

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-515592
(P2018-515592A)

(43) 公表日 平成30年6月14日(2018.6.14)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------------|---------------|-------------|
| C07H 3/06 (2006.01) | C07H 3/06 CSP | 4C057 |
| C08B 37/00 (2006.01) | C08B 37/00 | 4C086 |
| A61P 9/00 (2006.01) | A61P 9/00 | 4C090 |
| A61P 9/10 (2006.01) | A61P 9/10 | |
| A61K 31/7028 (2006.01) | A61K 31/7028 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-561949 (P2017-561949)
 (86) (22) 出願日 平成28年5月20日 (2016.5.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年1月19日 (2018.1.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2016/082928
 (87) 国際公開番号 WO2016/188381
 (87) 国際公開日 平成28年12月1日 (2016.12.1)
 (31) 優先権主張番号 201510267009.3
 (32) 優先日 平成27年5月22日 (2015.5.22)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 517409790
 シャンハイ グリーン バレー ファーマ
 シューティカル カンパニー リミテッド
 中華人民共和国 201203 シャンハ
 イ プードン ニュー エリア チャン
 ジャン ハイテク パーク ニュード
 ウン ロード 421
 (74) 代理人 110000578
 名古屋国際特許業務法人
 (72) 発明者 チャン チェンチン
 中華人民共和国 215123 ジャンス
 ー スーチョウ インダストリアル パー
 ク スーチョウ ガオフア ロード ナン
 バー55 チュンバン ファーユエン 8
 7-701

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酸化型β-1, 4-グルクロン酸オリゴマーおよびその製造方法と使用

(57) 【要約】

本発明は、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーおよびその製造方法と使用に関し、医薬化合物の技術分野に属する。本発明は、自然界に豊富に存在するセルロースを原料とし、臭化ナトリウム (NaBr) 2,2,6,6-テトラメチルピペリジンオキシド (TEMPO) -次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の酸化系で作用させ、-1,4-グルコースポリマーであるセルロースが有する6位のヒドロキシ基をカルボキシ基に酸化してグルクロン酸を形成させると同時に、反応条件を制御することによって末端が開環した酸化型グルクロン酸オリゴマーを製造するが、このような化合物は顕著な抗脳虚血活性を有し、潜在の抗脳虚血薬になる可能性がある。

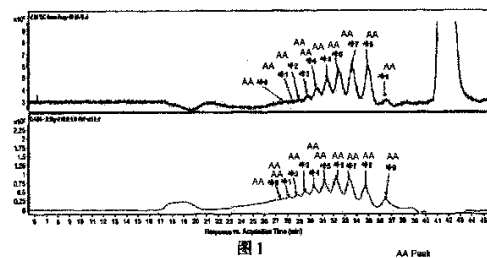


図1

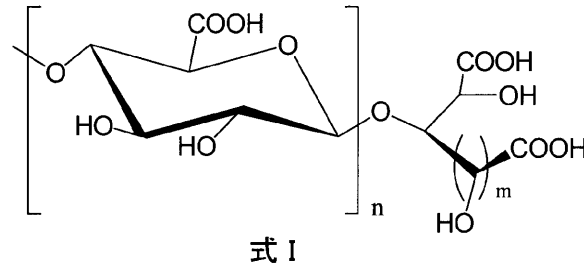
AA Peak

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重合度が1~20糖で、一般式Iの構造を有することを特徴とする酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマー。

【化 1】



10

(ただし、nは0~19から、mは0、1または2から選ばれる。)

【請求項 2】

mは0である、請求項1に記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマー。

【請求項 3】

mは1である、請求項1に記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマー。

【請求項 4】

mは2である、請求項2に記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマー。

20

【請求項 5】

nは0~10である、請求項1に記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマー。

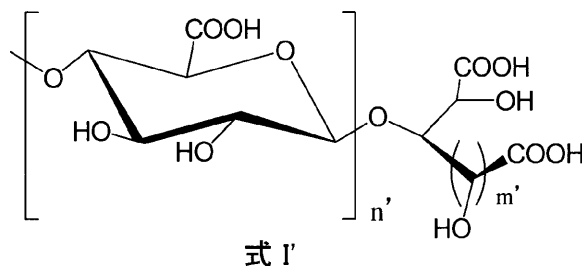
【請求項 6】

nは0、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10で、それぞれ酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの1糖、2糖、3糖、4糖、5糖、6糖、7糖、8糖、9糖、10糖または11糖に該当する、請求項1に記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマー。

【請求項 7】

一般式I'の構造を有する、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの混合物。

【化 2】



30

(ただし、n'およびm'はそれぞれ混合物における各グルクロン酸オリゴマーのnおよびmの平均値で、n'は0~19.0から、m'は0~2.0から選ばれる。)

【請求項 8】

n'は0~10.0から、m'は0.5~1.8から選ばれる請求項8に記載の混合物。

40

【請求項 9】

n'は0~10.0から、m'は0.8~1.5から選ばれる請求項8に記載の混合物。

【請求項 10】

nが0~10の成分は重量で計算すると混合物の80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上を占める請求項8または9に記載の混合物。

【請求項 11】

請求項1に記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの製造方法であって、

(1) 微晶質セルロース粉末を量って、マーセル化処理によってマーセル化された微晶質セルロース溶液を得、濃度が10-20 mg/mlである工程と、

50

(2) 工程(1)で得られたマーセル化された微晶質セルロース溶液に順に2,2,6,6-テトラメチルピペリジンオキシドおよび臭化ナトリウムを入れ、さらに塩基性pH調整剤でpHを10~11に調整した後、次亜塩素酸ナトリウム溶液を入れて40~80 の条件で5~10時間反応させ、最後に有機溶媒を入れて反応を終止させる工程と、

(3) 500Daの透析バッグにおいて透析し、濃縮し、冷凍乾燥して前記酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを得る工程と、

を含む方法。

【請求項12】

前記工程(2)において、微晶質セルロース粉末と2,2,6,6-テトラメチルピペリジンオキシドの質量比は1000:(5~50)であることを特徴とする請求項11に記載の製造方法。

10

【請求項13】

前記工程(2)において、臭化ナトリウムと2,2,6,6-テトラメチルピペリジンオキシドの質量比は10:1以上であることを特徴とする請求項11に記載の製造方法。

【請求項14】

前記工程(2)において、微晶質セルロース粉末と次亜塩素酸ナトリウム溶液の質量体積比は1g:(5~15)mlであることを特徴とする請求項11に記載の製造方法。

【請求項15】

前記工程(2)における有機溶媒は無水エタノールまたはメタノールであることを特徴とする請求項11に記載の製造方法。

【請求項16】

前記工程(2)における塩基性pH調整剤は5~50%のNaOH溶液であることを特徴とする請求項11に記載の製造方法。

20

【請求項17】

抗脳虚血薬の製造における請求項1~6のいずれかに記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーまたは請求項7~10のいずれかに記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの混合物の使用。

【請求項18】

前記抗脳虚血薬は、卒中、心筋梗塞、脳ショック、新生児窒息や脳外傷により生じるニューロンの虚血性損傷の治療または予防に使用される請求項17に記載の使用。

【請求項19】

脳神経保護薬の製造における請求項1~7のいずれかに記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーまたは請求項8~10のいずれかに記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの混合物の使用。

30

【請求項20】

請求項1~6のいずれかに記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーまたは請求項7~10のいずれかに記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの混合物と、薬学的に許容される賦形剤または担体とを含む薬物組成物。

【請求項21】

被験者のニューロンの虚血性損傷を治療または予防する方法であって、必要な被験者に有効量の請求項1~6のいずれかに記載の一般式Iの酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーまたは請求項7~10のいずれかに記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの混合物を投与することを含む方法。

40

【請求項22】

ニューロンの虚血性損傷を治療または予防する薬剤としての請求項1~7のいずれかに記載の一般式Iの酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーまたは請求項8~10のいずれかに記載の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの混合物。

【請求項23】

前記ニューロンの虚血性損傷は、卒中、心筋梗塞、脳ショック、新生児窒息や脳外傷によるものである請求項21に記載の方法または請求項22に記載の一般式Iの酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーまたは前記混合物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬化合物の技術分野に属し、具体的に、酸化型 α -1,4-グルクロン酸オリゴマーおよびその製造方法と使用に関する。

