(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
2018 年 2 月 22 日 (22.02.2018)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2018/032611 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/343 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01) *A61P 9/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/103782

(22) 国际申请日: 2016 年 10 月 28 日 (28.10.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610671928.1 2016年8月16日 (16.08.2016) CN

(71) 申请人: 南方科技大学(SOUTHERN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区学苑大道1088号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 侯圣陶 (HOU, Shengtao); 中国广东省深圳市南山区学苑大道1088号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 广州华进联合专利商标代理有限公司 (ADVANCE CHINA IP LAW OFFICE); 中国广东省广州市天河区花城大道85号3901房, Guangdong 510623 (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, JP, KE, KG, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

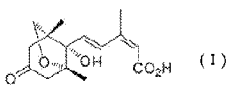
(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), 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))。

WO 2018/032611 A1

(54) **Title:** NEUROPROTECTIVE AGENT, AND METHOD FOR TREATING BRAIN DISEASE OR DISORDER

(54) **发明名称**: 神经保护剂及用于治疗脑部疾病或病症的方法



(I)

(57) **Abstract:** A neuroprotective agent, comprising a compound as represented by formula (I).

(57) **摘要**: 一种神经保护剂，包括具有如结构式（Ⅰ）的化合物。

发明名称：神经保护剂及用于治疗脑部疾病或病症的方法

技术领域

本发明涉及药物领域，特别涉及一种神经保护剂及用于治疗脑部疾病或病症的方法。

背景技术

脑卒中已经成为严重危害人类健康的三大疾病之一。然而目前，临床治疗脑卒中的药物除了临床时间窗使用的极为有限的通栓药之外，并无其它有效的神经细胞保护剂，也没有具有促进神经功能恢复的治疗药物。尽管经过几十年的努力，对脑卒中诱发的内源性神经保护分子和机理的认识仍然很局限（Molecular mechanisms of cerebral ischemia-inducedneuronal death. Hou ST, MacManus JP (2002),Int Rev Cytol 221:93-148.; The science of stroke: mechanisms in searchof treatments. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010). Neuron 67:181-198）。

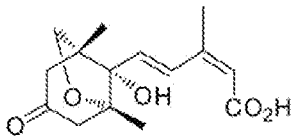
红花菜豆酸（Phaseic Acid，PA）是脱落酸（Abscisic Acid，ABA）萜类化合物的分解代谢产物，ABA 在细胞色素 P-450 酶的催化作用下生成红花菜豆酸((+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ (1998). Plant Physiol 118:849-860.)。ABA 在高等植物的生长和发育调控中起到重要生理功能，包括提高抗逆性（抗旱、抗寒、抗盐等），抑制生长和萌发，促进脱落和休眠，加速衰老和促进气孔关闭等。植物内源性 ABA 的含量水平，受生物合成和代谢之间平衡的变化控制。ABA 通过诱导第二信使 cADP-Ribose 的产生调控细胞内钙离子的释放而在植物中发挥作用（Guard cellABA and CO_2 signaling network updates and Ca^{2+} sensor priming hypothesis. sraelsson M, Siegel RS, Young J, Hashimoto M, Iba K, Schroeder JI (2006). CurrOpin Plant

Biol 9:654-663.)。(-)-PA 与 ABA 作用相类似，也是抑制光合作用和促进脱落的植物激素（ABA biosynthesis and degradation contributing to ABAhomeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stressconditions. Seiler C, Harshavardhan VT, Rajesh K, Reddy PS, Strickert M, Rolletschek H, Scholz U,Wobus U, Sreenivasulu N (2011). J Exp Bot 62:2615-2632.)。

发明内容

基于此，有必要提供一种神经保护剂，以使红花菜豆酸(-)-PA 应用在神经保护剂中。

一种神经保护剂，包括具有如下结构式的化合物：



。

一种用于治疗脑部疾病或病症的方法，包括给需要治疗的客体施用有效剂量的上述神经保护剂。

上述结构式的(-)-PA 高水平内源性存在于缺血大脑中，区别于其他 ABA 衍生物，且(-)-PA 较高含量地存在于缺血病灶周围的半隐区中，通过可逆性抑制谷氨酸受体，减少细胞钙内流，能保护皮质神经细胞免受谷氨酸毒性，使得上述结构式的(-)-PA 成为一种有效的神经保护剂。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他实施例的附图。

图 1a 为一实施例的 PA 合成标准品的(-)-PA 和(+)-PA 的色谱图；

图 1b 为一实施例的小鼠的大脑试验样品中的(-)-PA 色谱图；

图 1c 为一实施例的小鼠的血液试验样品中的(-)-PA 的色谱图；

图 2 为一实施例的小鼠的大脑试验样品和血液试验样品的(-)-PA 及其相关代谢产物的含量的柱状图；

图 3 为一实施例的饲料中的(-)-PA 及其相关代谢产物的含量的柱状图；

图 4 为一实施例的仅加入 100μM 的 NMDA 的皮层神经元、加入 100μM 的 NMDA 和加入 10μM 的(-)-PA 的皮层神经元、加入 100μM 的 NMDA 和加入 100μM 的(-)-PA 的皮层神经元、加入 1000μM 的 NMDA 和加入 10μM 的(-)-PA 的皮层神经元、以及仅加入 45mM 氯化钾的小鼠皮层神经元的钙离子内流的荧光比率图；

图 5 为一实施例的添加有 50μM 的 NMDA 和 100μM 的(-)-PA 的皮层神经元随时间的电位变化图；

图 6 为一实施例的添加有 50μM 的 NMDA 和 1000μM 的(-)-PA 的皮层神经元随时间的电位变化图；

图 7 为一实施例的皮层神经元中的(-)-PA 的浓度与电位关系曲线图；

图 8 为一实施例的未处理的皮层神经元、100μM 的 NMDA 处理的皮层神经元、不同浓度的(-)-PA 处理的皮层神经元以及 DMSO 处理的皮层神经元的存活率的柱状图；

图 9 为一实施例的未处理的皮层神经元、ALLN 处理的皮层神经元、10μM 的(-)-PA 和 100μM 的 NMDA 处理的皮层神经元、100μM 的(-)-PA 和 100μM 的 NMDA 处理的皮层神经元、以 1000μM 的(-)-PA 和 100μM 的 NMDA 处理的皮层神经元的存活率的柱状图；

图 10 为一实施例的实验小鼠和对照组小鼠在 MCAO 手术后 2 小时、6 小时和 24 小时的大脑缺血侧和对侧样品的(-)-PA 含量的柱状图；

图 11 为一实施例的小鼠大脑样品的照片；

图 12 为图 11 的三个区域的(-)-PA 的含量的柱状图；

图 13 为一实施例的灌注(-)-PA 和生理盐水的小鼠在 0.5 小时、6 小时和

24 小时后的存活率图；

图 14 为一实施例的灌注(-)-PA 和生理盐水的小鼠在 0.5 小时、6 小时和 24 小时进行的小鼠行为学评分图；

图 15 为一实施例的灌注(-)-PA 和生理盐水的小鼠的大脑的梗死面积图；

图 16 为一实施例的灌注(-)-PA 抗体和生理盐水的小鼠在 0.5 小时、6 小时和 24 小时进行的小鼠行为学评分结果图；

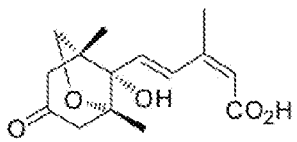
图 17 为一实施例的灌注(-)-PA 抗体和生理盐水的小鼠在 0.5 小时、6 小时和 24 小时的前脚掌的抓握反射握力评分结果图；

图 18 为一实施例的灌注(-)-PA 抗体和生理盐水的小鼠的大脑的梗死面积图。

具体实施方式

为了便于理解本发明，下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。

一实施方式的神经保护剂，包括具有如下结构式的化合物：



其中，神经保护剂还包括药物上可接受的载体。

其中，蛋白分子选自牛血清蛋白分子、卵清蛋白分子、钥孔血蓝蛋白分子、纤维蛋白分子及人血清蛋白分子中的一种。

其中，多肽选自多聚赖氨酸、多聚谷氨酸及二软脂酰氨酸中的一种。

其中，神经保护剂还包括药学上可接受的溶剂。

其中，溶剂为生理盐水或葡萄糖水溶液。

上述结构式的(-)-PA 高水平内源性存在于缺血大脑中，区别于其他 ABA 衍生物，且(-)-PA 较高含量地存在于缺血病灶周围的半隐区中，通过可逆性抑制谷氨酸受体，减少细胞钙内流，能保护皮质神经细胞免受谷氨酸毒性，使得上述结构式的(-)-PA 成为一种有效的神经保护剂。

一实施方式的用于治疗脑部疾病或病症的方法，包括给需要治疗的客体施用有效剂量的上述神经保护剂。

其中，施用为口服给药、注射给药、呼吸道给药、皮肤给药、粘膜给药或腔道给药。

其中，疾病或病症包括老年退行性脑病、脑中风、脑血管疾病、颅内占位性病变、癫痫、脑血栓形成、腔隙性梗死或脑栓塞。具体的，老年退行性脑病为老年痴呆、帕金森病等。

以下为具体实施例部分:

实施例

一、检测(-)-PA 在小鼠大脑中高水平内源性的存在

（1）动物实验及饲料:

