

[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 200480034356.1

[51] Int. Cl.

A61K 31/445 (2006.01)

A61P 27/04 (2006.01)

A61P 27/08 (2006.01)

A61P 27/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年11月11日

[11] 授权公告号 CN 100558360C

[22] 申请日 2004.11.22

[21] 申请号 200480034356.1

[30] 优先权

[32] 2003.11.20 [33] US [31] 60/523,802

[86] 国际申请 PCT/US2004/039719 2004.11.22

[87] 国际公布 WO2005/051328 英 2005.6.9

[85] 进入国家阶段日期 2006.5.22

[73] 专利权人 奥特拉控股公司

地址 美国特拉华州

[72] 发明人 威廉·L·马蒂尔

甘希亚姆·帕蒂尔

[56] 参考文献

US6001853A 1999.12.14

审查员 陈晏晏

[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 3 页 说明书 23 页 附图 2 页

[54] 发明名称

羟胺组合物在制备缓解黄斑变性和其他眼科疾病的药物中的用途

[57] 摘要

本发明公开了治疗或预防大量眼睛疾病或病症的方法。特别是，公开了缓解眼睛的黄斑变性、糖尿病视网膜病变和其他视网膜病变、以及眼葡萄膜炎、老花眼、干眼、青光眼、睑炎和红斑痤疮的方法。本方法包括一种施用含有眼科可接受载体或稀释剂和足以预防、延缓一种或多种眼科疾病的发展或减轻其症状的治疗量的羟胺化合物的组合物。

1. 由眼科受体或稀释液和至少一种羟胺化合物组成的组合物在制备用于改善、延缓或预防病人眼睛的一种疾病或紊乱的发展，或减轻其症状的药物中的应用，其中的疾病或紊乱是黄斑病变、视网膜病、角膜疾病、眼睑疾病、远视眼、青光眼或眼色素层炎。

2. 权利要求 1 的应用，其中的疾病或紊乱是年龄相关性黄斑病变。

3. 权利要求 1 的应用，其中的疾病或紊乱是视网膜病，且视网膜病分为脉络膜新生血管膜、黄斑水肿、视网膜前膜或黄斑裂孔。

4. 权利要求 1 的应用，其中的疾病或紊乱是眼色素层炎，且眼色素层炎分为前面的、中间的、后面的、或扩散的眼色素层炎。

5. 权利要求 1 的应用，其中的疾病或紊乱是青光眼，且青光眼分为高眼压性（IOP）或正常眼压性青光眼。

6. 权利要求 1 的应用，其中的疾病或紊乱是睑炎或眼睛的红斑痤疮。

7. 权利要求 1 的应用，其中的疾病或紊乱是远视眼。

8. 权利要求 1 的应用，其中的疾病或紊乱是角膜疾病。

9. 权利要求 1 的应用，其中的疾病或紊乱是干眼。

10. 权利要求 1 的应用，其中的羟胺化合物是 tempol-H, tempo-H 或 oxano-H。

11. 权利要求 1 的应用, 进一步包括与一种还原剂组合使用。
12. 权利要求 11 的应用, 其中的还原剂连同组合物施用。
13. 权利要求 12 的应用, 其中的还原剂被配制成组合物的组成部分。
14. 权利要求 11 的应用, 其中的还原剂与组合物分开施用。
15. 权利要求 11 的应用中的还原剂是巯基化合物。
16. 权利要求 11 的应用, 其中的还原剂是巯基丙酰基甘氨酸、N-乙酰基半胱氨酸、 β -巯基乙胺或谷胱甘肽。
17. 权利要求 1 的应用, 其中的组合物通过注射施用。
18. 权利要求 1 的应用, 其中的组合物从放置于眼睛表面上的一个聚合圆板或圆片施用。
19. 权利要求 1 的应用, 其中的组合物通过套管或植入病人身体的装置施用于眼睛内或眼睛附近, 或通过离子电渗疗法装置施用于眼睛表面。
20. 权利要求 1 的应用, 其中的组合物以眼滴剂、眼洗涤剂或眼药膏施用。
21. 权利要求 10 的应用, 其中所述羟胺化合物以约 0.1 μM 到 10 mM 的浓度存在。
22. 权利要求 10 的应用, 其中所述羟胺化合物以约 1.0 μM 到 5 mM

的浓度存在。

23. 权利要求 10 的应用，其中所述羟胺化合物以约 10 μM 到 2.5 mM 的浓度存在。

24. 权利要求 10 的应用，其中所述羟胺化合物以约 50 μM 到 1 mM 的浓度存在。

25. 权利要求 10 的应用，其中所述羟胺化合物以约 100 μM 到 1 mM 的浓度存在。

26. 一种由眼科受体或稀释液和一种羟胺化合物组成的组合物在制备用于保护视网膜色素上皮细胞免受光氧化损伤的药物中的应用。

27. 权利要求 26 的应用，其中的羟胺化合物是 tempol-H、tempo-H 或 oxano-H。

28. 权利要求 26 的应用，进一步包括与一种还原剂组合使用。

29. 权利要求 28 的应用，其中的还原剂是巯基化合物。

30. 权利要求 28 的应用，其中的还原剂是巯基丙酰基甘氨酸、N-乙酰基半胱氨酸、 β -巯基乙胺或谷胱甘肽。

羟胺组合物在制备缓解黄斑变性和其他眼科疾病的药物中的用途

相关申请的交叉引用

本申请要求 2003 年 11 月 20 日提交的美国临时申请 60/523,802 的优先权，其全部内容在此引入作为参考。

发明领域

本发明涉及眼科疾病的治疗。更具体的是，本发明提供了通过包含羟胺化化合物的药物制剂的施用，减轻或预防黄斑变性和其他视网膜和周围组织的有害疾病的方法。

发明背景

在此引用了多种专利和其他文献。每个这些专利和文献的内容在此整体引入作为参考。

作为身体的一个复杂而敏感的器官，眼睛会患多种疾病和其他影响其发挥正常功能的有害疾病。很多这种疾病可以存在于眼睛内部，并且大部分尤其是存在于在眼睛的后面，那里存在着视神经和视网膜、七层交替细胞和将光信号转换为神经信号的过程。视神经和视网膜的疾病和变性病症是全世界导致失明的最主要的原因。

明显的视网膜退行性疾病是黄斑变性，也称为老化相关性黄斑变性(AMD)。在 50 岁或更年长的美国人中，AMD 是视力丧失的最常见原因，且其随年龄的增加而愈加普遍。AMD 可分为湿性的(新血管性的)(neovascular)或干性的(非新血管性的)。最为常见的是该疾病的干性形式。当中心视网膜变得扭曲、具色素或最常见地变薄时，该疾病发生。黄斑变性的湿性形式引起最严重的视力丧失。黄斑变性的湿性形式通常与年龄老化相关，但能引起湿性黄斑变性的其它疾病包括严重

的近视以及某些类似组织胞浆菌病的眼内感染，其可在患有 AIDS 的个体中加重。包括遗传构成、年龄、营养、吸烟和暴露于阳光与否的多种因素都可能导致黄斑变性。

与糖尿病相关的视网膜病变是 1 型糖尿病失明的首要原因，在 2 型糖尿病中也很常见。视网膜病变的程度与患糖尿病的持续时间相关，通常开始于糖尿病发病之后的 10 年或更长时间。糖尿病的视网膜病变可分为(1)非增殖性或背景视网膜病变，其特征在于毛细血管渗透性、水肿、出血、小动脉瘤、以及渗出物的增加，或(2)增殖性视网膜病变，其特征在于从视网膜向玻璃体延伸新血管、瘢痕化、纤维组织形成、以及视网膜脱落的潜在可能。一般认为，糖尿病的视网膜病变至少部分由高血糖导致的糖基化蛋白的发展引起的。糖基化蛋白产生自由基，导致了氧化性组织损伤和诸如谷胱甘肽的细胞活性氧(ROS)清除剂的耗尽。

