

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7686873号
(P7686873)

(45)発行日 令和7年6月2日(2025.6.2)

(24)登録日 令和7年5月23日(2025.5.23)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 D 307/83 (2006.01)

C 0 7 D 307/83

C S P

A 6 1 K 31/343 (2006.01)

A 6 1 K 31/343

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/00

請求項の数 12 (全16頁)

(21)出願番号 特願2024-503689(P2024-503689)

(86)(22)出願日 令和4年7月20日(2022.7.20)

(65)公表番号 特表2024-526912(P2024-526912
A)

(43)公表日 令和6年7月19日(2024.7.19)

(86)国際出願番号 PCT/CN2022/106618

(87)国際公開番号 WO2023/001164

(87)国際公開日 令和5年1月26日(2023.1.26)

審査請求日 令和6年1月19日(2024.1.19)

(31)優先権主張番号 202110829381.4

(32)優先日 令和3年7月21日(2021.7.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 520468276

チャンスー チア タイ フェンハイ ファ
ーマシューティカル カンパニー リミテ
ッドJIANGSU CHIA TAI FE
NGHAI PHARMACEUTIC
AL CO., LTD.中華人民共和国 チャンスー ヤンチェン
ダフェン ディストリクト ナンシアン
ウエスト ロード ナンバー 266
No. 266 Nanxiang Wes
t Road, Dafeng Dist
rict, Yancheng, Jia
ngsu, China

(74)代理人 110002952

最終頁に続く

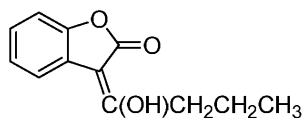
(54)【発明の名称】 虚血性脳損傷関連疾患を治療する化合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I I) :

【化 1】



(II)

10

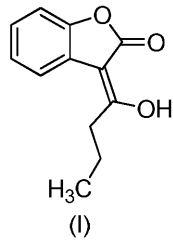
の構造を有する化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 2】

式 (I) :

20

【化 2】



10

の構造を有する化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 3】

以下の単位胞パラメータ：

【表 1】

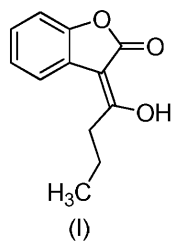
結晶系	単斜
空間群	$P 2_1 / c$
$a / \text{\AA}$	7. 3 1 8 (6)
$b / \text{\AA}$	2 0. 2 7 9 (1 7)
$c / \text{\AA}$	7. 4 5 8 (7)
$\alpha / ^\circ$	9 0
$\beta / ^\circ$	1 1 1. 4 1 7 (1 6)
$\gamma / ^\circ$	9 0
単位胞の体積/ $\text{\AA}^3$	1 0 3 0. 2 (1 6)

20

30

を有することを特徴とする、式 (I)：

【化 3】



40

の構造を有する化合物の単結晶。

【請求項 4】

50

医薬組成物であって、請求項 1 に記載の式 (I I) の構造を有する化合物又はその薬学的に許容される塩、請求項 2 に記載の式 (I) の構造を有する化合物又はその薬学的に許容される塩、或いは請求項 3 に記載の単結晶、及び 1 種又は複数種の薬学的に許容される担体を含む、
ことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の式 (I I) の構造を有する化合物又はその薬学的に許容される塩の、
虚血性脳損傷関連疾患を治療及び / 又は予防するための薬物の製造における使用。

【請求項 6】

請求項 2 に記載の式 (I) の構造を有する化合物又はその薬学的に許容される塩の、
虚血性脳損傷関連疾患を治療及び / 又は予防するための薬物の製造における使用。

10

【請求項 7】

請求項 3 に記載の単結晶の、
虚血性脳損傷関連疾患を治療及び / 又は予防するための薬物の製造における使用。

【請求項 8】

請求項 4 に記載の組成物の、
虚血性脳損傷関連疾患を治療及び / 又は予防するための薬物の製造における使用。

【請求項 9】

前記虚血性脳損傷関連疾患は、虚血性脳卒中、血管性認知症、脳虚血後炎症、痙攣、虚血性脳神経損傷又は壊死を含む、
ことを特徴とする請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の使用。

20

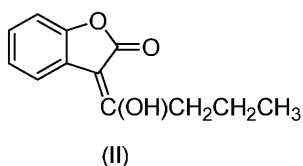
【請求項 10】

前記虚血性脳損傷関連疾患は、
虚血性脳卒中、血管性認知症、脳虚血後炎症、痙攣、虚血性脳神経損傷又は壊死を含む、
ことを特徴とする請求項 8 に記載の使用。

【請求項 11】

式 (I I) :

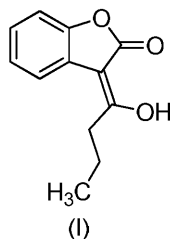
【化 4】



30

の構造を有する化合物及び式 (I) :

