

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780034007.3

[43] 公开日 2009年9月23日

[11] 公开号 CN 101542289A

[22] 申请日 2007.7.20
 [21] 申请号 200780034007.3
 [30] 优先权
 [32] 2006.7.21 [33] FR [31] 0606698
 [86] 国际申请 PCT/FR2007/051706 2007.7.20
 [87] 国际公布 WO2008/009868 法 2008.1.24
 [85] 进入国家阶段日期 2009.3.13
 [71] 申请人 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
 洛朗·德西雷 热罗姆·布尔丹

[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

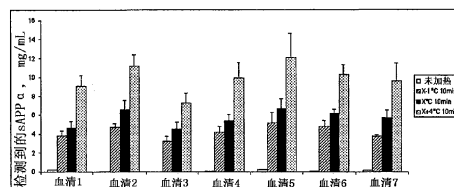
权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 6 页

[54] 发明名称

治疗神经变性疾病的方法和工具

[57] 摘要

本发明涉及用于治疗神经变性疾病的组合物和方法，在这些神经变性疾病中认知功能发生了变化，例如在阿茨海默氏病中所观察到的。更具体来说，本发明提出了在人类临床研究中观察神经保护性治疗的活性和/或有效性的策略，该策略基于某些血小板参数的生化定量并因此能够通过抽血实行。本发明还涉及适合用于执行所述策略的方法、工具、构建物和组合物。



1. 对样品中的 sAPP α 进行免疫定量的方法，包括对样品进行热处理的步骤和免疫定量的步骤。

2. 权利要求 1 的方法，其特征在于所述样品是血液或源自血液的样品或其它生物学流体样品。

3. 权利要求 1 或 2 任一项的方法，其特征在于热处理步骤包括将样品在大约 60°C 到 70°C 之间的温度下进行处理，处理时间期限足以暴露出 sAPP α 表位，通常为大约 30 秒到 10 分钟之间的时间期限。

4. 权利要求 1 或 2 任一项的方法，其特征在于免疫定量步骤利用特异性抗体来进行。

5. 权利要求 1 到 4 任一项的方法对人类血液样品（衍生物）中的 sAPP α 进行定量的应用。

6. 权利要求 5 的应用，用于对源自患有阿茨海默氏病的人类对象的血液（衍生物）样品中的 sAPP α 进行定量。

7. 权利要求 1 到 4 任一项的方法评估患有阿茨海默氏病的人类对象中的治疗效能的应用。

8. 评估或监测神经保护性治疗在哺乳动物中的有效性的方法，包括在接受所述治疗的哺乳动物的生物学样品中体外或离体测量 sAPP α 的产量的步骤，所述样品含有血小板，sAPP α 的产量是治疗有效性的指示。

9. 权利要求 8 的方法，其特征在于神经保护性治疗是选自吡唑并

吡啶和 GABA (A) 受体调节剂的化合物。

10. 权利要求 8 或 9 的方法，其特征在于哺乳动物患有神经变性疾病。

11. 权利要求 8 到 10 任一项的方法，其特征在于生物学样品是血液或血液衍生样品。

12. 权利要求 8 到 11 任一项的方法，其特征在于 sAPP α 的产量通过免疫测试、优选 ELISA 进行测量。

13. 权利要求 8 到 12 任一项的方法，其特征在于将测量到的 sAPP α 产量与治疗前或治疗早期阶段在所述哺乳动物中的参比水平或测量值进行比较。

14. 选自吡啶并吡啶和 GABA (A)受体调节剂的化合物在制备刺激或诱导哺乳动物中血小板生产 sAPP α 的药物中的应用。

15. 选自吡啶并吡啶和 GABA (A)受体调节剂的化合物在制备降低哺乳动物中血栓形成风险的药物中的应用。

16. 选自吡啶并吡啶和 GABA (A)受体调节剂的化合物在制备减少神经变性疾病患者中血管并发症的药物中的应用。

17. 选自吡啶并吡啶和 GABA (A)受体调节剂的化合物在制备抑制哺乳动物、特别是神经变性疾病患者中血小板凝结的药物中的应用。

治疗神经变性疾病的方法和工具

本发明涉及治疗神经变性疾病的组合物和方法，在这些神经变性疾病中认知功能发生了变化，例如在阿茨海默氏病中所观察到的。更具体来说，本发明提出了在某些血小板参数的生物化学分析测试的基础上，对神经保护性治疗的活性和/或有效性进行人类临床监测的策略，从而使该策略可以通过血液取样来进行。本发明还涉及适合执行这些策略的方法、工具、构建物和组合物。

阿茨海默氏病是痴呆症的首要原因和最常见的神经变性疾病。这种进行性疾病的特征为记忆丧失以及语言能力、定向性和判断力的退化。检查患有该疾病的患者的大脑，显示出大脑皮质海马神经元丧失，海马区是重要的记忆中心，参与推理、语言和记忆。胆碱能神经元尤其受到这种损耗的影响。

在患有阿茨海默氏病患者脑中观察到的主要异常是细胞内和细胞外蛋白聚集物的积累。由 APP（淀粉样前体蛋白）裂解产生的淀粉样 β 肽 ($A\beta$) 在细胞内和细胞外聚集而形成的老年斑，是涉及神经元和神经胶质细胞发生变化的特征区域。其它细胞内聚集物、神经原纤维缠结以及 τ 蛋白，似乎与痴呆症的严重性密切相关。

对家族形式进行的遗传学研究已经显示出有 4 个基因与该疾病的发展有关，APP、早老蛋白 1 和 2 (PS1 和 PS2)、以及载脂蛋白 E (Apo E)。尽管在每个这些基因中的突变或多态性导致了 $A\beta$ 肽产量的增加，但对造成突触和神经元丧失的机制仍然了解得很少。因此，似乎有几种假说和机制并存，涉及到一些现象例如特别是可以被 $A\beta$ 肽诱导的氧化应激，炎性和免疫现象，甚或性激素缺乏，胰岛素缺乏和甲状腺机能减退。其它假说强调了钙内流和兴奋毒性的变化的作用。但是，还

没有原理能够完全解释胆碱能神经元的具体弱点。目前可用的基于使用乙酰胆碱酯酶抑制剂的治疗方法，只能够暂时改善患者的认知功能，而不代表能够减缓阿茨海默氏病进展的治疗方法，更不用说是战胜它了。

尽管最近的观察结果强调了通过针对 A β 肽的免疫疗法进行药理学干预的可能性，但直接靶向参与 APP 代谢和 A β 肽产生的蛋白酶——分泌酶则更为恰当。

A β 肽是 40/42 个残基的片段，是在淀粉样肽生成途径中，APP 蛋白被称为 β -分泌酶 (BACE) 和 γ -分泌酶 (早老蛋白) 的两种蛋白酶连续裂解而产生的。A β 肽的序列位于 APP 的膜内和细胞外结构域的连接处。在非淀粉样肽生成途径中，APP 被 α -分泌酶在 A β 结构域中 A β 区的 16 位氨基酸 (Lys) 和 17 位氨基酸 (Leu) 之间切开，产生了在细胞外介质中被盐析出来的可溶性 APP α 部分 (sAPP α , 105-125 kDa, APP770 形式的 1-688 位残基)，以及保留在膜上、被称为 C83 (10 kDa) 的片段 (含有一部分跨膜结构域和 C-末端细胞内部分)，该片段自身被 γ -分泌酶裂解产生“APP 细胞内结构域”肽 (AICD) 和 P3 肽 (3 kDa)。因此， α -分泌酶的作用不仅阻碍了淀粉样肽的形成，而且还刺激了 APP 的细胞外 N-末端大片段 (胞外结构域) 的产生。通过 α -分泌酶产生的 APP 的可溶性 N-末端片段、或 sAPP α ，在囊泡腔中和细胞表面上被组成性盐析。这些种类的 APP 在体外被分泌到用表达 APP 的细胞调制的培养基中，在体内可以在血浆和脑脊液中发现。