几种其它较不常见但仍然使人衰弱的视网膜病变包括脉络膜新血管膜(CNVM)，黄斑囊样水肿(CME，也称作黄斑水肿或黄斑水肿)，视网膜外膜(ERM)(黄斑皱褶)和黄斑裂孔。在 CNVM 中，起源于脉络膜的异常血管滋长穿过了视网膜层。所述脆弱的新血管很容易破裂，从而引起血液或体液在视网膜层内聚集。在 CME 中，可作为疾病、损伤或手术的后果发生，在黄斑层内聚集体液，可以引起中心视觉的模糊、扭曲。ERM (黄斑皱褶)是在黄斑上形成的赛璐玢样膜，其通过引起混浊和扭曲影响中心视觉。随着其逐渐发展，在所述黄斑上的膜的收缩可引起肿胀。ERM 在 75 岁以上的人群中最为常见。其病因学是未知的，但可能与糖尿病的视网膜病变、玻璃体后部脱落、视网膜脱离或创伤以及其它病症相关。

另一种眼睛内部的疾病是眼葡萄膜炎，或葡萄膜的炎症。葡萄膜(色素层)由虹膜、睫状体和脉络膜组成。葡萄膜是眼球的三层包层的中间层，位于其后部(脉络膜)部分的巩膜和视网膜之间。眼葡萄膜炎可由

创伤、感染或手术引起，并可感染任意年龄的人群。眼葡萄膜炎可解剖学地分为前部的、中部的、后部的或扩散的。前部的眼葡萄膜炎感染眼睛的前部分，包括虹膜。中部的眼葡萄膜炎，也称为外周眼葡萄膜炎位于紧接睫状体区域的虹膜和晶状体后面的区域中部。后部的眼葡萄膜炎也引起某种形式的视网膜炎，或可影响脉络膜或视神经。扩散的眼葡萄膜炎涉及眼睛的所有部分。

青光眼是通过由视神经损伤引起的视觉丧失的一系列眼部疾病的组合。由于不充分的眼部导液引起的较高的眼内压(IOP)是青光眼的主要原因。青光眼可随眼睛年龄的老化而发展，或可作为眼睛损伤、炎症、肿瘤或白内障或糖尿病的老年病例的结果发生。其还可由诸如类固醇的某些药物引起。此外，青光眼在不存在 IOP 升高的情况下也会发展。这种形式的青光眼与日裔祖先的遗传（即正常压力青光眼的家族史），以及诸如心律不齐的系统性心脏病有关。

眼睛每天约产生一茶匙房水。通常情况下，这样的液体通过称为小梁网的海绵状结缔组织网、以其被产生出来的相同速率从眼睛中释放出来。在一段时期之内，自由基和别的活性氧(ROS)能够引起对于小梁网的逐渐的损伤。其结果是小梁网变得部分封阻，外流能力下降，且当更多房水形成时 IOP 升高。尽管一开始所述 IOP 并未升高至足以引起任何值得注意的症状，但当压力维持在较高水平或继续升高时，视神经中的纤维被压缩或破坏，导致了在若干年后的视觉逐渐丧失。Izzotti 等人提供了在外流系统的微小但关键的组织结构中将氧化性 DNA 损伤和青光眼相联系的确凿证据(Izzotti A, Sacca SC, Cartiglia C, De Flora S., 青光眼患者眼睛中的氧化性脱氧核糖核酸损伤(Oxidative deoxyribonucleic damage in the eyes of glaucoma patients). Am J Med. 2003; 114)。他们在青光眼患者的小梁网组织中观察到了 8-氧-脱氧鸟苷(8-OH-dG)的量升高超过三倍。所述升高的氧化性 DNA 损伤还与诸如眼内压指数的临床参数和视野丧失相关。

青光眼中视神经病变的主要特征包括视神经乳头的特征性改变、存活视网膜神经节细胞数目的下降以及视觉丧失。一般认为级联事件将视神经乳头的变性与该疾病中可观察到的视网膜神经节细胞的慢性死亡相联系，且该级联事件可通过神经保护剂的使用而得以延缓或预防(Osborne 等人, 2003, *Eur. J. Ophthalmol.* 13(Supp 3):S19-S26)，其中抗氧化剂和自由基清除剂是重要的一族(Hartwick, 2001, *Optometry and Vision Science* : 85-94)。

眼睛的一个没那么严重但是更加普遍的疾病是老花眼，其影响眼睛的晶状体。晶状体被认为给其予弹性的坚硬的胶原质囊包裹，使其能够通过睫状体肌控制的曲率变化在不同的距离聚焦。随着晶状体老化，其体积增加且因而弹性逐渐降低，减少了个体聚焦于邻近目标的能力。

眼睛的最外层，即角膜，控制和集中眼睛光线的进入。角膜必须保持对折射光线的适当的透光。角膜也有助于保护眼睛的其余部分免受微生物、灰尘、和其他有害物质的侵害，并且值得注意的是，它充当一个过滤器，筛选出太阳光中一些最具破坏性的紫外（UV）波长。如果没有这种保护，晶状体和视网膜将对 UV 辐射的伤害高度敏感。

角膜和周围的结膜也可经常遭受损害视力的多种有害病症。其包括诸如由过敏反应、感染或创伤引起的炎症反应，和以多种营养不良(由于混浊物质的积累导致的角膜的一个或多个部分丧失其正常的透明度)，例如富克斯(氏)营养不良、圆锥角膜、角膜网络状营养不良和 map-dot-fingerprint 营养不良来命名的少数几种和其它的病症(例如，干眼综合征)。

在干眼中，眼睛表面和泪腺炎症已被证实在称为干性角结膜炎的眼睛表面上皮细胞疾病中具有病理学的作用。氧化性组织损伤和表现氧化性潜能的多型核白细胞可在患有干眼的患者的泪液膜中出现。这

些反应导致了所涉及组织的严重损伤。自由基和炎症可参与所述疾病的病理学或自我蔓延(Augustin, A. J. 等人, 在患干眼患者泪液中的氧化反应, "Oxidative reactions in the tear fluid of patients suffering from dry eyes" Graefe's Arch. 1995, 11 : 694-698)。

视网膜光毒性是由于通过位于颞部入路眼科手术的操作显微镜或由军用激光将眼睛暴露于视网膜照度引起的。这些光源具有对小凹(fovea)造成光诱导损伤的潜能(M. A. Pavilack 和 R. D. Brod, 在颞部入路眼科手术过程中对人视网膜的光诱导光毒性的显微镜操作的潜在位点, "Site of Potential Operating Microscope Light-induced Phototoxicity on the Human retina during Temporal Approach Eye Surgery" Ophthalmol. 2001,108 (2): 381-385; H. F. McDonald 和 M. J. , 在睫状环玻璃体切割术中显微镜诱导的视网膜光毒性, "microscope-induced retinal phototoxicity during pars plana vitrectomy" Arch. Ophthalmol. 106: 521-523; Harris M. D.等人, 军事岗位中的眼睛损伤 "eye injuries in military occupations" Aviat. Space Environ. Med. 2003,74 (9): 947-952)。损伤还可以发生在准分子激光光疗后脱落的角膜表面的治疗后(Seiji Hayashi 等人, , 准分子激光治疗后氧自由基对角膜的损伤, "Oxygen free radical damage in the cornea after excimer laser therapy" J. Ophthalmol. 1997, 81 : 141-144)。

某些角膜病症是不可修正的, 且仅可通过角膜移植进行治愈, 而其它病症则可通过光性治疗性角膜切除术(PTK), 即准分子激光手术得以修正, 其过程已知会引起炎症反应, 引起角膜混浊或角膜区域混浊。

