

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780028381.2

[43] 公开日 2009 年 7 月 29 日

[11] 公开号 CN 101495185A

[22] 申请日 2007.7.27

[21] 申请号 200780028381.2

[30] 优先权

[32] 2006.7.28 [33] US [31] 60/820,735

[86] 国际申请 PCT/US2007/074603 2007.7.27

[87] 国际公布 WO2008/014457 英 2008.1.31

[85] 进入国家阶段日期 2009.1.24

[71] 申请人 爱尔康研究有限公司

地址 美国德克萨斯州

[72] 发明人 R·小科里尔 M·卡平 J·扬尼

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 3 页

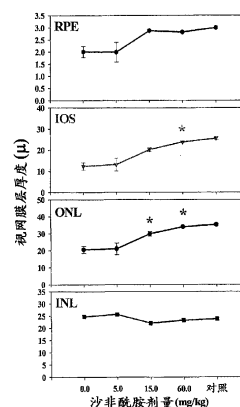
[54] 发明名称

用于治疗外层视网膜病症的单胺氧化酶抑制剂

[57] 摘要

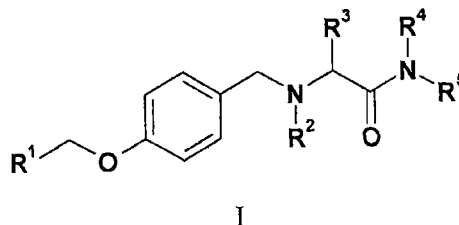
公开了利用抑制单胺氧化酶化合物治疗外层视网膜病症的组合物和方法。

用沙非酰胺治疗来预防视网膜损伤



* 与溶媒显著不同 ($p < 0.05$) 且与对照没有差别 ($p > 0.05$)

1. 用于治疗外层视网膜病症的方法，所述方法包括给药含有治疗有效量的单胺氧化酶抑制剂的组合物，其中所述单胺氧化酶抑制剂是式 I 化合物或其药学上可接受的衍生物或类似物



其中：

R^1 是 C5-C7 环烷基；苯基(未取代的)或独立地被一个或多个卤素或 CF₃ 取代的苯基；

R^2 是 H、C1-C3 烷基；

R^3 是 H、C1-C3 烷基(未取代的)或被 OR⁶ 取代的 C1-C3 烷基；

R^4 、 R^5 独立地是 H、C1-C3 烷基；

R^6 是 H、C1-C2 烷基。

2. 权利要求 1 的方法，其中：

R^1 是 C5-C7 环烷基；苯基(未取代的)或独立地被一个或两个 F、Cl 或 CF₃ 取代的苯基；

R^2 是 H、C1-C2 烷基；

R^3 是 H、C1-C2 烷基(未取代的)或被 OR⁶ 取代的 C1-C2 烷基；

R^4 、 R^5 独立地是 H、C1-C2 烷基；

R^6 是 H、C1-C2 烷基。

3. 权利要求 1 的方法，其中：

R^1 是苯基(未取代的)或独立地被一个或两个 F、Cl 取代的苯基；

R^2 是 H、CH₃；

R^3 是 H、C1-C2 烷基(未取代的)或被 OR⁶ 取代的 C1-C2 烷基；

R^4 、 R^5 独立地是 H、CH₃；

R^6 是 H、CH₃。

4. 权利要求 3 的方法，其中：

R^1 是 3-氟苯基；

R^2 是 H；

R^3 是 CH_3 ；

R^4 、 R^5 是 H。

5. 权利要求 4 的方法，其中化合物是沙非酰胺。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述病症选自：AMD；RP 和其它形式的遗传性变性视网膜病；视网膜脱离和撕裂；黄斑皱褶；影响外层视网膜的局部缺血；糖尿病视网膜病；与激光疗法(格栅样的、局灶性的和全视网膜的)包括光动力疗法(PDT)相关的损害；外伤；外科手术(视网膜移位、视网膜下手术或玻璃体切除术)或光-诱导的医源性视网膜病；和视网膜移植物的保护。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述病症选自：AMD、RP 和糖尿病视网膜病。

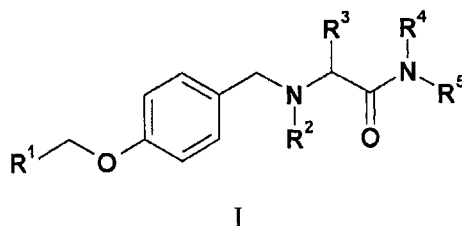
8. 权利要求 7 的方法，其中所述病症是 AMD。

9. 权利要求 1 的方法，其中组合物中单胺氧化酶抑制剂的量是约 0.01 至约 2%。

10. 权利要求 1 的方法，其中给药是通过下列方法进行的，所述方法包括：局部眼睛给药、玻璃体内注射、口服给药、眼球后给药、结膜下给药、眼睛膜囊内给药、经皮给药、静脉内给药、腹膜内给药、皮下给药、经缓释可生物降解的多聚体、脂质体给药和经微型泵给药。

11. 权利要求 10 的方法，其中给药是通过局部递送进行的。

12. 治疗或预防视网膜变性的方法，所述方法包括将含有治疗有效量的单胺氧化酶抑制剂的组合物给药至患者，其中所述单胺氧化酶抑制剂是式 I 化合物或其药学上可接受的衍生物或类似物