【背景技術】

【0002】

セルロースは、重合度が3000~5000で、 α -1,4グリコシド結合によって結合する直鎖のグルカンで、分子構造が直線状で、一定の強度および剛性を有し、希酸または塩基によって加水分解されにくく、植物の細胞壁の主要構成成分である。ヒトおよび肉食系動物の体内に含まれる β -グルコシダーゼが少ないため、セルロースを消化して利用することができない。微晶質セルロース(MCC)は精製された、部分的に分解したセルロースで、主要成分は α -1,4-グリコシド結合によって結合する直鎖の多糖類物質で、白色で、無臭・無味で、多孔微粒子からなる結晶粉末で、セルロースの使用効率を向上させ、低い重合度および大きい比表面積などの特殊な性質を有するため、製薬、化粧品、食品、軽化学工業などの産業で幅広く応用されている。

10

【0003】

グルクロン酸は、よく見られる糖類分子で、体内でグリコサミノグリカンのグリコシル基を構成する一部として、たとえばヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸などがあり、小分子配糖体のグリコシル基部分にも現れるが、自然界にはグルクロン酸のポリマーまたはオリゴマーが存在しない。

20

【0004】

近年、生活レベルの向上および人口構造の日々の老齢化に伴い、脳血管疾患の発症率および死亡率が上昇する傾向にあり、すでに死亡の要因の一つになっている。中でも、虚血性脳血管疾患は虚血性の種類における大半を占めている。現在、脳虚血疾患を好適に治療する薬物の種類は漢方薬組成物、漢方薬などがあるが、臨床治療効果はまだ検証が必要であるため、新規な抗脳虚血疾患薬の研究は重要な意義を有する。

【発明の概要】

【0005】

上記既存技術に存在する欠陥に鑑み、本発明は酸化型 α -1,4-グルクロン酸オリゴマーおよびその製造方法と使用を提供する。本発明において、自然界に豊富に存在するセルロースを利用し、臭化ナトリウム(NaBr)-2,2,6,6-テトラメチルピペリジンオキシド(TEMPO)-次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)の酸化系で作用させ、ヒドロキシ基を酸化してグルクロン酸を形成させると同時に、反応条件を制御することによって末端が開環した酸化型グルクロン酸オリゴマーを製造する。発明者は、すでに、当該化合物は1 μ Mの濃度で顕著に酸素-グルコース欠乏海馬細胞の増殖率を向上させ、かつ顕著な投与量依存性があり、このような化合物は顕著な抗脳虚血活性を有し、潜在的抗脳虚血薬になる可能性があることを証明した。

30

【0006】

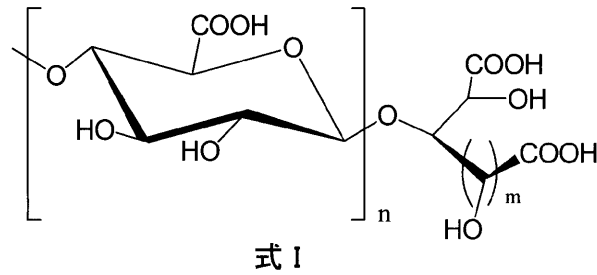
本発明の目的は、以下の技術方案によって実現される。

40

本発明の一つの側面では、重合度が1~20糖で、一般式Iの構造を有する、酸化型 α -1,4-グルクロン酸オリゴマーを提供する。

【0007】

【化1】



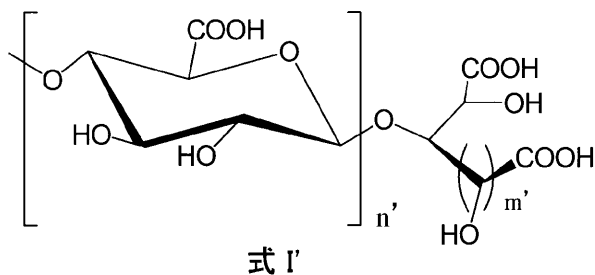
(ただし、 $n = 0 \sim 19$ 、 $m = 0, 1$ または 2 である。)

10

本発明のもう一つの側面では、上記の酸化型 $-1,4$ -グルクロン酸オリゴマーの混合物であって、一般式 I' の構造を有する酸化型 $-1,4$ -グルクロン酸オリゴマーからなるものを提供する。

【0008】

【化2】



20

(ただし、 n' および m' はそれぞれ混合物における各グルクロン酸オリゴマーの n および m の平均値で、 n' は $0 \sim 19.0$ から、 m' は $0 \sim 2.0$ から選ばれる。) n' および m' は整数でもよく、非整数でもよく、混合物における各グルクロン酸オリゴマーの n および m のモル量に基づいた算術平均値である。)

本発明のさらにもう一つの側面では、上記の酸化型 $-1,4$ -グルクロン酸オリゴマーまたはその混合物の製造方法であって、

(1) 微晶質セルロース (MCC) 粉末を量って、マーセル化処理によってマーセル化された MCC 溶液を得、濃度が $10 \sim 20$ mg/ml である工程と、

30

(2) 工程 (1) で得られたマーセル化された MCC 溶液に順に $2,2,6,6$ -テトラメチルピペリジンオキシド (TEMPO) および臭化ナトリウムを入れ、さらに塩基性 pH 調整剤で pH を $10 \sim 11$ に調整した後、次亜塩素酸ナトリウム溶液を入れて $40 \sim 80$ の条件で $5 \sim 10$ 時間反応させ、最後に有機溶媒を入れて反応を終止させる工程と、

(3) 500 Da の透析バッグにおいて透析し、濃縮し、冷凍乾燥することによって、酸化型 $-1,4$ -グルクロン酸オリゴマーの混合物を得るか、あるいは任意にクロマトグラフィーによって分離して単独の前記酸化型 $-1,4$ -グルクロン酸オリゴマーを得る工程と、を含む方法に関する。

40

【0009】

また、本発明は、本発明の一般式 I の酸化型 $-1,4$ -グルクロン酸オリゴマーまたはその混合物と、薬学的に許容される賦形剤または担体とを含む組成物に関する。

また、本発明のもう一つの側面では、抗脳虚血薬または脳神経保護薬の製造における本発明の酸化型 $-1,4$ -グルクロン酸オリゴマーまたはその混合物の使用を提供する。これらは、卒中、心筋梗塞、脳ショック、新生児窒息や脳外傷によるニューロンの虚血性損傷の治療または予防に使用することができる。

【0010】

また、本発明のもう一つの側面では、被験者のニューロンの虚血性損傷を治療または予防する方法あるいは被験者の脳神経を保護する方法であって、必要な被験者に有効量の前記の一般式 I の酸化型 $-1,4$ -グルクロン酸オリゴマーまたはその混合物を投与することを

50

含む方法を提供する。

【0011】

また、本発明は、ニューロンの虚血性損傷を治療または予防する薬剤あるいは脳神経を保護する薬剤としての一般式Iの酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーまたはその混合物を提供する。

【0012】

上記方案において、前記ニューロンの虚血性損傷は、卒中、心筋梗塞、脳ショック、新生児窒息や脳外傷によるものである。

本発明の突出した効果は、自然界で豊富に存在するセルロースを原料として酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを製造することができる、製造方法が簡単、条件が温和、コストが低い、産業化しやすいといったことを含む。同時に、このような化合物は、顕著な抗脳虚血活性を有し、1 μ Mで顕著に酸素-グルコース欠乏海馬細胞の増殖率を向上させ、かつ顕著な投与量依拠性があり、抗脳虚血、たとえば卒中、心筋梗塞、脳ショック、新生児窒息や脳外傷によるニューロンの虚血性損傷の潜在薬物になる可能性がある。

【0013】

以下、本発明の技術方案がより理解・把握しやすいように、実施例や図面を参照し、本発明の具体的な実施形態をさらに詳しく説明する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、実施例5における酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーのトータルイオンクロマトグラム (TIC) および210 nmにおける紫外線スペクトルである。

【図2】図2は、実施例5におけるピーク0の一段階の質量分析グラフ、すなわち、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの11および10糖の質量分析グラフである。

【図3】図3は、実施例5におけるピーク1の一段階の質量分析グラフ、すなわち、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの9糖の質量分析グラフである。

【図4】図4は、実施例5におけるピーク2の一段階の質量分析グラフ、すなわち、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの8糖の質量分析グラフである。

