

说明书

发明名称: 化合物的可药用盐及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种具有抗脑缺血、抗缺血后炎症和抗惊厥作用,能够改善缺血性脑卒中患者、脊髓损伤患者以及神经退行性疾病患者神经功能缺损化合物的可药用盐、晶型及药物组合物及其应用,以及上述盐和晶型的制备方法。

技术背景

[0002] 脑白质是中枢神经系统的重要组成部分,是神经纤维聚集的地方。脑白质病变(WML)通常是由血流减少、血管供氧不足引起的。脑血液供应障碍(不足),难以满足脑组织代谢需要,从而产生的一系列症状。临床可表现为头晕、头痛、肢体麻木或短暂的意识丧失,严重者会造成脑功能不可逆的损伤甚至死亡。脑缺血相关的疾病有短暂性脑缺血发作(TIA)、缺血性脑卒中(脑梗死)、烟雾病、慢性脑供血不足等,也是导致患者认知功能下降和血管性痴呆的原因之一。

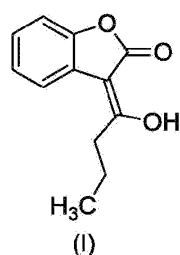
[0003] 脊髓损伤(spinal cord injuries, SCI)是现代社会人类致残率最高的疾病之一,常伴有肢体感觉障碍和运动功能丧失等症状。脊髓损伤作为中枢神经系统损伤,神经系统是不可再生组织,因为神经损伤导致的功能障碍恢复比较困难。创伤性脑损伤是脊髓损伤患者认知障碍的主要原因。脊髓损伤不仅会给患者本人带来身体和心理的严重伤害,还会对整个社会造成巨大的经济负担。

[0004] 帕金森病(Parkinson's Disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病,已成为世界性严重问题,帕金森病的典型临床特征包括运动表现,如运动迟缓、静止性震颤和姿势不稳,而引起帕金森病的根本原因就是患者中脑多巴胺能神经元丧失受损并死亡。目前的标准疗法是多巴胺替代疗法,但这种疗法治标不治本,且存在着较大的副作用。

[0005] 目前用于治疗中枢神经损伤引起疾病的药物很多,但真正有效者为数不多。现有药物尼莫地平对脑缺血有预防作用,但治疗作用不肯定。脑神经损伤和坏死,会导致人体相应系统功能障碍,极大降低患者生存质量,目前仍需提供其他

疗效更佳，具有抗脑缺血、抗缺血后炎症和抗惊厥作用，能够改善缺血性脑卒中患者神经功能缺损，脊髓损伤患者神经功能受损以及神经退行性疾病认知功能障碍，并能改善记忆，保护神经细胞和血脑屏障等作用的化合物。

[0006] 本公司开发了式(I)化合物(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮，用于治疗缺血性脑损伤、脊髓损伤和神经退行性疾病，在后续的研发中，为了产物易于处理、过滤和干燥，寻求适合的便于储存、长期稳定的产品，本发明对上述物质的盐进行了全面的研究，致力于得到最适合的盐型用于确保药物的质量、安全性、有效性及其应用。

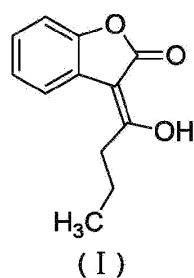


[0007] 发明内容

[0008] 本发明提供一种具有抗脑缺血、抗缺血后炎症和抗惊厥作用，能够改善缺血性脑卒中患者神经功能缺损、脊髓损伤患者神经功能受损以及神经退行性疾病患者等认知功能障碍的化合物的可药用盐、晶型及制备方法。

[0009] 本发明提供了如下结构式(I)化合物的可药用盐：

[0010] 其中，所述可药用盐选自钠盐、钾盐、镁盐、钙盐、哌嗪



盐、乙醇胺盐、葡甲胺盐、氨丁三醇盐；其中可药用盐还可以选自盐的一水合物、二水合物、三水合物或半水合物；所述盐选自钠盐、钾盐、镁盐、钙盐、哌嗪盐、乙醇胺盐、葡甲胺盐、氨丁三醇盐。

[0011] 本发明进一步提供了式(I)化合物的可药用盐，其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮钠盐。

- [0012] 本发明进一步提供了式(I)化合物的可药用盐, 其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮钠一水合物。
- [0013] 本发明进一步提供了式(I)化合物的可药用盐, 其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮钾盐。
- [0014] 本发明进一步提供了式(I)化合物的可药用盐, 其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮镁盐。
- [0015] 本发明进一步提供了式(I)化合物的可药用盐, 其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮钙盐。
- [0016] 本发明进一步提供了式(I)化合物的可药用盐, 其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮哌嗪盐。
- [0017] 本发明进一步提供了式(I)化合物的可药用盐, 其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮乙醇胺盐。
- [0018] 本发明进一步提供了式(I)化合物的可药用盐, 其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮葡甲胺盐。
- [0019] 本发明进一步提供了式(I)化合物的可药用盐, 其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮氨丁三醇盐。
- [0020] 本发明还提供了制备前述可药用盐的方法, 包括如下步骤: 式(I)所示化合物与碱成盐的步骤。
- [0021] 进一步的所述成盐的反应所用溶剂选自甲醇、乙醇、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙酸正丁酯、乙腈、异丙醇、丙酮、异丙醇、四氢呋喃、甲基异丁基酮、正庚烷、二氯甲烷、甲苯、异丙醚、甲基叔丁基醚、正丁醇、水中的至少一种。
- [0022] 本发明还提供了一种药物组合物, 其包含本发明的式(I)化合物或其可药用盐与一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。
- [0023] 本发明还提供了本发明式(I)化合物或其可药用盐在用于制备药物组合物的应用。
- [0024] 本发明还提供了本发明所述组合物在用于制备治疗和/或预防缺血性脑损伤相关疾病药物中的应用。

- [0025] 本发明所述的缺血性脑损伤相关疾病包括但不限于脑缺血、缺血性脑卒中、血管性痴呆、脑缺血后炎症、惊厥、缺血性脑神经元损伤或坏死。
- [0026] 本发明还提供了本发明所述组合物在用于制备治疗和/或预防神经肌肉疾病药物中的应用。
- [0027] 本发明所述的神经肌肉疾病为肌萎缩侧索硬化症(ALS)。
- [0028] 本发明还提供了本发明所述组合物在用于制备治疗和/或预防神经功能受损相关疾病药物中的应用。
- [0029] 本发明所述的神经功能受损相关疾病包括但不限于脊髓损伤或坏死。
- [0030] 本发明还提供了本发明所述组合物在用于制备治疗和/或预防神经退行性疾病药物中的应用。
- [0031] 本发明所述的神经退行性疾病包括但不限于帕金森病。
- [0032] 本发明所述化合物的可药用盐，易于处理、过滤和干燥，长期存储稳定，适合工业化开发用于确保药物的质量、安全性、有效性。

附图说明

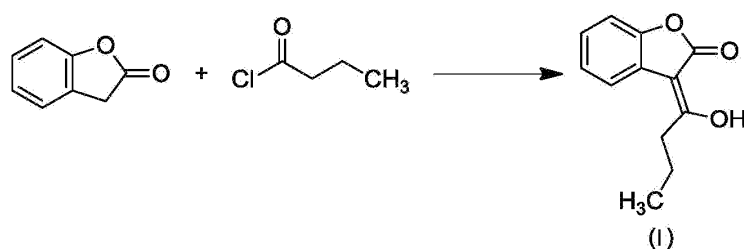
- [0033] 图1为钠盐一水合物差示扫描量热法(DSC)图；
- [0034] 图2为钠盐一水合物热重分析法(TGA)图；
- [0035] 图3为实施例10的氨丁三醇盐对SOD1 G93A ALS小鼠生存的影响；
- [0036] 图4为实施例10的氨丁三醇盐对MPTP诱导的小鼠帕金森模型的爬杆试验结果(注：图中数据均以平均值(Mean) ± 标准误(SEM)表示。*P<0.05表示与正常对照组相比差异具有统计学意义，#P<0.05表示与模型对照组相比差异具有统计学意义。);
- [0037] 图5为实施例10的氨丁三醇盐对MPTP诱导的小鼠帕金森模型的抓力检测结果(注：图中数据均以平均值(Mean) ± 标准误(SEM)表示。*P<0.05表示与正常对照组相比差异具有统计学意义。);
- [0038] 图6为纹状体DOPA检测结果(注：图中数据均以平均值(Mean) ± 标准误(SEM)表示。*P<0.05表示与正常对照组相比差异具有统计学意义，#P<0.05表示与模型对照组相比差异具有统计学意义);

- [0039] 图7为纹状体TH阳性纤维含量统计结果(注：A图为小鼠纹状体TH免疫组化染色 $2.5\times$ 镜下视野图，阳性结果呈棕褐色，B图为小鼠纹状体TH阳性区域统计结果图，每只动物统计3张切片，图中数据均以平均值(Mean) $\pm$ 标准误(SEM)表示。 $^{\ast}P<0.05$ 表示与正常对照组相比差异具有统计学意义， $^{\#}P<0.05$ 表示与模型对照组相比差异具有统计学意义)；
- [0040] 图8为黑质致密部TH阳性细胞数统计结果(注：A图为小鼠纹状体TH免疫荧光染色 $10\times$ 镜下视野图，B图为小鼠纹状体TH阳性区域统计结果图，每只动物统计3张切片，图中数据均以平均值(Mean) $\pm$ 标准误(SEM)表示。图中数据均以平均值(Mean) $\pm$ 标准误(SEM)表示。 $^{\ast}P<0.05$ 表示与正常对照组相比差异具有统计学意义， $^{\#}P<0.05$ 表示与模型对照组相比差异具有统计学意义)；
- [0041] 图9为受试化合物实施例10的氨丁三醇盐对病理改变的影响图例($50\times$ 与 $200\times$)；
- [0042] 图10为受试化合物实施例10的氨丁三醇盐对NF200的影响图例($400\times$)；
- [0043] 图11为受试化合物实施例10的氨丁三醇盐对受损脊髓转录组学的GSEA分析。