其中:

R^1 是 C5-C7 环烷基; 苯基(未取代的)或独立地被一个或多个卤素或 CF₃ 取代的苯基;

R^2 是 H、C1-C3 烷基;

R^3 是 H、C1-C3 烷基(未取代的)或被 OR⁶ 取代的 C1-C3 烷基;

R^4 、 R^5 独立地是 H、C1-C3 烷基;

R^6 是 H、C1-C2 烷基。

13. 权利要求 12 的方法, 其中单胺氧化酶抑制剂是沙非酰胺。

14. 权利要求 12 的方法, 其中所述病症选自: AMD; RP 和其它形式的遗传性变性视网膜病; 视网膜脱离和撕裂; 黄斑皱褶; 影响外层视网膜的局部缺血; 糖尿病视网膜病; 与激光疗法(格栅样的、局灶性的和全视网膜的)包括光动力疗法(PDT)相关的损害; 外伤; 外科手术(视网膜移位、视网膜下手术或玻璃体切除术)或光-诱导的医源性视网膜病; 和视网膜移植物的保护。

15. 权利要求 14 的方法, 其中所述病症选自 AMD、RP 和糖尿病视网膜病。

16. 权利要求 15 的方法, 其中所述病症是 AMD。

17. 权利要求 12 的方法, 其中组合物中单胺氧化酶抑制剂的量是约 0.01% 至约 2%。

18. 权利要求 12 的方法, 其中给药是通过下列方法进行的, 所述方法包括: 局部眼睛给药、玻璃体内注射、口服给药、眼球后给药、结膜下给药、眼睛膜囊内给药、经皮给药、静脉内给药、腹膜内给药、皮下给药、经缓释可生物降解的多聚体、脂质体给药和经微型泵给药。

19. 权利要求 18 的方法, 其中给药是通过局部递送进行的。

用于治疗外层视网膜病症的单胺氧化酶抑制剂

发明背景

1. 技术领域

本发明涉及为单胺氧化酶抑制剂的化合物和它们在治疗由急性或慢性眼睛变性病患或疾病引起的外层视网膜(outer retina)病症中的用途。

2. 相关技术的描述

在老年人群中,与年龄相关的黄斑变性(AMD)是失明的主要原因,其发病率由65岁成人中的大约20%增加至75岁或更年长个体中的37%。非-渗出型AMD特征是外层视网膜、视网膜色素上皮(RPE)、布鲁赫(Bruch's)膜和脉络膜毛细血管层中的玻璃疣堆积以及视杆和视锥光感受器萎缩;而渗出型AMD致使脉络膜新生血管生成(Green 和 Enger, 眼科学(*Ophthalmol*), 100: 1519-35, 1993; Green 等人, 眼科学(*Ophthalmol*), 92: 615-27, 1985; Green 和 Key, 美国眼科学协会会刊(*Trans Am Ophthalmol Soc*), 75: 180-254, 1977; Bressler 等人, 视网膜(*Retina*), 14: 130-42, 1994; Schneider 等人, 视网膜, 18: 242-50, 1998; Green 和 Kuchle (1997). In: Yannuzzi, L.A., Flower, R. W., Slakter, J. S. (编辑), 吲哚菁绿血管造影术(*Indocyanine green angiography*), St. Louis: Mosby, 151-6 页)。视网膜色素变性(RP)表示一类以伴随视锥光感受器和下面的色素上皮继发性萎缩的视杆变性为特征的遗传性营养障碍。(Pruett, 美国眼科学协会会刊(*Trans Am Ophthalmol Soc*), 81: 693-735, 1983; Heckenlively, 美国眼科学协会会刊(*Trans Am Ophthalmol Soc*), 85: 438-470, 1987; Pagon, 眼科学调查(*Sur Ophthalmol*), 33: 137-177, 1988; Berson, 研究性眼科学和视觉科学(*Invest Ophthalmol Vis Sci*), 34: 1659-1676, 1993; Nickells 和 Zack, 眼遗传学(*Ophthalmic Genet*), 17: 145-65, 1996)。视网

膜变性疾病例如 AMD 和 RP 的发病机制是多面性的,在正常个体中或在遗传学上易罹患的那些个体中其可由环境因素引发。迄今为止,已绘制或克隆了超过 100 种可能与各种外层视网膜变性相关的基因。

