

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480018148.2

[51] Int. Cl.

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 100525764C

[22] 申请日 2004. 6. 25

[21] 申请号 200480018148.2

[30] 优先权

[32] 2003. 6. 27 [33] FR [31] 03/07824

[86] 国际申请 PCT/FR2004/001630 2004. 6. 25

[87] 国际公布 WO2005/000302 法 2005. 1. 6

[85] 进入国家阶段日期 2005. 12. 27

[73] 专利权人 埃克森希特医疗股份有限公司

地址 法国巴黎

[72] 发明人 法比安·施魏格霍费尔

劳伦特·德西雷 安内利斯·热欣克

马加利·鲁凯特

[56] 参考文献

WO03016563A2 2003. 2. 27

WO0181345A1 2001. 11. 1

WO0181348A1 2001. 11. 1

WO03045949A1 2003. 6. 5

WO0178709A2 2001. 10. 25

WO02098878A1 2002. 12. 12

治疗阿尔茨海默病药物的研究进展. 王子红, 文彬, 潘国际, 郑家富. 中国临床康复, 第 6 卷第 19 期. 2002

审查员 黄海波

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 7 页

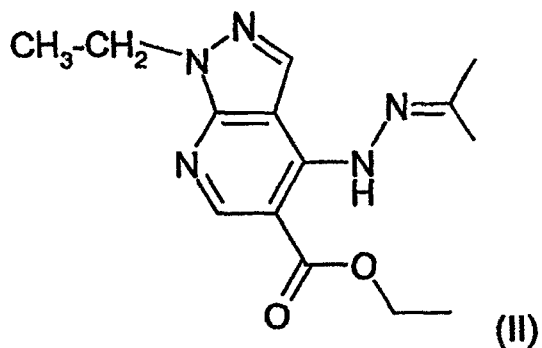
[54] 发明名称

吡唑并吡啶在制备治疗认知缺陷的药物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及用于改善, 增加或促进神经退行性病变的个体的认知的方法。更具体地, 本发明涉及吡唑并吡啶类化合物的应用以便改善神经退行性疾病个体的认知能力。本发明可用于改善具有不同神经退行性疾病个体的病症, 尤其是阿尔茨海默氏病以及血管性痴呆。

1. 具有下列通式(II)结构的依地唑酯或其盐或酯在制备用于治疗人类患者的认知缺陷的药物中的应用:



2. 权利要求 1 的应用, 其中患者患有神经退行性疾病。

3. 权利要求 2 的应用, 其中患者患有阿尔茨海默氏病, 血管痴呆, 帕金森氏症或亨廷顿氏舞蹈病。

4. 依地唑酯在制备用于治疗具有阿尔兹海默氏病的患者的认知缺陷的药物组合物中的应用。

5. 依地唑酯在制备用于治疗具有血管痴呆的患者的认知缺陷的药物组合物中的应用。

6. 权利要求 1 或 5 的应用, 其特征在于组合物经口服施用。

7. 权利要求 1 或 5 的应用, 其特征在于组合物系统地施用。

## 吡啶并吡啶在制备治疗认知缺陷的药物中的应用

### 发明领域

本发明涉及生物学，遗传学以及医学领域。本发明尤其涉及治疗神经退行性疾病的新的组合物以及方法，以及尤其是以便改善，增加或促进神经退行性疾病个体的认知。更具体地说，本发明涉及吡咯并吡啶类化合物的应用以便改善神经退行性疾病个体的认知能力。本发明可用于改善具有不同神经退行性疾病个体的病症，尤其是阿尔茨海默氏病或血管性痴呆。

### 发明背景

很多神经退行性疾病已经描述为具有与细胞程序死亡或细胞程序性死亡的现象相关的成分或阶段。一种可以引用中枢神经系统的神经退行性疾病(例如肌萎缩性侧索硬化-ALS-，帕金森氏症，阿尔茨海默氏病或血管痴呆)以及外周神经退行性疾病尤其是视神经退行性疾病。这些疾病主要采用对症疗法，尤其是治疗相关的炎性征兆，仅有少数治疗针对这些失调的真正病因，尤其是由于参与的代谢机制以及通道的复杂性以及病因的多样性。

本申请人提交的国际专利申请WO03/016563描述了治疗神经退行性疾病的新的神经毒性分子靶以及新的治疗方法。这些方法基于4型磷酸二酯酶的活性的调节或表达。

本申请人提交的国际申请PCT/FR04/00366提出了基于4型磷酸二酯酶的活性调节或表达治疗视神经退行性疾病的新方法。

申请WO01/78709，WO01/81348，WO01/81345以及WO03/045949涉及吡咯并吡啶在治疗与神经学疾病相关的某些事件中的应用，诸如

形成肽聚集(WO01/78709), TAU蛋白的磷酸化(WO01/81348)或GSK-3酶的阻断(WO01/81345以及WO03/045949)。

### 发明概述

本申请涉及神经退行性疾病的新的治疗策略, 其中如阿尔茨海默氏病以及血管痴呆中所观察到的改变了认知功能。这些策略是基于由本发明鉴定的一或多种新陈代谢通道的调节, 其与神经细胞中的兴奋毒性以及细胞程序性死亡的出现, 发展以及进展相关并且尤其与神经退行性疾病以及认知功能相关。

更具体地说, 本申请来源于吡唑并吡啶家族, 包括依地唑酯的化合物的有益并且显著特性用于治疗认知缺陷尤其是那些阿尔茨海默氏病以及血管痴呆诱导的认知缺陷的显示。因此本申请提出了设计用于治疗或减少神经退行性疾病患者的认知问题的新的治疗策略。

因此, 本发明涉及吡唑并吡啶家族的化合物在治疗神经退行性疾病, 尤其是与神经退行性疾病相关的认知缺陷中的应用。

本发明的另一个目的是吡唑并吡啶家族的化合物在治疗或改善神经退行性疾病个体认知缺陷, 尤其是阿尔茨海默氏病或血管痴呆中的应用。

本发明的更多方面涉及GABA(A)以及自由基的调节剂在制备设计用于治疗神经退行性疾病, 尤其是阿尔茨海默氏病以及血管痴呆, 或患有这些疾病的患者的认知问题或失调的药物组合物中的应用。

本发明的特定目的是吡唑并吡啶家族的化合物在制备设计用于神经退行性疾病患者的认知缺陷的药物组合物中的应用。

本发明的另一目的是增加神经退行性疾病患者的认知或认知感

觉的方法，包括给患者施用如上所述的化合物。优选地，此外本发明的方法可以抑制或减少神经退行性疾病中的神经元兴奋毒素。

不希望被作用机制制约，看来本发明化合物对认知失调的出乎意料并且优选的有益作用可以通过对GABA (A)受体以及线粒体的加倍影响得以解释。的确，本发明描述了在患病的病人的脑中鉴定三个特征在于AKAP11以及GABA (A) RAPL1的PDE4的mRNA的表达改变的最初的分子事件。这些事件时间上与兴奋毒性和/或神经元死亡的现象相关并且显示了与认知问题相关的GABA信号的改变的存在。由此尤其是，本发明揭示了从一方面从阿尔茨海默氏病人的前额皮质提取的mRNA以及另一方面从相同年龄的对照个体的相同脑区提取的mRNA之间编码GABA(A)受体的 $\epsilon$ 亚基的mRNA的剪接改变的存在。该发现因为该蛋白与GABA(A)受体的呈递以及退敏作用相关所以尤其重要，并且与年龄相关的老化以及病变与这种GABA(A)受体的退敏作用所需时间的增加相关。因此根据本发明这些病变尤其是认知缺陷可以由化合物对GABA通道以及线粒体的作用得以补偿。

因此，本发明引入了对选择GABA(A)受体作为治疗阿尔茨海默氏病，一般地说认知失调的治疗靶必不可少的新元素，并且由此可以理解当利用吡唑并吡啶家族治疗神经退行性疾病，包括阿尔茨海默氏病以及血管痴呆且更具体地用于治疗认知失调时所观察到的生物学以及治疗影响。显示于实施例中的结果尤其说明了这些化合物在改善病态的动物的记忆能力中的有效性。

### 发明详述

兴奋毒性以及细胞程序性死亡是神经元死亡的两个主要原因。多细胞程序性死亡通道来源于线粒体，并且细胞程序性死亡出现的一个要点例如线粒体转变孔(MTPP)的开放。由于线粒体的功能紊乱引起的自由基(ROS)的过量产生使得细胞程序性死亡的调控失衡并且由此诱导神经元对兴奋毒性易损性的增加。

