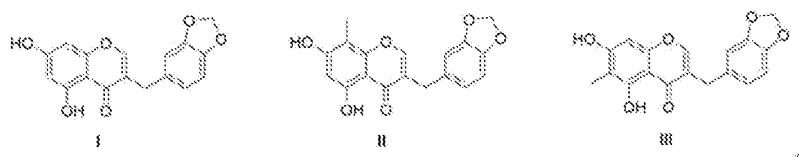


说明书

发明名称: 甲基麦冬黄酮A类衍生物及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物化学领域,具体涉及三种甲基麦冬黄酮A类衍生物式I、式II、式III及其制备和应用,尤其是在治疗和/或预防心血管疾病以及相关疾病方面的用途。



背景技术

[0002] 心血管疾病(CVD)是全球导致死亡的主要原因,占全世界死亡的31.5%,占非传染性疾病致死人数的45.0%,高于肿瘤及其他疾病,且患病率处于持续上升态势。根据《中国心血管健康与疾病报告2021》,推算我国心血管病现患人数3.3亿,占总人口的约23%,其中冠心病1139万,心力衰竭890万,高血压2.45亿,肺源性心脏病500万,房颤487万,风湿性心脏病250万。同时发病年龄逐渐年轻化。心脑血管疾病住院总费用逐年增加,平均增速远高于国民生产总值增速。

[0003] 近40年来,心血管疾病治疗药物有了很大进展,包括 β 受体阻滞剂、钙通道阻滞剂、利尿剂、肾素-血管紧张素-醛固酮系统药物、调脂药、血管扩张剂、窦房结通道阻滞剂、改善心肌代谢药及丹参片、速效救心丸、银杏叶制剂等中成药。但近年来,该领域治疗药物研发遇到瓶颈,除了在老药新用(如钠-葡萄糖协同转运蛋白2抑制剂恩格列净、达格列净)和少数的新作用靶点候选药物(Vericiguat和Omecamtiv Mecarbil)取得一定进展,整体研发明显落后于肿瘤药物和自身免疫性疾病药物,现有药物不能满足临床治疗的需要,迫切需要开发新的药物疗法。同时目前的标准治疗仍然存在心血管风险,接受二级预防的患者,仍会存在相当大的残留心血管风险,主要不良心血管事件的风险仍有4~12%。

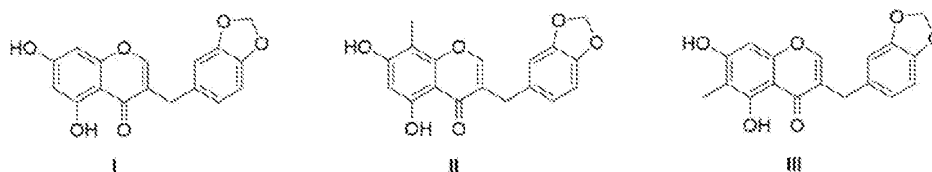
[0004] 以中药与天然产物为资源发现和研发创新药物，一直是新药创制的重要途径，中国原创并得到国际认可的创新药物如青蒿素、二氢青蒿素、石杉碱甲、双环醇、丁苯酞等都来源于中药。甲基麦冬黄酮A是中药麦冬中含有的成分，有研究显示其具有抗非酒精性脂肪肝及保肝活性，我们的研究发现其具有心血管疾病预防活性。在本发明中我们以甲基麦冬黄酮A为先导化合物，发现了具有更优活性的一类甲基麦冬黄酮A类衍生物，并进行了药效学评价。

[0005] 发明内容

[0006] 本发明解决的技术问题是提供三种甲基麦冬黄酮A类衍生物、其制备方法以及在制备预防和/或治疗与心血管有关疾病的药物中的应用。

[0007] 为解决本发明的技术问题，本发明提供如下技术方案：

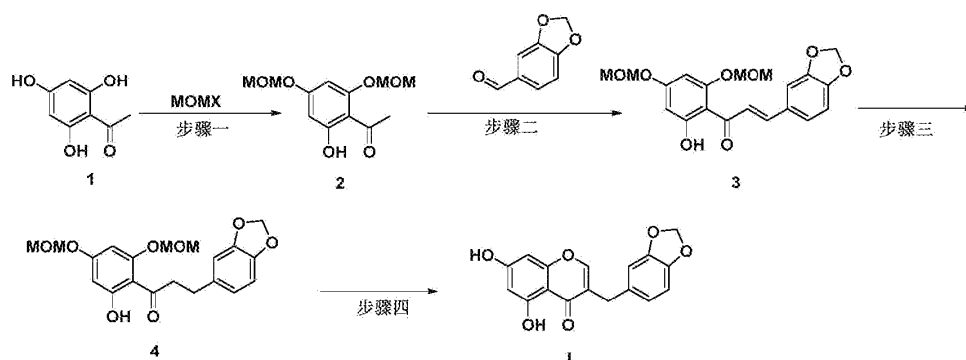
[0008] 本发明技术方案的第一方面是提供了三种甲基麦冬黄酮A类衍生物式I，式II，式III，及其药学上可接受的盐，具有如下的结构式：



[0009] 本发明技术方案的第二方面是提供了第一方面所述三种甲基麦冬黄酮A类衍生物式I，式II，式III及其药学上可接受盐的制备方法。

[0010] 本发明的甲基麦冬黄酮A类衍生物I可通过如下方法获得，该方法包括以下步骤：

[0011] 在碱性的条件下，将2,4,6-三羟基苯乙酮(1)与卤代甲氧基甲基醚反应制得式(2)结构的化合物；在碱性的条件下，式(2)结构的化合物与胡椒醛反应制得式(3)结构的化合物；将式(3)结构的化合物的双键还原制得式(4)结构的化合物；式(4)结构的化合物与三氯氧磷、N,N-二甲基甲酰胺反应制得式I结构的化合物：

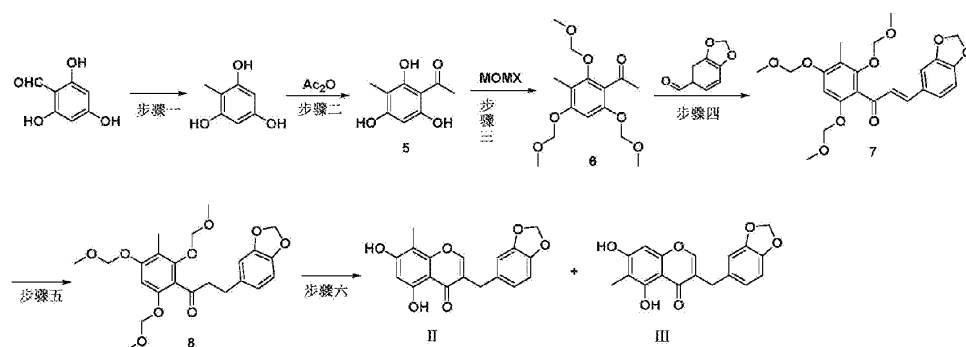


[0012] 优选地，在步骤一中，所述碱为三乙胺或N,N-二异丙基乙胺，所述的卤代甲氧基甲基醚为溴代甲氧基甲基醚。在步骤二中，所述碱为氢化钠或醇钠，KOH/EtOH等。在步骤三中，所述还原剂为钨碳/氢气或二氯亚锡等。

[0013] 更优选地，在步骤一中，所述碱为N,N-二异丙基乙胺。在步骤二中，所述碱为氢化钠，反应在溶剂如四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺等的存在下进行。在步骤三中，所述还原剂为钨碳/氢气。

[0014] 本发明的甲基麦冬黄酮A类衍生物II和III可通过如下方法获得，该方法包括以下步骤：

[0015] 将2,4,6-三羟基苯甲醛还原为2,4,6-三羟基甲苯，与醋酐反应制得式(5)结构的化合物；在碱性条件下式(5)与卤代甲氧基甲基醚反应制得式(6)结构的化合物；在碱性的条件下，式(6)结构的化合物与胡椒醛反应制得式(7)结构的化合物；将式(7)结构的化合物的双键还原制得式(8)结构的化合物；式(8)结构的化合物与三氯氧磷、N,N-二甲基甲酰胺反应制得式II和式III结构的化合物：



- [0016] 优选地，在步骤一中，所述还原剂为金属还原剂或金属硼氢化物。在步骤三中，所述碱为三乙胺或N,N-二异丙基乙胺。在步骤四中，所述碱为氢化钠或醇钠，KOH/EtOH。在步骤五中，所述还原剂为钨碳/氢气或二氯亚锡等。
- [0017] 更优选地，在步骤一中，所述还原剂为金属还原剂。在步骤三中，所述碱为N,N-二异丙基乙胺。在步骤四中，所述碱为氢化钠，反应在四氢呋喃的存在下进行。在步骤五中，所述还原剂为钨碳/氢气。
- [0018] 本发明技术方案的第三方面提供了一种药物组合物，其包含治疗和/或预防有效量的本发明第一方面所述甲基麦冬黄酮A类衍生物及其药学上可接受的盐，以及任选的一种或多种药学可接受的载体或赋形剂。
- [0019] 该药物组合物可根据本领域公知的方法制备。可通过将本发明化合物与一种或多种药学上可接受的固体或液体赋形剂和/或辅剂结合，制成适于人或动物使用的任何剂型。本发明化合物在其药物组合物中的含量通常为0.1-95重量%。
- [0020] 本发明化合物或含有它的药物组合物可以单位剂量形式给药，给药途径可为肠道或非肠道，如口服、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、鼻腔、口腔粘膜、眼、肺和呼吸道、皮肤、阴道、直肠等。
- [0021] 给药剂型可以是液体剂型、固体剂型或半固体剂型。液体剂型可以是溶液剂(包括真溶液和胶体溶液)、乳剂(包括o/w型和w/o型和复乳)、混悬剂、注射剂(包括水针剂、粉针剂和输液)、滴眼剂、滴鼻剂、洗剂和搽剂等；固体剂型可以是片剂(包括普通片、肠溶片、含片、分散片、咀嚼片、泡腾片、口腔崩解片)、胶囊剂(包括硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊)、颗粒剂、散剂、微丸、滴丸、栓剂、膜剂、贴片、气(粉)雾剂、喷雾剂等；半固体剂型可以是软膏剂、凝胶剂、糊剂等。
- [0022] 本发明化合物可以制成普通制剂、也制成是缓释制剂、控释制剂、靶向制剂及各种微粒给药系统。
- [0023] 为了将本发明化合物制成片剂，可以广泛使用本领域公知的各种赋形剂，包括稀释剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂、润滑剂、助溶剂。稀释剂可以是淀粉、糊精、蔗糖、葡萄糖、乳糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、微晶纤维素、硫酸钙、磷酸氢钙、碳酸钙等；湿润剂可以是水、乙醇、异丙醇等；粘合剂可以是淀粉

浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、微晶纤维素、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、丙烯酸树脂、卡波姆、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇等；崩解剂可以是干淀粉、微晶纤维素、低取代羟丙基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠、碳酸氢钠与枸橼酸、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠等；润滑剂和助溶剂可以是滑石粉、二氧化硅、硬脂酸盐、酒石酸、液体石蜡、聚乙二醇等。

- [0024] 还可以将片剂进一步制成包衣片，例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片，或双层片和多层片。
- [0025] 为了将给药单元制成胶囊剂，可以将有效成分本发明化合物与稀释剂、助溶剂混合，将混合物直接置于硬胶囊或软胶囊中。也可将有效成分本发明化合物先与稀释剂、黏合剂、崩解剂制成颗粒或微丸，再置于硬胶囊或软胶囊中。用于制备本发明化合物片剂的各种稀释剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂、助溶剂品种也可用于制备本发明化合物的胶囊剂。
- [0026] 为将本发明化合物制成注射剂，可以用水、乙醇、异丙醇、丙二醇或它们的混合物作溶剂并加入适量本领域常用的增溶剂、助溶剂、pH调节剂、渗透压调节剂。增溶剂或助溶剂可以是泊洛沙姆、卵磷脂、羟丙基- β -环糊精等；pH调节剂可以是磷酸盐、醋酸盐、盐酸、氢氧化钠等；渗透压调节剂可以是氯化钠、甘露醇、葡萄糖、磷酸盐、醋酸盐等。如制备冻干粉针剂，还可加入甘露醇、葡萄糖等作为支撑剂。
- [0027] 此外，如需要，也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂或其它添加剂。
- [0028] 为达到用药目的，增强治疗效果，本发明的药物或药物组合物可用任何公知的给药方法给药。
- [0029] 本发明化合物药物组合物的给药剂量依照所要预防或治疗疾病的性质和严重程度，患者或动物的个体情况，给药途径和剂型等可以有大范围的变化。一般来讲，本发明化合物的每天的合适剂量范围为0.001–5mg/Kg体重。上述剂量可以

一个剂量单位或分成几个剂量单位给药，这取决于医生的临床经验以及包括运用其它治疗手段的给药方案。

[0030] 本发明的化合物或组合物可单独服用，或与其他治疗药物或对症药物合并使用。当本发明的化合物与其它治疗药物存在协同作用时，应根据实际情况调整它的剂量。

[0031] 本发明技术方案的第四方面是提供了第一方面所述甲基麦冬黄酮A类衍生物及其药学上可接受的盐以及第三方面所述药物组合物在制备预防和/或治疗与心血管有关疾病的药物中的应用。其中所述的与心血管有关疾病选自选自以下中的一种或多种：心肌缺血、心肌损伤、心肌肥厚、冠心病、高血压、心力衰竭、心肌病、心率失常、心肌梗死、心绞痛。

[0032] 有益技术效果

[0033] 本发明的甲基麦冬黄酮A类衍生物，在异丙肾上腺素诱导的心肌细胞损伤模型、缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤模型、血管紧张素II诱导的心肌细胞损伤模型，均表现显著的心肌细胞损伤保护活性，能够显著提高心肌细胞存活率， $0.1 \mu\text{M}$ 即显示良好药效。在血管紧张素II诱导的心肌细胞肥大模型，亦表现显著的抑制心肌细胞肥大活性， $0.1 \mu\text{M}$ 即显示良好药效。心肌损伤伴随在心血管疾病发生发展当中，心肌肥大是高血压等导致心力衰竭重要的病理过程。多个实验结果均表明，本发明的化合物具有良好的心肌细胞保护和抑制心肌肥大活性，且在本实验条件下，多数活性结果优于甲基麦冬黄酮A和地尔硫卓。

[0034] 本发明的甲基麦冬黄酮A类衍生物式I和式II，在体内模型中具有以下方面显著活性：在经典的异丙肾上腺素诱导的缺血性心脏病小鼠模型表现明确的心肌缺血、心肌肥厚治疗作用，能够降低心力衰竭/心肌肥厚生物标记物NT-proBNP和ANP水平，降低血清心肌酶CK-MB水平，减轻心肌组织钙超载，显著改善心肌组织病理损伤；在血管紧张素II诱导的高血压性心脏病小鼠模型表现明确的降血压和相关心脏病防治作用，能够显著降低血管紧张素II诱导的收缩压进行性升高，降低心力衰竭/心肌肥厚生物标记物BNP水平，降低血清心肌损伤生物标记物肌钙蛋白cTn-T和心肌酶CK-MB水平，减少炎症因子TNF- α 的产生和释放，减轻肾素血管紧张素醛固酮系统(RAAS)系统和交感神经系统的过度激活效

应，改善心肌肥厚，改善左心室收缩和舒张功能，提高左心室顺应性。在体内动物模型中，本发明的甲基麦冬黄酮A类衍生物活性优于甲基麦冬黄酮A、地尔硫卓及螺内酯，与替米沙坦活性相当，且无替米沙坦导致低血压的不良作用。

[0035] 综合以上体外、体内实验结果，本发明的甲基麦冬黄酮A类衍生物具有潜在的抗心血管疾病药物的开发价值。

附图说明

[0036] 图1.甲基麦冬黄酮A类衍生物式I和式II对血管紧张素II(AngII)引起心肌细胞肥大损伤改善作用的图。

[0037] 图2.甲基麦冬黄酮A类衍生物式I和式II对异丙肾上腺素(ISO)诱导的心肌缺血/心肌肥厚小鼠心脏组织病理改变的改善作用(H.E.200×)。

[0038] 图3.甲基麦冬黄酮A类衍生物式I和式II对血管紧张素II(AngII)诱导的高血压性心脏病小鼠M型超声心动图的影响。

具体实施方式

[0039] 本发明提供了三种治疗心血管疾病的甲基麦冬黄酮A类衍生物及其制备和应用。下面列举实施例进一步对本发明予以说明，实施例仅为解释和说明性的，绝不意味着以任何方式限制本发明的范围。

[0040] 化合物的结构是通过核磁共振氢谱(¹H NMR)和/或质谱(MS)来确定的。NMR位移(δ)以10-6(ppm)的单位给出。NMR的测定是用Bruker AV400型核磁共振波谱仪。MS的测定是用Thermo scientific(ESI)质谱仪进行的。

[0041] 柱层析一般使用200~300目硅胶为载体。

[0042] 本发明的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成，或可购买于偶合科技、百灵威科技、安耐吉化学等公司。

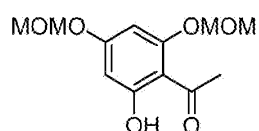
[0043] 氢气氛是指反应瓶连接一个约1L容积的氢气气球。

[0044] 下列药理研究实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

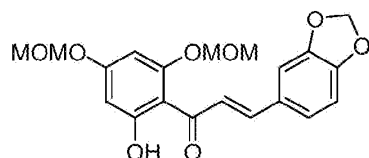
[0045] 下述实施例中，部分物质或缩写相应的中文名称如下：

[0046] Control：空白对照

- [0047] Model: 模型对照
- [0048] ISO: 异丙肾上腺素
- [0049] H/R: 缺氧复氧
- [0050] Ang II: 血管紧张素 II
- [0051] DMSO: 二甲基亚砜
- [0052] NaH: 氢化钠
- [0053] Na₂SO₄: 硫酸钠
- [0054] NaCl: 氯化钠
- [0055] SFC: 超临界液相色谱
- [0056] DEA: 二乙胺
- [0057] 实施例1甲基麦冬黄酮A类衍生物式I的制备
- [0058] 1、式(2)结构的化合物的制备(1-(2-hydroxy-4,6-bis(methoxymethoxy)phenyl)ethan-1-one)



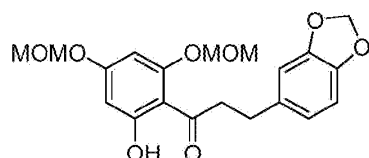
- [0059] 将2,4,6-三羟基苯乙酮(10.0g,59.5mmol)与N,N-二异丙基乙胺(23.1g,178.5mmol)溶于200mL二氯甲烷中,在冰浴下缓慢加入溴代甲氧基甲基醚(10.7mL,130.9mmol),2h内加毕,UPLC-MS监测反应进程,待原料消失后,加甲醇淬灭反应,反应液减压浓缩,残余物经硅胶柱层析纯化,洗脱剂石油醚/乙酸乙酯=10:1,得标题化合物8.0g,收率52%。
- [0060] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ 13.72(s,1H),6.26(dd,J=9.3,2.3Hz,2H),5.26(s,2H),5.17(s,2H),3.52(s,3H),3.47(s,3H),2.66(s,3H).
- [0061] 2、式(3)结构的化合物的制备(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-(2-hydroxy-4,6-bis(methoxymethoxy)phenyl)prop-2-en-1-one)



[0062] 将式(2)结构的化合物(8.0g,31.2mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺中,冰浴下缓慢加入NaH(1.1g,46.8mmol),然后加入胡椒醛(4.7g,31.2mmol),反应液在冰浴下继续搅拌反应30min, UPLC-MS监测反应进程,待原料消失后,加水,再加乙酸乙酯萃取,有机相用水和饱和NaCl水溶液洗涤,减压浓缩后,残余物经硅胶柱层析纯化,洗脱剂石油醚/乙酸乙酯=5:1,得标题化合物9.0g,收率74%。

[0063] ^1H NMR(400MHz,CDCl₃) δ 13.89(s,1H),7.82 - 7.69(m,2H),7.12 - 7.07(m,2H),6.84(d,J=7.9Hz,1H),6.28(dd,J=28.0,2.3Hz,2H),6.03(s,2H),5.29(s,2H),5.19(s,2H),3.54(s,3H),3.49(s,3H).