具体实施方式

- [0044] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明，根据本领域普通技术知识和惯用手段。以下实施例仅是本发明的部分优选实施例，不当视为对本发明的限制，对本领域普通技术人员来说，在不脱离本发明的范围内，还可以做出若干改进，这些改进也应视为本发明的保护范围。

- [0045] 实施例1：(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮的制备



- [0046] 将3-苯并呋喃酮(5.0g,37.3mmol,1.0eq.)溶于二氯甲烷(50mL)中，降温至 5°C ，缓慢加入叔丁醇钾(6g,53.5mmol,1.4eq.)，反应0.5h后，缓慢加入正丁酰氯(8g,75.0mmol,2.0eq.)，反应1h，加入水(50mL)萃取，取有机相使用0.1N的盐酸洗涤至酸

性(pH<2), 有机相用无水硫酸钠(5g)干燥0.5h, 过滤, 浓缩得到油状物, 之后使用高压制备色谱进行制备纯化, 将纯化后的溶液进行冷冻干燥, 得到式(I)化合物((Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2(3H)-酮(2.5g,32.9%), 为白色固体。

- [0047] ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz): δ 12.02(s, 1H), 7.35–7.33(d, 1H), 7.28–7.17(m, 3H), 2.76–2.73(m, 2H), 1.90–1.80(m, 2H), 1.12–1.08(m, 3H)。
- [0048] ^1H NMR($\text{CDCl}_3+\text{D}_2\text{O}$, 400MHz): δ 7.34–7.32(d, 1H), 7.28–7.16(m, 3H), 2.76–2.72(m, 2H), 1.89–1.80(m, 2H), 1.12–1.08(m, 3H)。
- [0049] 实施例2: 钠盐的制备
- [0050] 将(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮(10g,0.05mol,1.0eq.)溶于甲醇(100mL)中, 溶解后加入氢氧化钠(1.95g,0.05mol,1.0eq.), 搅拌反应1h, 浓缩后, 加入丙酮(200mL), 升温至50℃溶解, 降温至室温保持2h, 过滤, 干燥得类白色固体11g。
- [0051] 实施例3: 钠盐一水合物的制备
- [0052] 将实施例1产物类白色固体(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮钠盐(5g,0.22mol,1.0eq.)溶于水(20mL)中, 升温至60℃溶解, 降温至20℃保持2h, 过滤, 干燥得白色固体3g, 该固体粉末差示扫描量热法图(DSC)如图1所示, 其热重分析法图(TGA)如图2所示。
- [0053] 实施例4: 钾盐的制备
- [0054] 将(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮(1g,5mmol,1.0eq.)溶于丙酮(10mL)中, 溶解后加入氢氧化钾(0.27g,5mmol,1.0eq.), 搅拌反应0.5h, 过滤, 干燥得白色固体0.9g。
- [0055] 实施例5: 镁盐的制备
- [0056] 将(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮(1g,5mmol,1.0eq.)溶于乙酸甲酯(10mL)中, 溶解后加入氯化镁(0.46g,5mmol,1.0eq.), 搅拌反应1.5h, 过滤, 干燥得白色固体0.75g。
- [0057] 实施例6: 钙盐的制备

- [0058] 将(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮(1g,5mmol,1.0eq.)溶于丙酮(10mL)中,溶解后加入氯化钙(0.54g,5mmol,1.0eq.),搅拌反应1h,过滤,干燥得白色固体1.05g。
- [0059] 实施例7: 哌嗪盐的制备
- [0060] 将(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮(2g,10mmol,1.0eq.)溶于甲基异丁基酮(20mL)中,溶解后加入哌嗪(0.84g,10mmol,1.0eq.),搅拌反应1h,过滤,干燥得白色固体2.20g。
- [0061] 实施例8: 乙醇胺盐的制备
- [0062] 将(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮(2g,10mmol,1.0eq.)溶于乙醇(20mL)中,溶解后加入乙醇胺(0.60g,10mmol,1.0eq.),搅拌反应3h,过滤,干燥得白色固体1.88g。
- [0063] 实施例9: 葡甲胺盐的制备
- [0064] 将(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮(2g,10mmol,1.0eq.)溶于乙腈(20mL)中,溶解后加入葡甲胺(1.90g,10mmol,1.0eq.),搅拌反应2h,过滤,干燥得白色固体1.94g。
- [0065] 实施例10: 氨丁三醇盐的制备
- [0066] 将(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮(20g,0.1mol,1.0eq.)溶于异丙醇(200mL)中,溶解后加入氨丁三醇(11.8g,0.1mol,1.0eq.),搅拌反应2h,过滤,干燥得白色固体23g。
- [0067] 实验证明,实施例2-10所述的盐均可在常规实验条件中游离出化合物(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮。
- [0068] 实施例11: 氨丁三醇盐晶型溶解性及吸湿性研究
- [0069] 将实施例10样品氨丁三醇盐分别测试其在20℃、25℃和30℃下样品溶解性,试验结果见表1。
- [0070] 表1氨丁三醇盐在纯水中不同温度下的溶解性数据

样品重量 (实施例 10 样品)	温度	溶解水体积
1g	20℃	25ml
	25℃	20ml
	30℃	14ml

- [0071] 按照《中国药典》9103药物引湿性试验指导原则：
- [0072] 1.取干燥的具塞玻璃称量瓶(外径为50mm，高为15mm)，于试验前一天置于适宜的25℃±1℃恒温干燥器(下部放置氯化铵或硫酸铵饱和溶液)或人工气候箱(设定温度为25℃±1℃，相对湿度为80%±2%)内，精密称定重量(m₁)。
- [0073] 2.取供试品适量，平铺于上述称量瓶中，供试品厚度一般约为1mm，精密称定重量(m₂)。
- [0074] 3.将称量瓶敞口，并与瓶盖同置于上述恒温恒湿条件下2-4小时。
- [0075] 4.盖好称量瓶盖子，精密称定重量(m₃)。
- [0076] 5.引湿性特征描述与引湿性增重的界定
- [0077] 潮解：吸收足量水分形成液体。
- [0078] 极具引湿性：引湿增重不小于15%。
- [0079] 有引湿性：引湿增重小于15%但不小于2%。
- [0080] 略有引湿性：引湿增重小于2%但不小于0.2%。
- [0081] 无或几乎无引湿性：引湿增重小于0.2%。
- [0082] 实验结果：m₁=28.7554；m₂=29.7773；m₃=29.7773。
- [0083] 计算公式：增重百分率= $\frac{m_3-m_2}{m_2-m_1} \times 100\%$
- [0084] 实施例10样品氨丁三醇盐样品外观无变化，增重百分率为0.0%，无引湿性。
- [0085] 实施例12：稳定性研究
- [0086] 将实施例2钠盐样品分别考察在高温、高湿、光照条件下样品的稳定性，取样考察期为10天，试验结果见表2。
- [0087] 表2钠盐(实施例2样品)影响因素稳定性实验

样品	影响因素条件 (10d)	有关物质		
		RRT1.41	RRT1.47	总杂质
实施例 2	0 时	0.10	0.11	0.21
	高温 60℃	0.14	0.09	0.23
	高湿 75%	0.12	0.10	0.22
	光照	0.07	0.09	0.16

- [0088] 将实施例4~9钾盐、镁盐、钙盐、哌嗪盐、乙醇胺盐、葡甲胺盐样品分别考察在高温、高湿、光照条件下样品的稳定性，取样考察期为10天，试验结果见表3。

[0089] 表3钾盐、镁盐、钙盐、哌嗪盐、乙醇胺盐、葡甲胺盐(实施例4~样品)影响因素稳定性实验

样品	影响因素条件 (10d)	性状	纯度
实施例 4 (钾盐)	0 时	白色固体	99.41%
	高温 40℃	白色固体	99.66%
	高温 60℃	白色固体	99.58%
	高湿 75%	白色固体	99.34%
	高湿 92.5%	白色固体	99.47%
	光照	白色固体	99.41%
实施例 5 (镁盐)	0 时	白色固体	99.67%
	高温 40℃	白色固体	99.82%
	高温 60℃	白色固体	99.58%
	高湿 75%	白色固体	99.83%
	高湿 92.5%	白色固体	99.79%
	光照	白色固体	99.72%
实施例 6 (钙盐)	0 时	白色固体	99.42%
	高温 40℃	白色固体	99.58%
	高温 60℃	白色固体	99.68%
	高湿 75%	白色固体	99.56%
	高湿 92.5%	白色固体	99.44%
	光照	白色固体	99.43%
实施例 7 (哌嗪盐)	0 时	淡黄色固体	99.59%
	高温 40℃	淡黄色固体	99.67%
	高温 60℃	淡黄色固体	99.72%
	高湿 75%	淡黄色固体	99.66%
	高湿 92.5%	淡黄色固体	99.54%
	光照	淡黄色固体	99.43%
实施例 8 (乙醇胺盐)	0 时	白色固体	99.19%
	高温 40℃	白色固体	99.75%
	高温 60℃	白色固体	99.75%
	高湿 75%	白色固体	99.71%
	高湿 92.5%	白色固体	99.79%
	光照	白色固体	99.78%
实施例 9 (葡甲胺盐)	0 时	白色固体	99.53%
	高温 40℃	白色固体	99.45%
	高温 60℃	白色固体	98.04%
	高湿 75%	白色固体	99.01%
	高湿 92.5%	黄色油状液体	98.62%
	光照	白色固体	99.60%