这两个现象，自由基的过量产生以及兴奋毒性在由于老化以及诸如阿尔茨海默氏病，血管痴呆帕金森氏症以及ALS的神经退行性疾病引起的包括神经元死亡的病理机制中起一定的作用。的确，已经显示了自由基至少部分对老年脑的缺陷负责。氧化胁迫已经显示参与阿尔茨海默氏病，血管痴呆，帕金森氏症以及ALS的进展。氧化胁迫是助氧化剂以及抗-氧化剂之间体内平衡失调的结果，并且这将导致毒性自由基的产生。

本发明人已经确定了60天龄模型SLA动物脑中RNA剪接的所有组成成分，并且这是通过根据DATAS技术(描述在申请WO99/46403中)定性示差筛选实现的。该所有组成成分由提取自脑样品以及脊髓的RNA构建而来，没有以前分离的神经元，从而考虑与疾病的发展相关的可变剪接事件的最大数目。以这种方式生产的所有组成成分含有多于200个不同序列，包括兴奋毒性现象中的主要参与成分，诸如钾通道和NMDA受体。构成所有组成成分的序列特异性通过下列事实得以证实：在90天龄的动物中，对基因表达进行相同定性差异分析导致不同的所有组成成分，在所有组成成分中，尤其是缺乏兴奋毒性的不同标记。剪接修饰的分析证实：疾病的阶段不同，分子事件相异。

以特别有趣和意想不到的方式，对来自60天龄的转基因动物和对照动物的RNA进行DATAS分析可以从AKAP1蛋白("激酶锚定蛋白")以及由GABA (A) RAPL1蛋白("GABA (A)受体相关蛋白类1")分离磷酸二酯酶4B的mRNA衍生的cDNA片段。

能够水解AMPc的PDE4B蛋白参与AMP胞内浓度的调控。AKAP1蛋白将激酶A蛋白(由AMPc激活)的调节亚基锚定到线粒体膜并且调节线粒体转变孔的活性。获得的结果显示了PDE4B在病理神经组织中与相应RNA的结构修饰，尤其是非-编码3'部分区域的缺失相关的更高水平的表达。这个结果与DATAS鉴定的序列中的mRNA的不稳定序列的

存在完全相符。通过拼接或通过利用可选择的聚腺苷酸化序列引起的这些PDE4B的mRNA的不稳定序列的缺失可以导致稳定作用，因此引起该RNA编码部分表达的增加。该事件具体地发生在病理个体的脑中而非对照个体的脑中。

此外，获自AKAP1的片段的鉴定显示该蛋白参与了兴奋毒性以及神经元的死亡过程的进展。AKAP1与激酶A蛋白的调节亚基以及外周的苯化重氮（benzodiazepine）受体(PBR)相互作用，所述苯化重氮受体参与调节线粒体转变孔的开放，其开放表征了细胞程序性死亡的执行。因此，本发明暗示AKAP1调节PBR在细胞死亡诸如神经元死亡的现象中的干预。

获自GABA (A) RAPL1的片段的鉴定强调了依赖于GABA (A)受体突出信号的反调节。该观察结果与神经介质作为突触传导的抑制剂的重要性完全相符，尤其是其与GABA (A)受体的相互作用。该抑制可以保护神经元抗可以由兴奋毒性引起神经元死亡的持续兴奋。因此我们的工作显示了包含GABA (A)受体的呈递以及退敏作用的这种调控水平的改变。

更具体地说，本发明的发现说明了与认知问题相关的GABA信号改变的存在。本发明也揭示了一方面从阿尔茨海默氏病人的前额皮质提取的mRNA以及另一方面从相同年龄的对照个体的相同脑区提取的mRNA之间编码GABA (A)受体的  $\epsilon$  亚基的mRNA的剪接的改变的存在。在这以前的人病理学没有报道过这种亚基的异常。

因此本发明基于神经细胞中的兴奋毒性以及细胞程序性死亡的出现，发展以及进展相关的以及尤其与神经退行性疾病以及认知功能相关的这些新陈代谢通道的调节，提出了认知失调的新的治疗策略。

如上所指出，本发明涉及吡唑并吡啶家族的化合物在治疗神经退

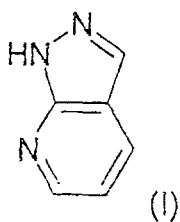
行性疾病(包括血管痴呆), 尤其是与神经退行性疾病相关的认知缺陷中的应用。

本申请记录了包括依地唑酯的吡唑并吡啶家族化合物用于治疗认知缺陷尤其是那些阿尔茨海默氏病以及血管痴呆诱导的认知缺陷的有益并且显著的特性。

在本发明的上下文, 术语“治疗”是指预防, 治愈, 缓解治疗, 以及病人的护理(减轻痛苦, 延长寿命, 减速疾病的进展, 改善神经元存活, 保护神经元抗兴奋毒性或细胞程序性死亡等等), 等等。此外, 所述治疗可以连同其它药物或者治疗一起进行, 尤其是针对疾病的晚期阶段, 诸如半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶(caspase)抑制剂或者其它的活性化合物。

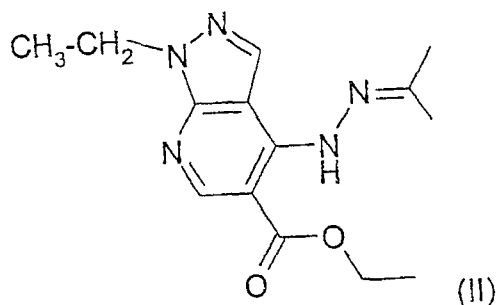
本发明尤其适合于治疗个体的认知缺陷即减少病人体内的这些影响和/或改善认知感觉。

在本发明的意义上, 吡唑并吡啶家族的化合物(或配体)优选地命名为具有下列式(I)结构的任意化合物, 其可以在任一位置上被取代或者未取代。



用于本发明的吡唑并吡啶家族的化合物尤其选自下列化合物:

-具有下列通式(II)结构的依地唑酯：



依地唑酯为本发明的优选的实施方案，

4-丁基氨基-1-乙基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯（曲卡唑酯），

4-丁基氨基-1-乙基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

1-(4-氨基-吡唑并[3,4-b]吡啶-1-基)-β-D-1-脱氧-呋喃核糖，

1-乙基-4-(N'-异亚丙基-联氨基)-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯（SQ 20009），

4-氨基-6-甲基-1-正戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶，

4-氨基-1-乙基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯（去丁基曲卡唑酯），

4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-甲酰胺，

1-乙基-6-甲基-4-甲基氨基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

4-氨基-6-甲基-1-丙基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

1-乙基-4-乙基氨基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

4-氨基-1-丁基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

5-(4-氨基-吡唑并[3,4-b]吡啶-1-基)-2-羟甲基-四氢呋喃-3-醇，

1-烯丙基-4-氨基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯，

4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸，

4-氨基-1-乙基-3,6-二甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

4-二甲基氨基-1-乙基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

1-乙基-6-甲基-4-丙基氨基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

4-氨基-6-甲基-1-戊-4-炔基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

4-氨基-1-丁-3-烯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-烯丙酰胺,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-异丙酰胺,  
4-氨基-1-戊基-N-正丙基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-甲酰胺,  
4-氨基-1-丁基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-6-甲基-1-戊-3-炔基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-丙-2-炔基酰胺,  
4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-N-(2-丙烯基)甲酰胺,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-丁酰胺,  
4-氨基-1-丁-3-炔基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-1-丁-3-烯基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-烯丙酰胺,  
4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-6-甲基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸异丁酯,  
4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-丁酰胺,  
4-氨基-6-甲基-1-(3-甲基-丁-2-烯基)-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-环丙酰胺,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-异羟肟酸乙酯,  
4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸丙-2-炔基酯,  
4-氨基-6-甲基-1-戊-4-炔基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-6-甲基-1-戊-4-烯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,

4-氨基-1-戊-3-炔基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-丙酰胺,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-环丙基甲基-酰胺,  
4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸 2-甲基烯丙酯,  
4-氨基-1-戊-3-炔基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-烯丙酰胺 (ICI 190,622),  
4-氨基-1-戊-4-炔基-N-2-丙烯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-甲酰胺,  
4-氨基-1-戊-3-炔基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-丙-2-炔基酰胺,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-丁-2-炔基酰胺,  
4-氨基-6-甲基-1-戊-3-炔基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-1-(2-环丙基-乙基)-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-1-己-5-炔基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸烯丙酯,  
4-氨基-1-戊-3-炔基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-环丙基甲基-酰胺,  
4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸丁-3-烯基酯,  
4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸环丙基甲酯,  
4-丁基氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-烯丙酰胺,  
4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸 2-环丙基-乙酯,  
4-氨基-6-甲基-1-戊-3-炔基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸环丙基甲酯,  
4-氨基-6-甲基-1-戊-4-炔基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸环丙基甲酯,  
4-氨基-1-苄基-6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-苄基酰胺,  
4-氨基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-苯基酰胺,