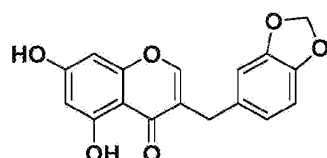
[0064] 3、式(4)结构的化合物的制备(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-(2-hydroxy-4,6-bis(methoxymethoxy)phenyl)propan-1-one)



[0065] 将式(3)结构的化合物(9g,23.2mmol)溶于150ml四氢呋喃中,加入Pd/C(0.9g),在室温下通入氢气16h, UPLC-MS监测反应进程,待原料消失后,过滤除去固体,液体减压浓缩,得到标题化合物7.2g,收率:79%。

[0066] ^1H NMR(400MHz,CDCl₃) δ 13.68(s,1H),7.26(s,1H),6.77 - 6.65(m,3H),6.27(dd,J=11.6,2.3Hz,2H),5.93(s,2H),5.24(s,2H),5.17(s,2H),3.48(d,J=3.1Hz,7H),3.35 - 3.29(m,2H),2.94(t,J=7.6Hz,2H)。

[0067] 4、式I的制备(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-(2-hydroxy-4,6-bis(methoxymethoxy)phenyl)propan-1-one)



[0068] 将式(4)结构的化合物(300mg,0.76mmol)溶于5mL乙酸乙酯,氮气氛下,缓慢滴加N,N-二甲基甲酰胺(224mg,3.06mmol)和三氯氧磷(470mg,3.06mmol),反应液在室温下继续搅拌5h, UPLC-MS监测反应进程,待原料消失后,加水淬灭反应,

再加乙酸乙酯萃取($3 \times 25\text{mL}$), 有机相用水和饱和NaCl水溶液洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物经硅胶柱层析纯化, 洗脱剂正己烷/乙酸乙酯=1:1, 得标题化合物34mg, 收率24.5%。

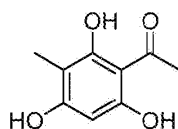
[0069] ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 12.70(s,1H),11.36 - 11.08(m,1H),8.19(s,1H),6.90 - 6.73(m,3H),6.31-6.30(m,1H),6.16-6.15(m,1H),5.95(s,2H),3.57(s,2H).

[0070] MS(ESI-): $[(\text{M}-\text{H})^-]$ 311.0.

[0071] HPLC纯度:99.34%(254nm),99.13%(214nm)。

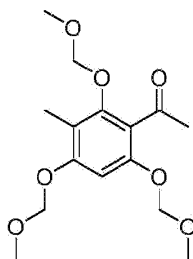
[0072] 实施例2: 甲基麦冬黄酮A类衍生物式II和式III的制备

[0073] 1、式(5)结构的化合物的制备(1-(2-hydroxy-4,6-bis(methoxymethoxy)phenyl)ethan-1-one)



[0074] 将2,4,6-三羟基甲苯(5g,35.70mmol)溶于100mL冰醋酸中, 室温下加入三氟化硼乙醚(6.08g,42.80mmol)和醋酐(4.37g,42.80mmol), N_2 下100℃反应5h, 冷却后, 减压除去乙酸, 加入乙酸乙酯, 有机相再用水和饱和NaCl水溶液洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 滤液减压浓缩后, 残余物经硅胶柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯=5:1, 得标题化合物4.0g, 收率62%。MS(ESI+): $[(\text{M}+\text{H})^+]$ 183.1.

[0075] 2、式(6)结构的化合物的制备(1-(2,4,6-tris(methoxymethoxy)-3-methylphenyl)ethan-1-one)



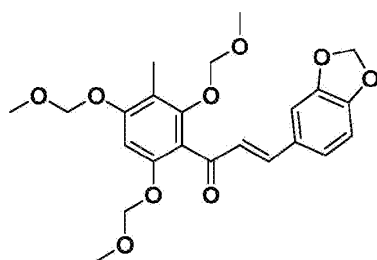
[0076] 将式(5)结构的化合物(4.0g,22.0mmol)溶于60mL THF中, 在冰浴下缓慢加入NaH(3.70g,154.0mmol), 然后滴加溴代甲氧基甲基醚(16.50g,132.0mmol), 反应液冰浴下继续搅拌反应3h, 缓慢加入水和乙酸乙酯淬灭反应, 再加乙酸乙酯萃取

(3x 20mL), 有机相用水和饱和NaCl水溶液洗涤, 减压浓缩后, 残余物经硅胶柱层析纯化, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯=5:1, 得标题化合物1.13g, 收率16%。

[0077] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 6.72(s, 1H), 5.23(s, 2H), 5.18(s, 2H), 4.86(s, 2H), 3.40(s, 3H), 3.39(s, 3H), 3.36(s, 3H), 2.42(s, 3H), 2.04(s, 3H).

[0078] MS(ESI+): [(M+H)+] 315.1.

[0079] 3、式(7)结构的化合物的制备(E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-(2,4,6-tris(methoxymethoxy)-3-methylphenyl)but-2-en-1-one

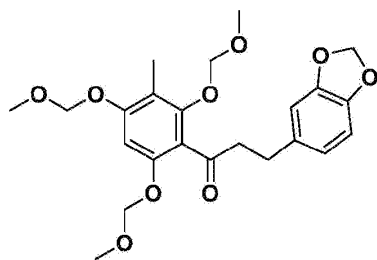


[0080] 将式(6)结构的化合物(1.13g, 3.6mmol)溶于20mL四氢呋喃中, 冰浴下缓慢加入NaH(130mg, 5.4mmol)和胡椒醛(0.54g, 3.6mmol), 反应液在冰浴下继续搅拌反应1h, 缓慢加入水和乙酸乙酯淬灭反应, 再加乙酸乙酯萃取(3x 20mL), 有机相用水和饱和NaCl水溶液洗涤, 减压浓缩后残余物经硅胶柱层析纯化, 洗脱剂为PE/EA=5:1, 得标题化合物1.1g, 收率58%。

[0081] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 7.41(s, 1H), 7.22(dJ=16.0Hz, 1H), 7.16(dJ=8.1Hz, 1H), 6.94(ddJ=11.9, 9.6Hz, 2H), 6.76(s, 1H), 6.08(s, 2H), 5.26(s, 2H), 5.13(s, 2H), 4.85(s, 2H), 3.48(s, 1H), 3.43(s, 3H), 3.39(dJ=5.3Hz, 1H), 3.33(s, 3H), 3.27(s, 3H), 2.08(s, 3H).

[0082] MS(ESI+): [(M-13)+] 447.3.

[0083] 4、式(8)结构的化合物的制备(4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-(2,4,6-tris(methoxymethoxy)-3-methylphenyl)butan-1-one)

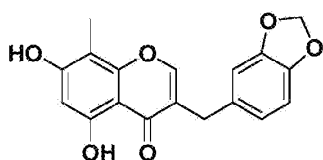


[0084] 将式(7)结构的化合物(400mg,0.87mmol)溶于10mL四氢呋喃,加入Pd/C(462mg,4.34mmol),室温下通入氢气8h,UPLC-MS监测反应进程,待原料消失后,过滤除去固体,液体减压浓缩,残余物经硅胶柱层析纯化,洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯=10:1,得标题化合物得到200mg,收率50%。

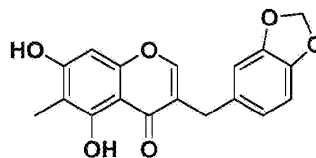
[0085] ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 6.83 - 6.79(m,2H),6.71-6.68(m,2H),5.95(s,2H),5.23(s,2H),5.13(s,2H),4.80(s,2H),3.40-3.39(m,5H),3.36(s,3H),3.32(s,3H),3.02(t,J=7.4Hz,2H),2.82(t,J=7.4Hz,2H),2.03(s,3H).MS(ESI+):[(M-13) $^+$]449.2.

[0086] 5、式II和式III的制备

[0087] (3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-5,7-dihydroxy-8-methyl-4H-chromen-4-one(II) and 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-5,7-dihydroxy-6-methyl-4H-chromen-4-one(III))



II



III

[0088] 将式(8)结构的化合物(200mg,0.43mmol)溶于10mL乙酸乙酯,氮气氛下,在冰浴下缓慢滴加N,N-二甲基甲酰胺(70mg,0.95mmol)和三氯氧磷(663mg,4.32mmol),反应液升至室温继续搅拌反应5h,UPLC-MS监测反应进程,待原料消失后,加水淬灭反应,再加乙酸乙酯萃取(3x 10mL),滤液减压浓缩后,残余物经制备型HPLC纯化,得式II和式III的混合物,进一步经SFC纯化(流动相:CO₂/

MeOH(0.1%DEA)=65/35)分别得到式Ⅱ($t_R=1.073\text{min}$, 20mg,收率14%)和式Ⅲ($t_R=0.903\text{min}$, 9mg, 收率6%)的化合物。

[0089] Ⅱ: ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 12.62(s,1H),10.79(s,1H),8.27(s,1H),6.87(dJ=1.2Hz,1H),6.82–6.80(m,1H),6.77–6.73(m,1H),6.29(s,1H),5.95(s,2H),3.58(s,2H),2.06(s,3H).