实验动物：C57B/6 小鼠 10 只，每只的体重 20~37g，均为雄性。

小鼠饲料：市场购买的饲料（LabDiet，Land O'Lakes Inc，加拿大安大略省）。

（2）动物样品收集及预处理:

小鼠的大脑组织和血液的收集：使用异氟烷将小鼠麻醉，小鼠麻醉后从小鼠的面部静脉收集血液，得到小鼠的血液样品；将小鼠处死，收集脑组织得到小鼠的大脑样品，将大脑样品和血液样品在液氮中快速冷冻，并在-80℃保存。

小鼠的大脑组织样品和血液样品预处理：将小鼠的大脑组织样品和血液样品分别采用多管球磨机匀浆（Mini-BeadBeater-96，Biospec Products 公司，巴特尔斯维尔市，俄克拉荷马州，美国），称取每份样品约 50mg 分别置于多个 Falcon 管中。将包含同位素内标(同位素内标物包括: d3-DPA、d5-ABA-GE、d3-PA、d4-7'-OHABA、d3-neoPA、d4-ABA 和 d4-trans-ABA，这些物质的合成制备在文献 Abrams et al.，2013 中有报道，每种物质浓度各 0.2ng/μL，溶于水和乙腈的混合液，且水和乙腈的混合液中水和乙腈的体积比为 1:1）的等

分试样加入每份样品中，并使用提取溶剂（异丙醇:水:冰醋酸 = 80:19:1，v/v/v）进行提取，提取物在避光和4℃下震荡24小时，经离心，取上清液，挥干溶剂。将提取物再溶于100μL的甲醇和冰醋酸的混合溶剂（其中，甲醇:冰醋酸的体积比为99:1）中，然后依次加入900μL体积百分含量为1%冰醋酸和2mL正己烷，分离得到水层，挥干溶剂，得到试验样品。试验样品于100μL甲醇和冰醋酸的混合溶剂中（甲醇:冰醋酸的体积比为99:1）中复溶，然后加入900μL 1%冰醋酸水的溶液，再经上Oasis HLB固相萃取柱（Waters，米西索加市，加拿大），洗脱溶剂为乙腈、水和冰醋酸的混合液（乙腈:水:冰醋酸=30:69:1，v/v/v），真空离心，然后用浓缩仪（Labconco公司，堪萨斯城市，美国）浓缩，收集并干燥，分别得到小鼠的大脑试验样品和血液试验样品。

（3）UPLC/ESI-MS/MS（超高效液相色谱串联质谱方法）分析和定量

PA合成标准品的UPLC/ESI-MS/MS分析和定量：采用上述UPLC/MS设备手性分离PA，采用的手性柱为Regis（R，R）Whelko5/100 Kromasil（4.6×150mm，5μm，REGIS Technologies公司）。流动相A为含有0.1%冰醋酸的色谱级水，流动相B为含有0.1%冰醋酸的色谱级甲醇。进样量为15μL，流速为0.40mL/min，洗脱梯度为：0min~1min 55%流动相B；1min~18min 55%~90%流动相B；18min~19min 90%~100%流动相B；19min~20min 100%流动相B；20min~21min 100%~55%流动相B；21min~25min 55%流动相B平衡柱子，等待下次进样。分离得到PA合成标准品的(-)-PA和(+)-PA的色谱图，如图1a所示。

小鼠的大脑试验样品和血液试验样品的UPLC/ESI-MS/MS分析和定量：将上述（2）小鼠的大脑组织样品和血液样品预处理后得到的小鼠的大脑试验样品和血液试验样品分别溶于含有体积百分含量40%的甲醇、0.5%醋酸和0.1ng/μL的加样回收同位素标准品（d6-ABA和d2-ABA-GE）的水溶液（v/v），再通过UPLC/ESI-MS/MS分析和定量。UPLC/ESI-MS/MS分析和定量时，采用Waters ACQUITY UPLC系统、二元溶剂输送系统、色谱柱和样品管理器通过Z-spray接口与Waters Micromass Quattro Premier XE四级杆串联质谱耦

合，其中，分析使用的色谱柱为 ACQUITY UPLC® HSS C18 （2.1 × 100mm，1.8μm），预柱为 ACQUITY HSS C18 VanGuard Pre-column （2.1 × 5mm，1.8μm），流动相 A 为含有体积百分含量 0.025%的冰醋酸的色谱级水，流动相 B 为含有 0.025%冰醋酸的色谱级乙腈。进样量为 10 μL，流速为 0.40mL/min，洗脱梯度为：0min~0.2min 2%流动相 B，0.2min~0.4min2%~15%流动相 B；0.4min ~5.0min 15%~50%流动相 B；5.0min~5.5min50%~100%流动相 B；5.5min~6.2min 100%流动相 B；6.2min~6.5min 100%~2%流动相 B；6.5min~8.0min 2%流动相 B。采用 MassLynx v4.1（Waters 公司）多反应监测模式（MRM）下采集数据，负离子模式，电喷雾电离，条件如下：毛细管电压 1.75kV，脱溶剂气体流速 1100L/小时，锥气流 150L/小时，离子源和脱溶剂温度分别为 120℃和 350℃。采用 QuanLynx v4.1 软件（Waters 公司）进行离线色谱数据处理，校准曲线采用所有目标化合物创建，并得到小鼠的大脑试验样品中的(-)-PA 色谱图，如图 1b 所示；小鼠的血液试验样品中的(-)-PA 的色谱图，如图 1c 所示；以及通过小鼠的大脑试验样品和血液试验样品的色谱图得到的(-)-PA 及其相关代谢产物的含量的柱状图，如图 2 所示，在图 2 中，*表示 $P<0.05$，即具有显著性；**表示 $P<0.01$，即非常显著，且以下图中的*表示均表示上述意义。

鼠饲料的 UPLC/ESI-MS/MS 分析和定量：采用小鼠的大脑试验样品和血液试验样品的定量和分析相同 UPLC/ESI-MS/MS 的方法对上述市场购买得到的饲料（LabDiet，Land O'Lakes Inc，加拿大安大略省）检测，从通过检测得到的饲料的色谱图得到饲料中的(-)-PA 及其相关代谢产物的含量的柱状图如图 3 所示。

（4）结果分析

从图 1a~图 1c 中可以看出，小鼠的大脑和血液中存在 PA，其存在形式为(-)-PA，而非(+)-PA。

从图 2 中可以看出，(-)-PA 在小鼠的大脑中的具有较高的含量，是血液中(-)-PA 的 10 倍，而大脑中 ABA 的含量低于(-)-PA 的含量的 30 倍，说明小鼠

大脑中高水平存在(-)-PA。

从图 3 中可以看出，饲料中(-)-PA 含量很低，这说明小鼠大脑中的(-)-PA 并不是来源于食物。显然说明，小鼠大脑中高含量的(-)-PA 为内源产生，而非来自于食物等外源性因素。

二、(-)-PA 保护皮层神经元免遭谷氨酸毒性实验

（1）皮层神经元培养：将怀孕 15 或 16 天的 CD-1 小鼠使用机械分离大脑半球，去除脑膜，再用 0.025%（w/v）的胰蛋白酶溶液消化 25min，然后加入胰蛋白酶抑制剂中和胰酶作用，再加入 0.05%（w/v）Dnase（脱氧核糖核酸酶），除去来自死细胞的 DNA。在培养基中经过一系列破碎处理以及温和的离心步骤分离出皮层神经元，再将神经元按照文章（Collapsin response mediatorprotein 3 deacetylates histone H4 to mediate nuclear condensation and neuronal death. Hou ST, Jiang SX, Aylsworth A, Cooke M, Zhou L (2013). Sci Rep 3:1350.）所使用的培养方法，在添加了 B-27 补充剂和 N2 补充剂（Invitrogen）的培养基中培养 7~14 天（由于神经元在这种培养基中完全成熟，才能对谷氨酸盐诱导的毒性有所反应，因此，需先将神经元培养成熟）。将细胞以 1×10^6 细胞/孔的密度接种于预先用 poly-D-lysine 处理的 24 孔板的玻片中，再以 2×10^7 细胞/10mL 的密度接种于 100mm 细胞培养皿中。细胞于 37℃细胞培养箱中培养。

（2）使用 Fura-2（细胞内钙离子的特异性荧光指示剂）的钙离子比率荧光测量方法(Abscisic acid does notevoke calcium influx in murine primary microglia and immortalised murine microglial BV-2 and N9 cells.Jiang SX, Benson CL, Zaharia LI, Abrams SR, Hou ST (2010). BiochemBiophys Res Commun 401:435-439.)测量荧光比值。

将在上述(1)中的体外培养 7 天的小鼠皮层神经元加入 5μM 的 Fura-2-AM（Molecular Probes，Eugene，CA）和 0.02% pluronic(Molecular Probes，Eugene，USA）的混合物中，并在 37℃孵育 30min，再用无 Mg^{2+} 的 PSS 缓冲液（2mM pH 为 7.2 的 HEPES、140mMNaCl、5mMKCl、2.3mM $CaCl_2$ 和 10mM 葡萄糖）