4-氨基-6-甲基-1-戊基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸苄酯,  
4-叠氮基-1-β-D-呋喃核糖基吡唑并[3,4-b]吡啶,  
1-戊-3-炔基-N-2-丙烯基-4-丙酰胺基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-甲酰胺,  
2-(4-氨基-吡唑并[3,4-b]吡啶-1-基)-5-羟甲基-四氢-呋喃-3,4-二醇,  
2-(6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基氨基)-乙醇,  
3-(6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基氨基)-丙-1-醇,  
3-(6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基氨基)-乙酸丙酯,  
2-(6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基氨基)-丙酸乙酯,  
2-(6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基氨基)-戊酸乙酯,  
2-(6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基氨基)-苯甲酸乙酯,  
3-(6-甲基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基氨基)-戊酸丙酯,  
N-苯亚甲基-N'-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-肼,  
N-呋喃-2-基亚甲基-N'-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-肼,  
N-(4-氟-苯亚甲基)-N'-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-肼,  
N-(3-呋喃-2-基-亚丙烯基)-N'-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-肼,  
N-(4-甲氧基-苯亚甲基)-N'-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-肼,  
4-[(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-亚肼甲基]-苄腈,  
N-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基亚甲基-N'-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-肼,  
N-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-N'-(4-硝基-苯亚甲基)-肼,  
N-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-N'-(2-硝基-苯亚甲基)-肼,  
N-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-N'-(4-三氟甲基-苯

亚甲基)-肼,

N-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-N'-(5-硝基-呋喃-2-基亚甲基)-肼,

N-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-N'-(2-三氟甲基-苯亚甲基)-肼,

N-(3-甲基-1-苯基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-4-基)-N'-(6-硝基-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基亚甲基)-肼,

4-(3-氯-4-甲氧基-苄基氨基)-1-乙基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸,

4-(3-氯-4-甲氧基-苄基氨基)-1-乙基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-(吡啶-4-基甲基)-酰胺,

4-(3-氯-4-甲氧基-苄基氨基)-1-乙基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-(四氢-呋喃-2-基甲基)-酰胺,

4-(3-氯-4-甲氧基-苄基氨基)-1-乙基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-(5-羟基-戊基)-酰胺,

4-(3-氯-4-甲氧基-苄基氨基)-1-乙基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-[3-(2-氧-吡咯烷-1-基)-丙基]-酰胺,

4-叔-丁基氨基-1-(2-氯-2-苯基-乙基)-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯,

1-(2-氯-2-苯基-乙基)-4-环丙基氨基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯,

1-(2-氯-2-苯基-乙基)-4-丙基氨基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯,

1-(2-氯-2-苯基-乙基)-4-苯基氨基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯,

4-丁基氨基-1-(2-氯-2-苯基-乙基)-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯,

1-(2-氯-2-苯基-乙基)-4-(2-乙氧基-乙基氨基)-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯,

4-苄基氨基-1-(2-氯-2-苯基-乙基)-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙

酯，

1-(2-氯-2-苯基-乙基)-4-苯乙基氨基-1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-羧酸乙酯，

化合物可以为盐，酯，消旋物，活性异构体等的形式。化合物保护自由基细胞的能力可以进行体外检查。尤其优选的化合物为依地唑酯，曲卡唑酯或卡它唑酯且更优选依地唑酯。

因此本发明第一次提出了与自由基调节以及GABA受体调节作为神经退行性疾病有关的认知缺陷治疗的治疗靶点的治疗干预。根据特定的实施方案，本发明可用于治疗这些疾病早期阶段的认知缺陷。尤其是可用于治疗阿尔茨海默氏病，血管痴呆，亨廷顿氏舞蹈病以及帕金森氏症。

本发明的特定目的是吡唑并吡啶化合物在制备用于患阿尔茨海默氏病以及血管痴呆患者的认知缺陷的药物中的应用。

本发明的另一个目的是吡唑并吡啶化合物，尤其是依地唑酯在制备用于治疗脑局部缺血的药物中的应用。

本发明的另一个目的涉及GABA (A)和/或自由基的调节剂在制备设计用于治疗神经退行性疾病，尤其是阿尔茨海默氏病以及血管痴呆，或患有这些疾病的患者的认知问题或失调的药物组合物中的应用。调节剂化合物可以为天然或合成来源的任意化合物，尤其是有机或无机分子，植物，细菌，病毒，动物，真核生物，合成或半合成来源，能够调节自由基(ROS)的表达或活性。

用于本发明的范围内的化合物可以任一方法进行配制以及给药。可以根据本领域技术人员公知的任一方法进行给药，优选通过系统或者局部的口服途径或者通过注射。通常通过眼内，腹膜内，脑内，静脉内，动脉内，皮下或肌内的途径给药。优选使用口服或者系统途径

给药。给药剂量可以是本领域技术人员所接受的剂量。通常，对于天然化合物的抑制剂化合物而言，注射大约0.01mg到100mg/kg。具体的单位剂量例如为施用的每剂量的0.5以及40 mg之间。应该理解，可以进行反复注射，有可能与其它活性制剂或者任一药学上可接受的介质（例如，在稳定剂等存在下，缓冲液，盐溶液，等渗液等）联合使用。

药学上可接受的载体或赋形剂可以选自缓冲液，溶剂，粘合，稳定，乳化溶液等等。缓冲液或稀释溶液尤其是在磷酸钙，硫酸钙，乳糖，纤维素，高岭土，甘露糖醇，氯化钠，淀粉，细晶糖以及羟丙基甲基纤维素(HPMC)中(用于缓释)。粘合剂例如为淀粉，明胶以及填充溶液诸如蔗糖，葡萄糖，右旋糖，乳糖等等。还可以使用天然或合成的树胶，诸如尤其是藻酸盐，羧甲基纤维素，甲基纤维素，聚乙烯基吡咯烷酮等等。其它的赋形剂例如为纤维素以及硬脂酸镁。稳定剂可以掺入制剂中，诸如例如多糖(阿拉伯胶，琼脂，藻酸，瓜尔胶以及黄蓍胶，壳多糖或其衍生物以及纤维素醚)。溶剂或溶液例如为生理盐水，水，蒸馏水，磷酸盐缓冲液，含磷酸盐的盐溶液及其它常规的液体。

本发明可用于哺乳动物，尤其是人类。显示于实施例中的结果说明了依地唑酯在改善兴奋毒性，氧化胁迫或脑局部缺血条件下神经元的活力，以及用于改善病态动物记忆能力中的有效性。

本发明也可以基于个体中基因，信使或PDE4或AKAP1或GABA (A) RAPL1蛋白反调节或改变的存在的确定的发展检验，试剂盒或检测方法，体外筛选或诊断这些疾病。本发明也提供了执行这种检验的手段，尤其是探针，引物，细胞，试剂等等。

本发明也提供了筛选治疗神经退行性疾病的候选分子的检验或方法，包括确定分子结合AKAP1，GABA (A) RAPL1，GAB (A)受体和/或PDE4，尤其是如上所述的这些基因或蛋白的变化形式的能力。

本发明的其它方面以及优点将根据必须被认为是说明性而非限制性的下列实施例而更加显而易见。

### 附图说明

图1：依地唑酯对小脑颗粒细胞上NMDA/丝氨酸诱导的毒性的神经保护作用。

图2：依地唑酯对小脑颗粒细胞上由红藻氨酸酯诱导的毒性的神经元保护性作用。

图3：依地唑酯对皮质神经元上由NMDA/丝氨酸诱导的毒性的神经元保护性作用。

图4：依地唑酯对皮质神经元上由红藻氨酸酯诱导的毒性的神经元保护性作用。

图5：依地唑酯对腹侧脊髓细胞上由NMDA/丝氨酸诱导的毒性的神经元保护性作用。

附图6：依地唑酯对SH-SY5Y细胞上由6-20羟基多巴胺诱导的毒性的神经元保护作用。

附图7：依地唑酯对大鼠脑梗塞模型的保护作用。

### 实施例

#### 实施例1：鉴定作为分子兴奋毒性靶的PDE4，AKAP1以及GABA (A) RAPL1

从不同阶段的动物脑的样本中提取的聚腺苷酰化（poly A+）的RNA 进行定性差异分析，不用预先分离的神经元从而考虑从而考虑与疾病的发展相关的可变剪接事件的最大数目。

poly A+RNA 通过本领域技术人员公知的方法进行制备。尤其是，可以通过诸如，硫氰酸胍的离液剂处理，然后利用溶剂（例如，酚，氯仿）的方法提取总 RNA。这种方法对于本领域技术人员是公知的[参见 Maniatis 等人，Chomczynski 等人，Anal. Biochem. 162(1987)156]，而且通过使用市售的试剂盒可以很容易的进行操作。poly A+RNA 根

