

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1976692 B

(45) 授权公告日 2011.05.25

(21) 申请号 200580020877.6

(22) 申请日 2005.06.06

(30) 优先权数据

60/582,293 2004.06.23 US

60/629,695 2004.11.19 US

60/660,904 2005.03.11 US

60/672,405 2005.04.18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.12.22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/020080 2005.06.06

(87) PCT申请的公布数据

W02006/007314 EN 2006.01.19

(73) 专利权人 矫正诊疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 肯尼思·威德 杰伊·利希特尔

内森·L·马塔

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 31/167(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

(56) 对比文件

K. C. Lewis, et al. Effects of Chronic Administration of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide(4-HPR) in Rats on Vitamin A Metabolism in the Eye. European Journal of Cancer 32A 10. 1996, 32A(10), 1803-1808.

Roxana A. Radu, et al. Treatment with isotretinoin inhibits lipofuscin accumulation in a mouse model of recessive Stargardt's macular degeneration. PNAS 100 8. 2003, 100(8), 4742-4747.

审查员 李哲

权利要求书 1 页 说明书 44 页 附图 25 页

(54) 发明名称

用视黄基衍生物治疗眼部疾病的方法和组合物

(57) 摘要

导致可逆性夜盲的化合物可以用于治疗与在视觉循环过程中蓄积的废物的过度产生有关的眼部疾病。我们描述了方法和组合物,其使用这些化合物和它们的衍生物来治疗例如黄斑变性和营养不良,或减轻与所述眼部疾病有关的症状。这些化合物和它们的衍生物可以作为单药剂治疗使用,或者与其他药剂或治疗联合使用。

1. N-(4- 羟基苯基) 视黄酰胺或 N-(4- 甲氧基苯基) 视黄酰胺或其药学可接受的盐在制备用于减少哺乳动物眼中的地理性萎缩或光感受器变性的形成或限制其扩散或者用于治疗哺乳动物的干性与年龄相关的黄斑变性的药物中的用途。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中 N-(4- 羟基苯基) 视黄酰胺以药学可接受的盐的形式存在。

3. 如权利要求 1 所述的用途, 其中 N-(4- 羟基苯基) 视黄酰胺用于制备治疗干性与年龄相关的黄斑变性的药物。

4. 如权利要求 1 所述的用途, 其中 N-(4- 甲氧基苯基) 视黄酰胺用于制备治疗干性与年龄相关的黄斑变性的药物。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的用途, 其中所述药物为适于全身性施用的形式。

6. 如权利要求 5 所述的用途, 其中所述药物为适于口服施用的形式。

7. 如权利要求 6 所述的用途, 其中所述药物为片剂、粉末、丸剂、糖锭、胶囊、液体、凝胶剂或膏剂的形式。

8. 如权利要求 7 所述的用途, 其中所述液体形式包括糖浆剂、酏剂或混悬液。

9. 如权利要求 7 所述的用途, 其中所述药物进一步包含: (a) 溶血磷脂胆碱、甘油一酯和脂肪酸; (b) 面粉、增甜剂和湿润剂; 或 (c) 玉米油和非离子型表面活性剂。

用视黄基衍生物治疗眼部疾病的方法和组合物

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2004 年 6 月 23 号提交的 U. S. 临时申请序列号 60/582, 293, 2004 年 11 月 19 日提交的 U. S. 临时申请序列号 60/629, 695, 2005 年 3 月 11 号提交的 U. S. 临时申请序列号 60/660, 904 和 2005 年 4 月 18 号提交的 U. S. 临时申请序列号 60/672, 405 的优先权, 在此将它们所有的公开内容整体引入本文作为参考。

[0003] 发明领域

[0004] 本文描述的方法和组合物涉及眼部疾病的治疗。

[0005] 发明背景

[0006] 视觉循环或类视黄醇循环是一系列由光驱动和酶催化的反应, 其中活性的视觉生色团视紫质被转变成全反式异构体, 然后又随即再生。循环的一部分发生在视杆的外节, 而循环的一部分发生在视网膜色素上皮细胞 (RPE) 中。该循环的组分包括各种脱氢酶和异构酶, 以及在光感受器和 RPE 之间运输中间体的蛋白质。

[0007] 与视觉循环有关的其他蛋白质负责运输、清除和 / 或处理由于视觉循环的类视黄醇例如全反式视黄醛 (atRAL) 的过量产生而蓄积的化合物和毒性产物。例如, N- 亚视黄基 N- 视黄基乙醇胺 (A2E) 来源于全反式视黄醛和磷脂酰乙醇胺的缩合。尽管光感受器和 RPE 对一定水平的发射橙色的荧光团是耐受的, 但如果过量仍会导致不良反应, 包括脂褐素的产生, 和在黄斑下可能出现玻璃疣。参见, 例如 Finnemann, S. C., Proc. Natl. Acad. Sci., 99 : 3842-47 (2002)。此外, A2E 对 RPE 可能是有细胞毒性的, 这会导致对视网膜的损害和破坏。玻璃疣是细胞外沉着物, 其蓄积于 RPE 下面, 是发展成与年龄相关的黄斑变性的危险因子。参见, 例如 Crabb, J. W., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 99 : 14682-87 (2002)。因此, 清除和处理来自于视觉循环副反应的毒性产物是十分重要的, 因为一些证据表明, 过度蓄积的毒性产物是与黄斑变性和视网膜营养不良有关的症状的部分原因。

[0008] 与年龄相关的黄斑变性一般分为两类: 湿性和干性。干性黄斑变性在所有病例中占约 90%, 也称做萎缩性、非渗出性、或玻璃疣性黄斑变性。在干性黄斑变性中, 玻璃疣典型地蓄积于视网膜的 RPE 组织下。然后, 当玻璃疣干扰黄斑中光感受器的功能时, 就会发生视觉丧失。该型的黄斑变性导致在很多年中视觉逐渐丧失。

[0009] 湿性黄斑变性占有所有病例的约 10%, 也称作脉络膜新血管生成, 视网膜下新生血管形成, 渗出性、或盘状变性。在湿性黄斑变性中, 在黄斑下可以形成异常的血管生长; 这些血管可以渗漏出血液和液体进入黄斑中并损害感光细胞。研究表明, 干性黄斑变性可以导致湿性黄斑变性。湿性黄斑变性可快速发展, 导致对中央视觉的严重损害。

[0010] Stargardt 病, 也称作 Stargardt 黄斑营养不良或黄点状眼底, 是最频繁遇到的青少年发作型的黄斑营养不良。研究表明, 该病症作为常染色体隐性遗传性状在 ABCA4 基因 (也称作 ABCR 基因) 中传递。该基因是基因的 ABC 超家族中的一员, 其编码与广谱物质的能量依赖性跨膜传输有关的跨膜蛋白质。

[0011] Stargardt 病的症状包括中央视觉的减退和暗适应困难, 这些问题一般随着年龄的增大而恶化, 使得许多受到 Stargardt 病困扰的人视力丧失了 20/100 到 20/400。由于全

反式视黄醛过度产生的潜在可能,通常要求患有 Stargardt 病的人避开亮光。

[0012] 诊断 Stargardt 病的方法包括观测黄斑中出现的衰退的萎缩性或“青铜铂”外观,以及在出现萎缩的中央黄斑损害区周围的视网膜内发生的大量淡黄白色斑的存在。其他诊断检测包括使用视网膜电流图、眼电图、和暗适应测试。另外,可以用荧光素血管造影片来确认该诊断。在后一个测试中观测到的“暗”或“沉默”脉络膜的出现,与脂褐素在患者视网膜色素上皮中的蓄积有关,这正是黄斑变性的早期症状之一。

[0013] 当前,对于黄斑变性和黄斑营养不良的治疗选择是很有限的。一些患有干性 AMD 的患者对于高剂量的维生素和矿物质产生应答。此外,一些研究表明,玻璃疣的激光光凝术阻止或延缓了玻璃疣的发展,玻璃疣可以导致干性 AMD 更加严重的症状。最后,一些研究表明,体外电流渗法 (rheophoresis) 对于患有干性 AMD 的患者是有益的。

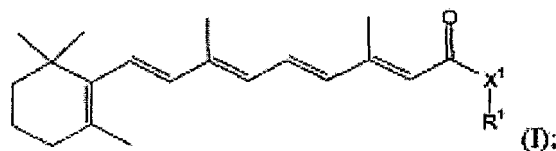
[0014] 然而,上述的成功是很有限的,人们仍然强烈地要求有新的方法和治疗来对付和限制与黄斑变性和营养不良有关的视觉丧失。

[0015] 发明简述

[0016] 本发明提供方法、组合物和制剂,用于 (a) 治疗眼部病症,和 (b) 控制预示 (例如危险因子) 或与这些眼部病症有关的症状。在一个方面,这些方法和制剂包含视黄基衍生物的使用。在另外的方面,眼部病症是黄斑变性、黄斑营养不良和视网膜营养不良。在另外的方面,该方法和制剂用于保护哺乳动物的眼免遭光的损害;在另外的方面,该方法和制剂用于限制哺乳动物眼中的全反式视黄醛、N- 亚视黄基 -N- 视黄基乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、脂褐素、地理性萎缩 (其中一个非限制性的例子是暗点)、光感受器变性和 / 或玻璃疣的形成。在另外的方面,这些方法和制剂包括使用可以削弱夜视力的药剂。在另外的方面,这些方法和制剂包括使用治疗眼部病症的药剂,其方式是 (a) 降低患者体内血清视黄醇的水平, (b) 调节患者眼中酶或蛋白质的活性,其中这些酶或蛋白质与视觉循环有关,例如,可以作为例子的是,卵磷脂 - 视黄醇酰基转移酶和 / 或细胞视黄醛结合蛋白,或 (c) 组合 (a) 和 (b) 的效应。在另外的方面,该方法和制剂与其他治疗方式组合使用。

[0017] 一个方面是减少哺乳动物眼中全反式视黄醛产生的方法,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物:

[0018]



[0019] 其中 X^1 选自 NR^2 、O、S、 CHR^2 ; R^1 是 $(CHR^2)_x-L^1-R^3$, 其中 x 是 0, 1, 2, 或 3; L^1 是单键或 $-C(O)-$; R^2 是选自 H、 (C_1-C_4) 烷基、F、 (C_1-C_4) 氟烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-(C_1-C_4)$ 烷基胺、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 氟烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基胺、和 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷氧基的部分; R^3 是 H 或一个任选被 1-3 个独立选择的取代基取代的部分,该取代基选自 (C_2-C_7) 烯基、 (C_2-C_7) 炔基、芳基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_5-C_7) 环烯基、和杂环,条件是当 x 是 0 并且 L^1 是单键时, R^3 不是 H;或其活性代谢物,或药学可接受的前药或溶剂化物。

[0020] 在另一方面是在哺乳动物眼中减少 N- 亚视黄基 -N- 视黄基乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺、和 / 或 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺产生的方法, 包括给哺乳动物施用至少一次有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。

[0021] 在另一方面是在哺乳动物眼中减少脂褐素产生的方法, 包括给哺乳动物施用有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。

[0022] 在另一方面是在哺乳动物眼中减少玻璃疣产生的方法, 包括给哺乳动物施用有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。

[0023] 在另一方面是在哺乳动物眼中调节卵磷脂 - 视黄醇酰基转移酶的方法, 包括给哺乳动物施用有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。

[0024] 在另一方面是在哺乳动物眼中治疗黄斑变性的方法, 包括给哺乳动物施用有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。在该方面一个进一步的实施方案中, 黄斑变性是青少年黄斑变性, 包括 Stargardt 病。在该方面的一个进一步的实施方案中, (a) 黄斑变性是干性与年龄相关的黄斑变性, 或 (b) 黄斑变性是视锥 - 视杆营养不良。在该方面的一个进一步的实施方案中, 黄斑变性是湿性与年龄相关的黄斑变性。在该方面的一个进一步的实施方案中, 黄斑变性是脉络膜新生血管形成, 视网膜下新生血管形成, 渗出性、或盘状变性。

[0025] 在另一方面是在哺乳动物眼中减少地理性萎缩 (其中一个非限制性的例子是暗点) 和 / 或光感受器变性的形成或者限制地理性萎缩 (其中一个非限制性的例子是暗点) 和 / 或光感受器变性扩散的方法, 包括给哺乳动物施用有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。

[0026] 在另一方面是在哺乳动物眼中减少黄斑下异常血管生长的产生的方法, 包括给哺乳动物施用有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。

[0027] 在另一方面是在哺乳动物的任一眼中保护光感受器的方法, 包括给哺乳动物施用有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。

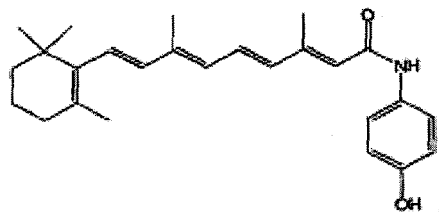
[0028] 在另一方面是保护哺乳动物的眼睛免受光损害的方法, 包括给哺乳动物施用有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。

[0029] 在另一方面是在哺乳动物的眼中中断视觉循环的方法, 包括给哺乳动物施用有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。

[0030] 在另一方面是通式 (I) 的化合物在制备用于治疗哺乳动物的眼部疾病或病症的药物中的应用, 其中至少一种视觉循环蛋白质的活性导致了该疾病或病症的病理学和 / 或症状。在该方面的一个实施方案中, 视觉循环蛋白质选自卵磷脂 - 视黄醇酰基转移酶和细胞视黄醛结合蛋白。在该方面的另一个或进一步的实施方案中, 眼部疾病或病症是视网膜病。在一个进一步或可替代的实施方案中, 视网膜病是黄斑变性。在一个进一步或可替代的实施方案中, 该疾病或病症的症状是在哺乳动物眼中全反式视黄醛、N- 亚视黄基 -N- 视黄基乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、脂褐素、光感受器变性、地理性萎缩 (其中一个非限制性的例子是暗点)、脉络膜新生血管形成和 / 或玻璃疣的形成。

[0031] 在上述任一方面的进一步的实施方案中, (a) X^1 是 NR^2 , 其中 R^2 是 H 或 (C_1-C_4) 烷基; (b) 其中 x 是 0; (c) x 是 1 并且 L^1 是 $-C(O)-$; (d) R^3 是任选取代的芳基; (e) R^3 是任选取代的杂芳基; (f) X^1 是 NH 并且 R^3 是任选取代的芳基, 包括进一步的实施方案, 其中 (i) 该芳基具有一个取代基, (ii) 该芳基具有一个选自卤素、OH、 $O(C_1-C_4)$ 烷基、 $NH(C_1-C_4)$ 烷基、 $O(C_1-C_4)$ 氟烷基、和 $N[(C_1-C_4) 烷基]_2$ 的取代基, (iii) 该芳基具有一个取代基, 其为 OH, (v) 该芳基是苯基, 或 (vi) 该芳基是萘基; (g) 该化合物是

[0032]



[0033] 或其活性代谢物, 或药学可接受的前药或溶剂化物; (h) 该化合物是 4- 羟苯基视黄酰胺, 或其活性代谢物, 或药学可接受的前药或溶剂化物; (i) 该化合物是 4- 甲氧苯基视黄酰胺, 或 (j) 4- 氧芬维 A 胺, 或其活性代谢物, 或药学可接受的前药或溶剂化物。

[0034] 在上述任一方面的进一步的实施方案中, (a) 有效量的化合物是全身性地施用于哺乳动物; (b) 有效量的化合物是口服施用于哺乳动物; (c) 有效量的化合物是由静脉内施用于哺乳动物; (d) 有效量的化合物是从眼部施用于哺乳动物; (e) 有效量的化合物是通过离子电渗疗法施用于哺乳动物; 或 (f) 有效量的化合物是通过注射施用于哺乳动物。

[0035] 在上述任一方面的进一步的实施方案中, 哺乳动物是人, 其包括一些实施方案, 其中 (a) 该人是 Stargardt 病的突变 ABCA4 基因的携带者, 或该人具有 Stargardt 病的突变 ELOV4 基因, 或者在与年龄相关的黄斑变性有关的补体因子 H 中有基因变异, 或 (b) 该人具有眼部病症或者特征, 该病症或者特征选自 Stargardt 病、隐性视网膜色素变性、地理性萎缩 (一个非限制性的例子是暗点)、光感受器变性、干性 AMD、隐性视锥 - 视杆营养不良、渗出性与年龄相关的黄斑变性、视锥 - 视杆营养不良、和视网膜色素变性。在上述任一方面的进一步的实施方案中, 哺乳动物是视网膜变性的动物模型, 其例子将在本文中提供。

[0036] 在上述任一方面的进一步的实施方案中, 包括有效量化合物的多次施用, 包括进一步的实施方案, 其中, (i) 多次施用之间的时间是至少 1 周; (ii) 多次施用之间的时间是至少 1 天; 和 (iii) 化合物是每日施用于动物的; 或 (iv) 化合物是每 12 小时施用于动物的。在进一步或可替代的实施方案中, 该方法包括一个休药期, 其中暂时停止施用该化合物或暂时降低所施用化合物的剂量; 在休药期结束后, 恢复化合物的剂量。休药期的长度可以从 2 天到 1 年不等。

[0037] 在上述任一方面的进一步实施方案中, 包括施用至少一种其他的药剂, 选自一氧化氮产生的诱导物、抗炎剂、生理可接受的抗氧化剂、生理可接受的矿物质、带负电荷的磷脂、类胡萝卜素、他汀类药物、抗血管生成药、基质金属蛋白酶抑制剂、13- 顺式视黄酸 (包括 13- 顺式视黄酸的衍生物)、11- 顺式视黄酸 (包括 11- 顺式视黄酸的衍生物)、9- 顺式视黄酸 (包括 9- 顺式视黄酸的衍生物)、和视黄基胺衍生物。在进一步的实施方案中:

[0038] (a) 该其他的药剂是一氧化氮产生的诱导物, 在所包括的实施方案中一氧化氮产生的诱导物选自瓜氨酸、鸟氨酸、亚硝化的 L- 精氨酸、亚硝酰化的 L- 精氨酸、亚硝化的

N-羟基-L-精氨酸、亚硝酰化的 N-羟基-L-精氨酸、亚硝化的 L-高精氨酸和亚硝酰化的 L-高精氨酸；

[0039] (b) 该其他的药剂是抗炎剂，在所包括的实施方案中抗炎剂选自非甾体类抗炎药、脂氧合酶抑制剂、泼尼松、地塞米松、和环氧合酶抑制剂；

[0040] (c) 该其他药剂是至少一种生理可接受的抗氧化剂，在所包括的实施方案中生理可接受的抗氧化剂选自维生素 C、维生素 E、 β -胡萝卜素、辅酶 Q、和 4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧基，或如下实施方案，其中 (i) 至少一种生理可接受的抗氧化剂与具有通式 (I) 结构的化合物一起施用；或 (ii) 至少两种生理可接受的抗氧化剂与具有通式 (I) 结构的化合物一起施用；

[0041] (d) 该其他药剂是至少一种生理可接受的矿物质，在所包括的实施方案中生理可接受的矿物质选自锌 (II) 化合物、铜 (II) 化合物、硒 (II) 化合物，或进一步包括给哺乳动物施用至少一种生理可接受的抗氧化剂的实施方案；

[0042] (e) 该其他药剂是带负电荷的磷脂，在所包括的实施方案中带负电荷的磷脂是磷脂酰甘油；

[0043] (f) 该其他药剂是类胡萝卜素，在所包括的实施方案中类胡萝卜素选自叶黄素和玉米黄素；

[0044] (g) 该其他药剂是他汀类药物，在所包括的实施方案中他汀类药物选自罗苏伐他汀、匹伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、西立伐他汀、美伐他汀、velostatin、氟伐他汀、康帕丁、洛伐他汀、达伐他汀、fluidostatin、阿伐他汀、阿伐他汀钙，和二氢康帕丁；

[0045] (h) 该其他药剂是抗血管生成药，在所包括的实施方案中抗血管生成药选自 Rhufab V2、色氨酸-tRNA 合成酶、PEG 化的抗-VEGF 适体、角鲨胺、乙酸阿奈可他、考布他汀 A4 前药、Macugen™、米非司酮、眼腱下用的 (subtenon) 曲安奈德、玻璃体内用的晶状曲安奈德、AG3340、氟轻松、和 VEGF-Trap；

[0046] (i) 该其他药剂是基质金属蛋白酶抑制剂，在所包括的实施方案中基质金属蛋白酶抑制剂选自金属蛋白酶的抑制剂、 α_2 -巨球蛋白、四环素、氧肟酸盐、螯合剂、合成的 MMP 片段、琥珀酰巯嘌呤、膦酰胺化物、和羟基甲酸；

[0047] (j) 该其他药剂是 13-顺式视黄酸 (包括 13-顺式视黄酸的衍生物)、11-顺式视黄酸 (包括 11-顺式视黄酸的衍生物)、9-顺式视黄酸 (包括 9-顺式视黄酸的衍生物)；

[0048] (k) 该其他药剂是视黄基胺衍生物，包括全反式视黄基胺衍生物、13-顺式视黄基胺衍生物、11-顺式视黄基胺衍生物、或 9-顺式视黄基胺衍生物；

[0049] (l) 该其他药剂 (i) 在施用具有通式 (I) 结构的化合物前施用，(ii) 在施用具有通式 (I) 结构的化合物后施用，(iii) 与具有通式 (I) 结构的化合物同时施用，或 (iv) 在施用具有通式 (I) 结构的化合物前和后施用；或

[0050] (m) 该其他药剂和具有通式 (I) 结构的化合物在相同的药物组合物中施用。

[0051] 在上述任一方面的进一步实施方案中，包括给哺乳动物施以体外电渗法。

[0052] 在上述任一方面的进一步实施方案中，包括给哺乳动物施以治疗，该治疗选自限制视网膜移位、光动力学疗法、玻璃疣激光术、黄斑裂孔术、黄斑移位手术、 Φ -移动、质子束疗法、视网膜剥离和玻璃体手术、巩膜扣带术、黄斑下手术、经瞳孔热疗法、光系统 I 疗法、微电流刺激法、抗炎剂、RNA 干扰、施用眼药例如碘依可酯或二乙氧膦酰硫胆碱或碳酸酞

酶抑制剂、微芯片植入法、干细胞疗法、基因替代疗法、核酶基因疗法、光感受器 / 视网膜细胞移植、和针灸。

[0053] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括施用激光光凝术从哺乳动物的眼中消除玻璃疣。

[0054] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括给哺乳动物施用至少一次具有通式(I)结构的第二化合物,其中第一化合物与第二化合物不同。

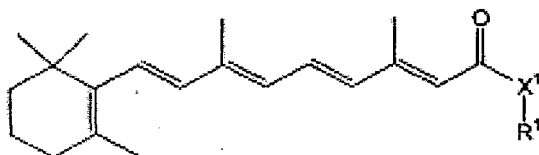
[0055] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括(a)监测哺乳动物眼中玻璃疣的形成;(b)通过自发荧光测定哺乳动物眼中脂褐素的水平;(c)测定哺乳动物眼的视敏度;(d)对哺乳动物的眼进行视野检查,在所包括的实施方案中视野检查是Humphrey视野检查;(e)在哺乳动物眼中测定N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-乙醇胺、和/或N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺的自发荧光或吸收光谱;(f)进行阅读速度和/或阅读敏度检查;(g)测定暗点大小;或(h)测定地理性萎缩损害的大小和数量。

[0056] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括确定该哺乳动物是否是Stargardt病的突变ABCA4等位基因的携带者,或是否具有Stargardt病的突变ELOV4等位基因,或者是否在与年龄相关的黄斑变性有关的补体因子H中有基因变异。

[0057] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括对视网膜变性的其他治疗。

[0058] 另一方面是药物组合物,包含有效量的具有下列结构的化合物:

[0059]



[0060] 其中 X^1 选自 NR^2 、O、S、 CHR^2 ; R^1 是 $(CHR^2)_x-L^1-R^3$,其中 x 是0,1,2,或3; L^1 是单键或 $-C(O)-$; R^2 是选自H、 (C_1-C_4) 烷基、F、 (C_1-C_4) 氟烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-(C_1-C_4)$ 烷基胺、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 氟烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基胺、和 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷氧基的部分; R^3 是H或一个任选被1-3个独立选择的取代基取代的部分,该取代基选自 (C_2-C_7) 烯基、 (C_2-C_7) 炔基、芳基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_5-C_7) 环烯基、和杂环,条件是当 x 是0并且 L^1 是单键时, R 不是H;或其活性代谢物,或药学可接受的前药或溶剂化物;和药学可接受的载体。

[0061] 在药物组合物方面的进一步实施方案中,(a)药学可接受的载体是适合眼部施用的;(b)药学可接受的载体包括溶血磷脂胆碱,甘油一酯和脂肪酸;(c)药学可接受的载体进一步包含面粉、增甜剂和湿润剂;(d)药学可接受的载体包含玉米油和非离子型表面活性剂;(e)药学可接受的载体包含二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、大豆油、叔丁醇和水;(f)药学可接受的载体包含乙醇、烷氧基化蓖麻油、和非离子型表面活性剂;(g)药学可接受的载体包含延长释放的制剂;或(h)药学可接受的载体包含快速释放的制剂。

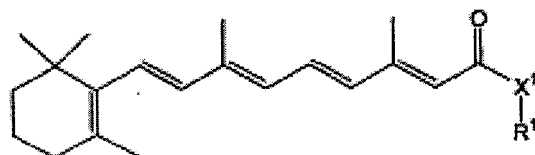
[0062] 在药物组合物方面的进一步实施方案中,该药物组合物进一步包含有效量的至少一种其他药剂,该其他药剂选自一氧化氮产生的诱导物、抗炎剂、生理可接受的抗氧化剂、生理可接受的矿物质、带负电荷的磷脂、类胡萝卜素、他汀类药物、抗血管生成药、基质金属

蛋白酶抑制剂、13-顺式视黄酸（包括13-顺式视黄酸的衍生物）、11-顺式视黄酸（包括11-顺式视黄酸的衍生物）、9-顺式视黄酸（包括9-顺式视黄酸的衍生物）、和视黄基胺衍生物。在进一步的实施方案中，(a) 该其他药剂是生理可接受的抗氧化剂；(b) 该其他药剂是一氧化氮产生的诱导物；(c) 该其他药剂是抗炎剂；(d) 该其他药剂是生理可接受的矿物质；(e) 该其他药剂是带负电荷的磷脂；(f) 该其他药剂是类胡萝卜素；(g) 该其他药剂是他汀类药物；(h) 该其他药剂是抗血管生成药；(i) 该其他药剂是基质金属蛋白酶抑制剂；或(j) 该其他药剂是13-顺式视黄酸。

[0063] 另一方面是治疗视网膜病的方法，包括调节哺乳动物体内视黄醇的血清水平，包括以下实施方案，其中 (a) 视网膜病是青少年黄斑变性，包括 Stargardt 病；(b) 视网膜病是干性与年龄相关的黄斑变性；(c) 视网膜病是视锥-视杆营养不良；(d) 视网膜病是视网膜色素变性；(e) 视网膜病是湿性与年龄相关的黄斑变性；(f) 视网膜病是或表现为出地理性萎缩和/或光感受器变性；或(g) 视网膜病是基于脂褐素的视网膜变性。

[0064] 在上述方面的一个实施方案中，该方法进一步包括给哺乳动物施用至少一次有效量的具有下列结构的第一化合物：

[0065]



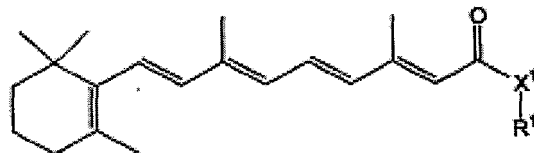
[0066] 其中 X^1 选自 NR^2 、O、S、 CHR^2 ； R^1 是 $(CHR^2)_x-L^1-R^3$ ，其中 x 是 0, 1, 2, 或 3； L^1 是单键或 $-C(O)-$ ； R^2 是选自 H、 (C_1-C_4) 烷基、F、 (C_1-C_4) 氟烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 (C_1-C_4) 烷基胺、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 氟烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基胺、和 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷氧基的部分； R^3 是 H 或一个任选被 1-3 个独立选择的取代基取代的部分，该取代基选自 (C_2-C_7) 烯基、 (C_2-C_7) 炔基、芳基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_5-C_7) 环烯基、和杂环，条件是当 x 是 0 并且 L^1 是单键时， R 不是 H；或其活性代谢物，或药学可接受的前药或溶剂化物。

[0067] 在另一个进一步的实施方案中，该方法进一步包括施用至少一种其他的药剂，该其他药剂选自一氧化氮产生的诱导物、抗炎剂、生理可接受的抗氧化剂、生理可接受的矿物质、带负电荷的磷脂、类胡萝卜素、他汀类药物、抗血管生成药、基质金属蛋白酶抑制剂、13-顺式视黄酸（包括13-顺式视黄酸的衍生物）、11-顺式视黄酸（包括11-顺式视黄酸的衍生物）、9-顺式视黄酸（包括9-顺式视黄酸的衍生物）、和视黄基胺衍生物。进一步的实施方案所包括的方法，其中 (a) 其他药剂是一氧化氮产生的诱导物；(b) 其他药剂是抗炎剂；(c) 其他药剂是至少一种生理可接受的抗氧化剂；(d) 其他药剂是至少一种生理可接受的矿物质；(e) 其他药剂是带负电荷的磷脂；(f) 其他药剂是类胡萝卜素；(g) 其他药剂是他汀类药物；(h) 其他药剂是抗血管生成药；(i) 其他药剂是基质金属蛋白酶抑制剂；或(j) 其他药剂是13-顺式视黄酸。

[0068] 在上述方面的一个进一步的实施方案中，治疗视网膜病的方法进一步包括调节哺乳动物眼内的卵磷脂-视黄醇酰基转移酶，包括如下实施方案，其中 (a) 视网膜病是青少年黄斑变性，包括 Stargardt 病；(b) 视网膜病是干性与年龄相关的黄斑变性；(c) 视网膜病

是视锥 - 视杆营养不良 ;(d) 视网膜病是视网膜色素变性 ;(e) 视网膜病是湿性与年龄相关的黄斑变性 ;(f) 视网膜病是或表现出地理性萎缩和 / 或光感受器变性 ;或 (g) 视网膜病是基于脂褐素的视网膜变性。在一个进一步的实施方案中,该方法进一步包括给哺乳动物施用至少一次有效量的具有如下结构的第一化合物 :

[0069]