[0090] MS(ESI+): $[(M+H)^+]$ 327.0.

[0091] HPLC纯度:99.71%(254nm),99.33%(214nm)。

[0092] Ⅲ: ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 12.96(s,1H),10.86(s,1H),8.19(s,1H),6.87(dJ=1.4Hz,1H),6.82–6.80(m,1H),6.76–6.74(m,1H),6.42(s,1H),5.95(s,2H),3.59(s,2H),1.96(s,3H).

[0093] MS(ESI+): $[(M+H)^+]$ 327.0.

[0094] HPLC纯度:99.48%(254nm),98.77%(214nm)。

[0095] 药理实验

[0096] 实验例1: 利用异丙肾上腺素(ISO)诱导的心肌细胞损伤模型对实施例化合物检测

[0097] 实验方法:

[0098] 对数生长期的大鼠H9C2心肌细胞,将 7×10^4 个/mL细胞接种于96孔板中,每孔100 μL ,分为空白对照组、ISO模型组、ISO+地尔硫卓10 μM 组、ISO+式I 0.1 μM 组、ISO+式I 0.3 μM 组、ISO+式I 1 μM 组、ISO+式I 3 μM 组、ISO+式I 5 μM 组、ISO+式I 10 μM 组、ISO+式II 0.1 μM 组、ISO+式II 0.3 μM 组、ISO+式II 1 μM 组、ISO+式II 3 μM 组、ISO+式II 5 μM 组、ISO+式II 10 μM 组、ISO+式III 1 μM 组、ISO+式III 5 μM 组、ISO+式III 10 μM 组、ISO+甲基麦冬黄酮A 1 μM 组、ISO+甲基麦冬黄酮A 5 μM 组、ISO+甲基麦冬黄酮A 10 μM 组。培养24小时后,给药组分别加入800 μM ISO和相应浓度的药物,ISO模型组加入800 μM ISO和等体积DMSO,空白对照组加入等体积DMSO,继续培养24h。去除上清液后每孔加入100 μL MTT溶液(0.5mg/mL),放入细胞培养箱中培养4h,去除上清液后每孔加入150 μL DMSO,震荡混匀10min,置于酶标仪570nm处测定吸光度,计算细胞存活率。细胞存活率(%)= $[(A_s-A_b)/(A_c-$

Ab)] × 100%。As：实验孔(含有细胞的培养基、MTT、ISO)；Ac：对照孔(含有细胞的培养基、MTT、不含ISO)；Ab：空白孔(不含细胞的培养基、MTT、不含ISO)。

[0099] 实验结果：

[0100] 结果见表1。与空白对照组相比，ISO作用H9C2心肌细胞24h，心肌细胞存活率显著降低(54.71%)，OD值与空白对照组比较有统计学差异。与ISO模型组比较，式I化合物0.1–10 μ M，式II化合物0.1–10 μ M及式III化合物1–10 μ M剂量，对ISO诱导的心肌细胞损伤均表现显著保护活性，能够显著提高细胞存活率，OD值与模型组比较有统计学差异。甲基麦冬黄酮A 1 μ M与5 μ M剂量对ISO损伤心肌细胞亦表现显著保护作用。与同剂量的甲基麦冬黄酮A比较，式I、式II化合物表现更优活性，式III化合物活性与甲基麦冬黄酮A相当。地尔硫卓10 μ M对ISO诱导的心肌细胞损伤亦具有保护活性，式I、式II化合物对ISO损伤心肌细胞的保护活性优于地尔硫卓，式III化合物1 μ M活性优于地尔硫卓10 μ M。

[0101] 表1实施例化合物对异丙肾上腺素(ISO)引起心肌细胞损伤的保护作用

组别	剂量 (μM)	OD值	细胞存活率 (%)
空白对照组	-	1.209±0.033	100.00
ISO模型组	-	0.661±0.055 ^{***}	54.71
地尔硫卓	10	0.773±0.029 [#]	63.94
式I	0.1	0.983±0.144 ^{###}	81.29
	0.3	0.929±0.105 ^{##}	76.84
	1	0.969±0.065 ^{###&&}	73.98
	3	0.926±0.045 ^{###}	76.59
	5	0.807±0.088 ^{##}	66.71
	10	0.839±0.091 ^{###&}	69.43
式II	0.1	0.964±0.132 ^{##}	79.76
	0.3	0.964±0.031 ^{###}	79.77
	1	0.904±0.072 ^{###&&}	74.78
	3	0.963±0.064 ^{###}	79.64
	5	0.784±0.067 ^{##}	64.88
	10	0.806±0.067 ^{###}	66.65
式III	1	0.815±0.041 ^{###}	67.39
	5	0.792±0.061 ^{##}	65.51
	10	0.750±0.065 [#]	62.06
甲基麦冬黄酮A	1	0.781±0.029 ^{##}	64.63
	5	0.801±0.045 ^{##}	66.28
	10	0.724±0.024 ^(p=0.09)	59.89

[0102] ***P<0.001与空白对照组比较；#P<0.05,##P<0.01,###P<0.001与模型组比较；&P<0.05,&&P<0.01与同剂量甲基麦冬黄酮A组比较。

[0103] 注：药物所用剂量对H9C2心肌细胞无毒性，数据未展示，下同。

[0104] 实验例2：利用缺氧复氧(H/R)诱导的心肌细胞损伤模型对实施例化合物检测

[0105] 实验方法：

[0106] 取对数生长期H9C2心肌细胞，7×10⁴个/mL接种于96孔板中，每孔100 μL，分为空白对照组、H/R模型组、H/R+地尔硫卓10 μM组、H/R+式I 0.1 μM组、H/R+式I 0.3 μM组、H/R+式I 1 μM组、H/R+式I 3 μM组、H/R+式I

5 μ M组、H/R+式I 10 μ M组、H/R+式II 0.1 μ M组、H/R+式II 0.3 μ M组、H/R+式II 1 μ M组、H/R+式II 3 μ M组、H/R+式II 5 μ M组、H/R+式II 10 μ M组、H/R+式III 0.1 μ M组、H/R+式III 0.3 μ M组、H/R+式III 1 μ M组、H/R+式III 3 μ M组、H/R+式III 5 μ M组、H/R+式III 10 μ M组、H/R+甲基麦冬黄酮A 1 μ M组、H/R+甲基麦冬黄酮A 5 μ M组、H/R+甲基麦冬黄酮A 10 μ M组。培养24h后，将H/R组、给药组的H9C2心肌细胞培养液更换为不含血清的无糖DMEM培养基，每孔100 μ L，放入缺氧孵化器后，37℃细胞培养箱进行缺氧培养。6h后，将H/R组、给药组的上清液弃掉，加入含10%胎牛血清的高糖培养基，每孔100 μ L，各给药组分别加入相应浓度的药物，H/R模型组和空白对照组加入等体积DMSO，在37℃，95% O₂，5% CO₂细胞培养箱中复氧培养12h。去除上清液后每孔加入100 μ L CCK溶液(CCK体积占DMEM培养液体积的10%)，放入细胞培养箱中培养1h，置于酶标仪450nm处测定吸光度，计算细胞存活率。细胞存活率=(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔) × 100%。

[0107] 实验结果：

[0108] 结果见表2。与空白对照组相比，糖氧剥夺后复氧，导致心肌细胞显著损伤，细胞存活率仅为50.80%。式I化合物(0.1、0.3、1、3、10 μ M)、式II化合物(0.1、0.3、3 μ M)及式III化合物(3 μ M)对缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤表现显著保护活性，显著提高缺氧复氧损伤心肌细胞的存活率，OD值与模型组比较有统计学差异。甲基麦冬黄酮A 10 μ M浓度对缺氧复氧诱导的心肌损伤亦表现显著保护活性，甲基麦冬黄酮A 1 μ M与5 μ M对缺氧复氧诱导的心肌损伤未表现显著保护活性。地尔硫卓10 μ M对缺氧复氧诱导的心肌损伤未表现显著保护作用。在该模型，式I、式II化合物活性优于甲基麦冬黄酮A，且低剂量起效。式I、式II和式III化合物活性优于地尔硫卓。式I、式II和式III化合物表现抗缺血再灌注诱导的心肌细胞损伤活性，式I和式II化合物活性优于式III化合物。

[0109] 表2实施例化合物对缺氧复氧(H/R)引起心肌细胞损伤的保护作用

组别	剂量 (μM)	OD值	细胞存活率 (%)
空白对照组	-	1.040±0.044	100.00
H/R模型组	-	0.528±0.032 ^{***}	50.80
地尔硫卓	10	0.522±0.061	50.17
式I	0.1	0.630±0.082 ^{###}	60.56
	0.3	0.628±0.061 ^{###}	60.34
	1	0.576±0.063 ^{##}	55.39
	3	0.620±0.069 ^{###}	59.62
	5	0.566±0.074 ^(p=0.07)	54.42
	10	0.575±0.091 [#]	55.26
式II	0.1	0.630±0.070 ^{###}	60.54
	0.3	0.612±0.059 ^{###}	58.84
	1	0.542±0.075	52.14
	3	0.640±0.070 ^{###}	61.54
	5	0.466±0.023	44.78
	10	0.498±0.071	47.86
式III	0.1	0.552±0.067	53.11
	0.3	0.500±0.062	48.09
	1	0.555±0.053	53.35
	3	0.580±0.069 [#]	55.80
	5	0.543±0.037	52.20
	10	0.527±0.047	50.65
甲基麦冬黄酮A	1	0.540±0.034	51.93
	5	0.501±0.042	48.17
	10	0.581±0.054 [#]	55.82