据本领域技术人员公知的常规方法从总 RNA 中制备，并且以市售试剂盒的形式提供。

这些 poly A+RNA 作为利用逆转录酶进行逆转录反应的模板。以优选的方式，使用缺失 RNase H 活性的逆转录酶，从而获得在大小上大于用传统逆转录酶获得的第一个互补 DNA 链。这种不含 RNase H 活性的逆转录酶制备物可以市售获得。

在疾病发生的每个时间点（30 天，60 天和 90 天），从转基因动物（T）和同系基因的对照动物（C）制备 poly A+RNA 以及单链 cDNA。

根据 DATAS 方法，在每个动力学时间点进行 mRNA（C）与 cDNA（T）的杂交，以及 mRNA（T）与 cDNA（C）的交互杂交。

然后根据 DATA 方法的操作流程纯化这些 mRNA/cDNA 异双链体。

不与互补 DNA 配对的 RNA 序列通过 RNase H 的作用从这些异双链体释放，因为这种酶降解成对的 RNA 序列。这些未配对的序列代表在相互同源的 RNA 之间存在的定性差异。这种定性差异可以位于 RNA 序列上的任一位点，在序列的 5' 或者 3' 区或者在序列中间，尤其在编码序列中。根据他们的位点，这些序列可能不只是剪接修饰，还可能是易位或者缺失的结果。然后根据本领域技术人员公知的方法，更具体的是描述于 DATAS 方法专利中的那些方法，克隆代表定性差异的 RNA 序列。

这些序列进入作为定性差异文库的 cDNA 文库。一种这样的文库含有健康状态特异的外显子和内含子；另一种文库就含有表征病理状况的剪接事件。

通过与探针杂交验证克隆的差异表达,所述探针由研究中的差异状态下提取的信使 RNA 的反转录获得。保留显示差异杂交的克隆用于后面的分析。通过 DATAS 鉴定的序列对应于通过在病理状态和正常状态中的剪接而差异表达的内含子和/或外显子。这些剪接事件可以特异于疾病发展的特定阶段或者表征健康状态。

将这些序列与数据库比较可以将获得的信息进行分类,并且提出根据诊断和治疗目的对序列加以合理选择。

对来自60天龄对照动物和转基因动物的RNA实施DATAS,可以分离到来自磷酸二酯酶4B mRNA的cDNA片段。这个片段相应于特异性存在于对照动物中的外显子片段,并且因此在60天龄阶段的SOD1G93A转基因动物体内特异性缺失。这个片段包括从小鼠PDE4B的终止密码子开始编号的核苷酸377到486(GenBank,登录号No. AF208023)。这个序列包括2912个碱基,缺失的片段相应于碱基2760到2869。由于选择性使用3'非编码外显子或者由于使用两种可选择的聚腺苷酰化位点,这个区是非编码的并且在对照动物和转基因动物之间差异表达。

对来自60天龄转基因动物和对照动物的RNA实施DATAS,可以分离到来自AKAP1 mRNA的cDNA片段。这个片段相应于特异性存在于对照动物中的外显子片段,并且因此在60天龄阶段的SOD1G93A转基因动物体内特异性缺失。这个片段与GenBank登录号No. NM\_009648序列的核苷酸1794到2322同源。由于可选择的剪接,这个区是编码的并且在对照动物和转基因动物之间差异表达。

对来自60天龄转基因动物和对照动物的RNA实施DATAS,可以分离到来自GABA(A)RAPL1的mRNA的cDNA片段。这个片段相应于特异性存在于对照动物中的外显子片段,并且因此在60天龄阶段的SOD1G93A转基因动物体内特异性缺失。这个片段与GenBank登录号

No.BC024706序列的核苷酸1055到1461同源。这个区来自非编码3'区并且在对照动物和转基因动物之间差异表达。

这些元件使得阐明和定义重要信号通道成为可能，并表明依赖于GABA(A)R的信号在阿尔茨海默氏病患者的脑中似乎改变了。的确，一方面从阿尔茨海默氏病人的前额皮质提取的mRNA以及另一方面从相同年龄的对照个体的相同脑区提取的RNA之间的DATAS技术的定性差异筛选的分析，证明了编码GABA (A) RAP蛋白(GABA (A)受体相关蛋白)的mRNA的剪接改变。此改变揭示了来自GenBank NM\_007278.1的所有组成成分的序列的碱基273上的内含子序列的 135个碱基的保守性。这些保守性修饰缺相以及GABA(A)RAP蛋白的功能性。因为这些蛋白与GABA (A)受体的呈递和退敏作用有关，DATAS分析揭示了突触活性调控在此水平上的改变。

GABA信号代表一个用于负调节突触活性的最有功效的机制。当此GABA (A)受体被GABA神经递质刺激时，此受体，其为一种离子通道，允许与神经元的复极化有关的氯离子的进入。GABA (A)受体具有由两个 $\alpha$ 亚基，两个 $\beta$ 亚基和一个附件结合形成的五邻体结构，附件主要为 $\Delta$ ， $\epsilon$ 或 $\gamma$ 亚基。

GABA (A)受体的激动剂为抗焦虑药而非失忆药。

GABA (A)受体的拮抗剂为抗焦虑药，惊厥原药和失忆原药。

此外，众所周知，在患有阿尔茨海默氏病的病人的脑中，GABA (A)受体的亚基之一， $\beta 3$ 亚基，为下表达。

$\epsilon$ 亚基，存在于海马中且其是在阿尔茨海默氏病发展过程中首先被改变的脑结构之一，产生对GABA (A)受体的最初的药理特性。的确，通过含有 $\epsilon$ 亚基的GABA (A)受体的 $\beta$ 亚基连接于药物诸如吡唑并

吡啶，诸如曲卡唑酯和依地唑酯，促进了GABA (A)与GABA神经介质的相互作用后的退敏作用。这些影响是特别有意义的，因为老化与GABA (A)受体退敏作用所必需时间的增加有关。

$\epsilon$  亚基的改变，如本发明所述，与老化诸如阿尔茨海默氏病相关的过程中GABA (A)受体的退敏作用所需时间的延长有关，可因此通过用药物诸如吡啶并吡啶，诸如曲卡唑酯和依地唑酯治疗病人来补偿。后者化合物也提供了作为PDE4抑制剂的优点，其在本发明显示了与兴奋毒性现象有关。

影响这些信号通道的可能性可导致对神经退行性疾病，尤其是与认知功能改变诸如阿尔茨海默氏病和血管痴呆有关的退行性疾病的尤其有效的治疗。

## 实施例 2 兴奋毒性的抑制

在此实施例中，大鼠小脑的粒状神经元，腹侧脊髓的皮质神经元和细胞根据本领域技术人员公知的技术进行培养。

### 大鼠小脑颗粒细胞的初级培养物：

7天龄 Wistar大鼠去头并且解剖小脑。除去脑膜后，将组织切割成小块并在37℃胰酶消化15分钟。细胞进行研磨分离并以300,000细胞/cm<sup>2</sup>接种在添加了10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺的Eagle基础培养基上。第二天，添加10  $\mu$  M的ARA-C（一种抗有丝分裂剂）以抑制神经胶质细胞的增殖。置于依地唑酯抑制化合物培养物酯后，加入毒素前，在10  $\mu$  M D-丝氨酸的存在下用50  $\mu$  M的红藻氨酸酯或者100  $\mu$  M 的N-甲基-D-天冬氨酸处理细胞9天。在毒素之前立即加入8-溴-cAMP。所有处理至少重复两次并在至少两种不同的培养物中进行。温育6小时以后，通过MTT试验评估毒性。结果归一化到未处理对照的平均数，用Wilcoxon试验进行统计分析。显著性水平设定为 $p \leq 0.05$ 。