【図5】図5は、実施例5におけるピーク3の一段階の質量分析グラフ、すなわち、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの7糖の質量分析グラフである。

【図6】図6は、実施例5におけるピーク4の一段階の質量分析グラフ、すなわち、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの6糖の質量分析グラフである。

【図7】図7は、実施例5におけるピーク5の一段階の質量分析グラフ、すなわち、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの5糖の質量分析グラフである。

【図8】図8は、実施例5におけるピーク6の一段階の質量分析グラフ、すなわち、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの4糖の質量分析グラフである。

【図9】図9は、実施例5におけるピーク7の一段階の質量分析グラフ、すなわち、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの3糖の質量分析グラフである。

【図10】図10は、実施例5におけるピーク8の一段階の質量分析グラフ、すなわち、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの2糖の質量分析グラフである。

【図11】図11は、実施例5におけるピーク8の一段階の質量分析グラフ、すなわち、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの1糖の質量分析グラフである。

【図12】図12は、実施例5における酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの12糖~20糖 (すなわちdp12~dp20) の質量分析グラフである。

【図13】図13は、実施例6における酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの核磁気共鳴水素スペクトルである。

【図14】図14は、実施例6における酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの核磁気共鳴炭素スペクトルである。

【図15】図15は、実施例7における酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの正常マウスの海馬細胞に対する作用である。

【図16】図16は、実施例7における酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの酸素-グル

10

20

30

40

50

コース欠乏マウスの海馬細胞に対する作用である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

具体的な実施形態

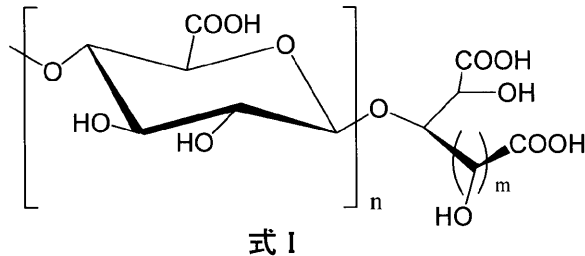
以下、本発明の方法を具体的に実施例により説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0016】

本発明の第一の側面は、重合度が1~20糖で、一般式Iの構造を有することを特徴とする酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーに関する。

【0017】

【化3】



(ただし、nは0~19から、mは0、1または2から選ばれる。)

ここで、m=0の場合、末端のグルコース分子は酸化によって2つの-CH(OH)-単位が脱去されたことを、m=1の場合、末端のグルコース分子は酸化によって1つの-CH(OH)-単位が脱去されたことを、m=2の場合、末端のグルコース分子は-CH(OH)-が脱去されず、ヒドロキシ基の酸化だけが生じたことを表す。一つの酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマー、すなわち、nがある数値の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーにおいて、mが0、1および2の産物は混在してもよく、単独で存在してもよい。異なるm値の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーは類似の生物活性を有する。

【0018】

本発明の一つの好適な実施形態において、nが1~9、すなわち、2糖~10糖の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーは、いずれも本発明にて分離されて特徴付けられる。より具体的に、式Iの酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーにおいて、nが20の場合、酸化1糖に、nが1の場合、酸化2糖に、nが2の場合、酸化3糖に、nが3の場合、酸化4糖に、nが4の場合、酸化5糖に、nが5の場合、酸化6糖に、nが6の場合、酸化7糖に、nが7の場合、酸化8糖に、nが8の場合、酸化9糖に、nが9の場合、酸化10糖に、nが10の場合、酸化11糖に該当する。これらの酸化した糖オリゴマーは、一種または複数種の混合物の様態で使用することができる。

【0019】

本発明の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの特徴は、末端が開環した異なる炭素原子数のグルクロン酸オリゴマーの構造を有することにある。一つの実施形態において、末端が開環した異なる炭素原子数のグルクロン酸オリゴマーは混合物の様態で存在してもよく、異なる重合度のグルクロン酸オリゴマーも混合物の様態で存在してもよい。

【0020】

本発明のもう一つの側面では、以下の一般式I'の構造を有する、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーに関する。

【0021】

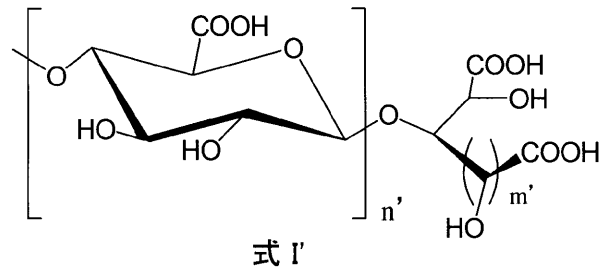
10

20

30

40

【化4】



(ただし、 m' および n' はそれぞれ混合物における各グルクロン酸オリゴマーの n および m の平均値で、 n' は0~19.0から、 m' は0~2.0から選ばれる。)好ましくは、 n' は0~10.0から、 m' は0.5~1.8から選ばれ、より好ましくは、 n' は0~10.0から、 m' は0.8~1.5から選ばれる。

【0022】

もう一つの好適な実施形態において、本発明の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの混合物に、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の末端が開環した -1,4-グルクロン酸の1~11個の重合体 (n が0~10のものに該当する)が含まれ、ここで、 m' は0.8~1.5である。

【0023】

本発明の酸化方法は、セルロースのマーセル化、セルロース溶液の酸化、および酸化産物の後処理による酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの形成といった工程を含む。

1. セルロースのマーセル化

本発明の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを製造するために、原料である微晶質セルロースをマーセル化させ、溶液とし、溶液の濃度は約10~20 mg/mLである。出願者は、溶液の濃度が高すぎると、酸化過程が完成しにくく、溶液の濃度が低すぎると、酸化産物が不均一になりやすいことを見出した。

【0024】

2. セルロース溶液の酸化

本発明は、臭化ナトリウム(NaBr)-2,2,6,6-テトラメチルピペリジンオキシド(TEMPO)-次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)の酸化系を使用する。反応条件の調整によって、当該酸化系の酸化性は特に本発明の -1,4-グルクロン酸オリゴマーを得るに適する。通常の酸化剤と比べ、本発明の酸化系は酸化反応をより完全にさせ、末端が開環した反応産物を得ることができるが、反応系の均一性を損なわない。また、モル量で換算する酸化系における各物質の比率は、たとえばTEMPO:NaBr=1:5~1:50で、セルロースにおけるグルコース単位:活性NaClO=1:0.5~1:5で、TEMPO:セルロースにおけるグルコース単位=1:1~1:5でもよい。本発明の一つの実施形態において、次亜塩素酸ナトリウム溶液における次亜塩素酸ナトリウムの重量百分率は1~20%、好ましくは2~15%、より好ましくは3~12%である。

【0025】

酸化反応は塩基性条件で行われ、研究では、最適なpH値の範囲は10~11で、反応系のpH値が高すぎると、酸化効率が低下するが、pH値が低すぎると、酸化の発生に不利である。反応のpH値は塩基性化合物によって制御され、最適な塩基性化合物はNaOH溶液である。NaOHの溶液は特に限定されない。

【0026】

本発明の酸化反応に適する酸化温度は40~80、好ましくは50~70、より好ましくは52~68であるが、この温度の範囲内で酸化を行うのは、残った不要な酵素を除去し、同時に末端が開環したグルクロン酸を得ることに有利である。どのような理論にも関わらず、発明者は、反応温度が40未満であることは、末端が開環した酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを得ることに不利であることを見出した。反応温度が高すぎると、原料の生物活性を損ない、反応産物の利用に不利である。

10

20

30

40

50

【0027】

有機溶媒を入れて反応を終止させた後、酸化して得られた産物溶液を精製し、酸化型-1,4-グルクロン酸オリゴマーを得る。好適な精製手段として、透析法で得られたグルクロン酸オリゴマーを精製し、特に、使用された材料を透析して分子量が500Daの物質を残すことによって、本発明のオリゴ糖を精製することができる。精製は、ほかの本分野で既知の手段を使用してもよいが、透析で得られるグルクロン酸オリゴマーの純度が99%超、より好ましくは99.5%以上になるようにできればよい。