光暴露是已被确定的促进视网膜变性病症例如 AMD 恶化的环境因素(Young, 眼科学调查(*Sur Ophthal*), 32:252-269, 1988; Taylor 等人, 眼科学档案(*Arch Ophthal*), 110: 99-104, 1992; Cruickshank 等人, 眼科学档案(*Arch Ophthal*), 111: 514-518, 1993)。因为以下原因,已表明致使视网膜细胞光损伤的光-氧化应激是视网膜变性疾病的有效模型,所述原因是:损伤主要是针对外层视网膜的光感受器和视网膜色素上皮(RPE)、在遗传性变性疾病中受到影响的上述相同细胞的(Noell 等人, 研究性眼科学和视觉科学(*Invest Ophthal Vis Sci*), 5, 450-472, 1966; Bressler 等人, 眼科学调查(*Sur Ophthal*), 32, 375-413, 1988; Curcio 等人, 研究性眼科学和视觉科学(*Invest Ophthal Vis Sci*), 37, 1236-1249, 1996);凋亡是在 AMD 和 RP 中光感受器和 RPE 细胞损失的细胞死亡机制,并且其在光-氧化诱导的细胞损伤之后发生(Ge-Zhi 等人, 美国眼科学协会会刊(*Trans AM Ophthal Soc*), 94, 411-430, 1996; Abler 等人, 分子病理学和药理学研究通报(*Res Commun Mol Pathol Pharmacol*), 92, 177-189, 1996; Nickells 和 Zack, 眼遗传学(*Ophthalmic Genet*), 17: 145-65, 1996);还已表明光为 AMD 和 RP 恶化的环境风险因素(Taylor 等人, 眼科学学报(*Arch Ophthalmol*), 110, 99-104, 1992; Naash 等人, 研究性眼科学和视觉科学(*Invest Ophthal Vis Sci*), 37, 775-782, 1996);并且还已表明抑制光-氧化损伤的治疗介入在遗传性变性视网膜疾病的动物模型中是有效的(LaVail 等人, 美国国家科学院学报(*Proc Nat Acad Sci*), 89, 11249-11253, 1992; Fakforovich 等人, 自然(*Nature*), 347, 83-86, 1990; Frasson 等人, 天然药物(*Nat. Med.*), 5, 1183-1187, 1990)。

许多不同类别的化合物已在使视网膜光-氧化损伤最小化的多种动物模型上得到证实。它们包括:抗氧化剂类例如抗坏血酸(Organisciak 等人, 研究性眼科学和视觉科学(*Invest Ophthal Vis Sci*), 26: 1589-1598, 1985)、

二甲基硫脲(Organisciak 等人, 研究性眼科学和视觉科学(*Invest Ophthalmol Vis Sci*), 33: 1599-1609, 1992; Lam 等人, 眼科学档案(*Arch Ophthalmol*), 108: 1751-1752, 1990)、 α -生育酚(Kozaki 等人, *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 98: 948-954, 1994)和 β -胡萝卜素(Rapp 等人, 当代眼研究(*Cur Eye Res*), 15: 219-232, 1995); 钙拮抗剂类例如氟桂利嗪(Li 等人, 实验性眼研究(*Exp Eye Res*), 56: 71-78, 1993; Edward 等人, 眼科学档案(*Arch Ophthalmol*), 109: 554-622, 1992; Collier 等人, 研究性眼科学和视觉科学(*Invest Ophthalmol Vis Sci*), 36: S516); 生长因子类例如碱性-成纤维生长因子、脑源性神经因子、睫状神经营养因子和白介素-1- β (LaVail 等人, 国家科学院学报(*Proc Nat Acad Sci*), 89: 11249-11253, 1992); 糖皮质激素类例如甲泼尼龙(Lam 等人, 格雷夫临床实验眼科学档案(*Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*), 231: 729-736, 1993)和地塞米松(Fu 等人, 实验性眼研究(*Exp Eye Res*), 54: 583-594, 1992); 铁螯合剂类例如去铁敏(Li 等人, 当代眼研究(*Cur Eye Res*), 2: 133-144, 1991); NMDA-拮抗剂例如依利罗地和 MK-801 (Collier 等人, 研究性眼科学和视觉科学(*Invest Ophthalmol Vis Sci*), 40: S159, 1999)。

已表明单胺氧化酶(MAO)抑制剂能抑制凋亡的诱导。认为上述抑制是由改变清道夫蛋白 Cu/Zn 超氧化物歧化酶(SOD1)和 Mn 超氧化物歧化酶(SOD2)以及癌-基因 Bcl-2、Bcl-XL、Bax、一氧化氮合酶、c-JUN 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶的基因表达而产生的。已表明雷沙吉兰(1 mg/kg)(一种 MAO-B 抑制剂)在小鼠闭合性头损伤模型中能明显促进运动功能和空间记忆的恢复。此外, 脑水肿被减少 40-50%。一些其它的 MAO 抑制剂已被描述用于其它的病症。在视网膜方面, 已表明 MAO 抑制剂司来吉兰和去甲司来吉兰能保护神经节细胞免于 NMDA-诱导的兴奋毒性(Takahata 等人, 欧洲药理学杂志(*Eur J Pharmacol*), 458(1-2): 81-9, 2003)。还已表明得普尼林(deprenyl)能在视神经压伤(Buys 等人, 当代眼研究(*Cur Eye Res*), 14(2): 119-126, 1995)或血清剥夺(serum deprivation)(Ragaiey 等人, 眼睛药理学和治疗学杂志(*J Ocul Pharmacol Ther*), 13(5): 479-88, 1997)后保

护神经节细胞。氯吉兰(一种 MAO-A 抑制剂)对圆盘脱落(disk shedding)和自噬性降解的光感受器节律的作用已被报道(Reme 等人, 英国眼科学协会会刊(*Trans Ophthalmol Soc U K*), 103 (Pt 4): 405-10, 1983)。

美国专利 5,263,957 描述了 N-苯基烷基取代的 α -氨基甲酰胺衍生物。所述化合物据说可用作抗癫痫、抗帕金森、神经保护、抗抑郁、解痉和/或安眠物质。所述'957 专利没有提及上述化合物用于治疗外层视网膜病症的用途。事实上, 完全没有提及眼科适应征。

