(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
2022 年 5 月 12 日 (12.05.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/095057 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 33/14 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61K 38/49 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/127619

(22) 国际申请日: 2020 年 11 月 9 日 (09.11.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (**SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY**) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 畅君雷 (**CHANG, Junlei**); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 冀雅彬 (**JI, Yabin**); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 深圳市威世博知识产权代理事务所（普通合伙） (**CHINA WISPRO INTELLECTUAL PROPERTY LLP.**); 中国广东省深圳市南山区高新区粤兴三道8号中国地质大学产学研基地中地大楼A806, Guangdong 518057 (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, IT, 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:** PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND MEDICAL USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种医药组合物及其医药用途

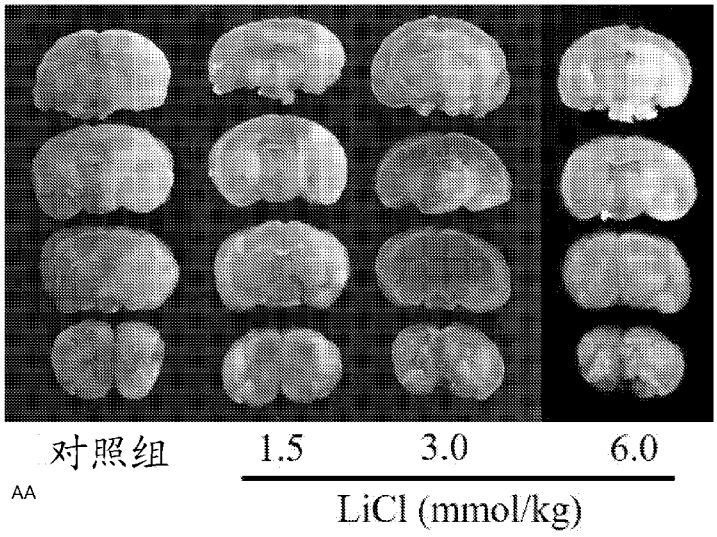


图 1 AA Control group

(57) **Abstract:** A pharmaceutical composition and the medical use thereof. The pharmaceutical composition comprises an effective dose of a lithium agent and a pharmaceutically acceptable carrier, and plays an effective pharmaceutical role in the treatment of ischemic stroke, blood-brain barrier injury and blood-brain diseases.

(57) 摘要: 一种医药组合物及其医药用途。该医药组合物包括有效剂量的锂剂和医药上可接受的载体，在治疗缺血性脑卒中、血脑屏障损伤及血脑疾病方面起到有效的药物作用。

[见续页]

WO 2022/095057 A1

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))。

一种医药组合物及其医药用途

【技术领域】

本申请涉及医药技术领域，特别是涉及一种医药组合物及其医药用途。

【背景技术】

缺血性脑卒中（又名脑梗死）是人类疾病谱当中致死率和致残率最高的疾病之一，对其最佳的治疗方法是包括阿替普酶（rtPA）和手术取栓在内的血管再通疗法，而他们均有严格的时间窗限制，导致相当比例的病人不能接受此类治疗。其中，血管再通疗法的时间窗的设定主要是为了避免或减少再灌注导致的血脑屏障（blood-brain barrier，BBB）损害。而如果能有效保护 BBB，那么血管再通疗法的时间窗就有可能被延长，从而有利于使更多的人接受血管再通治疗。但目前临床尚无有效的 BBB 保护药物。

其中，急性缺血性脑卒中发病后的超早期，现有的主要治疗方法是阿替普酶 rtPA 静脉溶栓和动脉内手术取栓术，而它们均有严格的时间窗限制，前者为 4.5 小时，后者为 6-8 小时（少数病人可以延长到 24 小时）。临床研究显示，超过此时间窗进行血管开通治疗会出现诸如出血转化、脑水肿等严重并发症，因此，相当比例急性脑梗死病人由于没有及时就医、距离医院路程远、路上塞车等主、客观因素导致到达医院时已超过血管开通治疗的时间窗，而不能接受血管开通治疗。同时，研究表明，rtPA 本身对于 BBB 有损害，即使在时间窗内使用，仍有相当比例病人会出现诸如出血转化、脑水肿等 BBB 损害表型。

目前，临床尚无针对性的 BBB 保护药物。有脑水肿或出血转化时，如已诱发脑疝，轻者使用 20%甘露醇、高渗盐、利尿剂等脱水治疗，重者进行“去骨瓣减压术”；而如果未诱发脑疝，一般给予病人镇静、降压、纠正水电酸碱平衡紊乱等支持治疗。

【发明内容】

本申请主要解决的技术问题是提供一种医药组合物及其医药用途，能够在治疗缺血性脑卒中及其所导致的血脑屏障损伤起到有效的药物作用。

为解决上述技术问题，本申请采用的一个技术方案是：提供一种治疗缺血

性脑卒中的医药组合物，该医药组合物包括：治疗缺血性脑卒中有效剂量的锂剂和医药上可接受的载体，其中，锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

其中，锂剂为氯化锂和/或碳酸锂。

其中，医药组合物呈剂量单位形式。

其中，医药组合物中的锂剂的剂量为 1.5-6.0 毫摩尔/千克中的一种，其中，毫摩尔/千克为锂剂的物质的量相对于患者的质量。

其中，医药组合物中的锂剂的剂量为 3.0 毫摩尔/千克。

其中，医药组合物还包括治疗缺血性脑卒中有效剂量的阿替普酶，且医药组合物中的阿替普酶的剂量为 0.9 毫克/千克，其中，毫克/千克为阿替普酶的质量相对于患者的质量。

为解决上述技术问题，本申请采用的另一个技术方案是：提供一种锂剂在治疗缺血性脑卒中药物的制备中的用途，其中，该锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

其中，锂剂为氯化锂和/或碳酸锂。

为解决上述技术问题，本申请采用的又一个技术方案是：提供一种治疗血脑屏障损伤的医药组合物，该医药组合物包括：治疗血脑屏障损伤的有效剂量的锂剂和医药上可接受的载体，其中，锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

为解决上述技术问题，本申请采用的又一个技术方案是：提供一种锂剂在治疗血脑屏障损伤的药物的制备中的用途，其中，该锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

为解决上述技术问题，本申请采用的又一个技术方案是：提供一种治疗血脑疾病的医药组合物，该医药组合物包括：治疗血脑疾病的有效剂量的锂剂和医药上可接受的载体，其中，锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

为解决上述技术问题，本申请采用的又一个技术方案是：提供一种锂剂在治疗血脑疾病的药物的制备中的用途，其中，该锂剂用于上调脑血管内皮细胞

Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

本申请的有益效果是：区别于现有技术的情况，本申请医药组合物中的锂剂对上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，以及对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构的保护有着重要的作用，进而能够对血脑屏障进行保护。因此，锂剂能够在治疗缺血性脑卒中及其所导致的血脑屏障损伤起到有效的药物作用。

【附图说明】

图1是采用 TTC 对小鼠大脑的冠状切片进行染色后的试验对比示意图；

图2是小鼠梗死体积在脑半球内的相对占比示意图；

图3是伊文斯兰染色的相对占比的示意图；

图4是伊文斯兰渗出量占半球重量的相对百分比的示意图；

图5是免疫荧光双重染色观察内源性 IgG 从血管中的渗出情况的示意图；

图6是IgG 从血管内渗出的相对密度柱状示意图；

图7是神经行为学评分柱状示意图；

图8是免疫荧光双重染色观察神经元凋亡情况示意图；

图9是小鼠梗死区神经元凋亡数量相对密度柱状图；

图10是免疫荧光双重染色观察 active β-catenin 在内皮细胞上的表达情况示意图；

图11是active β-catenin 在内皮细胞上表达的相对密度柱状图；

图12是各组梗死区脑组织 active 和 total β-catenin 蛋白水平示意图；

图13是图 12 中免疫印迹法相对密度柱状图；

图14是图 12 中免疫印迹法相对密度又一柱状图；

图15是各组脑梗死组织中 axin2 水平柱状图；

图16是各组脑梗死组织中 apcdd1 mRNA 水平柱状图；

图17是不同浓度氯化锂对于 bEnd.3 Axin2 mRNA 水平的影响示意图；

图18是不同浓度氯化锂对于 bEnd.3 TCF/LEF TOPflash 值的影响示意图；

图19是通过敲除 Fzd4 构建了 Wnt/β-catenin 通路缺陷的 bEnd.3 细胞系对应的氯化锂的效果示意图；

图20是通过敲除 Fzd4 构建了 Wnt/β-catenin 通路缺陷的 bEnd.3 细胞系对应的氯化锂的又一效果示意图;

图 21 是各组 axin2 mRNA 水平柱状图。

【具体实施方式】

下面结合附图和实施方式对本申请进行详细说明。

本申请提供一种治疗缺血性脑卒中的医药组合物，该医药组合物包括：治疗缺血性脑卒中有效剂量的锂剂和医药上可接受的载体。

缺血性脑卒中是指由于脑的供血动脉（颈动脉和椎动脉）狭窄或闭塞、脑供血不足导致的脑组织坏死的总称。有四种类型的脑缺血：短暂性脑缺血发作（TIA）；可逆性神经功能障碍（RIND）；进展性卒中（SIE）；完全性卒中（CS）。TIA 无脑梗死存在，而 RIND、SIE 和 CS 有不同程度的脑梗死存在。

从缺血的影响范围可将脑缺血分为局限性脑缺血和弥漫性脑缺血。局限性脑缺血的病因有：大脑中动脉栓塞；颅外颈内动脉或椎动脉狭窄、闭塞或血栓形成；脑动脉痉挛。弥漫性脑缺血的病因有：心搏骤停、低血压、贫血、低血糖等。

其中，现有的对于缺血性脑卒中（又名脑梗死）的最佳治疗方法是采用包括阿替普酶（rtPA）和手术取栓在内的血管再通疗法，而他们均有严格的时间窗限制，导致相当比例病人不能接受此类治疗。血管再通疗法的时间窗设定主要是为了避免或减少再灌注导致的血脑屏障损害，而阿替普酶 rtPA 本身对于血脑屏障有损害，即使在时间窗内使用仍有部分病人会出现诸如出血转化、脑水肿等 BBB 损害表型。但如果能有一种 BBB 保护剂和 rtPA 联用，以减轻其对于 BBB 的损害，那将提高血管再通治疗的有效性，血管再通疗法的时间窗就有可能被延长，并有利于使更多的人接受血管再通治疗。

锂剂在目前的临床或基础研究中的主要用途是对治疗躁狂和抑郁交替发作的双相情感性精神障碍有预防和治疗作用。本申请的发明人在实验研究中发现，在将锂剂用于小鼠的缺血性脑卒中时，能够上调其脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 通路，且对于小鼠脑梗死急性期 BBB 破坏也存在有明显的保护作用，从而潜在地增加了锂剂的适应症。