[0090] 将实施例10氨丁三醇盐样品分别考察在高温(60℃)、光照(裸放)、光照(包装)、高湿(92.5%、75%)条件下样品的稳定性,取样考察期为10天,试验结果见表4。

[0091] 表4氨丁三醇盐(实施例10样品)影响因素稳定性实验

样品	影响因素条件 (10d)	总杂质
实施例 10	0 时	0.08
	高温 60℃	0.03
	光照 (裸放)	0.03
	光照 (包装)	0.04
	高湿 92.5%	0.04
	高湿 75%	0.04

[0092] 结论: 影响因素试验表明, 在高温(60℃)、光照(裸放)、光照(包装)、高湿(92.5%、75%)条件下, 氨丁三醇盐具有较好的化学稳定性。

[0093] 生物学测定

[0094] 试验一: 化合物活性测定

[0095] 下列测定法证明本发明实施例1的化合物 I 具有改善缺血性神经功能缺损的作用。测定结果还表明, 本发明的化合物 I 口服给药后, 具有良好的生物利用度和药效。

[0096] 1、大鼠药代动力学测试

[0097] SD雄性大鼠(体重180-260g), 按1.0mg/kg剂量尾静脉注射以及10.0mg/kg剂量口服给予化合物 I , 每组3只动物。给药溶剂为5%DMSO+5%聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor EL)的生理盐水溶液。给药前禁食约12小时, 给药后4h自由进食; 不禁水。于给药前及给药后5、15、30min, 1、2、4、6、8、24h, 由眼眶采血约0.2mL, 置于EDTA-K2抗凝的EP管中冰浴, 4℃, 3500rpm低速离心10分钟分离血浆, 于-20℃保存直至分析。使用液相色谱-串联质谱联用方法(LC-MS/MS)对血浆中化合物 I 浓度进行定量分析。样品分析结果采用WinNonlin软件对药动学参数进行计算。

[0098] 如表5数据可见, 口服给药后, 与丁苯酞文献(王宁宁, 李月, 李晓红, 姜明燕, RP-HPLC法测定大鼠血浆中3-正丁基苯酞的含量及其药动学, 中国新药与临床杂志, 2012年12月, 第31卷第12期, 743-747页)报道值相比, 化合物 I 在大

鼠体内消除时间更长，生物利用度更高(生物利用度超过100%推测是非线性药代原因导致)。

[0099] 表5.药代动力学参数

参数	单位	化合物 I		丁苯酞（文献值 ^[1] ）	
		i.v. 1 mg/kg	p.o. 10mg/kg	i.v. 10mg/kg	p.o. 60mg/kg
T _{1/2}	h	7.5	9.6	2.2	2.83
T _{max}	h	/	0.5	/	0.7
C _{max}	ng/mL	/	56533.3	/	2900.0
MRT _{inf}	h	9.8	13.2	2.4	3.8
AUC _{0-t}	h*ng/mL	52515.0	702610.0	7230.0	7110.0
AUC _{0-inf}	h*ng/mL	59248.7	854122.3	8620.0	8560.0
F	%	144.2		16.6*	

- [0100] ★根据表中所列AUC0–inf文献值计算
- [0101] 2、大鼠脑组织分布试验
- [0102] 雄性SD大鼠(体重200–270g)，以20mg/kg剂量分别口服给予化合物 I 、丁苯酞(NBP)。于给药后0.5、1、4、24h采集动物的血浆及脑组织样本。血浆的采集：用含有EDTA–K2的EP管收集全血0.2mL，3500g离心10分钟后，收集上层血浆于–20℃保存。脑组织的采集：于动物安乐死后称取适量脑组织，按照脑组织：80% 甲醇水(w/v)=1:4进行匀浆。使用液相色谱–串联质谱联用方法(LC–MS/MS)对血浆及脑组织样本中化合物浓度进行定量分析。
- [0103] 由表6数据可知，口服给药后，本发明的化合物 I 在大鼠血浆和脑组织中的分布浓度更高。
- [0104] 表6化合物在大鼠血浆和脑组织中的浓度

采样时间	化合物 I 20 mg/kg p.o.		丁苯酞 20mg/kg p.o.	
	血浆测定值	脑组织测定值	血浆测定值	脑组织测定值
	浓度 (ng/mL)	浓度 (ng/g)	浓度 (ng/mL)	浓度 (ng/g)
0.5h	241333.3	8733.3	26.0	28.5
1h	192333.3	5726.7	19.1	22.8
4h	182333.3	5030.0	7.2	10.2
24h	23500.0	285.3	1.7	NA

- [0105] NA：低于定量下限
- [0106] 3、化合物在大鼠脑卒中模型的药效学研究：单次治疗给药
- [0107] 利用线栓法构建SD大鼠大脑中动脉阻断(MCAO)模型，用于评价化合物对大鼠脑缺血再灌的神经元保护作用。SD大鼠(240–270g)用3.0%异氟烷进行麻醉诱导后，进行手术并分离暴露右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)及颈内动脉(ICA)。结扎ECA，暂时夹闭ICA并在CCA近心端、远心端分别穿线，远心端系紧，近心端系一松结备用，在两线间剪一小口，将4–0号线栓经CCA的切口插入，再缓慢轻轻地推入颈内动脉，到达ICA的动脉夹处暂停，进一步套紧颈结扎线，然后将阻断ICA血流的动脉夹取出，立即将线栓推入ICA直到进入颅内。当线栓插入深度距离颈总动脉分叉约18mm左右时，有轻微阻力感，则线栓的头端已经进入大脑前动脉(ACA)，线栓侧壁已经堵塞了大脑中动脉开口，此时停止插入，并记录时间。移去CCA上的动脉夹，观察无活动性出血后关闭切口。缺血大鼠置于室温使其体温保持37℃，120min后即可进行诱导麻醉，在维持麻醉状态下缓慢地轻拉线栓，使其头端回到颈外动脉内，即实现大脑中动脉再灌注。动物于再灌注后立即(10min内)给药1次，共设置3个组，分别为模型对照组，化合物 I 静脉组(30mg/kg)和化合物 I 口服组(60mg/kg)。动物于缺血再灌注后24h实施安乐死并快速取脑，冷冻后切片，进行TTC染色。正常组织经染色后呈玫瑰红色，梗死组织呈白色。以梗死组织重量占全脑重量的百分比作为梗塞范围(Infraction Area%)，用来评价大鼠脑缺血损伤程度。
- [0108] 术后1天通过TTC染色分析，模型对照组动物脑梗死范围为：21.63 ± 5.66%。化合物 I 静脉组、化合物 I 口服组动物脑梗死范围分别为：13.61 ± 3.66%和14.88 ± 5.11%，可见，本发明所述化合物 I 静脉组和口服组均能明显减少动物脑

梗死范围(P=0.0025和P=0.0389)；同时，化合物 I 静脉组和化合物 I 口服组动物脑梗死抑制率分别为：37.1%和31.2%。以上结果均提示化合物 I 能很好的改善大鼠脑梗死的效果，具体如表7所示。

[0109] 表7.实验动物脑梗死范围和脑梗死抑制率

组别	梗死范围 (%)	脑梗死抑制率 (%)
模型对照组 (N=13)	21.63±5.66	—
化合物 I 静脉组 (N=12)	13.61±3.66**	37.1
化合物 I 口服组 (N=10)	14.88±5.11*	31.2

[0110] 注：表中数据均以均值±标准差(Mean±SD)表示；“N”代表各组进行统计分析的动物数量，“—”表示该项没有数据，★表示与模型对照组动物相比P<0.05，★★表示与模型对照组动物相比P<0.01。

[0111] 4、化合物对大鼠脑卒中中长期模型的药效学研究

[0112] 利用线栓法构建SD大鼠大脑中动脉阻断(MCAO)模型，连续28天进行受试药物干预，通过一般观察、神经行为学评分对受试药物进行脑卒中的药效学评价。

[0113] SD大鼠(240–280g)用3.0%异氟烷进行麻醉诱导后，进行手术并分离暴露右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)及颈内动脉(ICA)。结扎ECA，暂时夹闭ICA并在CCA近心端、远心端分别穿线，远心端系紧，近心端系一松结备用，在两线间剪一小口，将4–0号线栓经CCA的切口插入，再缓慢轻轻地推入颈内动脉，到达ICA的动脉夹处暂停，进一步套紧预结扎线，然后将阻断ICA血流的动脉夹取出，立即将线栓推入ICA直到进入颅内。当线栓插入深度距离颈总动脉分叉约18mm左右时，有轻微阻力感，则线栓的头端已经进入大脑前动脉(ACA)，线栓侧壁已经堵塞了大脑中动脉开口，此时停止插入，并记录时间。移去CCA上的动脉夹，观察无活动性出血后关闭切口。缺血大鼠置于室温使其体温保持37℃，120min后即可进行诱导麻醉，在维持麻醉状态下缓慢地轻拉线栓，使其头端回到颈外动脉内，即实现大脑中动脉再灌注。动物于再灌注后立即(10min内)给药，以后每天1次，连续28天，手术当天定义为D1(Day0)。共设置5个组，分别为假手术组，模型对照组，丁苯酞(NBP)给药组(60mg/kg,p.o.,q.d)、化合物