【化 5】

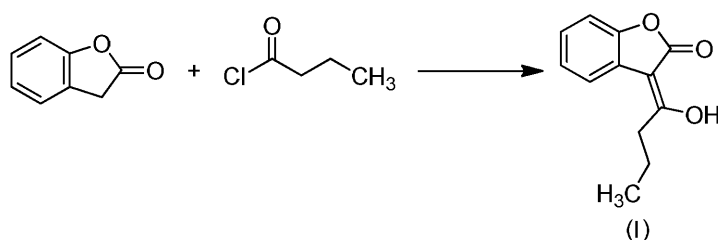


40

の構造を有する化合物を合成する方法であって、前記式 (I) で示される化合物が、下記反応式に従って製造される、方法。

50

【化 6】



10

【請求項 1 2】

請求項 2 に記載の式 (I) の化合物を石油エーテルに溶解してろ過した後、ろ液をピンホール膜で覆い、通風環境に置いて室温で溶媒を緩やかに蒸発させることにより、請求項 3 に記載の単結晶を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗脳虚血、抗虚血後炎症及び抗痙攣作用を有し、虚血性脳卒中患者における神経機能障害を改善できる化合物、医薬組成物、並びに虚血性脳神経損傷及び壊死関連疾患を治療するための方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

白質は中枢神経系の重要な構成要素であり、神経線維が集積した場所である。白質病変 (WML) は、通常、血流減少や血中酸素供給不足によって引き起こされる。脳血液供給障害 (不足) により、脳組織代謝の需要を満たすことが困難になり、従って一連の症状をもたらす。臨床では、眩暈、頭痛、四肢しびれ、又は一過性の意識喪失が見られ、重篤な者は、脳機能に不可逆的な損傷を引き起こし、死に至る場合もある。脳虚血関連疾患は、一過性脳虚血発作 (TIA)、虚血性脳卒中 (脳梗塞)、もやもや病、慢性脳供血不足などがあり、患者の認知機能低下及び血管性認知症の原因の 1 つでもある。

【0003】

30

現在、脳虚血による疾患を治療するための薬物は多数あるが、真に有効な者は数多くない。従来の薬物ニモジピンは、脳虚血に対して予防効果を有するが、治療効果は確実ではない。セロリ種子揮発油から抽出した 3-n-ブチルフタリド (NBP) は、2005 年に中国で、軽・中等度急性虚血性脳卒中の治療に使用されると承認されたが、現在の作用機序はまだ不明であり、且つ臨床使用過程において肝機能異常及び消化管反応などの副作用を引き起こす可能性がある。

【0004】

脳虚血は、異なる程度の脳神経損傷及び壊死を引き起こし、人体の対応するシステム機能障害を引き起こし、患者の生存品質を大幅に低下させ、現在は依然として、より優れた治療効果を有し、抗脳虚血、抗虚血後炎症及び抗痙攣作用を有し、虚血性脳卒中患者における神経機能障害を改善でき、且つ記憶障害を改善し、神経細胞及び血液脳関門を保護できるなどの作用を有する、他の化合物を提供する必要がある。

40

【発明の概要】

【0005】

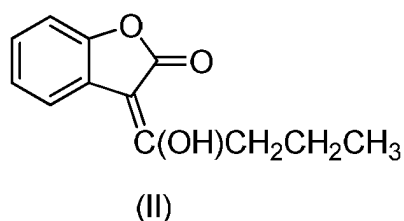
本発明は、虚血性脳神経損傷及び壊死関連疾患を治療するための、抗脳虚血、抗虚血後炎症及び抗痙攣作用を有し、虚血性脳卒中患者における神経機能障害を改善できる新規化合物を提供する。

【0006】

本発明は、以下の構造を有する式 (II) の化合物、又はその薬学的に許容される塩を提供する。

50

【化 1】

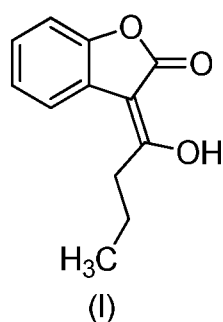


10

【 0 0 0 7】

本発明はまた、以下の構造を有する式（Ⅰ）の化合物、又はその薬学的に許容される塩を提供する。

【化 2】



20

【 0 0 0 8】

本発明は更に、本発明の式（ⅠⅠ）の化合物又はその薬学的に許容される塩、及び 1 種又は複数種の薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 0 9】

本発明は更に、本発明の式（Ⅰ）の化合物又はその薬学的に許容される塩、及び 1 種又は複数種の薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