美国专利号 5,945,454 描述了 2-(4-取代的)-苄基氨基-2-甲基-丙酰胺类及其作为治疗物质的用途。描述了上述化合物对中枢神经系统是活性的, 并建议上述化合物在中枢神经系统病症(包括眼损伤或视网膜病)中使用。值得注意的是, 本发明化合物不包括在要求保护的用于所述方法的化合物之内。

美国专利号 5,242,950 描述了通过给药 L-得普尼林或其盐来治疗黄斑变性的方法。L-得普尼林是选择性 MAO-B 抑制剂。L-得普尼林通过口服或经皮给药。上述'950 专利没有提及其它类型 MAO 抑制剂的用途, 也没有提及除口服或经皮之外的递送方法。美国专利号 5,981,598 描述了通过给药得普尼林化合物来治疗青光眼的方法。用于上述'598 专利或'950 专利的方法的公开化合物显然不同于本发明化合物。事实上, 在上述'598 专利中将“得普尼林化合物”定义为“结构上与得普尼林相似的得普尼林化合物”, 因此, 不包括本发明的优选化合物。

WO 2005/039591 描述了苯并氮杂萘衍生物, 它们是 MAO-B 抑制剂。其中所述的化合物也显然不同于本发明的化合物。

上述公开文本中都没有提及本发明化合物在抑制或预防由光感受器和/或视网膜色素上皮细胞的损失或损伤导致的视网膜变性中的用途。对于所述严重的、威胁视力的病症而言, 需要的是更有效的化合物和治疗方法。

发明内容

本发明涉及 MAO-A/B 和 B 抑制剂, 它们已被发现可用于治疗外层视

网膜病症，特别是：AMD；RP 和其它形式的遗传性变性视网膜病；视网膜脱离和撕裂；黄斑皱褶；影响外层视网膜的局部缺血；糖尿病视网膜病；与激光疗法(格栅样的、局灶性的和全视网膜的)包括光动力疗法(PDT)相关的损害；外伤；外科手术(视网膜移位(translocation)、视网膜下手术或玻璃体切除术)或光-诱导的医源性视网膜病；和视网膜移植物的保护。如本文所用，外层视网膜包括 RPE、光感受器、Muller 细胞(至延伸到外层视网膜的程度)和外丛状层。将所述化合物进行配制用于全身或局部眼睛递送。

附图说明

下列附图构成本说明书的一部分，且其进一步阐明本发明的某些方面。通过参照所述附图以及文中提供的具体实施方案的详述可以更好地理解本发明。

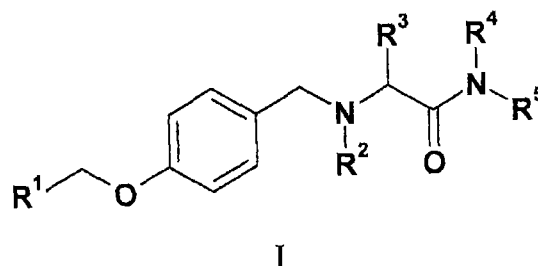
图 1A 和图 1B 显示了在 5 天(图 1A)和 1 个月(图 1B)时全身给药沙非酰胺(safinamide)并暴露于严重光-氧化刺激下的大鼠中的 ERG 功能的保存。15-60 mg/kg 剂量的沙非酰胺提供明显的和完全的视网膜功能保护。

图 2 显示用沙非酰胺治疗来预防视网膜损害。给药 60 mg/kg 沙非酰胺的大鼠无明显的视网膜损害。

发明详述

化学部分

本发明的主题是通式 I 所示的化合物



其中：

R¹ 是 C5-C7 环烷基；苯基(未取代的)或独立地被一个或多个卤素或

CF₃ 取代的苯基;

R² 是 H、C1-C3 烷基;

R³ 是 H、C1-C3 烷基(未取代的)或被 OR⁶ 取代的 C1-C3 烷基;

R⁴、R⁵ 独立地是 H、C1-C3 烷基;

R⁶ 是 H、C1-C2 烷基;

优选的式 I 化合物是如下化合物, 其中:

R¹ 是 C5-C7 环烷基; 苯基(未取代的)或独立地被一个或两个 F、Cl 或

CF₃ 取代的苯基;

R² 是 H、C1-C2 烷基;

R³ 是 H、C1-C2 烷基(未取代的)或被 OR⁶ 取代的 C1-C2 烷基;

R⁴、R⁵ 独立地是 H、C1-C2 烷基;

R⁶ 是 H、C1-C2 烷基;

更优选的式 I 化合物是如下化合物, 其中:

R¹ 是苯基(未取代的)或独立地被一个或两个 F、Cl 取代的苯基;

R² 是 H、CH₃;

R³ 是 H、C1-C2 烷基(未取代的)或被 OR⁶ 取代的 C1-C2 烷基;

R⁴、R⁵ 独立地是 H、CH₃;

R⁶ 是 H、CH₃;

最优选的式 I 化合物是如下的(S)和(R)化合物, 其中:

R¹ 是 3-氟苯基;

R² 是 H;

R³ 是 CH₃;

R⁴、R⁵ 是 H;