【0028】

また、本発明は、酸化型-1,4-グルクロン酸オリゴマーまたはその混合物を活性化化合物成分として抗脳虚血薬の製造における使用に関する。

脳血管疾患は、我が国で高齢者の死亡につながる一番の病因で、世界衛生戦略の研究の重点の一つでもある。脳血管疾患では、虚血性疾患の発症率が一位を占め、通常、軽度の虚血/酸欠の場合、脳の代償機序は中枢神経系を損傷から保護するが、虚血の程度が重くなると、不可逆的な神経損傷が生じ、一連の臨床症状につながり、死亡に至る。臨床では、脳血管意外（たとえば卒中）、心筋梗塞、脳ショック、新生児窒息や脳外傷はいずれもニューロンの虚血性損傷を引き起こす可能性がある。そのため、脳虚血症状を緩和し、脳細胞の生存率を向上させる天然由来の物質の開発は有意義である。

【0029】

本発明で使用される脳虚血症状を測定する細胞モデルは、HT-22細胞から酸素-グルコース欠乏の条件で生じた細胞（OGDモデル）である。HT-22細胞は、マウスの海馬ニューロンの細胞系で、マウスT4細胞系の一つのサブクローンで、海馬ニューロンの特性を有する。関連の内容は、たとえばJeney Ramirez-Sanchezら、*Neurochemistry International* 90 (2015) 215-223, “Neuroprotection by JM-20 against oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices: Involvement of the Akt/GSK-3 pathway”; Xiao-Jing Liら、*Journal of Ethnopharmacology* 141 (2012) 927- 933, Neuroprotective effects of TongLuoJiuNao in neurons exposed to oxygen and glucose deprivation; TIAN-ZHI ZHAOら、*Neuroscience* 328 (2016) 117-126, “GPER1 Mediates Estrogen-Induced Neuroprotection Against Oxygen-Glucose Deprivation In The Primary Hippocampal Neurons”などを参照する。

【0030】

本発明の発明者は、一般式Iの酸化型-1,4-グルクロン酸オリゴマーまたはその混合物は、脳虚血症状を改善し、虚血・酸欠の脳細胞の生存率を増やすことができることを見出した。また、本発明の酸化型-1,4-グルクロン酸オリゴマーは天然産物由来のもので、吸収と利用が容易である。

【0031】

本発明は、上記のような酸化型-1,4-グルクロン酸オリゴマーと、任意に選ばれる薬学的に許容される賦形剤とを含む組み合わせ薬物を提供する。

様々な比率で活性成分を含有する色々な組み合わせ薬物を製造する方法は既知であるが、本発明の公開内容によって当業者に当然である。たとえばRemington's Pharmaceutical Sciences, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995)に記載の通りである。前記薬物組成物を製造する方法は、適切な薬学的賦形剤、担体、希釈剤などを配合することを含む。

【0032】

既知の方法で本発明の薬物製剤を製造するが、通常の混合、溶解または冷凍乾燥の方法を含む。

本発明の薬物組成物は、患者に選ばれた施用様態に適する様々な経路、たとえば経口または胃腸外（静脈内、筋肉内、局部または皮下の経路）によって施用される。

【0033】

そのため、本発明の組み合わせ薬物は薬学的に許容される担体（たとえば不活性希釈剤または食用可能な担体）と合わせて全身に、たとえば経口投与によって施用することがで

10

20

30

40

50

きる。これらは硬殻または軟殻のゼラチンカプセルに封じ、錠剤にプレスすることができる。経口投与による治療の施用に対し、本発明の活性化合物は、一種または複数の賦形剤と合わせ、呑めるような錠剤、トローチ錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ、丸剤などの形態で使用することができる。このような組成物および製剤は少なくとも0.1%の活性化合物を含む。もちろん、このような組成物および製剤の比率は変わるが、所定の単位剤形重量の約1%～約99%を占めてもよい。このような治療に有用な組成物において、活性化合物の量は、有効投与量のレベルが得られるようなものである。

【0034】

錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤などは、たとえばトラガカント、アラビアゴム、コーンスターチやゼラチンのようなバインダー、たとえばリン酸水素二カルシウムのような賦形剤、たとえばコーンスターチ、馬鈴薯デンプン、アルギン酸のような崩壊剤、たとえばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、そしてショ糖、ペクチン、乳糖やアスパルテームのような甘味料、またはたとえばペパーミント、冬緑油やチェリーフレーバーのような矯味剤を含んでもよい。単位剤形がカプセルの場合、以上の種類の材料以外、さらに液体担体、たとえば植物油やポリエチレングリコールを含んでもよい。様々なほかの材料も存在してもよく、コーティングとして、またはほかの様態で固体の単位剤形の物理的形態を変えてもよい。たとえば、錠剤、丸剤またはカプセル剤はゼラチン、ロウ、ラックや糖などでコーティングしてもよい。シロップまたはエリキシル剤は、活性化合物を、甘味料としてショ糖またはペクチンを、防腐剤としてp-ヒドロキシ安息香酸メチルまたはp-ヒドロキシ安息香酸プロピルを、染料および矯味剤（たとえばチェリーフレーバーやオレンジフレーバー）を含んでもよい。もちろん、いずれの単位剤形の製造に用いられるいずれの材料も薬学的に許容されるもので、かつ使用量は無毒の量である。また、活性化合物は、徐放製剤や徐放装置に配合してもよい。

10

20

【0035】

活性化合物は、注入または注射によって静脈内または腹腔内に施用してもよい。活性化合物またはその塩の水溶液を調製し、任意に無毒な界面活性剤を配合してもよい。グリセリン、液体ポリエチレングリコール、グリセリン三酢酸エステルおよびその混合物ならびに油における分散剤を調製してもよい。通常貯蔵・使用の条件で、微生物の生長を防止するために、これらの製剤は防腐剤を含む。

30

【0036】

注射または注入に適する薬物剤形は、無菌の注射または注入が可能な溶液または分散剤の即座製剤に適する活性成分（任意にリボソームに封じられる）を含有する無菌水溶液または分散剤または無菌粉末を含む。すべての場合、最終の剤形は生産および保存の条件で無菌で、液体で、かつ安定したものでなければならない。液体担体は、溶媒または液体分散媒体でもよいが、たとえば水、エタノール、多価アルコール（たとえば、グリセリン、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、無毒なグリセリンエステルおよびこれらの適切な混合物を含む。たとえば、リボソームの形成、分散剤の場合所要の粒子の大きさを維持すること、または界面活性剤の使用によって、適切な流動性を維持することができる。様々な抗細菌剤や抗真菌剤（たとえばp-ヒドロキシ安息香酸エステル、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど）によって微生物を予防する作用を果たすことができる。多くの場合、たとえば糖、緩衝剤や塩化ナトリウムのような等張化剤を含むことが好ましい。吸収遅延剤を使用した組成物（たとえば、モノステアリン酸アルミニウムやゼラチン）によって注射が可能な組成物の吸収を遅延させることができる。

40

【0037】

適切な溶媒における所要量の活性化合物を必要な以上で挙げられた様々なほかの成分と配合した後、ろ過滅菌を行い、注射が可能な無菌溶液を調製する。無菌注射溶液の無菌粉末の製造に使用される場合、好適な製造方法は真空乾燥および冷凍乾燥の技術で、活性成分および任意のほかに必要な前の無菌ろ過溶液に存在した成分の粉末が得られる。

50

【0038】

有用な固体担体は、粉碎された固体（たとえばタルク、クレー、微晶質セルロース、シリカ、酸化アルミニウムなど）を含む。有用な液体担体は、水、エタノールまたはエチレングリコールまたは水-エタノール/エチレングリコール混合物を含み、本発明の組み合わせ薬物は任意に無毒な界面活性剤によって有効な含有量でそれに溶解または分散させることができる。補助剤（たとえばフレーバー）およびほかの抗微生物剤を入れることによって所定の使用に適する性質を最適化することができる。

【0039】

増ちょう剤（たとえば合成された重合体、脂肪酸、脂肪酸塩およびエステル、脂肪族アルコール、変性セルロースまたは変性無機材料）は液体担体とコーティングが可能なペースト剤、ゲル、軟膏、石鹸などの形成に使用し、直接使用者の皮膚に使用することもできる。

10

【0040】

化合物またはその混合物の治療に必要な量は、化合物自身だけでなく、投与形態、治療すべき疾患の本質および患者の年齢と状態にもよるが、最終的に現場の医師または臨床医師の決定によって決まる。