此外，虽然目前已有靶向性的 Wnt/β-catenin 通路激动剂，但尚处于实验阶

段。鉴于锂剂是一种临床常用的精神科药物，有望直接进行临床试验和应用。

而本申请的发明人在实验研究中发现，锂剂具有 BBB 功能和神经细胞的双重保护作用。且锂剂通过上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 通路，能够改善脑血管内皮细胞的功能完整，并能够对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护，从而实现对 BBB 的保护作用。

其中，该锂剂为氯化锂（LiCl）和/或碳酸锂（Li_2CO_3）。而在其他实施例中，该锂剂还可以是氢化锂、氮化锂及氢氧化锂等锂的化合物中任一合理的一种或多种混合，本申请对此不做限定。

其中，医药组合物呈剂量单位形式。

其中，医药组合物中的锂剂的剂量为 1.5-6.0 毫摩尔/千克中的一种，该毫摩尔/千克为锂剂的物质的量相对于患者的质量。而在其他实施例中，该医药组合物在具体的人体上使用时，该医药组合物中的锂剂的剂量还可以综合考虑药物的毒副作用或血药浓度等因素的变化，而采用其他任一合理的剂量，本申请对比不做限定。

其中，医药组合物中的锂剂的剂量为 3.0 毫摩尔/千克。

其中，医药组合物还包括治疗缺血性脑卒中有效剂量的阿替普酶，且医药组合物中的阿替普酶的剂量为 0.9 毫克/千克，该毫克/千克为阿替普酶的质量相对于患者的质量。

本申请还提供一种锂剂在治疗缺血性脑卒中药物的制备中的用途，其中，该锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

其中，该锂剂为氯化锂和/或碳酸锂。

本申请还提供一种治疗血脑屏障损伤的医药组合物，该医药组合物包括：治疗血脑屏障损伤的有效剂量的锂剂和医药上可接受的载体，其中，该锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

其中，该锂剂为氯化锂和/或碳酸锂。

其中，医药组合物呈剂量单位形式。

其中，医药组合物中的锂剂的剂量为 1.5-6.0 毫摩尔/千克中的一种，该毫摩尔/千克为锂剂相对于患者的质量。

其中，医药组合物中的锂剂的剂量为 3.0 毫摩尔/千克。

本申请还提供一种锂剂在治疗血脑屏障损伤的药物的制备中的用途，其中，该锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

其中，该锂剂为氯化锂和/或碳酸锂。

本申请还提供一种治疗血脑疾病的医药组合物，该医药组合物包括：治疗血脑疾病的有效剂量的锂剂和医药上可接受的载体，其中，锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

其中，该锂剂为氯化锂和/或碳酸锂。

其中，医药组合物呈剂量单位形式。

其中，医药组合物中的锂剂的剂量为 1.5-6.0 毫摩尔/千克中的一种，该毫摩尔/千克为锂剂相对于患者的质量。

其中，医药组合物中的锂剂的剂量为 3.0 毫摩尔/千克。

本申请还提供一种锂剂在治疗血脑疾病的药物的制备中的用途，其中，该锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

其中，该锂剂为氯化锂和/或碳酸锂。

本文所述锂剂可构成医药组合物的活性成分，且通常可与适当选择的合适赋形剂或载体混合以口服片剂、静脉注射剂或胶囊的形式给药。例如片剂、胶囊、丸剂、栓剂和散剂等剂量组合物取决于预定的给药方式，其可通过任何可接受的途径。这些给药途径包括经口服、静脉注射（静注）、肌肉注射（肌注）、皮下注射（皮下）。在一名患者中可以使用这些途径中的一或多种。在一实施方式中，本申请的化合物用作静脉注射剂量形式给药且可与无毒的医药上可接受的非活性载体组合，例如水、甘油、乙醇、生理盐水等等。也可以在口服混合物中加入通常用作粘合剂、崩解剂和着色剂的惰性赋形剂。

需要时，所给予的医药组合物也可包含少量的无毒物质，例如 pH 缓冲剂、乳化剂、乙酸钠等。使用化合物的剂量方案将取决于患者的物种、性别、体重、年龄、医学状况、给药途径以及所治疗病症的严重程度。熟练的医师可以很容易地确定和规定治疗疾病的药物有效剂量。

视患者的疾病和状况而定，本文所用术语“治疗”包括治愈治疗、姑息治疗和预防性治疗中的一种或多种。各活性化合物所施用的精确剂量将根据许多

因素而变化，这些因素包括但不限于患者的类型和所治疗疾病状态的类型、患者的年龄、以及给药途径。

对于上述治疗用途来说，所施用的剂量当然会随所施用方式、所需治疗以及所指示的疾病而变化。总日剂量可以单次剂量或分次剂量施用。本申请也涵盖缓释组合物。

举例而言，医药组合物可以呈适合口服投药的形式，如片剂、胶囊、丸剂、散剂、缓释调配物及溶液中的一种；或，该医药组合物也可以呈适合静脉注射的形式，如输液瓶或输液袋。医药组合物可以呈适合于精确剂量的单次施用的单位剂量形式。医药组合物将包括常规的医药载体和活性化合物。另外，它可包括其他药用或医药剂、载体、佐剂等。

合适的医药载体包括惰性稀释剂或填充剂、水。若需要，医药组合物可包含另外的成分，例如调味剂、粘合剂和类似成分。因此对于口服给药，含例如柠檬酸等各种赋形剂的片剂可以与各种崩解剂（例如淀粉、海藻酸和某些复合硅酸盐）以及粘合剂（例如蔗糖、明胶和阿拉伯胶）一起采用。另外，例如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石等润滑剂经常用于制备片剂。类似类型的固体组合物也可用于软和硬填充明胶胶囊中。这些组合物的有用组分包括乳糖或奶糖和高分子量聚乙二醇。当口服给药需要使用水混悬剂或酏剂时，其中的活性化合物可以与各种增甜剂或调味剂、色素或染料以及视需要乳化剂或助悬剂以及稀释剂（例如水、乙醇、丙二醇、甘油）或其组合相结合。而对于静脉注射给药，可以与蒸馏水或生理盐水一起使用。

所述领域的技术人员熟知或将明了制备具有特定量的活性化合物的各种医药组合物的方法。

本文所列剂量范围仅为例示性的，并不打算限制所主张组合物的范围或实践。举例而言，剂量可以根据药物代谢动力学或药效学参数调整，药物代谢动力学或药效学参数可包括临床效应如毒效应和/或实验室值。因此，本申请涵盖本领域技术人员所确定的患者内剂量递增。确定施用化疗剂的合适剂量和方案在相关领域中为人熟知，且一旦提供本文所公开的教义，应被理解为被所述领域的技术人员所涵盖。

本申请的医药组合物可以散装形式、以单个单位剂量形式、或以多个单位剂量形式制备、包装或出售。本文所用“单位剂量”是包含预定量的活性化合物的医药组合物的个别量。活性化合物的量通常等于将施用至受试者的活性化

合物的剂量、或此一剂量的一个方便的分数，例如，举例而言，此一剂量的一半或三分之一。

本申请医药组合物中活性化合物、医药上可接受的载体、及任何其他成分的相对量将根据所治疗受试者的身份、大小和状况且进一步根据组合物的投药途径而变化。举例来说，组合物可包含0.1%与100%(w/w)之间的活性成分。

除活性化合物外，本申请的医药组合物可进一步包含一种或多种另外的如上所讨论的治疗有效化合物。

下面以具体的数据来说明锂剂在治疗缺血性脑卒中方面提供有效的药物作用。其中，锂剂以氯化锂为例。

本申请采用的模型是小鼠大脑中动脉栓塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）1小时（h），血管再通48h的脑缺血再灌注模型，观察锂剂脑梗死超早期使用的干预效果。具体步骤如下：

1、动物规程和锂剂治疗

首先获取到8至10周大，且体重为20至23 g的C57BL/6雄性小鼠。将这些小鼠在无病原体的动物设施中进行12小时的光照和黑暗循环饲养。随机选取小鼠用于假手术、缺血模型或缺血后的治疗研究。在对其进行外科手术时，首先在诱导室中用4％的异氟烷对其进行诱导麻醉，并通过面罩输送2％的异氟烷维持麻醉。在整个手术过程中，使用加热垫将每只小鼠的核心温度维持在37±0.5°C，并通过改良的腔内纤维模型对该小鼠进行诱导、短暂性大脑中动脉闭塞（MCAO）处理。在MCAO持续60分钟后，通过缩回纤维建立再灌注。

在整个再灌注期间，小鼠可以自由获取食物和水。在MCAO持续48小时后，由观察者对该小鼠的神经功能进行评估，比如，进行缺损评分（20），抓握测试评分（21）和水平阶梯测试评分（22）。根据预先制定的排除计划，将手术后不存在神经功能缺损的小鼠排除。

在MCAO再灌注后，立即在小鼠的腹膜内（ip）注射浓度为2％的氯化锂（LiCl），腹膜内（ip）再灌注开始，然后以相同剂量在间隔24小时后再次注射。

2、梗死面积分析

再灌注48小时后，用异氟烷深度麻醉小鼠。取出小鼠的整个大脑，并在一个特殊的凹槽中进行冠状切片（厚度2 mm）。将切片立即浸入1 ml 1％的2,3,5-三苯基四唑氯化物（TTC）中，并在37°C下孵育10分钟。然后，在室温下将TTC溶液替换为4％多聚甲醛1小时。用数码相机对切片进行拍照，并通过ImageJ

软件（基于 java 的公共的图像处理软件）测量梗死面积。为了消除缺血后水肿对损伤体积的影响，如先前所述纠正了梗死面积（24）。其中，梗塞面积（%）的计算公式为[（（左半球的体积–右半球的非梗塞体积）/左半球的体积）100%。

3、伊文斯兰泄漏测量

使用伊文斯兰（Evans blue，一种生物染色剂，化学式为 6,6'-[[3,3'-二甲基(1,1'-二苯基)-4,4'-二基]双(偶氮基)]双(4-氨基-5-羟基-1,3-萘二磺酸)四钠盐）进行灌注，通过眼眶后静脉内（i.v.）注射施用 100 μl2%伊文斯兰 18-20h 后，用异氟烷深度麻醉小鼠，然后经左心室经 20 ml 冷盐水经心脏向搏动的心脏灌注，以去除血管内染料。取出小鼠大脑，并用数码相机拍照。然后将脑分为同侧缺血半球和对侧非缺血半球，并在 1ml 50%三氯乙酸中匀浆并离心（10,000 rpm，20 分钟），对上述溶液用乙醇稀释四倍后，用荧光读取器（620 nm 激发；680 nm 发射）测量伊文斯兰的浓度，并表示为 μg/g 脑组织。