I 口服低剂量组(6mg/kg,p.o.,q.d)、化合物 I 口服高剂量组(20mg/kg,p.o.,q.d)。给药期间,对所有动物进行网格试验测试(D7、D14、D21和D28,共4次)、新物体识别试验(D26新物体识别适应、D27检测);D28天给药结束后,对所有入组存活动物进行安乐死后快速将大脑取材,并进行病理分析。

[0114] (1)网格试验测试结果显示:手术后一周,模型对照组动物错步频数为7.24±3.59次、NBP治疗组、化合物 I 低、高剂量组错步频数分别为7.37±3.03次、5.33±2.33次和4.23±1.44次,其中化合物 I 高剂量组动物错步频数与模型对照组比较显著降低(P=0.0172);手术后2-3周,因模型组动物运动功能逐渐恢复,错步频数逐渐降低,化合物 I 高剂量组错步频数与模型对照组比较虽无显著差异,但仍有降低的趋势;造模后4周,模型动物错步频数降低至假手术组动物水平。以上结果提示,化合物 I 有改善脑卒中动物行走功能障碍的效果(详见表8)。

[0115] 表8.网格试验结果

组别	错步频数 (次)			
	1W	2W	3W	4W
假手术组 (12)	0.96±0.66	0.79±0.56	0.88±0.82	1.79±0.92
模型对照组 (N=17)	7.24±3.59	5.35±4.40	4.09±3.140	1.59±0.84
NBP 组 (N=15)	7.37±3.03	8.10±2.97	6.27±2.890	2.10±1.46
化合物 I 低剂量组 (N=12)	5.33±2.33	6.33±3.53	4.38±2.44	2.58±1.55
化合物 I 高剂量组 (N=13)	4.23±1.44*	3.23±2.56	2.50±0.81	1.42±1.11

[0116] 注:表中数据均以均值±标准差(Mean±SD)表示;“N”代表各组进行统计分析的动物数量;“1W、2W、3W、4W”分别代表术后1、2、3、4周,*代表与模型对照组比较P<0.05。

[0117] (2)治疗最后一天进行新物体识别试验,计算各组动物对新物体的认知指数(NRI)。模型对照组动物新物体认知指数为54.81±21.94%,与旧物体认知指数(FRI)无显著差异,而NBP治疗组、化合物 I 低和高剂量组动物NRI分别为

70.97 ± 22.57%、70.98 ± 22.60%和71.66 ± 17.06%，其中NBP治疗组、化合物 I 低剂量组和高剂量组新/旧物体认知指数均有显著性差异(P=0.0074、P=0.0212和P=0.0009)，同时化合物 I 低剂量组和高剂量组新物体认知指数与假手术组动物新物体认知指数(66.51 ± 10.80%)相当，以上结果提示，化合物 I 对脑卒中动物认知障碍有显著改善(详见表9)。

[0118] 表9.新物体识别试验结果

组别	嗅探时间 (S)		认知指数(%)	
	新物体	旧物体	新物体	旧物体
假手术组 (11)	10.52±4.00	5.70±3.19	66.51±10.80***	33.49±10.80
模型对照组 (N=14)	3.82±3.40	2.70±2.22	54.81±21.94	45.19±21.94
NBP 组 (N=13)	4.94±3.60	1.60±1.01	70.97±22.57**	29.03±22.57
化合物 I 低剂量组 (N=10)	4.74±3.61	1.54±1.10	70.98±22.60*	29.02±22.60
化合物 I 高剂量组 (N=13)	5.62±3.60	2.20±1.66	71.66±17.06***	28.34±17.06

[0119] 注：表中数据均以均值 ± 标准差(Mean ± SD)表示；“N”代表各组进行统计分析的动物数量；*代表与模型对照组比较P<0.05，**代表与模型对照组比较P<0.01，***代表与模型对照组比较P<0.001。

[0120] (3)病理学检查：1)修复范围：将修复区范围>30%的样品视为恢复情况较好，而≤30%的样品视为恢复不良。模型对照组恢复较好的动物比例为17.6%，NBP治疗组、化合物 I 低剂量组和高剂量组修复区>30%的比例分别为21.4%、33.3%和75.0%，化合物 I 高剂量组恢复情况最好，与模型对照组比较具有显著性差异(Chi-square，P=0.0080)，以上结果提示化合物 I 有促进梗死区域修复的作用(详见表10)；2)梗死修复区充盈血管数量：设定梗死修复区含红细胞血管数量≤10个和>10个两个标准。假手术组所有动物充盈状态血管的数量均大于10个，占比为100%，模型对照组动物梗死修复区含红细胞血管数量≤10和>10个的动物数量分别有10只和7只，含红细胞血管数量>10个动物数量占比41.2%，NBP治疗组梗死修复区含红细胞血管数量≤和>10个的动物数量分别有1只和14只，含红细胞血管数量>10个动物占比93.3%，与模型对照组动物相比

有统计学意义(Chi-square, P=0.0028), 化合物 I 低剂量组和高剂量组梗死修复区含红细胞血管数量 $\leq$ 和 >10 个的动物数量分别为0/12只、1/12只, 含红细胞血管数量 >10 个的数量显著高于模型对照组(Chi-square, P=0.0012、P=0.0076)。其次, 化合物 I 低剂量组和高剂量动物修复区含红细胞血管 >10 个的样品比例分别为100%、92.3%, 各治疗组均在90%以上, 以上结果提示化合物 I 在连续28天的治疗下可以显著提高脑卒中动物脑梗死修复区的血管充盈度(详见表11)。

[0121] 表10.各组样品恢复情况统计表

组别	样品数量		恢复较好的样品比
	修复区 $\leq$ 复区好	修复区 $>30\%$	例 (%)
假手术组 (12)	-	12	100
模型对照组 (N=17)	14	3	17.6
NBP 组 (N=14)	11	3	21.4
化合物 I 低剂量组 (N=12)	8	4	33.3
化合物 I 高剂量组 (N=12)	3	9**	75.0

[0122] 注：“.”代表各组进行统计分析的动物数量；**代表与模型对照组Chi-square比较P<0.01。

[0123] 表11.各组样品充盈血管的丰度统计表

组别	含红细胞血管的数量 (个)		含红细胞血管 >10 个的
	≤ 10	> 10	样品比例 (%)
假手术组 (12)	-	12	100
模型对照组 (N=17)	10	7	41.2
NBP 组 (N=15)	1	14**	93.3
化合物 I 低剂量组 (N=12)	0	12**	100
化合物 I 高剂量组 (N=13)	1	12**	92.3

[0124] 注：“.”代表各组进行统计分析的动物数量；**代表与模型对照组Chi-square比较P<0.01。

- [0125] 实施例2-10为实施例1化合物的盐，体内可游离为实施例1化合物，因此同样具有实施例1化合物的上述功能。
- [0126] 试验二：实施例10的氨丁三醇盐对脑卒中的药效
- [0127] 下列测定法证明实施例10的氨丁三醇盐具有改善缺血性神经功能缺损的作用。测定结果还表明，实施例10的氨丁三醇盐口服给药后，具有良好的生物利用度和药效。
- [0128] 1、化合物在大鼠脑卒中模型的药效学研究
- [0129] 利用线栓法构建SD大鼠大脑中动脉阻断(MCAO)模型，用于评价化合物对大鼠脑缺血再灌的神经元保护作用。SD大鼠(240-270g)用3.0%异氟烷进行麻醉诱导后，进行手术并分离暴露右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)及颈内动脉(ICA)。结扎ECA，暂时夹闭ICA并在CCA近心端、远心端分别穿线，远心端系紧，近心端系一松结备用，在两线间剪一小口，将4-0号线栓经CCA的切口插入，再缓慢轻轻地推入颈内动脉，到达ICA的动脉夹处暂停，进一步套紧预结扎线，然后将阻断ICA血流的动脉夹取出，立即将线栓推入ICA直到进入颅内。当线栓插入深度距离颈总动脉分叉约18mm左右时，有轻微阻力感，则线栓的头端已经进入大脑前动脉(ACA)，线栓侧壁已经堵塞了大脑中动脉开口，此时停止插入，并记录时间。移去CCA上的动脉夹，观察无活动性出血后关闭切口。缺血大鼠置于室温使其体温保持37℃，120min后即可进行诱导麻醉，在维持麻醉状态下缓慢地轻拉线栓，使其头端回到颈外动脉内，即实现大脑中动脉再灌注。动物于再灌注后立即(10min内)给药1次，共设置4个组，分别为模型对照组，实施例10的氨丁三醇盐灌胃组(20和40mg/kg)和丁苯酞口服组(60mg/kg)。再灌注后即刻(10min内)给药1次，后续每天给药1次，连续给药7次(包括首次给药)，除第1次给药外，后续每天给药的时间为下午4:00~7:00。造模前及造模后24h(1天)、72h(3天)和第7天各测定1次NSS行为学评分。动物于缺血再灌注后7天实施安乐死并快速取脑，冷冻后切片，进行TTC染色。正常组织经染色后呈玫瑰红色，梗死组织呈白色。以梗死组织重量占全脑重量的百分比作为梗塞范围(Infraction Area%)，用来评价大鼠脑缺血损伤程度。