并且特别是(S)-异构体(沙非酰胺)。

式 I 化合物是已知化合物, 并根据在美国专利号 5,263,957 中描述的方

法制备。

生物学部分

对于数百万患者来说,视网膜疾病对组织通常是破坏性的,并能导致视觉功能的丧失。例如,环境因素(例如光下暴露)可以损坏视网膜组织,已知其促使视网膜变性病症例如 AMD 恶化(Young 1988; Taylor 等人 1992; Cruickshank 等人 1993)。迄今为止,对于视网膜神经变性病症不存在有效的治疗。黄斑变性的早期通常用抗氧化剂或抗炎物质联合治疗,它们的功效还没有在临床得到证实。通过下列方法之一来治疗致使严重视力丧失的黄斑变性晚期,所述方法为手术除去视网膜下腔的膜、激光光凝固法、光动力学疗法和最近在患有渗出型 AMD 的患者中使用 VEGF 阻断剂法。对于称作地图状萎缩的晚期型干性 AMD,没有有效的认可治疗。激光治疗还用于治疗糖尿病视网膜病。重要的是应注意到视网膜的激光凝固术和视网膜下的膜或玻璃体内的膜的手术切除会致使活的视网膜神经元遭到破坏。通过 MAO 抑制剂预防或减少外层视网膜损伤是治疗年龄相关的黄斑病和/或黄斑变性和其它视网膜病的独特的新颖的治疗方法。

在本发明人所采用的光损伤示例中,在大剂量时抗氧化剂是无效的(α -生育酚)或微弱有效的(抗坏血酸、维生素 E 类似物)。类似地,在预防光诱导的功能或形态学变化中,一些钙拮抗剂(氟桂利嗪、尼卡地平)是中等有效的而其它(硝苯地平、尼莫地平、维拉帕米)没有作用。出乎意料地,发现在光损伤示例中本发明化合物的效力是抗氧化剂的 50-100 倍,因此本发明化合物可用于治疗外层视网膜病症。

单胺氧化酶(MAO)是线粒体外膜的整合蛋白,并在中枢神经系统(CNS)和外周神经系统(PNS)的胺类活中起主要作用。在人类 CNS 中,MAO-A 同工酶负责 5-羟色胺和去甲肾上腺素的脱氨基,而 MAO-B 同工酶负责多巴胺的脱氨基。在经过最初的热情之后,MAO-A 和非选择性 MAO 抑制剂的作用被与广泛的 MAO 诱导药物和 MAO 诱导食物的相互作用所限制,上述相互作用可能特别是与拟交感药物或含酪胺的食物的,引起高血压反

应。在许多模型中 MAO-B 同工酶抑制剂已显示出神经保护和神经修复性质,所述模型包括:猴子和小鼠 MPTP 模型、小鼠头损伤模型、大鼠面神经轴突切开术和啮齿类中的急性药物诱导的多巴胺能运动功能障碍。长效 MAO-B 抑制剂(得普尼林、司来吉兰)还伴随有失眠、恶心、良性心律失常、头晕和头痛。

本发明涉及通式 I 的 MAO 抑制剂或其任何药学上可接受的衍生物(包括药学上可接受的盐)在治疗外层视网膜病症中的用途。短语“药学上可接受的”指化合物能被安全地用于治疗外层视网膜病症。如本文所用,外层视网膜包括 RPE、光感受器、Muller 细胞(至其延伸到外层视网膜的程度)和外丛状层。将所述化合物配制用于全身或局部眼睛递送。

尽管预期任何短效的 MAO A/B 和 B 抑制剂可在本发明的方法中使用,但是优选的 MAO 抑制剂是强效、短效的 MAO-B 受体抑制剂,例如文中特别描述的那些化合物。优选的化合物包括 2-[[4-(3-氯-苄氧基)-苄基]-甲基-氨基]-乙酰胺、(S)-2-[4-(2-氟-苄氧基)-苄基氨基]-丙酰胺、(S)-2-[4-(4-氟-苄氧基)-苄基氨基]-丙酰胺、(S)-2-[4-(3-氯-苄氧基)-苄基氨基]-丙酰胺、(R)-2-[4-(3-氯-苄氧基)-苄基氨基]-3-羟基-丙酰胺、(S)-2-(4-环己基甲氧基-苄基氨基)-丙酰胺、(S)-2-[4-(3-氟-苄氧基)-苄基氨基]-3-羟基-丙酰胺、(S)-2-[4-(3-氯-苄氧基)-苄基氨基]-3-羟基-丙酰胺、(S)-2-[[4-(3-氯-苄氧基)-苄基]-甲基-氨基]-丙酰胺、(S)-2-[4-(3-氟-苄氧基)-苄基氨基]-丙酰胺(沙非酰胺)、(S)-2-[4-(3-氟-苄氧基)-苄基氨基]-丙酰胺(沙非酰胺)或这些化合物的任何药学上可接受的衍生物或类似物或盐。在文中所述的方法中使用的最优选化合物是沙非酰胺或其任何药学上可接受的衍生物、类似物或盐。

外层视网膜病症包括正常或遗传学上易罹患个体中的急性和慢性环境诱导的(创伤、缺血、光-氧化应激)光感受器和 RPE 细胞的变性病患。所述病症包括但不限于年龄相关的黄斑变性(AMD)、视网膜色素变性病(RP)和其它形式的遗传性变性视网膜疾病;视网膜脱离;撕裂;黄斑皱褶;影响外层视网膜的局部缺血;糖尿病视网膜病;与激光疗法(格栅样的、局灶性的和全视网膜的)包括光动力疗法(PDT)、热或冷冻疗法相关的损害;外伤;