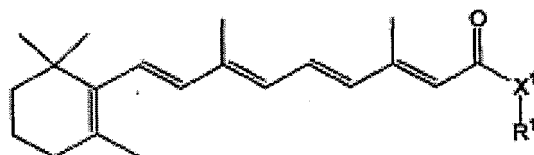


[0070] 其中 X^1 选自 NR^2 、 O 、 S 、 CHR^2 ; R^1 是 $(CHR^2)_x-L^1-R^3$, 其中 x 是 0, 1, 2, 或 3 ; L^1 是单键或 $-C(O)-$; R^2 是选自 H 、 (C_1-C_4) 烷基、 F 、 (C_1-C_4) 氟烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-(C_1-C_4)$ 烷基胺、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 氟烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基胺、和 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷氧基的部分 ; R^3 是 H 或一个任选被 1-3 个独立选择的取代基取代的部分,该取代基选自 (C_2-C_7) 烯基、 (C_2-C_7) 炔基、芳基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_5-C_7) 环烯基、和杂环,条件是当 x 是 0 并且 L^1 是单键时, R 不是 H ;或其活性代谢物,或药学可接受的前药或溶剂化物。

[0071] 在一个进一步的实施方案中,该方法进一步包括施用至少一种其他药剂,该其他药剂选自一氧化氮产生的诱导物、抗炎剂、生理可接受的抗氧化剂、生理可接受的矿物质、带负电荷的磷脂、类胡萝卜素、他汀类药物、抗血管生成药、基质金属蛋白酶抑制剂、13- 顺式视黄酸 (包括 13- 顺式视黄酸的衍生物)、11- 顺式视黄酸 (包括 11- 顺式视黄酸的衍生物)、9- 顺式视黄酸 (包括 9- 顺式视黄酸的衍生物)、和视黄基胺衍生物。进一步的实施方案包括如下方法,其中 (a) 该其他药剂是一氧化氮产生的诱导物 ;(b) 该其他药剂是抗炎剂 ;(c) 该其他药剂是至少一种 生理可接受的抗氧化剂 ;(d) 该其他药剂是至少一种生理可接受的矿物质 ;(e) 该其他药剂是带负电荷的磷脂 ;(f) 该其他药剂是类胡萝卜素 ;(g) 该其他药剂是他汀类药物 ;(h) 该其他药剂是抗血管生成药 ;(i) 该其他药剂是基质金属蛋白酶抑制剂 ;或 (j) 该其他药剂是 13- 顺式视黄酸。

[0072] 另一个方面是治疗视网膜的方法,包括给哺乳动物施用一种损害哺乳动物夜视力的药剂,包括如下实施方案,其中 (a) 视网膜病是青少年黄斑变性,包括 Stargardt 病 ;(b) 视网膜病是干性与年龄相关的黄斑变性 ;(c) 视网膜病是视锥 - 视杆营养不良 ;(d) 视网膜病是视网膜色素变性 ;(e) 视网膜病是湿性与年龄相关的黄斑变性 ;(f) 视网膜病是或表现出地理性萎缩和 / 或光感受器变性 ;或 (g) 视网膜病是基于脂褐素的视网膜变性。在一个进一步的实施方案中,该方法进一步包括给哺乳动物施用至少一次有效量的具有如下结构的第一化合物 :

[0073]



[0074] 其中 X^1 选自 NR^2 、 O 、 S 、 CHR^2 ; R^1 是 $(CHR^2)_x-L^1-R^3$, 其中 x 是 0, 1, 2, 或 3 ; L^1 是单键或 $-C(O)-$; R^2 是选自 H 、 (C_1-C_4) 烷基、 F 、 (C_1-C_4) 氟烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 $-C(O)$

OH、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-(C_1-C_4)$ 烷基胺、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 氟烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基胺、和 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷氧基的部分； R^3 是 H 或一个任选被 1-3 个独立选择的取代基取代的部分，该取代基选自 (C_2-C_7) 烯基、 (C_2-C_7) 炔基、芳基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_5-C_7) 环烯基、和杂环，条件是当 x 是 0 并且 L^1 是单键时， R 不是 H；或其活性代谢物，或药学可接受的前药或溶剂化物。

[0075] 在一个进一步的实施方案中，该方法进一步包括施用至少一种其他药剂，该其他药剂选自一氧化氮产生的诱导物、抗炎剂、生理可接受的抗氧化剂、生理可接受的矿物质、带负电荷的磷脂、类胡萝卜素、他汀类药物、抗血管生成药、基质金属蛋白酶抑制剂、13-顺式视黄酸（包括 13-顺式视黄酸的衍生物）、11-顺式视黄酸（包括 11-顺式视黄酸的衍生物）、9-顺式视黄酸（包括 9-顺式视黄酸的衍生物）、和视黄基胺衍生物。进一步的实施方案包括如下方法，其中 (a) 该其他药剂是一氧化氮产生的诱导物；(b) 该其他药剂是抗炎剂；(c) 该其他药剂是至少一种生理可接受的抗氧化剂；(d) 该其他药剂是至少一种生理可接受的矿物质；(e) 该其他药剂是带负电荷的磷脂；(f) 该其他药剂是类胡萝卜素；(g) 该其他药剂是他汀类药物；(h) 该其他药剂是抗血管生成药；(i) 该其他药剂是基质金属蛋白酶抑制剂；或 (j) 该其他药剂是 13-顺式视黄酸。

[0076] 另一方面是药物组合物，其用于 (a) 减少哺乳动物眼中 N-亚视黄基-N-视黄基乙醇胺、N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-乙醇胺、和 / 或 N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺的产生，(b) 减少哺乳动物眼中脂褐素的产生，(c) 减少哺乳动物眼中玻璃疣的形成，(d) 在哺乳动物眼中预防黄斑变性，(e) 减少哺乳动物眼中全反式视黄醛的产生，(f) 在哺乳动物眼中中断视觉循环，和 / 或 (g) 保护哺乳动物的眼睛免受光损害，包含有效量的至少一种具有通式 (I) 结构的化合物和药学可接受的载体。

[0077] 化合物，包括但不限于具有通式 (I) 结构的那些，其可以用于 (a) 减少哺乳动物眼中 N-亚视黄基-N-视黄基乙醇胺、N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-乙醇胺、和 / 或 N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺的产生，(b) 减少哺乳动物眼中脂褐素的产生，(c) 减少哺乳动物眼中玻璃疣的产生，(d) 在哺乳动物眼中预防黄斑变性，(e) 减少哺乳动物眼中全反式视黄醛的产生，和 / 或 (f) 保护哺乳动物的眼睛免受光损害，其具有至少一种如下的性质：在哺乳动物眼中中断视觉循环的能力，在哺乳动物中导致可逆性夜盲的能力，哺乳动物的眼睛可接受的生物利用度，和对哺乳动物的眼睛仅导致有限的和可接受的刺激的能力。

[0078] 在另一个或进一步的方面中，在哺乳动物眼中减少地理性萎缩和 / 或光感受器变性产生或限制地理性萎缩和 / 或光感受器变性扩散的方法，包括给哺乳动物施用至少一次有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。在进一步或可替代的实施方案中的方法，进一步包括施用至少一种其他药剂，该其他药剂选自一氧化氮产生的诱导物、抗炎剂、生理可接受的抗氧化剂、生理可接受的矿物质、带负电荷的磷脂、类胡萝卜素、他汀类药物、抗血管生成药、基质金属蛋白酶抑制剂、13-顺式视黄酸（包括 13-顺式视黄酸的衍生物）、11-顺式视黄酸（包括 11-顺式视黄酸的衍生物）、9-顺式视黄酸（包括 9-顺式视黄酸的衍生物）、和视黄基胺衍生物。

[0079] 在包括施用具有通式 (I) 结构的第一化合物的上述任一方法的进一步或可替代的实施方案中,该方法进一步包括测定哺乳动物的阅读速度和 / 或阅读敏感度。

[0080] 在包括施用具有通式 (I) 结构的第一化合物的上述任一方法的进一步或可替代的实施方案中,该方法进一步包括测定在哺乳动物眼中暗点的数量和 / 或大小。

[0081] 在包括施用具有通式 (I) 结构的第一化合物的上述任一方法的进一步或可替代的实施方案中,该方法进一步包括测定在哺乳动物眼中地理性萎缩损害的大小和 / 或数量。

[0082] 在包括施用具有通式 (I) 结构的第一化合物的上述任一方法的进一步或可替代的实施方案中,该方法进一步包括在哺乳动物眼中减少维生素 A 的酯化作用。

[0083] 在包括施用具有通式 (I) 结构的第一化合物的上述任一方法的进一步或可替代的实施方案中,该方法进一步包括在哺乳动物眼中降低视网膜色素上皮中脂褐素的自发荧光。

[0084] 在包括施用具有通式 (I) 结构的第一化合物的上述任一方法的进一步或可替代的实施方案中,该方法进一步包括在哺乳动物眼中降低 LRAT 下游的视觉循环蛋白质的底物的浓度。在进一步或可替代的实施方案中,下游的视觉循环蛋白质选自伴侣蛋白质、异构酶和脱氢酶。

[0085] 在进一步的方面是在哺乳动物眼中降低 LRAT 下游的视觉循环蛋白质的底物的浓度的方法,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。在进一步或可替代的实施方案中,下游的视觉循环蛋白质选自伴侣蛋白质、异构酶和脱氢酶。

[0086] 在进一步的方面是在哺乳动物眼中减少维生素 A 的酯化作用的方法,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的具有通式 (I) 结构的第一化合物。

[0087] 另一方面是调节细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP) 的活性的方法,包括将 CRALBP 与具有通式 (I) 结构的化合物接触。在进一步的实施方案中,该化合物直接接触细胞视黄醛结合蛋白。在一个进一步的实施方案中,所述调节发生在体内。在一个可替代的实施方案中,所述调节发生在体外。在进一步的实施方案中,所述调节发生在哺乳动物的眼中。在进一步的实施方案中,所述调节为患有眼部疾病或病症的哺乳动物提供治疗性益处。在进一步的实施方案中,所述调节改善或者减轻了与哺乳动物的眼部疾病或病症有关的至少一种症状。在进一步或可替代的实施方案中,该疾病或病症选自黄斑变性、黄斑营养不良、视网膜病。在进一步或可替代的实施方案中,该化合物是 4- 羟苯基视黄酰胺 ;或其代谢物,或药学可接受的前药或溶剂化物。在进一步或可替代的实施方案中,该化合物是 4- 甲氧苯基视黄酰胺 ;或其代谢物,或药学可接受的前药或溶剂化物。

[0088] 另一方面是通式 (I) 的化合物间接调节而不是直接调节视觉循环蛋白质的活性的方法。在所述方面的一个实施方案中,通式 (I) 的化合物直接调节某一种视觉循环蛋白 (通过与所述蛋白结合,或通过与所述蛋白的配体结合,其中该结合可以是化学结合、物理结合,或它们的组合,包括氢键键合),以降低视觉循环蛋白质的预期反应产物的浓度。在一个进一步的实施方案中,通式 (I) 的化合物直接调节的视觉循环蛋白质是 LRAT。在一个进一步的实施方案中,通式 (I) 的化合物对 LRAT 的直接调节降低了全反式视黄基酯类的浓度。在一个进一步的实施方案中,通过降低下游视觉循环蛋白质的底物浓度,全反式视黄基酯类浓度的降低间接调节了下游视觉循环蛋白质的活性。在一个进一步的实施方案中,所

述下游的视觉循环蛋白质包括异构酶、伴侣蛋白质和脱氢酶。

[0089] 本文所述的方法和组合物的其他目的、特征和优点从下面的详细描述中将变得显而易见。但应当理解的是,当说明具体的实施方案时,这些详细描述和具体的实施例仅仅是通过解释说明的方式给出,因为从该详述出发在本发明的精神和范围内的各种改变和变更对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0090] 本文所引用的所有参考文献,包括专利、专利申请和出版物,都整体一并引入本文作为参考。

[0091] 附图简述

[0092] 附图 1a-1c 显示了血清的乙腈提取物的各种反相 LC 分析。该血清来自于施用 14 天 DMSO (附图 1a)、10mg/kg N-4-(羟苯基)视黄酰胺 (HPR) (附图 1b)、或 20mg/kg HPR (附图 1c) 的小鼠。

[0093] 附图 2a 显示了在小鼠中注射 10mg/kg HPR 后,作为时间的函数的全反式视黄醇 (atROL) 和 HPR 的眼部浓度。

[0094] 附图 2b 显示了在小鼠中用 DMSO、10mg/kg HPR、或 20mg/kg HPR 治疗 14 天后,全反式视黄醇和 HPR 的血清浓度;附图 11 是本附图的更新和校正版本。

[0095] 附图 3a 显示了通过荧光猝灭测定的视黄醇和视黄醇结合蛋白质间相互作用的对照结合测定。

[0096] 附图 3b 显示了当存在 HPR (2 μ M) 时,通过荧光猝灭测定的视黄醇和视黄醇结合蛋白质间相互作用的结合测定。

[0097] 附图 4a 显示了在 abca4 无效突变小鼠中 HPR 对 A2PE-H₂ 生物合成的影响。

[0098] 附图 4b 显示了在 abca4 无效突变小鼠中 HPR 对 A2E 生物合成的影响。

[0099] 附图 5 显示了 HPR 剂量对 RPE 中 LRAT 活性的影响,使用的是体外生化测定。

[0100] 附图 6a 显示了 HPR 对全反式视黄基酯生物合成的影响,使用的是体外生化测定。

[0101] 附图 6b 显示了 HPR 对 11-顺式视黄醇生物合成的影响,使用的是体外生化测定。

[0102] 附图 6c 显示了 HPR 对全反式视黄醇利用的影响,使用的是体外生化测定。

[0103] 附图 7 显示了用荧光猝灭测定的细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP) 与各种配体之间的相互作用。

[0104] 附图 8 显示了用大小排阻色谱法和 UV/可见光分光光度法测定的 CRALBP 与各种配体之间的相互作用。

[0105] 附图 9 显示了用荧光猝灭测定的 N-4-(甲氧苯基)视黄酰胺 (MPR) 与视黄醇结合蛋白 (RBP) 的结合。

[0106] 附图 10 显示了用大小排阻色谱法和 UV/可见光分光光度法测定的 TTR 与 RBP-MPR 结合的调节。

[0107] 附图 11 显示了血清视黄醇作为芬维 A 胺浓度的函数的分析。

[0108] 附图 12 显示了在 ABCA4 无效突变小鼠中芬维 A 胺浓度相对于视黄醇、A2PE-H₂ 和 A2E 减少的相互关系图。

[0109] 附图 13 显示了 (A) 含 11-顺式视黄醛时 CRALBP 蛋白荧光的猝灭,和 (B) 含芬维 A 胺时 CRALBP 蛋白荧光的猝灭。

[0110] 附图 14 显示了与 CRALBP 结合的芬维 A 胺的光谱分析。

[0111] 附图 15 显示了作为 11cRAL 或芬维 A 胺浓度的函数的脱辅基 -CRALBP 的荧光猝灭。

[0112] 附图 16 显示了在视网膜色素上皮中芬维 A 胺对维生素 A 酯化作用的影响。

[0113] 附图 17 显示了在光适应的用 DMSO 和 HPR 处理的小鼠中的类视黄醇组合物 (图 A); HPR 对视觉生色团再生的影响 (图 B); HPR 对漂白的生色团再循环的影响 (图 C); 和视杆功能 (图 D)、视杆和视锥功能 (图 E) 和从光漂白中恢复 (图 F) 的电生理学测定。

[0114] 附图 18 显示了 A2PE-H₂ 和 A2E 水平作为芬维 A 胺剂量和治疗周期函数的分析 (图 A-F), 和在 ABCA4 无效突变小鼠的 RPE 中脂褐素自发荧光作为芬维 A 胺治疗的函数的分析 (图 G-I)。

[0115] 附图 19 显示了来自用 DMSO 和 HPR 处理的动物的视网膜光学显微镜检查影像。

[0116] 附图 20 显示了对照小鼠的洗眼杯提取物 (图 A), 和先前维持 HPR 治疗的小鼠在 12 天休药期后的洗眼杯提取物 (图 B) 的吸光度和荧光色谱图; 对照小鼠的洗眼杯提取物 (图 C), 和先前维持 HPR 治疗的小鼠在 28 天休药期后的洗眼杯提取物 (图 D) 的吸光度和荧光色谱图; 该直方图表明在图 A-D 中所述的小鼠的相对 A2E 水平。

[0117] 发明详述

[0118] 具有通式 (I) 结构的化合物已经用于癌症的治疗。具体地, 化合物 N-(4-羟苯基) 视黄酰胺, 也称作芬维 A 胺、HPR 或 4-HPR, 对治疗乳腺癌已经进行了广泛的试验。Moon, 等人, *Cancer Res.*, 39:1339-46(1979)。在 U. S. 4, 190, 594 和 4, 323, 581 中描述了芬维 A 胺。另外, 制备芬维 A 胺的其他方法也是已知的, 此外, 也已制备出了芬维 A 胺的大量类似物, 并测定了它们对治疗癌症的效力。参见, 例如美国专利申请公开号 U. S. 2004/0102650; U. S. 6, 696, 606; Villeneuve 和 Chan, *Tetrahedron Letters*, 38:6489-92(1997); Um, S. J., 等人, *Chem. Pharm. Bull.*, 52:501-506(2004)。但是, 令人忧虑的是, 这些化合物的一般倾向是在人类患者中产生一定的副作用, 包括损害夜视力。参见, 例如 Decensi, A., 等人, *J. Natl. Cancer Inst.*, 86:1-5-110(1994); Mariani, L., *Tumori.*, 82:444-49(1996)。最近的研究也提供了一些证据, 表明 N-(4-羟苯基) 视黄酰胺能够在某些培养的人 RPE 细胞中诱导神经元样分化。参见, Chen, S., 等人, *J. Neurochem.*, 84:972-81(2003)。

[0119] 令人惊奇地, 通式 (I) 的化合物可以为患有或易患黄斑变性和营养不良, 包括但不限于干性与年龄相关的黄斑变性和 Stargardt 病的患者提供益处。具体地, 通式 (I) 的化合物为这些人类患者提供如下的益处中的至少一些: 减少全反式视黄醛 (atRAL) 的量, 减少 A2E 的产生, 减少脂褐素的产生, 减少玻璃疣的产生, 和降低光敏度。在眼和视觉组织中形成 A2E 的趋势降低, 部分地是通过降低这些组织中全反式视黄醛的过度蓄积而导致的。由于 A2E 本身对 RPE 是有细胞毒性的 (其可导致视网膜死亡), 因此施用具有通式 (I) 结构的化合物 (如上所述, 单独, 或与其他药剂组合) 降低了细胞毒素剂 A2E 的蓄积率, 这样就为患者提供了益处。此外, 由于 A2E 是脂褐素的主要荧光团, 在眼和视觉组织中减少 A2E 的量也会降低这些组织中脂褐素蓄积的趋势。因此, 在一些方面, 可以认为所述的方法和组合物是基于脂褐素的治疗, 因为施用具有通式 (I) 结构的化合物 (如上所述, 单独, 或与其他药剂组合) 减少、降低或影响了在眼和 / 或视觉组织中脂褐素的蓄积。在眼和 / 或视觉组织中脂褐素蓄积率的降低对患有例如黄斑变性和 / 或营养不良等疾病或病症的患者是有益的。

[0120] 此外,由于干性与年龄相关的黄斑变性一般是湿性与年龄相关的黄斑变性的前兆,使用通式 (I) 的化合物也可以用作对后一种眼部病症的预防疗法。

[0121] 有趣的是,通式 (I) 的化合物和 / 或其衍生物也对视觉循环中的酶或蛋白质有影响。例如,视网膜色素上皮中的酯化作用涉及卵磷脂-视黄醇酰基转移酶 (LRAT),其对酰基从卵磷脂转移到视黄醇具有催化作用。施用通式 (I) 的化合物和 / 或其衍生物改变了 LRAT 的活性,这对患有或易患各种黄斑变性和营养不良的患者是有益的。

[0122] 血清中的维生素 A 被递送到肝外靶组织中,并立即被膜结合酶 LRAT 酯化。LRAT 对于将脂肪酸从膜磷脂递送到视黄醇上具有催化作用,并因此产生全反式视黄基酯,后者是所有组织中维生素 A 的主要贮存形式。在 RPE 中,全反式视黄基酯是产生光敏性视觉生色团前体 11-顺式视黄醇的唯一异构酶的唯一底物。随后该类视黄醇的氧化作用和与视网膜中视蛋白脱辅基蛋白的结合产生了视紫质。

[0123] N-4-(羟苯基)视黄酰胺在从肝和小肠制备的膜中也显示了对 LRAT 活性的显著抑制作用。此外,我们首次证明了(例如,实施例 13)HPR 在眼的 RPE 中抑制了 LRAT 的活性。如实施例所讨论的那样,施用 HPR 也可以同时降低血清的视黄醇和视黄醇结合蛋白 (RBP)。因此,除了 HPR 的全身效应(例如,降低血清视黄醇水平)外,也有细胞内的酶特异性效应(例如在 RPE 细胞中的 LRAT 活性)。事实上,在眼中的维生素 A 内稳态不仅依赖于从血清中视黄醇的递送,而且也依赖于视黄基酯的细胞内贮存,以提供视觉生色团,这提示,HPR 的效应在该器官中可能是最显著的。

[0124] 此外,具有通式 (I) 结构的化合物也与另一种视觉循环蛋白—细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP) 结合。为了说明该作用,并且仅仅是用于举例,在附图 7 和 8 中的数据表明了 HPR 与 CRALBP 结合。因此,在可以发现 CRALBP 的眼组织中,预计具有通式 (I) 结构的化合物与 CRALBP 会结合,因此,(a) 调节其他化合物,例如视黄醛,与 CRALBP 的结合,(b) 调节 CRALBP 的活性,(c) 作为 CRALBP 的配体,(d) 承受 CRALBP 催化的活性,包括运输活性,和 / 或 (e) 在所述方法和组合物中作为治疗剂。

[0125] 视觉循环。脊椎动物的视网膜包含两种类型的感光细胞—视杆和视锥。视杆是专用于低光条件下的视觉。视锥的敏感度较低,以较高的时间和空间分辨率提供视觉,并提供色觉。在日光条件下,视杆应答是饱和的,视觉完全由视锥来介导。这两种细胞类型都包含称作外节的结构,其包含一套膜盘。视觉转导反应发生在这些膜盘的表面,视觉的第一步是由视蛋白-色素分子(视紫质)吸收光子,这涉及生色团从 11-顺式到全反式的异构化作用。在恢复光敏度之前,所生成的全反式视黄醛必须在多酶过程中转化回 11-顺式视黄醛,该多酶过程发生在靠近视网膜的单层细胞—视网膜色素上皮中。

[0126] 黄斑或视网膜变性和营养不良。黄斑变性(也称视网膜变性)是一种涉及视网膜的中央部分—黄斑的变性的一种眼部疾病。在黄斑变性的病例中约 85%到 90%是“干”(萎缩或非新生血管)性类型。在干性黄斑变性中,视网膜的变性与黄斑下小的黄色沉积物,即玻璃疣的形成有关;此外,在 RPE 中脂褐素的蓄积导致了光感受器变性和地理性萎缩。该现象导致了黄斑的变薄和干燥。在视网膜中玻璃疣导致的变薄的位置和量与中央视觉丧失的量直接相关。视网膜的色素层和玻璃疣上的光感受器的变性变成萎缩性的,并可以导致中央视觉的缓慢丧失。最后,视网膜色素上皮和其下的感光细胞的丧失导致了地理性萎缩。给哺乳动物施用至少一种具有通式 (I) 结构的化合物可以在哺乳动物眼中减少光感受器

变性和 / 或地理性萎缩的产生,或限制它们的扩散。仅仅是用于举例,给哺乳动物施用 HPR 和 / 或 MPR 可以用于在哺乳动物眼中治疗光感受器变性和 / 或地理性萎缩。

[0127] 在“湿性”黄斑变性中,新血管形成(即,新生血管形成)以改善向视网膜组织,具体是黄斑下的血液供应,黄斑是负责我们的清晰中央视觉的视网膜的一部分。该新血管是容易被损坏的,有时会破裂,导致出血和伤害周围的组织。尽管在所有的黄斑变性病例中仅有约 10% 发生湿性黄斑变性,但它是约 90% 与黄斑变性有关的失明发生的原因。新生血管形成可以导致视觉的快速丧失,最终导致视网膜组织的瘢痕化和眼出血。该瘢痕组织和血液在视觉中产生了暗的、变形的区域,通常导致眼睛在法律上失明。湿性黄斑变性通常从中央视野的变形开始。直线变成了波浪状。许多患有黄斑变性的人也报告在他们的视野中发生视力模糊和空白斑(暗点)。生长促进蛋白,也称作血管内皮生长因子,或 VEGF,已被发现触发眼内的这种异常血管生长。这个发现引导人们积极地研究抑制或阻断 VEGF 的实验性药物。研究表明,抗 VEGF 剂可以用于阻断和预防异常的血管生长。这些抗 VEGF 剂停止或抑制了 VEGF 的刺激作用,因此使血管生长较少。这些抗 VEGF 剂也可以成功地抗血管生成或阻断 VEGF 诱导视网膜下血管生长的能力,以及阻止血管渗漏。给哺乳动物施用至少一种具有通式 (I) 结构的化合物可以在哺乳动物眼中减少湿性与年龄相关的黄斑变性的产生,或限制其扩散。仅仅是用于举例,给哺乳动物施用 HPR 和 / 或 MPR 可以用于在哺乳动物眼中治疗湿性与年龄相关的黄斑变性。类似地,通式 (I) 的化合物(仅仅是用于举例,包括 HPR 和 / 或 MPR) 可以用于治疗哺乳动物眼的脉络膜新生血管形成和黄斑下异常血管的形成。

[0128] Stargardt 病是在儿童期发生的表现为隐性黄斑变性的黄斑营养不良。参见,例如 Allikmets 等人, *Science*, 277 :1805-07 (1997) ;Lewis 等人, *Am. J. Hum. Genet.* , 64 : 422-34 (1999) ;Stone 等人, *Nature Genetics*, 20 :328-29 (1998) ;Allikmets, *Am. J. Hum. Gen.* , 67 :793-799 (2000) ;Klevering, 等人, *Ophthalmology*, 111 :546-553 (2004) 。Stargardt 病的临床特征是,中央视觉的逐步丧失和黄斑上的 RPE 的逐步萎缩。编码 Rim 蛋白 (RmP) 的人 ABCA4 基因的突变是 Stargardt 病发生的原因。在该病程的早期,患者表现为暗适应迟缓,但视杆功能正常。从组织学上讲,Stargardt 病与 RPE 细胞中脂褐素色素颗粒的沉积有关。

[0129] ABCA4 的突变也涉及隐性视网膜色素变性,参见例如 Cremers 等人, *Hum. Mol. Genet.* , 7 :355-62 (1998), 和隐性视锥 - 视杆营养不良,参见文献同上,和非渗出性与年龄相关的黄斑变性,参见例如 Allikmets 等人, *Science*, 277 :1805-07 (1997) ;Lewis 等人, *Am. J. Hum. Genet.* , 64 :422-34 (1999), 尽管在 AMD 中 ABCA4 突变的发生率仍未确定。参见 Stone 等人, *Nature Genetics*, 20 :328-29 (1998) ;Allikmets, *Am. J. Hum. Gen.* , 67 : 793-799 (2000) ;Klevering, 等人, *Ophthalmology*, 111 :546-553 (2004) 。与 Stargardt 病类似,这些病也与视锥暗适应迟缓有关。参见 Steinmetz 等人, *Brit. J. Ophthalm.* , 77 : 549-54 (1993) 。脂褐素在 RPE 细胞中的沉积在 AMD (参见 Kliffen 等人, *Microsc. Res. Tech.* , 36 :106-22 (1997)) 和视网膜色素变性的一些病例中也可显著地观察到。参见 Bergsma 等人, *Nature*, 265 :62-67 (1977) 。此外,常染色体显性型 Stargardt 病是由 ELOV4 基因中的突变导致的。参见 Karan, 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2005) 。

[0130] 此外,有几种类型的黄斑变性影响到儿童、青少年或成人,通常称作早发性或青少年性黄斑变性。这些类型中许多都是遗传性的,可以看作是黄斑营养不良,而不是变性。黄

斑营养不良的一些例子包括：视锥 - 视杆营养不良、角膜营养不良、Fuch 营养不良、Sorsby 黄斑营养不良、贝斯特病、和青少年性视网膜劈裂症，以及 Stargardt 病。

[0131] 化学术语

[0132] “烷氧”基涉及 (烷基)O- 基团，其中烷基如本文所述定义。

[0133] “烷基”涉及脂肪族烃基。烷基部分可以是“饱和烷基”基团，这意味着其不包含任何烯烃或炔烃部分。“烯烃”部分是指包含至少两个碳原子和至少一个碳 - 碳双键的基团，“炔烃”部分是指包含至少两个碳原子和至少一个碳 - 碳三键的基团。无论饱和还是不饱和的烷基部分，都可以是有支链的、直链的，或环状的。

[0134] “烷基”部分可以有 1 到 10 个碳原子（无论其在何时出现，数值范围例如“1 到 10”均指在给定范围内的每个整数；例如“1 到 10 个碳原子”是指烷基可以包含 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子，等等，乃至并包括 10 个碳原子，尽管该定义也包括了没有指出数值范围的术语“烷基”的情况）。烷基也可以是具有 1 到 5 个碳原子的“低级烷基”。所述化合物的烷基可以被指定为“C₁-C₄ 烷基”或类似的定义。仅仅是用于举例，“C₁-C₄ 烷基”是指在烷基链上有 1 到 4 个碳原子，即该烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。典型的烷基包括但不限于，甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、乙烯基、丙烯基、丁烯基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基等等。

[0135] 术语“烷基胺”涉及 -N(烷基)_xH_y 基团，其中 x 和 y 选自 x = 1, y = 1 和 x = 2, y = 0。当 x = 2 时，烷基可一起任选地形成环系统。

[0136] 术语“烯基”是指烷基的一种类型，其中烷基最先的 2 个原子形成双键，其中该双键不属于芳香基的一部分。即，烯基是以原子 -C(R) = C-R 开始的，其中 R 是指烯基的剩余部分，其可以相同或不同。烯基的非限制性例子包括 -CH = CH、-C(CH₃) = CH、-CH = CCH₃ 和 -C(CH₃) = CCH₃。烯基部分可以是支链的、直链的，或环状的（在该情况下，也可称作“环烯基”）。