30

【 0 0 1 0】

本発明は更に、本発明の式（ⅠⅠ）の化合物又はその薬学的に許容される塩の、虚血性脳損傷関連疾患を治療及び／又は予防するための薬物の製造における使用を提供する。

【 0 0 1 1】

本発明は更に、本発明の式（Ⅰ）の化合物又はその薬学的に許容される塩の、虚血性脳損傷関連疾患を治療及び／又は予防するための薬物の製造における使用を提供する。

【 0 0 1 2】

本発明は更に、本発明に記載の組成物の、虚血性脳損傷関連疾患を治療及び／又は予防するための薬物の製造における使用を提供する。

【 0 0 1 3】

本発明に記載の虚血性脳損傷関連疾患は、虚血性脳卒中、血管性認知症、脳虚血後炎症、痙攣、虚血性脳神経損傷又は壊死などを含むが、これらに限定されない。

40

【 0 0 1 4】

本発明は更に、本発明の式（ⅠⅠ）の化合物及び式（Ⅰ）の化合物を合成するための方法を提供する。

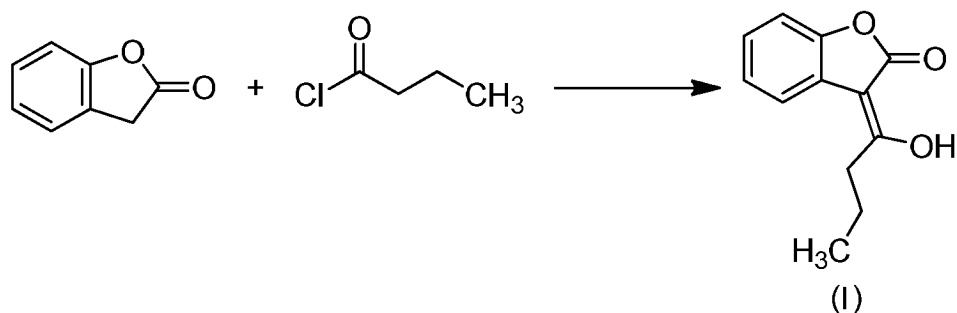
【 0 0 1 5】

一具体的な実例において、本発明は更に、式（Ⅰ）で示される化合物の製造方法を提供する。

【 0 0 1 6】

50

【化 3】



10

【0017】

本発明は更に、以下の単位胞パラメータを有する、本発明に記載の式 (I) の化合物の単結晶を提供する。

【表 1】

結晶系	単斜
空間群	$P2_1/c$
$a/\text{\AA}$	7.318 (6)
$b/\text{\AA}$	20.279 (17)
$c/\text{\AA}$	7.458 (7)
$\alpha/^\circ$	90
$\beta/^\circ$	111.417 (16)
$\gamma/^\circ$	90
単位胞の体積/ $\text{\AA}^3$	1030.2 (16)
Z	4

20

30

【0018】

一具体的な実施例において、式 (I) の化合物の単結晶の非対称単位は図 2 で示される。

【0019】

本発明は更に、本発明に記載の式 (I) の化合物を石油エーテルに溶解してろ過した後、ろ液をピンホール膜で覆い、通風環境に置いて室温で溶媒を緩やかに蒸発させることにより、上記単結晶を製造する方法を提供する。

【0020】

本発明に記載の化合物は、生物学的利用能がより高く、ラット血漿及び脳組織における分布濃度がより高く、虚血性脳損傷に良好な効果を有する。

40

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図 1】(Z) - 3 - (1 - ヒドロキシブテニル) ベンゾフラン - 2 (3H) - オン単結晶の顕微鏡写真である。

【図 2】(Z) - 3 - (1 - ヒドロキシブテニル) ベンゾフラン - 2 (3H) - オン単結晶の非対称単位である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

以下、具体的な実施例を結合して、当分野における一般的技術知識及び通常的手段に基

50

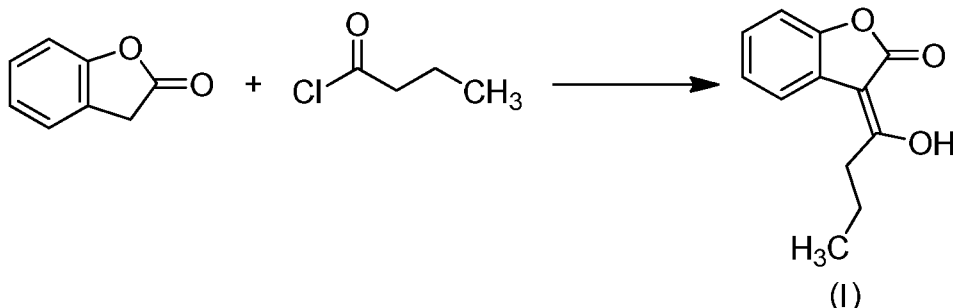
づき、本発明を更に説明する。以下の実施例は、本発明の好適な実施形態の一部に過ぎず、本発明を限定するものと解釈されるべきではなく、当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、若干の改変を加えることができ、それらも本発明の保護範囲にあると解釈されるべきである。

【0023】

実施例 1

(Z)-3-(1-ヒドロキシブテニル)ベンゾフラン-2(3H)-オンの合成

【化4】



10

【0024】

3-ベンゾフラノン(5.0g、37.3mmol、1.0eq.)をジクロロメタン(50mL)に溶解し、5℃まで降温し、カリウムtert-ブトキシド(6g、53.5mmol、1.4eq.)を緩やかに加え、0.5h反応させた後、塩化n-ブチリル(8g、75.0mmol、2.0eq.)を緩やかに加え、1h反応させ、水(50mL)を加えて抽出し、有機相を取って0.1Nの塩酸で酸性(pH<2)に洗浄し、有機相を無水硫酸ナトリウム(5g)で0.5h乾燥させ、ろ過し、濃縮して油状物を得、その後、高圧分取クロマトグラフィーを使用して分取精製し、精製後の溶液を凍結乾燥させ、白色固体の式(I)の化合物((Z)-3-(1-ヒドロキシブテニル)ベンゾフラン-2(3H)-オン(2.5g、32.9%)を得た。