- [0110] ***P<0.001与空白对照组比较；[#]P<0.05,^{##}P<0.01,^{###}P<0.001与模型组比较。
- [0111] 实验例3：利用血管紧张素 II (Ang II)诱导的心肌细胞损伤模型对实施例化合物检测
- [0112] 实验方法：
- [0113] 对数生长期的大鼠H9C2心肌细胞，将7×10⁴个/mL个细胞接种于96孔板中，每孔100 μL，分为空白对照组、Ang II 模型组、Ang II +地尔硫卓10 μM组、Ang II

+式I 0.1 μ M组、Ang II +式I 0.3 μ M组、Ang II +式I 1 μ M组、Ang II +式I 3 μ M组、Ang II +式I 10 μ M组、Ang II +式II 0.1 μ M组、Ang II +式II 0.3 μ M组、Ang II +式II 1 μ M组、Ang II +式II 3 μ M组、Ang II +式II 10 μ M组、Ang II +甲基麦冬黄酮A 10 μ M组。培养24小时后，给药组分别加入50 μ M Ang II 和相应浓度的药物，Ang II 模型组加入50 μ M Ang II 和等体积DMSO，空白对照组加入等体积DMSO，继续培养24h。去除上清液后每孔加入100 μ L MTT 溶液(0.5mg/mL)，放入细胞培养箱中培养4h，去除上清液后每孔加入150 μ L DMSO，震荡混匀10min，置于酶标仪570nm处测定吸光度，计算细胞存活率。细胞存活率(%)=[(As-Ab)/(Ac-Ab)]×100%。As：实验孔(含有细胞的培养基、MTT、Ang II)；Ac：对照孔(含有细胞的培养基、MTT、不含Ang II)；Ab：空白孔(不含细胞的培养基、MTT、不含Ang II)。

- [0114] 实验结果：
- [0115] 结果见表3。与空白对照组相比，50 μ M Ang II 引起心肌细胞显著损伤，细胞存活率仅70.81%，OD值与空白对照组比较有显著性差异。与模型组比较，式I化合物(3、10 μ M)和式II化合物(0.1、1、10 μ M)对Ang II 引起的心肌细胞损伤均表现显著保护活性，显著提高细胞存活率，OD值与模型组比较有统计学差异。式I和式II化合物其他剂量组亦有改善Ang II 引起心肌细胞损伤的趋势。10 μ M甲基麦冬黄酮A和10 μ M地尔硫卓对Ang II 引起的心肌细胞损伤亦表现显著保护活性。在Ang II 引起的心肌细胞损伤模型上，式I、式II化合物活性与甲基麦冬黄酮A和地尔硫卓相当，式II化合物0.1 μ M剂量活性略优于甲基麦冬黄酮A 10 μ M。
- [0116] 表3实施例化合物对血管紧张素 II (Ang II)引起心肌细胞损伤的保护作用

组别	剂量 (μM)	OD值	细胞存活率 (%)
空白对照组	-	1.076±0.063	100.00
Ang II 模型组	-	0.762±0.022***	70.81
地尔硫卓	10	0.857±0.042###	79.67

式I	0.1	0.809±0.060	75.14
	0.3	0.780±0.046	72.48
	1	0.791±0.043	73.51
	3	0.816±0.035 ^{##}	75.86
	10	0.823±0.048 ^{##}	76.43
式II	0.1	0.876±0.044 ^{###}	81.36
	0.3	0.791±0.062	73.49
	1	0.835±0.052 ^{##}	77.58
	3	0.785±0.048	72.98
	10	0.814±0.053 [#]	75.59
甲基麦冬黄酮A	10	0.833±0.041 ^{##}	77.40

[0117] ***P<0.001与空白对照组比较；[#]P<0.05，^{##}P<0.01，^{###}P<0.001与模型组比较。

[0118] 实验例4：利用血管紧张素 II (Ang II) 诱导的心肌细胞肥大模型对实施例化合物检测

[0119] 实验方法：

[0120] 将对数生长期的H9C2心肌细胞调整为 1.2×10^5 /孔的密度接种于六孔板，分为空白对照组、Ang II 模型组、Ang II +地尔硫卓10 μM组、Ang II +式I 0.1 μM组、Ang II +式I 0.5 μM组、Ang II +式I 1 μM组、Ang II +式II 0.1 μM组、Ang II +式II 0.5 μM组、Ang II +式II 1 μM组。培养24小时后，各给药组加入40 μM Ang II 和相应浓度的药物，Ang II +地尔硫卓10 μM组加入40 μM Ang II 和10 μM 地尔硫卓，Ang II 模型组加入40 μM Ang II 和等体积的DMSO，空白对照组加入等体积DMSO，继续培养24h。弃掉培养液，用PBS洗3次，每孔加入1mL甲醇于-20℃固定20分钟后放置至常温，弃去甲醇后每孔添加1mL 0.5%结晶紫染液染色10min，清水洗净后于倒置显微镜下拍照，随机选取视野拍照。采用Image J软件测量视野内所有心肌细胞的表面积和，同时计数视野内细胞数，获得每一个心肌细胞表面积。

[0121] 单个心肌细胞表面积=视野内所有心肌细胞表面积和/视野内心肌细胞数。

[0122] 实验结果：

[0123] 结果见图1与表4。Ang II 40 μ M作用H9C2细胞24h，与空白对照组相比，模型组心肌细胞数量显著减少，心肌细胞体积显著增大，式I化合物0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M，式II化合物0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M，均能显著改善Ang II引起的细胞数量下降情况，细胞数明显增多。单个心肌细胞表面积的结果见表4，模型组单个心肌细胞表面积与空白对照组比较显著增加，有统计学差异。式I化合物0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M和式II化合物0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M均能显著抑制Ang II引起的心肌细胞肥大现象，单个心肌细胞表面积与模型组相比显著降低。地尔硫卓10 μ M亦显著降低Ang II引起的心肌细胞肥大。式I和式II化合物在0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M剂量对心肌细胞肥大的抑制活性优于阳性药地尔硫卓10 μ M。

[0124] 表4实施例化合物对心肌细胞肥大的作用-单个心肌细胞表面积(μ M²)

分组	浓度(μM)	视野1	视野2	视野3	视野4	视野5	心肌表面积(μm ²)
空白对照组		157.86	220.78	216.49	178.22	161.18	186.91±26.85
模型组		623.16	654.51	644.21	646.13	774.26	668.45±53.90***
地尔硫卓	10	406.26	402.67	411.02	359.20	380.97	392.02±19.37 ^{###}
式I	0.1	362.68	351.69	344.78	338.55	410.64	361.67±25.76 ^{###}
	0.5	404.40	360.65	322.34	283.2	334.96	341.11±40.33 ^{###}
	1	312.97	300.38	328.43	331.13	303.72	315.33±12.53 ^{###}
式II	0.1	346.49	347.86	326.61	381.47	353.63	351.21±17.66 ^{###}
	0.5	420.10	338.84	355	334.83	342.18	358.19±31.68 ^{###}
	1	365.93	372.44	366.76	392.9	373.9	374.39±9.76 ^{###}

[0125] ***P<0.01与空白对照组比较；###P<0.01与模型组比较。

[0126] 实验例5：利用异丙肾上腺素(ISO)诱导的缺血性心脏病小鼠模型对实施例化合物检测

[0127] 实验方法：

[0128] 雄性C57BL/6小鼠适应环境后随机分为9组，分别为空白对照组、ISO模型组、ISO+地尔硫卓20mg/kg阳性对照药组、ISO+式I(0.1、0.5、2mg/kg)组、ISO+式II(0.1、0.5、2mg/kg)组。给药组小鼠均每天同一时间灌胃给药相应剂量的式I、式II化合物1次，阳性药地尔硫卓组每天灌胃给药相应剂量的地尔硫卓1次，空白对照组及模型组小鼠给予相同量的溶剂(0.5% CMC-Na)，给药量均为10mL/

kg, 连续给药11天。给药第4~10天进行ISO造模, 空白对照组皮下注射生理盐水, 其余各组小鼠皮下注射ISO 40mg/kg(均在给药后2h造模), 共7次。

- [0129] 心肌肥厚/心力衰竭生物标记物检测: 在给药结束后, 动物摘眼球取血, 血液室温静置2h, 3500rpm离心20min分离血清, 按ELISA试剂盒说明书测定血清ANP、NT-proBNP含量。
- [0130] 心肌酶CK-MB检测: 在给药结束后, 动物摘眼球取血, 血液室温静置2h, 3500rpm离心20min分离血清, 按ELISA试剂盒说明书测定血清CK-MB含量。
- [0131] 心肌组织钙离子检测: 实验结束后, 取部分心肌组织用超纯水制备10%心肌组织匀浆, 4℃, 1200rpm离心20min, 分离心肌组织匀浆上清。按试剂盒说明书测定钙离子含量; 用BCA蛋白检测法进行蛋白定量。
- [0132] 心肌组织病理检测: 实验结束后, 心脏经冰生理盐水清洗并用吸水纸拭干, 横向切成两半, 靠近心尖的三分之一部分固定于4%多聚甲醛溶液中, 经梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 然后放入溶解的石蜡中浸透3次进行包埋, 每次30min, 包埋好后进行连续切片(厚度约为4 μm)。常规苏木紫-伊红(H.E.)染色。在光学显微镜下观察心肌组织病理状态并照相、分析。
- [0133] 实验结果:
- [0134] 心肌肥厚/心力衰竭血清生物标记物结果:
- [0135] 血清N末端B型利钠肽前体(NT-proBNP)是心力衰竭早期诊断的生物标记物, 其水平降低也是药物治疗有效的有力证据。心钠肽(ANP)是另一个心力衰竭的血清敏感生物标记物, 目前研究亦显示, NT-proBNP和ANP水平与心肌肥厚程度呈正相关, 可作为心肌肥厚的生物标记物。ELISA试剂盒检测血清NT-proBNP和ANP水平, 结果见表5。模型组动物血清NT-proBNP及ANP水平较空白对照组均显著升高, 提示小鼠心脏损伤严重, 有心衰可能, 且存在心肌肥厚病征。式II 0.1mg/kg、0.5mg/kg、2mg/kg均显著降低血清NT-proBNP和ANP水平, 式I 0.1mg/kg、0.5mg/kg、2mg/kg亦能显著降低血清ANP水平, 与模型组比较均有统计学差异。式I、式II的三个剂量组对ANP的降低作用优于阳性对照药地尔硫卓20mg/kg, 式II的三个剂量组对NT-proBNP的降低作用亦优于阳性对照药地尔硫卓20mg/kg。