外科手术(视网膜移位、视网膜下手术或玻璃体切除术)或光-诱导的医源性视网膜病; 和视网膜移植物的保护。

本发明化合物是体外和体内有效的和选择性的 MAO-B 抑制剂(IC_{50} 在亚微摩尔至纳摩尔范围), 其通常不具有与 MAO-A 相关的作用。在小鼠口服给药后, 所述化合物作为强效的、短效的 MAO-B 抑制剂, 给药单剂量物质后 8-16 小时活性完全恢复。

可以使用技术人员公知的各种方法测量对于本发明方法有用的化合物的 MAO 抑制活性。下文所述的方法 1 和方法 2 是测量 MAO B 抑制活性的有用的试验示例。

方法 1

体外 MAO-A 和 MAO-B 酶活性试验

-膜制备(粗制线粒体组分)

在轻微麻醉下将雄性 Wistar 大鼠(Harlan, 意大利-175-200 g)处死, 并迅速移出脑部, 将其在 8 体积冰冷的含有 0.1 M EDTA 的 0.32 M 蔗糖缓冲液(pH 7.4)中制成匀浆。将上述粗的匀浆于+4℃、2220 rpm 离心 10 分钟, 回收上清液。再次将片状沉淀物(pellet)匀浆并离心。合并两次上清液, 并在 9250 rpm 离心 10 分钟。将片状沉淀物再悬浮在新鲜缓冲液中, 并于+4℃、11250 rpm 离心 10 分钟。将得到的片状沉淀物贮存在-80℃。

-体外酶活性试验

对于 MAO-A 和 MAO-B 分别使用底物 ^{14}C -5-羟色胺(5-HT)和 ^{14}C -苯乙胺(PEA), 利用放射酶学分析来评价酶活性。

将线粒体片状沉淀物(500 μ g 蛋白质)重新悬浮在 0.1 M 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中。将 500 μ l 该混悬液加入到 50 μ l 受试化合物溶液或缓冲液中, 并在 37℃孵育 30 min (预孵育), 接着加入底物(50 μ l)。在 37℃孵育 30 分钟(^{14}C -5-HT, 5 μ M)或在 37℃孵育 10 分钟(^{14}C -PEA, 0.5 μ M)。

加入 0.2 ml 37% HCl 或高氯酸来终止反应。离心后, 用 3 ml 乙醚(5-HT)或甲苯(PEA)萃取去氨基代谢产物, 并经液体闪烁光谱法在 90%效率下测

量放射性有机相。通过测量洗出液的放射性得到形成的中性和/或酸性代谢产物的量(其作为 MAO 活性结果)。

将样品中 MAO 的活性(相应于与无抑制剂的对照活性相比的放射性百分数)以 nmol 转化的底物/mg 蛋白/min 表示。

从至少 8 个不同的浓度点(每个一式两份, 10^{-10} 至 10^{-5} M)得到药物抑制曲线。用非线性回归分析(最佳拟合计算机辅助程序)计算带有确定的置信区间的 IC_{50} 值(抑制 50%酶活性的药物浓度)。

使用方法 1 中所述的步骤得出表 1 中所示的数据。

方法 2

离体 MAO-B 抑制

将受试化合物以 20 mg/Kg 的单剂量口服给药至雄性 C57BL 小鼠(Harlan, 意大利, 25-27 g)。在不同的时间间隔(1、2、4、8 和 24 h), 将动物处死, 移出脑部, 切出皮质层, 并将其储存于 -80°C 。在 0.1 M 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中制备粗匀浆, 并乘新鲜使用。按照上面所述来评价 MAO-A 和 MAO-B 活性。

表 1、一些本发明化合物对大鼠脑线粒体中 MAO-A 和 MAO-B 的体外抑制作用。

化合物	MAO A	MAO B
	$IC_{50}, \mu\text{M}$	
2-[[4-(3-氯-苄氧基)-苄基]-甲基-氨基]-乙酰胺	50	0.04
(S)-2-[4-(2-氟-苄氧基)-苄基氨基]-丙酰胺	228	0.18
(S)-2-[4-(4-氟-苄氧基)-苄基氨基]-丙酰胺	93	0.06
(S)-2-[4-(3-氯-苄氧基)-苄基氨基]-丙酰胺	114	0.03
(R)-2-[4-(3-氯-苄氧基)-苄基氨基]-3-羟基-丙酰胺	>100	0.11
(S)-2-(4-环己基甲氧基-苄基氨基)-丙酰胺	301	0.03
(S)-2-[4-(3-氟-苄氧基)-苄基氨基]-3-羟基-丙酰胺	100	0.14

(S)-2-[4-(3-氯-苄氧基)-苄基氨基]-3-羟基-丙酰胺	84	0.04
(S)-2-[[4-(3-氯-苄氧基)-苄基]-甲基-氨基]-丙酰胺	82	0.06
(S)-2-[4-(3-氟-苄氧基)-苄基氨基]-丙酰胺(沙非酰胺)	584	0.09