### 皮质细胞的初级培养:

取来自Wistar大鼠的16天龄胚胎并且解剖皮质。在37℃用胰蛋白酶处理25分钟后,细胞进行研磨分离。然后以300,000细胞/cm<sup>2</sup>接种在添加了10%马血清,10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺的极限必需培养基上。培养4天以后,一半的培养基用添加了5%马血清和2mM谷氨酰胺的极限必需培养基替换。同一天,添加10 μ M的5-氟-2-脱氧尿苷(一种抗有丝分裂剂)。培养7和11天以后,用条件培养基替换一半的培养基。所述条件培养基由含5%马血清和2mM谷氨酰胺的MEM组成;这种培养基在使用前在一层皮质星形胶质细胞上传代。在第14天,在10 μ M的D-丝氨酸的存在下加入毒素50 μ M的红藻氨酸酯或者20 μ M的N-甲基-D-天冬氨酸之前用依地唑酯抑制剂化合物处理细胞。所有的处理至少重复两次并在至少两种不同的培养物中进行。温育6小时以后,通过MTT试验评估毒性。结果归一化到未处理对照的平均数,用Wilcoxon试验进行统计分析。显著性水平设定为 $p \leq 0.05$ 。

### 腹侧脊髓细胞的初级培养物

细胞分离自14天龄Wistar大鼠胚胎。当获取它们时,通过二氧化碳杀死怀孕的雌性大鼠。

取得一系列胚胎并置入含有PBS的箱中。

解剖各胚胎的脊髓以及由背脊分离腹侧脊索。腹侧脊椎然后在37℃胰蛋白酶化20分钟。通过添加由Leibovitz 15培养基,20%马血清,N2 (1X)补充物,20%葡萄糖(3.2mg/ml),7.5%碳酸氢盐(1.8mg/ml)和L-谷氨酰胺(2mM)制成的培养基终止胰蛋白酶的作用。通过研磨分离细胞。除去积聚的组织并且然后通过台盼蓝染色分离细胞。细胞以250 000细胞/cm<sup>2</sup>的密度涂布在由神经基础(neurobasal)培养基,马血清 (2%),B27 (1X)补充物,和谷氨酰胺(2mM)制成的培养基中。体外培养3天后,抗-有丝分裂剂,ARA-C (5 μ M)添加至细胞以抑制胶质细胞的产生。细胞在湿润恒温箱(5% CO<sub>2</sub>)中37℃培养9天时间。培养9天后,在10 μ

MD-丝氨酸存在下添加25  $\mu$  M N-甲基-D-天冬氨酸之前，用抑制化合物：依地唑酯处理细胞。所有的处理至少重复两次并在至少两种不同的培养物中进行。用NMDA/D-丝氨酸作为毒素温育3小时后，通过MTT试验评估毒性。

结果归一化到未处理对照的平均数，用Wilcoxon试验进行统计分析。显著性水平设定为 $p \leq 0.05$ 。

#### MIT检验：

利用MTT试验测定毒性。与化合物温育后，加入MTT使得每孔的终浓度为0.5mg/ml。然后，将微孔板在37°C黑暗条件下培养30分钟。对培养基抽气，并将晶体重新悬浮在500  $\mu$  l的DMSO（二甲基亚砷）中。读取550nm处的吸光度并且计算百分比存活率。

结果：

结果示于图1-5中。这些结果显示了本发明的化合物对于神经元存活的保护效果。当神经元用本发明的抑制剂共处理时，观察到对兴奋毒性诱导剂（NMDA/丝氨酸和/或红藻氨酸酯）的剂量依赖性的保护效果。

图1和2显示了依地唑酯对颗粒小脑细胞的保护结果。结果证明了依地唑酯在NMDA/丝氨酸处理时可能对这些细胞产生40%的保护作用，并且通过红藻氨酸酯毒性诱导时产生50%的保护作用。

图3和4显示了依地唑酯对皮质神经元的保护结果。结果证明了依地唑酯在NMDA/丝氨酸处理时可能对这些细胞产生47%的保护作用，并且通过红藻氨酸酯毒性诱导时产生40%的保护作用。

附图5显示了依地唑酯对腹侧脊髓细胞的结果。这些结果表明在用NMDA/Ser处理时依地唑酯对这些细胞产生36%的保护作用。

本发明文件因此不仅包含兴奋毒性机制中的PDE4B和GABA (A)受体,而且也包含在兴奋毒性相关胁迫过程中保持神经元活力的抑制剂的能力。

#### 实施例3:氧化胁迫的抑制

在此实施例中,根据本领域技术人员的公知方法培养来自SH-SY5Y细胞系的细胞。这些获自人成神经细胞的细胞,具有神经元前体的早期发育阶段的特性。

所用毒素为诱导氧化胁迫的6-羟基多巴胺(6-OHDA)。通过MTT检验测定毒性。

附图6显示了依地唑酯对SH-SY5Y细胞的作用结果。这些结果表明在用6-OHDA处理时依地唑酯对这些细胞产生40%的保护作用。

因此依地唑酯是一种通过ROS诱导的细胞死亡的潜在体外保护剂。

依地唑酯的神经元保护潜能因此通过实施例2和3获得的结果被证实。

#### 实施例4:大鼠局部缺血的研究

评价依地唑酯在大鼠脑梗塞模型中的体内保护作用。此研究过程中,通过脑的内颈动脉和中动脉的腔内阻塞致使脑梗塞。阻塞之前和若干次之后用依地唑酯(10mg/kg, p.o)处理八只大鼠组。阻塞之前和若干次之后用参照化合物, L-NAME (1mg/kg, i.p.)处理八只大鼠组。八只大鼠组仅仅用介质处理。通过临床观察,神经学功能试验和通过研究结束时测定的梗塞大小来评价作用。

获得的结果表明相对于对照(参见附图7中的实例)依地唑酯诱导减少了平均28%的梗塞大小。在另一方面,观察到依地唑酯处理组相对于对照组(依地唑酯组31%对比对照组42%)的活动减退得到了改善。此外,动物的神经学评价证明了治疗组相对于对照组得到了改善。

#### **实施例5: Aquatic labyrinth检验(Morris pool)**

此检验用于评价在病态下大鼠记忆和空间控制信息的能力。该任务包括动物置于《庇护》平台所示距离,通过浸入在充满不透明水的水槽中使其看不见东西。该装置使评价动物的参照记忆成为可能(该平台与每天的测试保持在同一地方)。此检验使理解依赖于试验动物海马的功能的记忆行为成为可能。尤其是,此检验使区别成年大鼠(10个月)和老龄大鼠(30个月)的行为成为可能。海马是其功能在阿尔茨海默氏病过早地改变的脑结构。Morris pool检验因此被本领域专家考虑用于理解欲治疗阿尔茨海默氏病及其它与认知缺陷相关疾病的化合物的药理特性。

用依地唑酯(3mg/kg和10mg/kg)口服施用处理的老龄大鼠和通过介质处理的大鼠用于此研究。这些动物在Morris pool检验中的行为与成年大鼠对照组的表现相比较。

用3mg/kg依地唑酯处理的稍微改善了老龄大鼠的行为。

10mg/kg依地唑酯处理显著地使老龄动物产生接近于成年动物的行为。

这些结果表明依地唑酯改善了依赖于海马的记忆和认知特性,使降低表现相关老化的缺陷成为可能。此结果对依地唑酯用于治疗老化相关的认知问题尤其是诸如阿尔茨海默氏病进行了定性。

#### **实施例6: 临床应用于人**

此实施例描述了依地唑酯用于治疗人的神经退行性疾病的条件。  
此实施例说明了本发明的治疗潜能及其应用于人的条件。

在此研究中，依地唑酯的单、增加的剂量(0.5,1,2,5,10和20 mg)以0.5和5 mg剂量的胶囊形式口服施用于不同和连续的幼年的、健康的、男性志愿受试者的8人组。此研究在刚好一个中心，双盲进行，且对8人受试者中的2人提供安慰剂。评价的参数为施用产物后24小时的临床(副作用表现，临床信号，动脉压或心律的变化)，心电图(ECG记录)以及生物学耐受(血液学和血生物化学，尿检验)。产物施用之前和之后不同时间(0.25-0.50-1.00-1.50-2.00-3.00-4.00-5.00-6.00-8.00-10.00-12.00和24.00小时)的各受试者测定产物的血浆剂量。同样也测定施用产物之前和之后(4, 4-8, 8-12和12-24小时)收集的尿的产物尿剂量。