[0130] (1)脑梗死：术后7天，结果如表12所示，假手术对照组动物没有脑梗死，模型对照组动物脑梗死范围为 $19.951 \pm 3.432\%$ ，阳性药物组动物脑梗死范围为 $14.241 \pm 2.912\%$ ，相对于模型对照组显著降低($P \leq 0.05$)，实施例10的氨丁三醇盐20、40mg/kg动物的脑梗死范围分别为 $14.717 \pm 2.541\%$ 、 $13.762 \pm 2.225\%$ ，均显著低于模型对照组动物脑梗死范围($P \leq 0.05$)，根据脑梗死范围计算实施例10的氨丁三醇盐40mg/kg组和阳性药物组(丁基苯酞，60mg/kg)动物脑梗死抑制率分别为 $31.023 \pm 11.15\%$ 和 $28.624 \pm 14.597\%$ 。以上结果提示在本试验条件下在剂量为20mg/kg和40mg/kg时，实施例10的氨丁三醇盐对缺血性脑卒中大鼠脑梗死范围具有显著的改善效果，其中40mg/kg实施例10的氨丁三醇盐对脑梗死的改善效果优于60mg/kg的阳性药物。

[0131] 表12实验动物脑梗死范围和脑梗死抑制率

组别	全脑重量(g)	梗死区重(g)	梗死范围(%)	脑梗死抑制(%)
假手术对照组(N=12)	1.354±0.118	0.000±0.000	0.000±0.000	—
模型对照组(N=12)	1.138±0.07	0.227±0.043	19.951±3.432	—
实施例10的氨丁三醇盐 20mg/kg(N=11)	1.237±0.082	0.183±0.036	14.717±2.541*	26.236±12.737
实施例10的氨丁三醇盐 40mg/kg组(N=13)	1.280±0.074	0.176±0.030	13.762±2.225*	31.023±11.150
阳性对照(丁基苯酞) 60mg/kg组(N=12)	1.237±0.093	0.175±0.032	14.241±2.912*	28.624±14.597

[0132] 注：表中数据均以均值±标准差(Mean±SD)表示；“N”代表各组进行统计分析的动物数量，“—”表示该项没有数据，★表示与模型对照组动物相比 $P \leq 0.05$ 。

[0133] (2)神经行为学评分：结果如表13所示，所有组别动物术后Bederson评分均为3分，提示动物缺血成功。术后1天，模型对照组动物NSS得分为 7.21 ± 1.03 ，阳性药物和实施例10的氨丁三醇盐治疗组动物NSS评分相对于模型对照组具有降低的趋势，差异无统计学意义。

[0134] 术后3天，模型对照组动物NSS评分为 5.92 ± 0.70 ，实施例10的氨丁三醇盐40mg/kg剂量组动物NSS评分相对于模型对照组显著降低($P \leq 0.05$)。而阳性药物

组(丁基苯酞, 60mg/kg)动物NSS评分为 5.75 ± 0.92 , 与模型对照组相比无显著性差异。在后续观察期间, 模型对照动物NSS评分降至5分并维持在5分以上, 各给药组动物NSS评分出现持续降低趋势, 至造模7天后模型对照组动物NSS评分为 5.17 ± 1.56 , 实施例10的氨丁三醇盐40mg/kg组和阳性药物组(丁基苯酞, 60mg/kg)动物NSS评分分别为 3.42 ± 1.54 和 4.04 ± 1.20 , 其中实施例10的氨丁三醇盐40mg/kg组别动物NSS评分相对于模型对照组显著降低($P \leq 0.05$)。以上结果提示在本试验条件下在剂量为40mg/kg时, 实施例10的氨丁三醇盐对缺血性脑卒中大鼠急性期神经功能损伤具有显著的改善, 且效果好于阳性药物组。

[0135] 表13动物神经行为评分结果

组别	Bederson	NSS				
		D0	D2	D4	D6	D8
假手术对照组 (N=12)	3.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型对照组 (N=12)	3.00±0.00	0.00±0.00	7.21±1.03	5.92±0.70	5.13±1.58	5.17±1.56
实施例 10 的氨丁三醇盐 20mg/kg 组 (N=11)	3.00±0.00	0.00±0.00	6.73±1.57	5.68±1.27	4.50±0.63	4.27±1.06
实施例 10 的氨丁三醇盐 40mg/kg 组 (N=13)	3.00±0.00	0.00±0.00	6.04±1.35	4.62±1.24*	3.88±1.46	3.42±1.54*
阳性对照组 (丁基苯酞) 60mg/kg (N=12)	3.00±0.00	0.00±0.00	6.71±1.36	5.75±0.92	4.88±1.73	4.04±1.20

[0136] 注：表中数据均以均值±标准差(Mean±SD)表示；“N”代表各组进行统计分析的动物数量；* $P \leq 0.05$ 表示与模型对照组相比差异具有统计学意义；“D0”代表术前1天，“D2”、“D4”、“D6”和D8分别代表术后1天、3天、5天和7天。

[0137] (3)小结：本研究表明实施例10的氨丁三醇盐在减轻脑卒中导致的脑梗死的同时, 还减轻神经功能的损伤；而阳性药仅对脑梗死有改善作用。较低剂量的实施例10的氨丁三醇盐(40mg/kg)对脑梗死的抑制作用以及减轻神经功能损伤的作

用均优于较高剂量的阳性药(60mg/kg)，提示实施例10的氨丁三醇盐药效优于阳性药。

- [0138] 试验三：实施例10的氨丁三醇盐对肌萎缩侧索硬化症的药效
- [0139] 下列测定法证明实施例10的氨丁三醇盐具有改善肌萎缩侧索硬化症(ALS)的作用。
- [0140] 1、对SOD1-G93A转基因肌萎缩侧索硬化症小鼠的药效学研究
- [0141] 使用雄性SOD1-G93A转基因ALS模式小鼠(5周龄)，用于评价化合物对ALS疾病动物的治疗作用。小鼠经适应性饲养1周后，采用随机数表法按体质量、肌张力、转棒分为A组：溶剂，B组：利鲁唑25mg/kg p.o.，C组：实施例10的氨丁三醇盐40mg/kg p.o.，D组：实施例10的氨丁三醇盐60mg/kg p.o.，给药频率为连续给药两周，每周周一到周五给药，之后停药一周。每两周进行一次行为学测定，通过转棒实验和肌张力实验，并监测动物的体重和生存率，评价实施例10的氨丁三醇盐对ALS疾病的治疗作用。
- [0142] (1)转棒实验显示(表14)：转棒实验通过测定小鼠的转棒时间，评估动物的运动耐力和协调性，本实验中，实施例10的氨丁三醇盐40mg/kg在小鼠10-16周龄，即小鼠发病中期可显著改善ALS小鼠的转棒时间(P<0.05)，60mg/kg剂量组在小鼠发病晚期可显著改善小鼠的转棒时间(P<0.001，P<0.05)，而利鲁唑在本实验条件下对小鼠转棒时间有上调趋势，但无显著性差异。在本实验条件下，实施例10的氨丁三醇盐的药效优于利鲁唑。
- [0143] 表14实施例10的氨丁三醇盐对SOD1 G93A ALS小鼠转棒时间(s)影响

动物周龄	溶剂组	利鲁唑组	实施例 10 的氨	实施例 10 的氨丁
			丁三醇盐 (40mg/kg)	三醇盐 (60mg/kg)
8	205.0±7.569	232.9±14.20	237.5±14.63	231.4±12.39
10	221.2±4.947	254.1±9.229	263.6±8.950*	249.7±8.397
12	184.2±6.676	233.0±8.894	259.4±10.67*	224.6±9.470
14	209.1±5.999	218.9±8.639	248.2±8.163*	225.5±8.139
16	117.4±14.45	150.8±16.39	164.0±14.20*	179.2±5.743***

动物周龄	溶剂组	利鲁唑组	实施例 10 的氨	实施例 10 的氨丁
			丁三醇盐 (40mg/kg)	三醇盐 (60mg/kg)
18	23.44±11.81	45.61±14.52	32.87±9.782	63.55±12.04*

[0144] 注：表中数据均以均值±标准方差(Mean±SEM)表示；与溶剂组相比，★表示P<0.05,★★表示P<0.01,★★★表示P<0.001。

[0145] (2)肌张力实验(表15)：实施例10的氨丁三醇盐60mg/kg显著改善18–20周龄SOD1 G93A ALS小鼠的肌张力，而利鲁唑和40mg/kg的实施例10的氨丁三醇盐对小鼠肌张力有上调趋势，但无显著性差异。

[0146] 表15实施例10的氨丁三醇盐对SOD1 G93A ALS小鼠肌张力(g)的影响

动物周龄 (周)	溶剂组	利鲁唑组	实施例 10 的氨	实施例 10 的氨丁
			丁三醇盐 (40mg/kg)	三醇盐 (60mg/kg)
8	133.2±6.762	129.8±6.758	123.3±4.830	140.5±4.598
10	121.8±6.384	120.6±8.532	115.5±5.222	117.7±5.008
12	112.0±3.486	114.2±3.933	117.1±3.641	119.0±2.873
14	113.0±4.430	121.4±5.091	115.8±3.416	127.4±4.421
16	107.6±3.728	111.5±4.591	110.1±2.868	122.7±4.427
18	105.8±2.436	121.6±7.208	114.8±5.000	126.4±4.252**
20	75.38±2.234	68.71±4.333	86.26±3.279	92.73±2.555*