方法 3

MAO 抑制剂在大鼠光-氧化诱导的视网膜病模型中的神经保护活性

与光相关的视网膜病是由吸收可见或近紫外辐射引起的 RPE 和视神经视网膜过度刺激而导致的。损害的严重性取决于波长、辐射度、照射持续时间、物种、眼睛色素沉着和年龄。损伤可以由细胞膜过氧化、线粒体酶(例如细胞色素氧化酶)失活和/或增加的细胞内钙引起。由光-氧化应激造成的细胞损伤通过凋亡引起细胞死亡(Shahinfar 等人, 1991, 当代眼研究(*Current Eye Research*), 第 10 卷: 47-59; Abler 等人, 1994, 研究性眼科学和视觉科学(*Investigative Ophthalmology & Visual Science*), 第 35 卷(增刊): 1517)。已表明氧化应激诱导的凋亡是导致产生多种眼睛疾病的原因, 所述眼睛疾病包括医源性视网膜病、黄斑变性病、RP 和其它形式遗传性变性视网膜疾病、局部缺血视网膜病、视网膜撕裂、视网膜脱离、青光眼和视网膜新生血管生成(Chang 等人, 1995, 眼科学档案(*Archives of Ophthalmology*), 第 113 卷: 880-886; Portera-Cailliau 等人, 1994, 美国国家科学院学报(*Proceedings of National Academy of Science (U.S.A.)*), 第 91 卷: 974-978; Buchi, E. R., 1992, 实验性眼研究(*Experimental Eye Research*), 第 55 卷: 605-613; Quigley 等人, 1995, 研究性眼科学和视觉科学(*Investigative Ophthalmology & Visual Science*), 第 36 卷: 774-786)。已经在小鼠(Zigman 等人, 1975, 研究性眼科学和视觉科学(*Investigative Ophthalmology & Visual Science*), 第 14 卷: 710-713)、大鼠(Noell 等人, 1966, 研究性眼科学和视觉科学(*Investigative Ophthalmology & Visual*

Science), 第 5 卷: 450-473; Kuwabara 等人, 1968, 眼科学档案(*Archives of Ophthalmology*), 第 79 卷:69-78; LaVail, M.M., 1976, 研究性眼科学和视觉科学(*Investigative Ophthalmology & Visual Science*), 第 15 卷: 64-70)、兔子(Lawwill, T., 1973, 研究性眼科学和视觉科学(*Investigative Ophthalmology & Visual Science*), 第 12 卷: 45-51)和松鼠(Collier 等人, 1989; In LaVail 等人, 遗传和环境诱导的视网膜变性(*Inherited and Environmentally Induced retinal Degenerations*). Alan R. Liss, Inc., New York; Collier 等人, 1989, 研究性眼科学和视觉科学(*Investigative Ophthalmology & Visual Science*), 第 30 卷: 631-637)、非人类的灵长类(Tso, M. O. M., 1973, 研究性眼科学和视觉科学(*Investigative Ophthalmology & Visual Science*), 第 12 卷:17-34; Ham 等人, 1980, 视觉研究(*Vision Research*), 第 20 卷: 1105-1111; Sperling 等人, 1980, 视觉研究(*Vision Research*), 第 20 卷: 1117-1125; Sykes 等人, 1981, 研究性眼科学和视觉科学(*Investigative Ophthalmology & Visual Science*), 第 20 卷: 425-434; Lawwill, T., 1982, 美国眼科学协会会刊(*Transactions of the American Ophthalmology Society*), 第 80 卷: 517-577)和人类(Marshall 等人, 1975, 英国眼科学杂志(*British Journal of Ophthalmology*), 第 59 卷: 610-630; Green 等人, 1991, 美国眼科学杂志(*American Journal of Ophthalmology*), 第 112 卷: 520-27)中观察到光诱导的视网膜损伤。在人类中, 长期暴露于环境辐射还为 ARMD 的风险因素(Young, R. W., 1988, 眼科学研究(*Survey of Ophthalmology*), 第 32 卷:252-269; Taylor 等人, 1992, 眼科学档案(*Archives of Ophthalmology*), 第 110 卷:99-104; Cruickshank 等人, 1993, 眼科学档案(*Archives of Ophthalmology*), 第 111 卷: 514-518)。

用沙非酰胺预防光-氧化损伤: 通过测量光-诱导的视网膜功能(视网膜电流图(ERG))变化和评估视网膜形态学变化来评价短效 MAO-B 抑制剂沙非酰胺保护视网膜细胞免于蓝-光照射诱导的光化学损伤的效力。5-天恢复期后, 在给药沙非酰胺(5-60 mg/kg)的大鼠中, 测量到了光照射大鼠中显著剂量-依赖的视网膜功能保护。1 个月恢复期后, 在给药沙非酰胺(15-60

mg/kg)的大鼠中 ERGs 与正常的没有显著不同。

受试动物: 将雄性 Sprague Dawley 大鼠随机分至药物或溶媒实验组。接受溶媒(N=15)或药物(沙非酰胺: 5 mg/kg, N=10; 15 mg/kg, N=10; 30 mg/kg, N=10; 和 60 mg/kg, N=9)处理的大鼠在 6 小时的光照射(滤光器滤过的蓝光(~220 nm))前 48、24 和 0 小时以及光照后 24 和 48 小时给药(IP)。将对照大鼠笼养在正常循环光照的笼子里。对照大鼠不给药溶媒或药物。