[0137] 术语“炔基”是指烷基的一种类型，其中烷基最先的 2 个原子形成三键。即炔基是以原子 -C ≡ C-R 开始的，其中 R 是指炔基的剩余部分，其可以相同或不同。炔基的非限制性例子包括 -C ≡ CH、-C ≡ CCH₃、-C ≡ CCH₂CH₃。炔基部分的“R”部分可以是支链的、直链的，或环状的。

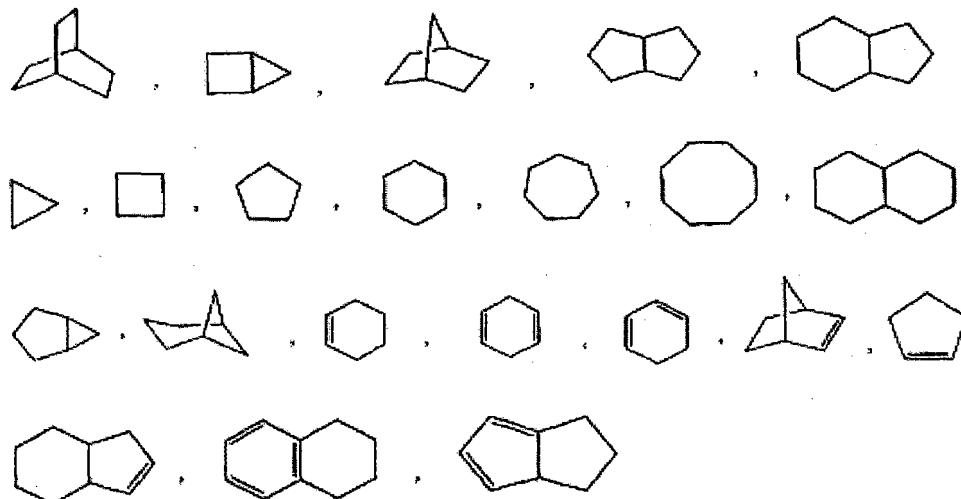
[0138] “酰胺”是具有通式 -C(O)NHR 或 -NHC(O)R 的一个化学部分，其中 R 选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基（通过一个环碳键合）和杂脂肪环（通过一个环碳键合）。酰胺可以是附着于通式 (I) 的化合物上的氨基酸或肽分子，并因此形成前药。本文所述化合物上的所有胺、羟基或羧基侧链都可以酰胺化。制备这些酰胺的方法和具体基团是本领域技术人员已知的，并可以容易地在参考资源，例如 Greene 和 Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 第三版, John Wiley & Sons, New York, NY, 1999 中找到，在此将其整体引入作为参考。

[0139] 术语“芳香基”或“芳基”是指芳香族基团，其具有至少一个含共轭 π 电子系统的环，包括碳环芳基（例如苯基）和杂环芳基（或“杂芳基”或“杂芳香基”）基团（例如吡啶）。该术语包括单环或稠环的多环（即共用相邻的碳原子对的环）基团。术语“碳环”是指一种化合物，其包含一个或多个共价闭合的环结构，形成环的主链的原子都是碳原子。因此，该术语将碳环与环主链包含至少一个不同于碳的原子的杂环区分开。

[0140] 术语“氰基”是指 $-\text{CN}$ 基。

[0141] 术语“环烷基”是指单环或多环的基团，其仅包含碳和氢，可以是饱和的、部分饱和的，或完全不饱和的。环烷基包括具有 3 到 10 个环原子的基团。环烷基的示例性的例子包括下列的部分：

[0142]



[0143] , 等等。

[0144] 术语“酯”是指具有通式 $-\text{COOR}$ 的化学部分，其中 R 选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基（通过环碳键合）和杂脂肪环（通过环碳键合）。本文所述化合物上的所有胺、羟基或羧基侧链都可以酯化。制备这些酯的方法和具体基团是本领域技术人员已知的，并可以容易地在参考资源，例如 Greene 和 Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999 中找到，在此将其整体引入作为参考。

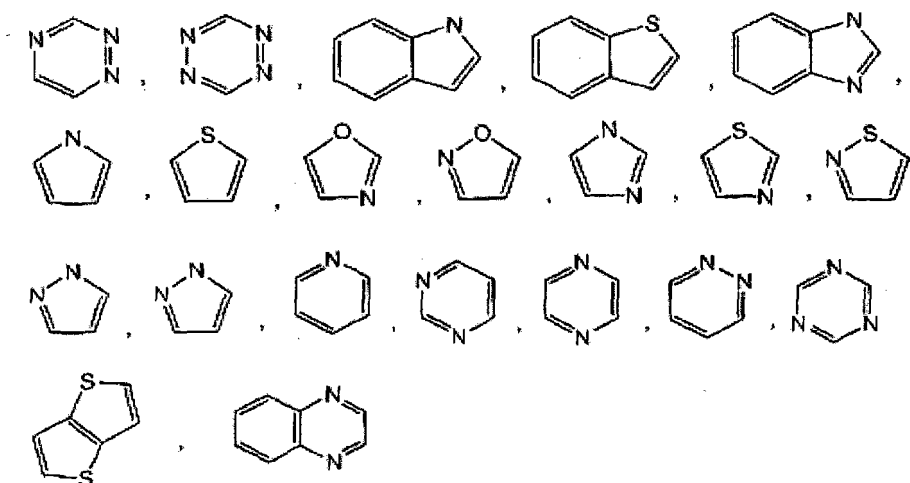
[0145] 术语“卤素”，或“卤素原子”是指氟、氯、溴或碘。优选的卤素是氟、氯和溴。

[0146] 术语“卤代烷基”、“卤代烯基”、“卤代炔基”和“卤代烷氧基”包括被一个或多个卤素或它们的组合取代的烷基、烯基、炔基和烷氧基结构。术语“氟代烷基”和“氟代烷氧基”分别包括其中卤素是氟的卤代烷基和卤代烷氧基。

[0147] 术语“杂烷基”、“杂烯基”和“杂炔基”包括任选取代的烷基、烯基和炔基，其中一个或多个骨架链原子选自碳以外的原子，例如氧、氮、硫、磷或它们的组合。

[0148] 术语“杂芳基”或“杂芳香基”是指包含一个或多个选自氮、氧和硫的环杂原子的芳基。包含 N 的“杂芳香基”或“杂芳基”部分是指环的至少一个骨架原子是氮原子的芳香基团。多环杂芳基可以是稠环的或非稠环的。杂芳基的示例性例子包括下列的部分：

[0149]

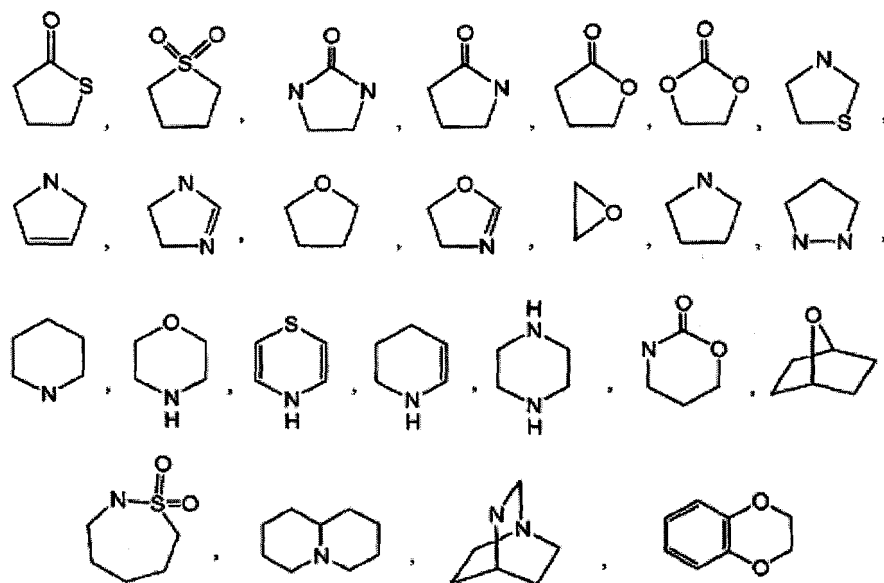


[0150] ,等等。

[0151] 术语“杂环”是指包含 1 到 4 个分别选自 O、S 和 N 的杂原子的杂芳香环和杂脂肪环基,其中每个杂环基在其环系统上有 4 到 10 个原子,条件是所述基团的环不包含 2 个邻近的 O 或 S 原子。非芳香杂环基包括在其环系统上仅有 4 个原子的基团,但芳香杂环基在其环系统上必须有至少 5 个原子。杂环基包括苯并稠合环系统。4 元杂环基的一个例子是氮杂环丁基(来自氮杂环丁烷)。5 元杂环基的一个例子是噻唑基。6 元杂环基的一个例子是吡啶基、10 元杂环基的一个例子是喹啉基。非芳香杂环基的例子是吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢噻喃基、哌啶子基、吗啉代基、硫吗啉基、塞噁基、哌嗪基、氮杂环丁基、环氧丙基、硫杂环丁烷基、高哌啶基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基、氧代杂卓基、二氮杂卓基、硫代杂卓基、1,2,3,6-四氢哌啶基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、二氢吲哚基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二噁烷基、1,3-二氧戊环基、吡唑啉基、二噻烷基、二硫代戊基、二氢吡喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡咯烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、3-氮杂双环并[3.1.0]环己基、3-氮杂双环并[4.1.0]环戊基、3H-吲哚基和喹啉基。芳香杂环基的例子是吡啶基、咪唑基、嘧啶基、吡唑基、噻唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、吲哚嗪基、酞嗪基、哒嗪基、三嗪基、异吲哚基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、噻二唑基、氟咱基、苯并氟咱基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹噁啉基、茶啶基和呋喃并吡啶基。上述基团,当衍生自上述基团时,如果可能,可以是 C-连接或 N-连接的。例如,衍生自吡咯的基团可以是吡咯-1-基(N-连接)或吡咯-3-基(C-连接)。此外,衍生自咪唑的基团可以是咪唑-1-基或咪唑-3-基(均是 N-连接),或咪唑-2-基、咪唑-4-基或咪唑-5-基(均是 C-连接)。这些杂环基包括苯并稠合的环系统和被一个或两个氧(=O)部分取代的环系统,例如吡咯烷-2-酮。

[0152] “杂脂肪环”基是指包含至少一个选自氮、氧和硫的杂原子的环烷基。该集团可以与芳基或杂芳基稠合。杂环烷基的示例性例子包括:

[0153]



[0154] , 等等。术语杂脂肪环也包括糖类的所有环状形式, 包括但不限于单糖、二糖和寡糖。

[0155] 术语“元环”可以包括所有的环状结构。术语“元”是指构成环的骨架原子的数目。因此, 例如环己基、吡啶、吡喃和噻喃是 6 元环, 环戊基、吡咯、呋喃和噻吩是 5 元环。

[0156] “异氰氧基”是指 $-NCO$ 基团。

[0157] “异氰硫基”是指 $-NCS$ 基团。

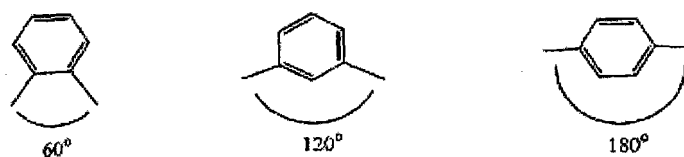
[0158] “缩硫基”是指 (烷基)S- 基团。

[0159] 此处的术语“亲核试剂”和“亲电子试剂”具有在合成和 / 或物理有机化学中熟知的通常含义。碳亲电子试剂典型地包含一个或多个烷基、烯基、炔基或芳香族 (sp^3 、 sp^2 或 sp 杂化) 碳原子, 其被 Pauling 电负性大于碳本身的任意原子或基团取代。碳亲电子试剂的例子包括但不限于, 羰基 (醛、酮、酯、酰胺)、肟、腙、环氧化物、氮丙啶、烷基, 烯基, 和芳基卤化物、酰基、磺酸酯 (芳基、烷基等等)。碳亲电子试剂的其他例子包括与吸电子基团电子共轭的不饱和碳原子, 例如在 α - 不饱和酮中的 β - 碳或在氟代芳基中的碳原子。制备碳亲电子试剂, 特别是制备精确控制的产物的方法, 是有机合成领域的技术人员已知的。

[0160] 芳族取代基的相对排列 (邻位、间位和对位) 赋予了这些立体异构体的特征性的化学作用, 而且在芳族化学领域是公认的。对位和间位的取代类型使这两种取代基进入了不同的定向。邻位排列的取代基相互之间定向于 60° ; 间位排列的取代基相互之间定向于 120° ; 对位排列的取代基相互之间定向于 180° 。

[0161] 邻位 间位 对位

[0162]



[0163] 取代基的相对排列, 即, 邻位、间位和对位, 也会影响取代基的电子性质。不受任何特定类型或水平的理论的限制, 已知邻位和对位排列的取代基相互之间的电子影响程度大

于相应的间位 - 排列的取代基。间位 - 二取代的芳族通常用不同于相应的邻位和对位 - 二取代芳族的途径来合成。

[0164] 术语“部分”是指分子的特定片段或官能团。化学部分是包埋或附着于分子上的公认的化学个体。

[0165] 术语“键”或“单键”是指当通过键连接的原子被认为是较大亚结构的一部分时，两个分子或两个部分之间的化学键。

[0166] “亚磺酰基”是指 $-S(=O)-R$ ，其中 R 选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基（通过环碳键合）和杂脂肪环（通过环碳键合）。

[0167] “磺酰基”是指 $-S(=O)_2-R$ ，其中 R 选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基（通过环碳键合）和杂脂肪环（通过环碳键合）。

[0168] “氰硫基”是指 $-CNS$ 。

[0169] 术语“任选取代”是指所述基团可以被一个或多个其他的基团分别和独立地取代，该其他的基团选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂脂肪环、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、烷基硫、芳基硫、氰基、卤素、羰基、硫代羰基、异氰基、氰硫基、异氰硫基、硝基、全卤代烷基、全氟代烷基、甲硅烷基和氨基，包括单和双取代氨基，以及它们的保护性衍生物。可以形成上述取代基的保护性衍生物的保护基是本领域已知的，而且可以在参考文献例如 Greene 和 Wuts 的上述文献中找到。

[0170] 上述的化合物可以具有一个或多个手性中心，每个中心可以以 R 或 S 构型存在。所述的化合物包括所有的非对映体、对映异构体、差向异构体以及它们适当的混合物。如果需要，可以通过本领域已知的方法，例如通过手性色谱柱分离立体异构体来获得立体异构体。

[0171] 本文所述的方法和制剂包括使用具有通式 (I) 结构的化合物的 N-氧化物、晶体形式（也称作多晶形物）、或药学可接受的盐，以及具有同样类型活性的这些化合物的活性代谢物。仅仅是用于举例，芬维 A 胺的一种已知的代谢物是 N-(4-甲氧苯基) 视黄酰胺，也被称作 4-MPR 或 MPR。芬维 A 胺的另一种已知的代谢物是 4-氧代芬维 A 胺。在一些情况中，化合物可以作为互变异构体存在。所有的互变异构体都包括在本文所述化合物的范围内。此外，所述化合物可以与药学可接受的溶剂例如水、乙醇等以非溶剂化以及溶剂化的形式存在。所述化合物的溶剂化形式也被认为是本文所公开的。

[0172] 药物组合物

[0173] 另一方面是药物组合物，包含通式 (I) 的化合物和药学可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

[0174] 术语“药物组合物”是指通式 (I) 的化合物和其他化学组分，例如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、助悬剂、增稠剂和 / 或赋形剂的混合物。该药物组合物促进了将化合物施用到机体中。在本领域存在施用化合物的多种技术，包括但不限于：静脉内、口服、气雾剂、胃肠外、眼部、肺部和局部施用。

[0175] 术语“载体”是指相对无毒性的化学化合物或药剂，其有利于化合物结合到细胞或组织中。

[0176] 术语“稀释剂”是指在递送前用于稀释感兴趣的化合物的化学化合物。稀释剂也可以用于稳定化合物，因为它们能提供更稳定的环境。溶解在缓冲溶液中的盐（其也可以

提供 pH 的控制或维持) 在本领域中用作稀释剂, 包括但不限于磷酸盐缓冲盐溶液。

[0177] 术语“生理学可接受的”是指例如载体或稀释剂的物质, 其不会消除化合物的生物活性或性质, 并且是无毒性的。

[0178] 术语“药学可接受的盐”是指不会对所施用的机体产生显著刺激并不会消除化合物的生物活性或性质的化合物的制剂。药学可接受的盐可以如下获得, 将通式 (I) 的化合物与酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等等反应。药学可接受的盐也可以如下获得, 将通式 (I) 的化合物与碱反应, 形成盐, 例如铵盐、碱金属盐, 例如钠或钾盐、碱土金属盐, 例如钙或镁盐、有机碱例如二环己胺, N- 甲基-D 葡萄糖胺, 三(羟基甲基) 甲胺的盐, 和氨基酸例如精氨酸, 赖氨酸等等的盐, 或使用本领域已知的其他方法。

[0179] 本文所公开的化合物的“代谢物”是在化合物代谢时形成的该化合物的衍生物。术语“活性代谢物”是指在化合物代谢时形成的化合物的生物活性衍生物。术语“代谢”是指机体转变特定物质的全过程(包括但不限于, 水解反应和由酶催化的反应)。因此, 酶可以对化合物产生特定的结构改变。例如, 细胞色素 P450 催化多种氧化和还原反应, 而二磷酸尿苷葡萄糖醛酰基转移酶催化活化的葡糖糖醛酸分子转变成芳香醇、脂肪醇、羧酸、胺和游离巯基。关于代谢的其他信息可以从 *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第 9 版, McGraw-Hill (1996) 中获得。

[0180] 本文所公开的化合物的代谢物的鉴定包括, 给宿主施用化合物并分析宿主的组织样本, 或者在体外将化合物和肝细胞一起培养, 然后分析所得到的化合物。这两种方法都是本领域公知的。

[0181] 仅仅用于举例, MPR 是已知的 HPR 的代谢物, 这两种物质都包含在通式 (I) 的结构中。MPR 在用 HPR 长期治疗的患者体内全身性地蓄积。MPR 全身性蓄积的一个原因是由于 HPR 被代谢为 MPR, 而 MPR 仅能(即使有的话) 缓慢地代谢。此外, MPR 可能具有相对较慢的清除率。因此, (a) 当施用 HPR 并确定其生物利用度时, 必须考虑 MPR 的药代动力学和药效学, (b) 对于代谢, MPR 比 HPR 更稳定, 和 (c) 在吸收后 MPR 比 HPR 能更迅速地生物利用。芬维 A 胺的另一种已知的代谢物是 4- 氧代芬维 A 胺。

[0182] MPR 也可以被认为是一种活性代谢物。如附图 9 和 10 所示, MPR (类似于 HPR) 可以与视黄醇结合蛋白 (RBP) 结合并阻止 RBP 结合到 Transerythrin (TTR) 上。因此, 当 HPR 或 MPR 施用于患者时, 所得到的期望的特征之一是 MPR 将蓄积并结合到 RBP 上, 抑制视黄醇与 RBP 的结合以及 RBP 与 TTR 的结合。因此, MPR 可以 (a) 作为视黄醇与 RBP 结合的抑制剂, (b) 作为 RBP 与 TTR 结合的抑制剂, (c) 限制视黄醇到某些组织, 包括眼组织的运输, 和 (d) 被 RBP 运输到某些组织, 包括眼组织。MPR 所显示出的与 RBP 的结合比 HPR 更弱, 因此, 它是视黄醇与 RBP 结合的强度较小的抑制剂。尽管如此, 预计 MPR 和 HPR 都可以近似等价地抑制 RBP 与 TTR 的结合。此外, 预计 MPR (类似于 HPR) 将与视觉循环蛋白, 包括 LRAT 和 CRALBP 结合。在这些方面, MPR 的作用模式与 HPR 相同, 可以作为所述方法和组合物中的治疗剂。

[0183] “前药”是指在体内转换成母体药物的药剂。前药通常是有用的, 因为在一些情况下, 它们比母体药物更易于施用。它们可以, 例如通过口服而生物利用, 而母体药物却不能。与母体药物相比, 前药在药物组合物中的溶解性也能改善。前药的一个非限制性的例子是

通式 (I) 的化合物,其作为酯 (“前药”) 施用可以促进跨细胞膜递送,在细胞膜处水溶性对于移动是不利的,然后其一旦进入水溶性有利的细胞内,即代谢水解成作为活性个体的羧酸。前药的另一个例子是结合到酸基上的短肽 (聚氨基酸),其中该肽经代谢露出活性部分。

[0184] 可以给人类患者施用所述化合物本身,或者在其与其他活性成分、或适当的一种或多种载体或赋形剂混合的药物组合物中施用作为联合治疗。本申请的化合物的配制和施用技术可以在 “Remington: The Science and Practice of Pharmacy,” 20th ed. (2000) 中找到。

[0185] 给药途径

[0186] 适当的给药途径可以是,例如,包括口服、直肠、经粘膜、经皮、肺、眼部、或肠内施用;胃肠外递送,包括肌内、皮下、静脉、髓内注射,以及鞘膜内、直接心室内、腹膜内、鼻内、或眼内注射。

[0187] 或者,人们可以用局部而非全身性给药的方式施用该化合物,例如,

[0188] 通常在长效或持续释放制剂中将该化合物直接注射到器官中。此外,人们可以以靶向药物递送系统,例如用器官特异性抗体包被的脂质体施用该药物。该脂质体将靶向至器官并被器官选择性地吸收。此外,药物可以为快速释放制剂的形式,延长释放制剂的形式,或中级释放制剂的形式。

[0189] 组合物 / 制剂

[0190] 包含通式 (I) 的化合物的药物组合物可以用本身已知的方法制备,例如通过常规混合、溶解、粒化、制糖衣、研磨、乳化、包囊、陷入或压缩的方法。

[0191] 药物组合物可以按常规的方法,用一种或多种生理可接受的载体,包括赋形剂和辅料来配制,其中所述赋形剂和辅料有助于将活性化合物加工为药学上可用的制剂。适当的制剂取决于所选择的给药途径。任何公知的技术、载体和赋形剂都是可以适当使用的,并且是本领域技术可以理解的;例如,在上述 Remington's Pharmaceutical Sciences 中。

[0192] 通式 (I) 的化合物可以通过各种方法施用,包括局部递送到眼的所有形式。另外,通式 (I) 的化合物可以全身性地,例如口服或静脉内施用。通式 (I) 的化合物可以局部给药至眼睛,并可以配制为各种局部施用的眼用组合物,例如溶液、混悬液、凝胶或软膏。因此“眼部施用”包括但不限于,眼内注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、眼周给药、结膜下注射、球后注射、前眼房注射 (包括进入前房或玻璃体腔)、Tenon's 下注射或植入、眼用溶液、眼用混悬液、眼用软膏、眼用植入物和眼用嵌入物、眼内溶液,使用离子电渗疗法、掺入到手术灌洗液和包中 (仅用于举例,插入到穹窿中的饱和棉拭子)。

[0193] 施用组合物至眼部通常会导致药剂与角膜的直接接触,至少一部分的施用药剂通过了角膜。通常,组合物在眼中的有效停留时间是约 2 到约 24 小时,更典型地约 4 到约 24 小时,最典型地约 6 到约 24 小时。

[0194] 示例性地,包含通式 (I) 的化合物的组合物可以采用液体的形式,其中该药剂存在于溶液、混悬液或这两者中。典型地当组合物作为溶液或混悬液使用时,第一部分的药剂存在于溶液中,而第二部分药剂为微粒形式存在于在液体基质中的混悬液中。在一些实施方案中,液体组合物可以包括凝胶制剂。在另外的实施方案中,液体组合物是含水的。或者,该组合物可以采取软膏的形式。

[0195] 有用的组合物可以是水溶液、混悬液或溶液 / 混悬液,其可以作为滴眼剂的形式存在。通过已知的滴数将所需的剂量施用于眼内。例如,对于每滴体积 $25 \mu\text{l}$ 而言,施用 1-6 滴将会递送 25-150 μl 的组合物。含水组合物典型地包含约 0.01% 到约 50%,更典型地约 0.1% 到约 20%,又更典型地约 0.2% 到约 10%,最典型地约 0.5% 到约 5% 重量 / 体积的通式 (I) 的化合物。

[0196] 典型地,含水组合物具有眼科可接受的 pH 和重量摩尔渗透压浓度。制剂、组合物或成分所涉及的“眼科可接受的”是指对所治疗的眼睛或其功能,或者所治疗的患者的一般健康不具有持久的有害作用。暂时效应例如小的刺激或“刺痛”的感觉是局部眼部施用药剂通常都具有的,这与所述制剂、组合物或成分为“眼科可接受的”相符。

[0197] 有用的水混悬液也可以包含一种或多种聚合物作为助悬剂。有用的聚合物包括水溶性聚合物例如纤维素聚合物如羟丙基甲基纤维素,和水不溶性聚合物例如交联的含羧基聚合物。有用的组合物也可以包含眼科可接受的粘膜粘着的聚合物,选自例如羧甲基纤维素、卡波姆(丙烯酸聚合物)、聚(甲基异丁烯酯)、聚丙烯酰胺、聚卡波非、丙烯酸 / 丙烯酸丁酯共聚物、海藻酸钠和葡聚糖。

[0198] 有用的组合物也可以包含眼科可接受的稳定剂以帮助稳定通式 (I) 的化合物。术语“稳定剂”通常包括导致形成药剂的胶束溶液或真溶液的药剂。某些眼科可接受的非离子型表面活性剂,例如聚山梨酯 80,以及眼科可接受的乙二醇、聚乙二醇,例如聚乙二醇 400、和乙二醇醚可以用作稳定剂。

[0199] 有用的组合物也可以包含一种或几种眼科可接受的 pH 调节剂或缓冲剂,包括酸,例如乙酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸和盐酸;碱,例如氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、乳酸钠和氨基丁三醇;和缓冲剂,例如柠檬酸 / 葡萄糖、碳酸氢钠和氯化铵。包含一定量的所述酸、碱和缓冲液,以维持该组合物的 pH 值在眼科可接受的范围内。

[0200] 有用的组合物也可以包含一定量的一种或多种眼科可接受的盐,该盐的量是能将组合物的重量摩尔渗透压浓度调整到眼科可接受的范围内所需要的。这些盐包括含有钠、钾或铵阳离子和氯、柠檬酸、抗坏血酸、硼酸、磷酸、碳酸氢、硫酸、硫代硫酸或重亚硫酸阴离子的盐;适当的盐包括氯化钠、氯化钾、硫代硫酸钠、重亚硫酸钠和硫酸铵。

[0201] 其它有用的组合物也可以包含一种或多种眼科可接受的防腐剂,以抑制微生物的活性。适当的防腐剂包括含汞的物质,例如硼酸苯汞和硫柳汞;稳定的二氧化氯;和季铵类化合物例如苯扎氯胺、西曲溴胺和西吡氯胺。

[0202] 其它有用的组合物可以包含一种或多种眼科可接受的表面活性剂,以增强物理稳定性或用于其它目的。适当的非离子型表面活性剂包括聚氧乙烯脂肪酸甘油酯和植物油,例如聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油;和聚氧乙烯烷基醚和烷基苯基醚,例如辛苯聚醇 10、辛苯聚醇 40。

[0203] 其它有用的组合物需要时可以包含一种或多种抗氧化剂,以增强化学稳定性。仅仅是用于举例,适当的抗氧化剂包括,抗坏血酸和偏重亚硫酸钠。

[0204] 水混悬液组合物可以包装在单剂量的不可再密闭的容器中。或者,也可使用多剂量的可再密闭的容器,在此情况下典型地在组合物中包含防腐剂。

[0205] 眼用组合物也可以采用固体物质的形式,药剂其可以插入到眼和眼睑之间或在结膜囊中释放药剂。其释放到泪液中,泪液洗涤角膜表面或者直接洗涤角膜本身,该固体物质

通常与角膜直接接触。适于以这种方式植入眼中的固体物质通常主要是由聚合物构成的，并且可以是生物可降解的或生物不可降解的。

[0206] 对于静脉注射，通式 (I) 的化合物可以配制成水溶液，优选是生理上相容的缓冲液，例如汉克斯溶液、林格溶液或生理盐水缓冲液。对于经粘膜施用，在制剂中使用适合渗透过屏障的渗透剂。这些渗透剂是本领域公知的。对于其它胃肠外注射，适当的制剂可以包括水或非水溶液，优选含生理上相容的缓冲液或赋形剂。这些赋形剂是本领域公知的。

[0207] 仅仅是用于举例，用于增溶较大的通式 (I) 的化合物的一种有用的制剂是带有阴性、阳性或中性电荷的磷脂、或胆汁盐 / 磷酸卵磷脂混合的脂类聚集系统，例如在 Li, C. Y., 等人, Pharm. Res. 13 :907-913 (1996) 中所述。可以用于相同目的的含有具有通式 (I) 结构的化合物的其他制剂包括使用包含醇例如乙醇和烷氧化蓖麻油的组合溶剂。参见，例如美国专利公开号 U. S. 2002/0183394。或者，包含通式 (I) 的化合物的制剂是乳剂，其由分散在水相的类脂、稳定量的非离子型表面活性剂、任选的溶剂和任选的等渗剂组成。出处同上。包含通式 (I) 的化合物的另一种制剂包含玉米油和非离子型表面活性剂。参见 U. S. 4, 665, 098。包含通式 (I) 的化合物的另一种制剂包含溶血磷脂胆碱、甘油一酯和脂肪酸。参见 U. S. 4, 874, 795。包含通式 (I) 的化合物的另一种制剂包含面粉、增甜剂和湿润剂。参见国际公开号 WO 2004/069203。包含通式 (I) 的化合物的另一种制剂包含二豆蔻酰磷脂酰胆碱、大豆油、叔丁醇和水。参见美国专利申请公开号 U. S. 2002/0143062。

[0208] 对于口服，可以容易地配制通式 (I) 的化合物，包括将活性物质和本领域公知的药学可接受的载体或赋形剂组合。这些载体能将所述化合物配制成片剂、粉末、丸剂、糖锭、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆剂、酞剂、膏剂、混悬液等等，以供要治疗的患者口服。供口服的药物制剂可以如下获得，将一种或多种固体赋形剂与一种或多种所述的化合物混合，任选粉碎所得的混合物，如果需要，在加入适当的辅料后处理颗粒的混合物，以获得片剂或糖锭核。特别地，适当的赋形剂是，填充剂例如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇；纤维素制剂例如，玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠；或其它，例如聚乙烯吡咯烷酮 (PVP 或聚维酮) 或磷酸钙。如果需要，可以加入崩解剂，例如交联羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐例如海藻酸钠。