4、免疫荧光和 TUNEL 检测染色

将冷冻的 7μm 厚切片在室温下在粘附显微镜载玻片上干燥，然后在 PBS（磷酸缓冲盐溶液）中复水。在室温下，将切片在 PBS + 0.2% Triton X-100 中的 10% 正常山羊血清中封闭 1 小时。将样品与以下一级抗体在 PBS + 5% 山羊血清+ 0.2% Triton X-100 中于 4°C 下孵育：仓鼠抗小鼠 CD31（血小板-内皮细胞粘附分子），驴抗小鼠 IgG（免疫球蛋白 G），兔抗 claudin-5（供紧密连接蛋白-5），兔抗 ZO-1（闭锁连接蛋白 1），兔抗胶原蛋白 IV（静脉内），兔抗 laminin（层粘连蛋白），兔抗结蛋白兔抗活性 β-连环蛋白。通过在 PBS 中冲洗 5 分钟（3 次）来去除多余的抗体。然后将样品与以下二级荧光标记的抗体在室温下孵育 1 小时：Cy3（受激发后肉眼可见的红光）山羊抗仓鼠 IgG 和 Alexa Fluor（荧光染料）488 驴抗兔 IgG 以 PBS + 5 稀释 1：500 % 山羊血清+ 0.2% Triton X-100 在室温下放置 1 小时。

其中，对末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP（脱氧尿嘧啶核苷三磷酸）-地高辛配基的末端标记（TUNEL）进行的染色，是使用 TUNEL FITC（细胞凋亡检测试剂盒）进行的。而对于双免疫荧光染色，将 TUNEL 切片在 PBS 中洗涤，并在 4°C 下与兔抗 NeuN（神经核抗原）一起孵育一整晚，然后在室温下与 Alexa Fluor 647 驴一起孵育 1 h 抗兔 IgG。通过在 PBS 中冲洗 5 分钟（3 次）来去除多余的抗体。将载玻片用 DAPI（4',6-二脒基-2-苯基吲哚）固定在防褪色固定介质中，并用显微镜成像，以获得 10、20 或 40 个图像。通过 ImageJ（基于

java 的公共的图像处理软件）定量免疫荧光信号面积或密度，并通过每只小鼠 5 至 8 个随机缺血区域中的血管面积（CD31 信号面积）进行归一化。

5、蛋白质印迹分析

从 2 毫米厚的冠状切片的缺血侧（约 3.30 毫米处）提取蛋白质至大脑前脑，并通过 Western（蛋白质印迹法）印迹进行分析。闭塞 48 h 后收集脑组织。通过补充蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA（从动物组织和动物细胞中抽取的可溶性蛋白）裂解缓冲液分离并收集脑组织蛋白质，并根据标准方案通过 BCA（BCA 蛋白浓度检测）测定进行定量。在 10％SDS-PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）凝胶上分离等量的每个样品的蛋白质裂解物。将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜上，然后将聚偏二氟乙烯膜与一抗一起孵育，包括兔抗 claudin-5，兔抗 ZO-1，兔抗闭合蛋白，兔抗 MMP-9，兔抗 β-连环素，兔抗 β-连环素，兔抗磷酸-JNK Thr183 / Tyr185（兔抗磷酸-c-Jun 氨基末端激酶-苏氨酸 286/苏氨酸 185），兔抗 JNK（c-Jun 氨基末端激酶），兔抗磷酸- Camk II Thr286（钙调蛋白激酶 II-苏氨酸 286），兔抗 CamkII（钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ），稀释比例为 1：1,000。β-肌动蛋白用作标准化的加载对照。将膜与相应的二抗一起孵育，并使用 GelView 6000M 系统（核酸染料-6000M）显影印迹。

6、实时定量 PCR（聚合酶链式反应）

使用 Direct-RNA MiniPrep（直接-RNA-质粒提取试剂盒）试剂盒提取总 RNA。使用逆转录 Supermix（以对象为基础的宏语言）进行 RT-qPCR（实时荧光定量 PCR）逆转录 RNA。RT-qPCR 使用 Power SYBRi Script Green（具有绿色激发波长染料的强效预混液）方法在实时荧光定量 PCR 仪的系统上进行。使用相对于肌动蛋白标准化的比较 Ct（电子计算机断层扫描）方法计算 RNA 表达。相对于校准器，使用 2-ΔΔCt 方法表示数据。

7、细胞培养，氧葡萄糖剥夺和恢复（OGD / R）以及锂处理

将小鼠脑源性内皮细胞 3 在含有 10％胎牛血清和 1％青霉素的 Dulbecco（杜尔贝科磷酸盐缓冲液）改良鹰培养基（DMEM，一种含各种氨基酸和葡萄糖的培养基）中进行培养。所有培养物均保持在湿度为 5％的 CO2 培养箱中，温度为 37°C，并在 80-90％汇合时常规传代。LiCl 或载体处理 15 小时后，将细胞暴露于 OGD / R（糖氧剥夺离体脑缺血模型）。然后，将培养液替换为带有 LiCl 或媒介物对照的 Dulbecco 改良版培养基，并将培养细胞放入含 0.5 – 1％O2 的模块化培养箱中和 99％的 N2（氮气），用 O2（氧气）分析仪进行监测。在 OGD

（氧糖剥夺）6 小时后，将细胞恢复为含 LiCl 的正常培养条件，以恢复 3 小时的氧葡萄糖。

8、细胞计数试剂盒 8（CCK-8）测试

用 CCK-8 测量细胞活力，将细胞以 5,000 个细胞/孔的浓度接种在 96 孔板中。将十毫升的 CCK-8 溶液加入到每个含有 100 毫升培养基的孔中。将细胞在 37℃下孵育 2 小时。用 MULTISKAN GO（多扫描仪）在 450nm 下测量 OD 值（光密度值）。

9、萤光素酶测定

对于典型的萤光素酶测定，将稳定的 bEnd.3（小鼠脑微血管内皮细胞）细胞系（其带有 Wnt /β-catenin 信号传导的 TOP-flash 萤火虫萤光素酶【具有 TCF / LEF（T 细胞因子、淋巴增强因子）结合位点的构建体】和海肾对照报道子接种在 96 孔板上。48 小时后，将细胞用 100 ng / ml Wnt3a 刺激 24 小时。使用 Dual Stop（双重终止）和 Glo（球蛋白）系统测量萤火虫和海肾荧光素酶的活性。将报告者的活性计算为每个孔中的萤火虫/海肾活性。在每个图中，所有数据均归一化为第一个条表示的数据点。

10、跨内皮电阻（TEER）和磁导率的测量

使用 Millicell-ERS-2（德国密理博）测量 TEER。将 bEnd.3 细胞播种在孔径为 0.4μm 的 Transwell 渗透膜（24 孔细胞培养插入物）上，并使其生长 3 天。在 LiCl 和 OGD / R 处理之前测量基线 TEER。通过减去空白 Transwell（侵袭实验）滤波器中测得的 TEER 值对所有测量值进行归一化。在 OGD / R 之后，评估了 LiCl 对异硫氰酸荧光素共轭的 70 kDa FITC-葡聚糖的内皮单层渗透性的影响。将十微升的 FITC-葡聚糖（5ug / ml）加入到腔室中，并将混合物温育 30 分钟。通过使用荧光板读数仪 MULTISKAN GO 测量从取自房室的 100μl 培养基等分试样发出的 520 nm 处的荧光来评估通透性。

11、统计分析

使用 Windows 软件包 SPSS 16.0（美国 SPSS）进行统计分析。数据表示为平均值±标准误差（SE）。学生的 t 检验用于两组比较。使用单向方差分析（ANOVA）确定来自不同组的所有观察指标的统计差异。如果方差是异质的，则使用最低有效差（LSD）t 检验或 Dunnett T3（新复极差法检验）检验来进一步分析差异。统计学显着性定义为 $P<0.05$。

具体地，实验结果请参见图 1 至图 21（其中，图 1、图 3、图 4、图 8、图

10、图 19 以及图 20 的原图为彩图），图 1 是采用 TTC 对小鼠大脑的冠状切片进行染色后的试验对比示意图；图 2 是小鼠梗死体积在脑半球内的相对占比示意图；图 3 是伊文斯兰染色的相对占比的示意图；图 4 是伊文斯兰渗出量占半球重量的相对百分比的示意图；图 5 是免疫荧光双重染色观察内源性 IgG 从血管中的渗出情况的示意图；图 6 是 IgG 从血管内渗出的相对密度柱状示意图；图 7 是神经行为学评分柱状示意图；图 8 免疫荧光双重染色观察神经元凋亡情况示意图；图 9 是小鼠梗死区神经元凋亡数量相对密度柱状图；图 10 是免疫荧光双重染色观察 active β-catenin 在内皮细胞上的表达情况示意图；图 11 是 active β-catenin 在内皮细胞上表达的相对密度柱状图；图 12 是各组梗死区脑组织 active 和 total β-catenin 蛋白水平示意图；图 13 是图 12 中免疫印迹法相对密度柱状图；图 14 是图 12 中免疫印迹法相对密度又一柱状图；图 15 是各组脑梗死组织中 axin2 水平柱状图；图 16 是各组脑梗死组织中 apcdd1 mRNA 水平柱状图；图 17 是不同浓度氯化锂对于 bEnd.3 Axin2 mRNA 水平的影响示意图；图 18 是不同浓度氯化锂对于 bEnd.3 TCF/LEF TOPflash 值的影响示意图；图 19 是通过敲除 Fzd4 构建了 Wnt/β-catenin 通路缺陷的 bEnd.3 细胞系对应的氯化锂的效果示意图；图 20 是通过敲除 Fzd4 构建了 Wnt/β-catenin 通路缺陷的 bEnd.3 细胞系对应的氯化锂的又一效果示意图；图 21 是各组 axin2 mRNA 水平柱状图。

其中，图 1 显示出了采用 TTC 对小鼠大脑的冠状切片进行染色后的缺血区，该白色区域即为该缺血区；图 2 显示出了梗死体积在脑半球内的相对占比（%），n=8/组；图 3 显示出了伊文斯兰的染色区（蓝色区域为伊文斯兰在脑组织内的渗漏区域）；图 4 对应为伊文斯兰渗出量占半球重量的相对百分比（%），n=6/组；图 5 显示了出免疫荧光双重染色观察内源性 IgG（绿色）从血管（CD31，红色）中的渗出情况，对应标尺为 100um；图 6 显示出了 IgG 从血管内渗出的相对密度柱状图，n=3/组；图 7 显示出了神经行为学评分柱状图，n=8/组。Data are mean（平均数据） ± s.e.m., *，$P < 0.05$，**，$P < 0.01$。综合图 1-图 7 能够看出，氯化锂的使用能够减少小鼠脑梗死体积和 BBB 渗漏，且能够改善神经功能缺损症状。

其中，图 8 显示出了免疫荧光双重染色观察神经元（红色）凋亡情况（TUNEL 染色，绿色），标尺 100um；图 9 显示出了梗死区神经元凋亡数量相对密度柱状图，n=3/组。Data are mean ± s.e.m.，*，$P < 0.05$。综合图 8-图 9 能够看出，氯化锂的使用减少了脑梗死组织的神经细胞凋亡。