【0041】

上記製剤は単位剤形で存在してもよく、当該単位剤形は単位製剤量を含む物理的分散単位で、ヒトおよびほかの哺乳動物への投与に適する。単位剤形はカプセルまたは錠剤でもよく、多くのカプセルまたは錠剤でもよい。関連の具体的な治療によって、活性成分の単位製剤量は約0.1～約1000 mgまたはそれ以上の間で変化または調整することができる。

20

【0042】

下記実施例に記載の実験方法は、特に説明しない限り、いずれも通常の方法で、前記試薬および材料は、特に説明しない限り、いずれも市販品として入手できるものである。

実施例1 酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの製造方法

(1) 1 gのMCC粉末を量って、50 mlの10% NaOH溶液でマーセル化処理を行い、マーセル化されたMCC溶液を得た。

【0043】

(2) 工程(1)で得られたマーセル化されたMCC溶液に順に5 mgのTEMPOおよび50 mgの臭化ナトリウムを入れ、10%のNaOH溶液でpHを10に調整し、活性次亜塩素酸ナトリウムに換算した濃度が5重量%になるように5mlの次亜塩素酸ナトリウム溶液を入れ、55 の条件で5時間反応させ、無水エタノールを入れて反応を終止させた。

30

【0044】

(3) 500Daの透析バッグにおいて透析し、濃縮し、冷凍乾燥して酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを得た。

実施例2 酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの製造方法

(1) 1 gのMCC粉末を量って、50 mlの10% NaOH溶液でマーセル化反応を行い、マーセル化されたMCC溶液を得た。

【0045】

(2) 工程(1)で得られたマーセル化されたMCC溶液に順に20 mgのTEMPOおよび250 mgの臭化ナトリウムを入れ、10%のNaOH溶液でpHを10に調整し、活性次亜塩素酸ナトリウムに換算した濃度が5重量%になるように10mlの次亜塩素酸ナトリウム溶液を入れ、40 の条件で8時間反応させ、無水エタノールを入れて反応を終止させた。

40

【0046】

(3) 500Daの透析バッグにおいて透析し、濃縮し、冷凍乾燥して酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを得た。

実施例3 酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの製造方法

(1) 1 gのMCC粉末を量って、100mlの10% NaOH溶液でマーセル化反応を行い、マーセル化されたMCC溶液を得た。

50

【 0 0 4 7 】

(2) 工程(1)で得られたマーセル化されたMCC溶液に順に50 mgのTEMPOおよび500 mgの臭化ナトリウムを入れ、30%のNaOH溶液でpHを11に調整し、活性次亜塩素酸ナトリウムに換算した濃度が5重量%になるように15 mlの次亜塩素酸ナトリウム溶液を入れ、70 の条件で3時間反応させ、メタノールを入れて反応を終止させた。

【 0 0 4 8 】

(3) 500Daの透析バッグにおいて透析し、濃縮し、冷凍乾燥して酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを得た。

実施例4 酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの製造方法

(1) 1 gのMCC粉末を量って、100mlの10%NaOH溶液でマーセル化反応を行い、マーセル化されたMCC溶液を得た。

【 0 0 4 9 】

(2) 工程(1)で得られたマーセル化されたMCC溶液に順に50 mgのTEMPOおよび600 mgの臭化ナトリウムを入れ、50%のNaOH溶液でpHを11に調整し、15 mlの次亜塩素酸ナトリウム溶液を入れ、60 の条件で8時間反応させ、メタノールを入れて反応を終止させた。

【 0 0 5 0 】

(3) 500Daの透析バッグにおいて透析し、濃縮し、冷凍乾燥して酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを得た。

実施例5 酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの質量分析

5.1 方法

実施例1で得られた2 mgの酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを量って1 mlの純水で溶解させた後、0.22 μmのマイクロポアフィルターでろ過した後、超高速液体クロマトグラフィー/四重極飛行時間型質量分析(UHPLC/Q-TOF-MS)を行った。

【 0 0 5 1 】

UHPLC/Q-TOF-MS分析はAgilent 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS(アジレント社、米国)システムを使用した。そのクロマトグラフィーの条件は、ACQUITY UPLC BEH125分子排除クロマトグラフィーカラム(4.6×300 mm, Waters)、検出波長:210 nm、移動相:Aは50mMの酢酸アンモニウム水溶液で、Bはメタノールで、比率は80%Aで、流速:0.1ml/minであった。質量分析の条件は、マイナスイオンモード、走査範囲:100~3000、乾燥ガス温度:350、乾燥ガス流速:8L/min、キャピラリー電圧:3500V、フラグメンター電圧:80Vであった。

【 0 0 5 2 】

5.2 結果

酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーをUHPLC/Q-TOF-MSによって分析したところ、以下のようなTIC図および紫外線スペクトル(図1に示す)を得た。図1から、各ピークは規則的な波状に分布することがわかり、使用したのは分子排除クロマトグラフィーカラムであるため、波状ピークは重合度の大きい順で分布すると推測される。さらに各クロマトグラフィーピークに相応する一段階の質量分析グラフ(図2~11)によってその構造が推測される。図2はピーク0の一段階の質量分析グラフで、ここで、m/z 655.7744、645.7753および635.7728はいずれも3つの電荷を帯び、計算して得られたこの三つの信号で表される化合物の分子量はそれぞれ1970、1940および1910 Daで、相応する構造は11糖の酸化型グルクロン酸オリゴマーで、式Iで表される(n=10、m=0、1または2)。また、当該質量分析グラフに3つの電荷を帯びた質量分析信号m/z 597.0981、587.0991および577.0951と2つの電荷を帯びた896.1517、881.1502および866.1462があり、計算したところ、これらは分子量がそれぞれ1794、1764および1734 Daである三つの10糖の酸化型グルクロン酸オリゴマーで、式Iに該当する(n=9、m=0、1または2)。同様に、図3~11はピーク1~9の質量分析グラフで、分析したところ、構造はそれぞれ9糖~1糖の酸化型グルクロン酸オリゴマーで、式Iで表される(n=8、0、m=0、1または1)。クロマトグラムでは、12~20糖は有効に分離しなかったが、質量分析では、はっきりとした信号があり、図12に示す通りである。

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

50

実施例6 酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの核磁気共鳴による構造の確認

6.1 方法

正確に実施例1で得られたサンプル25 mgを量って0.5 mlの重水(D₂O 99.96%)で溶解させ、内部標準であるトリメチルシリルプロパン酸ナトリウム(TSP)の濃度は0.2 µg/mlで、600MHzの核磁気共鳴装置(Agilent、米国)によって分析した。水素スペクトルの走査時間は1hで、試験温度は室温であった。炭素スペクトルの走査時間は12h以上で、試験温度は室温であった。

【0054】

6.2 結果

核磁気共鳴の結果は図13(1H-NMR)、図14(13C-NMR)に示す。水素スペクトルから、a(4.70~4.71ppm)は開環したアルドウロン酸と直接連結するか隣接する閉環の配置のグルクロン酸の1位Hを表すことがわかる。領域b(4.47~4.60ppm)は開環したアルドウロン酸と離れた閉環の配置のグルクロン酸の1位Hおよびグルクロン酸の還元末端が開環して2つの-CH₂O-が脱去したカルボキシ基の1位Hを表すことがわかる。炭素スペクトルから、さらに、領域1はカルボキシ基の炭素ピークで、領域2は異なる化学環境における閉環グルクロン酸の1位Cであることがわかる。水素スペクトル、炭素スペクトルを合わせて分析したところ、グルコース構造単位における6位はカルボキシ基に酸化され、かつグルクロン酸の還元末端が開環してある程度の分解が伴ったことがわかり、質量分析の結果がさらに証明された。

【0055】

実施例7 酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーの酸素 グルコース欠乏(OGD)条件におけるHT-22細胞に対する影響

7.1 OGDモデルの構築および実験の群分け

正常に培養したHT-22細胞を取り、細胞数を2×10⁴個/mlに調整し、100 µl/ウェルで96ウェルプレートに接種し、各群に4つの平行ウェルを設けた(n=4)。12h予備培養した後、投与群はそれぞれ10 µLの実施例1で得られた産物を培地で調製した異なる濃度のサンプル(1、10、100 µM)を入れ、正常群は同じ体積の培地を入れた。培養プレートを5% CO₂、37 °Cの恒温インキュベーターで12h培養し、観察して細胞生存率を測定することによってサンプルの正常に培養したHT-22細胞に対する影響を確認した。