[0209] 可以为糖锭核提供适当的包衣。为此目的，可以使用浓的糖溶液，其任选可包含阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、聚羧乙烯凝胶、聚乙二醇、和 / 或二氧化钛、漆溶液和适当的有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或色素加入到片剂或糖锭的包衣中，以识别或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0210] 可以用于口服的药物制剂包括由明胶制成的推入配合式胶囊，以及由明胶和增塑剂例如甘油或山梨糖醇制成的密封软胶囊。推入配合式胶囊可以包含与填充剂例如乳糖，粘合剂例如淀粉，和 / 或润滑剂例如滑石或硬脂酸镁，和任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中，活性化合物可以溶解或悬浮在适当的液体，例如脂肪油、液状石蜡或液体聚乙二醇中。另外，可以加入稳定剂。供口服的所有制剂应为适合这种施用的剂量。

[0211] 对于含服或舌下含化，该组合物可以采用以常规方法配制成的片剂、锭剂或凝胶的形式。

[0212] 用于施用具有通式 (I) 结构的化合物的另一种有用的制剂可以使用透皮递送装

置（“贴剂”）。这些透皮贴剂可以用于以可控的量为本发明的化合物提供连续或非连续的输注。递送药剂的透皮贴剂的构造和使用是本领域公知的，参见例如 U. S. 5, 023, 252。这些贴剂可以构造成用于药剂的连续、搏动或按需要递送。另外，可以通过离子电渗贴剂等等实现通式 (I) 的化合物的透皮递送。透皮贴剂可以为化合物提供可控的递送。通过使用控速膜或通过将化合物包埋到聚合物基质或凝胶中可以减慢吸收速率。相反地，可以使用吸收增强剂来增加吸收。适合透皮施用的制剂可以作为分离的贴剂存在，可以是亲脂的乳剂或缓冲水溶液，其溶解和 / 或分散在聚合物或粘合剂中。透皮贴剂可以置于患者身体的不同部位，包括眼睛上。

[0213] 可用于具有通式 (I) 结构的化合物的眼部施用的其他离子电渗装置是 Optis France S. A. 生产和拥有专利权的 Eyegate 涂布器，和 Iomed, Inc 开发出来的 Ocuphor™ 眼部离子电渗系统。

[0214] 对于通过吸入施用，通式 (I) 的化合物以喷雾剂的形式进行方便的递送，该喷雾剂来自于加压包装或雾化器，并使用适当的推进剂，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适当的气体。在加压气雾剂的情况下，剂量单位可以通过一个阀门来决定，以递送经计算的量。供吸入剂或吸入器使用的例如明胶胶囊和药筒可以配制成包含该化合物和适当的粉末基质例如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0215] 该化合物可以配制成通过注射，例如通过快速注射或连续输注进行胃肠外施用。用于注射的制剂可以以单位剂量形式存在，例如在安瓿或者多剂量容器中，其还包含添加的防腐剂。组合物可以采用在油性或水性载体中的混悬液、溶液或乳剂的形式，可以包含配制剂例如助悬剂、稳定剂和 / 或分散剂。

[0216] 用于胃肠外施用的药物制剂包括水溶性形式的活性化合物的水溶液。此外，活性化合物的混悬液可以制备成适当的油性注射混悬液。适当的亲脂溶剂或载体包括脂肪油，例如芝麻油，或合成的脂肪酸酯，例如油酸乙酯或甘油三酯，或脂质体。水性注射混悬液可以包含增加混悬液粘性的物质，例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地，该混悬液也包含适当的稳定剂或增加化合物溶解性的药剂，以允许制备高度浓缩的溶液。

[0217] 或者，活性成分可以是粉末形式，在使用前用适当的载体例如不含热原的灭菌水配制。

[0218] 该化合物也可以配制成直肠用组合物，例如直肠凝胶、直肠泡沫剂、直肠气雾剂、栓剂或保留灌肠剂，例如包含常规的栓剂基质如可可脂或其他的甘油酯。

[0219] 除了前述的制剂以外，该化合物也可以配制成长效制剂。这些长效制剂可以通过植入（例如皮下或肌内）或通过肌内注射来施用。因此，例如，该化合物可以与适当的聚合或疏水性物质（例如作为在可接受油中的乳剂）或离子交换树脂一起配制，或作为略溶的衍生物，例如略溶的盐。

[0220] 可注射的长效剂型的制备，包括在生物可降解的聚合物中形成通式 (I) 的化合物的微囊化基质（也被称为微囊基质）。取决于药物和聚合物的比例以及所使用的特定聚合物的性质，药物释放的速率是可控的。长效可注射制剂的制备，也可以包括将药物包埋到脂质体或微乳液中。仅仅是用于举例，可以使用近巩膜后长效制剂作为通式 (I) 的化合物的一种施用方式。巩膜是一个薄的无血管层，其在大部分脊椎动物眼周围包含高度有序的胶原网状结构。由于巩膜是无血管的，因此其可以用作一个天然的贮存所，注射的物质不能从

其中快速清除或从眼中除去。用于将该化合物施用到眼睛巩膜层的制剂可以是任何适于通过适合注射到巩膜层中的小直径插管注射而应用于巩膜的剂型。可注射应用的剂型的例子是溶液、混悬液或胶体混悬液。

[0221] 疏水性的通式 (I) 的化合物的药物载体是包含苯甲醇、非极性表面活性剂、可与水混溶的有机聚合物和水相的共溶剂系统。该共溶剂系统可以是 10% 乙醇、10% 聚乙二醇 300、10% 聚乙二醇 40 蓖麻油 (PEG-40 蓖麻油) 和 70% 水的溶液。该共溶剂系统良好地溶解疏水性化合物, 在全身性施用其自身产生的毒性较小。自然地, 该共溶剂系统的比例可以有较大的不同而不破坏其溶解性和毒性性质。此外, 共溶剂组分可以不同: 例如, 可以使用其他的低毒性非极性表面活性剂替代 PEG-40 蓖麻油, 聚乙二醇 300 的份数可以不同; 可以用其他生物相容的聚合物代替聚乙二醇, 例如聚乙烯吡咯烷酮; 而且在水溶液中可以包括其他的糖或多糖。

[0222] 或者, 可以使用疏水性药物化合物的其他递送系统。脂质体和乳剂是疏水性药物的递送媒介物或载体的公知例子。尽管通常有较大的毒性, 但也可以使用某些有机溶剂, 例如 N- 甲基吡咯烷酮。此外, 可以用持续释放系统, 例如包含治疗剂的固体疏水性聚合物的半渗透性基质来递送该化合物。各种持续释放物质是已确定的, 并且是本领域技术人员公知的。取决于其化学性质, 持续释放胶囊可以在几周到超过 100 天内释放该化合物。根据治疗剂的化学性质和生物稳定性, 可以使用稳定蛋白质的其他策略。

[0223] 一种施用具有通式 (I) 结构的化合物的制剂已经与芬维 A 胺一起 用于治疗神经细胞瘤、前列腺和卵巢癌, 其由 Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama) 以 Lym-X-Sorb™ 的名称出售。该制剂包含有组织的脂质基质, 其中该基质包括溶血磷脂胆碱、甘油单酯和脂肪酸, 该制剂经设计以改善芬维 A 胺的口服利用度。该制剂, 即包括溶血磷脂胆碱、甘油单酯和脂肪酸的口服制剂也可以改善具有通式 (I) 结构的化合物的生物利用度, 用于治疗眼部和视觉疾病和病症, 包括但不限于黄斑变性和营养不良。

[0224] 本文所述的所有制剂都可以从抗氧化剂、金属螯合剂、含硫醇的化合物和其他常用的稳定剂中获得益处。这些稳定剂的例子包括但不限于 (a) 约 0.5% 到约 2% w/v 甘油, (b) 约 0.1% 到约 1% w/v 甲硫氨酸, (c) 约 0.1% 到约 2% w/v 单硫代甘油, (d) 约 1mM 到约 10mMEDTA, (e) 约 0.01% 到约 2% w/v 抗坏血酸, (f) 0.003% 到约 0.02% w/v 聚山梨酯 80, (g) 0.001% 到约 0.05% w/v 聚山梨酯 20, (h) 精氨酸, (i) 肝素, (j) 硫酸葡聚糖, (k) 环糊精, (l) 聚硫酸戊聚糖和其他类肝素, (m) 二价阳离子例如镁和锌; 或 (n) 它们的组合。

[0225] 许多通式 (I) 的化合物可以提供为与药学上相容的平衡离子形成的盐。药学上相容的盐可以由很多酸来制备, 包括但不限于, 盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等等。与相应的游离酸或碱形式相比, 盐在水性或其他质子溶剂中溶解度更大。

[0226] 治疗方法、剂量和联合治疗

[0227] 术语“哺乳动物”是指所有的哺乳动物, 包括人。仅仅是用于举例, 哺乳动物包括人、非人的灵长类、牛、狗、猫、山羊、绵羊、猪、大鼠、小鼠和兔。

[0228] 此处的术语“有效量”涉及所施用的化合物的量, 其能在某种程度上减轻所要治疗的疾病、病症或病患中的一种或几种症状。

[0229] 包含本文所述化合物的组合物可以施用于预防性和 / 或治疗性疗法。所使用的术语“治疗”涉及预防性和 / 或治疗性疗法。在治疗性应用中, 给已经患有疾病、病症或疾患

的患者施用该组合物,其量足以治愈或至少部分地阻止该疾病、病症或疾患的症状。所使用的有效量取决于疾病、病症或疾患的严重度和病程,先前的治疗,患者的健康情况和对药物的应答,以及治疗医生的判断。可以认为,通过常规试验(例如,剂量增加的临床试验)来确定该治疗有效量在本领域的技术范围内。

[0230] 在预防性应用中,给对特定疾病、疾患或病症敏感或有患病危险的患者施用包含所述化合物的组合物。该量定义为“预防有效量或剂量”。在该应用中,精确的剂量也取决于患者的健康状况、体重,等等。可以认为,通过常规试验(例如,剂量增加的临床试验)来确定该预防有效量在本领域的技术范围内。

[0231] 术语“增强”是指在效力或持续时间上提高或延长所需效应。因此,对于增强治疗剂的效果,术语“增强”涉及在效力或持续时间上提高或延长其他治疗剂对系统的作用的能力。此处的“增强有效量”涉及足以增强另一种治疗剂在所需的系统中的效果的量。当在患者中使用时,这样使用的有效量取决于疾病、病患或病症的严重度和病程,先前的治疗,患者的健康情况和对药物的应答,以及临床医生的判断。

[0232] 在患者的病症没有改善的情况下,经医生决定,可以长期地施用该化合物,也即,在较长的时间,包括贯穿患者生命的时间里施用,以改善或控制或限制患者疾病或病症的症状。

[0233] 在患者情况改善的情况下,经医生决定,可以连续地使用该化合物;或者,所施用药物的剂量可以暂时减小或暂时停止一定的时间(即,“休药期”)。休药期的长度可以是2天到1年不等,仅仅用于举例,包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天和365天。在休药期期间剂量的减少可以是10%–100%,仅仅用于举例,包括10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%和100%。

[0234] 一旦患者的情况发生改善,如果必要则施用维持剂量。随后,施用的剂量或频率,或两者,都可以作为症状的函数降低到保持疾病、病患或病症改善的水平。然而,一旦发生任何症状的复发,患者都可能需要长期的间歇性治疗。

[0235] 相应于所述量的给定药剂的量将根据各种因素而不同,例如特定的化合物、疾病情况和其严重度、需要治疗的患者或宿主的性质(例如,体重),但尽管如此,可以用本领域已知的方式根据病例的特定状况,包括所施用的特定药剂、给药途径、要治疗的病症和要治疗的患者或宿主来进行常规的确定。然而,一般地成人治疗所使用的剂量典型地是每天0.02–5000mg,优选每天1–1500mg。所需剂量常规地存在于单剂量或分离剂量中同时施用(或间隔一小段时间)或间隔适当的时间施用,例如每天2、3、4或更多个亚剂量。

[0236] 在某些情况中,可适当地施用至少一种所述化合物(或其药学可接受的盐、酯、酰胺、前药或溶剂化物)和另一种治疗剂的组合。仅仅用于举例,如果患者接受一种所述化合物后产生的副作用之一是炎症,那么可适当地施用抗炎剂和初始治疗剂的组合。或者仅仅用于举例,施用佐剂来增强所述一种化合物的治疗有效性(即,佐剂本身仅有很小的治疗益处,但与另一种治疗剂组合时,可以增强对患者的总体治疗益处)。或者仅仅用于举例,施用一种所述化合物和也具有治疗益处的另一种治疗剂(其也包括一种治疗方案)可以增加患者所得到的益处。仅仅用于举例,在包括施用一种所述化合物的黄斑变性的治疗中,施用

治疗黄斑变性的其他治疗剂或疗法也能为患者增加治疗益处。在所有情况中,无论所要治疗的疾病、疾患或病症如何,患者所得到的总体益处可能仅仅是两种治疗剂的加成作用,或者患者可以得到协同作用。

[0237] 具体地,可能的联合治疗的非限制性例子包括使用至少一种通式 (I) 的化合物和一氧化氮 (NO) 诱导物、他汀类药物、带负电荷的磷脂、抗氧化剂、矿物质、抗炎剂、抗血管生成药、基质金属蛋白酶抑制剂和类胡萝卜素。在某些情况中,适当的组合药剂落在多重分类内 (仅仅用于举例,叶黄素是抗氧化剂和类胡萝卜素)。此外,通式 (I) 的化合物也可以与为患者提供益处的其它药剂一起施用,仅仅用于举例,包括环孢霉素 A。

[0238] 此外,通式 (I) 的化合物也可以和对患者产生叠加或协同益处的方法组合使用,仅仅用于举例,包括使用体外电渗法 (也称作膜差别过滤法)、施用可植入的小型窥镜、玻璃疣的激光光凝术和微刺激疗法。

[0239] 抗氧化剂的使用也对黄斑变性或营养不良的患者显示了益处。参见例如, Arch. Ophthalmol., 119 :1417-36 (2001) ;Sparrow, 等人, J. Biol. Chem., 278 :18207-13 (2003)。可以与至少一种具有通式 (I) 结构的化合物组合使用的适当的抗氧化剂的例子包括维生素 C、维生素 E、 β -胡萝卜素和其他类胡萝卜素、辅酶 Q、4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧基 (也称 Tempol)、叶黄素、丁羟甲苯、白藜芦醇、trolox 类似物 (PNU-83836-E)、和越桔提取物。

[0240] 某些矿物质的使用也对黄斑变性或营养不良的患者显示了益处。参见例如, Arch. Ophthalmol., 119 :1417-36 (2001)。可以与至少一种具有通式 (I) 结构的化合物组合使用的适当的矿物质的例子包括含铜的矿物质,例如氧化铜 (仅仅用于举例);含锌的矿物质,例如氧化锌 (仅仅用于举例) 和含硒的化合物。

[0241] 某些带负电荷的磷脂的使用也对黄斑变性或营养不良的患者显示了益处。参见例如, Shaban 和 Richter, Biol. Chem., 383 :537-45 (2002) ;Shaban, 等人, Exp. Eye Res., 75 :99-108 (2002)。可以与至少一种具有通式 (I) 结构的化合物组合使用的适当的带负电荷的磷脂的例子包括心磷脂和磷脂酰甘油。当与具有通式 (I) 结构的化合物组合使用时,带正电荷和 / 或中性的磷脂也能为患有黄斑变性或营养不良的患者提供益处。

[0242] 使用某些类胡萝卜素与在感光细胞中必需的光防护的维持有关。类胡萝卜素是天然产生的黄色到红色的萜类色素,其可以在植物、藻类、细菌和某些动物例如鸟和贝中找到。类胡萝卜素是一大类分子,其中已经鉴定出了超过 600 种天然产生的类胡萝卜素。类胡萝卜素包括碳氢化合物 (胡萝卜素) 和它们的氧化的、醇类衍生物 (叶黄素)。它们包括放线赤藓素 (actinioerythrol)、虾青素、角黄素、辣椒黄素、辣椒红素、 β -8'-脱辅基-胡萝卜素醛 (脱辅基-胡萝卜素醛)、 β -12'-脱辅基-胡萝卜素醛、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、"胡萝卜素" (α -和 β -胡萝卜素的混合物)、 γ -胡萝卜素、 β -隐黄质、叶黄素、番茄红素、紫赤藓素 (violerythrin)、玉米黄素、和其包含羟基-或羧基的成员的酯。许多在自然中存在的类胡萝卜素是顺式和反式异构体形式,而合成的化合物通常是外消旋混合物。

[0243] 在人体中,视网膜主要选择性地蓄积两种类胡萝卜素:玉米黄素和叶黄素。这两种类胡萝卜素被认为有助于保护视网膜,因为它们是强大的抗氧化剂并吸收蓝光。用鹌鹑进行的研究表明,缺乏类胡萝卜素的饮食的组使得视网膜只含低浓度的玉米黄素,并遭受了

严重的光损害,这可以由数量很高的凋亡感光细胞来证明,而高玉米黄素浓度的组只有很小的损害。与至少一种具有通式(I)结构的化合物组合的适当类胡萝卜素的例子包括叶黄素和玉米黄素,以及上述的任何类胡萝卜素。

[0244] 适当的一氧化氮诱导物包括在体内刺激内源性 NO 或提高内源性内皮细胞衍生舒张因子(EDRF)水平升高的化合物,或者其是一氧化氮合酶的底物。这些化合物包括,例如,L-精氨酸、L-高精氨酸和 N-羟基-L-精氨酸,包括它们的亚硝化和亚硝酰化类似物(例如亚硝化 L-精氨酸、亚硝酰化 L-精氨酸、亚硝化 N-羟基-L-精氨酸、亚硝酰化 N-羟基-L-精氨酸、亚硝化 L-高精氨酸和亚硝酰化 L-高精氨酸)、L-精氨酸的前体和/或其生理可接受的盐、包括,例如瓜氨酸、鸟氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸,包含至少一个所述氨基酸的多肽,精氨酸酶的抑制剂(例如 N-羟基-L-精氨酸和 2(S)-氨基-6-硼己酸)和一氧化氮合酶的底物,细胞因子、腺苷、缓激肽、钙网织蛋白、双醋苯啶和酚酞。EDRF 是一种内皮分泌的血管松弛因子,经鉴定是一氧化氮或其密切相关的衍生物(Palmer 等人, *Nature*, 327:524-526(1987); Ignarro 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9265-9269(1987))。

[0245] 他汀类药物可以作为降血脂剂和/或适当的一氧化氮诱导物。此外,他汀类药物的使用和延缓黄斑变性发生或发展之间的关系也得到了证实。G. McGwin, 等人, *British Journal of Ophthalmology*, 87:1121-25(2003)。因此,当与通式(I)的化合物联合施用,他汀类药物能为患有眼部病症(例如黄斑变性和营养不良,和视网膜营养不良)的患者提供益处。仅仅是用于举例,适当的他汀类药物包括罗苏伐他汀、匹伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、西立伐他汀、美伐他汀、velostatin、氟伐他汀、康帕丁、洛伐他汀、达伐他汀、fluidostatin、阿伐他汀、阿伐他汀钙(其是阿伐他汀的半钙盐)和二氢康帕丁。

[0246] 仅仅用于举例,与通式(I)的化合物一起使用的适当抗炎剂可以包括,阿司匹林和其他水杨酸盐、色甘酸钠、奈多罗米、茶碱、齐留通、扎鲁司特、孟鲁司特、普伦司特、吡罗美辛和脂氧合酶抑制剂;非甾体类抗炎药(NSAIDs)(例如布洛芬和 naproxin);泼尼松、地塞米松、环氧合酶抑制剂(即 COX-1 和/或 COX-2 抑制剂,例如 NaproxenTM,或 CelebrexTM);他汀类药物(仅仅用于举例,罗苏伐他汀、匹伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、西立伐他汀、美伐他汀、velostatin、氟伐他汀、康帕丁、洛伐他汀、达伐他汀、fluidostatin、阿伐他汀、阿伐他汀钙(其是阿伐他汀的半钙盐)和二氢康帕丁);和分离的类固醇。

[0247] 适当的基质金属蛋白酶(MMPs)抑制剂也可以与通式(I)的化合物联合施用,以治疗与黄斑或视网膜营养不良相关的眼部病症或症状。已知 MMPs 水解细胞外基质的大部分组分。这些蛋白酶在许多生物学过程例如正常组织重建、胚胎发生、创口愈合和血管发生中发挥主要的作用。但是在许多疾病状况,包括黄斑变性中观察到了 MMP 的过度表达。已经鉴定出了许多 MMP,它们中的大部分是多域锌内肽酶。很多的金属蛋白酶抑制剂是已知的(参加例如 Whittaker M. 等人, *Chemical Reviews* 99(9):2735-2776(1999)对 MMP 抑制剂的综述)。MMP 抑制剂的代表性例子包括金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)(例如, TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 或 TIMP-4)、 α_2 -巨球蛋白、四环素类(例如,四环素、米诺环素和多西环素)、氧肟酸盐(例如 BATIMASTAT、MARIMISTAT 和 TROCADE)、螯合剂(例如, EDTA、半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、D-青霉胺和金盐)、合成的 MMP 片段、琥珀酰巯嘌呤、磷酸酯化物、和羟基甲酸。仅仅用于举例,可以与通式(I)的化合物联合使用的 MMP 的例子包括,上述任意的抑制剂。

[0248] 抗血管生成药或抗-VEGF 药的使用也能为患有黄斑变性和营养不良的患者

提供益处。可以与至少一种具有通式 (I) 结构的化合物联合使用的适当的抗血管生成药或抗-VEGF 药的例子包括 RhufabV2 (Lucentis™)、色氨酸-tRNA 合成酶 (TrpRS)、Eye001 (抗-VEGF PEG 化适体)、角鲨胺、Retaane™ 15mg (乙酸阿奈可他, 用于长效混悬液; Alcon, Inc.)、考布他汀 A4 前药 (CA4P)、Macugen™、Mifeprex™ (米非司酮 -ru486)、眼腱下用的曲安奈德、玻璃体内用的晶状曲安奈德、普琳司他 (AG3340- 合成的基质金属蛋白酶, Pfizer)、氟轻松 (包括氟青松眼内植入物, Bausch&Lomb/Control Delivery Systems)、VEGFR 抑制剂 (Sugen) 和 VEGF-Trap (Regeneron/Aventis)。

[0249] 可以用于缓解视力减弱的其他药物治疗可以与至少一种通式 (I) 的化合物联合使用。这些治疗包括但不限于, 与非热激光使用的药剂, 例如 Visudyne™、PKC 412、Endovion (NeuroSearch AJS)、神经营养因子, 仅仅是用于举例, 包括胶质细胞衍生的神经营养因子和睫状节神经细胞营养因子、diatazem、多佐胺、Phototrop、9- 顺式视黄醛、眼用药物 (包括回波治疗) 包括碘依可酯或二乙氧膦酰硫胆碱或碳酸酐酶抑制剂、AE-941 (AEterna Laboratories, Inc.)、Sirna-027 (Sirna Therapeutics, Inc.)、pegaptanib (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences)、神经营养因子 (仅仅用于举例, 包括 NT-4/5、Genentech)、Cand5 (AcuityPharmaceuticals)、ranibizumab (Genentech)、INS-37217 (InspirePharmaceuticals)、整联蛋白拮抗剂 (包括来自 Jerini AG 和 Abbott Laboratories 的那些)、EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.)、BDM-E (BioDiem Ltd.)、沙利度胺 (例如 EntreMed, Inc 制造的)、心营养因子 -1 (Genentech)、2- 甲氧雌二醇 (Allergan/Oculex)、DL-8234 (Toray Industries)、NTC-200 (Neurotech)、四硫钼酸盐 (University of Michigan)、LYN-002 (Lynkeus Biotech)、微海藻类化合物 (Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals)、D-9120 (Celltech Group pic)、ATX-S10 (Hamamatsu Photonics)、TGF-β 2 (Genzyme/Celtrix)、酪氨酸激酶抑制剂 (Allergan, SUGEN, Pfizer)、NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences)、Opt-24 (OPTIS France SA)、视网膜细胞神经节神经保护物 (Cogent Neurosciences)、N- 硝基吡啶衍生物 (Texas A&M University System)、KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals)、和环孢霉素 A。参见美国专利申请公开号 U. S. 20040092435。

[0250] 在任何情况中, 可以以任何顺序或者甚至同时施用多种的治疗剂 (其中之一是本文所述化合物之一)。如果是同时, 多种治疗剂可以以单个的统一形式, 或多重形式 (仅仅用于举例, 作为单个丸剂或作为两个分离的丸剂) 提供。治疗剂中的一种可以在多剂量中提供, 或者两者都可以在多剂量中提供。如果不是同时, 多剂量之间的时间可以从大于 0 周到小于 4 周不等。此外, 组合的方法、组合物和制剂并不限于只使用两种药剂; 我们设想可以使用多治疗组合。仅仅用于举例, 具有通式 (I) 结构的化合物可以与至少一种抗氧化剂和至少一种带负电荷的磷脂一起提供; 或具有通式 (I) 结构的化合物可以与至少一种抗氧化剂和至少一种一氧化氮产生的诱导物和至少一种带负电荷的磷脂一起提供; 等等。

[0251] 此外, 通式 (I) 的化合物也可以与为患者提供叠加或协同益处的方法联合使用。提出的或被认为会缓解视力减弱的已知方法包括但不限于“有限的视网膜移位”、光动力学疗法 (仅仅用于举例, 包括受体-靶向 PDT, Bristol-Myers Squibb, Co.; 用于与 PDT 一起注射的吡吩姆钠; 维替泊芬, QLT Inc.; 用于 PDT 的罗培泊芬, Miravent Medical Technologies; 用于 PDT 的他拉泊芬钠, Nippon Petroleum; 莫特沙芬, Pharmacyclics,,

Inc.)、反义寡核苷酸(仅仅用于举例,包括由 Novagali Pharma SA 测试的产品和 ISIS-13650, Isis Pharmaceuticals)、激光光凝术、玻璃疣激光术、黄斑裂孔手术、黄斑移位手术、可植入的小型窥镜、 Φ -移动血管造影术(也称显微激光疗法或供给管治疗)、质子束疗法、微刺激疗法、视网膜剥离和玻璃体手术、巩膜扣带术、黄斑下手术、经瞳孔的热疗法、光系统 I 疗法、使用 RNA 干扰(RNAi)、体外电渗法(也称作膜差别过滤法和电流疗法)、微芯片植入法、干细胞疗法、基因替代疗法、核酶基因疗法(包括用于低氧反应元件的基因疗法, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; PDEF 基因疗法, GenVec)、光感受器/视网膜细胞移植(包括可移植的视网膜上皮细胞, Diacrin, Inc.; 视网膜细胞移植, Cell Genesys, Inc.)、和针灸。

[0252] 可以为个体提供益处的其他组合包括使用遗传学测试来确定个体是否是已知的与某些眼部病症有关的突变基因的携带者。仅仅用于举例,人们认为,人 ABCA4 基因的缺陷与 5 种不同的视网膜表型有关,包括 Stargardt 病、视锥-视杆营养不良、与年龄相关的视网膜变性和视网膜色素变性。参见例如 Allikmets 等人, Science, 277:1805-07(1997); Lewis 等人, Am. J. Hum. Genet., 64:422-34(1999); Stone 等人, Nature Genetics, 20:328-29(1998); Allikmets, Am. J. Hum. Gen., 67:793-799(2000); Klevering, 等人, Ophthalmology, 111:546-553(2004)。此外,在 ELOV4 基因中的突变会导致 Stargardt 病的常染色体显性形式。参见 Karan, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (2005)。具有上述任意突变体的患者预期在本文所述方法中会获得治疗性和/或预防性的益处。

[0253] 通式 (I) 的化合物的合成

[0254] 可以用本领域技术人员已知的标准合成技术或将本领域已知的方法与本文所述方法联合使用合成通式 (I) 的化合物。参见,例如美国专利申请公开 2004/0102650; Um, S. J., 等人, Chem. Pharm. Bull., 52:501-506(2004)。此外,数种通式 (I) 的化合物,例如芬维 A 胺,可以购自不同的商品供应商。作为进一步的指导,也可以利用下列的合成方法。

[0255] 通过亲电子试剂和亲核试剂反应形成共价键

[0256] 共价键和获得共价键的前体官能团的所选择的例子在标题为“共价键和其前体的例子”的表中给出。前体官能团以亲电子试剂基团和亲核基团试剂显示。在有机物上的官能团可以直接附着,或经任意有用的间隔基或下述定义的连接体附着。

[0257] 表 1:共价键和其前体的例子

[0258]

共价键产物	亲电子试剂	亲核试剂
氨甲酰	活化酯	胺/苯胺
氨甲酰	酰基叠氮	胺/苯胺
氨甲酰	酰基卤	胺/苯胺
酯	酰基卤	醇/苯酚
酯	酰基腈	醇/苯酚
氨甲酰	酰基腈	胺/苯胺
亚胺	醛	胺/苯胺
脞	醛或酮	肼
脞	醛或酮	羟基胺
烷基胺	烷基卤	胺/苯胺
酯	烷基卤	羧酸

硫醚	烷基卤	硫醇
酯	烷基卤	醇 / 苯酚
硫醚	烷基磺酸盐	硫醇
酯	烷基磺酸盐	羧酸
酯	烷基磺酸盐	醇 / 苯酚
酯	酞	醇 / 苯酚
氨甲酰	酞	胺 / 苯胺
苯硫酚	芳基卤	硫醇
芳基胺	芳基卤	胺
硫醚	azindine	硫醇
硼酸酯	硼酸盐	二醇
氨甲酰	羧酸	胺 / 苯胺
酯	羧酸	醇
肼	酰肼	羧酸
N- 酰基脲或酞	碳二亚胺	羧酸

[0259]

酯	重氮烷	羧酸
硫醚	环氧化物	硫醇
硫醚	卤代乙酰胺	硫醇
氨基三嗪	卤代三嗪	胺 / 苯胺
三嗪醚	卤代三嗪	醇 / 苯酚
脘	亚胺酯	胺 / 苯胺
脲	异氰酸盐	胺 / 苯胺
氨基甲酸乙酯	异氰酸盐	醇 / 苯酚
硫脲	异硫氰酸盐	胺 / 苯胺
硫醚	马来酰亚胺	硫醇
亚磷酸酯	亚磷酸酯	醇
甲硅烷基醚	甲硅烷基卤化物	醇
烷基胺	磺酸酯	胺 / 苯胺
硫醚	磺酸酯	硫醇
酯	磺酸酯	羧酸
酯	磺酸酯	醇
氨苯磺胺	磺酰基卤化物	胺 / 苯胺
磺酸酯	磺酰基卤化物	苯酚 / 醇