其中，图 10 显示出了免疫荧光双重染色观察 active β-catenin（绿色）在内皮细胞（红色）上的表达情况，标尺 100um；图 11 显示出了 active β-catenin 在内皮细胞上表达的相对密度柱状图，n=3/组；图 12 显示出了各组梗死区脑组织 active 和 total β-catenin 蛋白水平；图 13 和图 14 显示出了“C”图中免疫印迹法相对密度柱状图，n=3/组；图 15 和图 16 显示出了各组脑梗死组织中 axin2 和 apcdd1 mRNA 水平柱状图，n=3/组。缺血/再灌注：I/R，ischemia/reperfusion. n=8/组。Data are mean ± s.e.m.，*，P< 0.05, **，P<0.01。综合图 10-图 16 能够看出，氯化锂的使用能够减少小鼠脑梗死体积和 BBB 渗漏，且能够改善神经功能缺损症状。

其中，图 17 显示出了不同浓度氯化锂对于 bEnd.3 Axin2 mRNA 水平的影响，n=4/组；图 18 显示出了不同浓度氯化锂对于 bEnd.3 TCF/LEF TOPflash 值的影响，n=5/组；图 19 和图 20 显示出了通过敲除 Fzd4 构建了 Wnt/β-catenin 通路缺陷的 bEnd.3 细胞系用来观察氯化锂的效果，发现氯化锂能够显著提高 WT 和 Fzd4-/-bEnd.3 细胞系 OGD/R 后降低的细胞电阻值，并降低 FITC-dextran 渗漏率，n=3/组；图 21 显示出了各组 axin2 mRNA 水平柱状图，n=3/组。Data are mean ± s.e.m., *P < 0.05，**P < 0.01. 糖氧剥夺/恢复：OGD/R, oxygen-glucose deprivation and recovery；正常对照：NC，normal control；野生型：WT，wild type；内皮细胞穿膜电阻：TEER, trans-endothelial electrical resistance。综合图 17-图 21 能够看出，锂剂的使用能够上调小鼠脑微血管内皮细胞（bEnd.3）糖氧剥夺/恢复（模拟缺血再灌注损伤）后 Wnt/β-catenin 通路，并减轻内皮细胞损害。

实验发现：1）在使用的氯化锂的给药量为 1.5、3.0 和 6.0mmol/kg（毫摩尔/千克）三个剂量，以皮下注射，血管开通后即刻给药，1 次/日时，均观察到了小鼠脑梗死体积减少，同时也观察到了梗死区神经细胞凋亡的减少；2）在观察使用 3.0mmol/kg 浓度氯化锂对于 BBB 功能的保护作用时，发现梗死半球 BBB 功能示踪剂伊文斯兰（Evans blue）和小鼠血清 IgG 蛋白渗漏明显减少；3）通过行为学测定，发现锂剂能够改善小鼠脑梗死早期的神经行为学缺损。

通过小鼠脑组织的分子生物学实验发现，Wnt/β-catenin 通路的标志物 active-β-catenin 在脑血管内皮细胞上表达增加，同时其在脑组织中的蛋白水平在锂剂干预后也显著增高。此外，梗死脑组织内 Wnt/β-catenin 通路的标志性基因 apcdd1 在锂剂干预之后也显著增高。在脑血管内皮细胞的体外实验中发现，锂剂能够显著上调 Wnt/β-catenin 通路。同时，在体外糖氧剥夺/恢复模型中（模拟

体内的缺血再灌注损伤），与无锂剂处理的对照细胞相比，锂剂处理可增强单层脑血管内皮细胞完整性和 BBB 功能。

且锂剂具有 BBB 和神经细胞保护双重作用；锂剂的 BBB 保护作用是通过上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 通路和保护 BBB 的内皮细胞间紧密连接蛋白的结构实现的。同时，实验证实锂剂对于 BBB 的保护作用主要源于对于脑血管内皮细胞之间的紧密连接的保护。

此外，由于锂剂是临床常用药物，其药代动力学和毒副作用清晰，成本低廉，因此有望直接应用于临床脑梗死病人。

其中，锂剂不仅有 BBB 保护作用，同时也有神经保护作用，与其他靶向干预 Wnt/β-catenin 通路药物相比，锂剂具有更好的安全性。

其中，锂剂同样可应用与其他可导致 BBB 损害的疾病，包括脑出血、中毒性脑病、代谢性脑病、中枢神经系统白血病继发脑出血等。

综上所述，本申请中的医药组合物采用锂剂能够上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构的保护有着重要的作用，从而能够对血脑屏障进行保护。因此，锂剂能够在治疗缺血性脑卒中及其所导致的血脑屏障损伤起到有效的药物作用。

以上所述仅为本申请的实施方式，并非因此限制本申请的专利范围，凡是利用本申请说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换，或直接或间接运用在其他相关的技术领域，均同理包括在本申请的专利保护范围内。

权利要求书

1.一种治疗缺血性脑卒中的医药组合物，其特征在于，所述医药组合物包括：治疗缺血性脑卒中有效剂量的锂剂和医药上可接受的载体，其中，所述锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

2.根据权利要求 1 所述的医药组合物，其特征在于，所述锂剂为氯化锂和/或碳酸锂。

3.根据权利要求 1 或 2 所述的医药组合物，其特征在于，所述医药组合物呈剂量单位形式。

4.根据权利要求 3 所述的医药组合物，其特征在于，所述医药组合物中的所述锂剂的剂量为 1.5-6.0 毫摩尔/千克中的一种，其中，毫摩尔/千克为所述锂剂的物质的量相对于患者的质量。

5.根据权利要求 4 所述的医药组合物，其特征在于，所述医药组合物中的所述锂剂的剂量为 3.0 毫摩尔/千克。

6.根据权利要求 1 所述的医药组合物，其特征在于，所述医药组合物还包括治疗缺血性脑卒中有效剂量的阿替普酶，且所述医药组合物中的所述阿替普酶的剂量为 0.9 毫克/千克，其中，毫克/千克为所述阿替普酶的质量相对于患者的质量。

7.一种锂剂在治疗缺血性脑卒中药物的制备中的用途，其特征在于，所述锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

8.根据权利要求 7 所述的用途，其特征在于，所述锂剂为氯化锂和/或碳酸锂。

9.一种治疗血脑屏障损伤的医药组合物，其特征在于，所述医药组合物包括：治疗血脑屏障损伤的有效剂量的锂剂和医药上可接受的载体，其中，所述锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

10.一种锂剂在治疗血脑屏障损伤的药物的制备中的用途，其特征在于，所述锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

11.一种治疗血脑疾病的医药组合物，其特征在于，所述医药组合物包括：治疗血脑疾病的有效剂量的锂剂和医药上可接受的载体，其中，所述锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

12.一种锂剂在治疗血脑疾病的药物的制备中的用途，其特征在于，所述锂剂用于上调脑血管内皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路，并对血脑屏障的内皮细胞的紧密连接蛋白的结构进行保护。

