

(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
2019年9月26日 (26.09.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/179346 A1

(51) 国际专利分类号:

C07D 307/88 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
C07C 65/01 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)
C07C 51/41 (2006.01) A61K 9/19 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01) A61P 25/08 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/078059

(22) 国际申请日: 2019年3月14日 (14.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810225467.4 2018年3月19日 (19.03.2018) CN

(71) 申请人: 河南真实生物科技有限公司 (HENAN GENUINE BIOTECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国河南省平顶山市新城区复兴路中段10号院, Henan 467036 (CN)。

(72) 发明人: 常俊标 (CHANG, Junbiao); 中国河南省郑州市金水区红专路52号, Henan 450002 (CN)。 杜

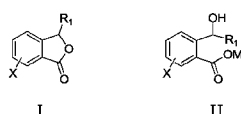
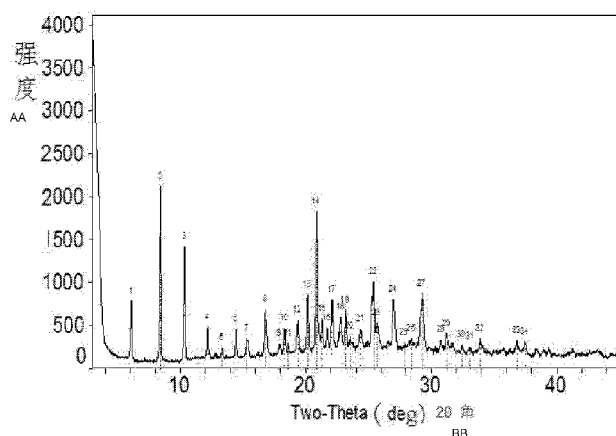
锦发 (DU, Jinfa); 中国河南省郑州市金水区红专路52号, Henan 450002 (CN)。 朱凯凯 (ZHU, Kaikai); 中国河南省郑州市金水区红专路52号, Henan 450002 (CN)。 王凯 (WANG, Kai); 中国河南省郑州市金水区红专路52号, Henan 450002 (CN)。

(74) 代理人: 郑州联科专利事务所 (普通合伙) (ZHENGZHOU LIANKE PATENT AGENCY (COMMON PARTNERSHIP)); 中国河南省郑州市郑东新区黄河南路宏图街西100米璞居大厦5楼, Henan 450046 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: BENZOIC ACID COMPOUNDS AND PREPARATION METHOD THEREFORE AND APPLICATIONS THEREOF

(54) 发明名称: 苯甲酸类化合物及其制备方法和应用



AA Strength
BB 2θ angle

(57) Abstract: The present invention belongs to the field of medicinal chemistry, relates to novel benzoic acid compounds I and II, and relates to the applications thereof in prevention and treatment or remission of cerebral ischemia or ischemia after acute and chronic myocardial infarction. In the structures of compounds I and II, X is H, I, Br, Cl, F, CN, amino and derivatives thereof. R₁ is the alkyl of C₂₋₁₀, which is substituted for C₂₋₁₀ alkyl, except for N-butane; M is an organic amine ion or a metal ion.

(57) 摘要: 本发明属药物化学领域, 涉及新型苯甲酸类化合物I和II, 涉及其在预防和治疗或缓解脑缺血或急性慢性心肌梗死后缺血等方面的应用。化合物I和II结构中, X是H, I, Br, Cl, F, CN, 氨基及其衍生物; R₁是C₂₋₁₀的烷基, 取代C₂₋₁₀烷基, 正丁烷基除外; M是有机胺离子或金属离子。



WO 2019/179346 A1

SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

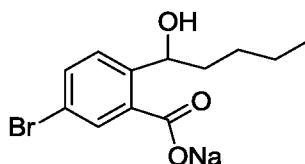
苯甲酸类化合物及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及新型苯甲酸类化合物，涉及其在预防和治疗或缓解脑缺血或急性心肌梗死后缺血疾病方面的应用，本发明也涉及其在预防和治疗或缓解渐冻症或渐冻人症（肌萎缩性脊髓侧索硬化症，amyotrophic lateral sclerosis, ALS）方面的应用，属药物化学领域。

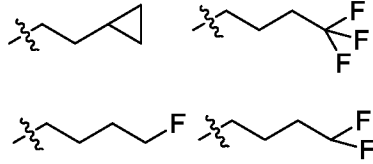
背景技术

心脑血管疾病尤其是冠状动脉粥样硬化以及由此导致的缺血性心脑血管疾病目前仍为严重困扰人类健康的常见疾病。据不完全统计，全球每年心脑血管疾病的死亡人数占总死亡人数的 30%，其中缺血性心脑血管疾病占 40%以上。中国有脑卒中病人约 700 万人，心梗病人约 200 万人。随着人们生活水平的提高，其发病率和死亡率均呈上升趋势。尽管目前临床上通过溶栓，冠脉搭桥，经皮冠状动脉介入技术等手段可显著缓解缺血性心脑血管细胞损伤，但是由急性心梗和脑梗所致的心脑血管细胞死亡，仍然严重影响疾病的愈后，导致死亡率增高。丁苯酞是目前批准上市的治疗脑卒中的药物。常俊标等人对其进行了结构改进，疗效显著提高。其中，候选药物 BZP（结构式 A）正在临床试验中（200810230890.X）。丁苯酞的代谢研究表明（X. Diao, Drug Metab Dispos 2013, 41, 430），侧链的终端两个碳极容易被 P450 氧化，丁苯酞在人体内代谢产物的分布如下所示），成人口服丁苯酞 200 毫克后 1 小时，其代谢产物 M3-2，M2，M5-2 的总和是有效药物 NBP 的 16 倍。因此，在末端两碳作进一步的改进，将很可能发现更有效的治疗心脑血管缺血相关疾病的药物。

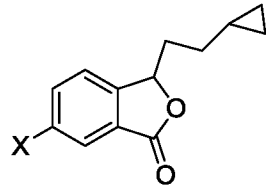


结构式 A

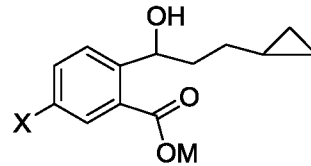
本发明化合物 I 和 II 中的 R₁ 取代基, 更优先选择如下结构:



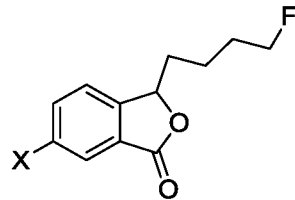
本发明所述新型苯甲酸类化合物优选具有式 III-X 化合物:



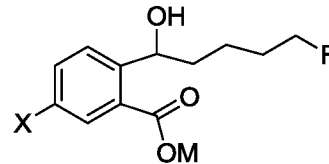
III



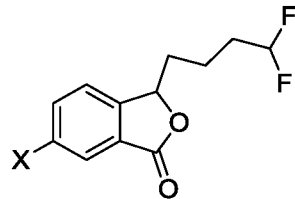
IV



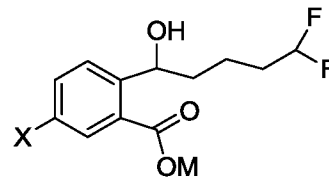
V



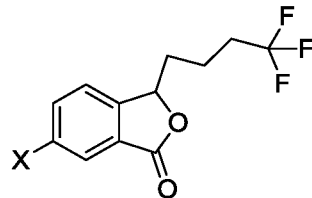
VI



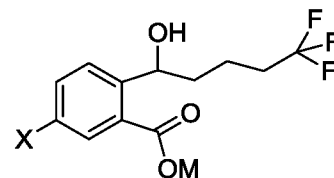
VII



VIII



IX



X

X 是 Br, F; M 是 K、Na、Ca、Zn 或 Mg 离子。

本发明进一步提供化合物 I-X 用于制备预防、治疗和缓解脑缺血疾病的药物。

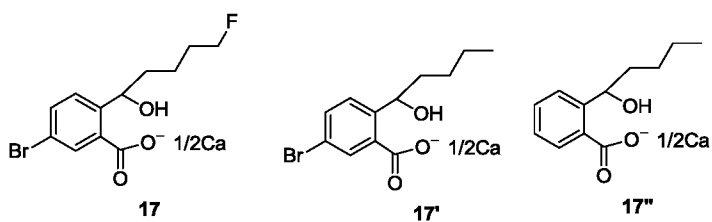
本发明更进一步提供化合物 I-X 用于制备预防、治疗和缓解心肌缺血疾病的药物。

本发明更进一步提供化合物 I-X 用于制备预防、治疗和缓解渐冻症的药物。

化合物 I-X 的氘代类似物也包括在本发明范围内。

本发明更进一步提供化合物 I-X 的制备方法如下:

以，本发明中的钾盐和钠盐不易得到高纯度的产品，不利大规模生产。所以下列化合物也都包括在本发明之内。



因此，本发明有望用于治疗

脑梗或心肌缺血性疾病和渐冻症药物的开发。

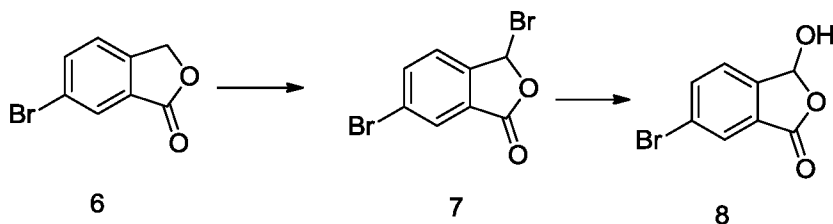
附图说明

图 1 为本发明化合物 17 晶型 A 的 X 射线粉末衍射 (XRPD) 图谱。

具体实施方式

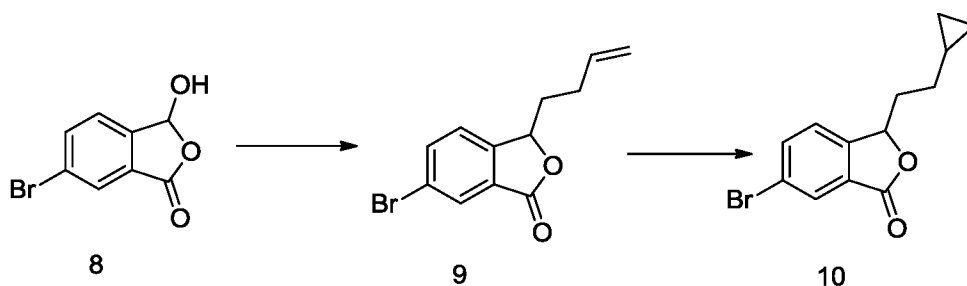
下面的实施例可以帮助本领域的技术人员更全面的理解本发明，但不以任何方式限制本发明。

实施例 1： 化合物 8 的制备



将原料 **6** (2.0 g, 9.39 mmol) 和 NBS (N-溴代琥珀酰亚胺) (1.84 g, 1.5 mmol), AIBN (偶氮二异丁腈) (154 mg, 0.94 mmol) 加入到四氯化碳 (30 mL) 中。反应混合物回流 2 h, 冷却至室温, 过滤。蒸去溶剂得到化合物 **7**。加入水 (10 mL) 后回流 1 h, 冷却, 加入 EtOAc (200 mL) 萃取, 有机相用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸去溶剂得到化合物 **8** (2.05g, 95%), 不经纯化直接用于下一步反应。

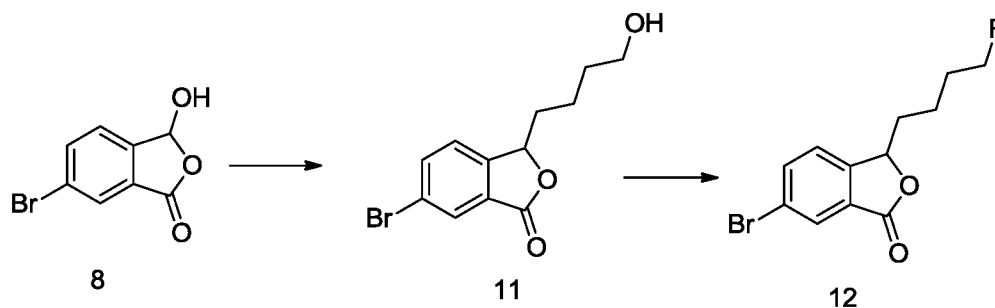
实施例 2： 化合物 10 的制备



将镁条 (0.63 g, 26.22 mmol) 加入到三口瓶中, 加入干燥的 THF (四氢呋喃) (20 mL) 和一粒碘, 在氮气保护, 50 °C 逐渐滴加 4-溴-1-丁烯 (2.95 g, 21.83 mmol) 的 THF (2 mL) 溶液引发反应, 滴加完毕后回流反应 2 h。将化合物 **8** (1.0 g, 4.37 mmol) 溶于 THF (10 mL) 中, 在氮气保护, 0 °C 滴加新制备的格式试剂, 滴加完后升至室温反应 2 h, 在 0 °C 滴加 1N HCl 淬灭, 蒸去 THF, 加入 DCM 溶解, 加入 1N HCl 调 pH 至 2, 室温反应过夜, 加入 EtOAc (100 mL), 分离出有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸去溶剂, 剩余物用硅胶柱纯化得白色固体化合物 **9** (325 mg, 28%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.84 (ddt, *J* = 17.0, 10.2, 6.6 Hz, 1H), 5.48 (dd, *J* = 8.3, 3.7 Hz, 1H), 5.15 - 5.01 (m, 2H), 2.37 - 2.20 (m, 2H), 2.18 - 2.07 (m, 1H), 1.86 (dtd, *J* = 14.2, 8.5, 5.4 Hz, 1H); *m/z*(ES+) (M+H)⁺=268。