所描述的刺激 α -分泌酶活性和增加 sAPP α 水平的方法，涉及活化 G-蛋白偶联受体，例如 P2Y2 核苷酸受体、PACAP PAC1 受体或各种不同神经递质的受体，例如蕈毒碱受体、代谢型谷氨酸受体、或甚至 5-羟色胺受体 (综述参见第 iii 节)。神经递质的刺激途径涉及蛋白激酶 C (PKC) 和磷脂酶 C 系统，以及 MAP 激酶，它们在文献中都明确描述为 sAPP α 生产调节剂，例如通过佛波酯或甚至通过 5-羟色胺 5-HT_{2a}

和 2c 受体拮抗剂刺激 PKC 依赖性途径。其它途径涉及已知通过产生 cAMP 和补充 Rac1 GTPase 在认知和记忆中发挥作用的 5-羟色胺 5-HT(4)受体, 或甚至通过 PKC 和/或 MAP 激酶的乙酰胆碱抑制剂, 雌激素例如 17 β -雌二醇或睾酮。普遍已知某些激素和生长因子例如 EGF 和胰岛素分别通过 PKC 或 P13K 刺激 sAPP α 的产生。其它药理剂最近被描述为刺激 sAPP α 的产生, 或者通过 cAMP-蛋白激酶 A (PKA) 途径, 例如佛司可林 (forskolin), 或是通过 PKC/MAP-激酶途径, 例如非甾体类抗炎药如环加氧酶 COX 抑制剂 (布洛芬)、HMG-CoA 还原酶的沙汀类抑制剂 (洛伐他汀)、雷沙吉兰衍生物或多酚例如(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸酯。但是, 所有这些方法, 尽管它们可以证实利用药理学工具寻求刺激 sAPP α 产生的策略的适当性, 但还没有引出适合人类临床使用的新化合物。

本发明提供了使用药理剂例如属于吡唑并吡啶类的化学化合物, 包括依他唑酯 (etazolate), 用于促进 sAPP α 片段生产的基本原理。

本发明还描述了 sAPP α 的产量增加与依他唑酯抑制 ROS (“反应性氧物类”) 诱导的效应即氧化应激的能力之间的关联。

这种氧化应激现象在阿茨海默氏病的几个方面扮演了重要角色: 不仅在神经元变性和星形细胞炎症方面, 而且在血小板的活化和聚集方面。后者的这些现象参与了阿茨海默氏病的血管并发症, 是血管性痴呆的原因。

因此, 在血小板活化水平上监测依他唑酯抑制剂对氧化应激起始的途径的影响是可能的。更普遍来说, 在血小板活化水平上监测神经保护性化合物的抑制剂效应是可能的。

因此, 本发明第一次有可能进行与血小板活化或聚集有关的任何生物学现象的测量, 用于对神经保护性化合物的有效性进行临床或治

疗性监测。从 APP 产生 A β 和 sAPP α 肽的能力为神经系统和血小板所共有。因此，因为依他唑酯对氧化应激的抑制性作用是通过 sAPP α 产量的增加而调动的，本发明提供了从血小板样品或更广义来说从血液样品监测依他唑酯对 APP 成熟的作用的基本原理。

本发明还对测量血小板活化或聚集有关的任何生物学现象以临床或治疗性监测吡唑并吡啶家族的任何化合物的有效性提出权利要求。此外，本发明可以对测量血液中 APP 成熟的任何变化、特别是血液样品或血小板制备物的 sAPP α 浓度，以便确保临床或治疗性监测吡唑并吡啶家族的任何化合物的有效性提出权利要求。

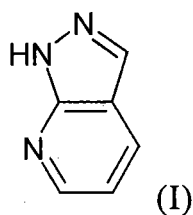
因此，本发明的主题在于在哺乳动物中评估或监测神经保护性治疗的有效性的方法，包括在接受了所述治疗的哺乳动物的生物样品中测量（优选体外或离体）sAPP α 产生的步骤，所述样品含有血小板，sAPP α 的产生是治疗有效性的指示。

本发明的另一个目标是对样品中的 sAPP α 进行免疫定量的方法，包括对样品进行热处理（以暴露 sAPP α ）的步骤和免疫定量的步骤。该方法适合对任何样品的 sAPP α 进行定量，尤其是血液或血液来源的样品（血清、血小板等）或其它生物流体。样品可以被预处理，尤其是稀释、富集、过滤等。

神经保护性治疗

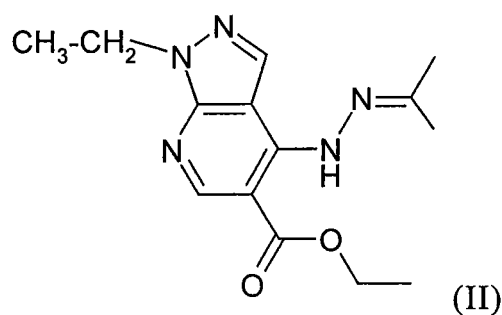
本发明也可用于在哺乳动物中评估或监测任何神经保护性治疗的有效性。在本发明中，神经保护性治疗是指任何可用于或已用于治疗影响神经系统的疾病、特别是神经变性疾病的治疗。在本文中，可以举出选自吡唑并吡啶和 GABA(A) 受体调节剂的化合物。

在本发明中，吡唑并吡啶家族的化合物有利地指称具有下式 (I) 的任何化合物，在任何位置上可以取代或未取代。



具体来说，在本发明中使用的吡唑并吡啶家族的化合物选自下列化合物：

- 下式 (II) 的依他唑酯：



依他唑酯构成了本发明的优选实施方案。

- 4- 丁基氨基-1-乙基-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯 (曲卡唑酯, tracazolate) ,
- 4-丁基氨基-1-乙基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,
- 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-胍基)-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯 (SQ 2009)
- 4-氨基-6-甲基-1-正戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶
- 4-氨基-1-乙基-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯(去丁基曲卡唑酯)
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-甲酰胺,
- 1-乙基-6-甲基-4-甲基氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-丙基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,
- 1-乙基-4-乙基氨基-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,

- 4-氨基-1-丁基-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯
- 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-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸,
- 4-氨基-1-乙基-3,6-二甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,
- 4-二甲基氨基-1-乙基-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,
- 1-乙基-6-甲基-4-丙基氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊-4-炔基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,
- 4-氨基-1-丁-3-烯基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-烯丙基酰胺,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-异丙基酰胺,
- 4-氨基-1-戊基-*N*-正丙基-1*H*-吡唑并-[3,4-*b*]吡啶-5-甲酰胺,
- 4-氨基-1-丁基-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊-3-炔基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-丙-2-炔酰胺,
- 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-*N*-(2-丙烯基)甲酰胺,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-丁酰胺,
- 4-氨基-1-丁-3-炔基-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-1-丁-3-烯基-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-烯丙基酰胺,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-(3-甲基-丁基)-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,