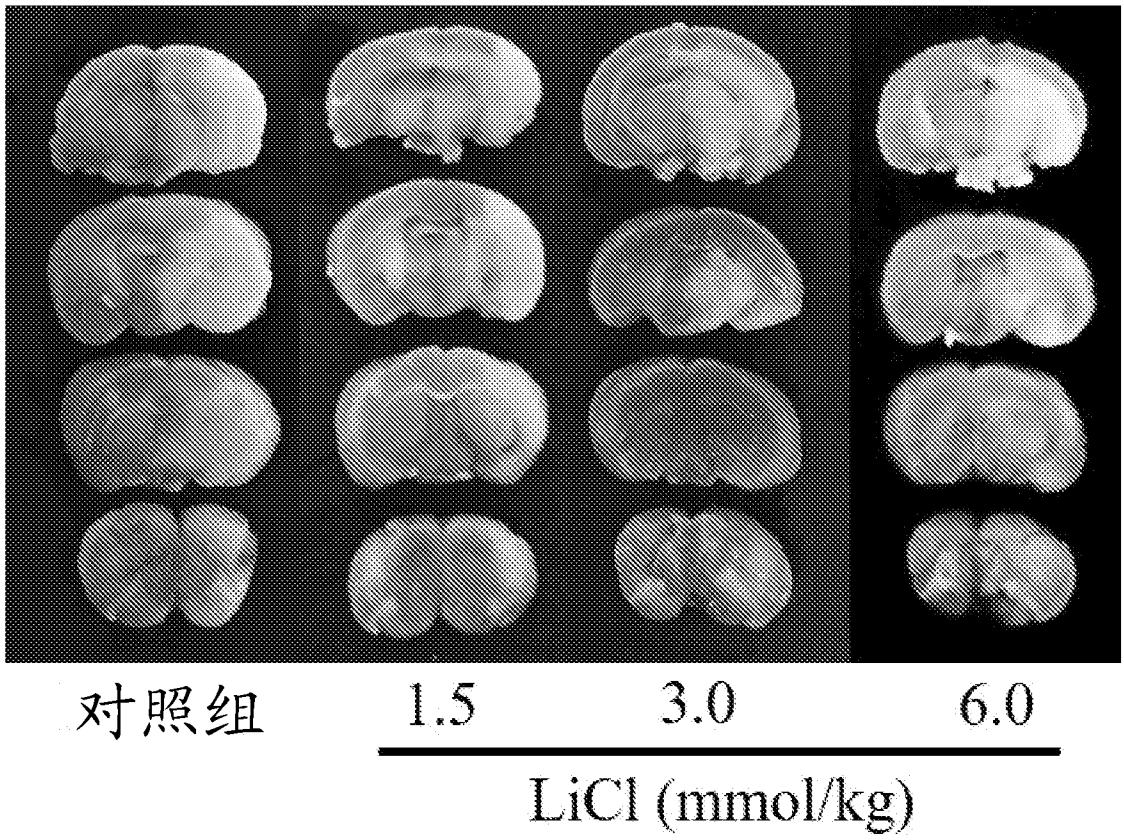


图 1

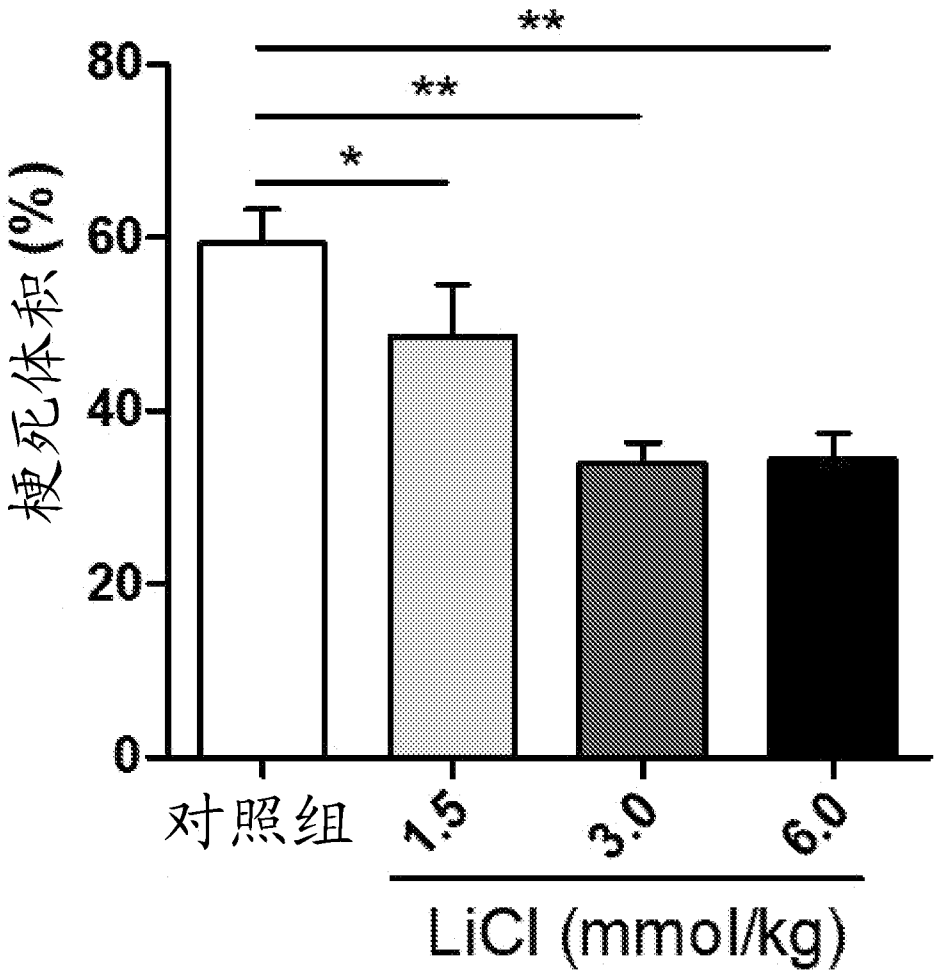


图 2

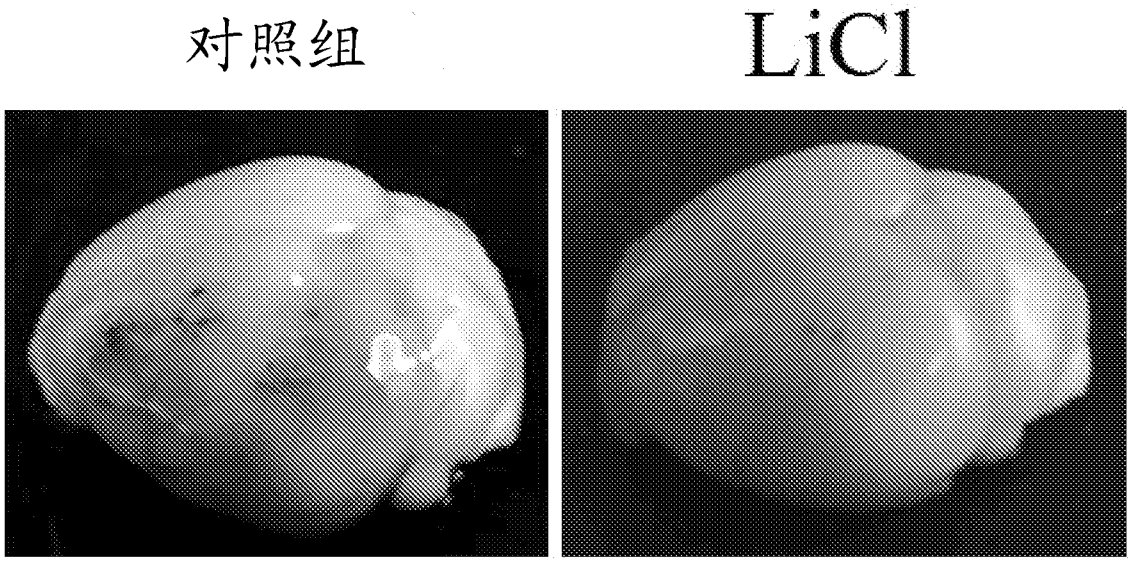


图 3

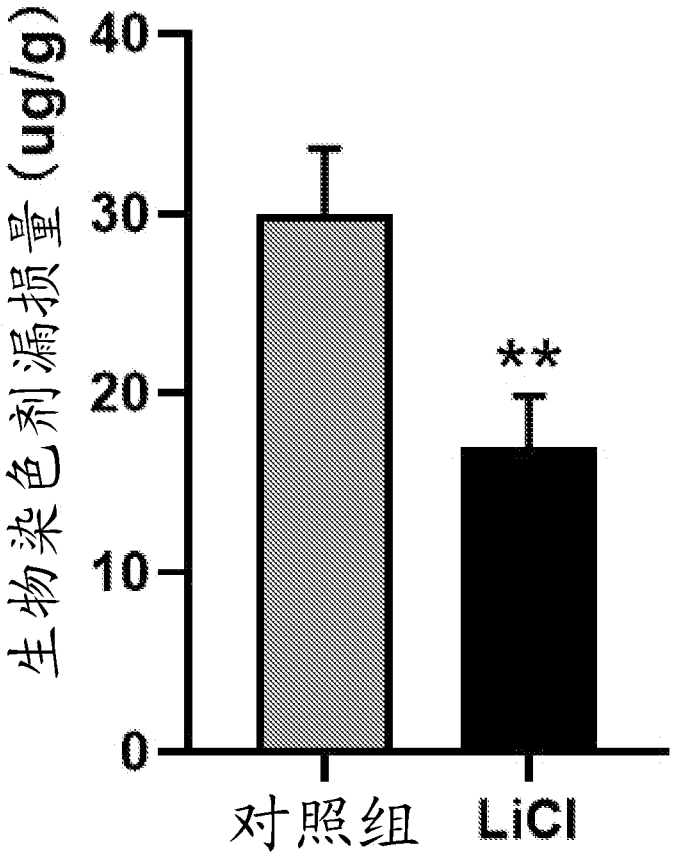
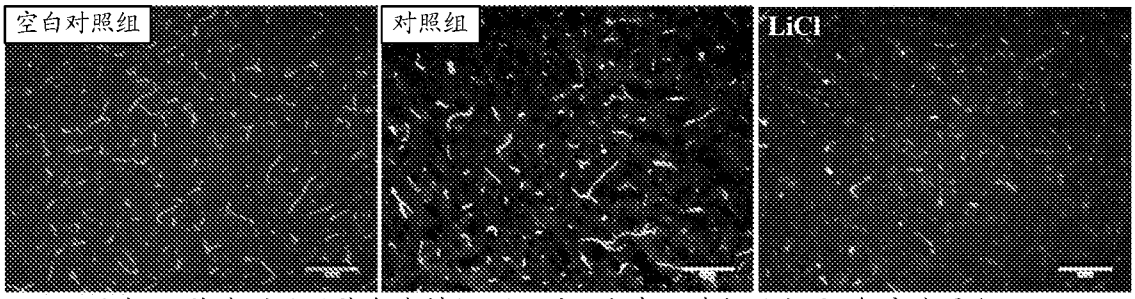


图 4



4，6-联脒-2-苯基吲哚（荧光染料） 血小板-内皮细胞粘附分子 免疫球蛋白G

图 5

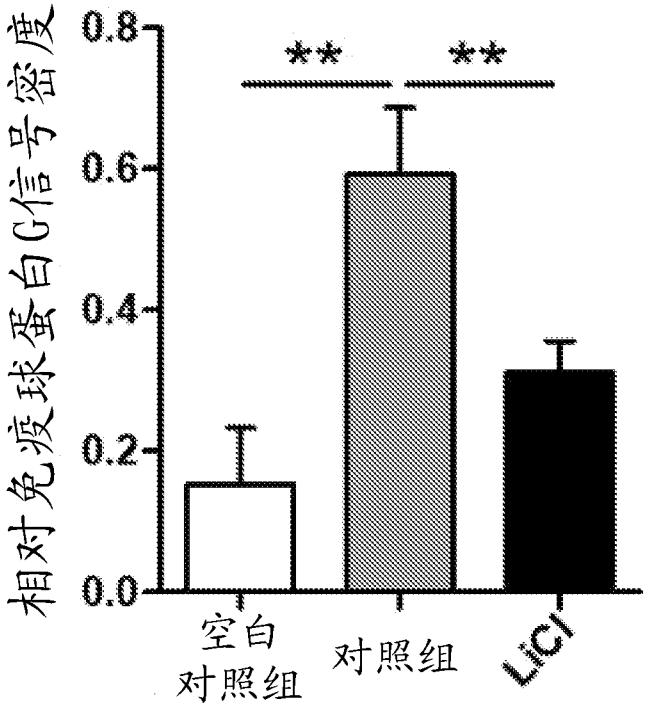

相对免疫球蛋白G信号密度
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
**
空白
对照组
对照组
LiCl

图 6

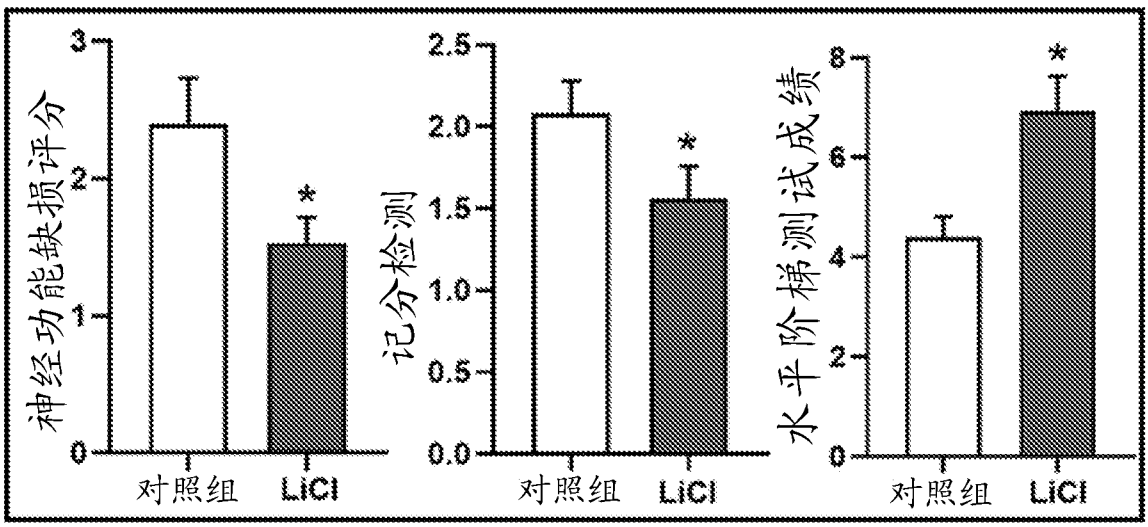

神经功能缺损评分
3
2
1
0
*
对照组
LiCl
记分检测
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
对照组
LiCl
水平阶梯测试成绩
8
6
4
2
0
*
对照组
LiCl