眼睛周围的皮肤也经常患疾病和病症。尤其是, 眼睑的红斑痤疮和睑炎都是较严重的病症。眼红斑痤疮是一种常见的、具有不确定病因的潜在致盲病症(Stone D. U. and J. Chodosh, 2004 Curr. Opin. Ophthalmol. 15 (6): 499-502)。眼部的睑炎可以是葡萄球菌性的睑炎、皮脂溢性睑炎, 这些炎症的混合形式, 或者是最严重的形式、溃疡性

的脸炎。

在多种眼科疾病或病症的发展和加速中都涉及到了氧化胁迫，包括上述 AMD 和多种视网膜病变(参见，例如 Ambati 等人，2003, *Survey of Ophthalmology* 48: 257-293; Berra 等人，2002, *Arch. Gerontol. Geriatrics* 34: 371-377)，和眼葡萄膜炎(例如 Zamir 等人，1999, *Free Rad. Biol. Med.* 27: 7-15)，白内障(例如，M. Lou, 2003, *Prog. Retinal & Eye Res.* 657-682)，青光眼(例如，Babizhayev 和 Bunin, 2002, *Curr. Op. Ophthalmol.* 13: 61-67)，角膜和结膜炎，多种角膜营养不良，手术后或 UV 相关的角膜损伤(例如，Cejkova 等人，2001, *Histol. Histopathol.* 16 : 523-533; Kasetsuwan 等人，1999, *Arch. Ophthalmol.* 117: 649-652) 和老花眼 (Moffat 等人，1999, *Exp. Eye Res.* 69: 663-669)。出于这个原因，对具有抗氧化性的药剂进行了研究以作为治疗这些病症的潜在治疗剂。已有众多研究致力于对细胞中产生还原力的生化途径，例如谷胱甘肽合成和循环。已经对能还原活化氧诸如超氧化物歧化酶的酶类进行了研究，从而确定其是否能够降低细胞的氧化胁迫。通过直接的自由基清除在细胞膜中抑制脂类氧化的化合物也可被考虑成为可能的治疗介入。

硝基氧是稳定的游离自由基，其可还原为相应的羟胺。这些化合物由于其清除自由基的特性而引起人们的兴趣，模拟了过氧化物歧化酶的活性，在氧化损伤和炎症的多种动物模型中发挥抗炎效果。Nilsson 等在 WO 88/05044 中公开了硝基氧及其相应的羟胺在局部缺血的细胞损伤的预防和治疗中是有效的。Paolini 等(美国专利 5,981, 548)公开了 N-羟基哌啶化合物及其在由氧自由基引起的病状的治疗中、以及作为食品和化妆品添加剂的潜在的普遍用途。Hsia 等(美国专利 6,458,758, 5,840,701, 5,824,781, 5,817,632, 5,807,831, 5,804,561, 5,767,089, 5,741,893, 5,725,839 和 5,591,710) 公开了稳定的硝基氧和羟胺(例如，tempol 及其羟胺对应物 tempol-H) 在与多种生物相容性高分子结合以缓解血液和血液成分中的自由基毒性的用途。Hahn 等(1998, *Int. J.*

Radiat. Oncol. Biol. Physics 42: 839-842; 2000, Free Rad. Biol. Med. 28: 953-958) 报道了稳定的自由基硝基氧及某些羟胺对应物的体内辐射防护作用和对血压的影响。

在眼睛疾病中, Zamir 等 (1999, *supra*) 报道了在大鼠模型中系统注射之后, 硝基氧-4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-N-氧基(TPL 或 tempol) 减轻了视网膜的 S-抗原诱导的实验性自身免疫性眼色素视网膜炎 (EAU) 的严重程度。Reddan 等 (1993, *Exp. Eye Res.* 56: 543-554) 报道了对硝基氧 tempol 在体外对保护晶状体上皮细胞免受过氧化氢损伤的用途的研究。Mitchell 等 (美国专利 5,462,946) 也公开了硝基氧 (例如 tempol) 在保护晶状体上皮细胞免受氧化损伤的用途。虽然 Mitchell 等也报道了相应的羟胺 tempol-H 并不提供这样的保护 (Mitchell 等, 1991, *Arch. Biochem. Biophys.* 289: 62-70; Krishna 等, 1991, *Cancer Research* 51: 6622-6628), Zigler 等 (美国专利 6,001,853) 的报道相反, 公开了羟胺与相应的硝基氧相比是更好的 anti-cataractogenic 组合物。

由于毒性较低, 羟胺与硝基氧相比是优选的治疗药剂。然而, 除了眼睛晶状体的高度还原环境 (M. Lou, 2003, *supra*), 尚未有羟胺组合物在眼睛疾病或病症治疗上的用途的报道。因此, 对于 AMD 与视网膜和眼睛内部许多其他疾病和病症, 以及其他的眼部疾病的安全且临床上有效的非手术治疗, 仍然存在保持了大量却未能解决的需求。

发明概述

根据本发明的一个方面, 提供了缓解、延缓或预防患者眼睛的一种疾病或病症的发展, 或减轻其症状的一种方法, 其中的疾病或病症是黄斑变性、视网膜病变青光眼和眼葡萄膜炎、黄斑囊样水肿、以及角膜、眼睑和结膜的某些疾病, 其包括但不限于炎症、创伤、通过暴露于操作显微镜诱导的视网膜光毒性、激光眼睛创伤、受激准分子激光器光疗后角膜脱落表面的处理; 老花眼、辐射损伤、角膜的新血管化和多种营养不良如 Fuch 营养不良、圆锥形角膜、晶格营养不良和

map-dot-fingerprint 营养不良，眼睛的脸炎和红斑痤疮、以及干眼综合症。在一些眼外的实施方案中，化合物和组合物可用于治疗秃头症和预防/治疗由化疗引起的直肠组织的损伤。对于眼睛治疗，本方法包括对患者眼睛施用包括眼科可接受的载体或稀释剂和足以缓解、延缓或预防疾病或病症的发展，或减轻其症状的治疗量的羟胺化合物的组合物。对于眼外的治疗，本方法包括对患者的受感染区域施用包括眼科可接受的载体或稀释剂和足以缓解、延缓或预防疾病或病症的发展，或减轻其症状的治疗量的羟胺化合物的组合物。

在一个实施方案中，疾病或病症是老化相关性黄斑变性。在另一个实施方案中，疾病或病症是视网膜病变，且视网膜病变分为脉络膜新血管膜、黄斑水肿、视网膜外膜或黄斑裂孔。在另一个实施方案中，疾病或病症是眼葡萄膜炎，且眼葡萄膜炎分为前部的、中部的、后部的或扩散的眼葡萄膜炎。在另一个实施方案中，疾病或病症是青光眼，且青光眼分为高眼压（IOP）或正常眼压青光眼。在另一个实施方案中，疾病或病症是关于角膜、眼睑或结膜的，尤其是涉及与炎症、创伤、UV 辐射或老化关联的氧化损伤。

在某些实施方案中，组合物包含至少一种羟胺化合物，其是 tempol-H, tempo-H 或 oxano-H。在一个典型的实施方案中，羟胺是 tempol-H。

在某些实施方案中，本方法进一步包括对患者的眼睛施用一种还原剂。还原剂可以与组合物共施用，或者可以分开施用。还原剂优选巯基化合物。

在上述的方法中，组合物可以通过多种途径施用。实例包括通过注射施用、从放置于眼睛表面上的一个聚合物圆板或圆片（例如，接触透镜）施用、通过插管或从植入患者身体或在眼睛内或眼睛附近的装置施用、或者通过眼药水、洗眼液或眼用软膏施用。