在三口瓶中加入干燥的 DCM (二氯甲烷) (5mL), 在氮气保护下加入 1.0M 的二乙基锌的正己烷溶液 (2.4 mL, 2.4 mmol) 冷却至 -10°C, 缓慢滴加三氟乙酸 (277 mg, 2.4 mmol) 的 DCM (5mL) 溶液, 加完后反应 20 min, 缓慢滴加二碘甲烷 (652 mg, 2.4 mmol) 的 DCM (5mL) 溶液, 滴加完后反应 20 min, 缓慢滴加化合物 **9** (50 mg, 0.19 mmol) 的 DCM (5mL) 溶液, 滴加完后升至室温, 反应 2-3 h, 在 0°C 下滴加饱和氯化铵溶液淬灭, 萃取, 分离有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸去溶剂, 剩余物经硅胶柱层析纯化得化合物 **10** 白色固体 (45 mg, 86%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.53 (dd, *J* = 8.2, 3.9 Hz, 1H), 2.23 - 2.11 (m, 1H), 1.86 (dtd, *J* = 14.3, 8.5, 5.6 Hz, 1H), 1.47 - 1.31 (m, 2H), 0.78 - 0.63 (m, 1H), 0.54 - 0.39 (m, 2H), 0.18 - 0.03 (m, 2H); *m/z*(ES+) (M+H)⁺=282。

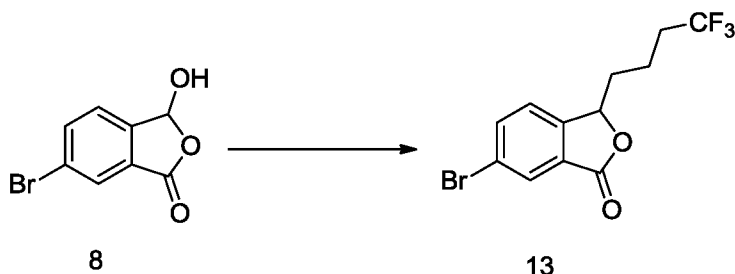
实施例 3: 化合物 12 的制备



将镁条 (125 mg, 5.22 mmol) 加入到三口瓶中, 加入干燥的 THF (5 mL) 和一粒碘, 在氮气保护, 加热条件下逐渐滴加 (4-溴丁氧基) (叔丁基) 二甲基硅烷 (1.16 g, 4.35 mmol) 的 THF (4 mL) 溶液引发反应, 滴加完毕, 回流反应 2 h 得到格式试剂。将化合物 **8** (200 mg, 0.87 mmol) 溶于 THF (5 mL) 中, 在氮气保护下, 0 °C 滴加新制备的格式试剂, 滴加完毕升至室温反应 2 h, 在 0 °C 滴加 1N HCl 淬灭, 蒸去 THF, 加入 DCM (50 mL) 溶解, 加 1N HCl 调 pH 至 2, 室温反应过夜, 萃取, 分离出有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸去溶剂, 剩余物经硅胶柱层析纯化得化合物 **11** 白色固体 (45 mg, 18%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.02 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.78 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.45 (dd, *J* = 7.8, 4.0 Hz, 1H), 3.68 - 3.62 (m, 2H), 2.54 (s, 1H), 2.15 - 2.05 (m, 1H), 1.84 - 1.72 (m, 1H), 1.69 - 1.46 (m, 4H)。

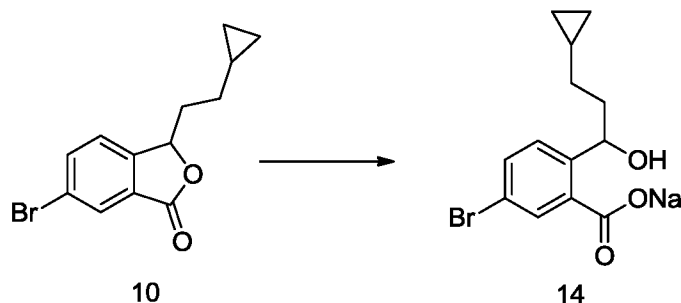
将化合物 **11** (45 mg, 0.16 mmol) 溶于 DCM (3 mL), 冷却至 -78 °C, 氮气保护下, 缓慢滴加 DAST (二乙胺基三氟化硫) (77 mg, 0.48 mmol) 的 DCM (3 mL) 溶液, 滴加完后升至室温反应 2 h, 加水淬灭, 萃取, 分离出有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸去溶剂, 剩余物经硅胶柱层析纯化得化合物 **12** 白色固体 (26 mg, 58%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.48 (dd, *J* = 7.9, 3.9 Hz, 1H), 4.53 (tt, *J* = 5.4, 2.7 Hz, 1H), 4.42 (tt, *J* = 5.4, 2.7 Hz, 1H), 2.18 - 2.06 (m, 1H), 1.85 - 1.71 (m, 3H), 1.69 - 1.59 (m, 2H)。¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -218.60。 *m/z* (ES+) (M-H)⁺ = 286。

实施例 4: 化合物 13 的制备



将镁条 (151 mg, 6.29 mmol) 加入到三口瓶中, 加入干燥的 THF (5 mL) 和一粒碘, 在氮气保护, 加热条件下逐渐滴加 1-溴-4, 4, 4-三氟丁烷 (1.0 g, 5.24 mmol) 的 THF (2 mL) 溶液引发反应, 滴加完毕, 回流反应 2 h。化合物 **8** (240 mg, 1.05 mmol) 溶于 THF (5 mL) 溶液中, 在氮气保护下, 0 °C 滴加新制备的格式试剂, 滴加完后升至室温反应 2 h, 在 0 °C 下滴加 1N HCl 淬灭, 蒸去 THF, 加入 DCM (20 mL), 加 1N HCl 调 pH 至 2, 室温反应过夜, 萃取, 分离出有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸去溶剂, 剩余物经硅胶柱层析纯化得化合物 **13** 白色固体 (110 mg, 33%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (s, 1H), 7.83 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.47 (dd, *J* = 7.2, 3.6 Hz, 1H), 2.26 - 2.14 (m, 3H), 1.87 - 1.73 (m, 3H)。¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -66.12。 *m/z*(ES⁺) (M+H)⁺=324。

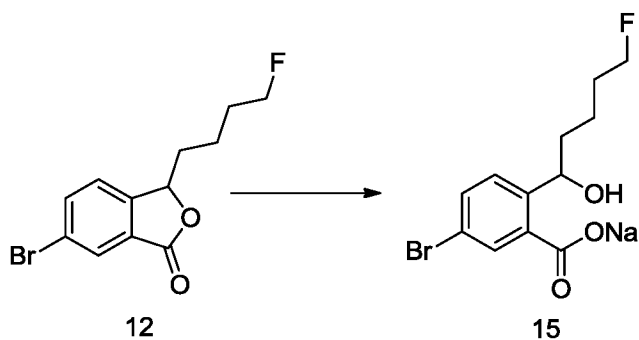
实施例 5: 化合物 14 的制备



将化合物 **10** (30 mg, 0.11 mmol) 溶于 MeOH/H₂O (4 mL, 1:1) 溶液中, 加入 NaOH (8.6 mg, 0.21 mmol) 在 50 °C 搅拌 5 h。蒸去溶剂, 多次加入乙醚带干。剩余产物加入乙醚溶解, 过滤, 滤液 0 °C 放置过夜, 有大量产物析出, 过滤, 得化合物 **14** 白色固体 (19 mg, 59%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.89 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 1.87 - 1.61 (m, 2H), 1.23 (s, 1H), 1.11 - 0.97 (m, 1H), 0.63 (s, 1H), 0.33 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), -0.06 (s, 2H);