[0260]

酯	重氮烷	羧酸
硫醚	环氧化物	硫醇
硫醚	卤代乙酰胺	硫醇
氨基三嗪	卤代三嗪	胺 / 苯胺
三嗪醚	卤代三嗪	醇 / 苯酚
脘	亚胺酯	胺 / 苯胺
脲	异氰酸盐	胺 / 苯胺
氨基甲酸乙酯	异氰酸盐	醇 / 苯酚
硫脲	异硫氰酸盐	胺 / 苯胺
硫醚	马来酰亚胺	硫醇
亚磷酸酯	亚磷酸酯	醇
甲硅烷基醚	甲硅烷基卤化物	醇

烷基胺	磺酸酯	胺 / 苯胺
硫醚	磺酸酯	硫醇
酯	磺酸酯	羧酸
酯	磺酸酯	醇
氨苯磺胺	磺酰基卤化物	胺 / 苯胺
磺酸酯	磺酰基卤化物	苯酚 / 醇

[0261] 一般地,碳亲电子试剂对互补的亲核试剂,包括碳亲核试剂的攻击是敏感的,其中进行攻击的亲核试剂为碳亲电子试剂带来一个电子对,以便在亲核试剂和碳亲电子试剂之间形成新键。

[0262] 适当的碳亲核试剂包括但不限于,烷基、烯基、芳基和炔基 Grignard,有机锂化物,有机锌化物,烷基-、烯基-、芳基-和炔基-锡药剂(有机锡化物),烷基-、烯基-、芳基-和炔基-硼烷试剂(有机硼烷化物和有机硼酸盐);这些碳亲核试剂具有在水或极性有机溶剂中动力学稳定的优点。其他碳亲核试剂包括磷的内鎊盐、烯醇和烯醇化物试剂;这些碳亲核试剂具有相对容易由合成有机化学领域技术人员公知的前体产生的优点。当与碳亲电子试剂一起使用时,碳亲核试剂在碳亲核试剂和碳亲电子试剂之间形成了新的碳碳键。

[0263] 适合与碳亲电子试剂偶合的非碳亲核试剂包括但不限于伯胺和仲胺、硫醇、硫醇化物和硫醚、醇、醇盐、叠氮化物、氨基脲等等。当与碳亲电子试剂一起使用时,这些非碳亲核试剂典型地形成了杂原子键(C-X-C),其中X是杂原子,例如氧或氮。

[0264] 保护基的使用

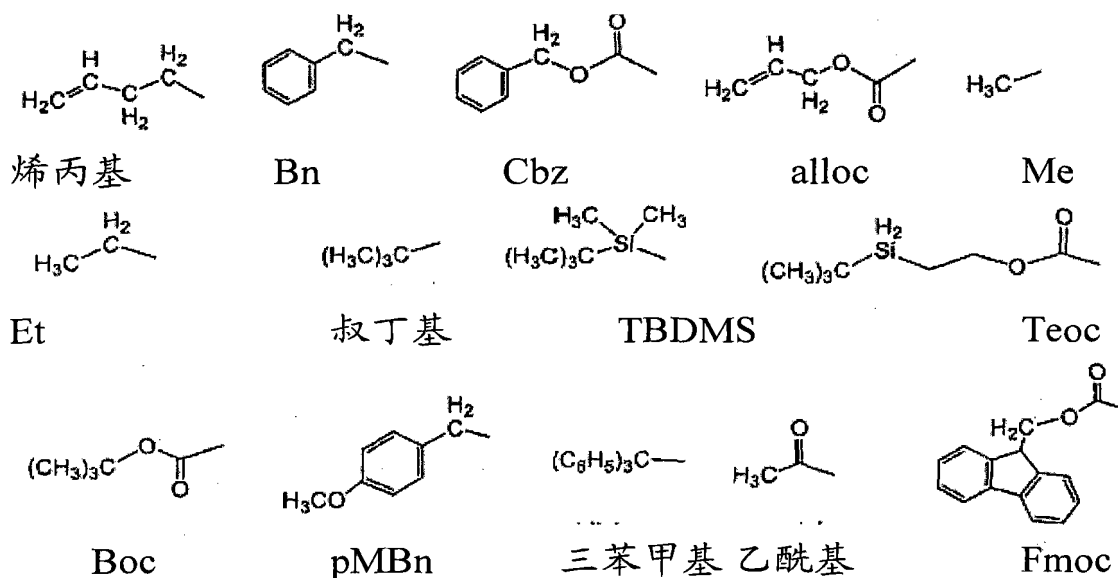
[0265] 术语“保护基”是指在除去该保护基前阻断一些或全部的反应性部分并阻止这些基团参加化学反应的化学部分。优选每个保护基可以通过不同的方法除去。在完全不同的反应条件下切除的保护基满足了对差别性除去的要求。可以用酸、碱和氢解来除去保护基。基团例如三苯甲基、二甲氧三苯甲基、乙缩醛和叔丁基二甲硅烷基是对酸敏感的,可以在用Cbz基保护的氨基存在下用于保护羧基和羟基反应性部分,其可用氢解和对碱敏感的Fmoc基来除去。羧酸和羟基反应性部分可以在用对酸敏感的基团例如叔丁基氨基甲酸酯或用对酸和碱稳定但可水解除去的氨基甲酸酯阻断的氨基存在下,用对碱敏感的基团来阻断,例如但不限于,甲基、乙基和乙酰基。

[0266] 羧酸和羟基反应性部分也可以用可水解除去的保护基例如苄基来阻断,而能与酸通过氢键结合的胺基可以用对碱敏感的基团例如Fmoc来阻断。作为一个例子,羧酸反应性部分可以通过转化成如本文举例的简单的酯类衍生物获得保护,或者它们可以用可氧化除去的保护基例如2,4-二甲氧苄基阻断,而共存的氨基可以用对氟化物不稳定的甲硅烷基氨基甲酸酯来阻断。

[0267] 在酸和碱保护基存在下,烯丙基阻断基是有用的,因为烯丙基是稳定的,并且随后可以通过金属或 π -酸催化剂除去。例如在对酸敏感的叔丁基氨基甲酸酯或对碱稳定的乙酰胺保护基存在下,用烯丙基阻断的羧酸可以用Pd₀-催化反应脱保护。另一形式的保护基是化合物或中间体可以附着到其上的树脂。只要残基附着到树脂上,就能阻断官能团,并且不发生反应。一旦从树脂中释放出来,官能团就可以用于反应。

[0268] 典型地,阻断/保护基可以选自:

[0269]



[0270] 在 Greene 和 Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第三版, John Wiley&Sons, New York, NY, 1999 中描述了其他保护基, 将其整体引入本文作为参考。

[0271] 用作说明的实施例

[0272] 下面的实施例用于说明测定通式 (I) 的化合物的有效性和安全性的方法。这些实施例仅仅是用于说明的目的, 而不是限制所述权利要求的范围。

[0273] 人体研究

[0274] 黄斑或视网膜变性的检测。可以用血管造影术鉴定眼中的异常血管。该鉴定可以帮助确定患者是否是使用候选物或其他治疗方法来阻止或预防进一步的视觉丧失的候选者。血管造影术对于治疗的随访以及进一步评价任何新血管的生长都是有用的。

[0275] 荧光素血管造影术 (荧光素血管造影、荧光素血管透照法) 是一种对眼睛后部的脉络膜和视网膜循环显影的技术。由静脉内注射荧光素染料, 然后行多帧照相术 (血管造影术)、检视镜评价 (血管透照法) 或 Heidelberg 视网膜血管造影术 (一种共焦扫描激光系统)。此外, 可以用 OCT 来检测视网膜, 这是一种获得视网膜的高分辨率切面显像的非侵入性方法。通过分析为视网膜提供营养的血管的渗漏或可能的损害, 荧光素造影术可以用于评价范围广泛的视网膜和脉络膜疾病。通过 Berkow 等人, *Am. J. Ophthalmol.* 97: 143-7 (1984), 它也可以用于评价视神经和虹膜的异常。

[0276] 类似地, 使用靛青绿的血管造影术可以用于眼睛后部循环的显像。其中荧光素对于研究视网膜循环是最有效的, 靛青较好地用于观测较深的脉络膜血管层。当单用荧光素染料不能观测到新生血管生成时, 使用靛青血管造影术是有帮助的。

[0277] 具有通式 (I) 结构的化合物用于人的适当剂量可以用标准剂量增加研究来确定。但是在研究所述化合物在治疗癌症中的应用中可以获得一些指导。例如, 将 $4800\text{mg}/\text{m}^2$ 剂量的芬维 A 胺——一种具有通式 (I) 结构的化合物, 施用于患有各种癌症的患者。这些剂量每天施用 3 次, 只观测到很小的毒性。但是, 根据对可达到的血浆水平的上限的观测, 这些患者的推荐剂量是 $900\text{mg}/\text{m}^2$ 。此外, 芬维 A 胺的生物利用度随着进餐而升高, 在高脂肪餐后其血浆浓度是糖类膳食后的 3 倍。

[0278] 在人类中偶有观测到夜盲症, 提示我们在正常治疗剂量下对视紫质再生有显著的

削弱。基于这些数据,我们提出,RPE 组织中芬维 A 胺的抑制浓度在与治疗癌症的人类治疗剂量类似或可能更低的剂量下达到。

[0279] 实施例 1:测定通式 (I) 的化合物治疗黄斑变性的效力

[0280] 对于预试,所有的患者都经过常规的眼科学检查,包括荧光素血管造影术,测定视敏度、电生理学参数和生化和流变参数。加入标准如下:至少一只眼睛的视敏度在 20/160 到 20/32 之间,AMD 的指征例如玻璃疣、晕轮状萎缩、色素凝集、色素上皮剥离或视网膜下新生血管形成。将怀孕或者主动母乳喂养婴儿的患者排除出本研究。

[0281] 将诊断为黄斑变性或其眼中 A2E、脂褐素或玻璃疣进行性形成的 200 名患者分成约 100 名患者的对照组和 100 名患者的实验组。以每日为基础给实验组施用芬维 A 胺。用与给实验组施用芬维 A 胺相同的方法给对照组施用安慰剂。

[0282] 给患者施用芬维 A 胺或安慰剂可以是口服或胃肠外施用,其量可以有效地抑制黄斑变性的发展或复发。有效剂量的范围是约 1-4000mg/m²,每日可高达三次。

[0283] 一种在对照和实验组中测定黄斑变性进展的方法是通过早期治疗糖尿病性视网膜病研究 (ETDRS) 图表 (Lighthouse, Long Island, NY) 用线条判定法和强制选择法 (Ferris 等人 *Am J Ophthalmol*, 94 :97-98 (1982)) 测定的最佳矫正视敏度。视敏度记录为 logMAR。在 ETDRS 图表上的一条线条的变化相当于 0.1logMAR。在对照和实验组中测定黄斑变性进展的另一种典型的方法包括使用视野检查,包括但不限于 Humphrey 视野检查,和测定 / 监测患者眼中 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺和 / 或 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺的自发荧光或吸收光谱。可以用不同的设备来测定自发荧光,包括但不限于共焦扫描激光检眼镜。参见 Bindewald, 等人, *Am. J. Ophthalmol.*, 137 : 556-8 (2004)。

[0284] 在对照和实验组中测定黄斑变性进展的其他方法包括采用眼底照相、用 Heidelberg 视网膜血管造影观测自发荧光随时间的变化 (或者,采用 M. Hammer, 等人 *Ophthalmology*, 2004 年 4 月 7 日 [专利前的 Epub] 所述的技术),和在基线、3、6、9 和 12 月的随访中采用荧光素血管造影术。形态变化的资料包括下列的变化 (a) 玻璃疣的大小、性质和分布 ;(b) 脉络膜新生血管形成的发展和进展 ;(c) 其他间隔的眼底变化或异常 ;(d) 阅读速度和 / 或阅读敏度 ;(e) 暗点大小 ;或 (f) 地理性萎缩损害的大小和数量。此外,任选使用阿姆斯勒方格表测定和颜色实验。

[0285] 为评价在施用药物期间统计学上的视觉改善,检查者使用 ETDRS (LogMAR) 图表,和标准化折射和视敏度方案。评价从基线到可获得的 治疗后间隔随访的平均 ETDRS (LogMAR) 最佳矫正视敏度 (BCVA) 可以帮助确定统计学上的视觉改善。

[0286] 为了评价对照组和实验组之间的 ANOVA (各组之间的方差分析),用 SAS/STAT 软件 (SAS Institutes Inc, Cary, North Carolina) 用非结构协方差的反复测定分析和两组 ANOVA 来比较从基线到可获得的 治疗后间隔随访的 ETDRS (LogMAR) 视敏度的平均变化。

[0287] 在研究开始后的毒性评价包括在下一年每 3 个月、在第三年每 4 个月以及再后一年每 6 个月检查。也可以在这些访问中评价芬维 A 胺和其代谢物 N-(4- 甲氧苯基) 视黄酰胺的血浆水平。毒性评价包换使用芬维 A 胺的患者,以及对照组的患者。

[0288] 实施例 2:测定通式 (I) 的化合物减少 A2E 产生的效力

[0289] 如实施例 1 所述的相同的实验设计,包括预试、施用、服用和毒性评价方案,也可以用于测定通式 (I) 的化合物减少或限制患者眼中 A2E 产生的效力。

[0290] 测定或监测 A2E 产生的方法包括采用患者眼中的 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺和 / 或 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺的自发荧光测定。可以用各种设备来测定自发荧光,包括但不限于共焦扫描激光检视镜,参见 Bindewald, 等人, *Am. J. Ophthalmol.*, 137 :556-8 (2004), 或使用如实施例所述的自发荧光或吸收光谱测定技术。其他可以作为特定治疗效力的替代标志的测定包括使用视敏度和视野检查,阅读速度和 / 或阅读敏度检查,测定暗点和 / 或地理性萎缩损害的大小和数量,如实施例 1 所述。可以使用实施例 1 所述的统计学分析。

[0291] 实施例 3 :测定通式 (I) 的化合物减少脂褐素产生的效力

[0292] 如实施例 1 所述的相同的实验设计,包括预试、施用、服用和毒性评价方案,也可以用于测定通式 (I) 的化合物减少或限制患者眼中脂褐素产生的效力。也可以使用实施例 1 所述的统计学分析。

[0293] 可以作为特定治疗效力的替代标志的测定包括使用视敏度和视野检查,阅读速度和 / 或阅读敏度检查,测定暗点和 / 或地理性萎缩损害的大小和数量,测定 / 监测患者眼中某些化合物的自发荧光,如实施例 1 所述。

[0294] 实施例 4 :测定通式 (I) 的化合物减少玻璃疣产生的效力

[0295] 如实施例 1 所述的相同的实验设计,包括预试、施用、服用和毒性评价方案,也可以用于测定通式 (I) 的化合物减少或限制患者眼中玻璃疣产生或形成的效力。也可以使用实施例 1 所述的统计学分析。

[0296] 在对照和实验组中测定玻璃疣进行性形成的方法包括在基线、第 3, 6, 9 和 12 月的随访中采用眼底照相和荧光素血管造影术。形态变化的资料包括下列的变化 (a) 玻璃疣的大小、性质和分布 ;(b) 脉络膜新生血管形成的发展和进展 ;(c) 其他间隔的眼底变化或异常。其他可以作为特定治疗效力的替代标志的测定包括使用视敏度和视野检查,阅读速度和 / 或阅读敏度检查,测定暗点和 / 或地理性萎缩损害的大小和数量,测定 / 监测患者眼中某些化合物的自发荧光,如实施例 1 所述。

[0297] 实施例 5 :黄斑营养不良的遗传学测定

[0298] 人们认为,人 ABCA4 基因的缺陷与 5 种不同的视网膜表型有关,包括 Stargardt 病、视锥 - 视杆营养不良、与年龄相关的视网膜变性 (干性和湿性) 和视网膜色素变性。参见例如 Allikmets 等人, *Science*, 277 :1805-07 (1997) ;Lewis 等人, *Am. J. Hum. Genet.*, 64 :422-34 (1999) ;Stone 等人, *Nature Genetics*, 20 :328-29 (1998) ;Allikmets, *Am. J. Hum. Gen.*, 67 :793-799 (2000) ;Klevering, 等人, *Ophthalmology*, 111 :546-553 (2004)。此外,在 ELOV4 基因中的突变会导致 Stargardt 病的常染色体显性形式。参见 Karan, 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2005)。可以通过下列任意的测定来诊断患者患有 Stargardt 病 : (a) 直接测序的突变检测策略,包括测定 ABCA4 或 ELOV4 所有外显子和侧翼内含子区域的序列突变 ; (b) 基因组的 Southern 分析 ;(c) 微阵列分析,包括所有已知的 ABCA4 或 ELOV4 变异体 ;和 (d) 液相色谱串联质谱法分析,并联合使用抗体的免疫细胞化学分析和 Western 分析。眼底照相、荧光素血管造影和扫描激光检视镜成像连同患者和他 / 或她的家庭病史可以预

测和 / 或证实该诊断。

[0299] 小鼠和大鼠研究

[0300] 在 $abca4^{-/-}$ 小鼠中阻断 A2E 产生的通式 (I) 的化合物的最佳剂量可以用标准剂量增加研究来确定。下面是一个说明性的方法, 利用的是芬维 A 胺——一种具有通式 (I) 结构的化合物。但是, 相似的方法也可用于其他具有通式 (I) 结构的化合物。

[0301] 优选在包括人治疗剂量的剂量下确定芬维 A 胺对光适应小鼠视网膜中的全反式视黄醛的作用。优选的方法包括用单一的早晨腹膜内剂量处理小鼠。在整天中, 可能需要增加注射频率来维持视网膜中全反式视黄醛的已降低的水平。

[0302] 敲除 ABCA4 的小鼠。 ABCA4 编码 rim 蛋白 (RmP), 其为视锥和视杆光感受器的外节盘中的 ATP- 结合盒 (ABC) 运载体。RmP 运载的底物是未知的。 $abca4$ 基因中的敲除突变产生的小鼠可以用于 RmP 功能的研究以及候选物质有效性的体内筛选, 参见 Weng 等人, *Cell*, 98 :13-23 (1999)。这些动物表现出复杂的眼部表型: (i) 减慢了光感受器变性, (ii) 延迟了在暴露于光中以后视杆敏感度的恢复, (iii) 在光漂白后, 提高光感受器外节中的 atRAL 并降低 atROL, (iv) 组成地提高外节中的磷脂酰乙醇胺 (PE) 含量, 和 (v) 脂褐素在 RPE 细胞中蓄积。参见, Weng 等人, *Cell*, 98 :13-23 (1999)。

[0303] 可以通过两种技术来监测处理和未处理的野生型和 $abca4^{-/-}$ 小鼠中光感受器变性的速率。一种是通过 ERG 分析在不同时间对小鼠进行研究, 其采纳自临床诊断程序。参见 Weng 等人, *Cell*, 98 :13-23 (1999)。将电极置于已麻醉小鼠的角膜表面, 从视网膜记录对闪光的电应答。光感受器的光诱导超极化产生的 α -波的振幅是光感受器变性的灵敏指标。参见, Kedzierski 等人, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, 38 :498-509 (1997)。对活的动物进行 ERG。因此, 可以在时间过程研究中反复分析相同的小鼠。定量光感受器变性的确定技术是视网膜切片的组织学分析。通过计数在外核层中光感受器核的行数来确定在每个时间点视网膜中剩余的光感受器的数量。

[0304] 组织提取。 在 1ml 的 PBS pH 7.2 中将眼睛样本在冰上解冻, 然后用 Dual1 玻璃-玻璃均化器将其手工匀化。在加入 1ml 氯仿 / 甲醇 (2 : 1, v/v) 后将样本进一步匀化。转移样本至硅酸硼管中, 将脂质萃取到 4ml 氯仿中。用 3ml PBS, pH 7.2 洗涤有机萃取物, 然后将样本以 3,000xg 离心分离 10 分钟。倒出氯仿相, 用另外的 4ml 氯仿再萃取水相。离心分离后, 合并氯仿相, 在氮气中将样本干燥。将样本的残余物重悬浮在 100 μ l 己烷中并如下所述通过 HPLC 进行分析。

[0305] HPLC 分析。 在 Agilent Zorbax Rx-SiI 柱 (5 μ m, 46X250mm) 上, 使用装有荧光和二极阵列监测器的 Agilent 1100 系列液体色谱仪来完成色谱分离。以 1ml/ 分钟的速度递送流动相 (己烷 / 2- 丙醇 / 乙醇 / 25mMKH₂PO₄, pH 7.0 / 乙酸 ; 485/376/100/50/0.275, v/v)。通过与可信标准品的保留时间和吸收光谱比较来进行样本的峰鉴定。报告的数据为从荧光监测器获得的峰值荧光 (L.U.)。

[0306] 实施例 6 : 芬维 A 胺对 A2E 蓄积的作用

[0307] 给实验组小鼠施用芬维 A 胺, 给对照组小鼠单独施用 DMSO, 分析 A2E 的蓄积。实验组每天在 10 到 25 μ l DMSO 中给予 2.5 到 20mg/kg 的芬维 A 胺。如果在最高剂量 50mg/mg 时没有观察到效果, 则试验更高的剂量。对照组单独给予 10 到 25 μ l DMSO 注射液。实验或对照物质通过腹膜内 (i. p.) 注射不超过 1 个月的不同实验时间段施用于小鼠。

[0308] 为测定 $abca4^{-/-}$ 小鼠 RPE 中 A2E 的蓄积, 每天通过腹膜内注射为 2 个月大的 $abca4^{-/-}$ 小鼠提供 2.5 到 20mg/kg 的芬维 A 胺。一个月后, 杀死实验组和对照组的小鼠, 通过 HPLC 测定 RPE 中 A2E 的水平。此外, 用 UV/Vis 分光光度计监测 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺和 / 或 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺的自发荧光或吸收光谱。

[0309] 实施例 7 : 芬维 A 胺对脂褐素蓄积的作用

[0310] 给实验组小鼠施用芬维 A 胺, 给对照组小鼠单独施用 DMSO, 分析脂褐素的蓄积。实验组每天在 10 到 25 μ l DMSO 中给予 2.5 到 20mg/kg 的芬维 A 胺。如果在最高剂量 50mg/mg 时没有观察到效果, 则试验更高的剂量。对照组单独给予 10 到 25 μ l DMSO 注射液。实验或对照物质通过腹膜内注射不超过 1 个月的不同实验时间段施用于小鼠。或者, 可以用递送实验或对照物质的泵以 0.25 μ l/ 小时的速度在不超过 1 个月的不同实验时间段内植入小鼠中。

[0311] 为测定芬维 A 胺对芬维 A 胺处理和未处理的 $abca4^{-/-}$ 小鼠中脂褐素产生的作用, 可以用电子或荧光显微镜法检查眼睛。

[0312] 实施例 8 : 芬维 A 胺对视杆细胞死亡或视杆功能损害的作用

[0313] 给实验组小鼠施用芬维 A 胺, 给对照组小鼠单独施用 DMSO, 测定芬维 A 胺对视杆细胞死亡或视杆功能损害的作用。实验组每天在 10 到 25 μ l DMSO 中给予 2.5 到 20mg/kg 的芬维 A 胺。如果在最高剂量 50mg/mg 时没有观察到效果, 则试验更高的剂量。对照组单独给予 10 到 25 μ l DMSO 注射液。实验或对照物质通过腹膜内注射不超过 1 个月的不同实验时间段施用于小鼠。或者, 可以用递送实验或对照物质的泵以 0.25 μ l/ 小时的速度在不超过 1 个月的不同实验时间段内植入小鼠中。

[0314] 每天 2.5 到 20mg/kg 的芬维 A 胺处理约 8 周的小鼠, 通过监测 ERG 记录和进行视网膜组织学检查来测定芬维 A 胺对视杆细胞死亡或视杆功能损害的作用。

[0315] 实施例 9 : 测定对光损害的保护作用

[0316] 下列研究来自于 Sieving, P. A., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 98 : 1835-40 (2001)。为进行慢性光暴露研究, 将 7 周大的雄性 Sprague-Dawley 大白鼠饲养在 5 勒白荧光的 12 :12 小时光 / 暗循环中。通过腹膜内注射在 0.18ml DMSO 中的 20-50mg/kg 芬维 A 胺, 为慢性大鼠每天给药 3 次, 共 8 周。对照组通过腹膜内注射接受 0.18ml DMSO。最后一次注射后 2 天, 杀死大鼠。如果在最高剂量 50mg/mg 时没有观察到效果, 则试验更高的剂量。

[0317] 对于急性光暴露研究, 将大鼠进行暗适应过夜, 在暗淡的红光下单独腹膜内注射在 0.18ml DMSO 中的 20-50mg/kg 芬维 A 胺, 并在 ERG 测定前, 在暴露于漂白光中之前保持在黑暗中 1 小时。将大鼠暴露在 2,000 勒白荧光中 48 小时。7 天后记录 ERG, 并立即进行组织学检查。

[0318] 麻醉大鼠并取出眼睛。在横穿两个半球的每 200 μ m 测定外核层厚度和视杆外节 (ROS) 长度的细胞计数, 平均该数目得到横穿整个视网膜的细胞改变的量度。在治疗的第 4 和 8 周记录慢性大鼠的 ERG。在急性啮齿目动物中, 通过使用不引起视锥作用的刺激通过暗适应 ERG 来跟踪视杆从漂白光中的恢复。用光适应的 ERG 来跟踪视锥的复原。在 ERG 前,

在弱的红光中准备好动物并麻醉。扩张瞳孔,通过使用金线角膜环来同时记录两只眼睛的 ERG。

[0319] 实施例 10 :涉及芬维 A 胺和异维甲酸的联合治疗

[0320] 用如实施例 6-9 所述的方法来测定小鼠和 / 或大鼠,但是具有另外的两个分组。在另外两个分组之一中,用提高剂量的异维甲酸,从每天 5mg/kg 至每天 50mg/kg 来治疗几组小鼠和 / 或大鼠。在第二个另外的分组中,用每天 20mg/kg 的芬维 A 胺和提高剂量的每天 5mg/kg 至每天 50mg/kg 异维甲酸的组合来治疗几组小鼠和 / 或大鼠。如实施例 6-9 所述来测定联合治疗的益处。

[0321] 实施例 11 :在 *abca4* 无效突变小鼠中芬维 A 胺对脂褐素 (和 / 或 A2E) 蓄积的效力 :阶段 I——剂量响应和对血清视黄醇的作用

[0322] 在动物和人受试者中 HPR 降低血清视黄醇的效果引导我们去探索 其也可能实现降低脂褐素和毒性二 - 类视黄醇耦合物 A2E 的可能性。该途径的原理是基于科学证据的两个独立的线索 :1) 通过抑制已知的视觉循环酶 (11- 顺式视黄醇脱氢酶) 降低眼维生素 A 浓度导致了脂褐素和 A2E 显著减少 ;2) 用缺乏维生素 A 的食物维持的动物显示出脂褐素蓄积明显减小。因此,本实施例的目的是检查 HPR 在动物模型中的效果,该动物模型为 *abca4* 无效突变小鼠,用于证明眼组织中脂褐素和 A2E 的大量蓄积。

[0323] 通过检查 HPR 对血清视黄醇的作用来开始最初的研究。将动物分成 3 组,分别给予 DMSO, 10mg/kg HPR, 或 20mg/kg HPR, 共 14 天。在研究期结束时,收集动物的血液,制备血清,用反相 LC/MS 分析血清的乙腈提取液。进行 UV- 可见光谱和质量 / 电荷分析来证实洗脱峰的鉴定。从这些分析中获得的样本色谱图显示的是 :附图 1a- 接受 HPR 载体 DMSO 的 *abca4* 无效突变小鼠的提取物 ;附图 1b-10mg/kg HPR ;附图 1c-20mg/kg HPR。该数据清楚地表明了血清视黄醇剂量依赖性地减少。定量数据表明,当为 10mg/kg HPR 时,全反式视黄醇降低了 40%,见附图 11。对于 20mg/kg HPR,血清视黄醇降低了 72%,见附图 11。在血清中 (20mg/kg HPR) 视黄醇和 HPR 的稳态浓度分别确定为 2.11 μ M 和 1.75 μ M。

[0324] 基于这些发现,我们试着进一步探索在 HPR 治疗期间视黄醇减少的机理。一个站得住脚的假设是,通过在 RBP 上的视黄醇结合位点处竞争, HPR 可以取代视黄醇。与视黄醇类似, HPR 将会在蛋白质荧光的区域吸收 (猝灭) 光能 ;然而,与视黄醇不同, HPR 不会发射荧光。因此,人们可以通过观测蛋白质 (340nm) 和视黄醇 (470nm) 荧光的减少来测定视黄醇从 RBP 全蛋白质中的取代。我们用与上述 14 天 20mg/kg HPR 实验所确定的浓度类似的 RBP- 视黄醇 /HPR 浓度完成了竞争结合测定。从该测定中获得的数据表明,在生理温度下 HPR 从 RBP 全蛋白质中有效地取代了视黄醇,见附图 3b。HPR 和 RBP 的竞争性结合是剂量依赖性的和可饱和的。在对照测定中,视黄醇荧光的降低伴随着蛋白质荧光的增加,见附图 3a。该效应被确定为是由于温度效应,即 RBP- 视黄醇解离常数在 37 $^{\circ}$ C 下随着时间的增加而提高 (亲和力降低)。总之,这些数据表明,相对于 RBP 全蛋白质 (例如, 1.0 μ M HPR, 0.5 μ M MRBP), 超过等摩尔当量的 HPR 的增加,将会使显著比例的视黄醇在体内从 RBP 中被取代。

[0325] 实施例 12 :在 *abca4* 无效突变小鼠中芬维 A 胺对脂褐素 (和 / 或 A2E) 蓄积的效力 :阶段 II——*abca4* 无效突变小鼠的长期治疗