【0056】

正常に培養したHT-22細胞を取り、元の培養液を吸い捨て、細胞を無糖DMEM培養液で2回洗浄し、DMEM無糖培養液を入れて細胞数を2×10⁴個/mlに調整した。100 µl/ウェルで96ウェルプレートに接種した。投与群はそれぞれ10 µlの実施例1で得られた産物を培地で調製した異なる濃度のサンプル(1、10、100 µM)を入れ、モデル群は同じ体積の培養液を入れた。培養プレートを酸素欠乏缶(95% N₂、5% CO₂を吹き込んだもの)に置き、37 °Cで12h恒温培養し、観察して細胞生存率を測定することによってサンプルのOGDにおけるHT-22細胞に対する影響を確認した。

【0057】

7.2 MTT法による細胞の生存率の測定

上記各群の細胞の培養が終了後、各ウェルに10 µLのMTT(5mg/ml)溶液を入れ、続いて4h培養し、100 µlの10% SDSを入れ、紫色の結晶が完全に溶解した後、その570nmにおけるOD値を測定し、そして細胞生存率を算出した。

【0058】

7.3 結果

MTT法で算出した各群の細胞生存率は表1、2および図15、16に示す。表1および図15から、低、中、高の投与量の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを入れた後の細胞の生存率は正常群と比べ、有意差がなかったことがわかり、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーはHT-22細胞に対して毒性がないことが示された。

【0059】

表2から、モデル群はコントロール群と比べ、HT-22細胞の生存率が顕著に低下した(p

10

20

30

40

50

<0.001) ことがわかり、OGDは細胞の生存に対して顕著な抑制作用を有することが示された。一方、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーを入れた後の細胞生存率はモデル群と比べて顕著に上昇し ($p < 0.01$)、かつ優れた投与量依り性が伴い、酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーはHT-22細胞の生長・生存を促進する作用を有することが示された。

【0060】

【表1】

表1 酸化型 β -1,4-グルクロン酸オリゴマーの正常 HT-22 細胞の生存率に対する影響

| 群 | 濃度 (μ M) | 細胞生存率 (%) |
|------------------------------|---------------|-------------------|
| コントロール群 | | 100.00 \pm 2.20 |
| 酸化型 β -1,4-グルクロン酸オリゴマー | 1 | 97.39 \pm 1.77 |
| | 10 | 96.07 \pm 0.96 |
| | 100 | 94.78 \pm 3.12 |

10

データは平均値 \pm 標準誤差で示す。

【0061】

コントロール群と比べ、 $p < 0.05$ で有意差がある (LSDテスト)。

【0062】

【表2】

表2 酸化型 β -1,4-グルクロン酸オリゴマーのOGDにおける HT-22細胞の生存率に対する影響

| 群 | 濃度 (μ M) | 細胞生存率 (%) |
|------------------------------|---------------|---------------------------------|
| コントロール群 | | 100.00 \pm 2.09 |
| モデル群 | | 62.98 \pm 1.88 ^{###} |
| 酸化型 β -1,4-グルクロン酸オリゴマー | 1 | 81.13 \pm 1.86 ^{**} |
| | 10 | 85.97 \pm 3.92 ^{***} |
| | 100 | 93.44 \pm 4.67 ^{***} |

20

30

データは平均値 \pm 標準誤差で示す。

【0063】

###はコントロール群と比べて $p < 0.001$ であることを表す (LSDテスト)。

**はモデル群と比べて $p < 0.01$ であることを表す (LSDテスト)。

***はモデル群と比べて $p < 0.001$ であることを表す (LSDテスト)。

【0064】

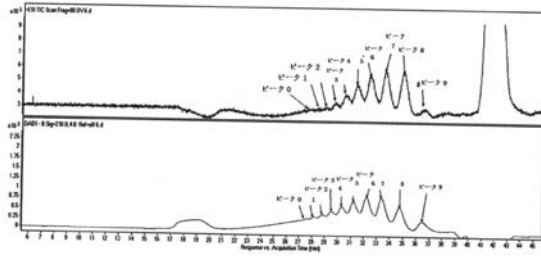
このように、本発明の酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマー混合物は優れた抗脳虚血作用を有することがわかる。実験から、各分離された酸化型 -1,4-グルクロン酸オリゴマーは類似の実験でも類似の結果があり、抗脳虚血薬の製造に応用することができること