[0147] 注：表中数据均以均值±标准方差(Mean±SEM)表示；与溶剂组相比，★表示P<0.05,★★表示P<0.01,★★★表示P<0.001。

[0148] (3)对生存率的影响：如图3所示，相较于对照组和阳性药组，SOD1 G93A ALS小鼠给予实施例10的氨丁三醇盐(20、40、60mg/kg)均表现出更长的生存期，其中40mg/kg组的生存期延长了约15天。

[0149] (4)对体重的影响：与溶剂组相比，实施例10的氨丁三醇盐各剂量和利鲁唑给药对小鼠体重无明显影响。

[0150] (5)小结

- [0151] 实施例10的氨丁三醇盐的40mg/kg和60mg/kg剂量组可显著改善SOD1G93A转基因导致的ALS样运动功能障碍，并可一定程度延长ALS小鼠生存期。在本实验条件下，阳性药利鲁唑对ALS小鼠的神经行为学功能有一定改善作用，但与溶剂对照组相比无显著差异，药效弱于实施例10的氨丁三醇盐。
- [0152] 2、对TDP-43-A315T转基因ALS小鼠的药效学研究
- [0153] 使用TDP-43-A315T转基因ALS模式小鼠(5周龄，雌雄各半)，用于评价化合物对ALS疾病动物的治疗作用。小鼠经适应性饲养1周后，采用随机数表法按体质量、肌张力、转棒分为A组：溶剂，B组：利鲁唑25mg/kg p.o.，C组：实施例10的氨丁三醇盐40mg/kg p.o.，D组：实施例10的氨丁三醇盐60mg/kg p.o.，小鼠给药频率为每天一次，每周连续给药7天，给药一周后停一周。每两周进行一次行为学测定，通过转棒实验和肌张力实验，并监测动物的体重和生存率，评价实施例10的氨丁三醇盐对ALS疾病的治疗作用。
- [0154] (1)肌张力实验显示(表16和表17)：在13-14周龄时，与溶剂组相比，60mg/kg的实施例10的氨丁三醇盐可显著改善雄性TDP-43 ALS小鼠的肌张力，而利鲁唑对肌张力有上调趋势，但无显著性差异。在14-16周龄时，20mg/kg和40mg/kg的实施例10的氨丁三醇盐可显著上调雌性ALS小鼠肌张力，利鲁唑对雌性ALS小鼠肌张力无显著改善作用。
- [0155] 表16实施例10的氨丁三醇盐对雄性TDP-43 A315T ALS小鼠肌张力(g)影响

动物周龄 (周)	溶剂组	利鲁唑组	实施例 10 的氨	实施例 10 的氨
			丁三醇盐 (40mg/kg)	丁三醇盐 (60mg/kg)
6	158.8±5.917	144.0±10.127	155.4±6.495	175.7±7.244
8	182.8±6.418	152.4±10.35	170.9±6.777	177.0±5.555
10	160.5±8.541	150.5±14.46	155.6±8.359	155.93±4.345
12	146.4±10.79	145.4±5.551	123.1±18.21	136.8±16.00
13	86.78±29.28	147.8±1.650	120.8±12.91	149.8±3.710**
14	80.23±24.17	129.2±1.250	89.72±19.04	149.8±2.045**

- [0156] 注：表中数据均以均值±标准方差(Mean±SEM)表示；与溶剂组相比，★表示P<0.05,★★表示P<0.01,★★★表示P<0.001。

[0157] 表17实施例10的氨丁三醇盐对雌性TDP-43 A315T ALS小鼠肌张力的影响

动物周龄 (周)	溶剂组	利鲁唑组	实施例 10 的氨	实施例 10 的氨
			丁三醇盐 (20mg/kg)	丁三醇盐 (40mg/kg)
6	155.9±4.760	145.2±5.444	165.4±7.815	155.8±3.677
8	172.8±10.54	177.8±9.836	190.2±14.13	190.6±10.24
10	149.8±6.816	133.6±12.04	153.7±8.355	147.8±7.822
12	157.4±7.212	161.5±3.666	159.4±13.21	154.3±6.584
13	143.2±6.715	146.4±6.928	149.8±4.815	148.1±4.851
14	140.8±3.035	143.1±9.165	150.9±6.940	161.6±2.816*
16	135.6±3.747	149.0±6.827	159.5±7.125*	155.2±3.339*

[0158] 注：表中数据均以均值±标准方差(Mean±SEM)表示；与溶剂组相比，★表示P<0.05,★★表示P<0.01,★★★表示P<0.001。

[0159] (2)转棒实验显示(表18和表19)：实施例10的氨丁三醇盐60mg/kg剂量组在ALS小鼠11-13周龄时可显著上调雄性TDP43 ALS小鼠的转棒时间，利鲁唑组在小鼠11-13周龄时对转棒时间有上调趋势，但与溶剂组相比无显著性差异。实施例10的氨丁三醇盐20mg/kg对雌性小鼠的转棒时间也有一定上调作用。

[0160] 表18实施例10氨丁三醇盐对雄性TDP-43 A315T ALS小鼠转棒时间(s)影响

给药时间 (周)	溶剂组	利鲁唑组	实施例 10 的氨	实施例 10 的氨丁
			丁三醇盐 (40mg/kg)	三醇盐 (60mg/kg)
6	250.7±7.962	250.8±12.71	272.9±7.148	295.6±3.322
8	272.0±14.66	236.4±16.14	267.5±9.357	275.1±11.91
10	243.5±17.57	234.0±10.64	275.8±10.38	267.3±10.94
11	173.1±28.12	215.6±31.32	224.3±26.08	263.0±12.54**
12	141.3±26.60	202.4±41.22	182.1±40.34	266.3±17.99***
13	99.39±61.47	135.32±76.92	154.2±30.27	209.0±31.68**

[0161] 注：表中数据均以均值±标准方差(Mean±SEM)表示；与溶剂组相比，★表示P<0.05,★★表示P<0.01,★★★表示P<0.001。

[0162] 表19实施例10的氨丁三醇盐对雌性TDP-43 A315TALS小鼠转棒时间(s)影响

[0163] 注：表中数据均以均值±标准方差(Mean±SEM)表示；与溶剂组相比，★表示P<0.05，

给药时间 (周)	溶剂组	利鲁唑组	实施例 10 的氨	实施例 10 的氨
			丁三醇盐 (20mg/kg)	丁三醇盐 (40mg/kg)
2	269.8±12.35	269.8±5.164	287.0±8.449	273.6±12.14
4	285.0±8.609	258.8±15.65	288.6±7.796	271.4±10.22
6	267.2±13.05	275.3±9.266	285.4±6.626	269.5±8.270
8	267.8±13.06	272.3±10.56	266.3±14.55	275.6±9.651
10	244.9±13.02	238.4±16.32	254.2±12.62	260.6±12.34
12	254.6±13.75	252.3±16.24	266.2±14.94	270.6±9.446
14	252.5±19.89	270.6±12.70	272.3±10.62	256.3±10.00
16	207.9±20.82	255.9±17.39	267.8±16.51	236.5±15.50

- [0164] ★★表示P<0.01,***表示P<0.001。
- [0165] (3)体重的测定：利鲁唑及实施例10的氨丁三醇盐各剂量给药对小鼠体重无显著影响。
- [0166] (4)小结：说明实施例10的氨丁三醇盐在不影响小鼠体重的情况下，可显著改善TDP-43 A315T转基因ALS小鼠的运动功能障碍，药效优于对照药物利鲁唑。
- [0167] 试验四：实施例10的氨丁三醇盐对帕金森病的治疗效果
- [0168] 下列测定法证明本发明实施例10的氨丁三醇盐具有缓解帕金森认知功能障碍的作用。
- [0169] 1.化合物对MPTP诱导的小鼠帕金森模型的治疗效果
- [0170] 腹腔注射1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(Aromatic amino-acid decarboxylase, MPTP)，注射剂量为30mg/kg，每周注射2次，连续注射4周建立小鼠帕金森病模型，根据动物的行为学检测、纹状体多巴胺(Dopamine, DOPA)及组织病理学检查结果，对供试品实施例10的氨丁三醇盐的药效进行评价。
- [0171] 50只C57小鼠，根据造模前爬杆试验结果，区组随机分为5个组，分别为正常对照组、模型对照组、实施例10的氨丁三醇盐低剂量组、实施例10的氨丁三醇盐高剂量组和阳性对照组(左旋多巴，20mg/kg)。于MPTP首次注射当天开始药物干

预处理，每天给药1次，连续给药4周，供试品实施例10的氨丁三醇盐给药剂量为5mg/kg和20mg/kg，阳性对照组(左旋多巴)给药剂量为20mg/kg。MPTP末次注射后48h内进行爬杆试验和抓力测试。

- [0172] 1)爬杆试验结果
- [0173] 爬杆试验统计汇总结果见表19和图4。造模前各试验组动物爬杆时长无明显差异，试验终点时正常对照组动物爬杆时长为 $8.35 \pm 0.89s$ ，模型对照组动物爬杆时长为 $11.51 \pm 2.39s$ ，相较于正常对照组显著增加($P<0.05$)，阳性对照组动物爬杆时长为 $8.76 \pm 1.57s$ ，与模型对照相比具有减少趋势。实施例10的氨丁三醇盐低剂量组和高剂量组动物爬杆时长分别为 $9.67 \pm 1.48s$ 、 $8.83 \pm 1.77s$ ，与模型对照相比爬杆时长均减少，其中实施例10的氨丁三醇盐高剂量组与模型对照相比差异具有统计意义($P<0.05$)。以上结果提示，实施例10的氨丁三醇盐对MPTP诱导的PD模型有显著的治疗作用。