- 4-氨基-6-甲基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸异丁基酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊基-1*H*-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)-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-环丙酰胺,
- 乙基 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-氧肟酸酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊基-1*H*-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-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊-4-烯基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-1-戊-3-炔基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-丙酰胺,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-环丙基甲酰胺,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸 2-甲基烯丙基酯,
- 4-氨基-1-戊-3-炔基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-烯丙基酰胺 (ICI 190,622) ,
- 4-氨基-1-戊-4-炔基-*N*-2-丙烯基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-甲酰胺,
- 4-氨基-1-戊-3-炔基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-丙-2-炔基酰胺,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-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-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-1-(2-环丙基-乙基)-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-1-己-5-炔基-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸烯丙基酯,
- 4-氨基-1-戊-3-炔基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-环丙基甲酰胺,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊基-1*H*-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-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸环丙基甲基酯,
- 4-丁基氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-烯丙基酰胺,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊基-1*H*-吡唑并[2,4-*b*]吡啶-5-羧酸 2-环丙基乙基酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊-3-炔基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸环丙基甲基酯,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊-4-炔基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸环丙基甲基酯,
- 4-氨基-1-苯甲基-6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-苯甲基酰胺,
- 4-氨基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-苯基酰胺,
- 4-氨基-6-甲基-1-戊基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸苯甲基酯,
- 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-1*H*-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-1*H*-吡唑并[3,4-*b*] 吡啶-4-基氨基)-乙醇,
- 3-(6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*] 吡啶-4-基氨基)-丙-1-醇,
- 3-(6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*] 吡啶-4-基氨基)-乙酸丙基酯,
- 2-(6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*] 吡啶-4-基氨基)-丙酸乙基酯,
- 2-(6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*] 吡啶-4-基氨基)-戊酸乙基酯,
- 2-(6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*] 吡啶-4-基氨基)-苯甲酸乙基酯,
- 3-(6-甲基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*] 吡啶-4-基氨基)- 戊酸丙基酯,
- *N*-亚苄基-*N'*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*] 吡啶-4-基)-胍,
- *N*-呋喃-2-基亚甲基-*N'*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*] 吡啶-4-基)-胍,
- *N*-(4-氟-亚苄基)-*N'*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*] 吡啶-4-基)-胍,

- *N*-(3-呋喃-2-基-亚烯丙基)-*N'*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-4-基)-胍,
- *N*-(4-甲氧基-亚苄基)-*N'*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-4-基)-胍,
- 4-[(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-4-基)-亚胍基甲基]-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-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-4-基)-胍,
- *N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-4-基)-*N'*-(4-硝基-亚苄基)-胍,
- *N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-4-基)-*N'*-(2-硝基-亚苄基)-胍,
- *N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-4-基)-*N'*-(4-三氟甲基-亚苄基)-胍,
- *N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-4-基)-*N'*-(5-硝基-呋喃-2-基亚甲基)-胍,
- *N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-4-基)-*N'*-(2-三氟甲基-亚苄基)-胍,
- *N*-(3-甲基-1-苯基-1*H*-吡啶并[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)-胍,
- 4-(3-氯-4-甲氧基-苯甲基氨基)-1-乙基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸,
- 4-(3-氯-4-甲氧基-苯甲基氨基)-1-乙基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-5-(吡啶-4-基甲基)-酰胺,
- 4-(3-氯-4-甲氧基-苯甲基氨基)-1-乙基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-5-(四氢-呋喃-2-基甲基)-酰胺,
- 4-(3-氯-4-甲氧基-苯甲基氨基)-1-乙基-1*H*-吡啶并[3,4-*b*]吡啶-5-(5-羟基-戊基)-酰胺,
- 4-(3-氯-4-甲氧基-苯甲基氨基)-1-乙基-1*H*-吡啶并[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)-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯，
- 1-(2-氯-2-苯基-乙基)-4-环丙基氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯，
- 1-(2-氯-2-苯基-乙基)-4-丙基氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯，
- 1-(2-氯-2-苯基-乙基)-4-苯基氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯，
- 4-丁基氨基-1-(2-氯-2-苯基-乙基)-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯，
- 1-(2-氯-2-苯基-乙基)-4-(2-乙氧基-乙基氨基)-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯，
- 4-苯甲基氨基-1-(2-氯-2-苯基-乙基)-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯，
- 1-(2-氯-2-苯基-乙基)-4-苯乙基氨基-1*H*-吡唑并[3,4-*b*]吡啶-5-羧酸乙基酯。

这些化合物可以是盐、酯、外消旋物、活性异构体等的形式。在一个具体的实施方案中，神经保护性化合物选自依他唑酯、曲卡唑酯或卡它唑酯（cartazolate），更优选为依他唑酯。

GABA(A)调节剂可以是任何天然或合成来源的化合物，尤其是植物、细菌、病毒、动物、真核生物、合成或半合成来源的能够调节自由基（ROS）的表达或活性的有机或无机分子。至于具体的例子，可以特别地举出苯二氮卓（benzodiazepine）。

在本发明的范围内使用的化合物或治疗可以以不同的方式配制和施用。施用可以通过本技术领域的专业人员已知的任何方法来进行，优选为口服或者全身或局部注射。注射典型为眼内、腹膜内、脑内、静脉内、动脉内、皮下或肌内。口服或全身性施用是优选的。施用的

剂量可以由本技术领域的专业人员调整。典型情况下，对于化合物注射大约 0.01 mg 到 100 mg/kg。具体的单位剂量是例如每剂 0.5 到 40 mg。应该理解，可以进行重复注射，可以与其它活性药剂或任何可药用赋形剂（例如存在稳定剂的缓冲液、盐水或等张溶液等）组合。

可药用载体或赋形剂可以选自缓冲溶质、溶剂、粘合剂、稳定剂、乳化剂等。缓冲或稀释溶质尤其是磷酸钙、硫酸钙、乳糖、纤维素、高岭土、甘露醇、氯化钠、淀粉、糖粉和羟丙基甲基纤维素（HPMC）（用于延长释放）。粘合剂是例如淀粉、明胶，填充剂溶质例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、乳糖等。天然或合成树胶也可以使用，例如尤其是藻酸盐、羧甲基纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。其它赋形剂是例如纤维素和硬脂酸镁。制剂中可以掺入稳定剂，例如多糖（阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、瓜尔胶和黄蓍树胶、几丁质或其衍生物和纤维素醚）。溶剂或溶质是例如 Ringer's 溶液、水、蒸馏水、磷酸缓冲液、磷酸盐溶液以及其它的常规流体。

样品

为了执行上面描述的方法，可以使用任何源自被治疗的对象的含有血小板的样品。事实上，本发明显示，神经保护性化合物能够在血小板中诱导 sAPP α 产生。因此，可以通过在任何含有血小板的样品中的 sAPP α 分析来评估和监测治疗的有效性。

在一个具体的实施方案中，生物样品是血液或源自血液的样品。“源自”血液的样品被理解为通过例如稀释、过滤、纯化等的任何处理过的血液样品，以富集样品中的血小板、消除其它细胞群体、使可能的病原体失活、校准分析等。