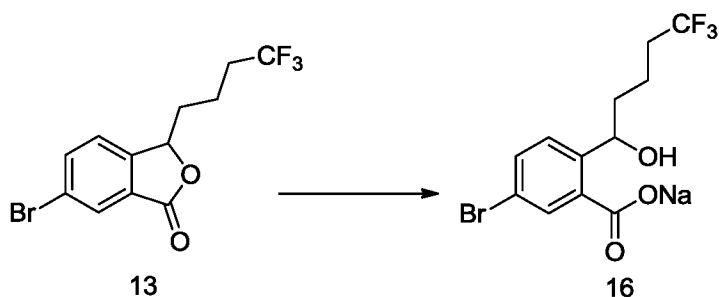
$m/z(\text{ES}^+) (\text{M}-\text{Na})^- = 297$ 。

实施例 6： 化合物 15 的制备



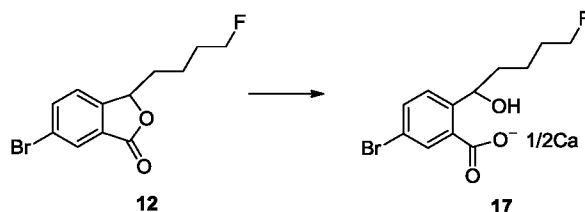
将化合物 **12** (93 mg, 0.33 mmol) 溶于 MeOH/H₂O (11 mL, 1:1) 溶液中, 加入 NaOH (26 mg, 0.65 mmol), 在 50 °C 搅拌 5 h。蒸去溶剂, 多次加入乙醚带干。得化合物 **15** 乳白色固体 (93 mg, 95%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.35 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.57 - 4.40 (m, 2H), 4.35 (dd, $J = 14.9, 8.9$ Hz, 1H), 1.69 - 1.53 (m, 4H), 1.49 - 1.35 (m, 1H), 1.22 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H); ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -216.41。 $m/z(\text{ES}^+) (\text{M}-\text{Na})^- = 303$ 。

实施例 7： 化合物 16 的制备



将化合物 **13** (100 mg, 0.31 mmol) 溶于 MeOH/H₂O (10 mL, 1:1) 溶液中, 加入 NaOH (25 mg, 0.62 mmol), 在 50 °C 搅拌 5 h。蒸去溶剂, 多次加入乙醚带干。浓缩后的产物加入乙醚过滤, 溶液低温放置过夜, 有大量产物析出, 过滤, 得化合物 **16** 白色固体 (50 mg, 44%)。 $m/z(\text{ES}^+) (\text{M}-\text{Na})^- = 339$ 。

实施例 8： 化合物 17 的制备



将化合物 12 (5.0 g, 17.4 mmol, 1.0 eq) 溶于 50mL 甲醇中, 加入 NaOH (870.7 mg, 20.9 mmol, 1.2 eq), 在 70 °C 搅拌 4 h。旋干即得白色固体钠盐, 加入 50mL 水, 用 1 M HOAc 调节至 pH 为 7-8, 60 °C 下滴加用 25mL 水溶解的一水合醋酸钙 (1.57 g, 8.7 mmol, 0.5 eq), 滴数滴有固体析出, 停止滴加, 搅拌 20 分钟, 将剩余溶液滴加进去, 搅拌 1 h, 室温冷却, 过滤, 水洗, 甲醇洗, 乙醚洗, 真空干燥得化合物 17 白色固体 5.32 g, 产率 97%。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.88 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 7.44 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.88 (br s, 2H), 4.89 (s, 2H), 4.44 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.32 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.69-1.54 (m, 8H), 1.49-1.39 (m, 2H), 1.33-1.22 (m, 2H); ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -216.3; *m/z*(ESI) [M-Na]⁻=303。

化合物 17 的稳定晶体形式为晶型 A, 使用 Cu-Kα 辐射, λ = 1.5418 Å, 所述晶体形式的 X 射线粉末衍射 (XRPD) 在衍射角 2θ 为 6.10, 8.43, 10.36, 12.18, 13.34, 14.46, 15.30, 16.77, 17.93, 18.31, 18.60, 19.36, 20.16, 20.88, 21.30, 21.70, 22.10, 22.81, 23.18, 23.57, 24.37。处有特征峰, 其中 2θ 值误差范围为 ±0.2 (见图 1)。

化合物 17 的稳定晶体形式为晶型 A 在下列特征峰衍射角 2θ 处具有特征峰及其相对强度 (%) :

2θ (±0.2°)	相对强度 I%
6.10	33.0
8.42	100
10.36	64.9
12.18	17.5
16.77	26.2
19.36	17.9

19.36	17.9
20.16	31.5
20.88	77.7
22.10	26.4
23.18	20.6
25.45	36.6
26.99	27.6
29.30	31.1

实施例 9：动物药效实验

实验材料和方法

1. 实验过程

1.1. 动物适应：动物到达设施后，将其饲养于严格控制环境条件的动物饲养间中，饲养间的温度维持在 20~24℃，湿度 30~70%。通过温湿度计对饲养间的温度和湿度进行实时监控，并且每天对温度和湿度记录两次（上午和下午各 1 次）。动物饲养间的采光由一个电子定时开灯系统来控制，每天开灯 12 小时关灯 12 小时（7:00 AM 点开灯，19:00 PM 关灯）。

1.2. 实验过程：雄性 SD 大鼠，适应 5-7 天后开始实验，手术开始时体重 200~250g 左右。实验当天，大鼠用 10%水合氯醛 0.35ml/100g 腹腔注射麻醉后，将大鼠固定于保温装置的手术台，分离颈总动脉，至颈外动脉和颈内动脉分叉处，小心分离颈外动脉，使用灭菌的 MCAO 专用拴线，经颈外动脉插入颈内动脉，插入线栓直到线栓标记处（约 18mm±0.5mm），拴线头部抵达大脑中动脉起始部，缺血 2 小时后，将线栓拔出至颈外动脉处，使血流再灌注。其中再灌注后行为学评分 <1 者将被剔除。手术后将大鼠放于保温毯直至苏醒。24h 后，进行神经行为学评分，麻醉后取血，EDTA-K₂ 抗凝，离心分离上清，-80℃ 保存。处死大鼠取脑进行 TTC 染色评价梗死面积。本次实验将分 3 天完成，每天每组 n=3-4 只大鼠。

1.3. 术中监测：分别于术前，缺血后以及再灌注后使用激光多普勒仪记录脑血流量

1.4. 终点剔除标准：1) 脑部未梗死；2) 蛛网膜下腔出血

1.5. 日常监控: 自动物抵达设施起, 实验人员及兽医进行每日笼边观察, 健康状况和体重每周至少监测一次。

1.6. 分组: 本实验总共 60 只动物, 术后随机进行分组。各组情况如下表:

组号	分组	动物数(只)	给药剂量	给药方式	给药时间
1	假手术组	10		iv	再灌注即刻
2	模型对照组	10		iv	再灌注即刻
3	BZP	10	3mg/kg	iv	再灌注即刻
4	本发明化合物 14	10	3mg/kg	iv	再灌注即刻
5	本发明化合物 15	10	3mg/kg	iv	再灌注即刻
6	本发明化合物 16	10	3mg/kg	iv	再灌注即刻
7	本发明化合物 17	10	3mg/kg	iv	再灌注即刻

1.7. 药品配制:

精密称取待测药, 加入生理盐水溶解, 配制浓度为 1.5mg/ml。

1.8. 给药及记录方案: 给药前将配置好的药物从 4℃ 冰箱取出, 恢复至室温后给药。给药体积为 2ml/kg。

1.9. 终点实验:

1.9.1. 神经行为学评分: 再灌注 24h 后分别进行神经行为学评分。采用改良 Longa 评分法, 共分 6 个等级, 采用 0-5 分法, 0: 正常, 无神经功能缺损; 1 分: 左侧前爪不能完全伸展, 轻度神经功能缺损; 2 分: 行走时, 时而向左侧(瘫痪侧)运动; 3 分: 行走时, 一直向左侧(瘫痪侧)转圈; 4 分: 向左侧(瘫痪侧)瘫倒; 5 分: 不能自发行走, 有意识丧失。

1.9.2. 脑梗死比例: 大鼠 CO₂ 吸入安乐死/水合氯醛 (330mg/kg 麻醉), 经心脏采血, 取大脑放入脑槽行冠状切片 (每片 2mm), 使用 1%TTC (1g/100ml) 在 37℃ 避光染色 15min, 染色后脑片拍照后使用 Image Pro Plus 6.0 分析梗死面积比例。梗死区面积/脑总面积为梗死面积比例。

1.9.3. 收集血浆做进一步检测，-80℃保存。

2. 数据分析及统计：

所有的数据被录入到 Excel 文档中，并以平均值 ± 标准误的方式表示，显著性差异采用单因素方差分析方法加 Dunnett' s 分析进行比较。P 值小于 0.05 被认为有显著性差异，P 值小于 0.01 被认为有极显著性差异。

实验结果

表 1. 化合物对脑缺血再灌注大鼠脑血流量的影响

	组号	术后/术前	再灌注/术前
Sham	1	95.7%	
Vehicle	2	16.2%	83.6%
BZP	3	15.2%	91.1%
本发明化合物 14	4	13.5%	88.3%
本发明化合物 15	5	16.8%	95.6%
本发明化合物 16	6	14.3%	89.8%
本发明化合物 17	7	15.5%	95.3%

手术过程中，插入线栓后大鼠脑血流量降低 70%以上，再灌注后脑血流量恢复，表明 tMCAO 模型成功建立。根据表 1 数据可见，BZP 和化合物 14-16 都对脑缺血再灌注后脑血流量恢复有显著作用，尤其化合物 15、17(恢复到术前的 95.6%) 对恢复脑血流量的作用比 BZP (91.1%) 更明显。

表 2. 化合物对脑缺血再灌注大鼠脑梗死面积的影响

	组号	梗死百分比	梗死面积抑制率
Sham	1	0%	
Vehicle	2	52.2%	0%
丁苯酞钾	3	37.5%	26.4%
BZP	4	20.6%	57.5%
本发明化合物 15	5	12.0%	75.3%
本发明化合物 17	6	11.8%	77.4%

根据表 2 的结果可见,造模后未用药时,梗死面积达到 52.2%,而 BZP 和化合物 15 的使用都显著地减少脑缺血再灌注大鼠脑梗死面积,尤其是化合物 15,对脑缺血再灌注大鼠脑梗死面积减少的最为显著,降低到 12.0%,脑梗死面积显著小于丁苯酞钾的 37.5%和 BZP 的 20.2%。钙盐化合物 17 减少脑缺血再灌注大鼠脑梗死面积的效果与钠盐化合物 15 相当。

本发明的动物实验证明,BZP 和化合物 14-16 均可以改善 tMCAO 引起的脑损伤,其中化合物 15 效果最好,并与化合物 17 相当。

表 1,化合物 15 使血流量恢复 95.6%,而 BZP 只恢复 91.1%。表 2,化合物 15 使脑梗死面积降低到 12.0%,而 BZP 只能降低到 20.2%,丁苯酞钾最差仍有 37.5%。使脑血流量恢复和降低脑梗死面积两个方面,本发明化合物 15 比 BZP 和丁苯酞两者更优。

化合物 17 是化合物 15 的钙盐,两者的药效相当。

实施例 10: 人微粒体中稳定性

1 实验材料

1.1 药品与试剂

受试物 BZP 和化合物 15,纯度 97%以上,由河南美泰宝生物制药有限公司制备并提供。

内标 PHPB;

磷酸二氢钾和磷酸氢二钾为分析纯,购自生工生物工程(上海)有限公司;

人肝微粒体(HLM)购自上海瑞德肝脏疾病研究中心;

甲醇为质谱纯,购自 Fisher 公司;

乙酸铵为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;

1.2 仪器与设备

ACCELA 液相色谱系统,美国 Thermo 公司;

TSQ QUANTUM ULTRA 质谱系统,美国 Thermo 公司;

2 实验方法

2.1 样品前处理

精密吸取 50 μL 肝微粒体温孵液，依次加入 50 μL 内标溶液、150 μL 甲醇，于涡旋混合器上涡旋 30 s 混合均匀，13000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，小心吸取上清液用 0.22 μM 滤膜过滤，取滤液进样 10 μL ，进行 LC/MS/MS 分析。

2.2 人肝微粒体代谢反应

1000 μL 反应系统中丁苯酞系列化合物(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和人肝微粒体(1.0 mg/ml)、NADPH(2 mM)以及磷酸盐缓冲液(100 mM , $\text{PH}=7.4$)。甲醇浓度不超过 0.1%(v/v)。首先将 MTB 系列化合物、肝微粒体在磷酸盐缓冲液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下预温孵 5min，然后加入 NADPH 启动反应，反应 0、5 min、10 min、20 min、30 min、40 min、60 min、120 min 后，立即取出放入冰浴，并向系统中加入 50 μL 内标和 150 μL 冰冻甲醇终止反应。然后按样品前处理方法处理，进行 LC/MS/MS 分析。

2.3 数据处理

利用 DAS 3.0 药代动力学软件将 MTB 系列化合物在浓度-时间数据进行曲线拟合，计算消除半衰期 ($t_{1/2}$)。

3 实验结果

表 3 MTB 系列化合物在人肝微粒体中的稳定性 ($T_{1/2}$)

	丁苯酞钾	BZP	化合物 14	化合物 15	化合物 17
$T_{1/2}$ (h)	<1	4.17	2.44	19.09	19.30

结果表明，在人肝微粒体中，丁苯酞钾的半衰期小于 1 小时，BZP 为 4.17 小时，而氟化物 15 和 17 的半衰期显著延长，分别达到 19.09 和 19.30 小时。可见，氟化物使化合物稳定，完全可以 1 天用药 1 次。