本发明的组合物可包含本发明的一种以上的化合物。而且，所述组合物可包含本领域已知的另一种化合物，与本发明的化合物结合，用于一种特定适应症的治疗。在一些实施方案中，本发明的多种化合物同时地施用。在另一些实施方案中，本发明的多种化合物顺序地施用。同样地，用于治疗这里描述的疾病和病症的本领域已知的其他化合物可与本发明的化合物同时地或顺序地施用。本发明也提供使用这样的组合治疗来治疗疾病和病症的方法。

本发明的其他特征和优点可通过参考以下的详细描述和实施例得以理解。

附图说明

图 1 显示不同浓度的 Tempol-H 保护蓝光照射的充满 A2E 的 RPE 细胞。

图 2 显示 1 mM Tempol-H 对蓝光辐射的充满 A2E 的 RPE 细胞的保护效果。

示例性实施方案的详细描述

本发明提供了对目前的药理学疗法稀缺或者完全缺乏的许多眼睛疾病或病症的治疗或预防的方法。特别是，提供了缓解黄斑变性、糖尿病性视网膜病变和其他视网膜病变，包括但不限于脉络膜新血管膜（CNVM）、黄斑水肿、视网膜外膜（ERM）（黄斑皱褶）和黄斑裂孔，以及青光眼、眼葡萄膜炎、和角膜（和眼睑周围和结膜）疾病，包括但不限于炎症、创伤、辐射损伤、角膜新血管化和多种营养不良如 Fuch 营养不良、圆锥形角膜、晶格营养不良和 map-dot-fingerprint 营养不良，以及干眼综合症、眼睛的睑炎和红斑痤疮。也提供减轻、预防或缓解对视网膜的色素上皮细胞的光氧化损伤，其与黄斑变性的发展有关，并用于缓解眼睛的激光手术包括青光眼的 trabeculectomy 治疗和角膜再成形的角膜切除术期间的疼痛和炎症的方法。本方法包括

施用包括眼科可接受的载体或稀释剂和一种足以预防、延缓上面列出的一种或多种眼科疾病的发展，或减轻其症状的治疗量的羟胺化合物的组合物。

如提及的一样，Zigler 等的美国专利 6,001,853 公开了羟胺，优选与还原剂组和，在抑制眼睛的晶状体白内障发展的用途。然而，清澈透明的晶状体拥有几个独特的特征，使其保持透明度以便光线可以透过并聚焦于视网膜上。这包括（1）高含量的还原的谷胱甘肽（GSH），（2）不寻常的高蛋白含量（其湿重的 35-50%）和，重要的（3）多种抗氧化剂和氧化防卫酶（M. Lou, 2003, *supra*）。存在于晶状体内的独特的条件可解释为什么羟胺化合物被发现对于预防白内障有效。但是因为那些条件不会在眼睛的别处复制，羟胺在眼睛的晶状体中作为抗-cataractogenics 的功效并未提供这类化合物在 AMD、视网膜病变、眼睛任何部分的炎症疾病、神经病、或晶状体以外的任何其他疾病或病症的缓解上有任何功效的预测。此外，Zigler 等人的羟胺是晶状体内的抗-cataractogenic 的报道并未陈述晶状体内的其他疾病，例如老花眼。

本发明者鉴定了眼睛内部和后面及晶状体外其他组织（例如角膜）的疾病或病症也可通过羟胺化合物如 tempol-H 的施用而得到缓解或预防。这些鉴定是通过利用黄斑变性和其他视网膜疾病的动物模型建立的，其方案被列举在实施例中。

在本发明中适用的羟胺化合物的优选实例是 tempol-H（硝基氧 4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-基氧的羟胺还原形式），tempo-H（硝基氧 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-基氧的羟胺还原的形式）和 oxano-H（2-乙基-2,4,4-三甲基恶唑烷，其是 oxano，2-乙基-2,4,4-三甲基恶唑烷-3-基氧的还原形式）。本发明中适用的其他羟胺化合物包括但并不限于由 Hahn 等(1998, *supra* ; 2000, *supra*)、Samuni 等 (2001, *supra*)公开的那些羟胺化合物；和 Paolini 等的美国专利 5,981,548（公开了某些 N-羟基哌啶酯及其作为抗氧化剂在许多方面、而非眼科学中的用途）；Gupta 等的美

国专利 4,404,302（公开了某些 N-羟胺作为光稳定剂在整形外科手术制剂中的用途）；Mitchell 等的美国专利 5,462,946（公开了衍生自取代的恶唑烷的某些硝基氧，用于保护生物体免受氧化胁迫的伤害）；Ramey 等的美国专利 3,936,456（公开了取代的哌嗪 dione 氧基和羟化物，用于聚合体的稳定化）；Behrens 等的美国专利 4,691,015（描述了衍生自阻胺的羟胺及其中某些羟胺在聚烯烃的稳定化中的用途）；和 Hsia 等的几个上述的美国专利中公开的羟胺化合物。大部分上述引用的化合物对于眼睛的施用迄今仍然未知。确实，它们中没有一个已知被用于黄斑变性、视网膜病变、青光眼或眼葡萄膜炎，或角膜、眼睑、或结膜的疾病的治疗。

本发明的方法包括将一个或多个前述的（或其他适合的）羟胺化合物配制成组合物，应用于需要治疗的患者的眼睛。因此，如下面的更加详细的描述一样，这些组合物适合作为注射剂、或作为眼药水或在接触晶体中、嵌入物或类似的物质使用的药物。因此，可以将化合物配制入含有任一需要的稀释剂、盐、pH 改性物质和在药物剂型领域普通技术人员所熟知的类似物质的无菌水中做成剂型，目的是为了获得适宜施用于眼睛的溶液。其可以是血管注射剂、眼药水、嵌入物、接触晶体、凝胶，和可能要求某种不同剂型的其他液体类型。因此包括了适合直接施用于眼睛的所有这些剂型。

本发明的所述组合物还具有根据所使用抗氧化剂的不同范围的抗氧化剂。所述应用还依赖于允许所述药物组合物至少 2 年保存期所需的抗氧化剂量。所述制剂制剂中可包括一种或多种抗氧化剂。某些常用的抗氧化剂具有管理部门所允许的最高水平。同样地，需要给药的抗氧化剂量也应该足够有效而不引起任何不希望的效果。这样的剂量可由内科医生根据需要进行调节，在管理部门所设定的最高水平之内，且处于本领域所属技术人员确定适当和有效的剂量范围之内。合理的范围是约 0.01%-约 0.15%重量体积比的 EDTA，约 0.01%-约 2.0%重量体积的亚硫酸钠，和约 0.01%-约 2.0%重量体积比的偏亚硫酸氢钠。本

领域所属技术人员能够对上述每种物质采用约 0.1%重量体积比的浓度。N-乙酰基半胱氨酸可以约 0.1%-约 5.0%重量体积比的范围存在，约 0.1%-约 10%的羟胺浓度是优选的。抗坏血酸或盐可以约 0.1%-约 5.0%重量体积比的范围存在，约 0.1%-约 10%重量体积比的羟胺浓度是优选的。其它的巯基，如果包括在的话，可以与 N-乙酰基半胱氨酸具有相同的范围。其它示例性的化合物包括巯基丙酰基甘氨酸，N-乙酰基半胱氨酸， β -巯基乙胺，谷胱甘肽和类似的物质，虽然也可以采用其它适于眼科给药的抗氧化剂，例如，抗坏血酸及其盐或亚硫酸盐或偏亚硫酸氢钠。

可采用缓冲剂将眼药水制剂制剂的 pH 保持在约 4.0-约 8.0 的范围中；从而使眼睛的疼痛最小化。在某些实施方案中，所述 pH 优选地被保持在约 3.5-约 6.0，优选为约 4.0-约 5.5。以便确保了大多数羟胺处于其质子化形式以具有最高的水溶性。所述缓冲液可以是 pKa 为约 4.0-约 5.5 的任意弱酸及其共轭碱；例如乙酸/乙酸钠；柠檬酸/柠檬酸钠。羟胺的 pKa 为约 6.0。为了直接的玻璃体内和眼球内注射，制剂应为 pH 7.2-7.5，优选为 pH 7.3-7.4。