[0326] 我们开始一个为期一月的研究来评价在 *abca4* 无效突变小鼠中 HPR 降低 A2E 和

A2E 前体的效果。每天将 HPR (20mg/kg, 腹膜内) 在 DMSO 中施用于 abca4 无效突变小鼠 (BL6/129, 2 个月大), 共 28 天。对照组的年龄 / 品种相匹配的小鼠仅接受 DMSO 载体。在 0、14 和 28 天 (每组 $n = 3$) 对小鼠取样, 摘出眼珠并萃取氯仿可溶的组分 (脂类、类视黄醇和脂类-类视黄醇偶联物)。用颈脱位法处死小鼠, 摘出眼珠, 并分别在冻存管中急剧冰冻。然后用装有联机荧光检测器的 HPLC 分析样本提取物。该研究的结果表明 A2E 前体 A2PE-H2 显著地在早期减少, 见附图 4a, 随后 A2E 减少, 见附图 4b。定量分析表明在 HPR 治疗 28 天后, A2PE-H2 有 70% 的减少, A2E 有 55% 的减少。可以用类似的研究来确定 HPR 治疗对视网膜电描记和形态学表型的影响。

[0327] 实施例 13: 在视网膜色素上皮中芬维 A 胺对维生素 A 内稳态的影响

[0328] 我们用体外生化测定检查了 HPR 对视觉循环的酶或蛋白质的作用。具体地, 研究了由牛 RPE 制备的膜对外源性全反式视黄醇的利用。来自我们研究的代表性数据如附图 5 所示。抑制数据的动力学分析表明, 在约 $20 \mu\text{M}$ HPR 时发生了 LRAT 的半数最大抑制作用。在 RPE 中 HPR 的稳态水平 (从每天腹膜内给予 20mg/kg HPR 共 28 天的小鼠确定) 范围是 $5-10 \mu\text{M}$ 。为此目的, 我们在与上述相似的测定中检查了 $10 \mu\text{M}$ HPR 对全反式视黄基酯和 11- 顺式视黄醇的产生的效果。除了全反式视黄醇利用降低 (附图 6c) 和全反式视黄基酯合成减少 (附图 6a) 外, 该数据表明了对 11- 顺式视黄醇生物合成的统计学显著的抑制作用 ($p < 0.05$, 用星号表示), 见附图 6b。在内源性类视黄醇存在下, 外源性全反式视黄醇的利用是极低的, 11- 顺式视黄醇仅由内源性全反式视黄基酯产生。事实上, 当我们在内源性视黄基酯存在下进行实验时, 我们没有观测到 HPR 对 11- 顺式视黄醇产生的作用; 但是, LRAT 活性的抑制持续存在。因此, 视黄酸影响视觉循环中至少两个靶点。我们已经确定, 通过 LRAT 抑制和全反式视黄基酯水平的降低, 发生了 11- 顺式视黄醇生物合成的 HPR 诱导的降低。在这种情况下, 异构酶会缺乏底物, 11- 顺式视黄醇的产生下降。

[0329] 在凝集物中, 几项研究清楚地表明, 存在多个调节视觉生色团生物合成的靶点。然后降低的视觉生色团导致了产生 A2E 的类视黄醇——全反式视黄醛的减少。因此, 用 HPR 治疗不仅对降低递送到眼中的视黄醇的量具有全身效应, 而且也对降低全反式视黄醇的稳态水平具有细胞内效应。如上述证据显示, 最终的结果是降低了 RPE 中的 A2E。

[0330] 因此该研究的结果之一是, 黄斑变性和营养不良的治疗, 包括但不限于在哺乳动物眼中控制全反式视黄醛、N- 亚视黄基 -N- 视黄基乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、地理性萎缩、暗点、脂褐素和玻璃疣的形成, 可以通过施用降低血清视黄醇水平和调节视觉循环中至少一种酶或蛋白质例如 LRAT 的活性的一种或多种药剂来完成。治疗黄斑或视网膜变性和营养不良, 或者减轻与所述疾病或病症相关的症状的该双重作用途径, 被认为是一种可普遍接受的途径, 并且如本文所述用芬维 A 胺已经观测到。此外, (a) 施用一种或多种降低患者血清视黄醇水平但不调节视觉循环中的至少一种酶的药剂, 或 (b) 施用一种或多种调节视觉循环中的至少一种酶但不降低患者血清视黄醇水平的药剂, 本身也可以提供对所述营养不良和变性或与其相关的症状的治疗。如本文所述的测定可以用于选择其它具有所述双重作用的药剂, 包括选自具有通式 (I) 结构的化合物的药剂, 以及其他药剂。推定的先导化合物包括已知或证明会影响视黄醇的血清水平的其它药剂。

[0331] 为确定 HPR 在体内对视觉循环酶或蛋白质的作用,可以在 HPR- 处理的小鼠和年龄 / 品种匹配的对照小鼠中检查视紫质从内源性类视黄醇贮存库中的再生。

[0332] 实施例 14 :涉及芬维 A 胺和他汀类药物的联合治疗

[0333] 用如实施例 6-9 所述的方法来测试小鼠和 / 或大鼠,但具有另外的两个分组。在另外两个分组之一中,以基于体重的最佳剂量用适当的他汀类药物,例如: **Lipitor**[®] (阿伐他汀)、**Mevacor**[®] (洛伐他汀)、**Pravachol**[®] (普伐他汀钠)、Zocor[™] (辛伐他汀)、Leschol (氟伐他汀钠) 等等,治疗几组小鼠和 / 或大鼠。在第二个另外的分组中,用每天 20mg/kg 的芬维 A 胺和提高剂量的前一步骤使用的他汀类药物组合来治疗几组小鼠和 / 或大鼠。这些他汀类药物用于人的建议剂量例如是: **Lipitor**[®] (阿伐他汀) 10-80mg/ 天、**Mevacor**[®] (洛伐他汀) 10-80mg/ 天、**Pravachol**[®] (普伐他汀钠) 10-40mg/ 天、Zocor[™] (辛伐他汀) 5-80mg/ 天、Leschol (氟伐他汀钠) 20-80mg/ 天。用于小鼠和 / 或大鼠受试者的他汀类药物的剂量应当根据体重来计算。如实施例 6-9 所述来测定联合治疗的益处。

[0334] 实施例 15 :涉及芬维 A 胺、维生素和矿物质的联合治疗

[0335] 如实施例 14 所述的方法对小鼠和 / 或大鼠进行试验,但是使用选择的维生素和矿物质。芬维 A 胺和维生素和矿物质的组合施用可以口服或胃肠外施用,其量为抑制黄斑变性发展或复发的有效量。开始时的试验剂量范围是芬维 A 胺每天约 20mg/kg, 和 100-1000mg 维生素 C, 100-600mg 维生素 E, 10,000-40,000 IU 维生素 A, 50-200mg 锌和 1-5mg 铜, 共 15-20 天。如实施例 6-9 所述来测定联合治疗的益处。

[0336] 实施例 16 :与细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP) 结合的荧光猝灭研究

[0337] 室温下将 0.5 μ M 的脱辅基 -CRALBP 和 1 μ M 的 11- 顺式视黄醛 (11cRAL)、全反式视黄醛 (atRAL) 或 N-4- 羟苯基视黄酰胺 (HPR) 在 PBS 中温育 1 小时,作为对照组,将相同体积的 DMSO 加入到脱辅基 -CRALBP 溶液中。测定发射光谱在 290nm 到 500nm 之间,激发波长在 280nm, 和 2nm 通带 (见附图 7)。

[0338] 与 DMSO 对照相比,所有三种类视黄醇都显著地猝灭了 CRALBP 的荧光发射,其中 11cRAL 猝灭的程度最高, HPR 最低,提示所有三种化合物都与 CRALBP 结合。荧光猝灭可能是由于荧光共振能在蛋白质的芳族残基和所结合的种类视黄醇之间转移而引起的。

[0339] 实施例 17 :与 CRALBP 结合的大小排阻层析研究

[0340] 室温下将 4 μ M 的脱辅基 -CRALBP 和 8 μ M 的 11cRAL、atRAL 或 HPR 在 PBS 中温育 1 小时。在对照实验中,将相同体积的 DMSO 加入到 CRALBP 溶液中。通过 BioRad Bio-Sil SEC 125 凝胶过滤柱 (300x7.8mm) 分析 50 μ l 的每个样本混合物。

[0341] 在 DMSO 对照中 (见附图 8a), 脱辅基 -CRALBP 作为多聚体被洗脱 (洗脱峰在 8.1ml); 而配体结合的全蛋白质转变成单体形式 (洗脱峰在 9.4ml)。在 11cRAL 存在下,大部分的 CRALBP 与配体结合,在单体洗脱位置显示了强烈的 430nm 光吸收 (见附图 8b)。少于一半的 atRAL 结合到 CRALBP 上 (见附图 8c), 仅有少量的 HPR 结合到 CRALBP, 如 350nm 的吸收峰所示 (见附图 8d)。

[0342] 实施例 18 :MPR 结合到视黄醇结合蛋白 (RBP) 上的荧光猝灭研究

[0343] 室温下将 0.5 μ M 的脱辅基 -RBP 分别和 0, 0.25, 0.5, 1 和 2 μ M 的 MPR 在 PBS 中

温育 1 小时。作为对照,将相同浓度的脱辅基-RBP 也与 $1\ \mu\text{M}$ 的 HPR 或 $1\ \mu\text{M}$ 的 atROL 温育。所有混合物包含 0.2% 乙醇 (v/v)。测定发射光谱在 290nm 到 550nm 之间,激发波长在 280nm,和 3nm 通带。

[0344] 如附图 9 所示,MPR 显示了对 RBP 荧光的浓度依赖性猝灭, $1\ \mu\text{M}$ 的 MPR 饱和地猝灭 $0.5\ \mu\text{M}$ 的 RBP。由于观测到的荧光猝灭可能是由于荧光的共振能在蛋白质芳香残基和结合的 MPR 分子之间转移引起的,提示 MPR 结合到 RBP 上。MPR 的猝灭程度小于 atROL 和 HPR,后两者是结合到 RBP 上的其它两种配体。

[0345] 实施例 19 :Transthyretin (TTR) 与 RBP 结合的大小排阻研究

[0346] 室温下将 $10\ \mu\text{M}$ 的脱辅基-RBP 和 $50\ \mu\text{M}$ 的 MPR 在 PBS 中温育 1 小时。然后向该溶液中加入 $10\ \mu\text{M}$ 的 TTR,在室温下再温育该混合物 1 小时。通过 BioRad Bio-Sil SEC 125 凝胶过滤柱 (300x7.8mm) 分析 $50\ \mu\text{l}$ 加入和未加入 TTR 的样本混合物。在对照实验中,以相同方法分析 atROL-RBP 和 atROL-RBP-TTR 混合物。

[0347] 如附图 10a 所示,MPR-RBP 样本显示了 RBP 洗脱峰 (在 11ml),在 360nm 处有强烈光吸收,表明 RBP 结合到 MPR 上;与 TTR 温育后,该 360nm 光吸收与 RBP 洗脱峰一起保留,而 TTR 洗脱峰 (在 8.6ml) 不包含任何明显的 360nm 光吸收 (见附图 10b),表明 MPR-RBP 没有结合到 TTR 上。在 atROL-RBP 对照实验中,RBP 洗脱峰显示了强烈的 330nm 光吸收 (见附图 10c);在与 TTR 温育后,超过一半的该 330nm 光吸收转移到 TTR 洗脱峰 (见附图 10d) 上,表明 atROL-RBP 结合到 TTR 上。因此,MPR 抑制了 TTR 与 RBP 的结合。

[0348] 实施例 20 :作为 HPR 浓度函数的血清视黄醇的分析

[0349] 每日给予 ABCA4 无效突变小鼠在 DMSO 中的指定剂量的 HPR (腹膜内),共 28 天 (每剂量组 $n = 4$ 只小鼠)。在研究期结束时,采集血样,制备血清。在用乙腈沉淀血清蛋白质后,通过 LC/MS 从溶解相确定视黄醇和 HPR 的浓度 (见附图 11)。洗脱化合物的鉴定通过 UV-vis 吸收光谱法以及样本峰和可信标准品的共洗脱得到了证实。

[0350] 实施例 21 :在 ABCA4 无效突变小鼠中 HPR 浓度与视黄醇、A2PE-H₂ 和 A2E 减少的关系

[0351] 将实施例 25 的附图 18 的图 A-G 所示数据的组平均数作图,来显示血清 HPR 的升高与血清视黄醇的减少之间的密切相关性 (见附图 12)。血清视黄醇的减少与 A2E 和其前体化合物 (A2PE-H₂) 的减少之间高度相关。当血清视黄醇减少仅为 20% 时,观测到在 2.5mg/kg 剂量组中 A2PE-H₂ 显著减少 (约 47%)。该不成比例的减少的原因与该组 2 个月大的动物比其它组固有的眼类视黄醇含量降低有关。很可能的是,如果在一个较长的时间里这些动物维持 2.5mg/kg 剂量,也能实现 A2E 更大地减少。

[0352] 实施例 22 :HPR 与细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP) 结合的荧光分析

[0353] 利用 11-顺式视黄醛 (11cRAL) 的 CRALBP 蛋白荧光的猝灭。用 280nm 激发 (“无 11cRAL”) 测定重组脱辅基-CRALBP ($0.5\ \mu\text{M}$) 的荧光发射。加入天然配体 (11cRAL) 以浓度依赖性方式猝灭 CRALBP 蛋白荧光 (见附图 13A)。这些数据验证了用于证实蛋白质-配体相互作用的技术途径。

[0354] 利用 HPR 的 CRALBP 蛋白荧光的猝灭。所示数据是用与上述实验相同的试验设计获得的。用 280nm 激发 (“无 HPR”) 测定重组脱辅基-CRALBP 的荧光发射。加入 HPR 以与使用天然配体观测到的方式类似的浓度依赖性方式猝灭 CRALBP 蛋白荧光 (见附图 13b)。

这些数据强烈提示, CRALBP 与 HPR 以生理学浓度结合。

[0355] 实施例 23 :HPR 与细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP) 结合的光谱分析

[0356] 为了证实在 HPR 和 CRALBP 结合的荧光分析期间获得的数据, 用亲和色谱法和光谱分析进行第二次分析。用组氨酸标签构建重组脱辅基 -CRALBP, 在表达克隆后利用该组氨酸标签在 Ni⁺ 亲和层析柱上纯化该蛋白质。这里, 我们利用了脱辅基 -CRALBP 特异性地“捕获”蛋白质和任意蛋白质 - 配体种类的这种特征, 用于光谱分析。制备包含脱辅基 -CRALBP (10 μ M) 和 11cRAL (20 μ M) 或 HPR (20 μ M) 的两种结合混合物。在用于分析非特异性配体结合到亲和基质上的对照实验中, 我们制备两种另外的混合物, 其中在结合缓冲液中仅包含 11cRAL (20 μ M) 或 HPR (20 μ M)。该结合混合物通过分离的 Ni⁺ 亲和层析柱, 充分洗涤该柱以洗脱未结合的蛋白质和配体。在加入洗脱缓冲液后, 通过光谱法分析洗脱的级分。11cRAL+ 脱辅基 -CRALBP 结合混合物 (阳性对照) 的光谱分析证实, 该技术是有效的, 因为该光谱与 11cRAL 和 CRALBP 的结合相符。重要的是, 该数据也表明了 HPR 与脱辅基 -CRALBP 的结合。如果 HPR 不与脱辅基 -CRALBP 结合, 则在洗脱的 HPR+ 脱辅基 -CRALBP 样本中仅能观察到蛋白质光吸收 (280nm)。相反, 可见到 2 个最大光吸收; 一个在 280nm, 另一个在 360nm, 这是由于 HPR 的光吸收 (见附图 14)。

[0357] 我们对 11cRAL 和 HPR 与脱辅基 -CRALBP 的结合进行了解离常数 (KD) 的分析。荧光猝灭数据的转化显示每个配体都有相似的值 (~ 30nM)。该计算是基于完全猝灭蛋白质荧光必需的配体浓度。该数据表明, 在 ~ 1.5 μ M 下 11cRAL 和 HPR 最大化地猝灭脱辅基 -CRALBP 的荧光。因此, 尽管脱辅基 -CRALBP 被描述成 11- 顺式特异性类视黄醇结合蛋白, 但显然它也结合 HPR。事实上, 在动物实验期间 (甚至在 2.5mg/kg 的最低治疗剂量下), 在 RPE 中 HPR 的浓度远超过 30nM, 提示在视觉循环的视觉生色团生物合成期间预计有某种程度的 HPR 介导的抑制作用。

[0358] 实施例 24 :在视网膜色素上皮 (RPE) 中 HPR 对维生素 A 的酯化作用的效果

[0359] 用体外生化测定来鉴定在视觉循环中 HPR 的另一个靶点。卵磷脂视黄醇酰基转移酶 (LRAT) 催化视黄醇转化成视黄基酯。LRAT 不仅对于视黄醇 - 视黄基酯的内环境稳态, 而且对视觉生色团生物合成的底物的产生也是关键性的。附图 16 的图 A 所示的数据表明了 HPR 对视黄基酯合成速率的抑制效果。在该测定中, 用牛 RPE 微粒体作为酶的来源, 全反式视黄醇 (atROL) 是底物。HPR 以浓度依赖性方式降低了净视黄基酯的合成。图 A 中动力学数据的二次转换 (Eadie-Hofstee) 显示, 抑制模式是竞争性的 (见附图 16, 图 B)。因此, HPR 与 atROL 竞争地结合到 LRAT 的位点上。确定表观抑制常数 (K_i) 是 ~ 6 μ M。这意味着, 在 6 μ M HPR 时, 视黄基酯合成的速率降低了 50%。在一个单独的研究中, 我们已经确定了当 HPR 剂量为 10mg/kg 时, 在 RPE 中 HPR 的浓度接近 10 μ M。

[0360] 总之, 实验 20-24 所述的数据显示了在动物实验期间 HPR 对降低 A2E 和其前体蓄积的显著效果是由于降低血清视黄醇的全身效应和视觉循环内的细胞内效应。

[0361] 实施例 25 :HPR 对类视黄醇、A2E 荧光团的稳态浓度和视网膜生理学的效果

[0362] 在光适应的 DMSO- 和 HPR- 处理的小鼠中类视黄醇组合物的分析 (附图 17, 图 A) 显示, 作为 HPR 处理 (每天 10mg/kg, 共 28 天) 的结果, 视觉循环类视黄醇减少了约 50%。附图 17 的图 B 和 C 显示 HPR 没有影响这些小鼠的视觉生色团的再生 (图 B 是视觉生色团的生物合成, 图 C 是漂白的生色团再循环)。附图 17 的图 D-F 是视杆功能 (图 D)、视杆和

视锥功能（图 E）和从光漂白中恢复（图 F）的电生理测定。仅有的值得注意的差别是在 HPR- 处理的小鼠中暗适应延迟（图 F）。

[0363] 每天向 ABCA4 无效突变小鼠给予在 DMSO 中的指定剂量的 HPR 或单独给予 DMSO，共 28 天（每个处理组 $n = 16$ 只小鼠）。在研究开始时，2.5mg/kg 组的小鼠是 2 个月大，在其他处理组的小鼠是 3 个月大。在指定的时间，从每组中抽取有代表性的小鼠（ $n = 4$ ）用于 A2E 前体化合物（见附图 18，A2PE-H₂，图 A、C 和 E）和 A2E（见附图 18，图 B、D 和 F）的分析。摘出眼睛，对半切开，并通过氯仿 / 甲醇 - 水相分配法从后极中提取脂溶性组分。用 LC 分析样本提取物。洗脱的化合物的鉴定通过 UV-vis 吸收光谱法以及样本峰和可信标准品的共洗脱得到了证实。注意：在 10mg/kg 组中适当年龄和品种匹配的小鼠的局限性阻碍了 14 天间隔的分析。该数据显示的是在研究期间 A2PE-H₂ 和 A2E 的剂量依赖性减少。

[0364] 附图 18 的图 G-I 显示的是在 abcr 无效突变小鼠（Stargardt 病的动物模型）的 RPE 中 HPR 显著地降低脂褐素的自发荧光的形态学 / 组织学证据。处理情况如上所述。HPR 处理的动物中自发荧光的水平与年龄匹配的野生型动物的水平相当。附图 19 显示了来自 DMSO- 和 HPR- 处理的动物的视网膜的光学显微镜检查影像。在视网膜细胞结构中没有观测到异常形态学或完整性的破坏。

[0365] 脂褐素在视网膜色素上皮（RPE）中的蓄积是在各种视网膜的变性疾病中观测到的常见病理学特征。在脂褐素颗粒中存在毒性的基于维生素 A 的荧光团（A2E），其与 RPE 和感光细胞的死亡有关。在这些实验中，我们利用了表现出脂褐素蓄积加速的动物模型来评价基于血清维生素 A（视黄醇）减少的治疗途径的效力。芬维 A 胺有效地和可逆地降低了血清视黄醇。给在 Stargardt 病基因（ABCA4）中具有无效突变的小鼠施用 HPR 极大地降低了血清视黄醇 / 视黄醇结合蛋白质，阻止了在 RPE 中 A2E 和脂褐素自发荧光的蓄积。从生理学上讲，HPR- 诱导的视觉生色团的减少可以表现为暗适应的适度延迟；而生色团再生动力学是正常的。重要的是，HPR 对维生素 A 酯化和生色团动员的特定细胞内效应也得到了鉴定。这些发现表明了 A2E 生物合成依赖于维生素 A 的性质，证实了一种容易地可转移到患有基于脂褐素的视网膜疾病的人类患者的治疗途径。

[0366] 实施例 26：在休药期期间 HPR 治疗的益处持续存在

[0367] 每天给 ABCA4^{-/-} 小鼠施用 HPR（在 DEMO 中，10mg/kg），共 28 天。对照 ABCA4^{-/-} 小鼠在相同时间仅接受 DMSO。在 28 天的治疗期后对 A2E 前体（A2PE-H₂）和 A2E 的生物化学（HPLC）分析显示，在 HPR- 处理的小鼠的眼中这些荧光团减少（附图 18）。利用荧光显微镜法的进一步分析证实了该生化数据，表明 HPR 处理的 ABCA4^{-/-} 小鼠的脂褐素自发荧光水平与在未处理的野生型小鼠中观测到的水平相当（附图 18）。通过光学显微镜检查的组织学检查显示视网膜的细胞结构或形态学没有变化（附图 19）。重要地，在 HPR 处理停止后，所观测到的脂褐素自发荧光的减少持续了较长时间。在 28 天的处理后停止施用 HPR（10mg/kg）或 DMSO，在 2 周后和 4 周后再评价 A2E 和前体水平。

[0368] 我们用 HPLC 检查了洗眼杯的提取物，并通过吸光度和荧光法进行了检测。通过联机光谱分析和通过与可信标准品的共洗脱证实了对指定峰的鉴定。该数据表明，在先前维持 HPR 处理的动物中（附图 20，图 A），与对照小鼠相比，A2E 和前体（A2PE-H₂ 和 A2PE）水平显著地降低（附图 20，图 B），甚至在不接受 HPR 剂量 12 天（即 12 天的休药期）后仍然如此。类似的结果也在 28 天休药期后的小鼠中观测到：A2E 和前体（A2PE-H₂ 和 A2PE）水

平显著地低于对照小鼠（将附图 20 的图 C 的处理小鼠与附图 20 的图 D 的对照小鼠相比较）。此外，在 12 或 28 天的休药期后，A2E 和前体（A2PE-H₂ 和 A2PE）水平维持在或接近于 28 天处理后立即测定的水平（即，相对于对照组降低了大约 50%），尽管在 28 天休药期后 A2E 和前体（A2PE-H₂ 和 A2PE）的量相比 12 天休药期的水平已经增加了几个百分点。尽管在 HPR 休药期中动物眼中的 A2E 和前体（A2PE-H₂ 和 A2PE）水平持续性地降低，但我们在 28 天的休药期内不能在动物眼中检测到 HPR 或 HPR 代谢物（例如，MPR）。附图 20 的图 C 和 D 的迹线显示了与所指定峰有关的自发荧光的强度。这清楚地表明，峰荧光追踪了 A2E、A2PE 和 A2PE-H₂ 的丰度。

[0369] 这些数据是关于临床试验期间的毒性，是通过在较高剂量下证明临床效力以后使患者维持降低的 HPR 剂量而完成的。该分析可以不需要通过显微镜检查进行另外的确证。据我们所知，该效应尚未在其他治疗眼部病症或特征的方法中观测到，这些眼部病症或特征选自 Stargardt 病、干性与年龄相关的黄斑变性、基于脂褐素的视网膜变性、光感受器变性、和地理性萎缩。在降低哺乳动物眼中 N-亚视黄基-N-视黄基乙醇胺的产生的方法中，以及在降低哺乳动物眼中脂褐素的产生的方法中，也尚未观测到该效果。

[0370] 该效果不能归因于血清视黄醇的长期减少，因为在最后的 HPR 剂量后 48 小时血清视黄醇就回到了基线。事实上，HPR 在 RPE 内蓄积，而且我们确定了 HPR 介导的视觉循环的特异性酶和蛋白质的抑制作用，这提示了 HPR 在休药期的潜在的有益效果应当归功于在视觉循环内的效果。此外，HPR 降低了血清视黄醇水平，这导致在所处理动物的眼中视黄醇水平的降低。一旦在眼中视黄醇的水平降低，眼中视黄醇水平的随后增加将有一个时间延迟。单独或组合地，眼中的 A2E、A2PE 和 A2PE-H₂ 的产生将保持在低水平，尽管在血清或眼中没有 HPR。

[0371] 根据本公开内容，所公开及请求保护的所有方法都可以不经过过多试验就可进行和完成。对本领域技术人员显而易见地，不脱离本发明的概念、精神和范围即可对所述方法和所述方法的步骤或步骤顺序进行改变。更具体地，显而易见地，某些化学或生理学相关的药剂可以取代本文所述的药剂，同时还能达到相同或相似的结果。所有的这些相似的取代或变更对本领域技术人员都是显而易见的，而且应当认为其在附属的权利要求限定的本发明的精神、范围和概念内。