清洗，然后在无 Mg^{2+}的 PSS 缓冲液里稳定 5min，使用 Northern Eclipse Digital Ratio Image System（EMPIX，Mississauga，ON）系统和 Axiovert 200 摄影机对 Fura-2 的强度进行检测，其中，发射波长为 510nm，测量 Fura-2 在 340nm 和 380nm 波长的荧光比值。通过 DG-5 system（Sutter Instrument Company，Novato，CA）系统进行双重刺激筛选。$[Ca^{2+}]i$ 浓度由 Fura-2 在 R340/380 这两个激发波长的荧光强度经过背景修正后的比值来表示。R340/380 为盖破片上同一个视野中 20 个细胞的比值平均值。检测过程中先记录$[Ca^{2+}]i$ 基态水平 20s，用 100μM 的 NMDA 溶解于无 Mg^{2+}的 PSS 缓冲液，加入皮层神经元中，随后依次加入不同浓度的(-)-PA(10μM、100μM 和 1000μM)，记录$[Ca^{2+}]i$ 水平 60~100s; 接着用无 Mg^{2+}的 PSS 缓冲液清洗神经元 300s，加入含有 45mM KCl 的 PSS 缓冲液进行去极化处理，记录$[Ca^{2+}]i$ 水平变化 60s，以此来表示神经元的活力，所有测量至少重复 3 次，所有数据使用 Microsoft Excel 分析，结果为三次独立实验的平均值，从而得到仅加入 100μM 的 NMDA 的皮层神经元、加入 100μM 的 NMDA 和加入 10μM 的(-)-PA 的皮层神经元、加入 100μM 的 NMDA 和加入 100μM 的(-)-PA 的皮层神经元、加入 1000μM 的 NMDA 和加入 10μM 的(-)-PA 的皮层神经元、以及仅加入 45mM 氯化钾的小鼠皮层神经元的钙离子内流的荧光比率图，如图 4 所示。

（3）全细胞电生理记录

使用 Axopatch 700A patch-clamp amplifier （Axon Instruments，Inverurie，Scotland）在室温下（22~25℃）对上述（1）培养的皮层神经元进行全细胞膜片钳记录。数据通过 DigiData 1322A，pClamp 9.0 软件采集，采样频率为 10kHz，信号通过 5kHz 过滤。电极用 Flaming/Brown micropipette puller（Sutter Instruments，Novato，CA）牵拉和抛光，记录电极的电阻在不同内液中为 4~6MΩ，电压钳记录过程中，在放大器中使用电阻电容回路消除瞬变电压。在全细胞模式形成之后，串联电阻通常是<15MΩ，串联电阻补偿设置为 70%~90%，液接电位大约为 2mV，通过电极电位偏置调整进行自动调节，使用外液（NaCl 150mM、KCl 5mM、$CaCl_2$ 0.2mM、葡萄糖 10mM 和 HEPES

10mM，NaOH 调节 pH 至 7.4)和电极内液（KCl 140mM、$MgCl_2$ 2.5mM、HEPES 10mM、EGTA 11mM 和 ATP 5mM，KOH 调节 pH 至 7.3）记录 NMDA/AMPA 激活电流，除非特别说明，电压钳记录膜电位钳制在-70mV。使用 8-通道聚焦灌注系统（ALA Scientific Instruments，Farmingdale，NY）通过压力将药物（50μM 的 NMDA 和不同浓度的(-)-PA）在外液中加到皮层神经元上，其中，(-)-PA 的浓度范围在 100~1000μM。整个记录过程皮层神经元一直浸泡在外液中，通过电子控制完成药物溶液更换。膜片钳数据使用 Clampfit 9.0（Axon Instruments）处理，使用 Origin 7.5 （OriginLab，Northampton，MA）分析，并得到添加有 50μM 的 NMDA 和 100μM 的(-)-PA 的皮层神经元随时间的电位变化图，如图 5 所示，以及得到添加有 50μM 的 NMDA 和 1000μM 的(-)-PA 的皮层神经元随时间的电位变化图，如图 6 所示。并通过记录皮层神经元在各个浓度的(-)-PA 中的电位，得到皮层神经元中的(-)-PA 的浓度与电位关系曲线图，如图 7 所示，其中，剂量反应曲线用 Logistic 方程计算：$y=(A_1-A_2)/(1+(x/x_0)p]+A_2$，y 是响应，$A_1$ 和 A_2 分别是最大和最小响应，x_0 是指达到最大反应一半时所对应的浓度，x 是药物浓度，p 是希尔系数。

（4）神经元存活力

将上述（1）的体外 37℃培养 7 天的皮层神经元分别用 100μM 的 NMDA（N-甲基-D-天冬氨酸）、浓度分别为 10μM、50μM、100μM、250μM、500μM、1000μM、2000μM(-)-PA 和二甲基亚砜（DMSO）处理 15min，并 37℃再培养 24 小时。在处理过程结束之后，使用阿尔玛蓝（Invitrogen）对皮层神经元进行神经元存活力分析，将阿尔玛蓝和培养基的体积比为 1:10，将按照阿尔玛蓝加入培养基中，然后将加入有阿尔玛蓝的培养基加入皮层神经元中，然后将 1:10 稀释的阿尔玛蓝加到皮层神经元中，于 37℃孵育 1 小时进行染色。将染色的细胞用倒置显微镜（Carl Zeiss，AX10 vert 200M）进行观察，拍照，使用 Image J 软件进行分析。根据染色面积计算皮层神经元的存活率，从而得到未处理的皮层神经元、100μM 的 NMDA 处理的皮层神经元、不同浓度的(-)-PA 处理的皮层神经元以及 DMSO 处理的皮层神经元的存活率的柱状图，

如图 8 所示。

将上述（1）的体外 37℃培养 7 天的皮层神经元分别用钙蛋白酶抑制剂（ALLN）、10μM 的(-)-PA 和 100μM 的 NMDA、100μM 的(-)-PA 和 100μM 的 NMDA、1000μM 的(-)-PA 和 100μM 的 NMDA 处理 15min，并 37℃再培养 24 小时。使用阿尔玛蓝染色法对皮层神经元进行神经元存活力分析，根据染色面积计算皮层神经元的存活率，从而得到未处理的皮层神经元、ALLN 处理的皮层神经元、10μM 的(-)-PA 和 100μM 的 NMDA 处理的皮层神经元、100μM 的(-)-PA 和 100μM 的 NMDA 处理的皮层神经元、以 1000μM 的(-)-PA 和 100μM 的 NMDA 处理的皮层神经元的存活率的柱状图，如图 9 所示。

（5）结果分析:

从图 4 中可以看出，100μM 的 NMDA 能够诱发细胞内钙（$[Ca^{2+}]i$）的快速流入，当使用 100μM 的 NMDA 和浓度范围从 10μM 到 1000μM 的(-)-PA 处理皮层神经元时，使$[Ca^{2+}]i$ 流入保持在较低水平，并且以剂量依赖形式改善皮层神经元的$[Ca^{2+}]i$ 流入，添加氯化钾对皮层神经元进行去极化处理能引起大量的$[Ca^{2+}]i$ 流入。从图中发现，(-)-PA 能够有效地减少 NMDA 诱导增加的$[Ca^{2+}]i$ 流入。这说明，(-)-PA 是一个谷氨酸受体潜在的可逆性抑制剂。

从图 5~7 中可以看出，50μM 的 NMDA 可在皮层神经元上可诱导出大量的内向电流，加入 100μM 和 1000μM(-)-PA 能有效抑制 NMDA 激活的电流，洗掉 NMDA 之后，膜电位又可以恢复到起始水平，说明(-)-PA 抑制 NMDA 激活的电流是可逆的。且在 100~1000μM 范围内，(-)-PA 剂量依赖性的抑制了 NMDA 激活的电流，IC50 为 175.4 ± 21.5μM，斜率因子为 0.96 ± 0.3(n=10)。再次证明了，(-)-PA 可能是一个谷氨酸受体的可逆性抑制剂。

从图 8 中可以看出，100μM 的 NMDA 处理培养的皮层神经元会导致细胞大量死亡，而任何浓度的(-)-PA 处理的皮层神经元对细胞完全没有影响，即(-)-PA 本身对培养的皮层神经元没有毒性，不会导致细胞的死亡。

从图 9 中可以看出，使用(-)-PA 对皮层神经元预处理，可以改善神经元对 NMDA 毒性的死亡，且使用的(-)-PA 浓度越大，皮层神经元的细胞死亡率

越低，即呈剂量依赖性。

综上，上述实验确定(-)-PA 对皮层神经元的谷氨酸受体有非常重要的影响。且以上实验结果清楚地证明了(-)-PA 是一个可逆的谷氨酸受体抑制剂，能在预防缺血性大脑引起的兴奋性毒性中发挥关键作用。

三、脑缺血诱导(-)-PA 在大脑缺血半影区生成，(-)-PA 对缺血动物模型的大脑具有保护作用

（1）实验动物：雄性 C57B/6 小鼠，每只 20~37g。

（2）动物模型及样品收集方法：

小鼠 MCAO（大脑中动脉闭塞）模型制作：将 MCAO 组的小鼠在异氟烷短时麻醉作用下，采用管腔内可逆性 MCAO 线栓法分别对小鼠大脑做左侧手术（Collapsin response mediatorprotein 3 deacetylates histone H4 to mediate nuclear condensation and neuronal death. Hou ST, Jiang SX, Aylsworth A, Cooke M, Zhou L (2013). Sci Rep 3:1350.）。脑缺血 1 小时，将线栓取出后，血流恢复正常，通过激光多普勒血流仪监测，并且伤口缝合。在手术过程中使用直肠探针测小鼠体温，并通过加热垫与加热灯维持体温在 37℃，且为了保证在手术过程中实验操作的一致性，血压、血液气体和 pH 值都进行了检测（Increased Mdm2expression in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. Tu Y, Hou ST, Huang Z, Robertson GS, MacManus JP (1998). J Cereb BloodFlow Metab 18:658-669.）。