本发明的所述化合物还可包括适于眼睛给药的张力剂。其中适合的是氯化钠，其可将本发明的制剂配制成和 0.9%盐水大约等渗的制剂。

在某些实施方案中，可将本发明的所述化合物与增稠剂一起进行配制。示例性的增稠剂有羟乙基纤维素，羟丙基纤维素，甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。所述化合物中的粘度剂可高至约 2.0%重量体积比。优选地，所述粘度剂的存在范围从约 0.2%-约 0.5%重量体积比。聚乙烯吡咯烷酮的优选范围可从约 0.1%-约 2.0%重量体积比。本领域所属技术人员可优选根据食品药品监督管理局(FDA)接受的制定的任意范围。

如果需要的话，本发明所述化合物还可含有添加的共溶剂。适合的共溶剂可包括甘油，聚乙二醇(PEG)，聚山梨醇酯，丙二醇，甘露醇

和聚乙烯醇。所述共溶剂可以约 0.2%-约 0.4%的重量体积比的范围存在。优选地，甘露醇可以约 0.5%-约 4.0%重量体积比的范围配制在本发明的所述化合物中。优选地，聚乙烯醇可以约 0.1%-约 4.0%重量体积比的范围配制在本发明的所述化合物中。本领域所属技术人员可优选根据食品药品监督管理局(FDA)接受的制定的任意范围。

在本发明中可以在特定的范围内使用防腐剂。其中，优选为高至 0.013%重量体积比的苯扎氯铵，高至 0.013%重量体积比的苄索氯铵，高至 0.5%重量体积比的氯丁醇，高至 0.004%重量体积比的乙酸苯基汞或硝酸苯基汞，高至 0.01%重量体积比的硫柳汞，和约 0.01%-约 0.2%重量体积比的对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯。

用于注射的制剂被优选地设计成一次性给药且不含有防腐剂。可注射的溶液应该具有相当于 0.9%氯化钠溶液(摩尔渗透压浓度为 290-300 mOsmoles)的等渗度。这可以通过添加氯化钠或其它如上所列示的共溶剂、或如上所列示的诸如缓冲剂的赋型剂和抗氧化剂来实现。可注射的制剂是无菌的，且在一个实施方案中，是以一次性使用的小管或安瓿提供的。在其它实施方案中，为了进行再组成和随后的注射，可以无菌的、冻干的固体形式提供可注射的产品。

眼睛前房组织浸在房水之中，而视网膜持续暴露于玻璃体。这些液体/凝胶以一种高度还原的氧化还原状态存在，因其包含抗氧化剂化合物和酶。因此，根据本发明配制的眼科组合物优选包含一种还原剂是有利的，或者分开施用还原剂以维持羟胺的还原状态。

优选的还原剂可以是 N-乙酰半胱氨酸、抗坏血酸或盐的形式，和亚硫酸盐钠或偏亚硫酸氢钠，抗坏血酸和/或 N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽尤其适合可注射的溶液。N-乙酰半胱氨酸和抗坏血酸钠的组合可被用于不同的剂型中。金属螯合抗氧化剂，例如 EDTA（乙二胺四乙酸）或可能的 DTPA（二乙烯三胺五乙酸）也可被加入以维持羟胺在眼药水

剂型中的还原状态。

可采用一种或多种本领域公知的递送方式将含有本发明所述化合物的组合物对患者的眼睛进行递送。在优选实施方案中，可以眼药水或洗液的方式将所述组合物对眼睛进行局部递送。在其它实施方案中，可将所述组合物以局部眼用软膏的形式进行施用，其特别适于有效治疗角膜、结膜或周围皮肤的疾病，例如干眼和睑炎。在其它实施方案中，可通过定期的结膜下或眼内注射，或通过诸如 BSS®或 BSS PLUS®(Alcon USA, Fort Worth, 德克萨斯州)的冲洗溶液灌注，或通过使用诸如 BSS®或 BSS PLUS®组合物的羟胺预配制溶液，将所述组合物递送至眼内的多个位置。在一个实施方案中，本发明所述化合物在玻璃体切割术中的应用可有效减轻或预防与玻璃体切割术相关的白内障的发展。

或者，可将所述组合物应用于其它本领域所述技术人员公知的眼科制剂形式，例如预形成或原位形成的凝胶或脂质体，例如在 Herrero-Vanrell 的美国专利 5,718,922 中公开的那样。已采用了向玻璃体中直接注射药物来进行疾病治疗，其中使用微球体或脂质体来缓慢地释放药物(Moritera, T.等人，作为玻璃体中药物传递系统的生物可降解聚合物的微球体，“Microspheres of biodegradable polymers as a drug-delivery system in the vitreous” Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1991 32(6): 1785-90)。

在其它实施方案中，所述组合物可通过接触透镜(例如 Lidofilcon B, Bausch & Lomb CW79 或 DELTACON (Deltafilcon A))或临时滞留在眼睛表面上的其它物体被递送到或透过需要治疗的眼睛的晶状体。例如，美国专利 6,410,045 描述了接触透镜类型的药物递送装置，其包括吸收于所述接触透镜中的浓度为按重量计 0.05%-0.25%的能够递送入眼液的含有药物的多聚水凝胶接触透镜。

在其它实施方案中,可采用诸如胶原角膜防护物(例如, BIO-COR 可溶解的角膜防护物, Summit Technology, Watertown, 马萨诸塞州)的支持物。还可通过来自渗透泵(ALZET®, Alza Copr., Palo Alto, 加利福尼亚州)插管或通过含有所述组合物的定时释放的胶囊(OCCUSENT®)或生物可降解片(OCULEX®, OCUSERT®)的植入, 将所述组合物通过灌注施用进入眼球。这些施用方法的益处在于为眼睛提供了连续的组合物供给。例如, 这有利于羟胺化合物对角膜和水状体的局部递送。

还有几种其它的递送系统也是可取的, 其特别适于向眼睛的内部或后部递送药物组合物。例如, Parel 等人的美国专利 6,154,671 公开了通过离子渗入疗法向眼球进行药剂递送的装置。该装置采用了用于容纳所述活性剂的容器, 其含有至少一种位于角膜周围面向眼睛组织的活性表面电极。所述容器还具有与所述患者部分关闭的眼睑相接触的返回电极。Wong 等人的美国专利 5,869,079 公开了在生物可降解缓释眼科植入物中亲水和疏水实体的组合。此外, Guo 等人的美国专利 6,375,972, Chen 等人的美国专利 5,902,598, Wong 等人的美国专利 6,331,313, Ogura 等人的美国专利 5,707,643, Weiner 等人的美国专利 5,466,233 和 Avery 等人的美国专利 6,251,090 的每一个都描述了可用来递送含有本发明化合物的药物组合物的眼内植入装置和系统。

本领域中已知用于药物递送的眼睛植入装置的许多例子。例如, 美国专利 6,726,918 描述用于治疗炎症介导的眼睛疾病的方法, 包括: 给个体的眼睛玻璃体植入一种生物可降解的植入装置, 包括一种类固醇抗炎剂和一种生物可降解的聚合物, 其中的植入装置将药剂递送到玻璃体, 其量在约 48 小时内足以达到相当于至少约 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 地塞米松的浓度, 且维持相当于至少约 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 地塞米松的浓度至少约三周。

美国专利 6,713,081 描述以控释和缓释方式将治疗药剂递送到眼睛的眼睛植入装置。说明和描述了双重模式和单一模式的药物递送装置。描述了适合结膜下和玻璃体内放置的植入装置。该专利也描述与