[0174] 表19爬杆(s)试验结果

组别	样本例数	造模前	试验终点
正常对照组	10	9.49±1.45	8.35±0.89
模型对照组	7	9.47±1.48	11.51±2.39 [*]
实施例 10 的氨丁三醇盐低剂量组	6	9.40±1.51	9.67±1.48
实施例 10 的氨丁三醇盐高剂量组	8	9.51±1.66	8.83±1.77 [#]
阳性对照组（左旋多巴）	6	9.40±1.62	8.76±1.57

- [0175] 注：表中数据均以平均值(Mean)±标准差(SD)表示。^{*} $P<0.05$ 表示与正常对照组相比差异具有统计学意义，[#] $P<0.05$ 表示与模型对照组相比差异具有统计学意义。
- [0176] 2)抓力检测结果
- [0177] 抓力检测统计汇总结果见表20和图5。造模前各试验组动物抓力无明显差异，试验终点时正常对照组动物抓力为 $260.98 \pm 14.81g$ ，模型对照组动物抓力为 $210.92 \pm 10.00g$ ，相较于正常对照组显著减小($P<0.05$)，阳性对照组(左旋多巴)动物抓力为 $226.26 \pm 8.39g$ ，与模型对照相比具有增高趋势。实施例10的氨丁三醇

盐低剂量组和高剂量组动物抓力分别为 $219.05 \pm 12.83\text{g}$ 、 $227.16 \pm 5.85\text{g}$ ，与模型对照相比抓力均具有增高趋势。

[0178] 表20抓力(g)检测结果

组别	样本例数	造模前	试验终点
正常对照组	10	275.67 ± 9.17	260.98 ± 14.81
模型对照组	7	275.92 ± 10.48	$210.92 \pm 10.00^{\&}$
实施例 10 的氨丁三醇盐低剂量组	6	276.97 ± 6.40	$219.05 \pm 12.83^{\&}$
实施例 10 的氨丁三醇盐高剂量组	8	278.44 ± 8.96	$227.16 \pm 5.85^{\&}$
阳性对照组（左旋多巴）	6	272.61 ± 9.01	$226.26 \pm 8.39^{\&}$

[0179] 注：表中数据均以平均值(Mean)±标准差(SD)表示。[&]P<0.05表示与正常对照组相比差异具有统计学意义。

[0180] 3)纹状体DOPA检测结果

[0181] 纹状体DOPA检测汇总结果见表21和图6。正常对照组动物纹状体DOPA含量为 $4931.52 \pm 1607.66\text{ng/g}$ ，模型对照组动物纹状体DOPA含量为 $891.92 \pm 285.94\text{ng/g}$ ，与正常对照组相比显著降低(P<0.05)，阳性对照组动物DOPA含量为 $1156.72 \pm 375.72\text{ng/g}$ ，与模型对照组相比无明显变化。实施例10的氨丁三醇盐高剂量组动物DOPA含量为 $2731.07 \pm 868.18\text{ng/g}$ ，与模型对照组相比显著增高(P<0.05)，实施例10的氨丁三醇盐低剂量组动物DOPA含量为 $837.82 \pm 372.19\text{ng/g}$ ，与模型对照相比无明显变化。以上结果说明，实施例10的氨丁三醇盐高剂量组(20mg/kg)对MPTP制备的PD模型中的多巴胺能神经元具有显著的保护作用。

[0182] 表21纹状体DOPA(ng/g)检测结果

组别	样本例数	DOPA
正常对照组	10	4931.52 ± 1607.66
模型对照组	7	$891.92 \pm 285.94^{\&}$
实施例 10 的氨丁三醇盐低剂量组	6	$837.82 \pm 372.19^{\&}$
实施例 10 的氨丁三醇盐高剂量组	8	$2731.07 \pm 868.18^{\#}$
阳性对照组（左旋多巴）	6	$1156.72 \pm 375.72^{\&}$

[0183] 注：表中数据均以平均值(Mean)±标准差(SD)表示。*P<0.05表示与正常对照组相比差异具有统计学意义，#P<0.05表示与模型对照组相比差异具有统计学意义。

[0184] 4)纹状体TH阳性纤维含量统计结果

[0185] 纹状体TH阳性纤维含量统计汇总结果见表22和图7。正常对照组动物纹状体TH阳性纤维含量为1133191.93±103519.32，模型对照组动物纹状体TH阳性纤维含量为470927.76±115639.36，与正常对照组相比显著降低(P<0.05)，阳性对照组(左旋多巴)动物TH阳性纤维含量为536968.78±68050.46，与模型对照组相比无明显变化。实施例10的氨丁三醇盐高剂量组动物TH阳性纤维含量为709627.56±100462.19，与模型对照组相比显著增高(P<0.05)，实施例10的氨丁三醇盐低剂量组动物TH阳性纤维含量为526554.39±169680.75，与模型对照相比无明显变化。以上结果说明，与上述的结果一致，实施例10的氨丁三醇盐高剂量组(20mg/kg)对MPTP制备的PD模型中的多巴胺能神经元具有显著的保护作用。

[0186] 表22纹状体TH阳性纤维含量统计结果

组别	样本例数	TH 阳性纤维含量
正常对照组	10	1133191.93±103519.32
模型对照组	7	470927.76±115639.36 [*]
实施例 10 的氨丁三醇盐低剂量组	6	526554.39±169680.75 [*]
实施例 10 的氨丁三醇盐高剂量组	8	709627.56±100462.19 ^{*#}
阳性对照组（左旋多巴）	6	536968.78±68050.46 [*]

[0187] 注：表中数据均以平均值(Mean)±标准差(SD)表示。*P<0.05表示与正常对照组相比差异具有统计学意义，#P<0.05表示与模型对照组相比差异具有统计学意义。

[0188] 5)黑质致密部TH阳性细胞数统计结果

[0189] 黑质致密部TH阳性细胞数统计汇总结果见表23和图8，个体数据见附表23。正常对照组动物TH阳性细胞数为57.47±5.81个，模型对照组动物TH阳性细胞数为30.57±3.29个，与正常对照组相比显著降低(P<0.05)，阳性对照组动物TH阳性细胞数为31.50±4.14个，与模型对照组相比无明显变化。实施例10的氨丁三醇盐

高剂量组动物TH阳性细胞数为 42.42 ± 4.36 个，与模型对照组相比显著增高($P < 0.05$)，实施例10的氨丁三醇盐低剂量组动物TH阳性纤维含量为 31.22 ± 5.97 个，与模型对照相比无明显变化。结果再次证明，实施例10的氨丁三醇盐高剂量组(20mg/kg)对MPTP制备的PD模型中的多巴胺能神经元具有显著的保护作用。

[0190] 表23黑质致密部TH阳性细胞数统计结果

组别	样本例数	TH 阳性细胞数
正常对照组	10	57.47 ± 5.81
模型对照组	7	$30.57 \pm 3.29^{\&}$
实施例 10 的氨丁三醇盐低剂量组	6	$31.22 \pm 5.97^{\&}$
实施例 10 的氨丁三醇盐高剂量组	8	$42.42 \pm 4.36^{\&\#}$
阳性对照组（左旋多巴）	6	$31.50 \pm 4.14^{\&}$

[0191] 注：表中数据均以平均值(Mean) ± 标准差(SD)表示。&P<0.05表示与正常对照组相比差异具有统计学意义，#P<0.05表示与模型对照组相比差异具有统计学意义。

[0192] 试验五：实施例10的氨丁三醇盐对脊髓损伤的治疗效果

[0193] 下列测定法证明本发明实施例10的氨丁三醇盐具有缓解脊髓损伤的作用。

[0194] 1：化合物治疗大鼠脊髓损伤(SCI)研究

[0195] 在大鼠脊髓损伤模型中，研究化合物实施例10的氨丁三醇盐对脊髓损伤的治疗效果并初步探讨作用机制。

[0196] 雄性SD大鼠，异氟烷麻醉后，大鼠背部胸椎区域备皮。以T10椎体的棘突为中心切开皮肤，逐层切开皮下筋膜、肌肉，暴露棘突和椎板，暴露脊髓硬脊膜。将大鼠固定于JK052型打击器下方，采用10g打击棒从5cm自由落体撞击T10胸髓，制备脊髓损伤模型。造模后2h，将造模成功大鼠分为4组，每组入组统计10只。另设置假手术组统计10只。受试药组灌胃给药实施例10的氨丁三醇盐，剂量分别为5、20mg/kg，每天1次，连续28d。阳性对照组(注射用甲泼尼松琥珀酸钠)尾静脉给予注射用甲泼尼松琥珀酸钠1次，剂量为180mg/kg。假手术组、模型对照组灌胃给予等体积0.5%CMC。分组给药见下表24。

[0197] 表24化合物治疗大鼠脊髓损伤(SCI)研究分组给药方式

分组	n	剂量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药周期 (d)	给药方式/频率
假手术组	10	-	10 mL/kg	28 d	ig/ qd
模型对照组	10	-	10 mL/kg	28 d	ig/ qd
受试药组低剂量	10	5	10 mL/kg	28 d	ig/ qd
受试药组高剂量	10	20	10 mL/kg	28 d	ig/ qd
阳性对照组(注射用 甲泼尼松琥珀酸钠)	10	180	10 mL/kg	1 d	iv/ qd