20

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 12.02(s, 1H), 7.35-7.33(d, 1H), 7.28-7.17(m, 3H), 2.76-2.73(m, 2H), 1.90-1.80(m, 2H), 1.12-1.08(m, 3H)。

30

¹H NMR(CDCl₃+D₂O, 400MHz): δ 7.34-7.32(d, 1H), 7.28-7.16(m, 3H), 2.76-2.72(m, 2H), 1.89-1.80(m, 2H), 1.12-1.08(m, 3H)。

【0025】

実施例 2

(Z)-3-(1-ヒドロキシブテニル)ベンゾフラン-2(3H)-オン単結晶の製造
20mg(0.098mmol)の実施例3で製造された(Z)-3-(1-ヒドロキシブテニル)ベンゾフラン-2(3H)-オンを石油エーテル(0.4mL)に溶解し、ろ過した後、ろ液をピンホール膜で覆い、ヒュームフードに置き、室温で溶媒を緩やかに蒸発させ、24h後に(Z)-3-(1-ヒドロキシブテニル)ベンゾフラン-2(3H)-オン単結晶(図1)を得た。

40

【0026】

(Z)-3-(1-ヒドロキシブテニル)ベンゾフラン-2(3H)-オン単結晶のX線データは、MoターゲットKα線(λ=0.71073Å)を光源とするBruker D8 Venture回折計で収集された。データ収集過程において、結晶は296Kに維持された。単結晶の構造解析はOlex2ソフトウェアにおいて行われ、SHELXTプログラムのIntrinsic Phasing方法を使用して初期構造を計算し、そしてSHELXLプログラムの最小二乗法により構造精密化を行った。(Z)-3-(1

50

- ヒドロキシブテニル) ベンゾフラン - 2 (3 H) - オンの結晶学的データ及び構造精密化パラメータは表 1 で示され、(Z) - 3 - (1 - ヒドロキシブテニル) ベンゾフラン - 2 (3 H) - オン単結晶の非対称単位は図 2 で示された。

【 0 0 2 7 】

【表 2】

表 1. (Z) - 3 - (1 - ヒドロキシブテニル) ベンゾフラン - 2 (3 H) - オンの結晶学的データ及び構造精密化パラメータ

経験式	C ₁₂ H ₁₂ O ₃
分子量	204.22
温度/K	296.15
結晶系	単斜
空間群	P2 ₁ /c
a/Å	7.318(6)
b/Å	20.279(17)
c/Å	7.458(7)
α/°	90
β/°	111.417(16)
γ/°	90
単位胞の体積/Å ³	1030.2(16)
Z	4
ρ _{calc} /cm ³	1.317
μ/mm ⁻¹	0.094
F(000)	432.0
結晶のサイズ/mm ³	0.18×0.18×0.16
回折光源	MoKα (λ=0.71073Å)
データ収集の2θ範囲/°	4.018 to 54.558
回折指標範囲	−9≤h≤9、−25≤k≤26、−9≤l≤9
収集回折点数	7840
独立回折点数	2303 [R _{int} =0.0291、R _{sigma} =0.0290]
データ/制限/パラメータ	2303/0/138
F ² に基づく適合度	1.057
最終R因子 [I>2σ(I)]	R ₁ =0.0511、wR ₂ =0.1280
最終R因子 [全データ]	R ₁ =0.0662、wR ₂ =0.1389
最大残留電子密度ピーク/バレー/e Å ⁻³	0.23/−0.41

【 0 0 2 8 】

生物学的測定：

本発明の化合物 I が虚血性神経機能障害を改善する作用を有することは、以下の測定により証明された。また、測定結果により、本発明の化合物 I は経口投与後に良好な生物学的利用能及び薬効を有することが示された。

【 0 0 2 9 】

試験 1：ラット薬物動態試験

SD 雄性ラット (体重 180 ~ 260 g) に、化合物 I を 1.0 mg / kg の用量で尾静脈注射及び 10.0 mg / kg の用量で経口投与し、各群に 3 匹の動物であった。投与溶媒は、5 % DMSO + 5 % ポリオキシエチレンヒマシ油 (Cremophor EL)

の生理食塩水溶液であった。投与前に約 12 時間禁食させ、投与後 4 h 自由に摂取させ、水を禁じない。投与前及び投与後 5、15、30 min、1、2、4、6、8、24 h に、眼窩から約 0.2 mL 採血し、EDTA-K2 抗凝固 EP チューブに置いて氷浴し、4 で、3500 rpm で 10 分間低速遠心分離して血漿を分離し、分析するまで -20 で保存した。液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析の併用法 (LC-MS/MS) を使用して、化合物 I の血漿における濃度の定量分析を行った。試料分析結果は、WinNonlin ソフトウェアを使用して薬物動態パラメータを計算した。