眼睛植入装置关联的制作和实施技术。

美国专利 6,251,090 描述了玻璃体内的药物递送装置、方法和植入装置，通过它们仅需一次最初的手术植入装置，可在持续的一段时间将广泛的有益药物包括药物或其他药理学药剂导入玻璃体的空穴。该装置和方法将植入所必须的手术切口最小化，避免将来的或重复的侵害手术或程序。最初药物的补充量可容易地被导入，或者加入药物可依照要求变化或改变。此外，该装置和方法可以控制递送到玻璃体腔的剂量，并允许患者控制递送的时间。该装置被构造成可过滤递送到眼睛的药物，也避免在植入或使用期间损伤或干扰眼睛的其他部分。

美国专利 5,824,072 描述了生物相容的眼睛植入装置，包括用于治疗目的而导入眼睛的脉络膜上层空间或无血管区域的活性剂。药物的施用被控制和维持长时期，然而确保施用位点以外基本上不会达到有效水平。

美国专利 5,773,019 描述了一种持续释放药物递送植入装置，其在其他提到的地方，可被安置到眼睛的外表面或眼睛内部。药物核被聚合体包衣层覆盖，可渗透到低溶解度溶剂，释放速度不限。

美国专利 5,773,021 描述被放置于结膜囊中的生物粘合性眼科嵌入物。该嵌入物通过挤压、热成形、或热压缩一种聚合物基质和待递送的药物进行制备。聚合体基质包括水溶性的生物相容的聚合体，如羟基烷基纤维素、麦芽糖糊精、壳聚糖、改性淀粉或聚乙烯基醇；非水溶性的生物相容聚合体，如烷基纤维素。应用时可使用生物粘合性聚合物如聚乙烯基羧酸型聚合体或某些生物粘合性多糖或其衍生物。所述眼科嵌入物的特征在于目的是延长和控制药物的释放。

美国专利 5,443,505 和 5,766,242 公开了包括用于导入眼睛的脉络膜上层空间或无血管区域的活性剂的植入装置，并描述了将包括氢化

可的松的微胶囊和平板放置到平坦部。

美国专利 5,378,475 描述一种缓释的植入装置，用于嵌入眼睛的玻璃体。该植入装置具有第一层非渗透性包衣，如乙烯基乙酸乙烯酯，包围药物贮存器的大部分但非全部，且具有第二层渗透性包衣，如渗透性的交联的聚乙烯基醇，置于第一层包衣之上，其中第一层包衣不覆盖的药物贮存器，以提供药物可通过其扩散到植入装置之外的部位。

美国专利 5,725,493 描述了一种眼科植入装置，用于在一段时间内给玻璃体腔提供药物。药物贮存器被附着在眼睛的外面，具有一个通道可允许药物进入眼睛的玻璃体腔。

美国专利 5,164,188 公开以胶囊包裹的药剂用于导入眼睛的脉络膜上层，并描述放置包含氢化可的松的微胶囊和 plaques 到平坦部。

美国专利 4,997,652 公开了生物可降解的包括微胶囊药物的眼睛植入装置，并描述了将含有氢化可的松琥珀酸酯的微胶囊植入到眼睛的后面部分。

美国专利 4,014,335 描述一种眼科药物递送装置，放置于巩膜和下眼睑之间的盲管，用于施用药物并作为贮存器。该眼睛装置的特征在于以受控制、持续的施用速度长时间对眼睛施用药物。为达此目的，该眼睛装置包括一个三层的聚合材料薄片，药物装在薄片的中央贮存器区域。药物通过至少一层聚合物薄片从贮存器扩散。

美国专利 4,300,557 教导了一种胶囊，填充有待递送的药理学药物，其作为眼内的植入装置使用。通过在眼睛中切开一个切口，将胶囊嵌入眼睛的玻璃体区域，嵌入胶囊并封闭切口。胶囊在适当的位置保留一段时间，且通过造成第二个眼睛外科切口取出装置。胶囊具有连上的管子，其通过眼睛的表面并从眼睛向外延伸，用于后来的药物

注射。而在玻璃体中，装置未被锚定，可自由地移动。

Zhou 等进一步公开了多重药物的植入装置，包括 5-fluorouridine、去炎松、和用于增生性玻璃体视网膜病变（PVR）眼内处理的人类重组组织血纤维蛋白溶酶原活化剂（Zhou, T, 等 1998, “用于增生性玻璃体视网膜病变眼内处理的复合药物递送植入装置的研发” J. Controlled Release 55:281-295 ）。

配制和施用根据本发明的方法的组合物，使得应用的剂量可有效缓解眼睛内部和后部的氧化胁迫，和/或抑制眼睛的黄斑变性、其他视网膜病变或眼葡萄膜炎的发展。通常，优选的活性量为在剂型中占约 0.1%到约 10.0%的重量体积比。在一些实施方案中，优选的活性药物浓度为 0.25%到约 10.0%的重量体积比。羟胺成分在组织和体液中的浓度优选在约 0.1 μ M 到约 10mM 的范围。在一些实施方案中，范围为 1 μ M 到 5mM，在另一个实施方案中，范围为 10 μ M 到 2.5mM。在另一个实施方案中，范围为约 50 μ M 到 1mM。最优选羟胺浓度范围为 1 到 100 μ M。还原剂在组织和体液中的浓度将为 0.1 μ M 到 5mM，优选的范围为 10 μ M 到 2mM。组合物成分的浓度根据施用途适当地调整，通过典型的药代动力学和稀释法计算，获得这样的局部浓度。

本发明的方法可被应用到眼科学以外更广泛的领域。这些领域可包括，例如保护毛囊和直肠在癌症的放疗期间免受辐射损伤。其它不提倡对眼睛进行递送的施用形式可包括口服药片，液体或喷雾剂；静脉内，皮下和腹膜内注射；以贴片或软膏对皮肤进行的施用；灌肠剂，栓剂或气雾剂。

本发明的组合物可包含一种以上的本发明的化合物。因此本发明的组合物包含至少一种本发明的化合物。在一些实施方案中，本发明的化合物被同时施用。在另外的实施方案中，本发明的化合物被顺序地施用。本发明的方法包括应用这种组合疗法。

在本发明的一些实施方案中，本发明的所述化合物可与本领域中公知的其它化合物一起施用，所述其它化合物可有效地治疗疾病或病症，所述疾病或病症是本发明所述化合物的靶。因此，本发明的所述组合物还包括至少一种本领域中公知的治疗拟被治疗的疾病或病症的其它化合物。所述本领域中公知的其它化合物可以与本发明的所述化合物同时施用，或依次施用。类似地，本发明的方法包括使用这样的组合治疗方案。

对于黄斑变性或任何其他视网膜病变或这里描述的眼睛疾病的有效治疗，本领域技术人员可推荐一个剂量方案和足以用于待治疗的受试者的剂量。如果需要，优选每天剂量给药 1 到 4 次。如果组合物被配制在缓释递送介质中，或通过植入装置或玻璃体内注射递送，则不会那么频繁地施用。剂量方案也会改变，这取决于活性药物的浓度，其由使用的羟胺和患者的需要而定。

眼科医师或对本领域类似的技术人员有多种方式监测剂量方案的效果，并由此调整剂量。例如，黄斑变性或其他视网膜的治疗效果可通过视觉敏度的提高、异常的评估和立体彩色的底部照片的分级来确定。（老化相关性眼睛疾病研究调查组，NEI, NIH, AREDS 报告号 8,2001, Arch. Ophthalmol. 119: 1417-1436）。在眼葡萄膜炎中的治疗效果可通过视觉敏度和玻璃体薄雾的改善及炎症的控制来确定（Foster 等 2003, Arch. Ophthalmol. 121: 437-40）。依据这种评估，如果需要，眼科医师可调整剂量给药的频率和/或浓度。