40

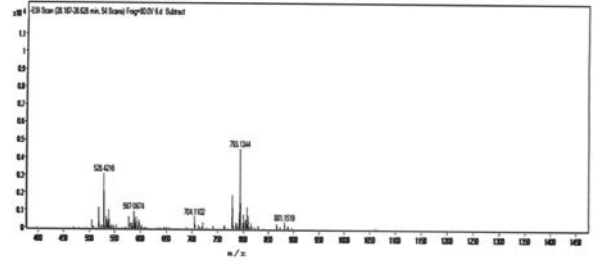
【0065】

本発明はまだ多くの実施形態があり、同等の変換または同等効果の変換によるすべての技術方案はいずれも本発明の保護範囲に含まれる。

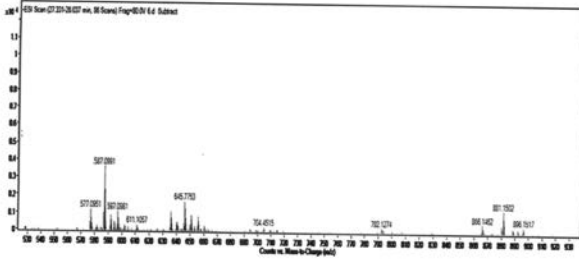
【 図 1 】



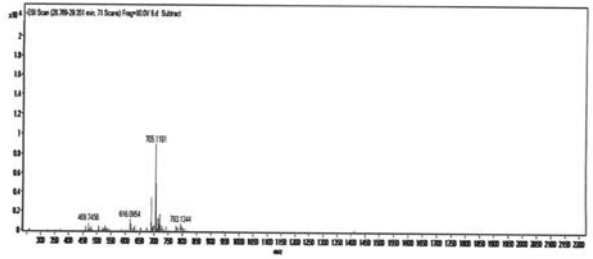
【 図 3 】



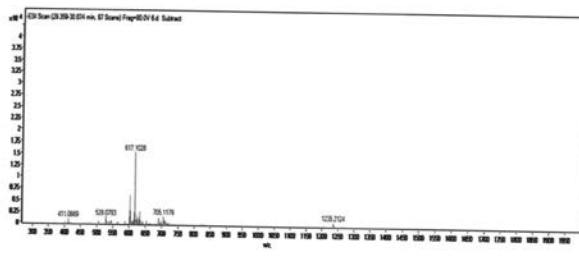
【 図 2 】



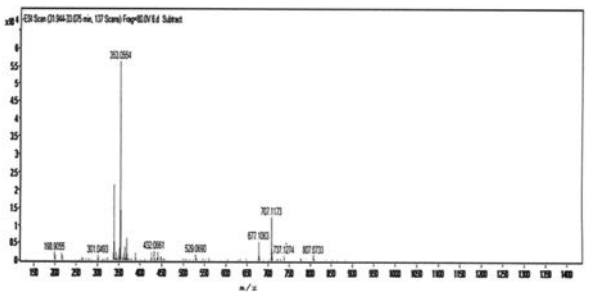
【 図 4 】



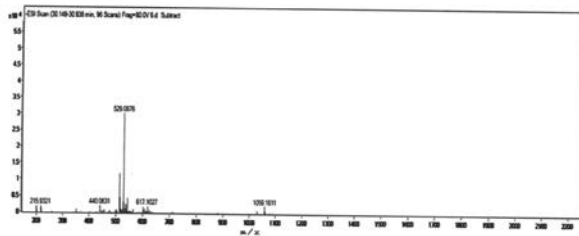
【 図 5 】



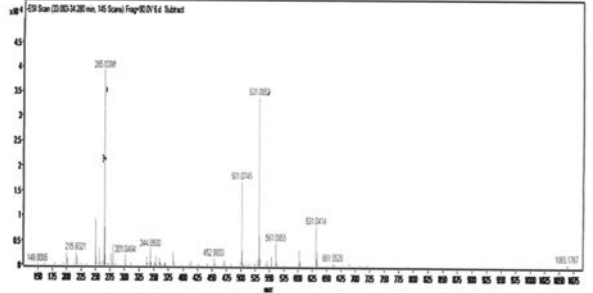
【 図 8 】



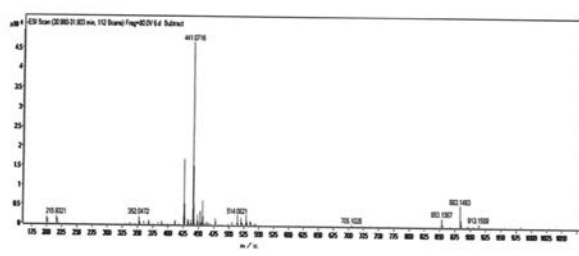
【 図 6 】



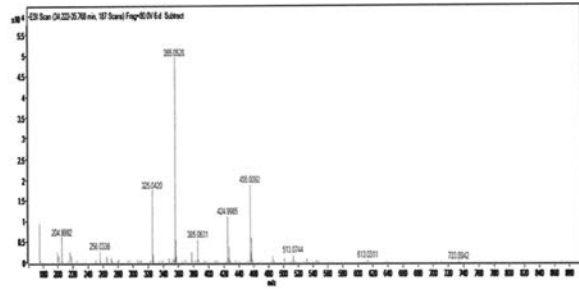
【 図 9 】



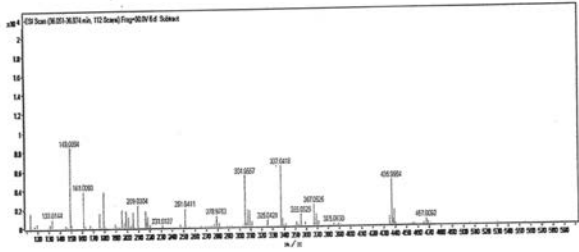
【 図 7 】



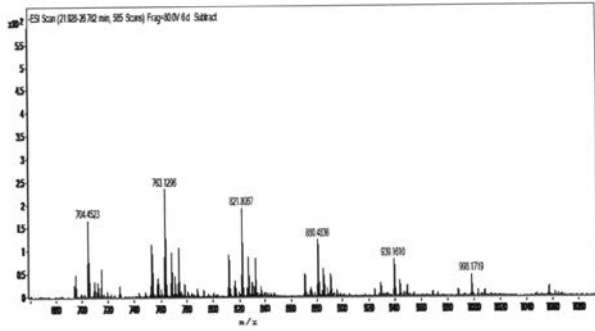
【 図 1 0 】



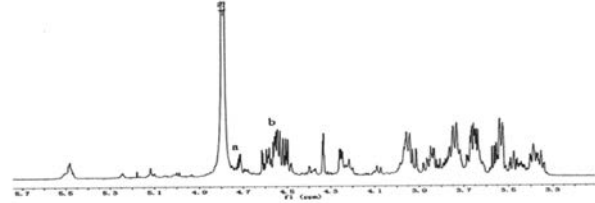
【 図 1 1 】



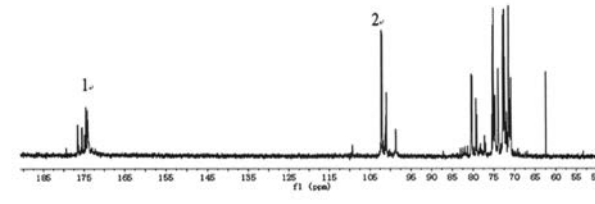
【 図 1 2 】



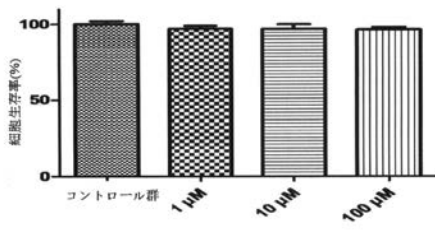
【 図 1 3 】



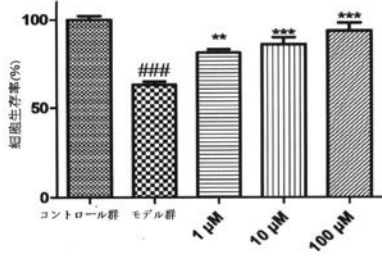
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 国際調査報告 】

| | |
|--|--|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | International application No. PCT/CN2016/082928 |
| Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet) | |
| This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: | |
| <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 21 and 23 (the part referring to claim 21) because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 21 and 23 (the part referring to claim 21) are directed to a method of treatment of the human/animal body (PCT Rule 39. 1(iv)), the search has been made and on the basis of the use of the compounds for preparing medicaments.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p> | |
| Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet) | |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: | |
| <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p>Remark on protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p> | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/082928

| | |
|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | |
| C07H 15/04 (2006.01) i; C07H 1/00 (2006.01) i; A61P 9/10 (2006.01) i; A61P 25/00 (2006.01) i; C08B 37/02 (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) C07H 15/-; C07H 1/-; A61P 9/10; A61P 25/-; C08B 37/02 | |
| 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, DWPI, SIPOABS, REGISTRY, CAPLUS, galacturonic acid, glucopyranuronosyl, glucuronic acid, galactaric acid, glucaric acid, oligo, aldehyde acid, polyglucoson, NaOH, cerebral, neuron, ischemia, microcrystalline cellulose, MCC, mercerization, structure search according to Formula I | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages |
| X | WO 0232913 A1 (UNIV CONNECTICUT) 25 April 2002 (25.04.2002) description, page 1, line 20 to page 2, line 8 and embodiment 4 |
| A | WO 0232913 A1 (UNIV CONNECTICUT) 25 April 2002 (25.04.2002) The whole document, especially description, page 1, line 20 to page 2, line 8 and embodiment 4 |
| X | M. Schaemann et al. Reaction of enamines and mediated anodic oxidation of carbohydrates with the 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxoammonium ion (TEMPO+). Electrochimica Acta, 06 July 2005 (06.07.2005), vol. 50, no. 25 and 26, pages 4956-4972, especially page 4969, scheme 15, compound 32 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | |
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "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 |
| "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 | |
| Date of the actual completion of the international search 19 August 2016 | Date of mailing of the international search report 25 August 2016 |
| Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451 | Authorized officer CHEN, Junxia Telephone No. (86-10) 62086343 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2016/082928

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 5831043 A (ROQUETTE FRERES) 03 November 1998 (03.11.1998) the abstract and description, column 4, lines 53-55 | 1, 4-6, 22 |
| X | Jean-Francois Thaburet et al. TEMPO-mediated oxidation of maltodextrins and D-glucose: effect of pH on the selectivity and sequestering ability of the resulting polycarboxylates. Carbohydrate Research. 31 December 2001 (31.12.2001) vol. 330, no. 1, pages 21-29; especially pages 22 and 23; page 25, the last but one paragraph and page 26, figure 2, compounds a, b and c | 1-10, 22 |
| X | Russell Pressey Oxidized oligogalacturonides activate the oxidation of indoleacetic acid by peroxidase Plant Physiology 31 December 1991(31.12.1991), vol. 96, no. 4 pages 1167-1170, especially the abstract, page 1168, right column, paragraph 1; page 1169, left column, the last paragraph to right column, paragraph 1 and page 1170 | 1, 4-7, 22 |
| PX | CN 104945448 A (SOOCHOW UNIV.) 30 September 2015 (30.09.2015) claims and embodiments 1-7 | 1-23 |
| PX | CN 104892792 A (SOOCHOW UNIV.) 09 September 2015 (09.09.2015) claims and embodiments 1-7 | 1-10, 17-23 |
| A | LI, Lin. TEMPO-NaClO-NaBr Selective Oxidation Primary Alcohol of Microcrystalline Cellulose at C6 Position. Qingdao University of Science and Technology. Master's Thesis. 31 December 2010 (31.12.2010) pages 16-17 and 46-53 | 1-23 |
| A | WANG, Xianling et al. Influence on Structure and Oxidation Reactivity of Microcrystalline Cellulose by Different Activation Methods. Chemistry and Industry of Forest Products. 31 December 2010 (31.12.2010), vol. 27, no. 3 the whole document | 1-23 |
| A | WANG, Shumin et al. Research Development on the mechanism of anti-cerebral ischemia medicaments. Chinese Journal of Drug Application and Monitoring. 31 December 2008(31.12.2008), vol. 5, no. 3, pages 30-32 | 1-23 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/082928