【0030】

表 2 のデータにより、経口投与後に、ブチルフタリド文献 (王寧寧、李月、李曉紅、姜明燕、RP-HPLC 法によるラット血漿における 3-n-ブチルフタリドの含有量及びその薬物動態学の測定、中国新薬と臨床雑誌、2012 年 12 月、第 31 巻第 12 期、743 ~ 747 ページ) に報告されている値と比較して、化合物 I のラット体内における排除時間がより長く、生物学的利用能がより高いことが分かった (生物学的利用能が 100 % を超えた原因は、非線形薬物動態であると推測された)。

【0031】

【表 3】

表 2. 薬物動態パラメータ

パラメータ	単位	化合物 I		ブチルフタリド (文献値 ^[1])	
		i. v. 1 mg / kg	p. o. 10 mg / kg	i. v. 10 mg / kg	p. o. 60 mg / kg
$T_{1/2}$	h	7.5	9.6	2.2	2.83
T_{max}	h	/	0.5	/	0.7
C_{max}	ng/mL	/	56533.3	/	2900.0
MRT_{inf}	h	9.8	13.2	2.4	3.8
AUC_{0-t}	h * ng/mL	52515.0	702610.0	7230.0	7110.0
AUC_{0-inf}	h * ng/mL	59248.7	854122.3	8620.0	8560.0
F	%	144.2		16.6*	

* 表に列挙された AUC_{0-inf} 文献値により計算される

【0032】

試験 2 : ラット脳組織分布試験

雄性 SD ラット (体重 200 ~ 270 g) に、化合物 I、ブチルフタリド (NBP) をそれぞれ 20 mg / kg の用量で経口投与した。投与後 0.5、1、4、24 h に、動物の血漿及び脳組織サンプルを採取した。血漿の採取 : EDTA-K2 含有 EP チューブで全血を 0.2 mL 収集し、3500 g で 10 分間遠心分離した後、上層血漿を収集して -20 で保存した。脳組織の採取 : 動物の安楽死後に適量の脳組織を秤取り、脳組織 : 80 % メタノール水 (w/v) = 1 : 4 に従って均質化した。液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析の併用法 (LC-MS/MS) を使用して、化合物の血漿及び脳組織サンプルにおける濃度の定量分析を行った。

【0033】

表 3 のデータにより、経口投与後に、本発明の化合物 I のラット血漿及び脳組織における分布濃度がより高いことが分かった。

【0034】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3. 化合物のラット血漿及び脳組織における濃度

サンプリング 時間	化合物 I 20mg/kg p.o.		ブチルフタリド 20mg/kg p.o.	
	脳組織		脳組織	
	血漿測定値	測定値	血漿測定値	測定値
	濃度 (ng/mL)	濃度 (ng/g)	濃度 (ng/mL)	濃度 (ng/g)
0.5h	241333.3	8733.3	26.0	28.5
1h	192333.3	5726.7	19.1	22.8
4h	182333.3	5030.0	7.2	10.2
24h	23500.0	285.3	1.7	NA

NA：定量下限未満

【0035】

試験 3：化合物のラット脳卒中モデルにおける薬効学的研究：単回治療投与

ラット脳虚血再灌流に対する化合物のニューロン保護効果を評価するために、系栓子法を使用してSDラット中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルを構築した。SDラット（240～270g）を3.0%イソフルランで麻酔誘導した後、手術を行い、そして右側総頸動脈（CCA）、外頸動脈（ECA）及び内頸動脈（ICA）を分離露出させた。ECAを結紮し、ICAを一旦クランプし、そしてCCAの近位端、遠位端にそれぞれ系通しし、遠位端で締め付け、近位端で解けやすい結び目を作って必要に備え、両系の間に小さな切り口をはさみ、CCAの切り口から4～0番系栓子を挿入し、更に緩やかに内頸動脈へ軽く押し込み、ICAの動脈クリップに当てると一旦止まり、結紮系を更に締め付けた後、ICAの血流を遮断していた動脈クリップを外し、その直後に系栓子をICAへ押し込めて頭蓋内まで入れた。総頸動脈分岐から約18mm程度の深さまで系栓子を挿入した場合、軽い抵抗感があり、即ち系栓子の先端が既に前大脳動脈（ACA）に入り、系栓子の側壁が既に中大脳動脈の開口を閉塞した時に、挿入を止め、そして時間を記録した。CCA上の動脈クリップを除去し、活動性出血がないことを観察した後、切り口を閉じた。虚血ラットを室温に置いて体温を37℃に維持し、120min後に誘導麻酔し、麻酔を維持する状態で緩やかに系栓子を軽く引き、その先端を外頸動脈内に戻すことで、中大脳動脈再灌流を実現した。動物は再灌流の直後（10min以内）に1回投与し、モデル対照群、化合物I静脈群（30mg/kg）及び化合物I経口投与群（60mg/kg）の合計3群をそれぞれ設けた。動物を虚血再灌流後24hに安楽死させ、そして脳を速やかに摘出し、凍結後に切片化し、TTC染色を行った。正常組織は染色後ローズ色になり、梗塞組織は白色になった。ラット脳虚血損傷の程度を評価するために、梗塞組織の全脳重量に対する百分率を梗塞範囲（Infarction Area%）とした。