上面的方法可以应用于所有哺乳动物，优选为人类，特别是患有神经变性疾病例如阿茨海默氏病、帕金森氏症、ALS、亨廷顿舞蹈病等的人类。

sAPP α 分析

可以使用本技术领域的专业人员本身了解的不同技术分析 sAPP α 。因此，尤其值得一提的是基于使用特异性针对 sAPP α 的抗体的免疫技术。这样的抗体可以按照文献得到（Exp. Neurol. 2003 Sep; 183(1):74-80），或者可以通过本身为本技术领域专业人员所熟知的技术来生产。因此，可以通过用 sAPP α 或 sAPP α 的任何表位或片段免疫非人类哺乳动物，然后分离和/或筛选能够在体外结合 sAPP α 的多克隆或单克隆抗体，来生产这样的抗体。然后可以通过对抗体与整个 APP 蛋白和/或源自 APP 蛋白的其它肽例如 C83 片段、AICD 肽和 P3 肽的结合实验进行测定，来证实抗体的特异性。优选，使用的抗体能够与 sAPP α 特异性结合，但不能与 C83 片段、AICD 肽和 P3 肽特异性结合。结合的“特异性”是指与与 sAPP α 的结合可以同与其它蛋白或肽的可能结合区分开来。

用于测量 sAPP α 产生的方法可以包含 ELISA 或 RIA 技术，使用被特异性抗体包被的底物、磁性球、柱子、几种抗体（捕获抗体和检测抗体）等。优选使用 ELISA 实验。

通常，将所测量的 sAPP α 产生与所述哺乳动物中治疗前或治疗早期阶段测量的参比水平或值进行比较。从而可以确定患者中 sAPP α 的产量水平在治疗后或治疗期间是否增加了。sAPP α 水平的维持或增加构成了治疗有效性的指示。

此外，本发明人还开发了可用于对任何样品的 sAPP α 进行免疫定量的改进方法。该方法尤其依赖样品处理步骤，使得可溶性 sAPP α 片段的特异性表位暴露出来（从而使其可以接近）。事实上，本发明人展示的结果显示，没有适当的方案，不能够通过 ELISA 以特异和可定量的方式检测 sAPP α 。

因此，本发明的另一个目标在于对样品中的 sAPP α 进行免疫定量的方法，包括对样品进行热处理的步骤（用于暴露 sAPP α 表位）和免疫定量的步骤。该方法适合对任何样品的 sAPP α 进行定量，尤其是血液或源自于血液的样品（血清、血小板等）、其它生物流体或培养上清液。样品可以被预处理，特别是稀释、富集、过滤等。

优选，热处理步骤包括在大约 60°C 到 70°C 之间的温度下处理样品，处理的时间长度足以暴露 sAPP α 表位，典型为大约 30 秒到 10 分钟之间。正如实施例所显示的，这样的方法允许对来自人类血液样品的 sAPP α 进行可靠、可重复和特异性的分析。

免疫分析可以使用本身已知的不同技术来进行，例如特别是 ELISA，使用了任何特异性针对 sAPP α 的试剂，特别是例如上面描述的那些任何特异性抗体。在这些抗体中，特别要提到的是识别包含在 APP 的 1-17 位氨基酸残基中的表位的任何抗体。更具体来说，这样的抗体或试剂盒是可商购的，例如 Sigma 或 Biosource 销售的 ELISA APP 试剂盒，或某些 sAPP α 特异性抗体（在 APP 裂解的水平上）或识别 sAPP α 和 APP 的：

- 单克隆抗体 6E10（特异性针对 sAPP α ）
- 单克隆抗体 2B3（包含在 IBL sAPP α 试剂盒中），特异性针对 sAPP α
- 单克隆抗体 BAN50，通过针对 A β 肽 1-16（PMID: 10480887）免疫来生产
- 单克隆抗体 22C11（识别 sAPP α 的抗 APP 抗体）
- 多克隆 polyC11（Upstate /Millipore，目录号 AB5368，由 Chemicon 生产）
- 来自 OYC 的 sAPP (poly)（目录号 APP-KPI- 抗血清）
- 来自 Signet Covance 的 sAPP α (poly)（目录号 SIG-39139）
- 兔抗 sAPP 抗体 3329，特异性识别重组形式的 sAPP α （PMID: 9465092）。

治疗性应用

意外地证明了上面定义的神经保护性治疗允许在血小板中诱导或刺激 sAPP α 的生产，这使得可以设想这种类型的化合物的新的治疗性应用。

因此，本发明的目标在于选自吡唑并吡啶和 GABA (A)受体调节剂的化合物在制备刺激或诱导哺乳动物中血小板生产 sAPP α 的药物中的应用。

本发明还涉及选自吡唑并吡啶和 GABA (A)受体调节剂的化合物在制备降低哺乳动物血栓形成风险的药物中的应用。

本发明还涉及选自吡唑并吡啶和 GABA (A)受体调节剂的化合物在制备减少患有神经变性疾病的患者血管并发症的药物中的应用。

本发明还涉及选自吡唑并吡啶和 GABA (A)受体调节剂的化合物在制备抑制哺乳动物、特别是患有神经变性疾病的患者血小板凝集的药物中的应用。

通过下面的实施例，本发明将被更详细地描述，这些实施例应该被认为是说明性和非限制性的。

附图说明

- 图 1：在未处理的血清中的 sAPP α 分析。
- 图 2：热处理对 sAPP α 的 ELISA 检测的影响。
- 图 3：在人类血清中检测 sAPP α 。
- 图 4：在血清中检测重组 sAPP α 。
- 图 5：依他唑酯刺激 sAPP α 的体外生产。
- 图 6：依他唑酯刺激神经元中 sAPP α 的生产。

图 7: 依他唑酯刺激 sAPP α 的体内生产。

图 8: 依他唑酯对淀粉样肽毒性的影响以及 GABA_A 抑制剂对依他唑酯诱导的神经保护作用的影响。统计学: Wilcoxon 检验: ###, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ 。

图 9: α -分泌酶对依他唑酯诱导的神经保护作用的抑制效应。统计学: Wilcoxon 检验: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ 。

图 10: 抗 sAPP α 中和抗体对依他唑酯诱导的神经保护作用的影响。统计学: Wilcoxon 检验: ##, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

实施例

实施例 1: sAPP α 的分析方法

在血液中循环的 APP 的可溶性片段 (sAPP α) 来自血小板细胞以及相关的 α -分泌酶活性。该片段显示出随着衰老以及在阿茨海默氏病 (AD) 的生理病理过程中而减少。血液中的循环 sAPP α 可以被当作生物标记物, 用于监测随着衰老以及在阿茨海默氏病生理病理过程中出现的、并且可以通过服药治疗加以矫正的 APP 加工的变化。

因此, 对于血液凝固和血小板活化后, 血液中、更具体为血清中的 sAPP α 水平进行精确定量, 以评估目的在于修该 APP 的加工以治疗阿茨海默氏病的治疗方法的有效性, 存在着实实在在的兴趣。

开发了下面描述的方法, 以便使 sAPP α 可溶性片段的特异性表位暴露出来并变得可接近, 用于按照双重三明治 ELISA 技术进行高亲和性抗体-抗原检测。

事实上, 没有处理血清样品的适当方案, 就不可能通过 ELISA 以可定量和特异性的方式检测 sAPP α 。如图 1 所示, 单独的没有预处理的血清显示出非常明确可定量检测的 sAPP α (3.5 ng/mL), 但是随着重组 sAPP α 的加入 (+10 ng/mL), 它似乎没有增加, 而加入同样量 sAPP α 则显示出约为预计量 (10 ng/mL) 的检测值 (8.7 ng/mL)。在没有特