实施例 11：小鼠的急性毒性

将药物溶解于水，配成不同的浓度，通过小鼠尾静脉注射，观察死亡率，计算出导致一半用药小鼠死亡的剂量。结果如下（表 4）：

表 4 MTB 系列化合物急性半数致死剂量

	丁苯酞钾	BZP	化合物 15	化合物 17
T1/2 (h)	373 mg/kg	330 mg/kg	1036 mg/kg	1100 mg/kg

结果表明，化合物 15 和 17 的毒性相当，都比丁苯酞钾和 BZP 的显著降低。

权利要求书

1. 苯甲酸类化合物，其特征在于，其具有式 I 或其盐式 II 的结构：



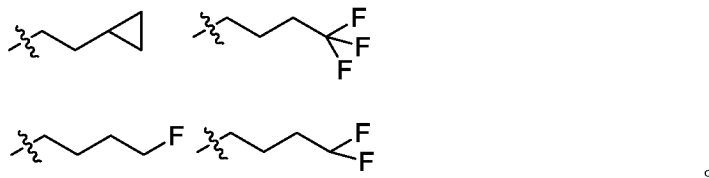
其中，X 是 H, I, Br, Cl, F, CN, 氨基；在苯环上单取代；
 R₁ 是 C₂₋₁₀ 的烷基，被环丙烷基或氟取代的 C₂₋₁₀ 烷基，正丁烷基除外；
 M 是有机胺离子或金属离子。

2. 如权利要求 1 所述苯甲酸类化合物，其特征在于，X 是 H, I, Br, Cl, F, CN, 氨基，在苯环上单取代；R₁ 是 C₃₋₅ 的烷基，环丙烷取代的 C₃₋₅ 的烷基，氟取代的 C₃₋₅ 烷基，正丁烷基除外；M 是 K、Na、Ca、Zn 或 Mg 离子。

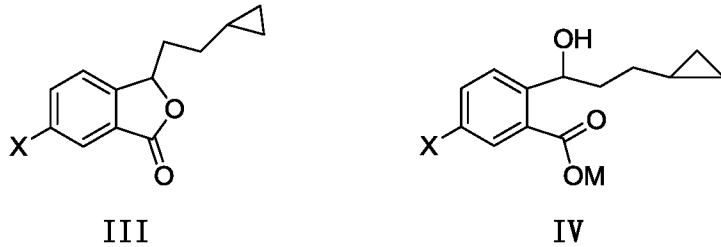
3. 如权利要求 1 所述苯甲酸类化合物，其特征在于，X 是 Br 或 F；R₁ 是 C₃₋₅ 的烷基，环丙烷取代的 C₃₋₅ 的烷基，氟取代的 C₃₋₅ 烷基，正丁烷基除外；M 是 K、Na 或 Ca 离子。