【0036】

術後1日のTTC染色分析により、モデル対照群の動物の脳梗塞範囲は21.63±5.66%であった。化合物I静脈群、化合物I経口投与群の動物の脳梗塞範囲は、それぞれ13.61±3.66%及び14.88±5.11%であり、これにより、本発明に記載の化合物I静脈群及び経口投与群は、何れも動物の脳梗塞範囲を著しく低減できることが分かり（P=0.0025及びP=0.0389）、同時に、化合物I静脈群及び化合物I経口投与群の動物の脳梗塞抑制率は、それぞれ37.1%及び31.2%であった。以上の結果から、化合物Iはラットの脳梗塞に対する改善効果が高いことが示され、具体

的には表 4 で示された。

【 0 0 3 7 】

【 表 5 】

表 4．実験動物の脳梗塞範囲及び脳梗塞抑制率

群別	梗塞範囲 (%)	脳梗塞抑制率 (%)
モデル対照群 (N=13)	21.63±5.66	-
化合物 I 静脈群 (N=12)	13.61±3.66**	37.1
化合物 I 経口投与群 (N=10)	14.88±5.11*	31.2

注：表中のデータは、何れも平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示され、「N」は各群の統計分析を行った動物の数を表し、「-」はデータなしを表し、*はモデル対照群の動物と比較して P<0.05、**はモデル対照群の動物と比較して P<0.01 ということを表す。

【 0 0 3 8 】

試験 4：化合物のラット脳卒中中長期モデルに対する薬効学的研究

系栓子法を使用して SD ラット中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを構築し、28 日間連続で被験薬物介入を行い、一般観察、神経行動学スコアにより、被験薬物に対して脳卒中の薬効学的評価を行った。

【 0 0 3 9 】

SD ラット (240 ~ 280 g) を 3.0 % イソフルランで麻酔誘導した後、手術を行い、そして右側総頸動脈 (CCA)、外頸動脈 (ECA) 及び内頸動脈 (ICA) を分離露出させた。ECA を結紮し、ICA を一旦クランプし、そして CCA の近位端、遠位端にそれぞれ系通しし、遠位端で締め付け、近位端で解けやすい結び目を作って必要に備え、両系の間に小さな切り口をはさみ、CCA の切り口から 4 - 0 番系栓子を挿入し、更に緩やかに内頸動脈へ軽く押し込め、ICA の動脈クリップに当てると一旦止まり、結紮系を更に締め付けた後、ICA の血流を遮断していた動脈クリップを外し、その直後に系栓子を ICA へ押し込めて頭蓋内まで入れた。総頸動脈分岐から約 18 mm 程度の深さまで系栓子を挿入した場合、軽い抵抗感があり、即ち系栓子の先端が既に前大脳動脈 (ACA) に入り、系栓子の側壁が既に中大脳動脈の開口を閉塞した時に、挿入を止め、そして時間を記録した。CCA 上の動脈クリップを除去し、活動性出血がないことを観察した後、切り口を閉じた。虚血ラットを室温に置いて体温を 37 に維持し、120 min 後に誘導麻酔し、麻酔を維持する状態で緩やかに系栓子を軽く引き、その先端を外頸動脈内に戻すことで、中大脳動脈再灌流を実現した。動物は再灌流の直後 (10 min 以内) に投与し、その後、毎日 1 回、28 日間連続で、手術当日は D1 (Day 0) と定義された。偽手術群、モデル対照群、ブチルフタリド (NBP) 投与群 (60 mg / kg、p.o.、q.d)、化合物 I 低用量経口投与群 (6 mg / kg、p.o.、q.d)、化合物 I 高用量経口投与群 (20 mg / kg、p.o.、q.d) の合計 5 群をそれぞれ設けた。投与の間、全ての動物に対して、グリッド試験 (D7、D14、D21、及び D28 の合計 4 回)、新規物体認識試験 (D26 は新規物体認識適応、D27 は検出) を行い、D28 に投与終了後、群における全ての生存動物を安楽死させた後、脳を速やかに摘出し、そして病理学的分析を行った。

【 0 0 4 0 】

(1) グリッド試験の結果により、手術後 1 週間、モデル対照群の動物の踏み外し頻度は 7.24 ± 3.59 回であり、NBP 治療群、化合物 I 低、高用量群の踏み外し頻度は、それぞれ 7.37 ± 3.03 回、5.33 ± 2.33 回、及び 4.23 ± 1.44 回であり、そのうち、化合物 I 高用量群の動物の踏み外し頻度は、モデル対照群と比較して顕著に低下しており (P = 0.0172)、手術後 2 ~ 3 週間、モデル群の動物は運動機能が徐々に回復していたため、踏み外し頻度が徐々に低下しており、化合物 I 高用量群の踏み外し頻度は、モデル対照群と比較して顕著な差はなかったが、依然として低下の傾向があり、モデル構築後 4 週間、モデル動物の踏み外し頻度は、偽手術群の動物のレベルまで