别处理的纯血清中，ELISA 检测对于可溶性和循环中的 sAPP α 似乎不是特异性的。

为了接近血清中的可溶性 sAPP α 并能够以可靠、特异和可重复的方式对其定量，我们开发了样品制备和处理方法，允许通过热处理使得血清中存在的 sAPP α 可以被特异性 ELISA 抗体接近。

首先将血清样品在 pH 7.4 的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (Sigma # D8537)、5% BSA、0.05% Tween-20 中稀释。然后将稀释的样品在 66°C 热处理 10 分钟，然后冷却到 4°C。然后通过 ELISA 技术使用特异性针对 sAPP α 的试剂盒对样品进行分析。

如图 2 所示，通过 ELISA 从血清中检测到的 sAPP α 以明显的方式作为加热温度和热处理时间的函数而增加（温度范围：60- 70°C；X = 66°C）。

该血清样品制备和热处理方法在三个独立的实验中于 7 种不同人类血清中进行了评估。如图 3 所示，用这种方法 (X = 66°C) 通过 ELISA 从人类血清检测的 sAPP α 看来是可重复的。

为了更好地评估这种用于血清中 sAPP α 的方法，我们使用了三种逐渐增加量的 sAPP α (5、7.5 和 10 ng/mL) 评估了在人类血清中检测 sAPP α 的线性。图 4 显示了在不同的 3 天对同样血清进行的三次独立实验的平均值。

如图 4 所示，在制备和热处理后生物学基质（血清）中加入/掺入的 sAPP α 量与通过 ELISA 检测到的 sAPP α 量之间，存在非常好的比例关系。这些结果显示加入到的处理过的血清中的 sAPP α 不与血清中的游离 sAPP α 竞争。这些结果在不同的 3 天进行的 3 次实验中显示出良好的可重复性。

根据这些结果，可以通过与对应于不含内源 sAPP α 并且向其中加入了同样量 sAPP α 的生物学基质的样品进行比较，来计算处理过的血清中重组 sAPP α 的回收率。

如下表所示，在 3 种逐渐增加的量的情况下，血清中重组 sAPP α 的回收率（表示为预计值的百分数%）位于可接受的限度 $100\% \pm 25\%$ 内。

血清中重组 sAPP α 的回收率			
样品	预计浓度 (ng/mL)		
	5	7.5	10
1/等分试样-1	106.0	95.2	100.7
1/等分试样-2	122.2	113.1	114.2
1/等分试样-3	118.9	103.5	101.1
1/等分试样-4	113.4	109.9	111.3
1/等分试样-5	119.2	104.1	101.2
回收率平均值	115.9	105.2	105.7
标准偏差	6.4	6.9	6.5
CV%	5.5	6.5	6.2

FDA 在 2001 年 5 月的美国食品和药品管理局工业指南文件的生物分析方法验证中，定义了应用于诊断方法的 ELISA 分析的性能标准。下面的文件规定了免疫分析的接受和评价标准。

- Findlay 等，Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective.（用于生物分析的免疫分析验证：药物工业前景展望），Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 21 (2000) 1249–1273

- Viswanathan 等，Workshop/Conference Report — Quantitative

Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. (专题讨论会/大会报告 — 定量生物分析方法的验证和执行：色谱和配体结合分析的最佳实践), The AAPS Journal 2007; 9 (1) Article 4 (<http://www.aapsj.org>).

下面的数据显示出, 通过使用 IBL 销售的 sAPP α 试剂盒实施的本发明分析方法的性能, 符合 FDA 推荐的标准。

		浓度 (ng/ml)		
sAPP α		5	7.5	10
回收率	% 回收	115.9	105.2	105.7
	CV%	5.5	6.5	6.2
批间准确度	CV%	4.6	6.4	5.5
批内准确度	CV%	5.3	5.3	1.9
线性	r ²	0.99923		
	CV%	1.8	4.0	4.1
	准确性 %	98.1	96.6	96.0
LOQ (ng/ml)		1.0		
基质效应	% 回收率	95.8		
	CV%	13.1		
	准确性 %	90.0		
特异性	%	95.1		
	CV%	6.2		

LOQ: 定量限; CV% 变异系数。

实施例 2: 依他唑酯刺激 sAPP α 的产生

将以稳定的方式过表达人类 APP 的转染的 HEK293 细胞保持在含有 Earle 盐并添加了 10%胎牛血清 (FCS)、2 mM L-谷氨酰胺 (Sigma, Lyon, 法国)、1X 非必需氨基酸和抗生素的修改的 Eagle 培养基中。在将所指示的不同浓度的分子铺展在 10 厘米板上之后, 将细胞处理 48

小时，或者以 DMSO 作为载体处理 24 小时。使用可商购的抗体通过 ELISA 和 Western 印迹测量 sAPP α 。

获得的结果显示在图 5 中，显示出依他唑酯诱导 sAPP α 分泌。

实施例 3：依他唑酯刺激了皮层神经元生产 sAPP α

测量了从 17 日龄 Wistar 大鼠胚胎分离的皮层神经元中 sAPP α 的产量。细胞从被切到含有 0.25%胰蛋白酶的溶液中的皮层结构获得。将解离的细胞以每平方厘米 500,000 个的密度接种到用 6 μ g/mL 聚鸟氨酸包被的培养皿中含有添加剂（1X B27, 2 mM L-谷氨酰胺, 0.6%葡萄糖, 抗生素和抗真菌剂, 以及 2%马血清）的 Neurobasal 培养基中。细胞保持在 37°C 和 5% CO₂ 下。接种后 24 小, 使用 5 μ M AraC（5 阿糖胞苷）作为抗有丝分裂剂处理细胞。在体外 4 天后, 一半培养基用不含马血清的培养基更换, 将培养物在该培养基中保持 7 到 10 天使其成熟。

经过更换一次培养基并在新鲜培养基中积累 24 小时后, 使用可商购的抗体通过 Western 印迹测量 sAPP α 。通过对扫描的放射自显影图片进行密度计量分析来进行定量。如图 6 所示, 依他唑酯（0.2 和 2 μ M, 24 小时）刺激了 sAPP α 从皮层神经元的盐析。显示的结果是双份执行的三次独立实验的平均值 \pm SEM, 被表示成与对照（未处理的培养物）的百分率形式。

实施例 4：依他唑酯在体内刺激 sAPP α 的产生

在 APP 大脑中加工的生理模型——豚鼠中进行了体内 sAPP α 产量的研究。给雄性 Hartley 白化豚鼠施用依他唑酯或赋形剂（生理盐溶液），在实验开始时豚鼠体重为 250–270 g，每天给药一次，连续 15 天，10 mg/kg 的剂量口服。在最后一次给药后 1 小时，将豚鼠处死，立即提取脑，在液氮中冷冻，保存在 -80 °C。将皮层在含有 0.2% Triton X-100、50 μ g/mL 庆大霉素和蛋白酶抑制剂混合物的 pH 7.5 的 20 mM Tris 碱溶液中 4°C 下进行匀浆。可溶性 sAPP α 通过 ELISA 实验进行测量，将结果根