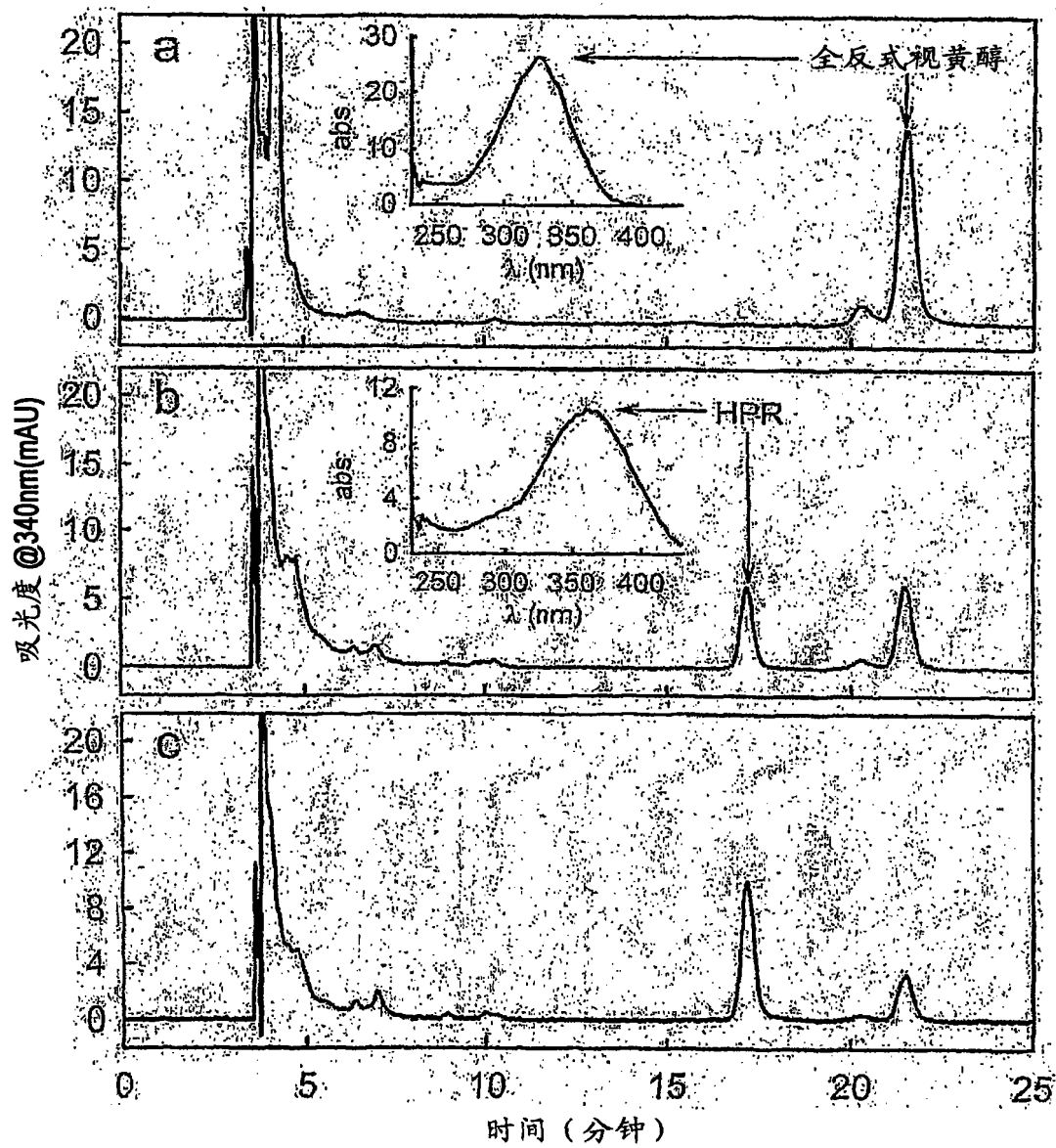


图 1a-c

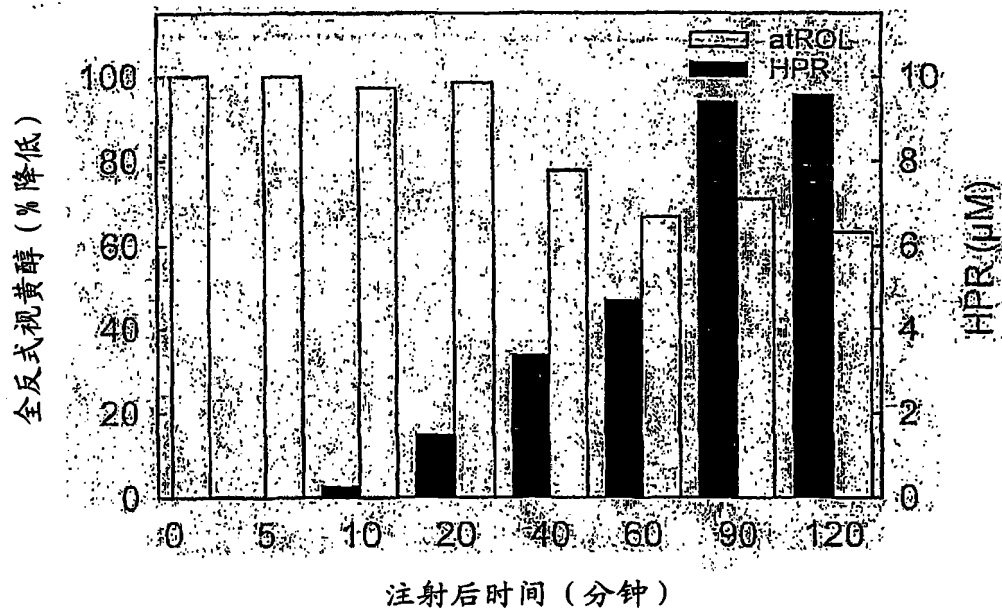


图 2a

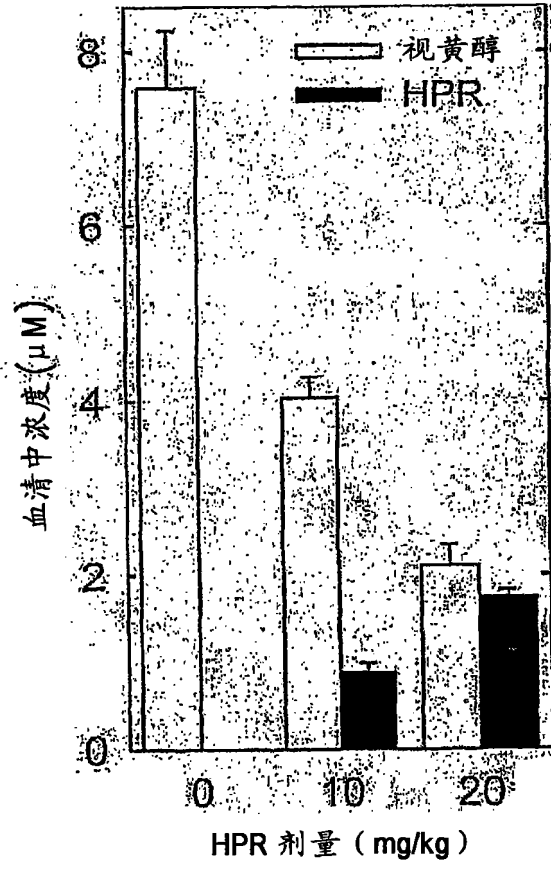


图 2b

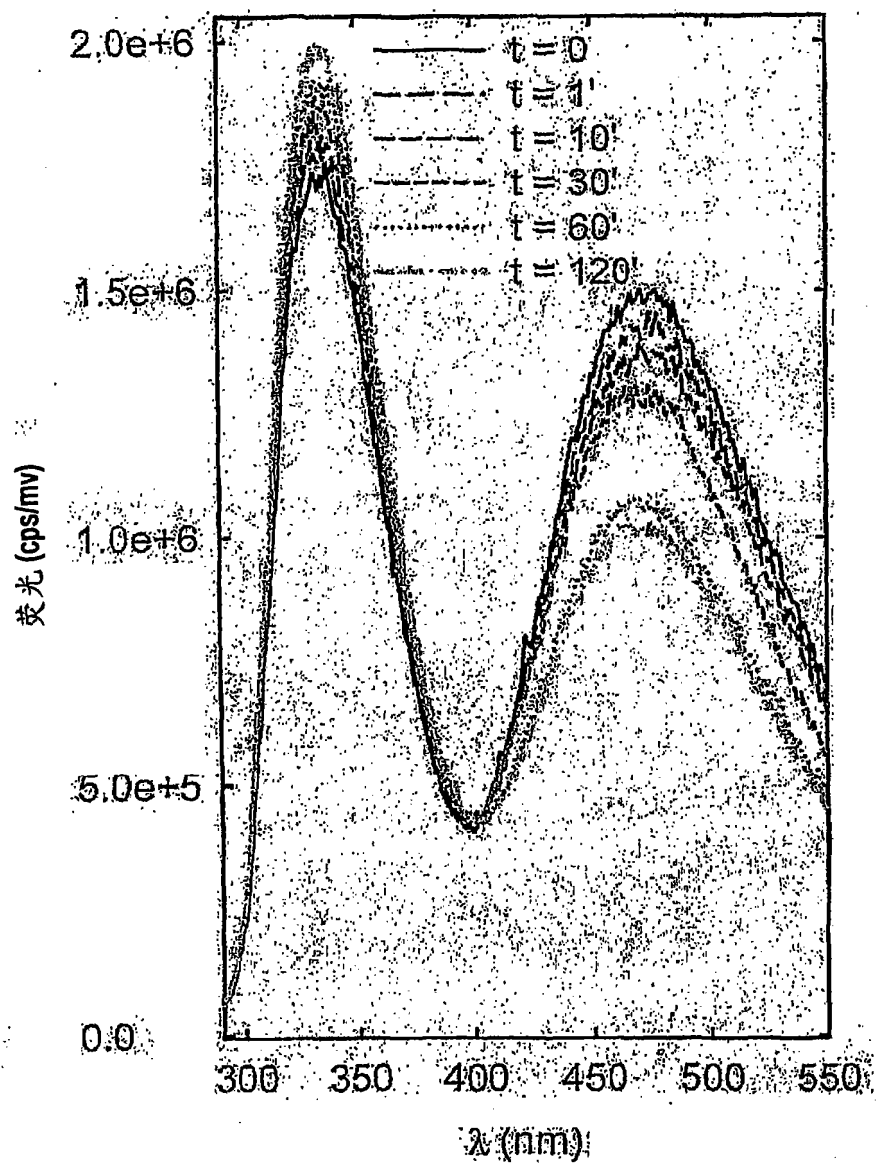


图 3a

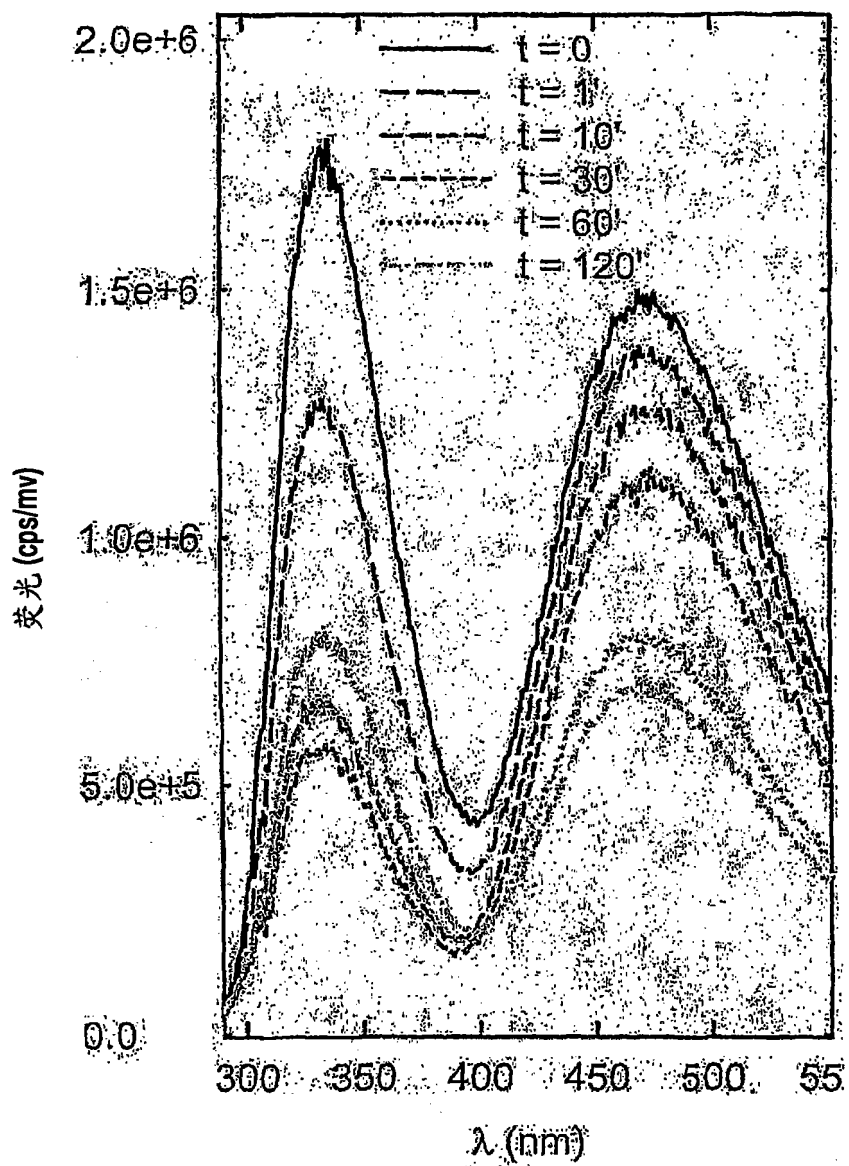


图 3b

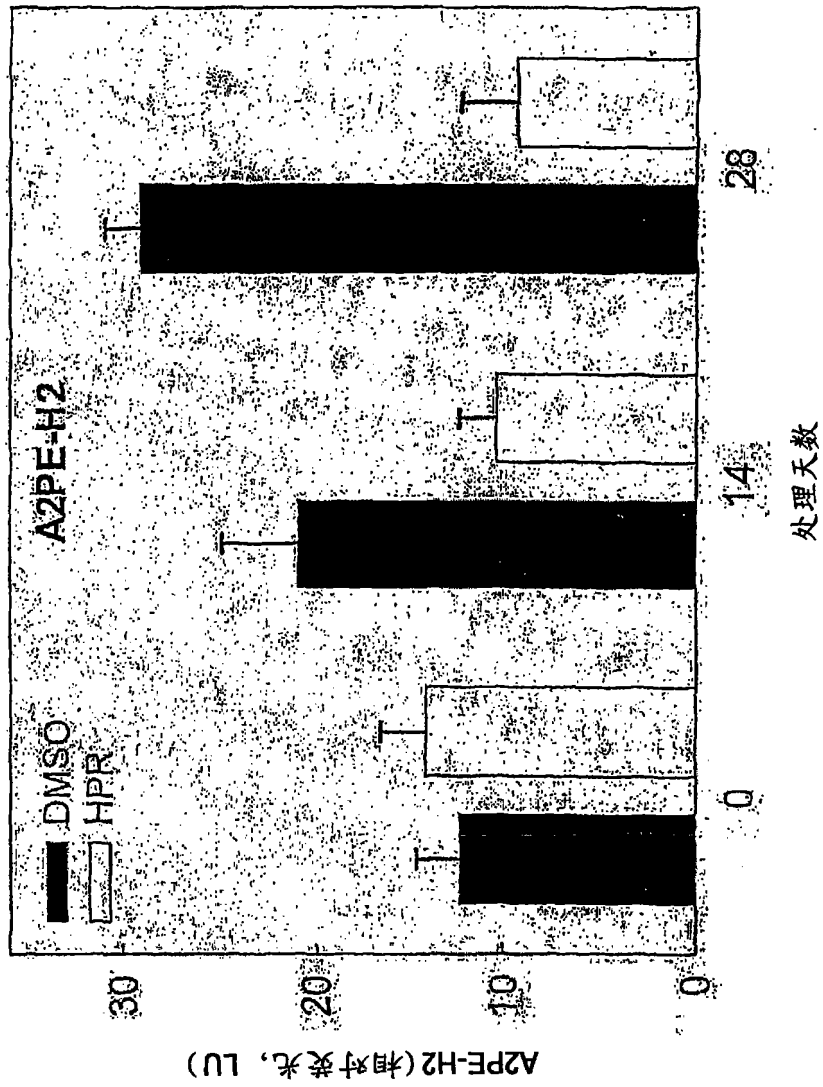


图 4a

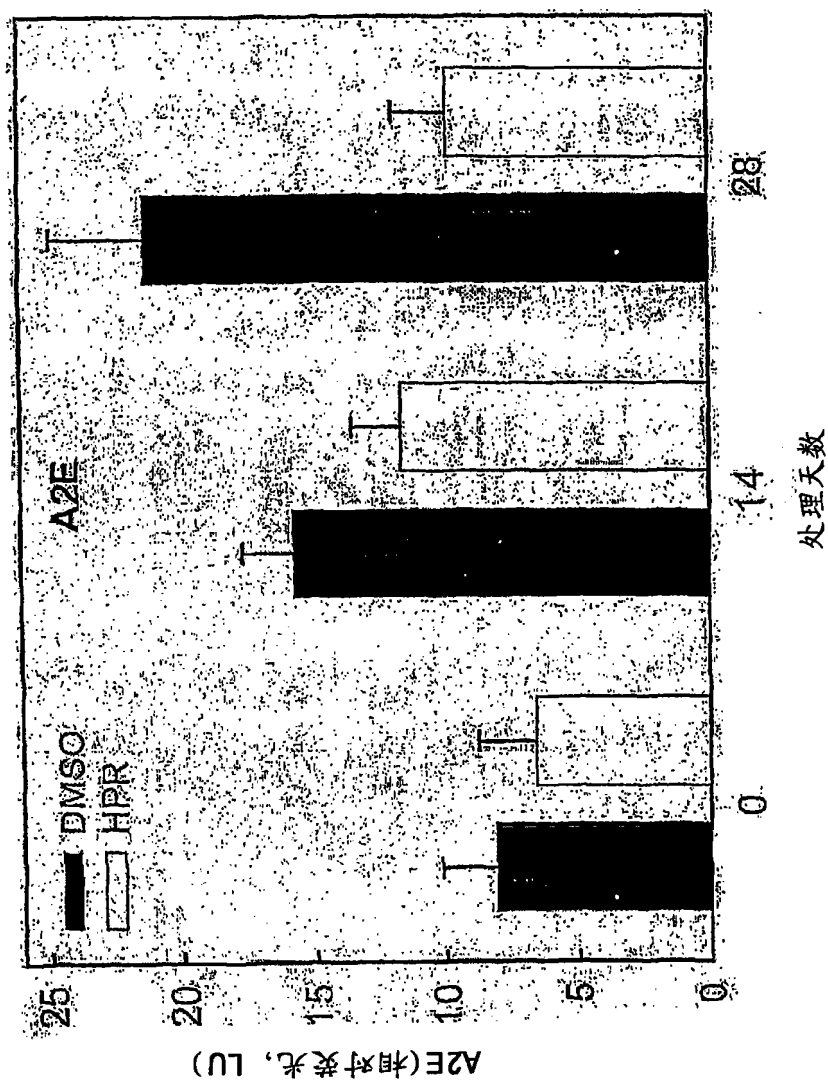


图 4b

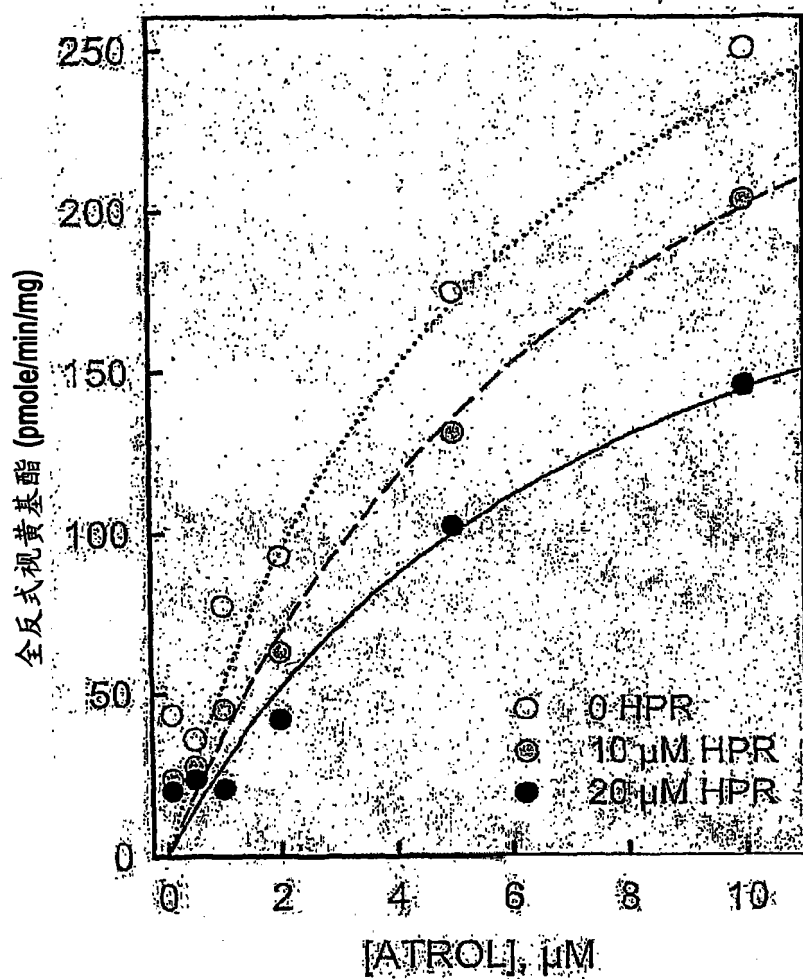


图 5

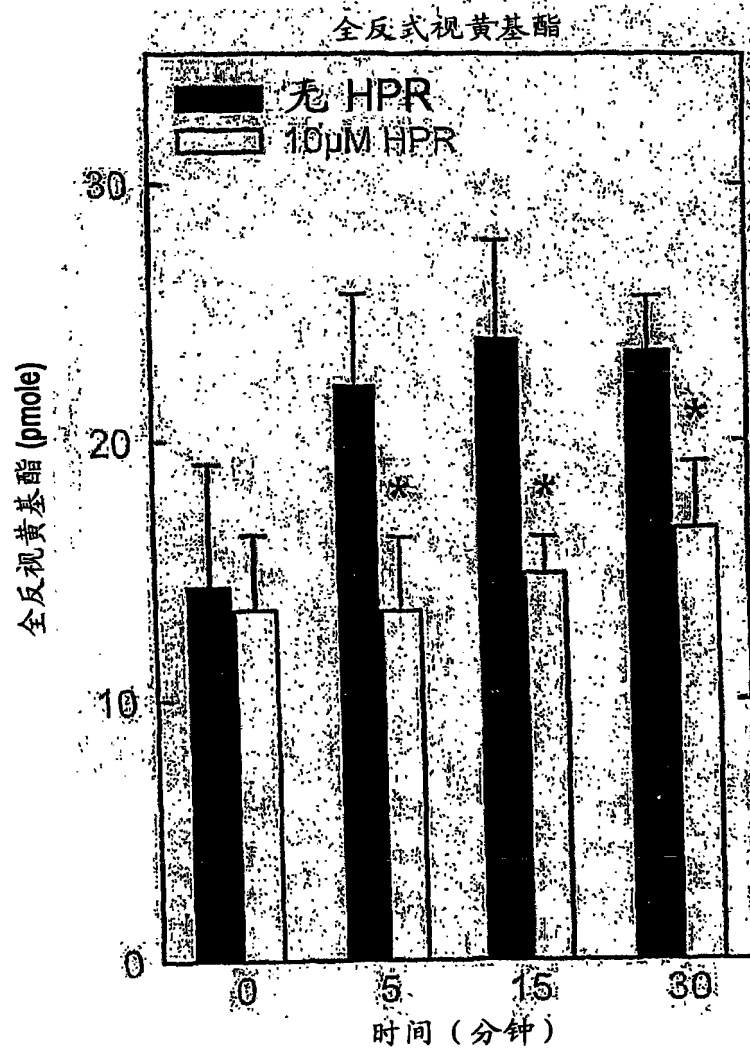


图 6a

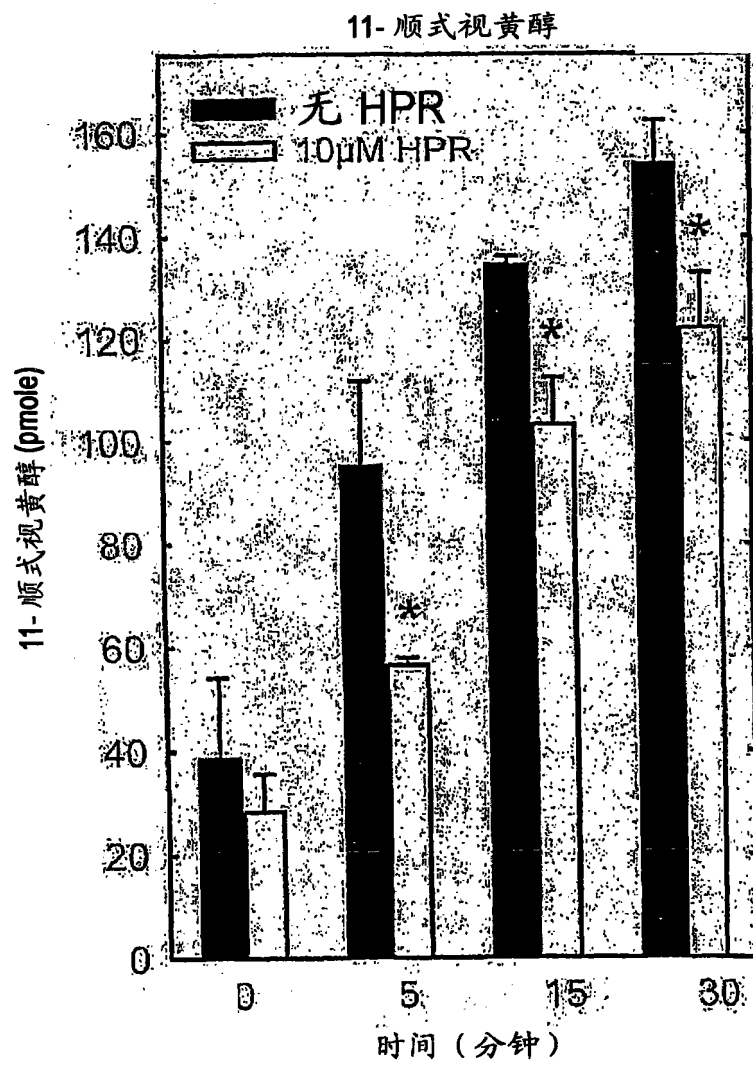


图 6b

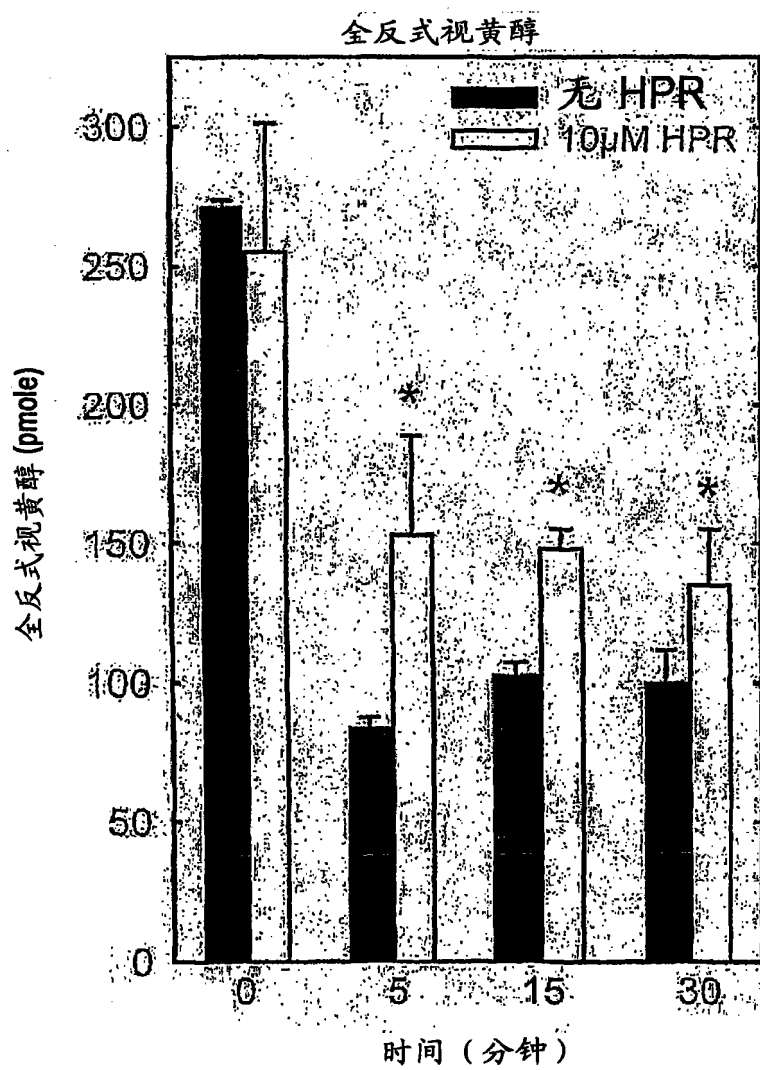


图 6c

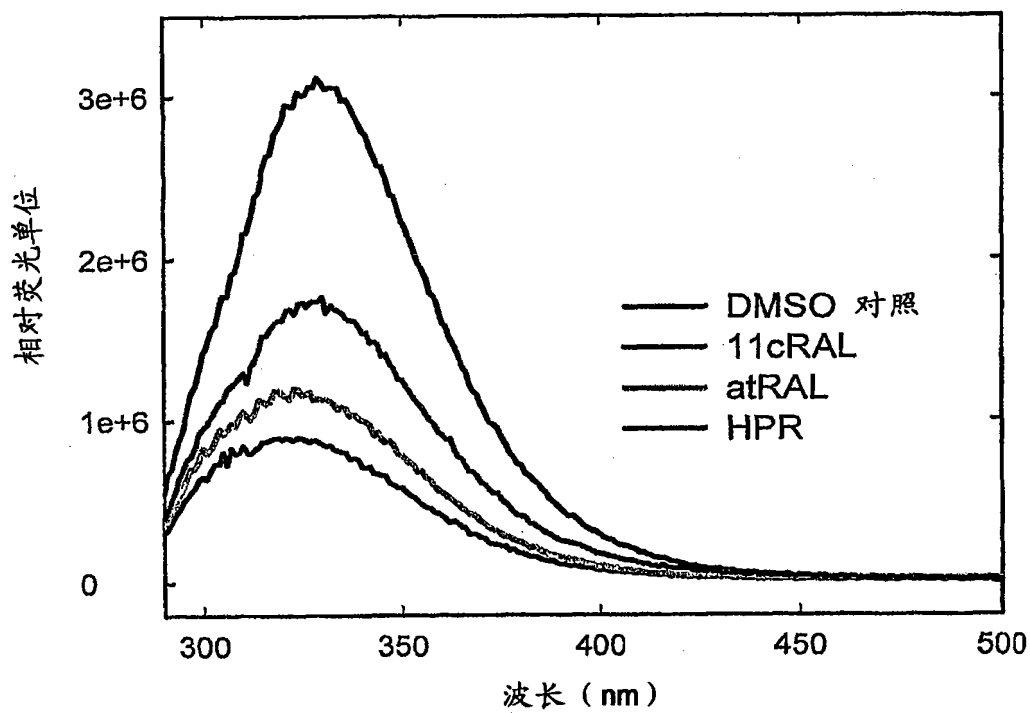


图 7

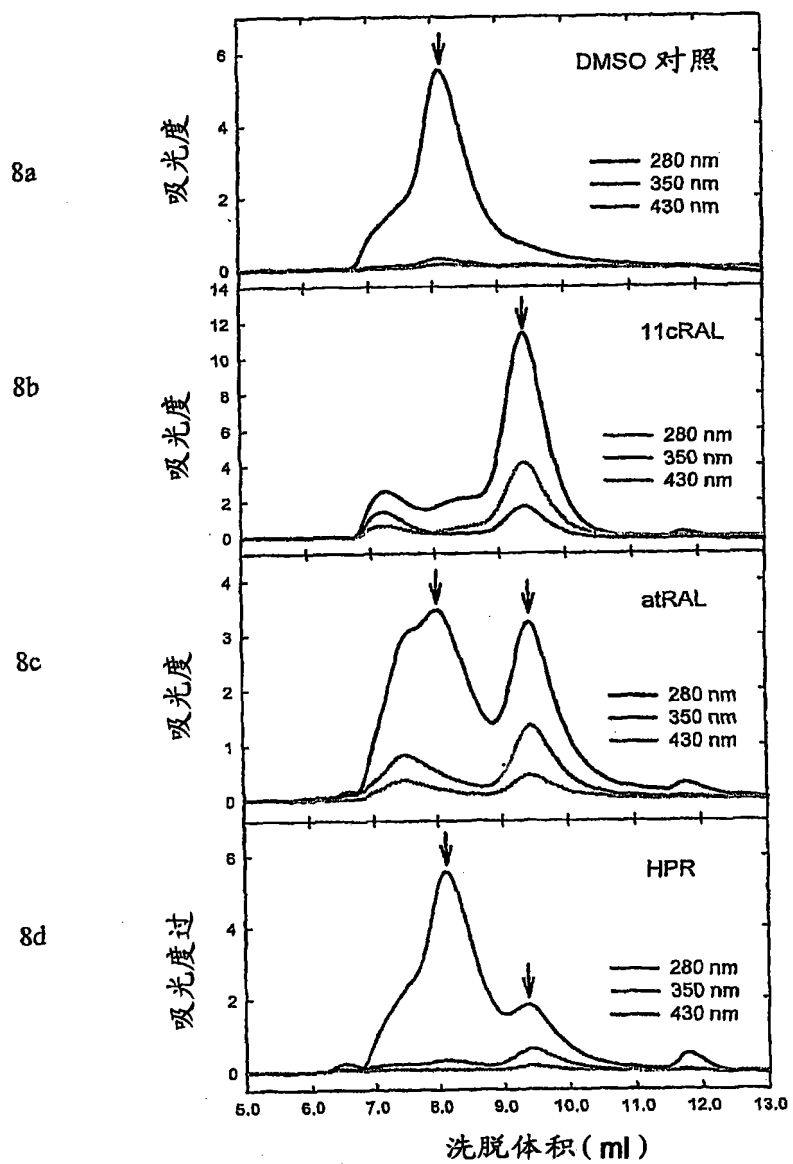