低下したことが示された。以上の結果から、化合物 I は脳卒中動物の行動機能障害に対して改善効果を有することが示された（詳細は表 5 参照）。

【 0 0 4 1 】

【表 6】

表 5. グリッド試験の結果

群別	踏み外し頻度 (回)			
	1 W	2 W	3 W	4 W
偽手術群 (12)	0.96 ± 0.66	0.79 ± 0.56	0.88 ± 0.82	1.79 ± 0.92
モデル対照群 (N=17)	7.24 ± 3.59	5.35 ± 4.40	4.09 ± 3.14	1.59 ± 0.84
NBP 群 (N=15)	7.37 ± 3.03	8.10 ± 2.97	6.27 ± 2.89	2.10 ± 1.46
化合物 I 低用量群 (N=12)	5.33 ± 2.33	6.33 ± 3.53	4.38 ± 2.44	2.58 ± 1.55
化合物 I 高用量群 (N=13)	4.23 ± 1.44*	3.23 ± 2.56	2.50 ± 0.81	1.42 ± 1.11

注：表中のデータは、何れも平均値 ± 標準偏差 (Mean ± SD) で示され、「N」は各群の統計分析を行った動物の数を表し、「1W、2W、3W、4W」は、それぞれ術後 1、2、3、4 週間を表し、*はモデル対照群と比較して $P < 0.05$ ということを表す。

【 0 0 4 2 】

(2) 治療の最終日に新規物体認識試験を行い、各群の動物の新規物体に対する認知指数 (NRI) を計算した。モデル対照群の動物の新規物体認知指数は $54.81 \pm 21.94\%$ であり、旧物体認知指数 (FRI) と顕著な差がなく、NBP 治療群、化合物 I 低及び高用量群の動物の NRI は、それぞれ $70.97 \pm 22.57\%$ 、 $70.98 \pm 22.60\%$ 及び $71.66 \pm 17.06\%$ であり、そのうち、NBP 治療群、化合物 I 低用量群及び高用量群の新規 / 旧物体認知指数は、何れも顕著な差があり ($P = 0.0074$ 、 $P = 0.0212$ 及び $P = 0.0009$)、同時に、化合物 I 低用量群及び高用量群の新規物体認知指数は、偽手術群の動物の新規物体認知指数 ($66.51 \pm 10.80\%$) と同等であり、以上の結果から、化合物 I は脳卒中動物の認知障害を顕著に改善することが示された（詳細は表 6 参照）。

【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 6. 新規物体認識試験の結果

群別	スニフ時間 (s)		認知指数 (%)	
	新規物体	旧物体	新規物体	旧物体
偽手術群 (11)	10.52±4.00	5.70±3.19	66.51±10.80***	33.49±10.80
モデル対照群 (N=14)	3.82±3.40	2.70±2.22	54.81±21.94	45.19±21.94
NBP群 (N=13)	4.94±3.60	1.60±1.01	70.97±22.57**	29.03±22.57
化合物I低用量群 (N=10)	4.74±3.61	1.54±1.10	70.98±22.60*	29.02±22.60
化合物I高用量群 (N=13)	5.62±3.60	2.20±1.66	71.66±17.06***	28.34±17.06

注：表中のデータは、何れも平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示され、「N」は各群の統計分析を行った動物の数を表し、*はモデル対照群と比較して $P<0.05$ 、**はモデル対照群と比較して $P<0.01$ 、***はモデル対照群と比較して $P<0.001$ ということを表す。

【0044】

(3) 病理学的検査：1) 修復範囲：修復領域範囲 $>30\%$ の試料を回復状況良好とし、 30% の試料を回復不良とした。モデル対照群の回復良好な動物の割合は 17.6% であり、NBP治療群、化合物I低用量群及び高用量群の修復領域 $>30\%$ の割合は、それぞれ 21.4% 、 33.3% 及び 75.0% であり、化合物I高用量群の回復状況が最も良好で、モデル対照群と比較して顕著な差があり (Chi-square、 $P=0.0080$)、以上の結果から、化合物Iは梗塞区域の修復に対して促進作用を有することが示され (詳細は表7参照)、2) 梗塞修復領域の充満血管数：梗塞修復領域の赤血球を含む血管数 10個及び >10 個の2つの標準を設定した。偽手術群の全ての動物における充満状態の血管数は何れも10個より多く、割合は 100% であり、モデル対照群の動物における梗塞修復領域の赤血球を含む血管数 10個及び >10 個の動物数は、それぞれ10匹及び7匹であり、赤血球を含む血管数 >10 個の動物数の割合は 41.2% であり、NBP治療群における梗塞修復領域の赤血球を含む血管数 及び >10 個の動物数は、それぞれ1匹及び14匹であり、赤血球を含む血管数 >10 個の動物数の割合は 93.3% であり、モデル対照群の動物と比較して統計学的意義 (Chi-square、 $P=0.0028$) を有し、化合物I低用量群及び高用量群における梗塞修復領域の赤血球を含む血管数 及び >10 個の動物数は、それぞれ $0/12$ 匹、 $1/12$ 匹であり、赤血球を含む血管数 >10 個の動物数はモデル対照群より顕著に高かった (Chi-square、 $P=0.0012$ 、 $P=0.0076$)。次に、化合物I低用量群及び高用量群の動物における修復領域の赤血球を含む血管 >10 個の試料の割合は、それぞれ 100% 、 92.3% であり、各治療群は何れも 90% 以上であり、以上の結果から、化合物Iは28日間連続の治療において脳卒中動物の脳梗塞修復領域の血管充満度を顕著に高めることが示された (詳細は表8参照)。