施用增加剂量阶段结束时，另一6人受试者组接收两次的一剂量的依地唑酯：空腹，以及在进餐富脂肪过程中。此第二部分的目的是比较两个施用条件之间的产物的血液速率的发展。评价的参数为施用产物后24小时的临床(副作用表现，临床信号，动脉压或心律的变化)，心电图(ECG记录)以及生物学耐受(血液学和血生物化学，尿检)。产物之前和之后不同时间(0.25-0.50-1.00-1.50-2.00-3.00-4.00-5.00-6.00-8.00-10.00-12.00和24.00小时)测定各受试者的产物血浆剂量。同样也测定施用产物之前和之后(4, 4-8, 8-12和12-24小时)收集的尿的产物尿剂量。

也发展了用于此产物的胃-抗性胶囊使得能够将其应用于人的临床研究中。

增加剂量的第一研究阶段期间获得的结果表明依地唑酯被良好地耐受且不涉及任何的副作用。此外，血浆剂量证实人对该产物具有良好的强剂量的吸收。

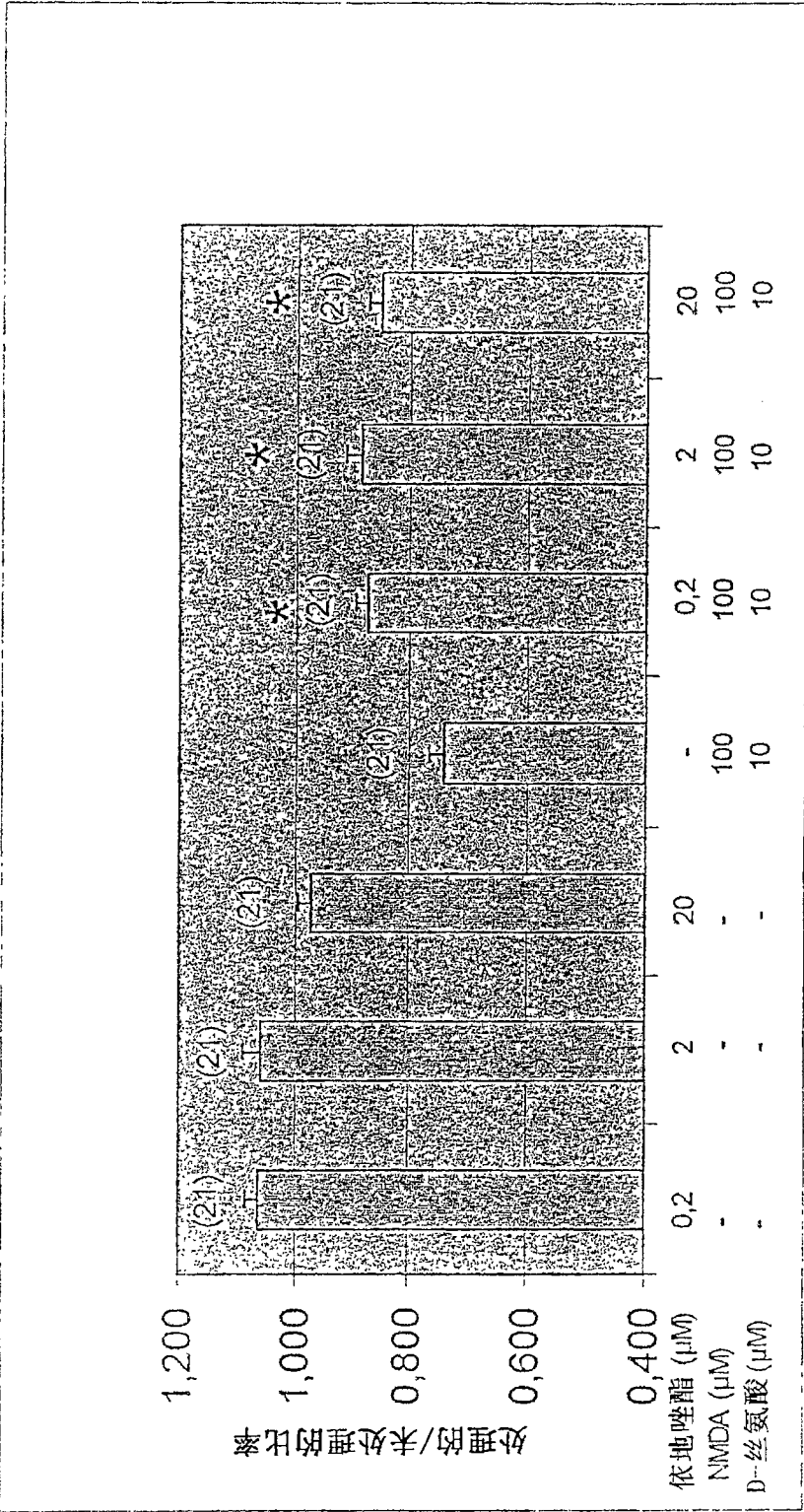
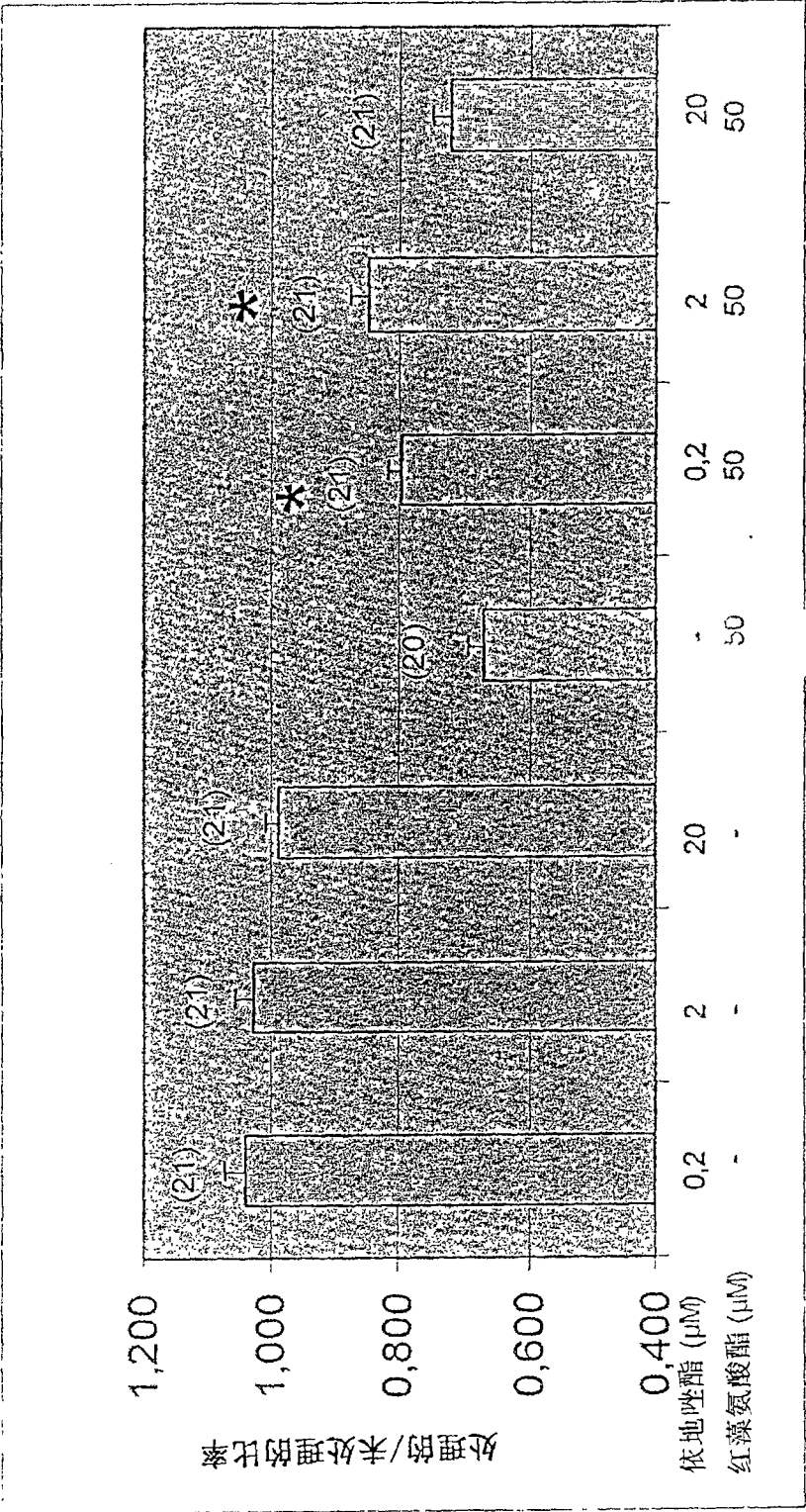


