p> <p>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088</p> <p>传真号: (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>电话号码: (86-10)62085562</p>									

主题的分类

C07F 9/08 (2006.01) i

C07C 43/235 (2006.01) i

A61K 31/09 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i