- [0198] 1)对BBB评分的影响
- [0199] 大鼠脊髓损伤出现明显神经功能障碍，在不同时间点进行BBB评分，评分方法如下：
- [0200] 大鼠BBB评分标准

评分标准	0分：无可见后肢运动 1分：一或两个关节轻微运动，通常为髋和/或膝关节 2分：一个关节广泛活动或一个关节广后动且有另一关节轻微活动 3分：两个关节广泛活动. 4分：后肢全部三个关节可轻微活动 5分：两个关节轻微活动，第三个关节可广泛活动 6分：两个关节广泛活动，第三个关节可轻微活动 7分：后肢全部三个关节可广泛活动 8分：非承重情况下可以爪掌面着地 9分：间或爪掌面承重支撑或爪背面承重移动，无爪掌面支撑移动 10分：偶见爪掌面承重移动；无前后肢协调动作 11分：可较多的见到掌面承重移动，但无前后肢协调动作 12分：可较多的见到掌面承重移动，偶见前后肢协调动作 13分：常见掌面承重移动，可常见前后肢协调动作 14分：有持续性掌面承重移动和前后肢协调动作；或出现常见的掌面移动，持续型前后肢协调动作，偶有爪背侧移动 15分：持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作，前肢前进过程中无或偶有抓地；初接触时主动爪位置与身体平行 16分：步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作，前肢前进过程中常见爪抓地；初接触时主动爪位置与身体平行，负重转移后旋转
	17分：步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作，前肢前进过程中常见爪抓地；初接触时和负重转移后主动爪位置均与身体平行 18分：步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作，前肢前进过程中可持续性爪抓地；初接触时主动爪位置均与身体平行，负重转移后旋转 19分：步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作，前肢前进过程中可持续性爪抓地；初接触时和负重转移后主动爪位置均与身体平行尾巴有时或总是下垂 20分：持续性掌面移动，持续性协调步态，足趾持续抓地，初接触时和负重转移后主动爪位置均与身体平行,躯干不稳定，尾巴持续翘起 21分：持续性掌面移动，持续性协调步态，足趾持续抓地，活动过程中主动爪位置始终与身体平行，躯干持续稳定，尾巴持续翘起

[0201] 随造模后时间的延长，BBB评分稍有恢复；受试化合物实施例10的氨丁三醇盐20mg/kg给药后7d～28d，可明显改善BBB评分(P<0.05～0.01)。阳性对照(注射用甲泼尼松琥珀酸钠)给药后14d～28d，对BBB评分亦有改善作用(P<0.05)。结果见表25。

[0202] 表25化合物实施例10的氨丁三醇盐对BBB评分(分)的影响(mean±SD)

组别	n	剂量 (mg/kg)	药前	药后3 d	药后7 d	药后14 d	药后28 d
假手术组	10	-	21±0	21±0	21±0	21±0	21±0
模型对照	10	-	0±0 ^{###}	0±0 ^{###}	1.4±1.2 ^{###}	2.3±1.8 ^{###}	4.7±3.0 ^{###}
实施例10的氨丁三醇盐低剂量组(5mg/kg)	10	5	0±0	0.1±0.3	1.4±2.1	2.2±3.5	4.8±3.8
实施例10的氨丁三醇盐高剂量组(20mg/kg)	10	20	0±0	0.4±0.7	3.8±2.1 ^{**}	6.7±4.9 [*]	9.3±4.1 [*]
阳性对照组(注射用甲泼尼松琥珀酸钠)	10	180	0±0	0.1±0.3	2.8±1.9	5.7±4.5 [*]	7.9±3.4 [*]

[0203] 注：1.与假手术组比较，^{###}P<0.001；与模型对照组比较：^{*}P<0.05，^{**}P<0.01.

[0204] 2)对病理改变的影响

[0205] 假手术组脊髓组织结构致密，膜被结构完整，脊髓灰质、白质结构清晰，界限明显；神经元、胶质细胞轮廓清晰，神经纤维连续性好，神经细胞排列整齐。

[0206] 与假手术组比，模型对照组脊髓组织被严重破坏，脊髓一侧可见明显缺损，组织排列疏松紊乱伴炎性细胞浸润及显著的神经元空泡化及变性。低剂量组与模型对照组未见明显差异。受试化合物实施例10的氨丁三醇盐20mg/kg剂量组超半数(4/6例)出现病变减轻。阳性药物组(注射用甲泼尼松琥珀酸钠)部分(3/6例)出现病变减轻。结果见图9。

[0207] 3)对NF200表达的影响

[0208] NF200是神经纤维的标记物。与假手术组比较，大鼠脊髓损伤后，NF200表达稍有增加(P<0.01)。与模型对照组比较，受试药实施例10的氨丁三醇盐20mg/kg可使NF200表达明显增加(P<0.01)。阳性对照(注射用甲泼尼松琥珀酸钠)给药后NF200无明显改变(P>0.05)。结果见表26、图10。

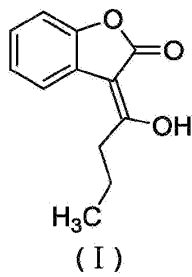
[0209] 表26实施例10的氨丁三醇盐对NF200表达的影响(mean±SD，n=6)

组别	剂量 (mg/kg)	阳性数量 (个/视野)
假手术组	-	4.1±4.8
模型对照组	-	15.8±5.8 ^{##}
实施例10的氨丁三醇盐低剂量组	5	22.5±7.5
实施例10的氨丁三醇盐高剂量组	20	30.3±7.4 ^{**}
阳性对照组(注射用甲泼尼龙琥珀酸钠)	180	22.2±6.3

- [0210] 注：1.与假手术组比较，^{##}P<0.01；与模型对照组比较：^{**}P<0.01.
- [0211] 4)对受损脊髓的转录组学分析
- [0212] 为了进一步验证实施例10的氨丁三醇盐对受损脊髓的保护或促再生作用，从受损位点上下游各1cm处截取组织，进行转录组学分析，GSEA分析显示实施例10的氨丁三醇盐可显著上调轴突再生和突触相关基因，并显著下调细胞外基质和炎症相关基因的表达(见图11)。

权利要求书

[权利要求 1] 式(I)化合物的可药用盐



所述可药用盐选自钠盐、钾盐、镁盐、钙盐、哌嗪盐、乙醇胺盐、葡甲胺盐、氨丁三醇盐；
或者所述可药用盐选自前述盐的一水合物、二水合物、三水合物或半水合物。

[权利要求 2] 根据权利要求1的化合物的可药用盐，其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮钠盐。

[权利要求 3] 根据权利要求1的化合物的可药用盐，其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮钠一水合物。

[权利要求 4] 根据权利要求1的化合物的可药用盐，其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮钾盐。

[权利要求 5] 根据权利要求1的化合物的可药用盐，其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮镁盐。

[权利要求 6] 根据权利要求1的化合物的可药用盐，其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮钙盐。

[权利要求 7] 根据权利要求1的化合物的可药用盐，其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮哌嗪盐。

[权利要求 8] 根据权利要求1的化合物的可药用盐，其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮乙醇胺盐。

[权利要求 9] 根据权利要求1的化合物的可药用盐，其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮葡甲胺盐。

- [权利要求 10] 根据权利要求1的化合物的可药用盐，其为(Z)-3-(1-羟基丁烯基)苯并呋喃-2-酮氨丁三醇盐。
- [权利要求 11] 制备权利要求1-10任一项所述式(I)所示化合物的可药用盐的方法，包括如下步骤：式(I)所示化合物与碱成盐的步骤。
- [权利要求 12] 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，所述成盐的反应所用溶剂选自甲醇、乙醇、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙酸正丁酯、乙腈、异丙醇、丙酮、异丙醇、四氢呋喃、甲基异丁基酮、正庚烷、二氯甲烷、甲苯、异丙醚、甲基叔丁基醚、正丁醇、水中的至少一种。
- [权利要求 13] 药物组合物，其包含权利要求1-10任一项式(I)化合物的可药用盐与一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。
- [权利要求 14] 权利要求1-10任一项式(I)化合物的可药用盐或权利要求13所述的药物组合物在用于制备治疗和/或预防缺血性脑损伤相关疾病药物中的应用，优选的，所述的缺血性脑损伤相关疾病包括但不限于脑缺血、缺血性脑卒中、血管性痴呆、脑缺血后炎症、惊厥、缺血性脑神经元损伤或坏死。
- [权利要求 15] 权利要求1-10任一项式(I)化合物的可药用盐或权利要求13所述的药物组合物在用于制备治疗和/或预防神经肌肉疾病药物中的应用，优选的，所述的神经肌肉疾病为肌萎缩侧索硬化症
- [权利要求 16] 权利要求1-10任一项式(I)化合物的可药用盐或权利要求13所述的药物组合物在用于制备治疗和/或预防神经功能受损相关疾病药物中的应用，优选的，所述的神经功能受损相关疾病包括但不限于脊髓损伤或坏死。
- [权利要求 17] 权利要求1-10任一项式(I)化合物的可药用盐或权利要求13所述的药物组合物在用于制备治疗和/或预防神经退行性疾病药物中的应用，优选的，所述的神经退行性疾病包括但不限于帕金森病。