图1

\*: p < 0.05 Wilcoxon 检验



\*: p < 0.05 Wilcoxon 检验

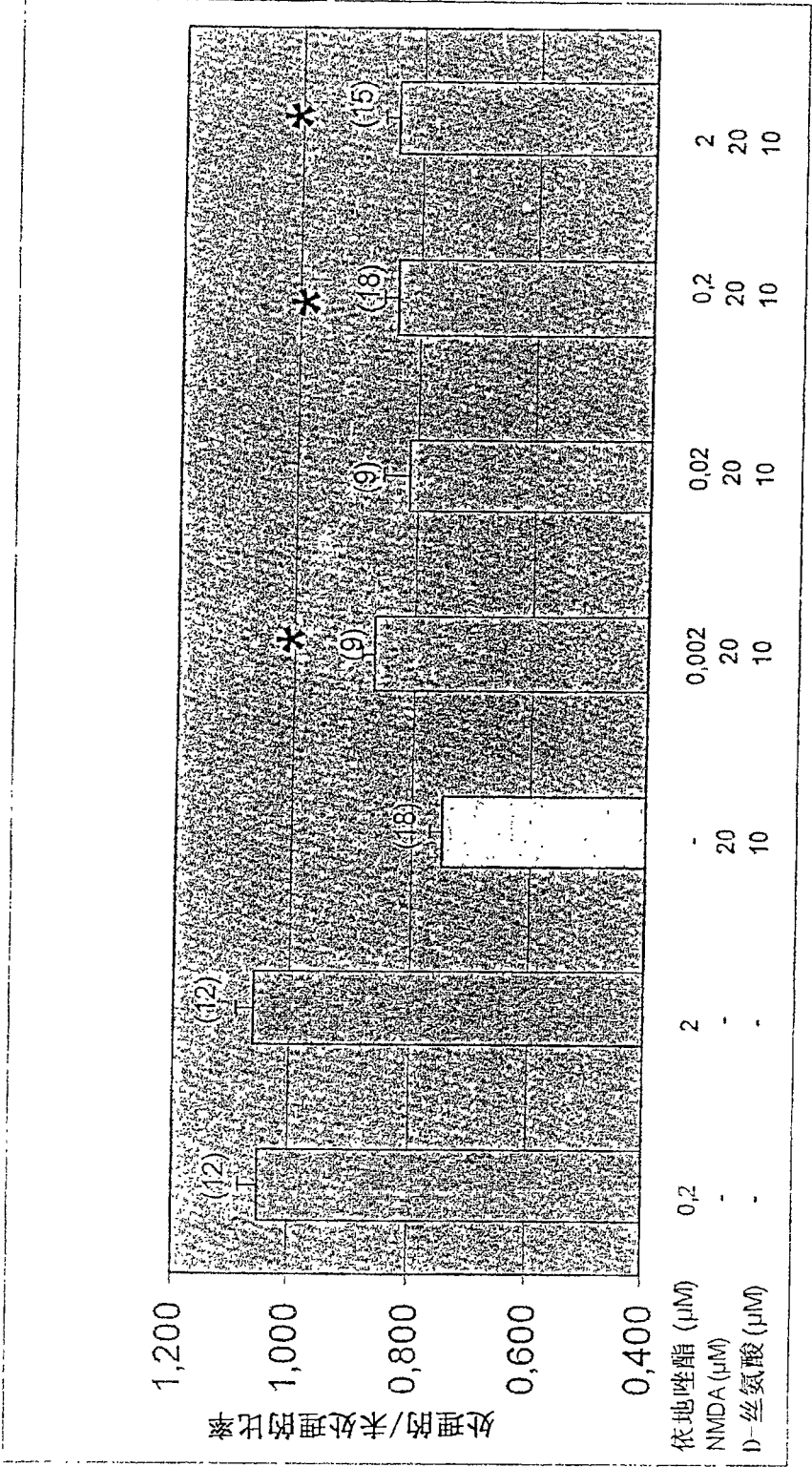


图3

\* : p < 0.05 Wilcoxon 检验

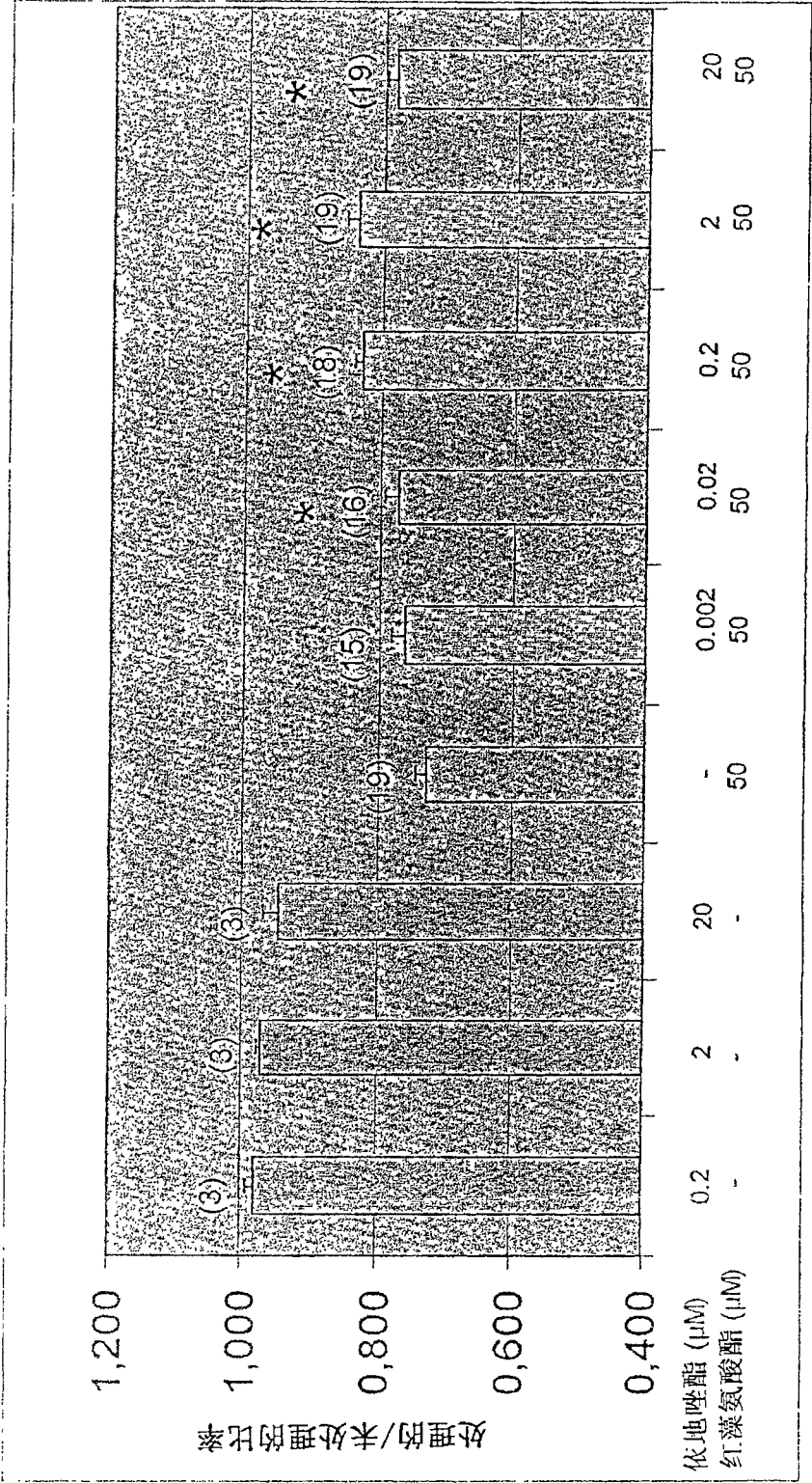


图4

\*: p < 0.05 Wilcoxon 检验

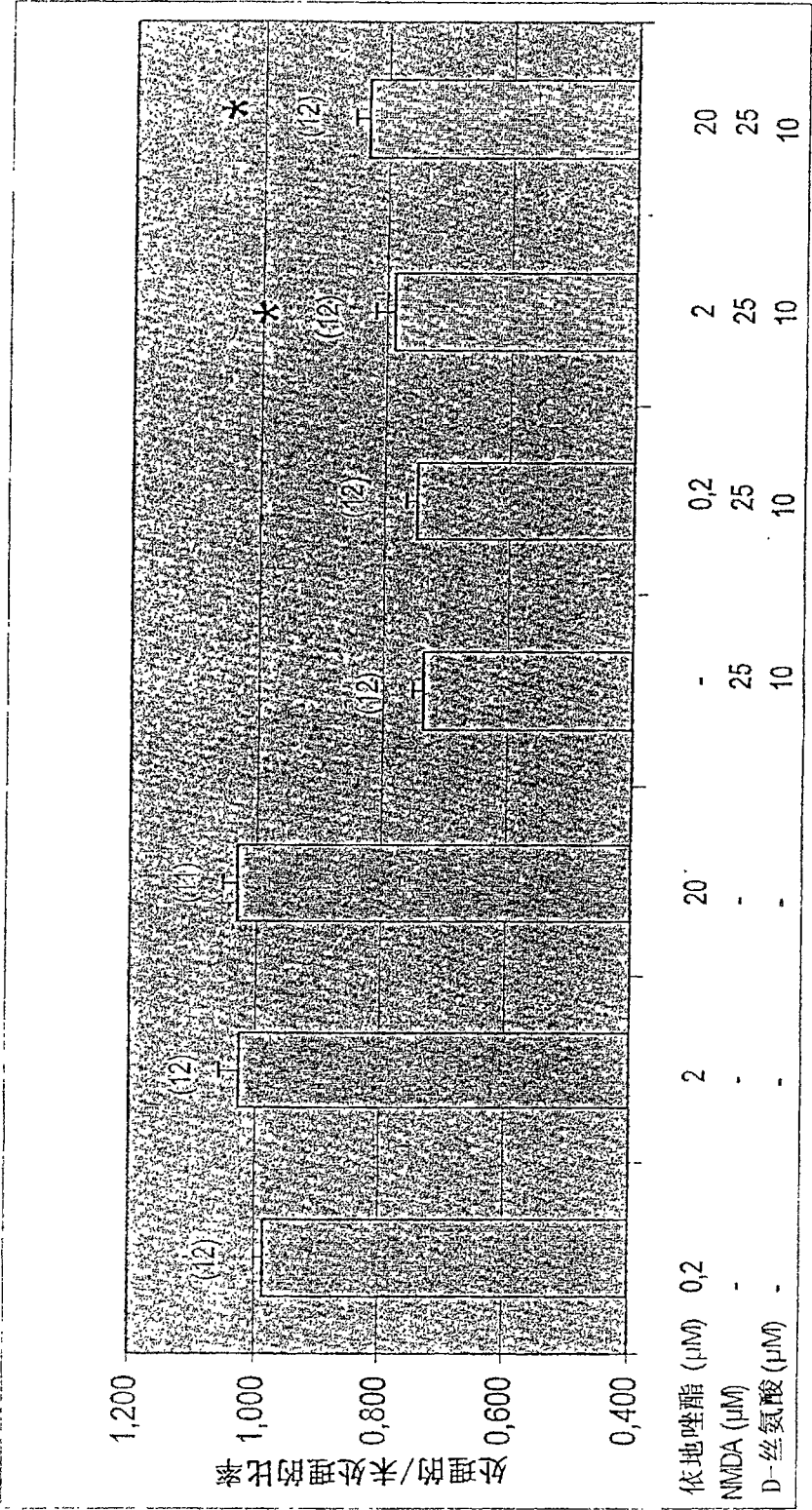


图5

\*:  $p < 0.05$  Wilcoxon 检验