据提取物中存在的蛋白量进行归一化。

图7显示了与用赋形剂处理的对照动物相比，在依他唑酯处理的动物的脑中测量到的sAPP α 量增加。依他唑酯诱导的增加倍数为3，这在统计学上是非常显著的（***：根据Wilcoxon检验 $p < 1E-4$ ）。

获得的结果显示出依他唑酯诱导sAPP α 分泌。

实施例 5：依他唑酯的神经保护效应需要 sAPP α 的体内生产

A β 25-35 肽含有淀粉样肽的神经毒性片段，是用于研究化合物的神经保护效应的经典工具。在每个实验开始时，7-10 日龄的神经元培养物更换新鲜培养基，并在加入浓度为 33.5 μ M 的 A β 25-35 淀粉样肽之前 6 小时，用依他唑酯抑制剂化合物进行处理。该浓度以经典和可重复的方式在神经元培养物中产生 30% 到 40%的毒性。

进行了几个实验以表征依他唑酯的神经保护效应。为了证实神经保护作用是否涉及 GABAA 受体，在使用依他唑酯之前，浓度分别为 50 μ M、20 μ M 和 10 μ M 的 GABAA 受体拮抗剂印防己毒素 (Picrotoxine) (PTX)、丙泊酚 (Gabazine) /SR95531 和荷包牡丹碱 (Bicuculine) (BIC) 进行预温育。

最近，几项研究显示 sAPP α 具有神经营养和神经保护功能，特别是在体外和体内针对淀粉样肽，表明依他唑酯可以通过 α -分泌酶途径介导其神经保护效应。为了确定是 sAPP α 的抑制还是其产生提供了依他唑酯针对淀粉样肽的神经保护效应，分别使用了中和性抗 sAPP α 抗体 (3E9 抗体) 和 α -分泌酶抑制剂。对于 sAPP α 的中和来说，将 3E9 抗体 (5 μ g/ml) 与依他唑酯同时加入到皮层细胞中。两种 α -分泌酶抑制剂，化合物弗林蛋白酶 (Furin) 抑制剂 I (Hwang EM, Kim SK, Sohn JH, Lee JY, Kim Y, Kim YS, Mook-Jung I. Furin is an endogenous regulator of alpha-secretase associated APP processing. (弗林蛋白酶是与

APP 加工相关的 α -分泌酶的内源调控剂) Biochem Biophys Res Commun. 2006 Oct 20;349(2):654-9.) 和 TAPI (Slack BE, Ma LK, Seah CC. Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. (肿瘤坏死因子- α 转化酶上调淀粉样肽前体蛋白胞外结构域的组成性脱落) Biochem J. 2001 Aug 1;357(Pt 3):787-94), 则在加入依他唑酯之前用于预处理 1 小时。

所有的处理被执行至少两次,并在至少两种不同的培养物中进行。在温育 48 小时后,通过 MTT 测试测量毒性。将结果按照未处理的平均值归一化,通过 Wilcoxon 检验进行统计学分析。在 p 小于或等于 0.05 的情况下确定显著性值。

MTT:

通过使用 MTT 测试来测量毒性。与化合物温育后,在孔中加入 MTT 至终浓度为 0.5 mg/mL。然后将板在 37 °C 暗处温育 30 分钟。吸出培养基,将晶体重新悬浮在 500 μ L DMSO (二甲基亚砷) 中。读取 550 nm 处吸光度并计算存活率百分数。

结果:

获得的结果显示在图 8-10 中。这些结果说明了本发明的化合物对淀粉样肽 A β 25-35 诱导的神经元死亡的保护性效应。

在用依他唑酯共处理神经元的过程中,观察到了剂量依赖性保护剂效应(图 8),特别是在剂量为 0.2 μ M 时获得了 90%的细胞存活率。这种效应被三种 GABA_A 抑制剂的使用所阻断,统计学分析表明这种效应是高度显著的(在比较 0.2 μ M EHT 0202 与 0.2 μ M EHT 0202 更多拮抗剂后, Wilcoxon 检验为 $p < 1e-4$)。结果对应于 7 个独立实验的平均值 \pm SEM。

图 9 和 10 显示了在 sAPP α 的生产或活性抑制剂存在下,在皮层神经元上利用依他唑酯获得的结果。呈现的结果显示,依他唑酯使得这些被两种 α -分泌酶抑制剂——化合物弗林蛋白酶抑制剂 I 和 TAPI 的处理所抑制的细胞获得了保护性效应(图 9)。这些数据表明负责 sAPP α 产生的 α -分泌酶的活性为依他唑酯诱导的神经保护作用所必需。

图 10 显示了依他唑酯诱导的神经保护作用需要 sAPP α 的产生,因为当在培养基中加入抗 sAPP α 中和性抗体时,依他唑酯的神经保护效应失去了。

本发明证明了依他唑酯通过 GABA_A 受体起作用时,对淀粉样肽诱导的毒性的神经保护效应。这种神经保护效应与 α -分泌酶途径的活化和 sAPP α 的产生相关。