[0136] 表5式I、式II对异丙肾上腺素(ISO)诱导的缺血性心脏病小鼠血清心肌肥厚/心力衰竭生物标记物NT-proBNP、ANP含量的影响(n=8-9)

组别	剂量 (mg/kg)	ANP(pg/mL)	NT-proBNP(pg/mL)
空白对照组	-	210.73±10.22	34.93±7.41
模型组	-	421.27±123.93 ^{***}	46.19±10.44 [*]
地尔硫卓	20	361.59±46.95	43.12±2.93
式I	0.1	301.02±58.98 [#]	39.35±2.83
	0.5	295.85±57.72 [#]	43.52±6.06
	2	289.01±50.17 ^{##}	40.47±7.15
式II	0.1	303.60±37.76 [#]	34.07±4.10 ^{##}
	0.5	264.38±27.96 ^{##}	31.31±2.24 ^{###}
	2	258.19±52.28 ^{##}	31.12±2.33 ^{###}

[0137] *P<0.05, ***P<0.001与空白对照组比较; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001与模型组比较。

[0138] 心肌损伤血清生物标记物心肌酶CK-MB结果:

[0139] 血清肌酸激酶-同工酶(CK-MB)是判断心肌坏死的另一个临床特异性和敏感性指标。结果见表6。ISO模型组小鼠血清心肌酶CK-MB水平较空白对照组显著升高,进一步提示心脏损伤存在。式I 0.5mg/kg, 式II 0.5mg/kg、2mg/kg均能显著降低血清CK-MB水平,与模型组比较有统计学差异。式I 0.1mg/kg、2mg/kg, 式II 0.1mg/kg亦有降低血清CK-MB水平的趋势。式I、式II对CK-MB的降低作用优于阳性对照药地尔硫卓20mg/kg。

[0140] 表6式I、式II对异丙肾上腺素(ISO)诱导的缺血性心脏病小鼠血清心肌酶CK-MB含量的影响(n=8-9)

组别	剂量 (mg/kg)	CK-MB (ng/mL)
空白对照组	-	12.73±0.85
模型组	-	18.75±5.50 [*]
地尔硫卓	20	17.98±2.88
式 I	0.1	14.86±2.90
	0.5	13.71±2.75 [#]
	2	15.05±2.49
式 II	0.1	15.48±1.76
	0.5	12.89±2.29 ^{##}
	2	12.91±1.53 ^{##}

- [0141] ^{*}P<0.05与空白对照组比较；[#]P<0.05，^{##}P<0.01与模型组比较。
- [0142] 心肌组织钙离子浓度结果：
- [0143] 心肌细胞钙离子(Ca²⁺)在心肌细胞兴奋-收缩偶联中发挥重要作用，钙超载是ISO诱导的心肌肥厚损伤中重要机制之一。结果见表7。ISO模型组小鼠心肌组织Ca²⁺含量较空白对照组显著升高，心肌组织钙超载明显。式I、式II三个剂量组均能显著降低心肌组织Ca²⁺含量，阳性对照药地尔硫卓20mg/kg亦能显著降低心肌组织Ca²⁺含量，式I、式II低、中剂量组对心肌组织钙超载现象的改善作用优于阳性对照药地尔硫卓20mg/kg。
- [0144] 表7式I、式II对异丙肾上腺素(ISO)诱导的心肌缺血小鼠心肌组织Ca²⁺含量的影响(n=8-9)

组别	剂量 (mg/kg)	Ca ²⁺ (mmol/gprot)
空白对照组	-	0.041±0.017
模型组	-	0.076±0.011 ^{***}
地尔硫卓组	20	0.057±0.011 ^{##}
式 I	0.1	0.050±0.008 ^{###}
	0.5	0.046±0.010 ^{###}
	2	0.058±0.009 ^{##}
式 II	0.1	0.046±0.015 ^{###}
	0.5	0.054±0.014 ^{##}
	2	0.059±0.009 ^{##}

- [0145] ***P<0.001，与空白对照组比较；##P<0.01，###P<0.001与模型组比较。
- [0146] 心肌组织病理检查结果：
- [0147] 心肌组织H&E染色结果如图2所示，空白对照组小鼠的心肌组织纤维排列整齐，结构清晰可见规则纹路，胞核清晰，细胞质丰富均匀，炎症细胞浸润情况少见。ISO模型组小鼠的心肌组织室间隔、乳头肌心肌细胞肥大显著，心肌细胞水肿、变性；局部室间隔和乳头肌心肌组织损伤(心肌细胞坏死)严重，损伤(坏死)病变呈片状分布，且彼此相连，局部可见室间隔、乳头肌透壁性心肌组织损伤；病变部位炎症显著，损伤部位可见纤维组织明显增生。式I、式II三个剂量灌胃给药均可显著改善ISO引起的小鼠心肌组织病理损伤，心肌细胞水肿、肥大减轻，心肌细胞坏死程度减轻，纤维组织增生程度降低。对心脏组织进行病理评分结果见表8，式I、式II三个剂量显著降低发生心肌组织严重病变的动物数量及降低均病变程度评分。阳性对照药地尔硫卓20mg/kg亦能显著降低心肌组织的病变程度，式I 2mg/kg、式II 2mg/kg对心肌组织病变程度的改善作用优于阳性对照药地尔硫卓20mg/kg。
- [0148] 表8式I、式II对异丙肾上腺素(ISO)诱导的心肌缺血小鼠心肌组织病变程度的影响(H&E 200×)

组别	剂 量 (mg/kg)	各病变程度的动物数						平均评分
		病变程度分级						
		-	+	++	+++	++++	+++++	
空白对照组	-	10	0	0	0	0	0	0.00±0.00
模型组	-	0	0	0	0	4	6	4.60±0.52***
地尔硫卓	20	2	3	1	4	0	0	1.70±1.25###
式 I	0.1	0	0	2	5	2	0	3.00±0.71##
	0.5	0	2	4	4	0	0	2.20±0.79##
	2	1	6	3	0	0	0	1.20±0.63###
式 II	0.1	0	2	4	4	0	0	2.20±0.79##
	0.5	0	3	4	3	0	0	2.00±0.82###
	2	4	6	1	0	0	0	0.73±0.65###

- [0149] ***P<0.001，与空白对照组比较；###P<0.001与模型组比较。
- [0150] 附病理评分标准：
- [0151] -：未见异常。
- [0152] +：未见心肌组织损伤，局部室间隔、乳头肌心肌细胞肥大，局部心肌细胞水肿、变性，病变部位局部肌间隙增宽、间质轻度非特异性炎症。
- [0153] ++：未见明显心肌组织损伤(心肌细胞坏死)，局部室间隔、乳头肌心肌细胞肥大，局部心肌细胞水肿、变性；局部部位可见细胞肌原纤维溶解(横纹消失)，病变先对局限，呈小灶状分布；间质可见非特异性炎症，局部间质纤维组织增生。
- [0154] +++：室间隔、乳头肌心肌细胞肥大明显，局部心肌细胞水肿、变性；局部室间隔或乳头肌心肌组织损伤(心肌细胞坏死，样本仅见一处部位)，病变局限于局部室间隔心内膜下(或乳头肌)，病变局限、受累范围较小；病变部位间质可见非特异性炎症，局部间质纤维组织增生。
- [0155] ++++：室间隔、乳头肌心肌细胞肥大显著，局部心肌细胞水肿、变性；局部室间隔和乳头肌心肌组织明显损伤(心肌细胞坏死)，病变成灶状(或小片状)分布，累及范围较大；病变部位炎症明显，局部纤维组织明显增生。
- [0156] +++++：室间隔、乳头肌心肌细胞肥大显著，局部心肌细胞水肿、变性；局部室间隔和乳头肌心肌组织损伤(心肌细胞坏死)严重，损伤(坏死)病变呈片状分

布,且彼此相连,局部可见室间隔、乳头肌透壁性心肌组织损伤;病变部位炎症显著,损伤部位可见纤维组织明显增生。

[0157] 实验例6:利用血管紧张素II(AngII)诱导的高血压性心脏病小鼠模型对实施例化合物检测

[0158] 实验方法:

[0159] 雄性C57BL/6小鼠适应环境后随机分为10组,分别为空白对照组、Ang II模型组、Ang II+替米沙坦10mg/kg阳性对照组、Ang II+螺内酯20mg/kg阳性对照组、Ang II+式I(0.1、0.5、2mg/kg)组及Ang II+式II(0.1、0.5、2mg/kg)组。给药组小鼠均每天同一时间灌胃给药相应剂量的式I、式II化合物1次,阳性对照组每天灌胃给予相应剂量的替米沙坦、螺内酯1次,空白对照组及模型组小鼠给予相同量的溶剂(0.5%CMC-Na液),给药量均为10mL/kg,连续给药14天。给药第1~13天进行Ang II造模,空白对照组皮下注射生理盐水,其余各组小鼠皮下注射Ang II 1.44mg/kg(均在给药后2h造模),共13次。

[0160] 血压监测:分别于给药第0、7、13天测量小鼠的血压,每组小鼠随机选取3只,将小鼠放置入固定器暴露鼠尾,固定器放在加热垫上以维持小鼠正常体温,将鼠尾的根部穿过加压尾套并固定,启动充气加压,应用测量仪测定SBP。每只动物血压指标均连续测量5次,取平均值。