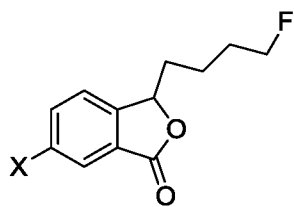
4. 如权利要求 3 所述苯甲酸类化合物，其特征在于，

R₁ 选自：

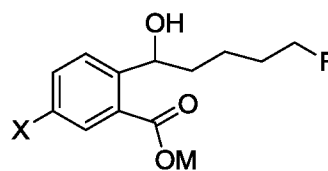


5. 如权利要求 4 所述苯甲酸类化合物，其特征在于，其具有式 III-X 的结构：

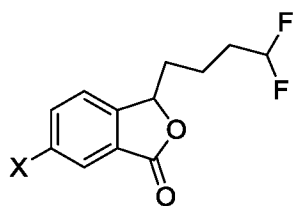




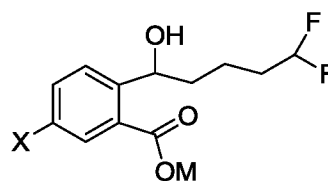
V



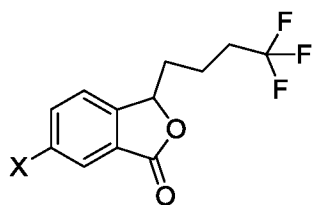
VI



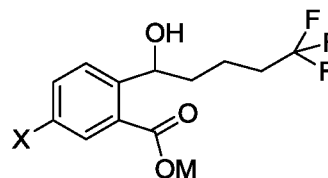
VII



VIII



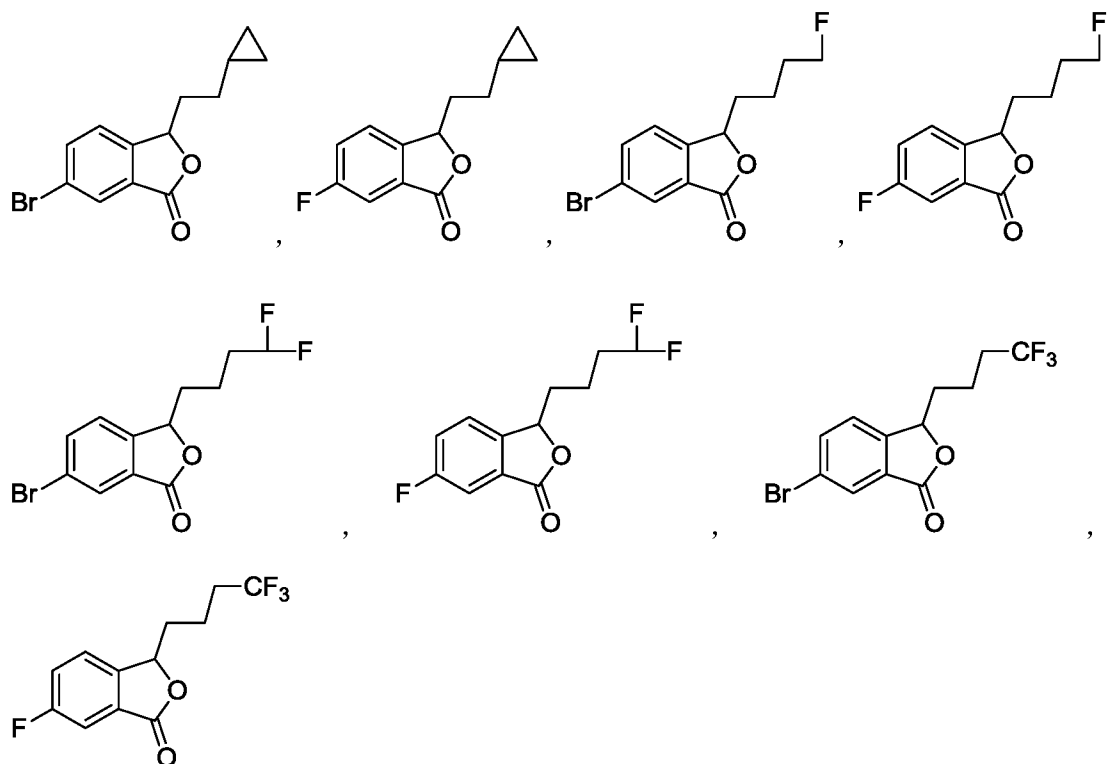
IX



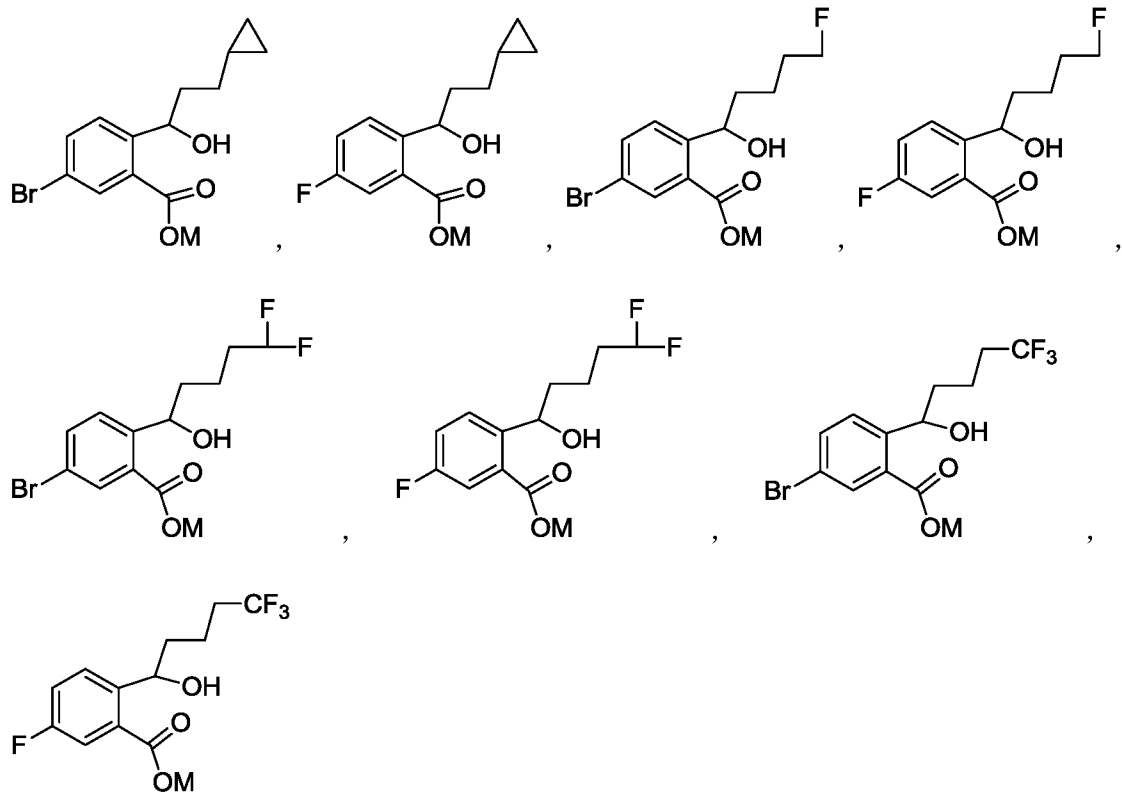
X

M 是 K、Na、Ca、Zn 或 Mg 离子；X 是 Br，F。

6、如权利要求 5 所述苯甲酸类化合物，其特征在于，选如下化合物：

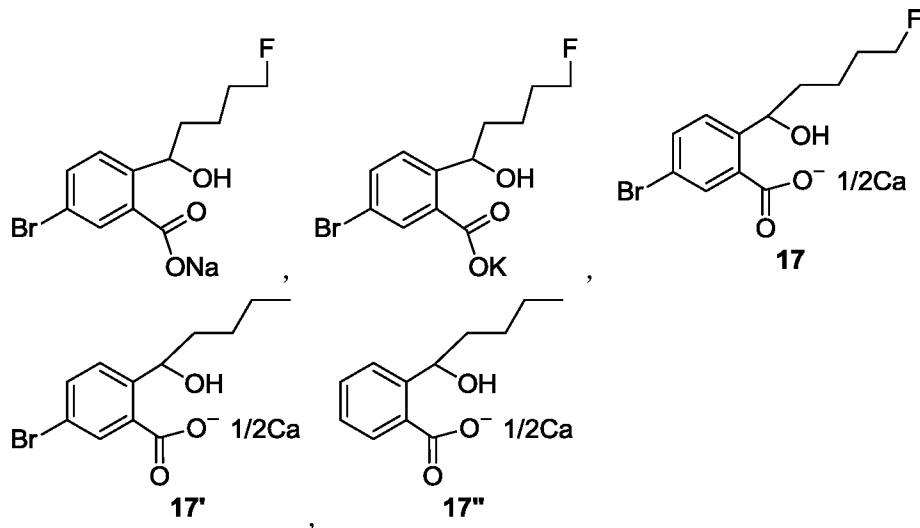


7、如权利要求 5 所述苯甲酸类化合物，其特征在于，选如下化合物：



其中，M 是 K、Na、Ca、Zn 或 Mg 离子。

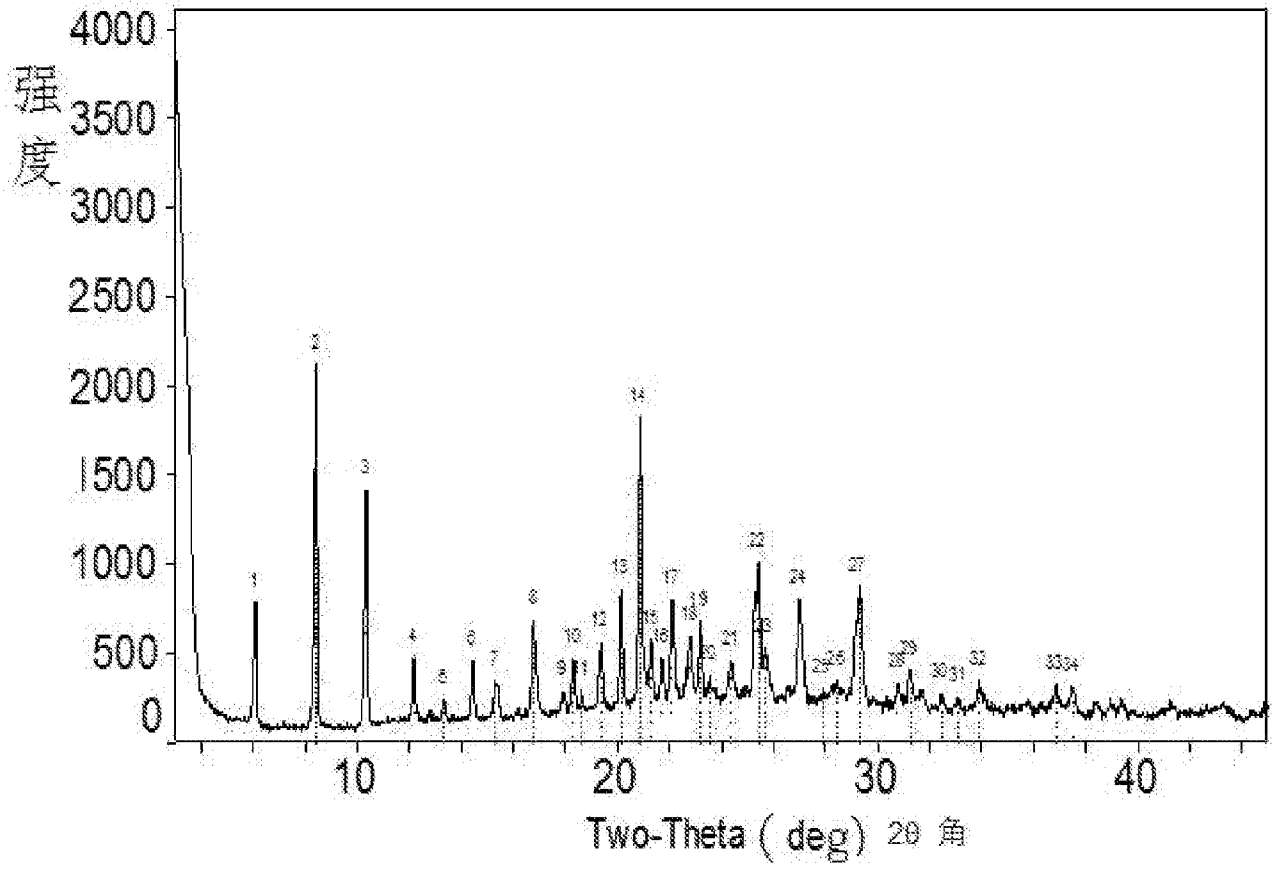
8、如权利要求 1 所述苯甲酸类化合物，其特征在于，选如下化合物：



9、如权利要求 8 所述苯甲酸类化合物，其特征在于，化合物 17 晶体为晶型 A，使用 Cu-K α 辐射， $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$ ，所述晶型 A 的 X 射线粉末衍射在衍射角 2θ

为 6.10, 8.43, 10.36, 12.18, 13.34, 14.46, 15.30, 16.77, 17.93, 18.31, 18.60, 19.36, 20.16, 20.88, 21.30, 21.70, 22.10, 22.81, 23.18, 23.57, 24.37。6.88 处有特征峰，其中 2θ 值误差范围为 ± 0.2 。

10、如权利要求 1-9 其中之一所述苯甲酸类化合物的应用，其特征在于，作为活性成分将其用于制备治疗或缓解脑缺血疾病、急慢性心肌缺血疾病或渐冻症或肌萎缩性脊髓侧索硬化症药物中。



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/078059**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07D 307/88(2006.01)i; C07C 65/01(2006.01)i; C07C 51/41(2006.01)i; A61K 31/365(2006.01)i; A61K 31/192(2006.01)i; A61K 9/20(2006.01)i; A61K 9/48(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 25/08(2006.01)i

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)

C07D C07C

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)

CNKI, CNABS, CNTXT, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAPLUS, MARPAT, butylphthalide, 正丁基苯酞, 脑缺血, 心肌缺血, 渐冻症, 肌萎缩, Cerebral ischemia, Myocardial ischemia, Gradual freezing, Muscular atrophy, search according to structural formulas I and II

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101029037 A (ZHENGZHOU UNIVERSITY) 05 September 2007 (2007-09-05) compound of formula I, embodiment 5, and claim 5	1-6, 10
A	CN 1594270 A (TEAM ACADEMY OF PHARMACEUTICAL SCIENCE) 16 March 2005 (2005-03-16) claim 1	1-10
A	CN 101402565 A (ZHENGZHOU UNIVERSITY) 08 April 2009 (2009-04-08) entire document	1-10
A	CN 101054346 A (WEN, JIANBO) 17 October 2007 (2007-10-17) entire document	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 June 2019

Date of mailing of the international search report

21 June 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

**State Intellectual Property Office of the P. R. China
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
 100088
 China**

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/078059

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101029037	A	05 September 2007	CN	100554259	C	28 October 2009
CN	1594270	A	16 March 2005	WO	2005123651	A8	13 April 2006
				CN	100540523	C	16 September 2009
				WO	2005123651	A1	29 December 2005
CN	101402565	A	08 April 2009	CN	101402565	B	04 July 2012
CN	101054346	A	17 October 2007	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/078059