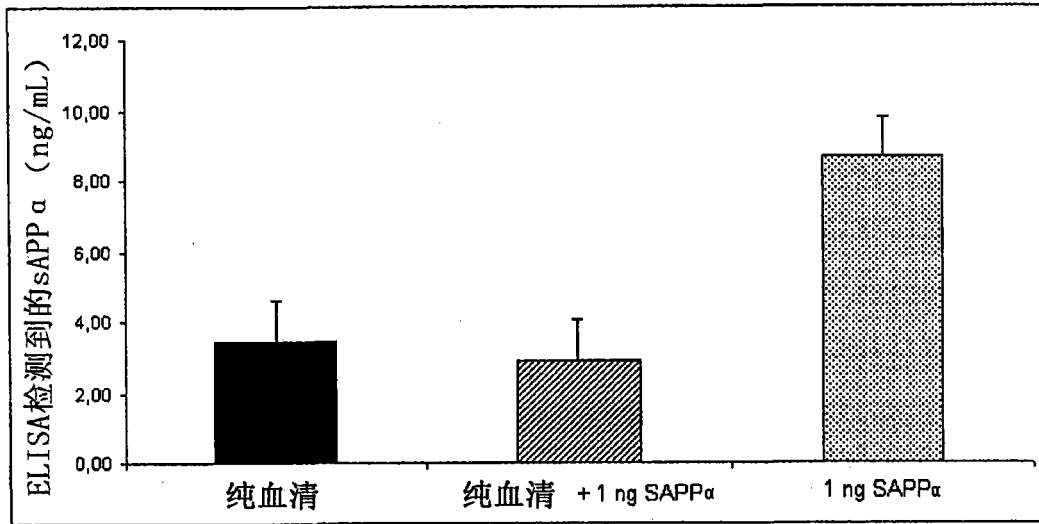


图1

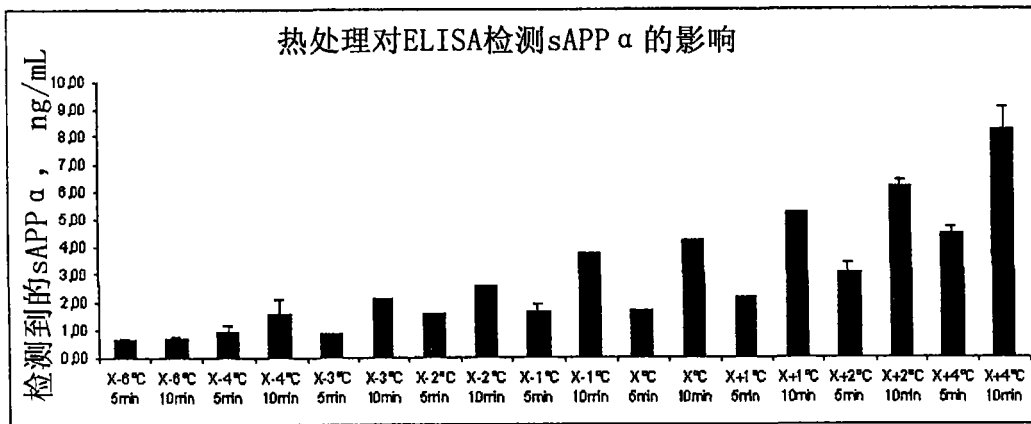


图2

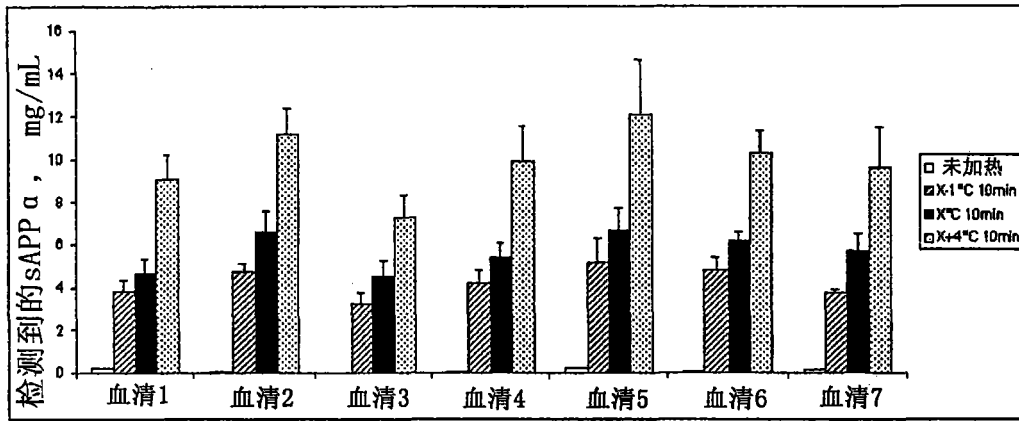


图3

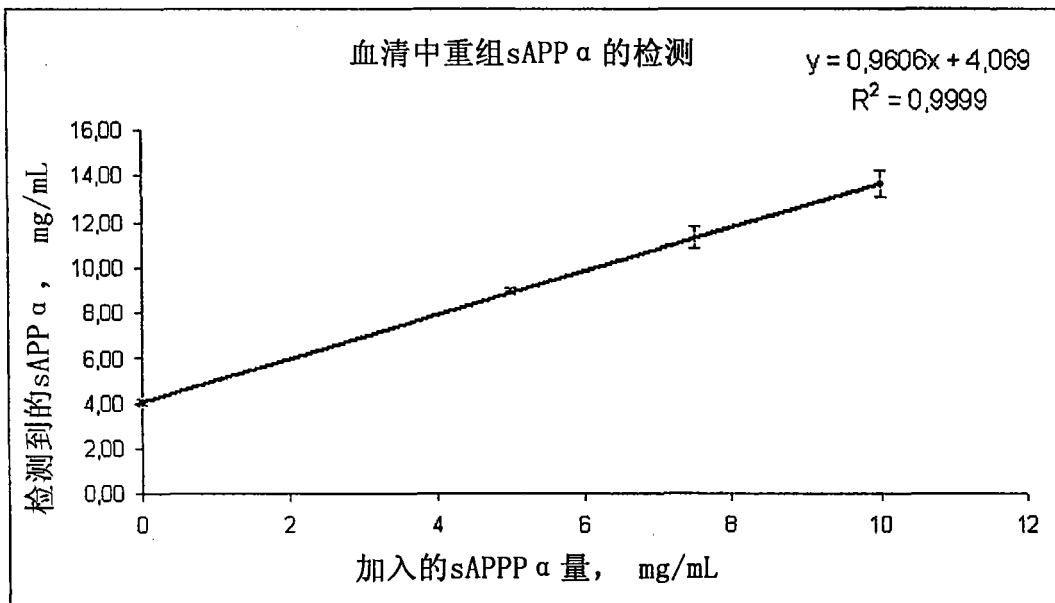


图4

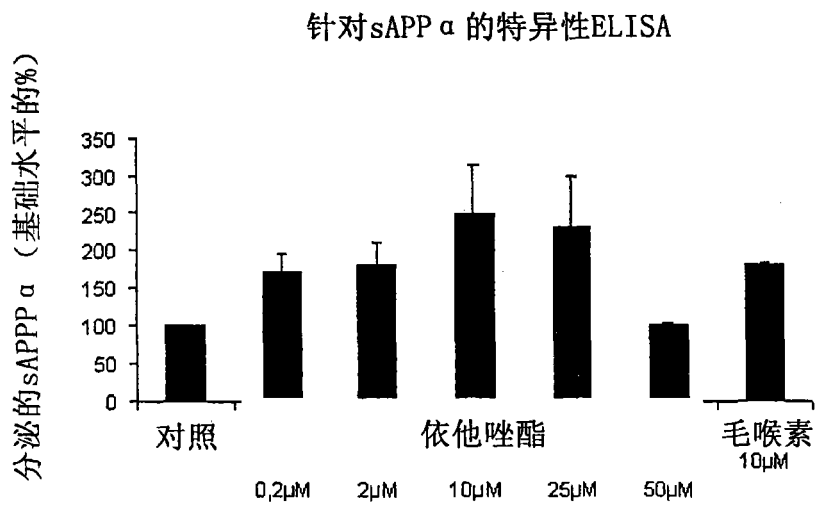


图5

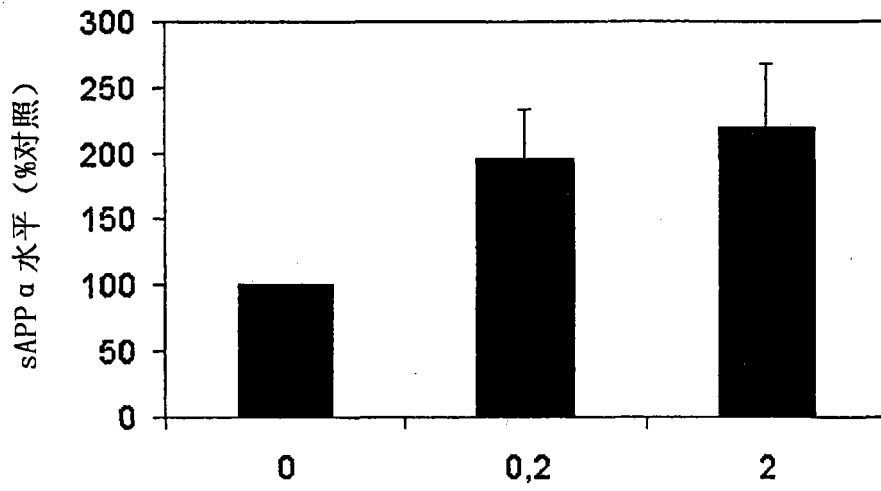


图6

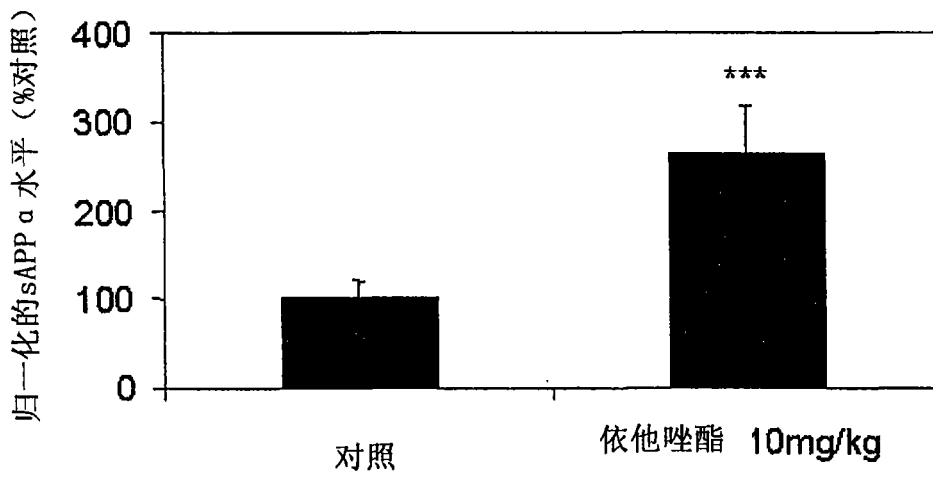


图7

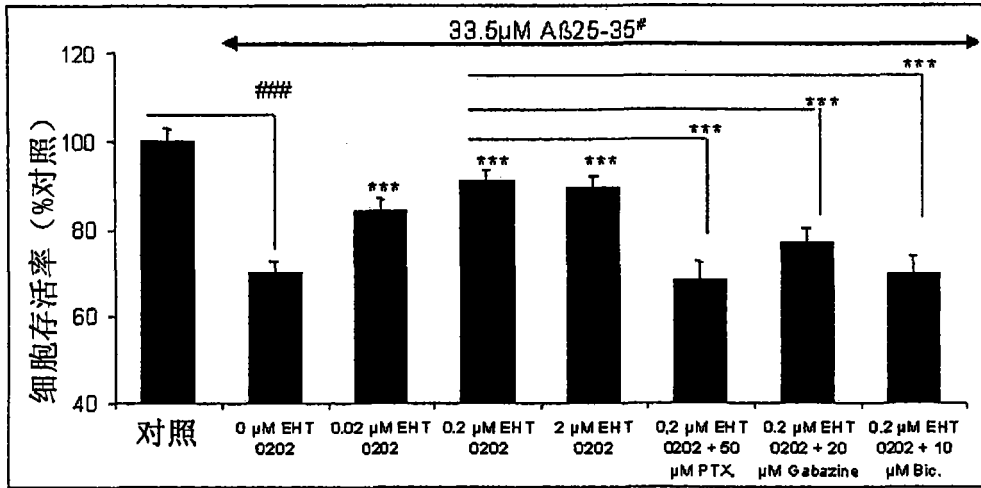


图8

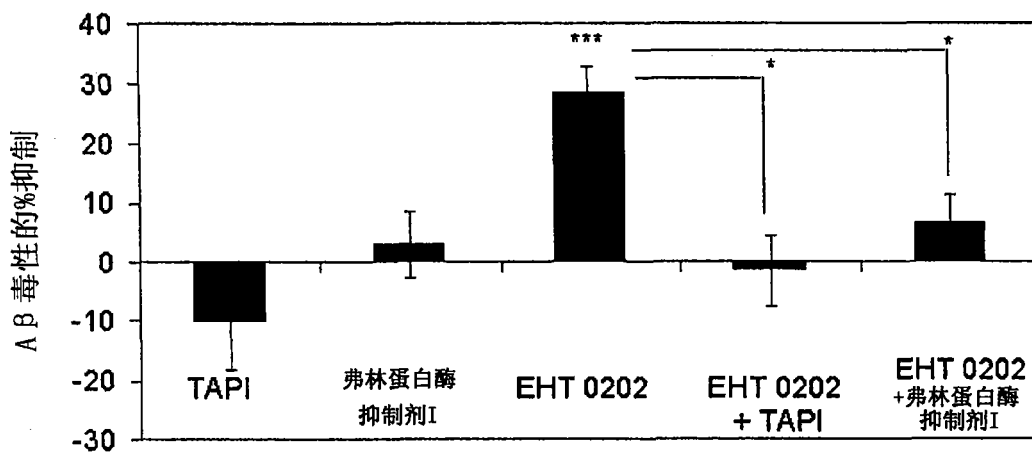


图9

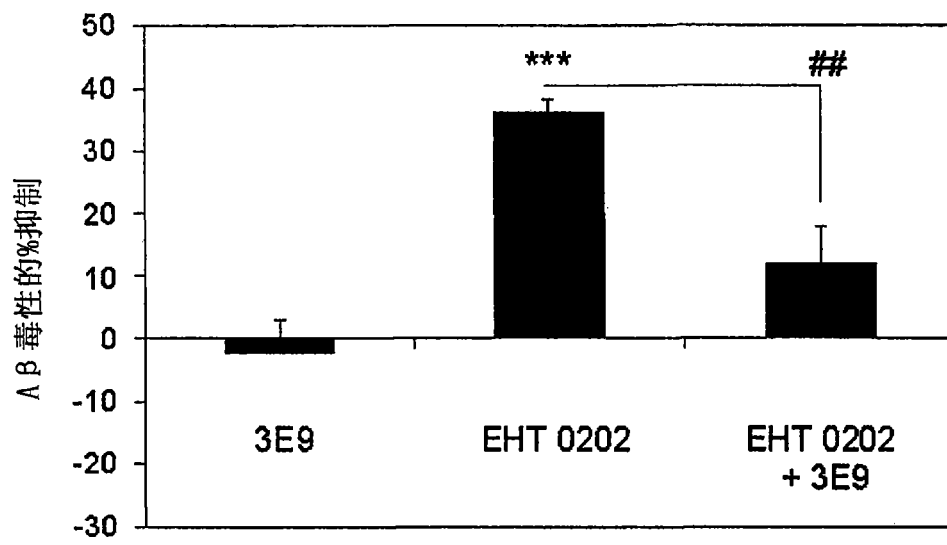


图10

专利名称(译)	治疗神经变性疾病的方法和工具		
公开(公告)号	CN101542289A	公开(公告)日	2009-09-23
申请号	CN200780034007.3	申请日	2007-07-20
[标]发明人	法比安施魏格霍费尔 洛朗德西雷 热罗姆布尔丹		
发明人	法比安·施魏格霍费尔 洛朗·德西雷 热罗姆·布尔丹		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/6896 G01N2800/2821 G01N2800/52 G01N33/9426 A61P25/28		
代理人(译)	杨青		
优先权	2006006698 2006-07-21 FR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于治疗神经变性疾病的组合物和方法，在这些神经变性疾病中认知功能发生了变化，例如在阿茨海默氏病中所观察到的。更具体来说，本发明提出了在人类临床研究中观察神经保护性治疗的活性和/或有效性的策略，该策略基于某些血小板参数的生化定量并因此能够通过抽血实行。本发明还涉及适用于执行所述策略的方法、工具、构建物和组合物。