小鼠大脑样品的收集：小鼠安乐死，分离小鼠左右半球大脑。选择主要包含缺血病灶组织的左半球的额叶部分（L1 与前囟 2.96-0.50），得到小鼠的大脑样品，然后将大脑样品在液氮中快速冷冻并在-80℃保存。

（3）MCAO 缺血后血液再灌注（由于 MACO 手术后，血液会自然流动到缺血处，即为血液灌注）不同时间对小鼠大脑两侧(-)-PA 含量的影响

实验动物：（1）中所述小鼠 12 只，其中对照组 3 只，实验组 9 只。

实验组小鼠处理方法：接受了（2）所述相同的手术操作，其中 3 只在术后 2 小时处死，3 只在术后 6 小时处死，3 只在术后 24 小时处死。采用（2）

所述的方法收集小鼠大脑样品。

对照组小鼠处理方法：接受了（2）所述的手术操作，但没有进行脑中动脉栓塞。术后 24 小时处死。采用（2）所述的方法收集小鼠大脑样品。

采用 UPLC/ESI-MS/MS 对所得到的大脑缺血侧和对侧样品进行(-)-PA 定量分析，得到数据做柱状图，如图 10 所示。

（4）MCAO 对小鼠大脑中缺血核心区域、半影区和对侧区域的影响

实验动物：（1）中所述小鼠 5 只。

实验小鼠处理方法：接受了（2）所述相同的手术操作，术后 24 小时处死。采用（2）所述的方法收集小鼠大脑样品。

使用 Laser Microdissection Leica LMD6 system （徕卡显微系统）分别对小鼠大脑样品进行激光显微切割，将大脑样品均划分成三个区域，缺血核心区（区域 1）、半影区（区域 2）和对侧（区域 3），如图 11 所示，将每个区域切下，使用 10 个红外线和 2 个紫外脉冲，其中，相同区域的所有细胞收集在同一个 LCM 收集管中。切割之后的细胞立即裂解，并采用 UPLC/ESI-MS/MS 进行三个区域的(-)-PA 含量测定分析，得到三个区域的(-)-PA 的含量数据做柱状图，如图 12 所示。

（5）(-)-PA 注入实验评估小鼠存活率、神经功能缺陷评估和大脑梗死面积测量

实验动物：（1）中所述小鼠 19 只，其中实验组 11 只，对照组 8 只。

实验组和对照组小鼠处理方法：接受了（2）所述相同的手术操作，术后 24 小时后，根据文献的内容(Directintraventricular delivery of drugs to the rodent centralnervous system. DeVos SL, Miller TM (2013). J Vis Expe50326..)，使用注射速度为 1.0μL/hr 的微量泵以及大于 3 天排量的蓄水槽（Alzet 1003D）（DURECT Corporation，ALZET Osmotic Pumps，Cupertino，CA），对实验组小鼠进行(-)-PA（50mg/mL）注射，对照组小鼠进行 100%生理盐水（安慰剂）的注射。提前先将微量泵浸泡在无菌生理盐水溶液中 37℃过夜，以便在植入之后迅速将(-)-PA 注入。注入之后 0.5 小时、6 小时和 24 小时进行小鼠

存活率统计，存活率统计结果作图，如图 13 所示。

注入之后 0.5 小时、6 小时和 24 小时对实验组和对照组的小鼠进行神经功能缺陷评估评分，神经功能缺陷评分采用六分制评分，评估标准为：0，正常无神经损伤症状；1，轻微转向行为，当尾巴被拎起来的时候伴有或不伴有不持续的蜷缩，侧端旋度 50%；2，轻微持续的蜷缩，侧端旋度 50%；3，强烈和即刻的持续蜷缩，小鼠持有蜷缩姿势超过 1~2 秒，小鼠鼻子几乎碰到尾巴；4，严重蜷缩造成滚筒状，丧失步行或翻正反射；5，昏迷或奄奄一息。每组至少采用 8 只小鼠，评分的平均值用于统计分析。其中，神经功能缺陷评估评分结果见图 14。

注入 24 小时后处死小鼠，对其大脑进行梗死面积测量。测量方法如下：使用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑（TTC）的染色法（Chlortetracycline and demeclocycline inhibit calpains andprotect mouse neurons against glutamate toxicity and cerebral ischemia. Jiang SX, Lertvorachon J, Hou ST, Konishi Y, Webster J, Mealing G, Brunette E,Tauskela J, Preston E (2005). J BiolChem280:33811-33818.）计算注入(-)-PA 的小鼠和注入生理盐水小鼠的大脑的梗死面积，即将小鼠的大脑样品分别切成 4 个 2mm 厚的冠状切片，在 37℃下用 5mL 2%的 TTC 染色 90min。然后，用生理盐水冲洗，并随后暴露于乙醇和二甲亚砜的混合物（乙醇和二甲亚砜的体积比为 1:1）中以溶解甲瓒产物。在黑暗中孵育 24 小时后，溶解得到的溶剂提取物在三个管中用新鲜乙醇和 Me_2SO（其中，Me 表示甲基）的混合溶剂按照体积比为 1:20 稀释，并放置在比色皿。用分光光度计测试稀释物在 485nm 处的吸光度值的平均值。TTC 染色在脑缺血侧与对侧大脑损失率由以下公式计算得到：损失率=（1-缺血侧脑的吸光度/对侧脑吸光度）× 100%。根据上述公式得到对照组和实验组的小鼠梗死面积测量结果作图，如图 15 所示。

（6）(-)-PA 抗体注入实验评估小鼠神经功能缺陷评估、前肢握力测试和大脑梗死面积测量

实验动物：（1）中所述小鼠 10 只，其中实验组 5 只，对照组 5 只。

实验组和对照组小鼠处理方法：接受了（2）所述相同的手术操作，术后24小时后，根据文献的内容(Directintraventricular delivery of drugs to the rodent centralnervous system. DeVos SL, Miller TM (2013). J Vis Expe50326..)，使用注射速度为 1.0μL/hr 的微量泵以及大于 3 天排量的蓄水槽（Alzet 1003D）（DURECT Corporation，ALZET Osmotic Pumps，Cupertino，CA），对实验组的小鼠进行(-)-PA 抗体（50mg/mL）注射，对照组的小鼠进行100%生理盐水（安慰剂）的注射。提前先将微量泵浸泡在无菌生理盐水溶液中37℃过夜，以便在植入之后迅速将(-)-PA 抗体注入。注入之后 0.5 小时、6 小时和 24 小时对对照组和实验组的小鼠按照（5）中的神经功能缺陷评估评分，统计结果作图，如图 16 所示。

注入之后 0.5 小时、6 小时和 24 小时进行小鼠前肢握力测试，测试方法如下：前肢握力测试用抓力测试器-Columbus 仪器（MyNeurolab，St.Louis，MO）测量肌肉的力量和有关神经肌肉整合的前脚掌的抓握反射握力。峰值前置放大器自动存储的峰值拉力并显示在液晶显示屏上。对于每个动物，在特定的时间点进行至少 10 次测量，计算平均值和标准误差。所得结果作图，如图17 所示。

注入 24 小时后处死小鼠，按照（5）中梗死面积的测量方法对其大脑进行梗死面积测量。得到小鼠梗死面积测量结果作图，如图 18 所示。

（7）结果分析:

从图 10 中可以看出，MACO 手术后血液再灌注 2 小时时，MCAO 引起(-)-PA 在局部性缺血小鼠的脑中含量显著升高。MCAO 处理诱导(-)-PA 表达在缺血侧脑和对侧脑，表示(-)-PA 可能在对侧脑起到保护作用。

从图 12 中可以看出，(-)-PA 水平在半影区比缺血核心显著提高，大脑对侧的(-)-PA 表达水平比缺血病灶区更高。这些研究表明，天然存在的(-)-PA 可能在缺血性脑中起保护作用。

从图 13~15 中可以看出，(-)-PA 处理小鼠与生理盐水处理的小鼠相比，具有更好的存活率，灌注(-)-PA 的小鼠的梗死面积也显著降低，在神经系统

评分，这些小鼠显示分数也有更好的改善。

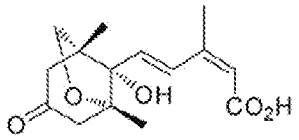
从图 16~18 中可以看出，灌注(-)-PA 抗体的小鼠与生理盐水处理的对照组相比，TTC 染色表明实验组局部缺血梗死区域更大，灌注(-)-PA 抗体的小鼠表现神经功能缺损评分和降低前爪拉伸强度变化更显著，这表明在脑中减少(-)-PA 表达恶化脑缺血的行为学结果。

以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合，为使描述简洁，未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述，然而，只要这些技术特征的组合不存在矛盾，都应当认为是本说明书记载的范围。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权利要求书