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|-------------------|----------------|-------------------|
| WO 0232913 A1 | 25 April 2002 | AU 1336302 A | 29 April 2002 |
| | | US 6498269 B1 | 24 December 2002 |
| US 5831043 A | 03 November 1998 | FR 2742755 A1 | 27 June 1997 |
| | | NO 307886 B1 | 13 June 2000 |
| | | MX 9606648 A | 31 May 1998 |
| | | AT 216703 T | 15 May 2002 |
| | | EP 0798310 A1 | 01 October 1997 |
| | | DE 69620864 T2 | 12 December 2002 |
| | | JP 09235291 A | 09 September 1997 |
| | | NO 965268 A | 23 June 1997 |
| | | ES 2176420 T3 | 01 December 2002 |
| | | FR 2742755 B1 | 20 February 1998 |
| | | EP 0798310 B1 | 24 April 2002 |
| | | CA 2193034 A1 | 22 June 1997 |
| | | DE 69620864 D1 | 29 May 2002 |
| | | NO 965268 D0 | 10 December 1996 |
| CN 104945448 A | 30 September 2015 | None | |
| CN 104892792 A | 09 September 2015 | None | |

| 国际检索报告 | | 国际申请号 PCT/CN2016/082928 |
|--|--|----------------------------|
| A. 主题的分类 C07H 15/04(2006.01)i; C07H 1/00(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; C08B 37/02(2006.01)i 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 | | |
| B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07H 15/-, C07H 1/-, A61P 9/10, A61P 25/-, C08B 37/02 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNKI, CNABS, DWPI, SIPOABS, REGISTRY, CAPLUS, 半乳糖醛酸, 葡萄糖醛酸, 葡糖醛酸, 寡聚, 醛酸, 葡聚糖, 半乳糖二酸, 糖二酸, 粘酸, 粘液酸, 黏酸, 脑, 神经元, 缺血, 微晶纤维素, 丝光化, NaOH, galacturonic acid, glucopyranuronosyl, glucuronic acid, galactaric acid, glucaric acid, cerebral, neuron, ischemia, microcrystalline cellulose, MCC, mercerization, 根据式I的结构式检索 | | |
| C. 相关文件 | | |
| 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 |
| X | WO 0232913 A1 (UNIV CONNECTICUT) 2002年 4月 25日 (2002-04-25) 说明书第1页第20行至第2页第8行以及实施例4 | 1, 4-6, 22 |
| A | WO 0232913 A1 (UNIV CONNECTICUT) 2002年 4月 25日 (2002-04-25) 全文, 特别是说明书第1页第20行至第2页第8行以及实施例4 | 2-3, 7-21, 23 |
| X | M. Schaemann等. "Reaction of enamines and mediated anodic oxidation of carbohydrates with the 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxoammonium ion (TEMPO+)" Electrochimica Acta, 第50卷, 第25-26期, 2005年 7月 6日 (2005-07-06), 第4966-4972页, 特别是第4969页方案15的化合物32 | 1, 4-6, 22 |
| X | US 5831043 A (ROQUETTE FRERES) 1998年 11月 3日 (1998-11-03) 摘要及说明书第4栏第53-55行 | 1, 4-6, 22 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。 | | |
| * 引用文件的具体类型: | | |
| "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 | "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 | |
| "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 | |
| "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) | "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 | |
| "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" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 | | |
| 国际检索实际完成的日期 2016年 8月 19日 | 国际检索报告邮寄日期 2016年 8月 25日 | |
| ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451 | 受权官员 陈俊霞 电话号码 (86-10)62086343 | |

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/082928

| c. 相关文件 | | |
|---------|---|-------------|
| 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 |
| X | Jean-Francois Thaburet 等. "TEMPO-mediated oxidation of maltodextrins and D-glucose: effect of pH on the selectivity and sequestering ability of the resulting polycarboxylates" Carbohydrate Research, 第330卷, 第1期, 2001年 12月 31日 (2001 - 12 - 31), 第21-29页, 特别是第22-23页、第25页倒数第2段及第26页图2的化合物a、b、c | 1-10, 22 |
| X | Russell Pressey. "Oxidized oligogalacturonides activate the oxidation of indoleacetic acid by peroxidase" Plant Physiology, 第96卷, 第4期, 1991年 12月 31日 (1991 - 12 - 31), 第1167-1170页, 特别是摘要, 第1168页右栏第1段、第1169页左栏最后一段至右栏第一段以及第1170页 | 1, 4-7, 22 |
| PX | CN 104945448 A (苏州大学) 2015年 9月 30日 (2015 - 09 - 30) 权利要求书及实施例1-7 | 1-23 |
| PX | CN 104892792 A (苏州大学) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 权利要求书及实施例1-7 | 1-10, 17-23 |
| A | 李琳. "TEMPO-NaClO-NaBr选择性氧化微晶纤维素C6位伯羟基的研究" 青岛科技大学 硕士学位论文, 2010年 12月 31日 (2010 - 12 - 31), 第16-17、46-53页 | 1-23 |
| A | 王献玲等. "不同活化方法对微晶纤维素结构和氧化反应性能的影响" 林产化学与工业, 第27卷, 第3期, 2010年 12月 31日 (2010 - 12 - 31), 全文 | 1-23 |
| A | 王淑民等. "抗脑缺血药物的作用机制研究进展" 中国药物应用与监测, 第5卷, 第3期, 2008年 12月 31日 (2008 - 12 - 31), 第30-32页 | 1-23 |

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/082928

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求: 21和23 (引用权利要求21的部分)
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
[1] 尽管权利要求21和23 (引用权利要求21的部分) 涉及对人体或动物体实施的治疗方法 (细则39.1(iv) PCT), 仍基于所述化合物的制药用途进行了检索。
2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
3. 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/082928

| 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) |
|-------------|-----------|----|----------------|------|-----------|----|----------------|
| WO | 0232913 | A1 | 2002年 4月 25日 | AU | 1336302 | A | 2002年 4月 29日 |
| | | | | US | 6498269 | B1 | 2002年 12月 24日 |
| US | 5831043 | A | 1998年 11月 3日 | FR | 2742755 | A1 | 1997年 6月 27日 |
| | | | | NO | 307886 | B1 | 2000年 6月 13日 |
| | | | | MX | 9606648 | A | 1998年 5月 31日 |
| | | | | AT | 216703 | T | 2002年 5月 15日 |
| | | | | EP | 0798310 | A1 | 1997年 10月 1日 |
| | | | | DE | 69620864 | T2 | 2002年 12月 12日 |
| | | | | JP | H09235291 | A | 1997年 9月 9日 |
| | | | | NO | 965268 | A | 1997年 6月 23日 |
| | | | | ES | 2176420 | T3 | 2002年 12月 1日 |
| | | | | FR | 2742755 | B1 | 1998年 2月 20日 |
| | | | | EP | 0798310 | B1 | 2002年 4月 24日 |
| | | | | CA | 2193034 | A1 | 1997年 6月 22日 |
| | | | | DE | 69620864 | D1 | 2002年 5月 29日 |
| | | | | NO | 965268 | D0 | 1996年 12月 10日 |
| CN | 104945448 | A | 2015年 9月 30日 | 无 | | | |
| CN | 104892792 | A | 2015年 9月 9日 | 无 | | | |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|----------------------------------|-----------------|------------|
| A 6 1 K 31/715 (2006.01) | A 6 1 K 31/715 | |
| A 6 1 K 31/7032 (2006.01) | A 6 1 K 31/7032 | |

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 ハオ ジエ
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 ジャンスー スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
 ウ レンアイ ロード ナンバー 1 9 9

(72) 発明者 スン シューチャン
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 ジャンスー スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
 ウ レンアイ ロード ナンバー 1 9 9

(72) 発明者 チャン フィリン
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 ジャンスー スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
 ウ レンアイ ロード ナンバー 1 9 9

F ターム(参考) 4C057 AA03 BB04
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA05 EA25 MA01 MA04 NA14 ZA36
 ZA40
 4C090 AA02 AA05 AA09 BA34 BB52 BB65 BB71 BB92 BD35 CA14
 CA19 CA34 DA23