【0045】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 7. 各群の試料の回復状況統計表

群別	試料の数		回復良好な試料の割合 (%)
	修復領域 ≤ 30 %	修復領域 > 30 %	
偽手術群 (12)	—	12	100
モデル対照群 (N = 17)	14	3	17.6
NBP群 (N = 14)	11	3	21.4
化合物 I 低用量群 (N = 12)	8	4	33.3
化合物 I 高用量群 (N = 12)	3	9**	75.0

注:「N」は各群の統計分析を行った動物の数を表し、**はモデル対照群と Chi-square 比較して $P < 0.01$ ということを表す。

【0046】

【表 9】

表 8. 各群の試料の血管充満度統計表

群別	赤血球を含む血管の数 (個)		赤血球を含む血管 > 10 個の試料の割合 (%)
	≤ 10	> 10	
偽手術群 (12)	—	12	100
モデル対照群 (N = 17)	10	7	41.2
NBP群 (N = 15)	1	14**	93.3
化合物 I 低用量群 (N = 12)	0	12**	100
化合物 I 高用量群 (N = 13)	1	12**	92.3

注:「N」は各群の統計分析を行った動物の数を表し、**はモデル対照群と Chi-square 比較して $P < 0.01$ ということを表す。

20

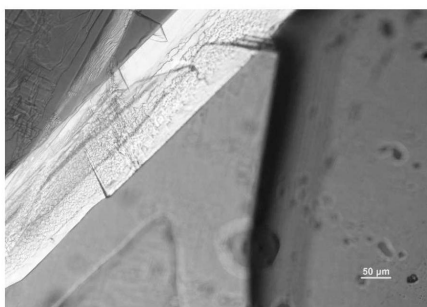
30

40

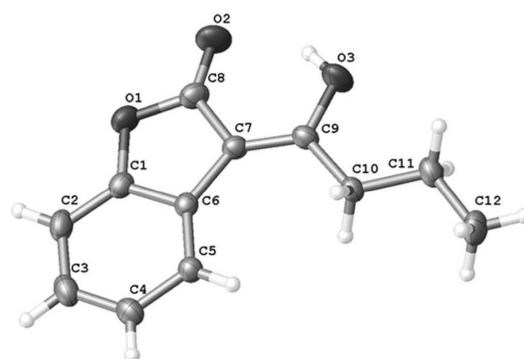
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

弁理士法人鷺田国際特許事務所

(72)発明者 チュー ヨンチアン

中華人民共和国 チャンスー ヤンチェン ダフエン ディストリクト ナンシアン ウエスト ロード
ナンバー 2 6 6

(72)発明者 リウ チア

中華人民共和国 チャンスー ヤンチェン ダフエン ディストリクト ナンシアン ウエスト ロード
ナンバー 2 6 6

(72)発明者 ワン ジア

中華人民共和国 チャンスー ヤンチェン ダフエン ディストリクト ナンシアン ウエスト ロード
ナンバー 2 6 6

(72)発明者 チェン チー

中華人民共和国 チャンスー ヤンチェン ダフエン ディストリクト ナンシアン ウエスト ロード
ナンバー 2 6 6

(72)発明者 ヤン ヤン

中華人民共和国 チャンスー ヤンチェン ダフエン ディストリクト ナンシアン ウエスト ロード
ナンバー 2 6 6

審査官 松澤 優子

(56)参考文献 中国特許出願公開第 1 0 7 5 0 1 2 5 0 (C N , A)

特表 2 0 1 4 - 5 2 8 4 6 0 (J P , A)

特表 2 0 0 7 - 5 1 7 0 1 2 (J P , A)

Shen Hong et al. , Improved synthesis of 2-n-butyl-5-nitrobenzofuran , Guangdong Chemic
al Industry , 2013年 , Vol. 6 , p. 6-7

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 D 3 0 7 / 8 3

A 6 1 K 3 1 / 3 4 3

A 6 1 P 9 / 1 0

A 6 1 P 2 5 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)