图 7

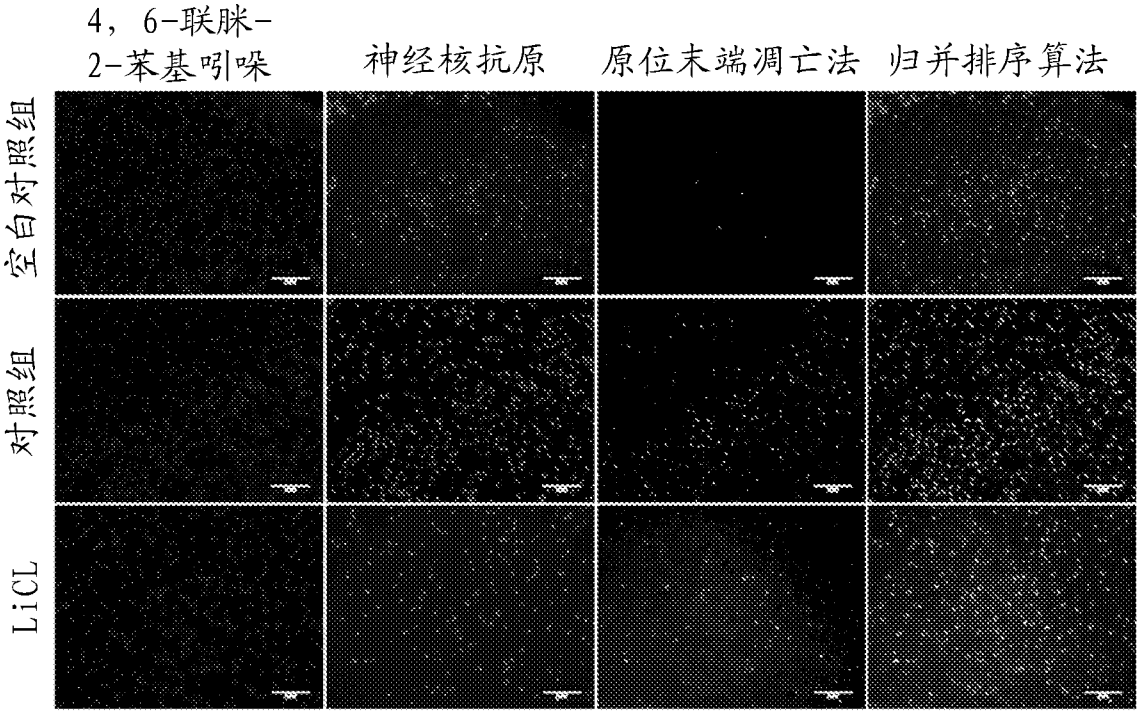

4，6-联脒-
2-苯基吲哚
神经核抗原
原位末端凋亡法
归并排序算法
空白对照组
对照组
LiCL

图 8

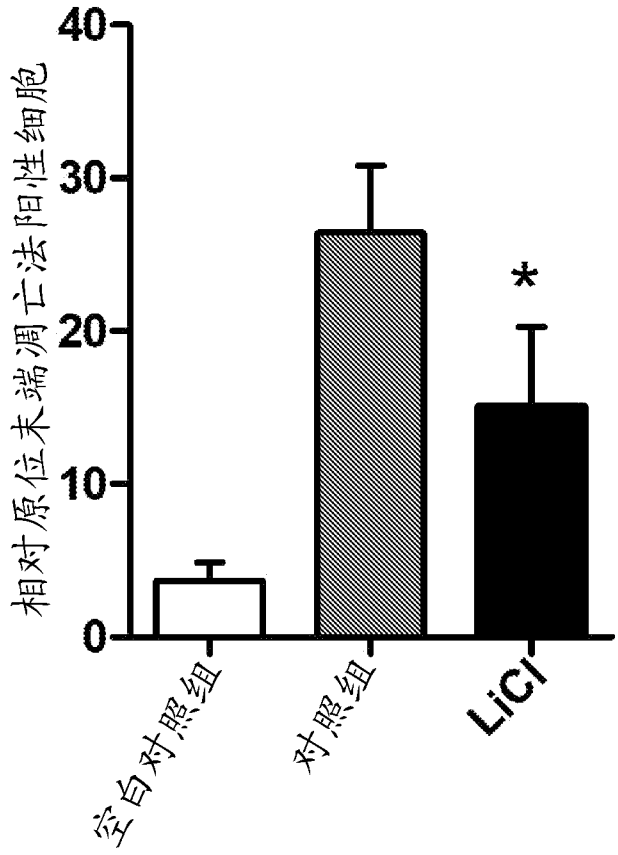

相对原位末端凋亡法阳性细胞
40
30
20
10
0
*
空白对照组
对照组
LiCl

图 9

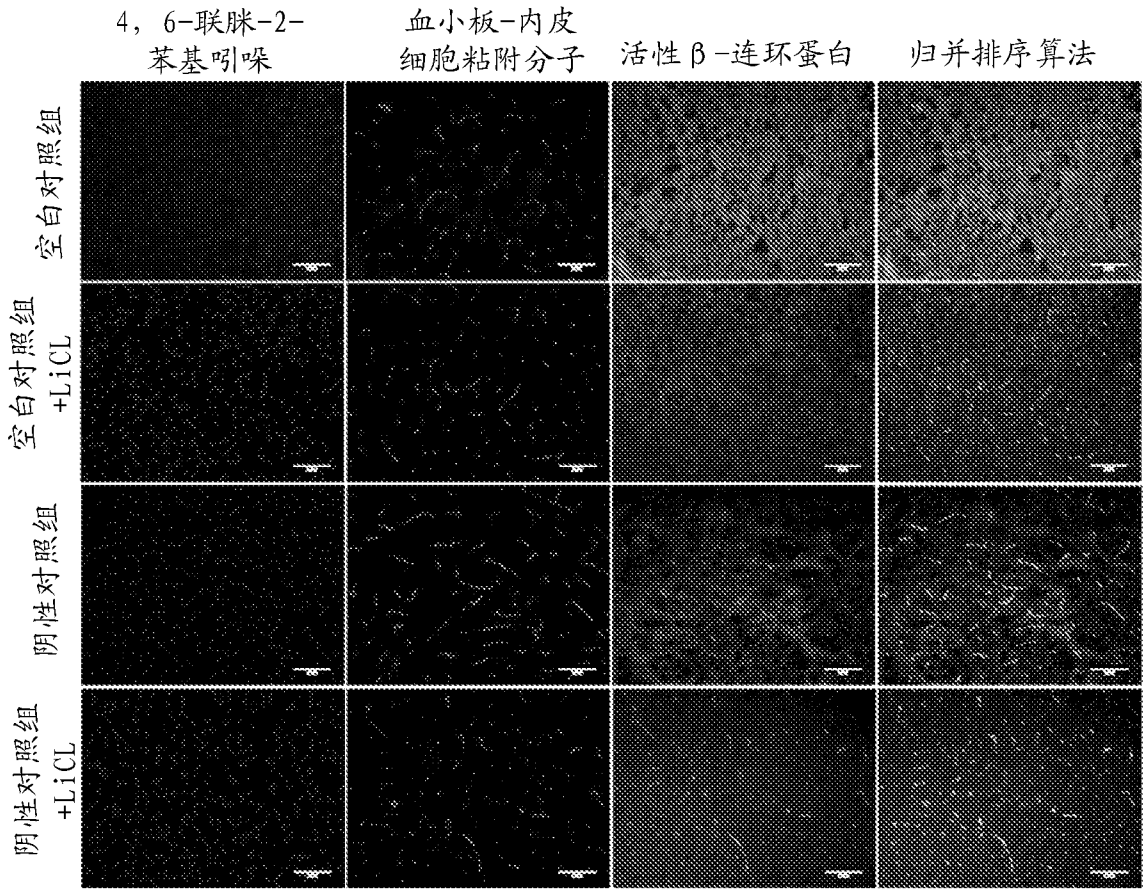

4，6-联脒-2-苯基吲哚
血小板-内皮细胞粘附分子
活性β-连环蛋白
归并排序算法
空白对照组
空白对照组+LiCL
阴性对照组
阴性对照组+LiCL

图 10

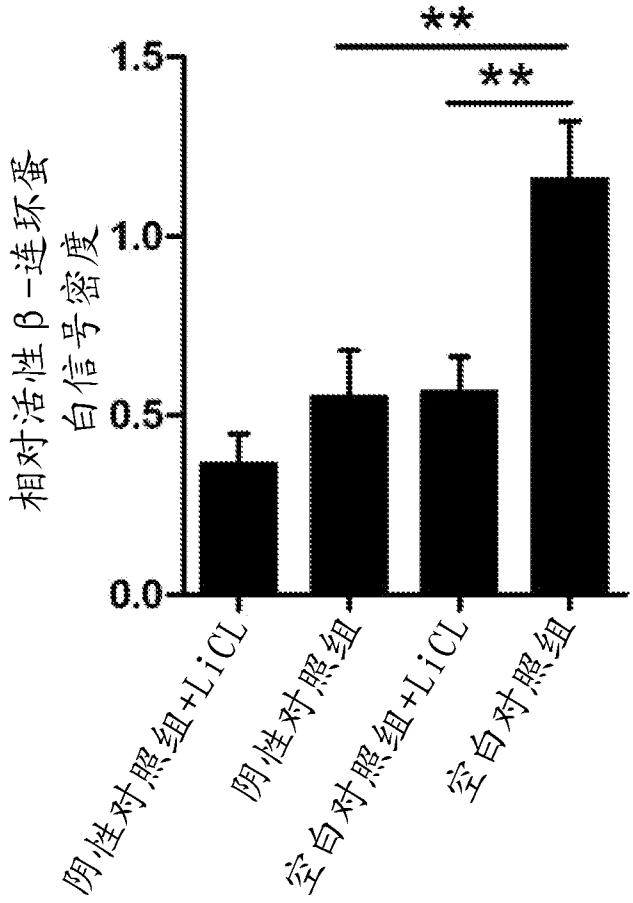

**
**
1.5
1.0
0.5
0.0
相对活性β-连环蛋白信号密度
阴性对照组+LiCL
阴性对照组
空白对照组+LiCL
空白对照组

图 11

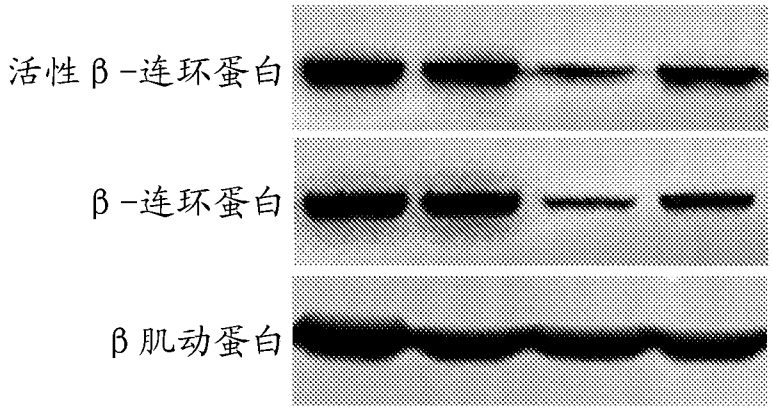

活性β-连环蛋白
β-连环蛋白
β肌动蛋白

图 12

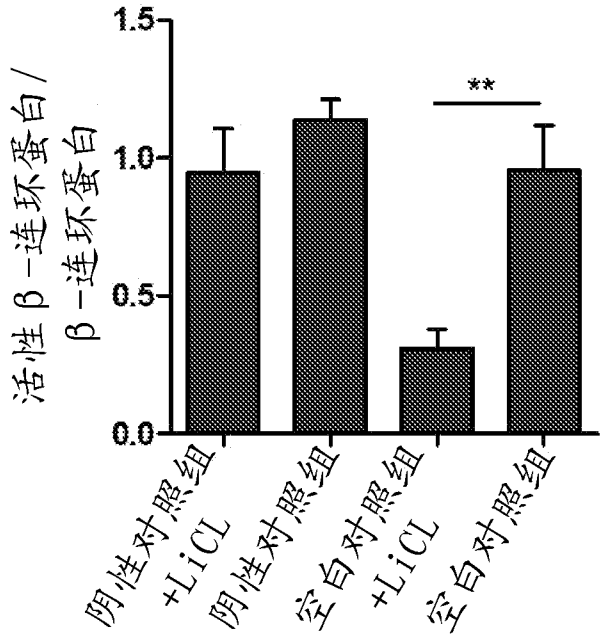

活性β-连环蛋白/
β-连环蛋白
1.5
1.0
0.5
0.0
**
阴性对照组
+LiCL
阴性对照组
空白对照组
+LiCL
空白对照组

图 13