[0161] 超声心动图检测:给药第14天(Ang II造模13次),每组动物随机选取5只,麻醉后固定,剃除胸毛,于胸部涂少量耦合剂。采用Vevo 770 Imaging System小动物超声实时影像系统行超声心动图检查,所有动物心动图指标均连续测量3个心动周期,取平均值。

[0162] 心肌肥厚/心力衰竭生物标记物检测:实验结束后,动物摘眼球取血,血液室温静置2h,3500rpm离心20min分离血清,按ELISA试剂盒说明书测定血清BNP含量。

[0163] 心肌损伤血清生物标志物检测:实验结束后,动物摘眼球取血,血液室温静置2h,3500rpm离心20min分离血清,按ELISA试剂盒说明书测定血清肌钙蛋白cTn-T及心肌酶CK-MB含量。

- [0164] 血清炎症因子检测：实验结束后，动物摘眼球取血，血液室温静置2h，3500rpm离心20min分离血清，按ELISA试剂盒说明书测定血清TNF- α 含量。
- [0165] 血清醛固酮(ALD)水平检测：实验结束后，动物摘眼球取血，血液室温静置2h，3500rpm离心20min分离血清，按ELISA试剂盒说明书测定血清ALD含量。
- [0166] 血清cAMP水平检测：实验结束后，动物摘眼球取血，血液室温静置2h，3500rpm离心20min分离血清，按ELISA试剂盒说明书测定血清cAMP含量。
- [0167] 实验结果：
- [0168] 血压监测结果：
- [0169] 结果见表9。给药前各组小鼠的基础收缩压(SBP值)无明显差异；血管紧张素II (AngII)持续刺激7天、14天，模型组小鼠SBP显著升高，与空白对照组比较有统计学差异。式I、式II三个剂量组均显著降低SBP值，与模型组相比均有统计学差异。螺内酯、替米沙坦阳性对照药亦能显著降低SBP值，式I、式II各剂量组降低SBP的活性与螺内酯20mg/kg相当；替米沙坦10mg/kg组给药后小鼠SBP值低于空白对照组动物，其中第7天SBP值较空白对照组显著降低，表现低血压状态，与临床已有报道一致，服用替米沙坦等ARB类药物可能会诱发一过性低血压的副作用，式I、式II未出现此类不良作用。
- [0170] 表9式I、式II给药对血管紧张素II (Ang II)诱导的高血压性心脏病小鼠SBP的影响(n=3)

组别	剂量 (mg/kg)	0d	7d	14d
空白对照组	-	104.13±9.96	106.13±4.74	103.53±6.99
模型组	-	107.47±3.93	134.87±4.39 ^{**}	144.80±5.05 ^{**}
螺内酯组	20	106.13±0.81	109.73±6.81 ^{##}	109.70±4.20 ^{###}
替米沙坦组	10	104.13±3.56	91.20±6.35 ^{###&}	100.47±7.68 ^{##}
式I	0.1	102.13±4.30	121.33±3.19 [#]	107.60±9.81 ^{##}
	0.5	109.70±5.67	109.80±4.50 ^{##}	105.13±7.10 ^{##}
	2	104.93±9.21	107.73±6.53 ^{##}	109.20±5.19 ^{##}
式II	0.1	100.30±7.37	105.73±6.00 ^{##}	110.13±3.51 ^{###}
	0.5	102.43±8.41	106.07±1.22 ^{###}	113.93±3.51 ^{###}
	2	101.27±12.13	110.93±5.78 ^{##}	108.27±7.29 ^{##}

[0171] **P<0.01，与空白对照组比较；#P<0.05，##P<0.01，###P<0.001与模型组比较；

[0172] *P<0.05，与空白对照组比较。

[0173] 超声心动图检查结果：

[0174] 小动物超声心动图技术是一种操作简便、重复性好的评估小鼠心功能的技术。利用该技术获得M型超声心动图，见图3，对数据进行测量和计算，部分数据见表10。Ang II连续给药导致显著的左心室功能异常，引起左心室收缩期和舒张期室壁厚度显著增加，表现明显的心肌肥厚病征。式I、式II三个剂量组均能够显著降低左心室收缩期和舒张期后壁厚度，与模型组比较有统计学差异，显著改善心肌肥厚。螺内酯、替米沙坦阳性对照药亦能显著降低左心室收缩期和舒张期后壁厚度。式I、式II三个剂量组对心肌肥厚的改善活性优于螺内酯20mg/kg。

[0175] 表10式I、式II给药对血管紧张素 II (Ang II)诱导的高血压性心脏病小鼠超声心动图数据的影响(n=5)

细则 91,
07.09.2023

组别	剂量 (mg/kg)	收缩期后壁厚度 (mm)	舒张期后壁厚度 (mm)
空白对照组	-	0.93±0.08	0.72±0.03
模型组	-	1.35±0.12***	1.07±0.19**
螺内酯组	20	1.01±0.08###	0.81±0.07#
替米沙坦组	10	0.79±0.16####	0.65±0.07##
式I	0.1	0.90±0.06###	0.79±0.09#
	0.5	0.87±0.11####	0.64±0.02###
	2	0.90±0.16##	0.67±0.08##
式II	0.1	0.91±0.10###	0.72±0.08##
	0.5	0.87±0.04###	0.69±0.06##
	2	0.82±0.11###	0.72±0.06##

[0176] **P<0.01，***P<0.001与空白对照组比较；#P<0.05，##P<0.01，###P<0.001与模型组比较。

[0177] 心肌肥厚/心力衰竭生物标记物结果：

[0178] 血清脑钠肽(BNP)是另一个重要的心力衰竭早期诊断的生物标记物，同时其与心肌肥厚程度呈正相关，是心肌肥厚的生物标记物之一。结果见表11，AngII模型组小鼠血清BNP水平较空白对照组显著升高。式I、式II三个剂量均显著降低

血清BNP水平，与模型组比较均有统计学差异。螺内酯、替米沙坦阳性对照药亦能显著降低血清BNP水平。式I、式II的三个剂量组对BNP的降低作用优于阳性对照药螺内酯20mg/kg。

[0179] 表11式I、式II给药对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的高血压性心脏病小鼠血清心肌肥厚/心力衰竭生物标记物BNP含量的影响(n=7-9)

组别	剂量 (mg/kg)	BNP (pg/mL)
空白对照组	-	87.43±8.13
模型组	-	146.74±10.80 ^{***}
螺内酯组	20	129.92±15.60 [#]
替米沙坦组	10	96.84±7.34 ^{###}
式I	0.1	112.93±17.57 ^{###}
	0.5	117.59±13.78 ^{###}
	2	102.97±5.56 ^{###}
式II	0.1	103.21±16.09 ^{###}
	0.5	101.08±9.09 ^{###}
	2	91.67±15.39 ^{###}

- [0180] ^{***}P<0.001与空白对照组比较；[#]P<0.05，^{###}P<0.001与模型组比较。
- [0181] 心肌损伤血清生物标记物结果：
- [0182] 心肌细胞坏死时，心肌内含有的一些蛋白质类物质会从心肌组织内释放出来，并出现在外周循环血中，可作为心肌损伤的判断性指标。肌钙蛋白(Tn)是心肌组织收缩的调节蛋白，心肌肌钙蛋白(cTn)与骨骼肌中的Tn在分子结构和免疫学上是不同的，因此是心肌所独有，是判断心肌坏死最特异和敏感的首选标志物。cTn有三个亚型，cTn-T，cTn-I，cTn-C。cTn-T对早期和晚期心肌坏死均具有很高的诊断价值。结果如表12所示，模型组小鼠血清心肌损伤标志性蛋白cTn-T与空白对照组相比显著升高，式I、式II三个剂量给药均能显著降低血清cTn-T水平，与模型组比较有统计学差异。螺内酯、替米沙坦阳性对照药亦能显著降低血清cTn-T水平。式I对cTn-T的降低作用与螺内酯20mg/kg相当，式II对cTn-T的降低作用优于螺内酯20mg/kg。

[0183] 血清肌酸激酶-同工酶(CK-MB)是判断心肌坏死的另一个临床特异性和敏感性指标。结果见表12。AngII模型组小鼠血清心肌酶CK-MB水平较空白对照组显著升高。式I、式II三个剂量给药均能显著降低血清CK-MB水平，替米沙坦阳性对照药亦能显著降低血清CK-MB水平，式I、式II对CK-MB的降低作用优于阳性对照药螺内酯20mg/kg。

[0184] 表12式I、式II给药对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的高血压性心脏病小鼠血清心肌损伤生物标记物cTn-T和CK-MB含量的影响(n=7-9)

组别	剂量 (mg/kg)	cTn-T (ng/L)	CK-MB (ng/mL)
空白对照组	-	122.68±9.84	12.83±1.87
模型组	-	222.14±49.60 ^{***}	20.14±2.08 ^{***}
螺内酯组	20	169.17±21.95 [#]	18.86±1.40
替米沙坦组	10	134.07±17.50 ^{###}	12.72±1.09 ^{###}
式I	0.1	167.25±24.56 [#]	15.73±1.79 ^{###}
	0.5	165.79±23.78 ^{##}	15.17±1.63 ^{###}
	2	164.52±19.68 ^{##}	15.72±1.89 ^{###}
式II	0.1	153.56±13.05 ^{##}	15.36±2.41 ^{###}
	0.5	145.15±15.79 ^{###}	14.07±1.33 ^{###}
	2	136.64±18.24 ^{###}	13.39±2.57 ^{###}