列举下面的实施例以更加详细地描述本发明。用于举例说明，并非限制于本发明。

实施例 1：在兔子模型中，Tempol-H 对光化学视网膜损害的治疗效果

光产生视网膜损伤的能力远远低于其能够产生热损伤的水平被称为光化学视网膜损伤。一般认为光化学视网膜损伤的作用机理是光诱导的自由基的产生。目前已经充分意识到了在临床眼科中所使用的常见光源能够产生的光化学视网膜损伤的能力。已证明在眼科手术中使用的操作显微镜具有产生视网膜光化学损伤的能力。这一观察结果已被用来在兔眼中构建一个模型，用来检测各种制剂对光化学视网膜损伤的防御能力。现已测定眼观察仪器(ophthalmoscopically)可见的视网膜损伤在暴露于操作显微镜仅 2.5 分钟之后就可检测到。以下设定的操作方法可用来确定通过玻璃体内注射施用 tempol-H 是否能够阻止由操作显微镜产生的眼观察仪器可见的光化学视网膜损伤的发展。

材料和方法:

在处理前一周，对每只动物进行基线眼底照相和 FA。在暴露于来自操作显微镜的光线前 1 天，每只动物的一只眼睛接受 0.1cc BSS®的玻璃体内注射作为对照，而另一只眼睛则接受 0.1cc 溶于 BSS®介质的 Tempol-H。通过 IM 注射 60-40%盐酸氯胺酮（氯胺酮）100mg/ml 和甲苯噻嗪 20mg/ml 的混合物将所述动物麻醉。将窥器插入接受所述注射的眼中，使用 30g 的针穿过紧邻于缘之后的巩膜，并转变角度使其不接触到晶状体，并将其尖端放置于玻璃体腔中部。注射之后，用手持 Applanation 眼压器监测眼内压。如果必要的话，可在所述动物返回其笼子之前，实施穿刺术将眼内压降低至正常水平。

将 20 只有色兔子的 40 只眼睛暴露于 Zeiss OpMi 1 型操作显微镜的光不同时间段直至 1 小时。通过 IM 注射 60-40%盐酸氯胺酮 100mg/ml 和甲苯噻嗪 20mg/ml 的混合物将所述动物麻醉。然后将所述兔子固定于桌上；向要暴露的眼中插入眼睑窥器。用托品酰胺 HCl 1%使瞳孔扩大，用 BSS®冲洗角膜。将来自显微镜的光定位于离所述动物 20cm 位置的方式，从而将所述光集中并与所述眼睛平行。所述光束集中在所述角膜上锐聚焦中。暴露后 48 小时，对所述动物进行检验并重复进行眼底照相和 FA。采用标准方法处死动物并收集选中的眼睛，并储存于

冷的戊二醛(glutaldehyde)溶液中进行其它分析。

实施例 2：玻璃体内注射之后 Tempol-H 掺入兔子视网膜组织的评估

为了评价 tempol-H 对预防 AMD 和其它视网膜病症的有效性，必须确定所述药物已掺入视网膜组织。在本实施例中设定的操作方法采用了闪烁技术来制定在向所述兔子进行玻璃体内注射之后，tempol-H 掺入视网膜组织的量和持续时间。因为兔子的大眼睛为治疗施用提供了适当的模板，所以在包括玻璃体内注射的实验中对新西兰白兔进行详细的表征(Hosseini 等人，2003, *Lasers Surg. Med.* 32: 265-270)。此外，在通过闪烁技术对吸收进入视网膜组织的药物进行评估的实验中也广泛的使用了新西兰白兔(Ahmed 等人，1987, *J. Pharm. Sci.* 76: 583-586)。

材料与方法：

在本实验方法中使用的是 24 只 2.5-3 公斤重的雄性新西兰白兔。将所述兔子随即分入两个处理分组中的一组。开始对兔子进行基线眼科检查从而确保所有眼睛都没有受到刺激和感染。在随即分组和基线检测之后，通过皮下注射 100mg/ml 盐酸氯胺酮/20mg/ml 甲苯噻嗪将所述兔子麻醉。向双眼施用 1 滴商业可获得的 0.5% 盐酸丙对卡因(proparacaine hydrochloride)。然后根据以下所示的盲随机化方案(masked randomization)通过玻璃体内注射对兔子进行双侧(bilaterally)处理。

盲处理组：

1. 用标记的 tempol-H 进行双侧的玻璃体内注射。(N=12)
2. 用安慰剂（介质）进行双侧的玻璃体内注射。(N=12)

在 1、7、14 和 28 天，将分别来自每一处理组的 3 只兔子共 6 只兔子，用致死剂量的戊巴比妥钠处死。处死后立即实施双侧摘出，并将所述视网膜组织取出进行闪烁分析(在摘出后可将视网膜组织冷冻以防止液体流失)。将视网膜组研磨成匀浆并溶解于碱或季铵化合物中。

记录闪烁读数从而对存在于所述视网膜组织中的 tempol-H 的量进行定量。

对统计分析而言，来自用实验物体施用的所有兔子的数据都认为是有价值的。初级和次级效率变量具有统计显著性。采用的是双侧非参数统计检验， $p < 0.05$ 被认为统计显著。

实施例 3: Tempol-H 对视网膜色素上皮细胞(RPE)中的光氧化过程进行保护的效率

背景:

尽管目前还不清楚萎缩性老化相关性黄斑变性(AMD)的病因学，但通常都接受 AMD 是开始于视网膜色素上皮细胞的死亡、光受体细胞的变性，以及由此引起的之后发生的视觉丧失。有越来越多的证据将在 RPE 中累积的脂褐素与这些细胞的死亡关联起来。例如，不仅黄斑下面 RPE 细胞中的脂褐素水平最高，通过测定眼底自动荧光监测 RPE 的脂褐素也证明了在先前荧光增强的位点，RPE 萎缩的区域会随之扩大。对于测定 RPE 脂褐素和 RPE 细胞死亡之间关联的研究显示 RPE 脂褐素的组分，即双维甲酸类发光团 A2E 能够扰乱细胞膜，并且介导蓝光对 RPE 的损伤。A2E 的光激活导致了单态氧的生成，且后者沿着来自 A2E 的维甲酸类侧链对碳-碳双键的加成由此形成了环氧化物。以这种方式，可将 A2E 转化成含有多种环氧化物化合物的混合物(A2E-环氧化物)。已证明这些高活性的环氧化物能够损伤细胞。最终，在 RPE 细胞中由 A2E 的激发引起的光化学事件启动了细胞死亡，该启动过程包括半胱氨酸依赖性蛋白酶(caspase)的参与来分解细胞底物，并且可通过线粒体蛋白 bcl-2 进行调节。

还测定了 tempol-H 对 A2E 介导的蓝光损伤的保护能力。

材料与方法:

将在培养中积累了 A2E 的 APRE-19 细胞暴露于卤素源所递送来的

430 \pm 20nm 的光。这个波长的光是适当的，因为(i) A2E 的激发最大值为约 430nm，和(ii)这一波长的光可在体内达到所述 RPE，而波长大于 400nm 的光则不能被角膜和晶状体所吸收。对用 tempol-H 预处理(24 小时)和没有预处理的蓝光照射的充满 A2E 的 RPE 的细胞死亡进行了比较。细胞活力的丧失是通过以下 2 种方式进行定量的：

1. 基于健康的具有代谢活性的细胞将所述黄色四唑鎓盐 MTT 分解成紫色的 formazan 晶体进行量热计微滴定分析。在蓝光照射之后 24 小时测定细胞活力。在 2 个实验中的每一个中都分析三个重复的小孔。