1、一种神经保护剂，包括具有如下结构式的化合物：



。

2、根据权利要求 1 所述的神经保护剂，其特征在于，还包括药学上可接受的载体。

3、根据权利要求 2 所述的神经保护剂，其特征在于，所述载体为多肽或蛋白分子。

4、根据权利要求 3 所述的神经保护剂，其特征在于，所述蛋白分子选自牛血清蛋白分子、卵清蛋白分子、钥孔血蓝蛋白分子、纤维蛋白分子及人血清蛋白分子中的一种。

5、根据权利要求 3 所述的神经保护剂，其特征在于，所述多肽选自多聚赖氨酸、多聚谷氨酸及二软脂酰氨酸中的一种。

6、根据权利要求 1 所述的神经保护剂，其特征在于，还包括药学上可接受的溶剂。

7、根据权利要求 6 所述的神经保护剂，其特征在于，所述溶剂为生理盐水或葡萄糖水溶液。

8、一种用于治疗脑部疾病或病症的方法，包括给需要治疗的客体施用有效剂量的根据权利要求 1~7 中的任何一项所述的神经保护剂。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述施用为口服给药、注射给药、呼吸道给药、皮肤给药、粘膜给药或腔道给药。

10、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述疾病或病症包括老年退行性脑病、脑中风、脑血管疾病、颅内占位性病变、癫痫、脑血栓形成、腔隙性梗死或脑栓塞。

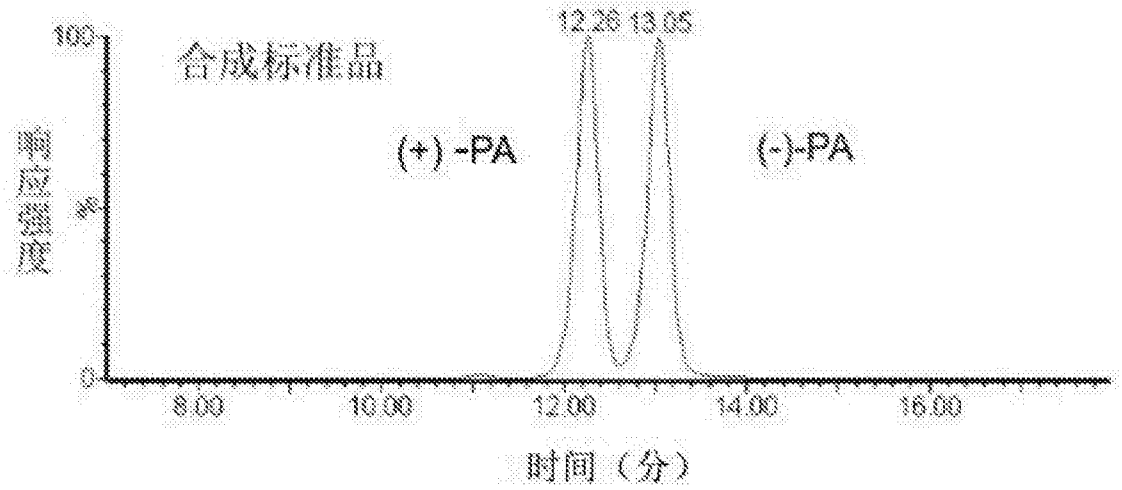

100
合成标准品
响应强度
(+) -PA
(-)-PA
12.26
13.05
0
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
时间（分）

图 1a

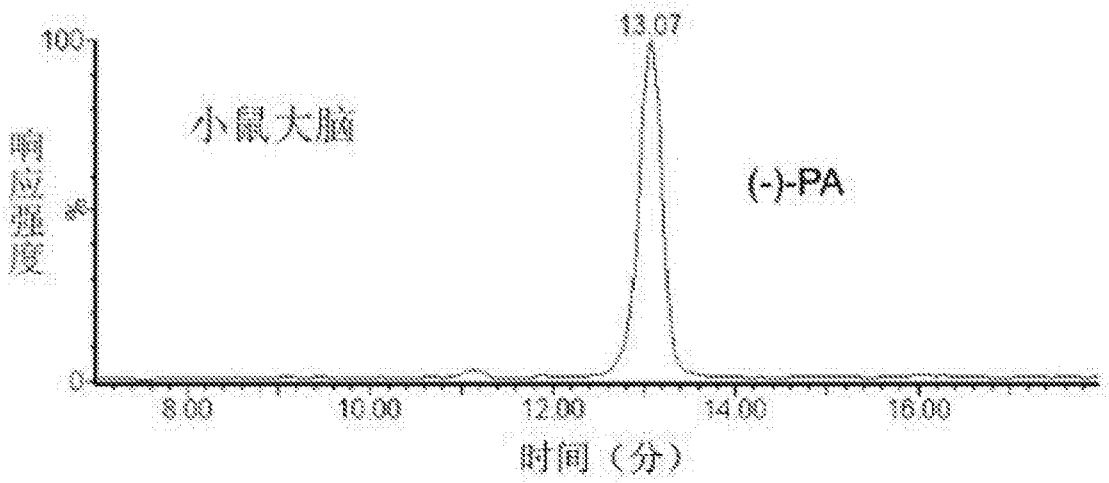

100
小鼠大脑
响应强度
(-)-PA
13.07
0
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
时间（分）

图 1b

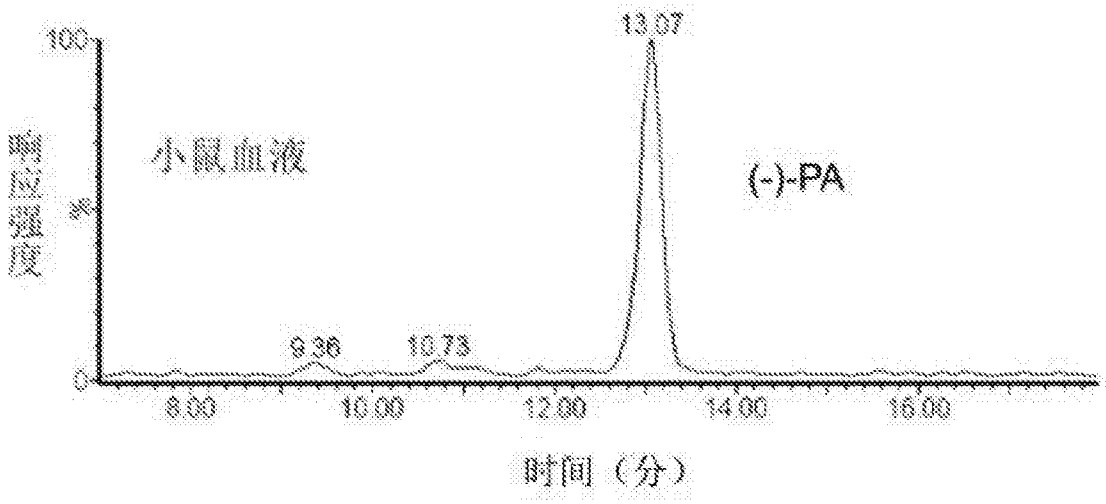

100
%
0
响应强度
小鼠血液
13.07
(-)-PA
9.36
10.73
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
时间（分）

图 1c

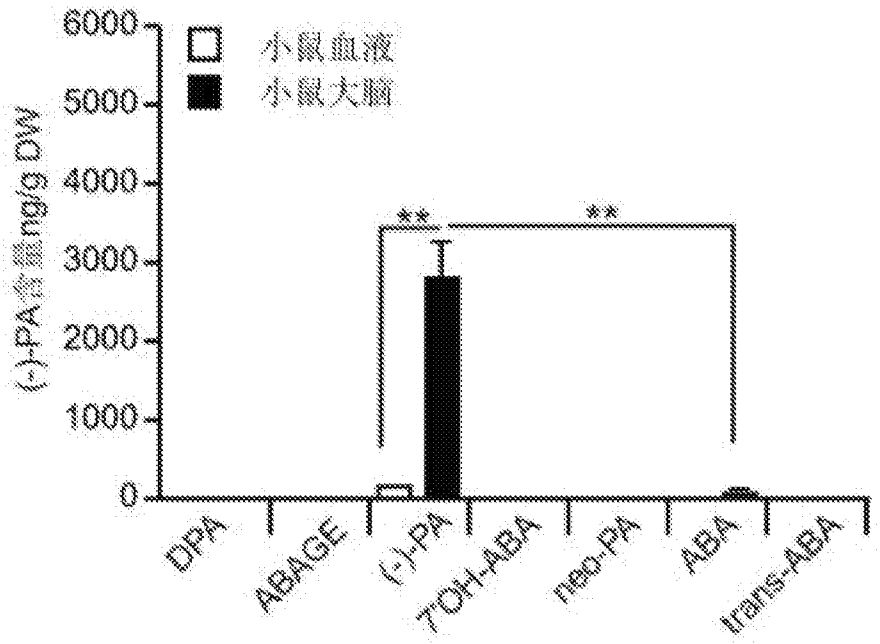

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
(-)-PA含量ng/g DW
小鼠血液
小鼠大脑
**
**
DPA
ABAGE
(-)-PA
7OH-ABA
neo-PA
ABA
trans-ABA