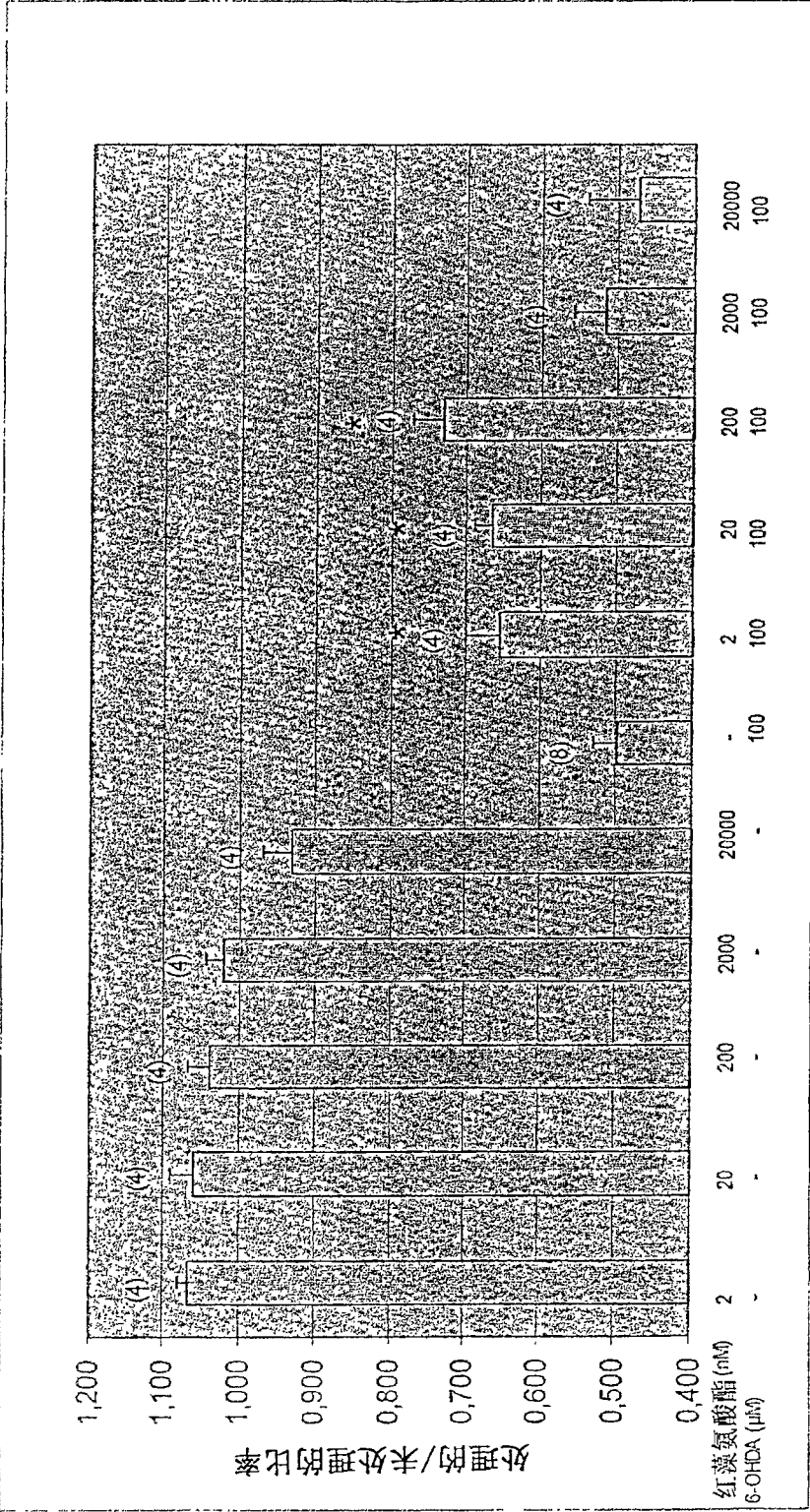
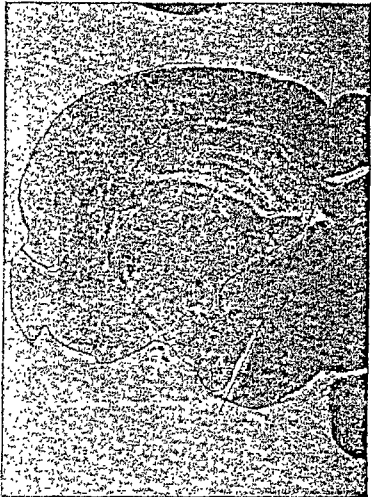


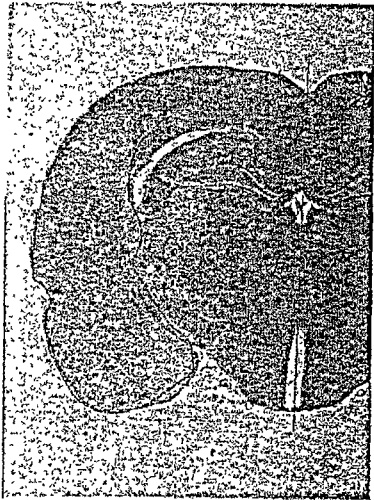
图6

\*:  $p < 0.05$  Wilcoxon 检验



用介质处理的动物

梗塞面积=这个部分的82%  
梗塞提及=缺血的大脑半球的72%



用依地唑酯处理的动物

梗塞面积=这个部分的29%  
梗塞提及=缺血的大脑半球的20%

图7