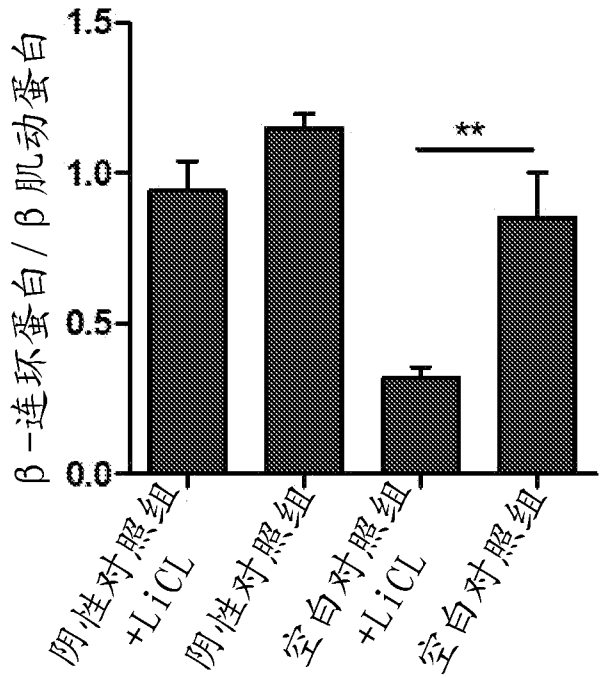

β-连环蛋白/β肌动蛋白
1.5
1.0
0.5
0.0
**
阴性对照组
+LiCL
阴性对照组
空白对照组
+LiCL
空白对照组

图 14

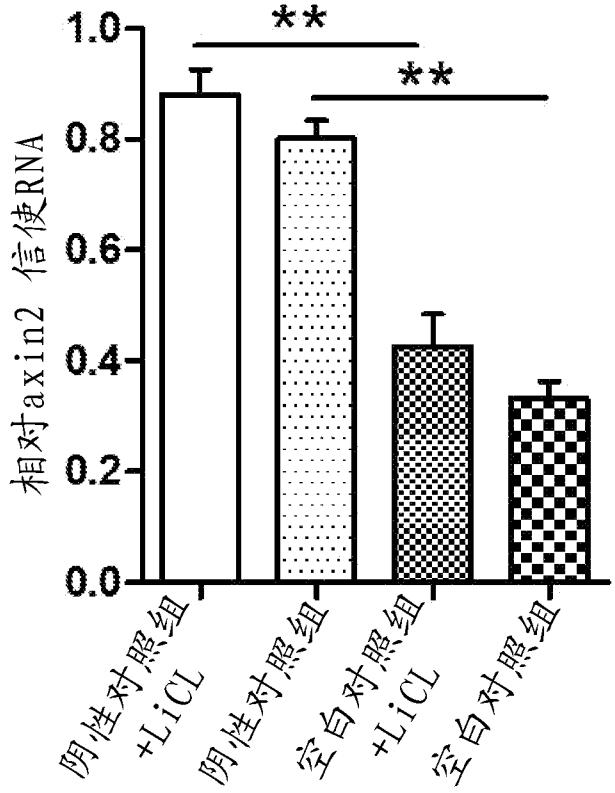

**
**
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
相对axin2 信使RNA
阴性对照组 +LiCL
阴性对照组
空白对照组 +LiCL
空白对照组

图 15

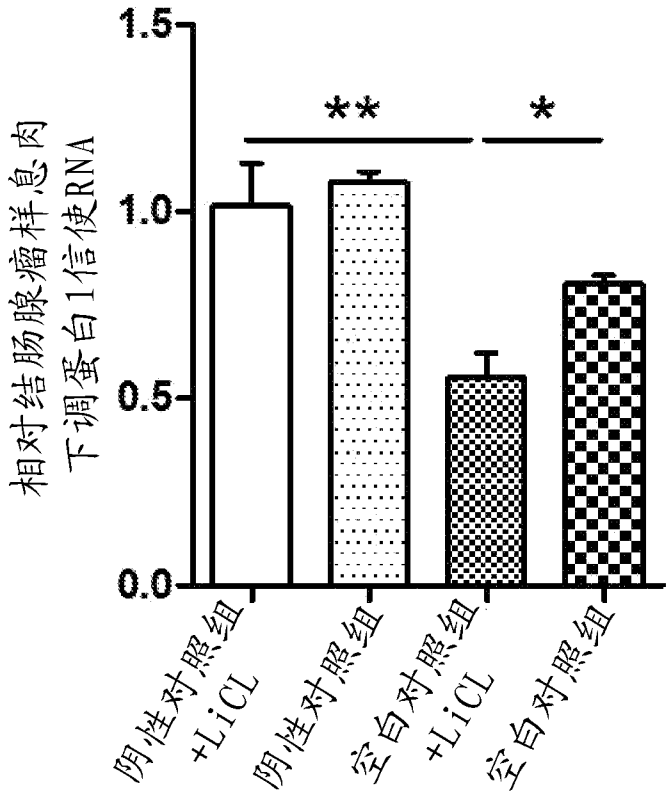

**
*
1.5
1.0
0.5
0.0
相对结肠腺瘤样息肉下调蛋白1信使RNA
阴性对照组 +LiCL
阴性对照组
空白对照组 +LiCL
空白对照组

图 16

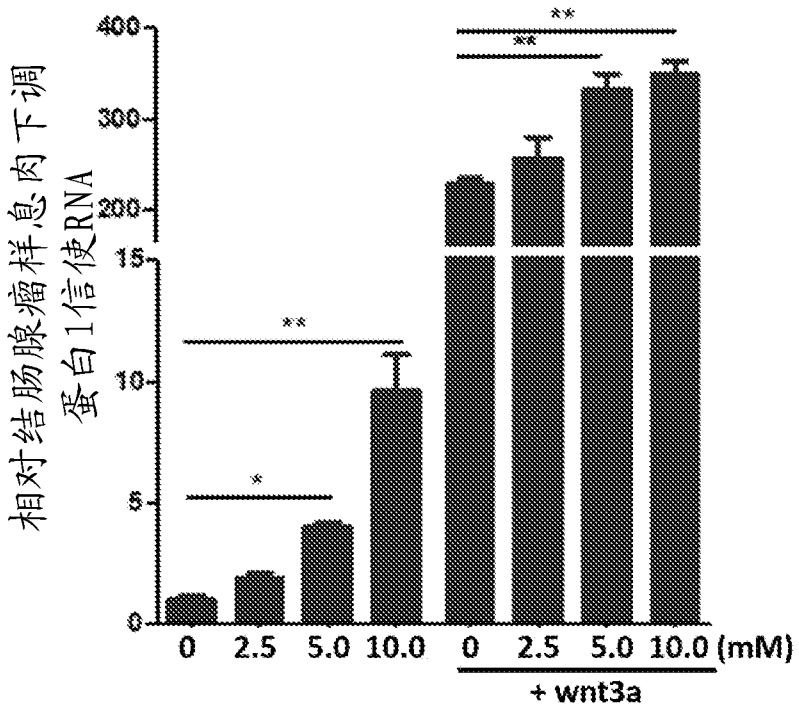

相对结肠腺瘤样息肉下调
蛋白1信使RNA
400
300
200
15
10
5
0
*
**
**
**
0 2.5 5.0 10.0 0 2.5 5.0 10.0 (mM)
+ wnt3a

图 17

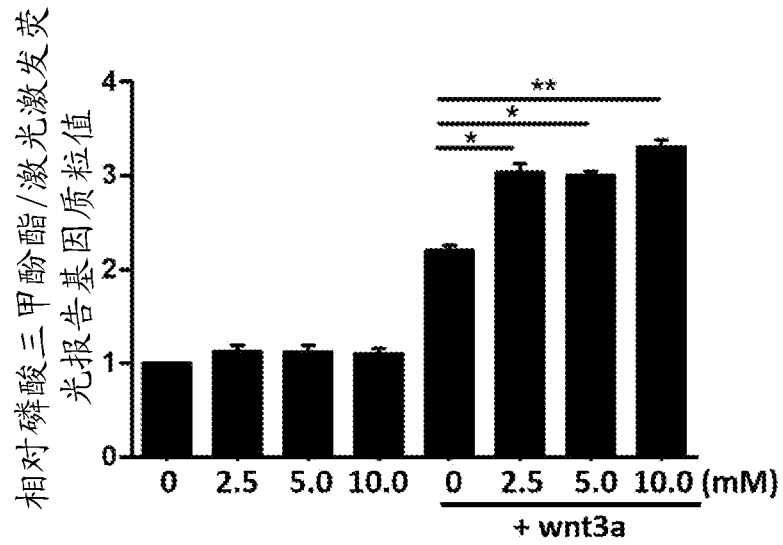

相对磷酸三甲酚酯/激光激发荧
光报告基因质粒值
4
3
2
1
0
*
*
**
0 2.5 5.0 10.0 0 2.5 5.0 10.0 (mM)
+ wnt3a