图 2

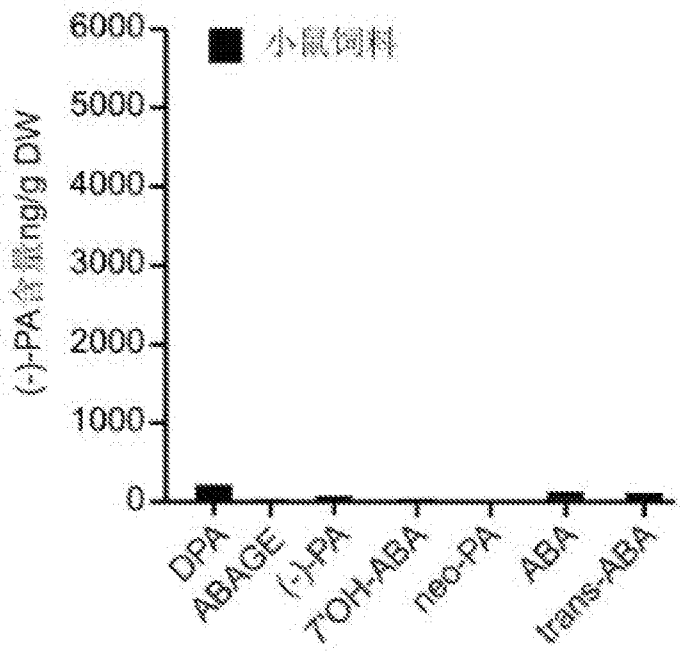

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
(-)-PA含量ng/g DW
小麦饲料
DPA
ABAGE
(-)-PA
7'OH-ABA
neo-PA
ABA
trans-ABA

图 3

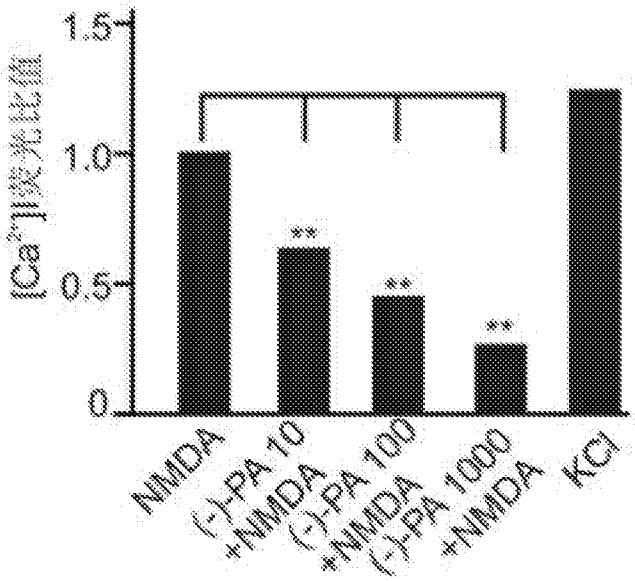

1.5
1.0
0.5
0
[Ca2+]i荧光比值
**
**
**
NMDA
(-)-PA 10 +NMDA
(-)-PA 100 +NMDA
(-)-PA 1000 +NMDA
KCl

图 4

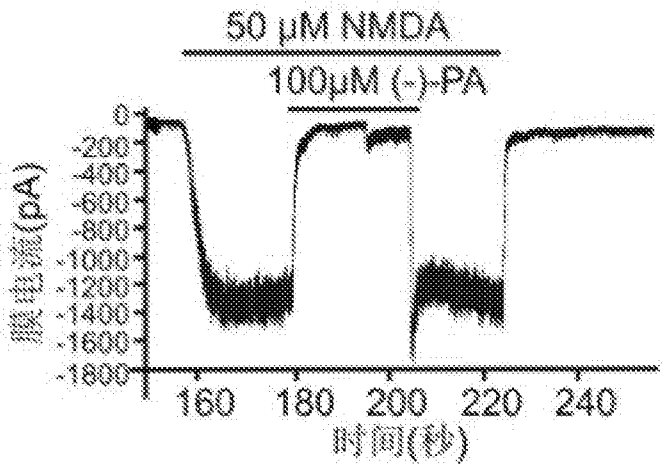

50 μM NMDA
100μM (-)-PA
膜电流(pA)
0
-200
-400
-600
-800
-1000
-1200
-1400
-1600
-1800
160
180
200
220
240
时间(秒)

图 5

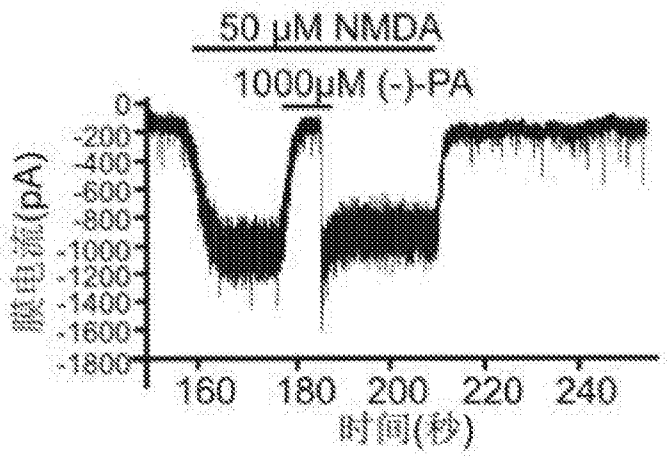

50 μM NMDA
1000μM (-)-PA
膜电流(pA)
0
-200
-400
-600
-800
-1000
-1200
-1400
-1600
-1800
160
180
200
220
240
时间(秒)

图 6

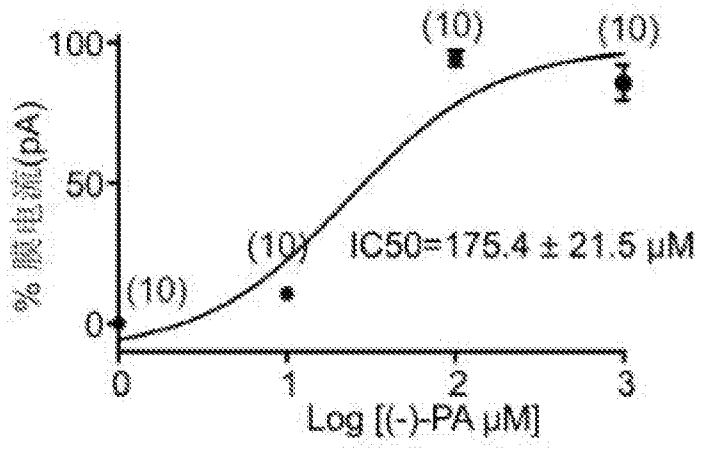

100
50
0
% 膜电流(pA)
(10)
(10)
(10)
(10)
IC50=175.4 ± 21.5 μM
0
1
2
3
Log [(-)-PA μM]

图 7

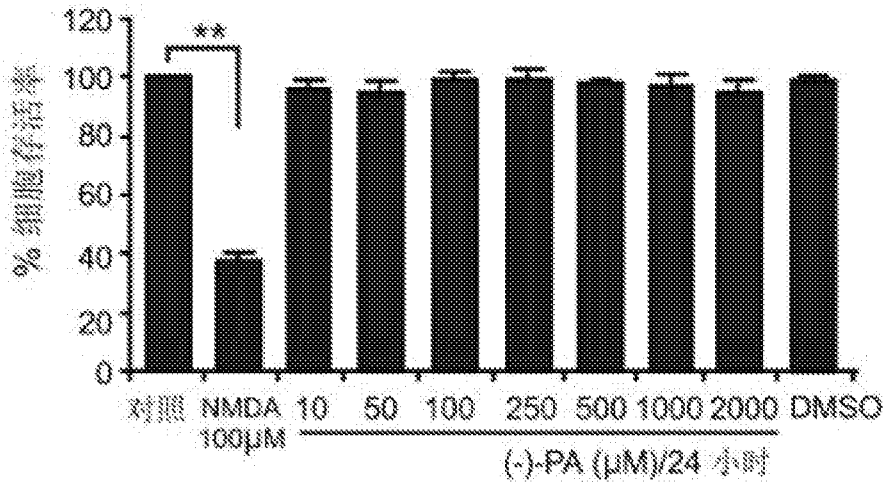

120
100
80
60
40
20
0
% 细胞存活率
**
对照
NMDA 100μM
10
50
100
250
500
1000
2000
DMSO
(-)-PA (μM)/24 小时

图 8

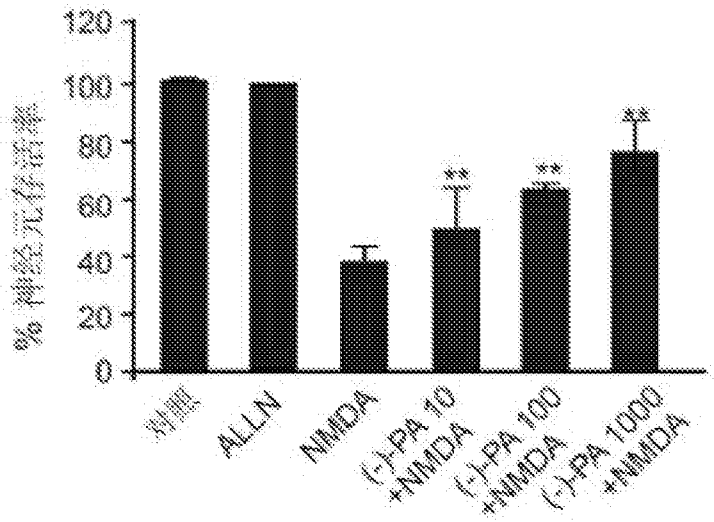

120
100
80
60
40
20
0
% 神经元存活率
**
**
**
对照
ALLN
NMDA
(-)-PA 10 +NMDA
(-)-PA 100 +NMDA
(-)-PA 1000 +NMDA