2. 双色荧光分析，其中通过膜-impermeant 染料(Dead Red 核酸染料，Molecular Probes)染色所有死细胞的细胞核都染成红色，而 DAPI 将所述细胞的细胞核染成蓝色。在蓝光照射后 8 小时测定细胞活力。通过对每个孔中照射区域中 5 个视野内的细胞计数进行重复分析，每个实验对 3 个孔进行分析。所的数据是基于 3 次实验的结果。

结果：

如图 1 和图 2 所示，在这一黄斑变性的模型中，tempol-H 提供了对于充满 A2E 的 RPE 死亡的剂量依赖性保护。

尽管参照所提供的优选实施方案对本发明进行了特别地说明和描述，但还需理解本发明并不局限于在此具体公开和示例性的实施方案。可对本发明优选实施方案进行诸多改变和修改，并且这种改变和修改不背离所附权利要求所限定的本发明的范围和精神。

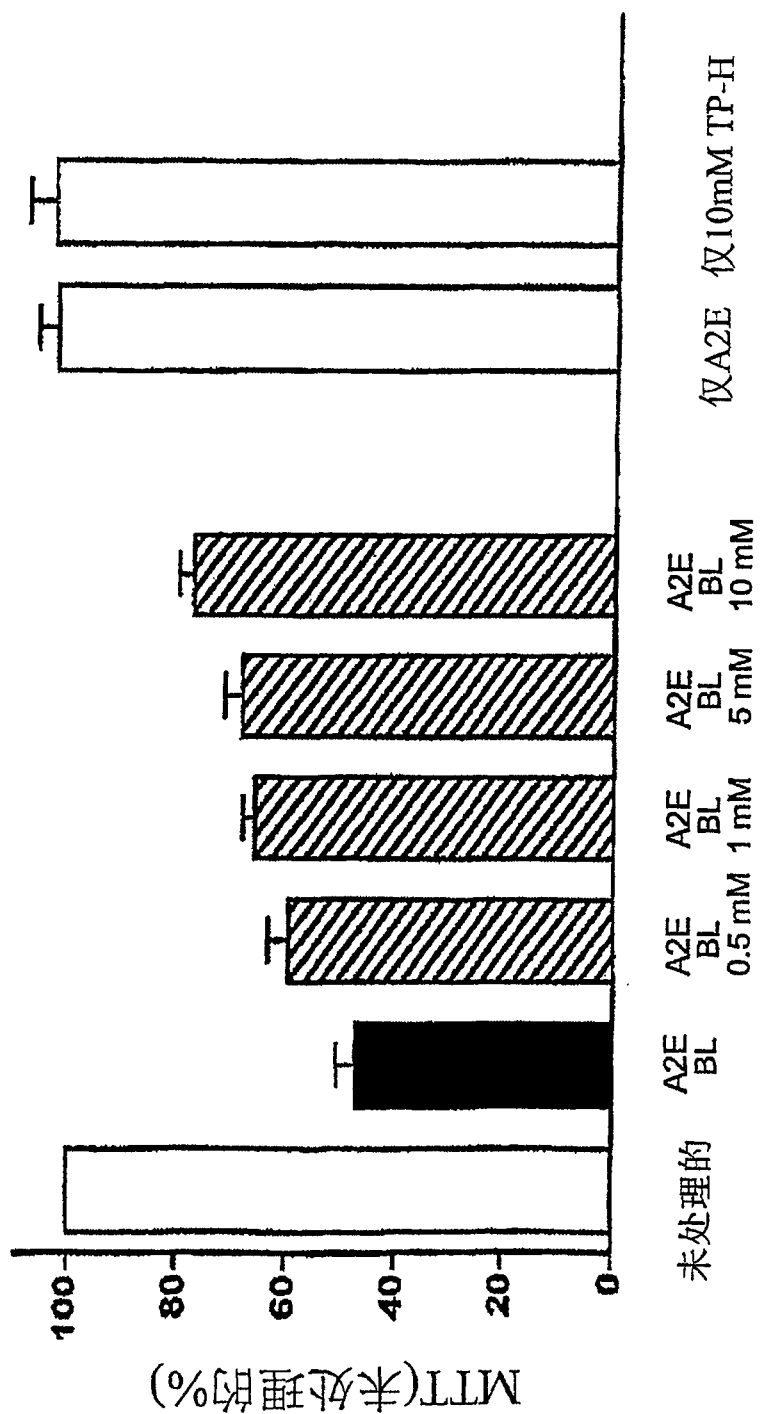


图 1

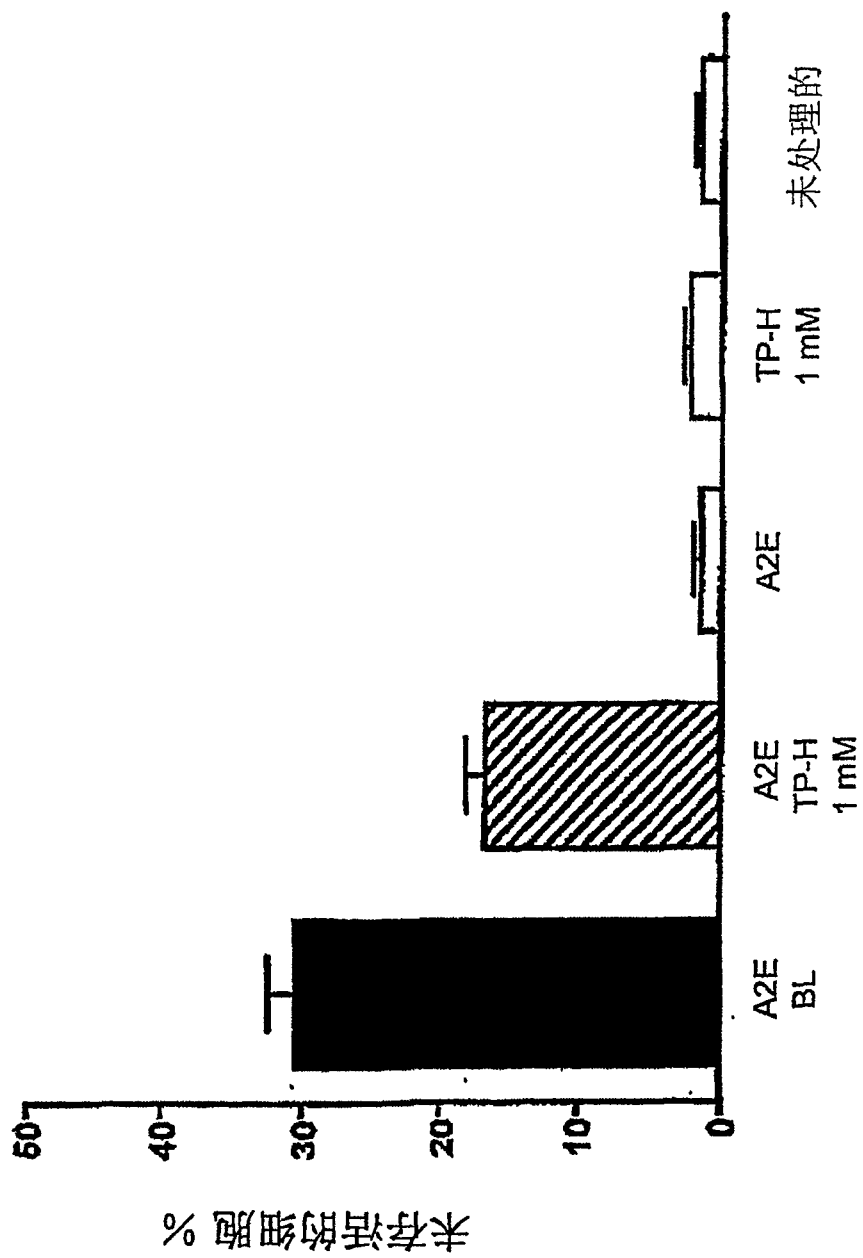


图 2