图 18

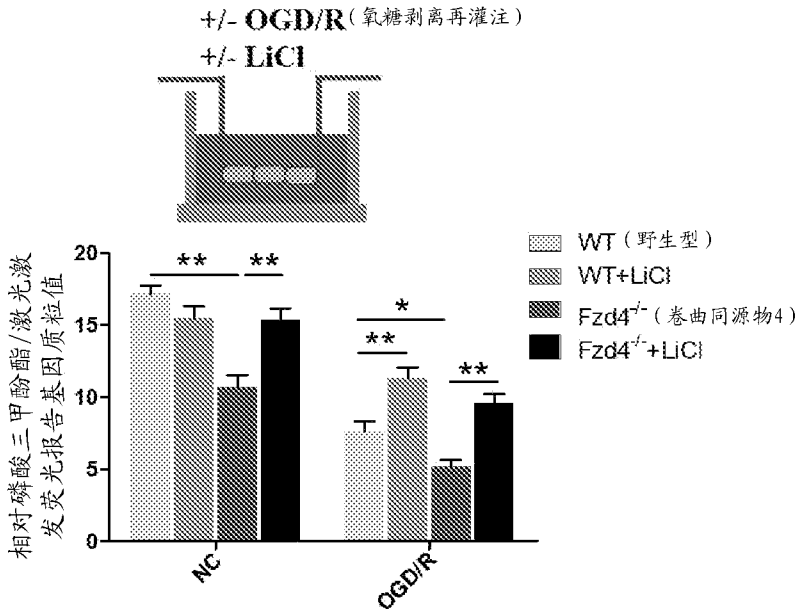

+/- OGD/R（氧糖剥离再灌注）
+/- LiCl
相对磷酸三甲酚酯/激光激发荧光报告基因质粒值
20
15
10
5
0
**
**
*
**
**
NC
OGD/R
WT（野生型）
WT+LiCl
Fzd4-/-（卷曲同源物4）
Fzd4-/-+LiCl

图 19

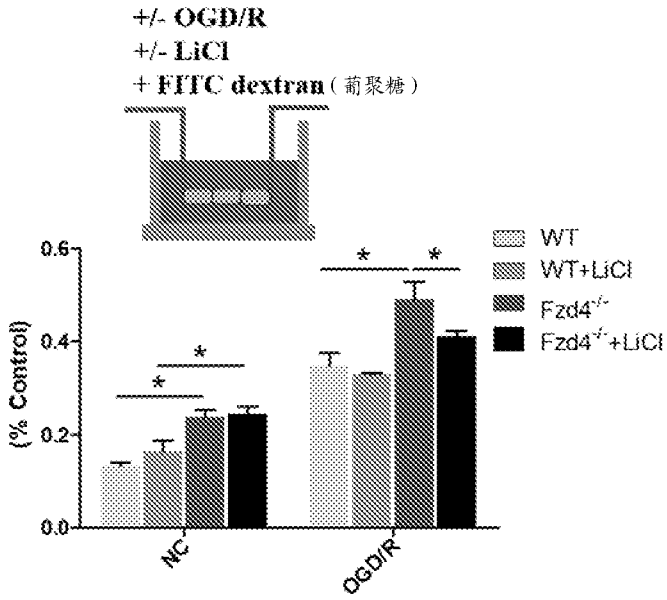

+/- OGD/R
+/- LiCl
+ FITC dextran（葡聚糖）
(% Control)
0.6
0.4
0.2
0.0
*
*
*
*
NC
OGD/R
WT
WT+LiCl
Fzd4-/-
Fzd4-/-+LiCl

图 20

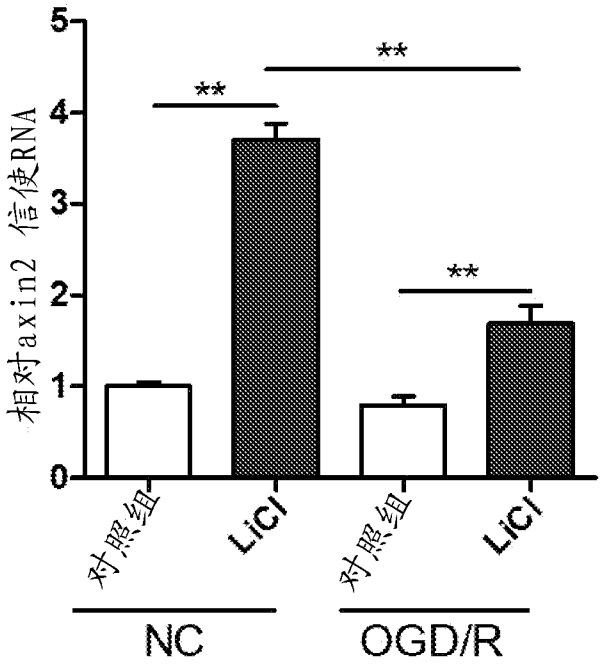


图 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/127619

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 33/14(2006.01)i; A61K 33/00(2006.01)i; A61K 38/49(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 25/00(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)

CNABS, CNTXT, CJFD, CNKI, 万方学术期刊数据库, 读秀学术, DWPI, VEN, SIPOABS, USTXT, WOTXT, EPTXT, PubMed, patentics, STN: 锂, 氯化锂, 碳酸锂, 缺血, 脑卒中, 脑梗, 中风, 血脑屏障, 内皮, Li, licl, li2CO3, Lithium, stroke, cerebral apoplexy, ischemia, endothelial, Wnt, blood-brain barrier, BBB, 深圳先进技术研究院, 畅君雷, 冀雅彬

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101176735 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 14 May 2008 (2008-05-14) claim 1, description page 3 paragraph 2 from the bottom	1-9, 11
A	CN 101036669 A (JINAN UNIVERSITY) 19 September 2007 (2007-09-19) claim 3	1-12
A	WO 2017096123 A1 (THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION) 08 June 2017 (2017-06-08) claims 1 and 12	1-12
X	HAUPT, Matteo et al.,. "Lithium enhances post-stroke blood-brain barrier integrity, activates the MAPK/ERK 1/2 pathway and alters immune cell migration in mice," *Neuropharmacology,* 13 October 2020 (2020-10-13), pp. 1-14	1-12
X	LI, Haiying et al.,. "Evaluation of the Protective Potential of Brain Microvascular Endothelial Cell Autophagy on Blood-Brain Barrier Integrity During Experimental Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury," *Translational Stroke Research,* No. 5, 30 July 2014 (2014-07-30), pp. 618-626	1-12

☑ 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
22 July 2021	**05 August 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/127619

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI, Weishan et al.,. "Lithium Posttreatment Alleviates Blood-Brain Barrier Injury After Intracerebral Hemorrhage in Rats," *Neuroscience*, 31 December 2018 (2018-12-31), pp. 129-137	9-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/127619

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101176735	A	14 May 2008	None			
CN	101036669	A	19 September 2007	CN	100515428	C	22 July 2009
WO	2017096123	A1	08 June 2017	KR	20180081824	A	17 July 2018
				SG	11201804440 X	A	28 June 2018
				CA	3007116	A1	08 June 2017
				EP	3795147	A1	24 March 2021
				CN	111184739	A	22 May 2020
				HK	1256307	A1	20 September 2019
				US	2017159013	A1	08 June 2017
				EP	3383495	A1	10 October 2018
				US	9885015	B2	06 February 2018
				AU	2016364845	A1	21 June 2018
				US	10253293	B2	09 April 2019
				JP	2018535988	A	06 December 2018
				EP	3383495	B1	20 January 2021
				KR	102102837	B1	22 April 2020
				US	2018148688	A1	31 May 2018
				CN	108430582	B	21 February 2020
				CN	108430582	A	21 August 2018
				EP	3383495	A4	04 September 2019
				KR	20200043503	A	27 April 2020

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/127619

A. 主题的分类

A61K 33/14(2006.01)i; A61K 33/00(2006.01)i; A61K 38/49(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 25/00(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）)

CNABS,CNTXT,CJFD,CNKI,万方学术期刊数据库，读秀学术，DWPI,VEN,SIPOABS,USTXT,WOTXT,EPTXT,PubMed,patentics,STN:锂,氯化锂,碳酸锂,缺血,脑卒中,脑梗，中风，血脑屏障，内皮,Li,licl,li2CO3,Lithium,stroke,cerebral apoplexy,ischemia,endothelial,Wnt,blood-brain barrier,BBB,深圳先进技术研究院，畅君雷，冀雅彬

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	CN 101176735 A (苏州大学) 2008年 5月 14日 (2008-05-14) 权利要求1，说明书第3页倒数第2段	1-9,11
A	CN 101036669 A (暨南大学) 2007年 9月 19日 (2007-09-19) 权利要求3	1-12
A	WO 2017096123 A1 (THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION) 2017年 6月 8日 (2017-06-08) 权利要求1、12	1-12
X	HAUPT, Matteo 等, . "Lithium enhances post-stroke blood-brain barrier integrity, activates the MAPK/ERK 1/2 pathway and alters immune cell migration in mice, " Neuropharmacology, , 2020年 10月 13日 (2020-10-13), 第1-14页	1-12

☑ 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
2021年 7月 22日	2021年 8月 5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	张娜
传真号 (86-10)62019451	电话号码 010-53961907

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	LI, Haiying 等, . "Evaluation of the Protective Potential of Brain Microvascular Endothelial Cell Autophagy on Blood-Brain Barrier Integrity During Experimental Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury, " Translational Stroke Research, , 第5期, 2014年 7月 30日 (2014-07-30), 第618-626页	1-12
X	LI, Weishan 等, . "Lithium Posttreatment Alleviates Blood-Brain Barrier Injury After Intracerebral Hemorrhage in Rats, " Neuroscience, , 2018年 12月 31日 (2018-12-31), 第129-137页	9-12

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/127619

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	101176735	A	2008年 5月 14日	无			
CN	101036669	A	2007年 9月 19日	CN	100515428	C	2009年 7月 22日
WO	2017096123	A1	2017年 6月 8日	KR	20180081824	A	2018年 7月 17日
				SG	11201804440X	A	2018年 6月 28日
				CA	3007116	A1	2017年 6月 8日
				EP	3795147	A1	2021年 3月 24日
				CN	111184739	A	2020年 5月 22日
				HK	1256307	A1	2019年 9月 20日
				US	2017159013	A1	2017年 6月 8日
				EP	3383495	A1	2018年 10月 10日
				US	9885015	B2	2018年 2月 6日
				AU	2016364845	A1	2018年 6月 21日
				US	10253293	B2	2019年 4月 9日
				JP	2018535988	A	2018年 12月 6日
				EP	3383495	B1	2021年 1月 20日
				KR	102102837	B1	2020年 4月 22日
				US	2018148688	A1	2018年 5月 31日
				CN	108430582	B	2020年 2月 21日
				CN	108430582	A	2018年 8月 21日
				EP	3383495	A4	2019年 9月 4日
				KR	20200043503	A	2020年 4月 27日