图 9

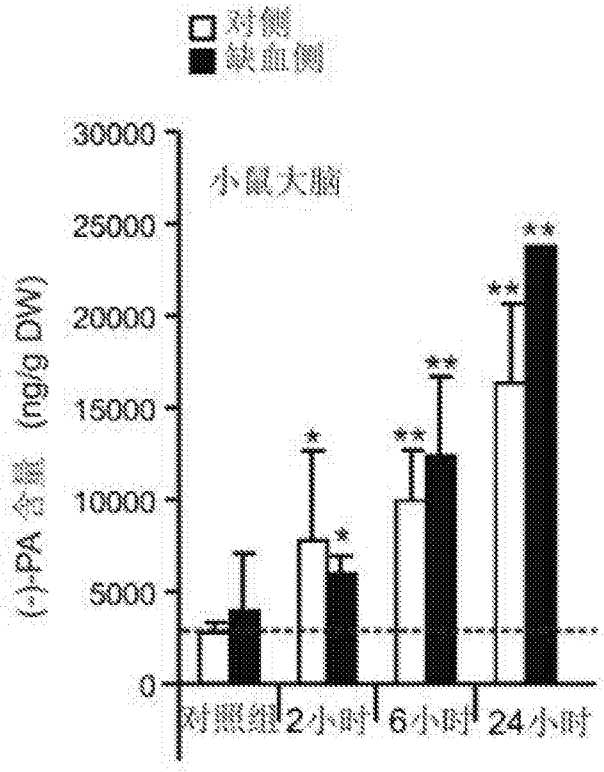

对侧
缺血侧
小鼠大脑
(-)-PA 含量 (ng/g DW)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
*
**
对照组
2小时
6小时
24小时

图 10

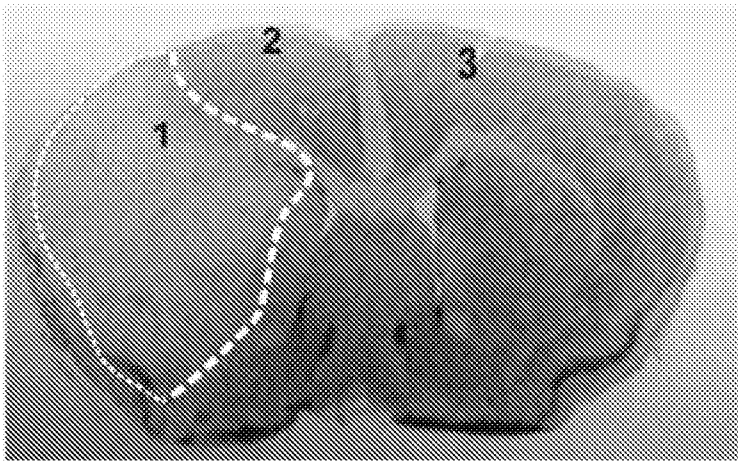

1
2
3

图 11

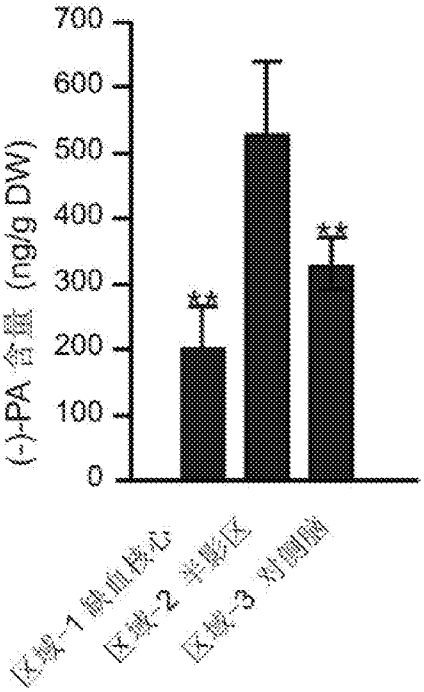

700
600
500
400
300
200
100
0
(-)-PA 含量 (ng/g DW)
**
**
区域-1 缺血核心
区域-2 半影区
区域-3 对侧脑

图 12

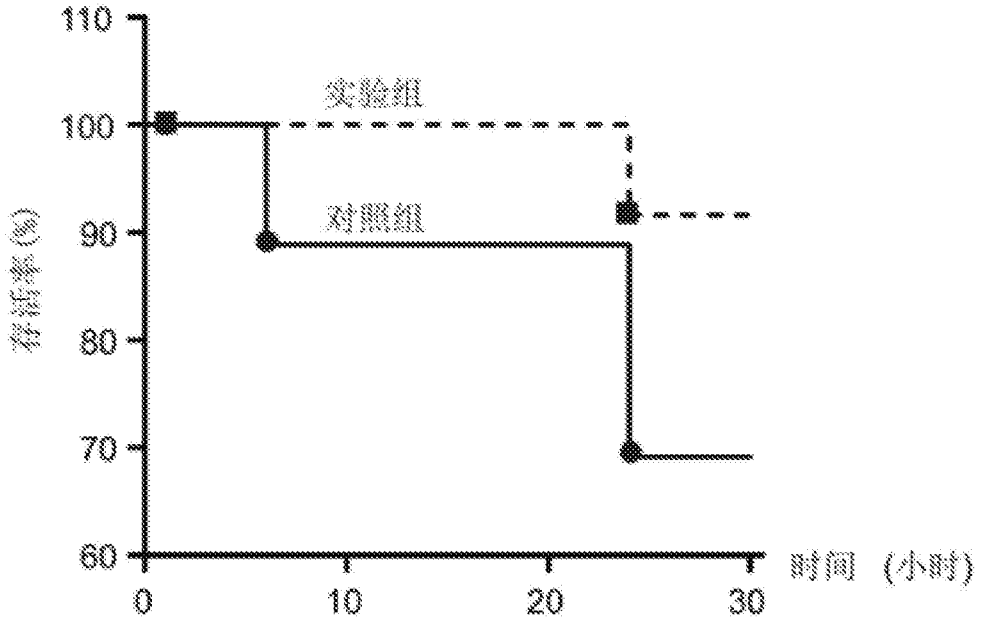

110
100
90
80
70
60
实验组
对照组
存活率 (%)
0
10
20
30
时间 (小时)