[0185] ***P<0.001与空白对照组比较；#P<0.05，###P<0.001与模型组比较。

[0186] 血清炎症因子结果：

[0187] 炎症的产生是心血管疾病发生的关键因素，炎症因子(如TNF-α)的释放将直接诱发心肌细胞凋亡和心脏收缩能力的损害，甚至导致心力衰竭。结果见表13。模型组小鼠血清炎症因子TNF-α水平较空白对照组显著升高，体内炎症反应明显。式I、式II三个剂量给药均能显著降低血清TNF-α水平，螺内酯、替米沙坦阳性对照药亦能显著降低血清TNF-α水平。式I、式II三个剂量组对TNF-α的降低作用优于阳性对照药螺内酯20mg/kg。

[0188] 表13式I、式II给药对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的高血压性心脏病小鼠血清炎症因子TNF-α含量的影响(n=7-9)

组别	剂量 (mg/kg)	TNF- α (ng/L)
空白对照组	-	571.91 $\pm$ 60.44
模型组	-	850.37 $\pm$ 84.90 ^{***}
螺内酯组	20	758.49 $\pm$ 72.35 [#]
替米沙坦组	10	616.87 $\pm$ 70.42 ^{###}
式I	0.1	706.64 $\pm$ 91.15 ^{##}
式II	0.5	699.02 $\pm$ 55.58 ^{###}
	2	634.24 $\pm$ 98.58 ^{###}
	0.1	645.36 $\pm$ 87.50 ^{###}
	0.5	671.09 $\pm$ 80.55 ^{###}
	2	627.56 $\pm$ 98.89 ^{###}

- [0189] ***P<0.001与空白对照组比较；#P<0.05，##P<0.01，###P<0.001与模型组比较。
- [0190] 肾素血管紧张素醛固酮系统(RAAS)效应因子醛固酮(ALD)含量结果：
- [0191] AngII通过与心脏血管紧张素受体1(AT1R)结合，刺激下游信号通路，促使醛固酮(ALD)产生增多，ALD除了对钠的重吸收和血容量的调节外，更有直接促心脏肥厚的作用。另外，ALD可通过增加心脏AT1R密度进一步加强AngII对心肌细胞作用的敏感性。结果见表14。模型组小鼠血清ALD水平较空白对照组显著升高，式I、式II三个剂量给药均能显著降低血清ALD水平，螺内酯、替米沙坦阳性对照药亦能显著降低血清ALD水平。式I、式II三个剂量组对ALD的降低作用优于阳性对照药螺内酯20mg/kg。
- [0192] 表14式I、式II给药对血管紧张素 II (Ang II)诱导的高血压性心脏病小鼠血清ALD含量的影响(n=7-9)

组别	剂量（mg/kg）	ALD（pg/mL）
空白对照组	-	158.79±9.20
模型组	-	244.19±30.00 ^{***}
螺内酯组	20	209.03±25.11 [#]
替米沙坦组	10	162.74±7.38 ^{###}
式I	0.1	206.80±16.10 ^{##}
	0.5	192.69±14.38 ^{###}
	2	199.41±31.27 [#]
式II	0.1	186.44±21.59 ^{###}
	0.5	177.28±21.57 ^{###}
	2	185.89±12.61 ^{###}

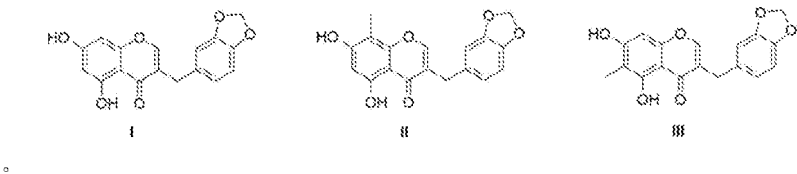
- [0193] ^{***}P<0.001与空白对照组比较；[#]P<0.05，^{##}P<0.01，^{###}P<0.001与模型组比较。
- [0194] 交感神经系统内分泌因子环磷酸腺苷(cAMP)结果：
- [0195] 交感神经系统过度兴奋可导致环磷酸腺苷(cAMP)含量过度增加，诱发心律失常或激活心肌细胞的信号传导通路，造成心肌肥厚、纤维化，甚至影响心脏功能。结果见表15。模型组小鼠血清cAMP水平较空白对照组显著升高，提示交感神经系统兴奋性过度增加。式I 0.1mg/kg、0.5mg/kg，式II 0.1mg/kg、0.5mg/kg、2mg/kg均能显著降低血清cAMP水平，替米沙坦阳性对照药亦能显著降低血清cAMP水平，螺内酯对过度增加的cAMP水平无显著降低作用。式II三个剂量组对过度增加的cAMP的降低作用与阳性对照药替米沙坦10mg/kg相当。
- [0196] 表15式I、式II给药对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导的高血压性心脏病小鼠血清cAMP含量的影响(n=7-9)

组别	剂量 (mg/kg)	cAMP (nmol/L)
空白对照组	-	25.92±2.09
模型组	-	31.21±1.65 ^{***}
螺内酯组	20	29.34±3.04
替米沙坦组	10	25.18±1.10 ^{###}
式I	0.1	27.73±3.03 [#]
	0.5	27.42±1.12 ^{###}
	2	29.04±5.17
式II	0.1	24.81±1.63 ^{###}
	0.5	26.38±1.81 ^{###}
	2	24.42±2.07 ^{###}

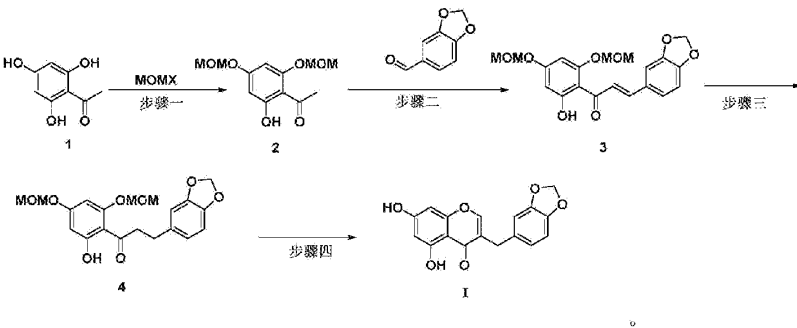
[0197] ***P<0.001与空白对照组比较； #P<0.05， ###P<0.001与模型组比较。

权利要求书

[权利要求 1] 三种甲基麦冬黄酮A类衍生物或其药学上可接受的盐，其特征在于，该三种甲基麦冬黄酮A类衍生物具有式I，式II，式III所述的结构式：



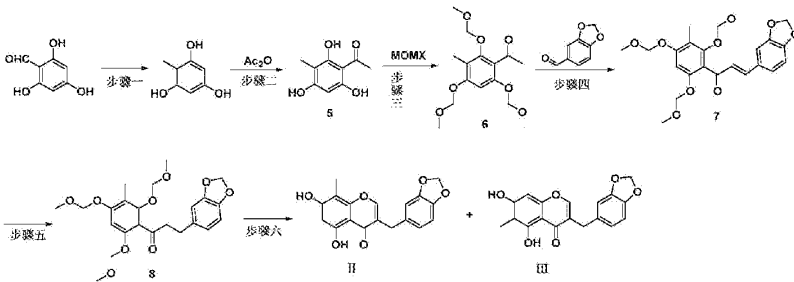
[权利要求 2] 权利要求1所述的甲基麦冬黄酮A类衍生物I的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：
在碱性的条件下，将2,4,6-三羟基苯乙酮(1)与卤代甲氧基甲基醚反应制得式(2)结构的化合物；在碱性的条件下，式(2)结构的化合物与胡椒醛反应制得式(3)结构的化合物；将式(3)结构的化合物的双键还原制得式(4)结构的化合物；式(4)结构的化合物与三氯磷、N,N-二甲基甲酰胺反应制得式I结构的化合物：



[权利要求 3] 如权利要求2所述的甲基麦冬黄酮A类衍生物I的制备方法，其特征在于，在步骤一中，所述碱为三乙胺或N,N-二异丙基乙胺，所述的卤代甲氧基甲基醚为溴代甲氧基甲基醚；在步骤二中，所述碱为氢化钠或醇钠，KOH/EtOH；在步骤三中，所述还原剂为钯碳/氢气或二氯亚锡。

[权利要求 4] 权利要求1所述的甲基麦冬黄酮A类衍生物II和III的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

将2,4,6-三羟基苯甲醛还原为2,4,6-三羟基甲苯，与醋酐反应制得式(5)结构的化合物；在碱性条件下与式(5)与卤代甲氧基甲基醚反应制得式(6)结构的化合物；在碱性的条件下，式(6)结构的化合物与胡椒醛反应制得式(7)结构的化合物；将式(7)结构的化合物的双键还原制得式(8)结构的化合物；式(8)结构的化合物与三氯氧磷、N,N-二甲基甲酰胺反应制得式Ⅱ和式Ⅲ结构的化合物；



- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的甲基麦冬黄酮A类衍生物Ⅱ和Ⅲ的制备方法，其特征在于，在步骤一中，所述还原剂为金属还原剂或金属硼氢化物。在步骤三中，所述碱为三乙胺或N,N-二异丙基乙胺，所述的卤代甲氧基甲基醚为溴代甲氧基甲基醚；在步骤四中，所述碱为氢化钠或醇钠，KOH/EtOH；在步骤五中，所述还原剂为钨碳/氢气或二氯亚锡等。
- [权利要求 6] 一种药物组合物，其特征在于，包含预防和/或治疗有效量的权利要求1所述的甲基麦冬黄酮A类衍生物或其药学上可接受的盐，以及任选的一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。
- [权利要求 7] 权利要求1所述甲基麦冬黄酮A类衍生物或其药学上可接受的盐或者权利要求6所述药物组合物在制备预防和/或治疗与心血管有关疾病的药物中的应用。
- [权利要求 8] 根据权利要求7的应用，其特征在于，所述的与心血管有关疾病选自以下中的一种或多种：心肌缺血、心肌损伤、心肌肥厚、冠心病、高血压、心力衰竭、心肌病、心率失常、心肌梗死、心绞痛。