图 8

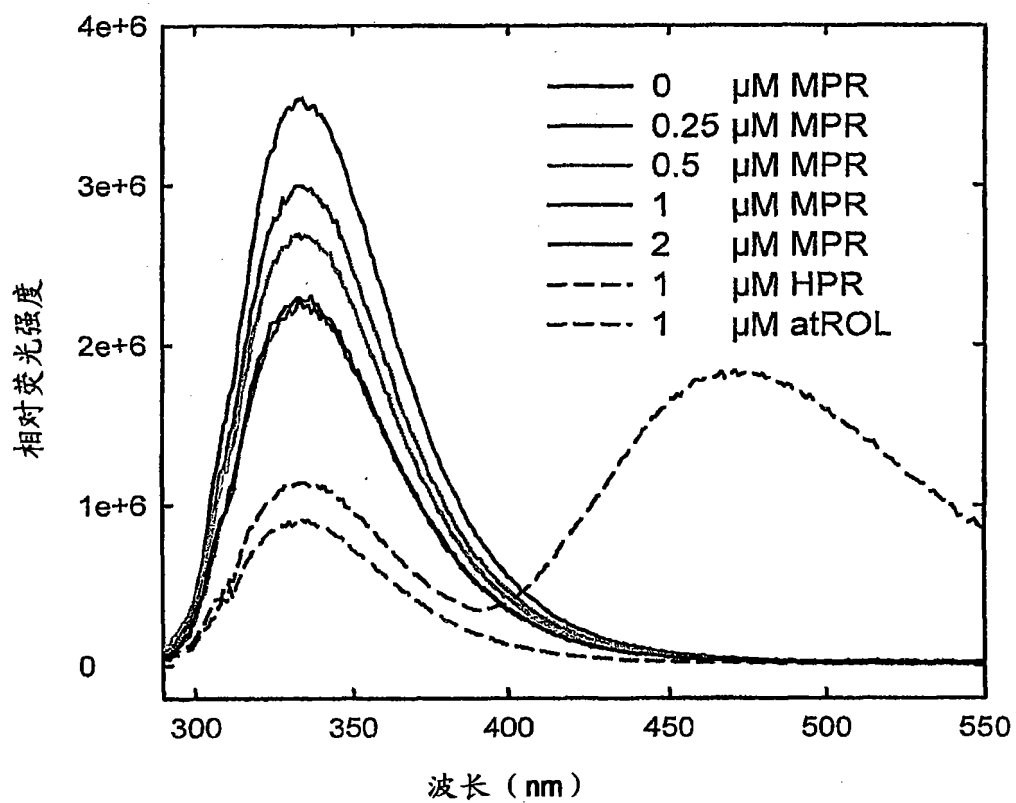


图 9

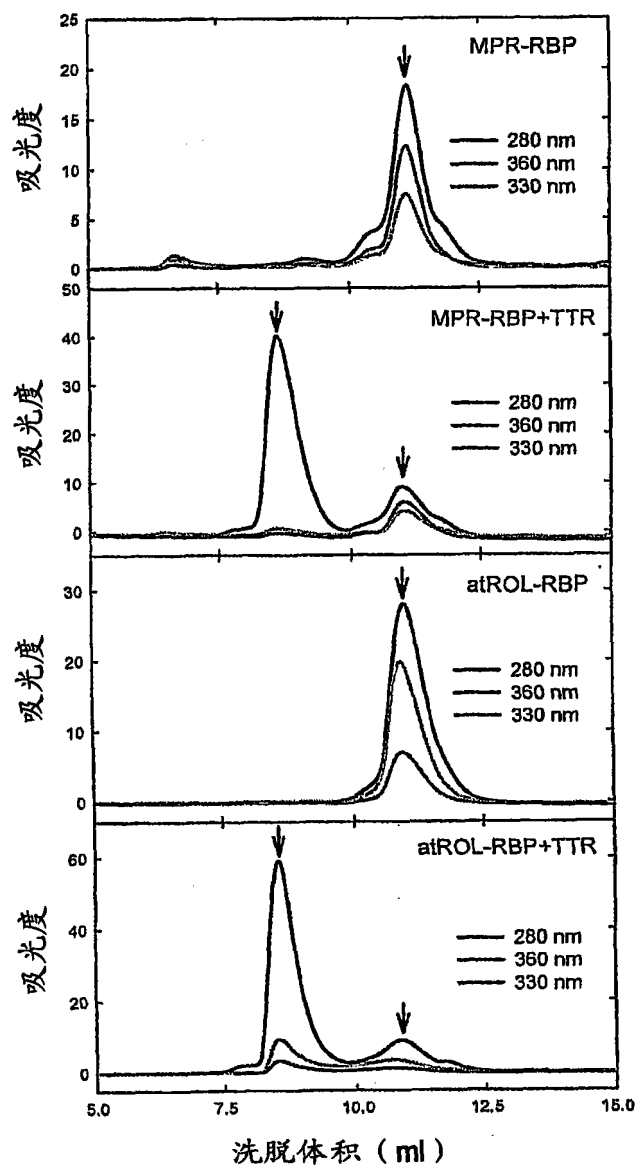


图 10

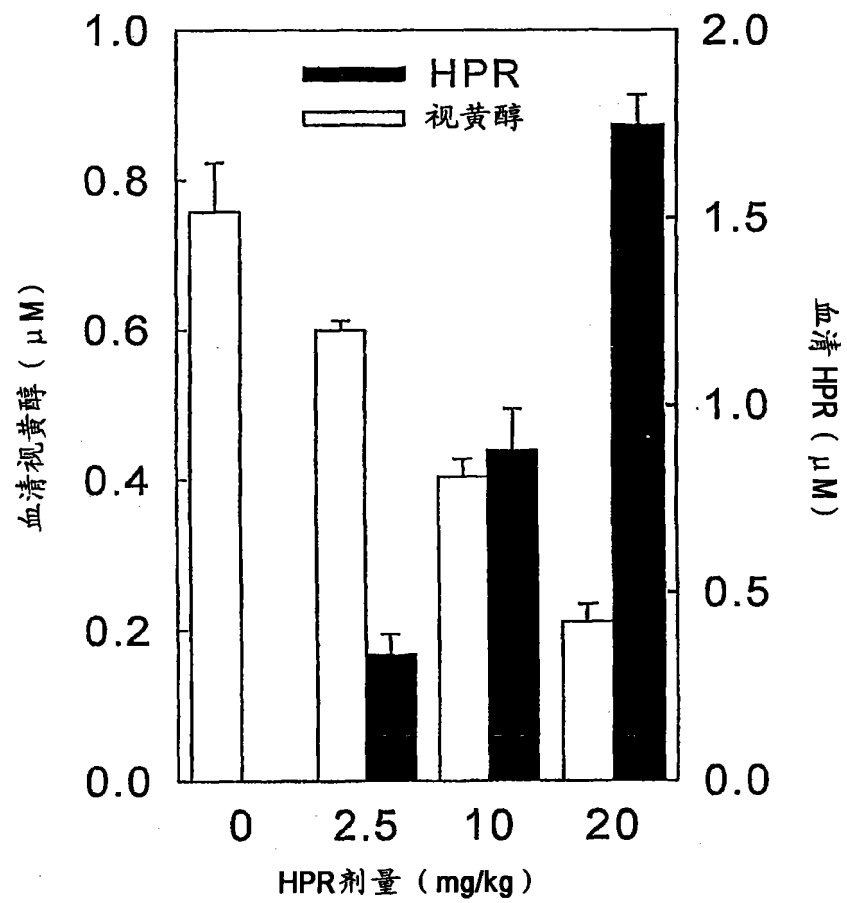


图 11

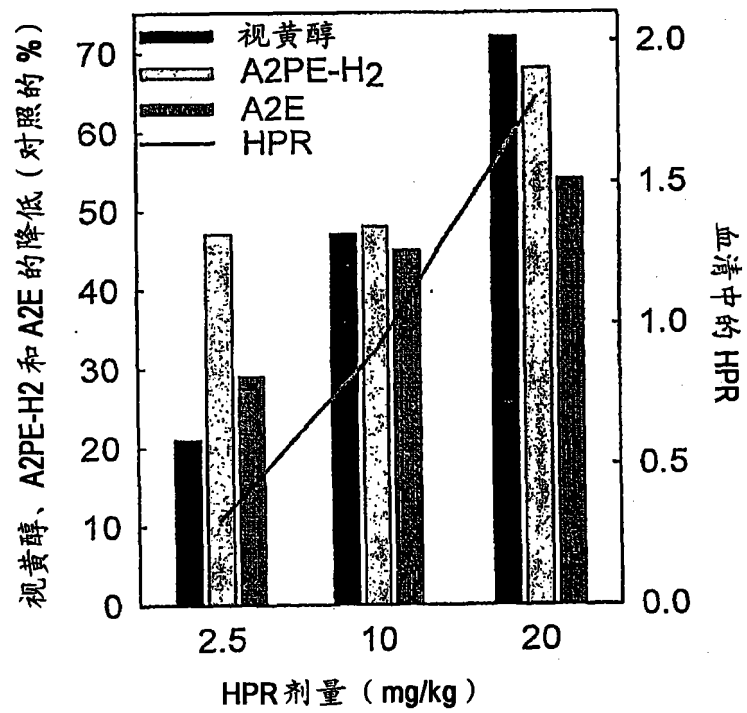


图 12

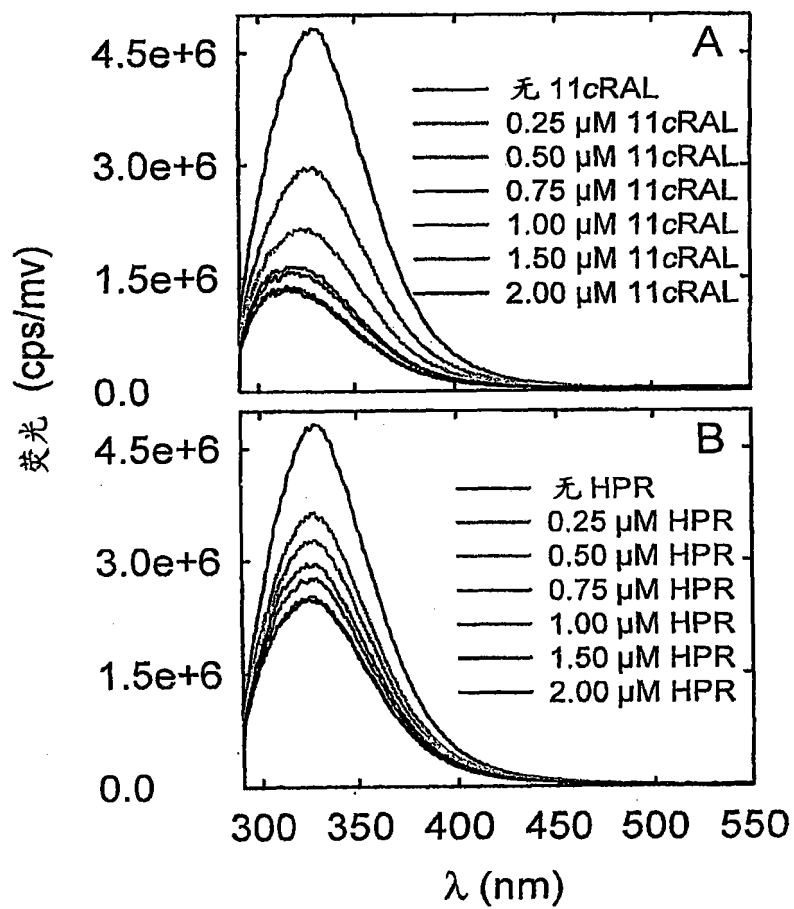


图 13

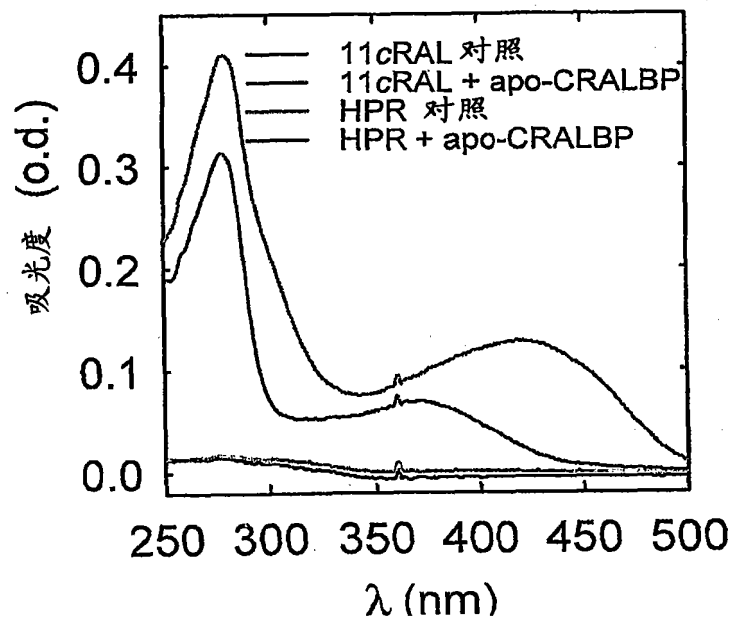


图 14

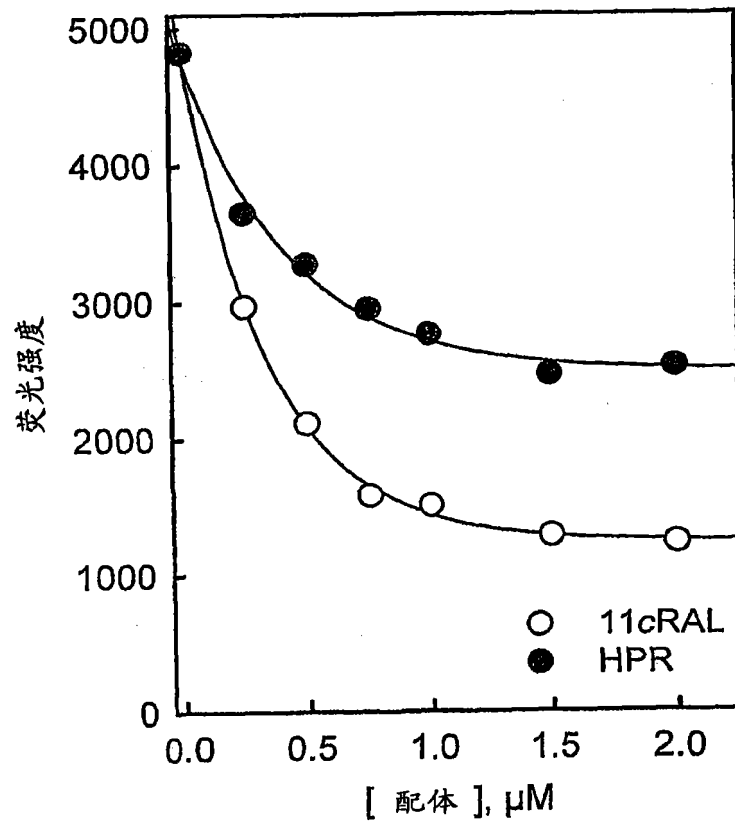


图 15

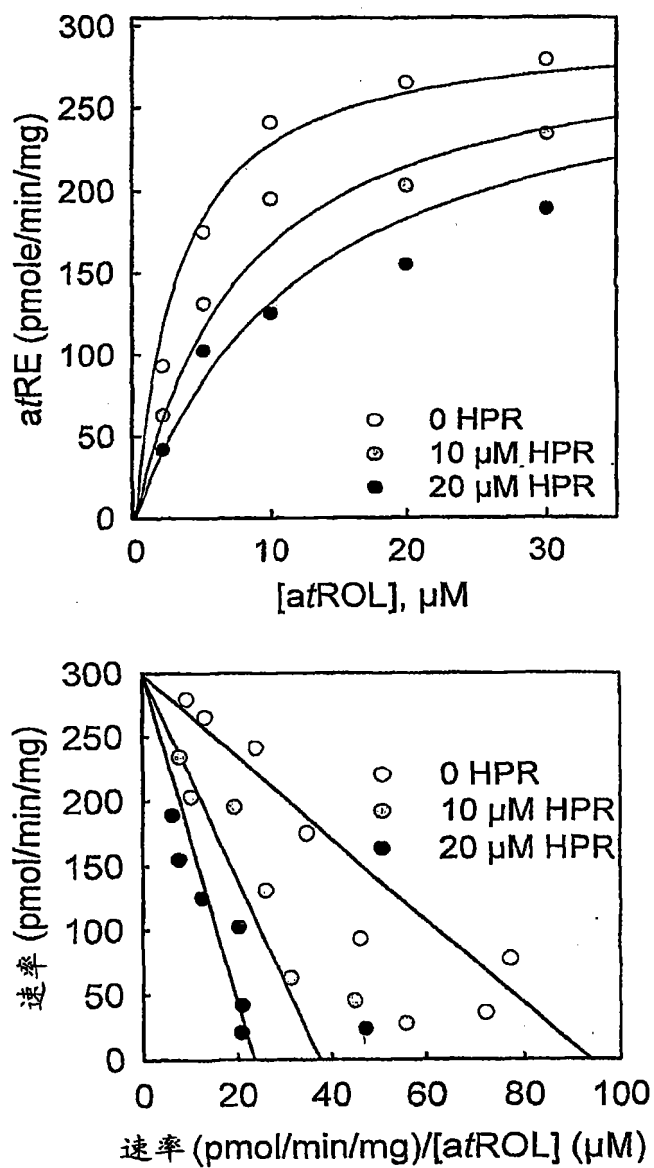


图 16

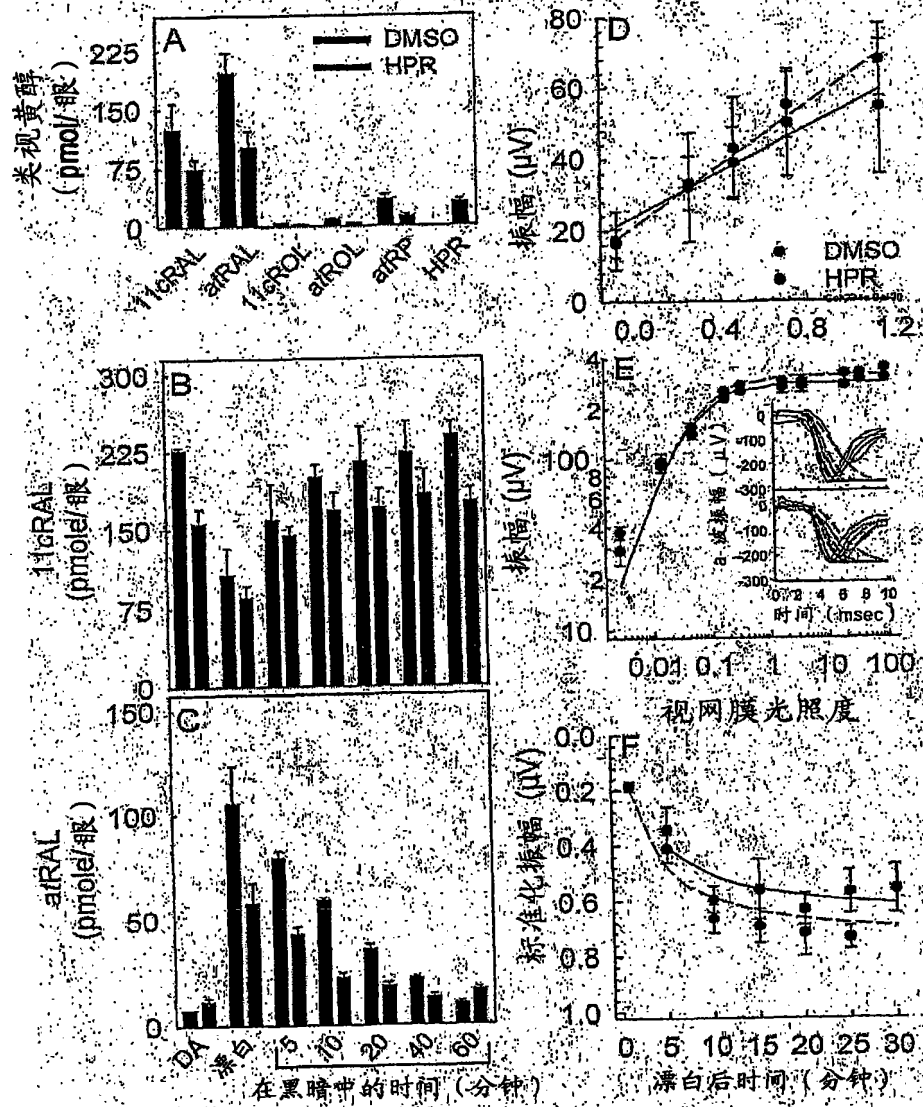


图 17

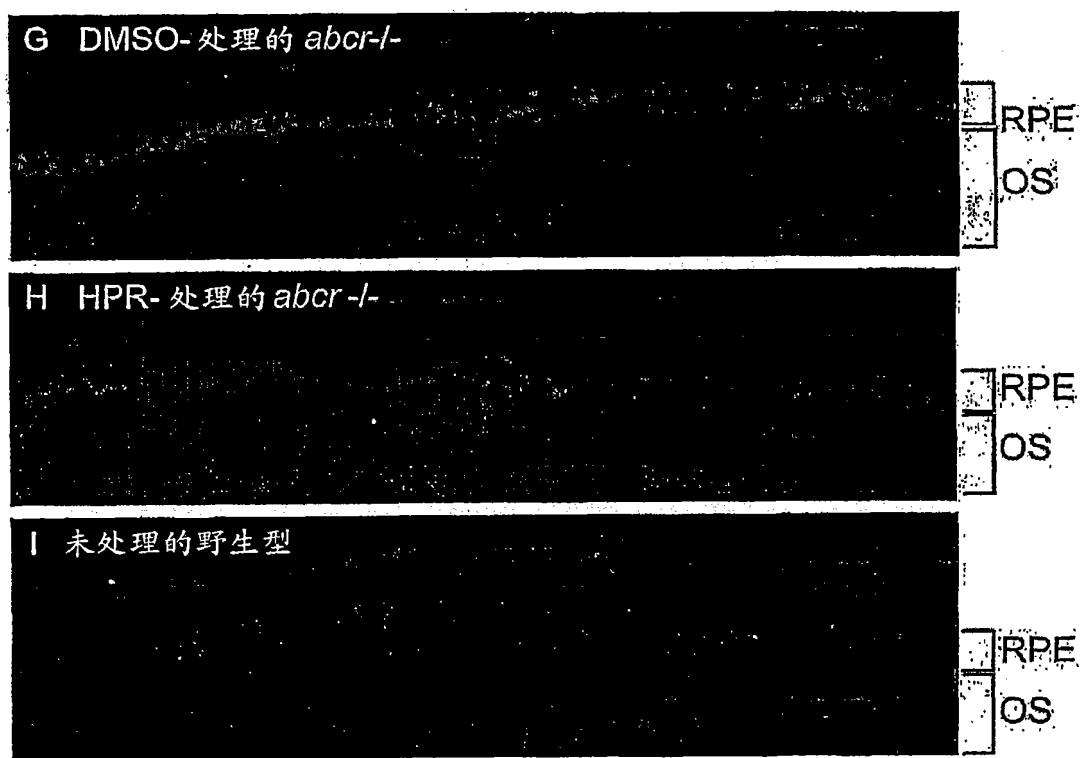
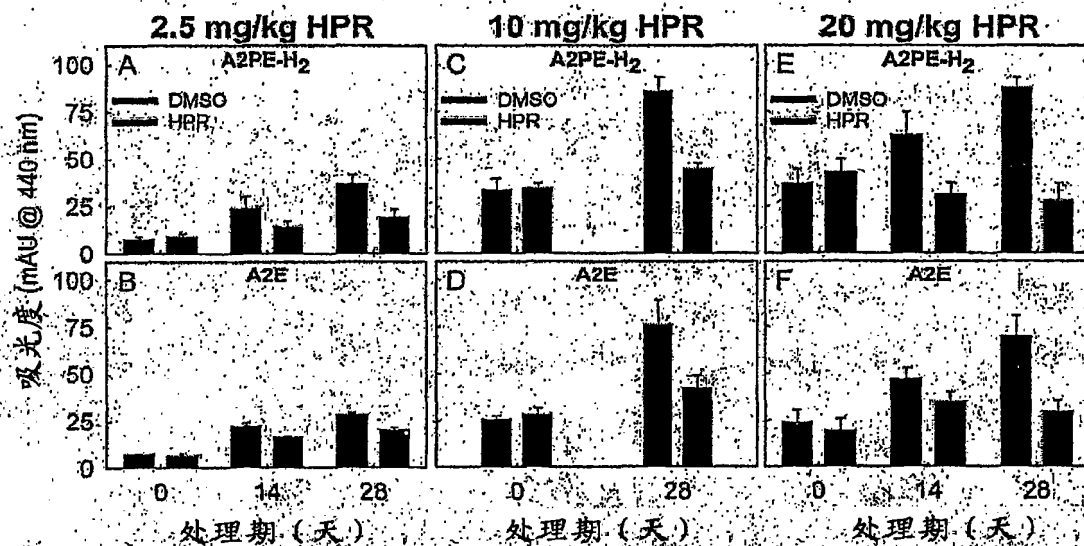


图 18

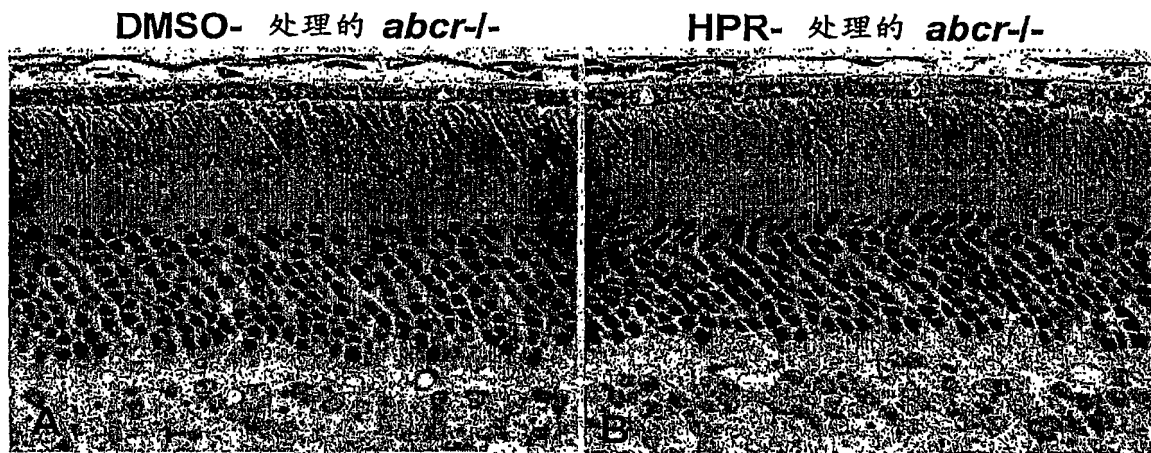


图 19

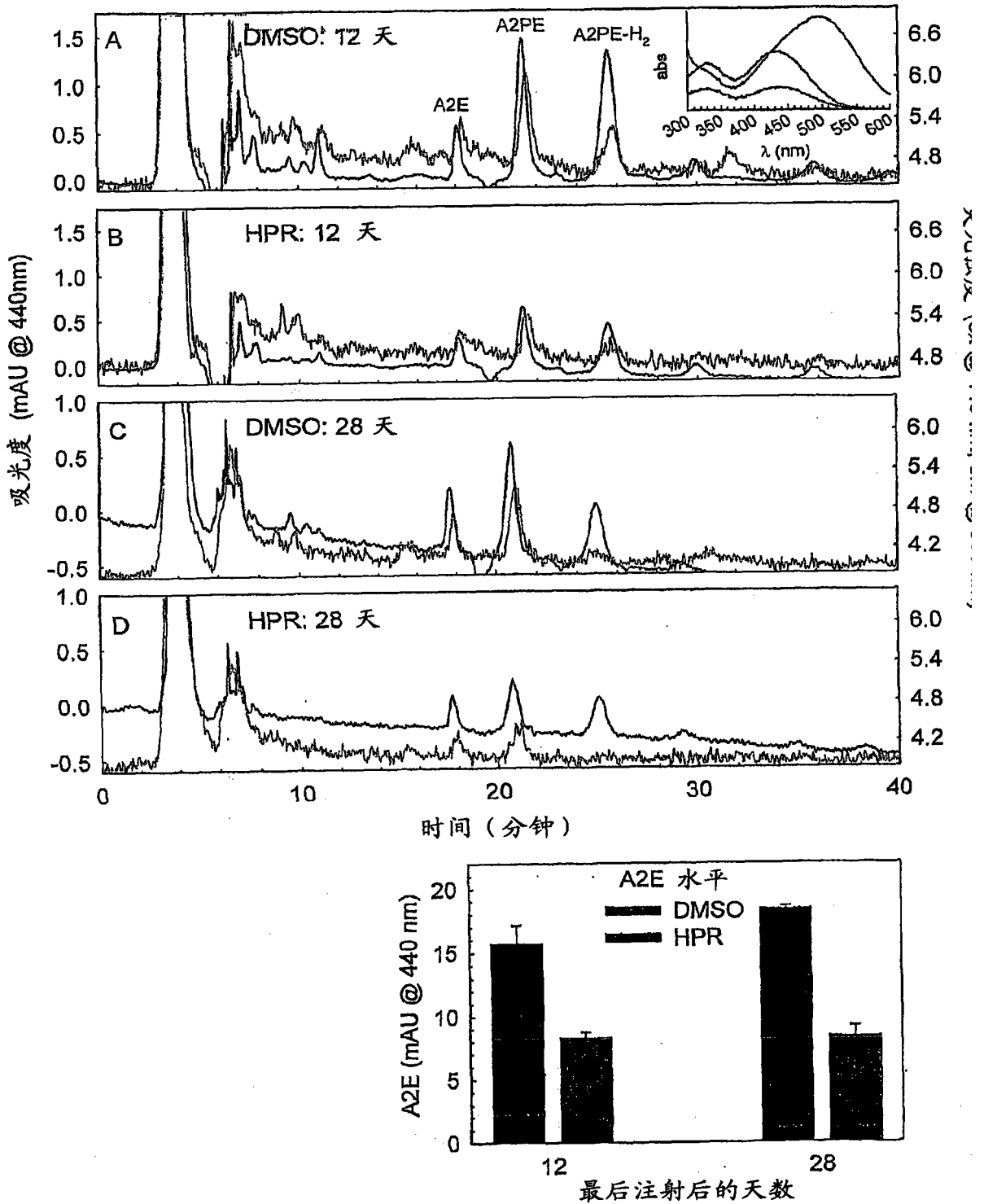


图 20