图 13

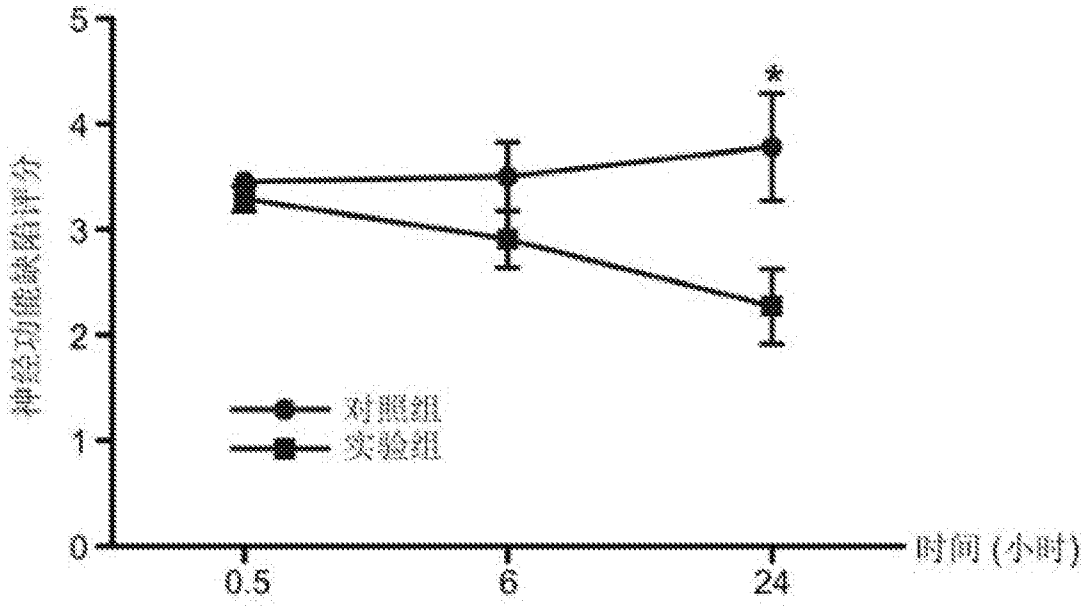

神经功能缺陷评分
5
4
3
2
1
0
*
对照组
实验组
0.5
6
24
时间（小时）

图 14

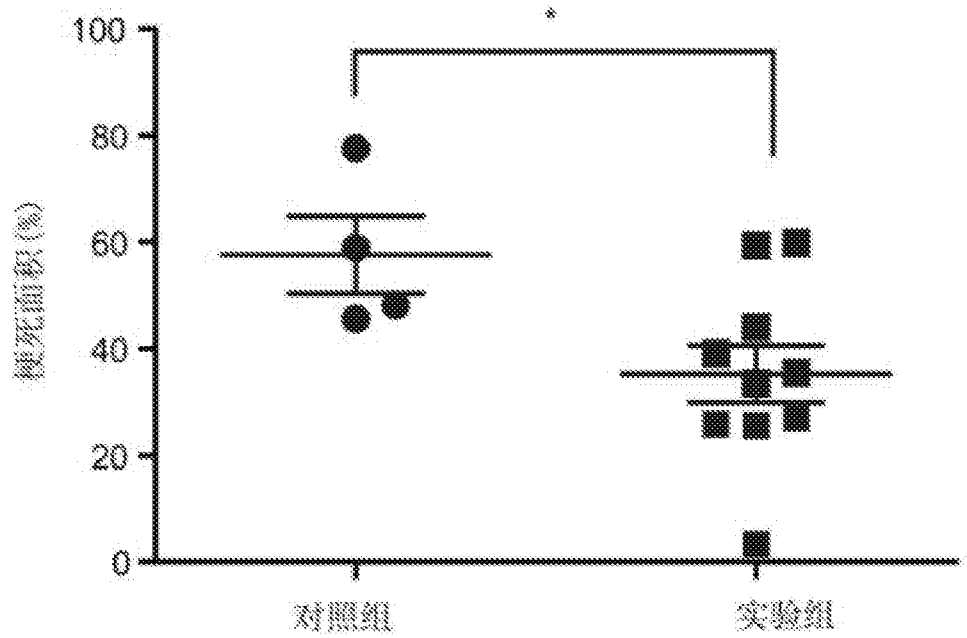

梗死面积（%）
100
80
60
40
20
0
*
对照组
实验组

图 15

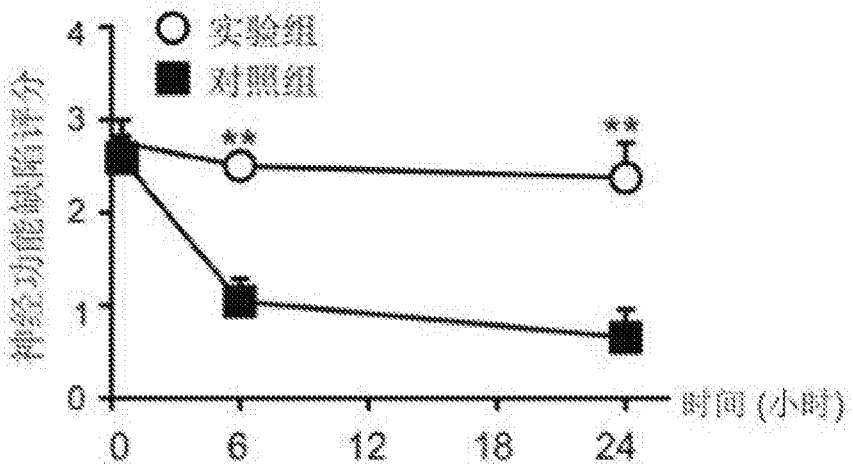

实验组
对照组
神经功能缺陷评分
4
3
2
1
0
**
**
0
6
12
18
24
时间 (小时)

图 16

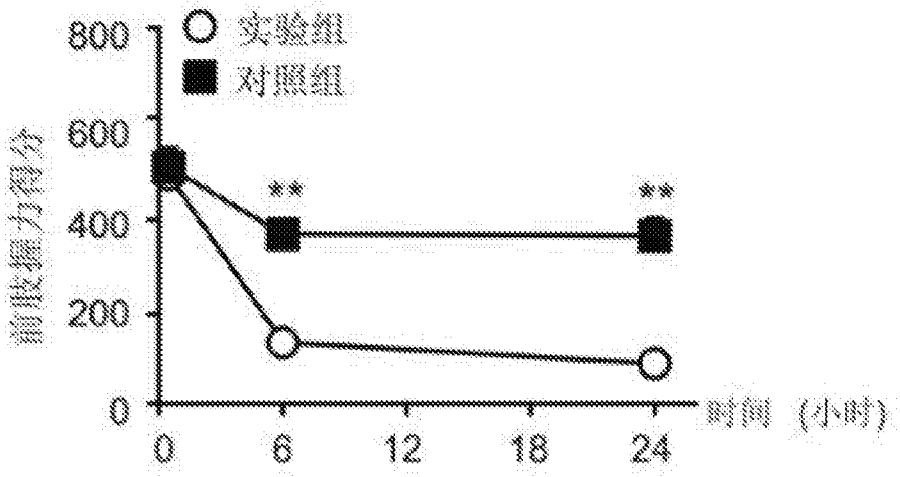

实验组
对照组
前肢握力得分
800
600
400
200
0
**
**
0
6
12
18
24
时间 (小时)

图 17

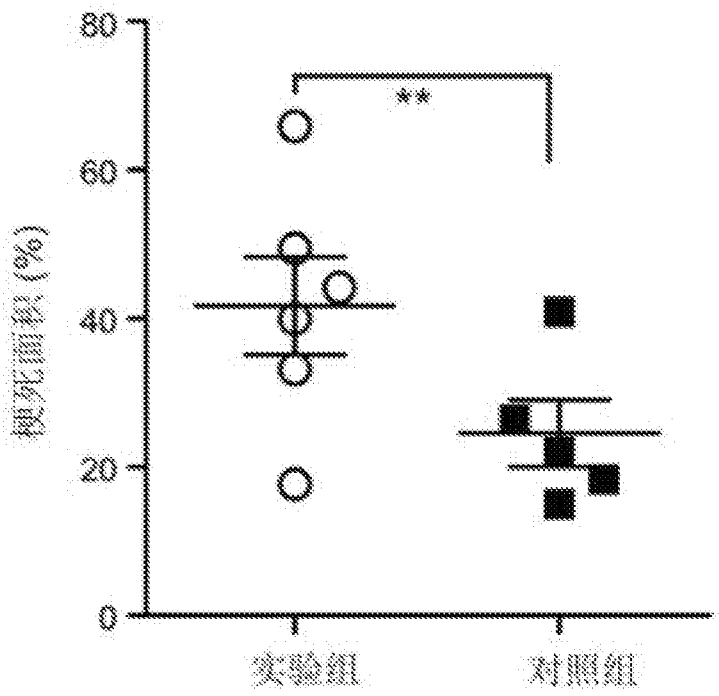


图 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/103782

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/343 (2006.01) i; A61K 47/42 (2017.01) i; A61P 25/00 (2006.01) i; A61P 9/10 (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)

A61K; A61P

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)

CNPAT(Cprs), CTCMPD, CNKI Full-Text database, Chinese Medicine Abstract, WPI, EPODOC, stn: 红花菜豆酸, 化合物结构式, 神经保护, 脑卒中, 中风, 神经退行性, 脑, 癫痫, 脑栓塞, stroke, infarction, neuroprotective, neuroprotectant, neuroprotection, neurodegeneration, epilepsy, cerebral, cerebral embolism

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104945355 A (WUHAN OPTICS VALLEY HUMANWELL BIOLOGICAL MEDICINE CO., LTD.), 30 September 2015 (30.09.2015), see abstract	1-10
A	CN 102232993 A (NANJING ZELANG MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.), 09 November 2011 (09.11.2011), description, paragraph 0002	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	Date of mailing of the international search report
20 April 2017	19 May 2017

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, Yanyan
Telephone No. (86-10) 62089312

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/103782

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:

1. ☒ Claims Nos.: 8-10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] The claimed application of claims 8-10 relates to a treatment performed on a human body or an animal body, which falls within the subject matter for which a search is not required under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv). However, the examiner has still carried out a search on the claimed corresponding pharmaceutical application of claims 8-10.

2. ☐ 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:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/103782

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104945355 A	30 September 2015	None	
CN 102232993 A	09 November 2011	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/103782

A. 主题的分类

A61K 31/343(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 9/10(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)

A61K; A61P

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））

CNPAT(Cprs), CTCMPD , CNKI Full-Text database, Chinese Medicine Abstract, WPI, EPODOC, stn; 红花菜豆酸，化合物结构式，神经保护，脑卒中，中风，神经退行性，脑，癫痫，脑栓塞，stroke, infarction, neuroprotective, neuroprotectant, neuroprotection, neurodegeneration, epilepsy, cerebral,cerebral embolism

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
A	CN 104945355 A (武汉光谷人福生物医药有限公司) 2015年 9月 30日 (2015-09-30) 参见摘要	1-10
A	CN 102232993 A (南京泽朗医药科技有限公司) 2011年 11月 9日 (2011-11-09) 说明书第0002段	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 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

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“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）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“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

“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

“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

“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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2017年 4月 20日	2017年 5月 19日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
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	陈晏晏
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62089312

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/103782

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： 8-10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求8-10所要求保护的应用涉及对人体或动物体的治疗，属于不要求检索的主题(PCT条约第17 (2) (a) (i)和细则第39. 1(iv))。但是审查员还是针对权利要求8-10所要求的相应制药应用进行了检索。

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/CN2016/103782

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 104945355 A	2015年 9月 30日	无	
CN 102232993 A	2011年 11月 9日	无	