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07D 307/88(2006.01)i; C07C 65/01(2006.01)i; C07C 51/41(2006.01)i; A61K 31/365(2006.01)i; A61K 31/192(2006.01)i; A61K 9/20(2006.01)i; A61K 9/48(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 25/08(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(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>C07D C07C</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>CNKI, CNABS, CNTXT, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAPLUS, MARPAT, butylphthalide, 正丁基苯酐, 脑缺血, 心肌缺血, 渐冻症, 肌萎缩, Cerebral ischemia, Myocardial ischemia, Gradual freezing, Muscular atrophy, 根据式I, II进行的结构式检索。</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 101029037 A (郑州大学) 2007年 9月 5日 (2007 - 09 - 05) 式I化合物, 实施例7, 权利要求5</td> <td>1-6, 10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1594270 A (北京天衡药物研究院) 2005年 3月 16日 (2005 - 03 - 16) 权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101402565 A (郑州大学) 2009年 4月 8日 (2009 - 04 - 08) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101054346 A (温建波) 2007年 10月 17日 (2007 - 10 - 17) 全文</td> <td>1-10</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	X	CN 101029037 A (郑州大学) 2007年 9月 5日 (2007 - 09 - 05) 式I化合物, 实施例7, 权利要求5	1-6, 10	A	CN 1594270 A (北京天衡药物研究院) 2005年 3月 16日 (2005 - 03 - 16) 权利要求1	1-10	A	CN 101402565 A (郑州大学) 2009年 4月 8日 (2009 - 04 - 08) 全文	1-10	A	CN 101054346 A (温建波) 2007年 10月 17日 (2007 - 10 - 17) 全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 101029037 A (郑州大学) 2007年 9月 5日 (2007 - 09 - 05) 式I化合物, 实施例7, 权利要求5	1-6, 10															
A	CN 1594270 A (北京天衡药物研究院) 2005年 3月 16日 (2005 - 03 - 16) 权利要求1	1-10															
A	CN 101402565 A (郑州大学) 2009年 4月 8日 (2009 - 04 - 08) 全文	1-10															
A	CN 101054346 A (温建波) 2007年 10月 17日 (2007 - 10 - 17) 全文	1-10															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" 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</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</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(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</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>“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>“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>“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>“&” 同族专利的文件</p>																	
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																
2019年 6月 12日	2019年 6月 21日																
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	解佳桦																
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62089649																

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/078059

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101029037	A	2007年 9月 5日	CN	100554259	C	2009年 10月 28日
CN	1594270	A	2005年 3月 16日	WO	2005123651	A8	2006年 4月 13日
				CN	100540523	C	2009年 9月 16日
				WO	2005123651	A1	2005年 12月 29日
CN	101402565	A	2009年 4月 8日	CN	101402565	B	2012年 7月 4日
CN	101054346	A	2007年 10月 17日	无			