视网膜功能评估: ERG 是测量眼睛对闪光的电反应的非侵袭性临床方法。a-波和 b-波是 ERG 诊断视网膜功能的两个组成部分。a-波反映外层视网膜功能, 它是由光感受器和 RPE 之间的相互作用产生的, 而 b-波反映内层视网膜(inner retina)功能, 特别是双极细胞。尽管上述光照不明显损伤内层视网膜, 但由于缺少光感受器输入, b-波被阻抑。a-波振幅或潜伏期的变化用于诊断外层视网膜病变。5 天恢复期后, 记录暗适应的麻醉大鼠(氯胺酮-HCl, 75 mg/Kg; 赛拉嗪, 6 mg/Kg)的 ERG。通过观察 ganzfeld 引出眼睛对光闪的电反应。将对一系列强度逐渐增加的闪光的 ERG 数字化, 以便分析短暂的波形特征和反应电压-log 强度之间的关系。

视网膜损伤的光显微评估: 将眼组织固定在多聚甲醛和戊二醛的混合物中, 在逐渐升高的乙醇系列中使其脱水, 植入 JB-4 塑性树脂中, 并使用连接至显微镜的定量计算机影象分析系统分析 1 至 1.5-微米厚度的切片。测量视网膜色素上皮(RPE)、外核层(ONL)和内核层(INL)的厚度以及线粒体所在的内节(IS)和含有光敏感感光色素的外节(OS)的长度, 来评估外层视网膜保护。因为光照不明显影响内核层, 这层作为附加的对照测量。

结果: 正如通过 ERG 所测量的, 当光照射后第 5 天测量, 对给药溶媒的大鼠的蓝光照射致使视网膜功能明显下降(ANOVA, $p < 0.001$) (图 1A)。蓝光照射后, 给药溶媒的大鼠的最大 a-波响应振幅减少 69%, 并且最大的 b-波响应振幅减少 71%。给药沙非酰胺产生剂量-依赖的视网膜功能保护(图 1A)。在所有的评估剂量(5-60 mg/kg), 与给药溶媒的大鼠相比测得显著的 ERG 保护。给药沙非酰胺(5 mg/kg)的大鼠的最大 ERG a-波响应是正常的 52%, 并且从给药 15 或 30 mg/kg 的大鼠中记录的响应强于正常的 70%。

与保持在正常、暗淡、可见、循环光下的对照大鼠相比，给药沙非酰胺(60 mg/kg)的大鼠的视网膜响应没有显著下降。

图 1A 显示 6 小时蓝光照射后第 5 天测定的 ERG 响应幅度。给药沙非酰胺(5-60 mg/kg)提供明显的视网膜功能保护。

在另外的 3 周恢复期后，闪光诱导的视网膜响应评估(图 1B)显示给药溶媒的大鼠没有明显的 ERG 响应恢复。在给药沙非酰胺(15 至 60 mg/kg)的大鼠中，ERG 响应评估显示正常的 ERG a-和 b-波功能。给药溶媒的大鼠视网膜光显微评价显示明显的(ANOVA, $p < 0.001$) RPE 变薄和光感受器细胞损失和它们的内+外节长度缩短(图 2)。在给药沙非酰胺大鼠中测定了视网膜损伤的剂量依赖式减少。与给药溶媒的大鼠相比，从给药沙非酰胺(15 和 60 mg/kg)大鼠中得到的视网膜显示较厚的 RPE。与给药溶媒的大鼠相比，给药沙非酰胺(15 和 60 mg/kg)的大鼠中的 ONL 明显更厚，且光感受器节段(segment)的长度明显更长(60 mg/kg)，并与正常对照没有明显不同。给药沙非酰胺(60 mg/kg)的大鼠的视网膜无任何明显的视网膜损伤。

一般来讲，对于变性疾病而言，将本发明化合物口服给药，所述化合物的日剂量为大约 0.001 至大约 500 毫克。优选的总日剂量是约 1 至约 100 毫克。非口服给药例如玻璃体内给药、局部眼睛给药、透皮贴剂给药、皮下给药、肠胃外给药、眼内给药、结膜下给药或眼球后给药或眼睛膜囊内(subtenon)注射给药、经巩膜给药(包括离子电渗疗法)、后部巩膜旁(posterior juxtасcleral)递送给药、或者缓释的可生物降解的多聚体或脂质体给药可能需要调整必需的总日剂量，以提供治疗有效量的化合物。还可以以眼灌洗液剂递送化合物。浓度应为大约 0.001 μM 至大约 100 μM ，优选大约 0.01 μM 至大约 5 μM 。

可以将上述化合物引入到各种类型的眼用制剂中用于递送至眼睛(例如局部、前房内(intracamerally)、巩膜旁或通过植入物)。上述化合物可以与眼科可接受的防腐剂、表面活性剂、粘度增强剂、胶凝剂、渗透增强剂、缓冲剂、氯化钠和水混合以形成含水的、无菌眼用混悬剂或溶液剂或预制的凝胶剂或原位形成的凝胶剂。可通过将化合物溶解于生理学上可接受的

等渗水缓冲液来制备眼用溶液制剂。此外，眼用溶液剂可以包含眼科可接受的表面活性剂以帮助溶解化合物。眼用溶液剂可以包含粘度增强剂例如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等，以改善制剂在结膜囊的存留。为了制备无菌的眼用软膏制剂，将活性成分与防腐剂在适当的溶媒(例如矿物油、液体羊毛脂或白凡士林)中混合。根据类似的眼用制备品中公开的制剂，可以通过将活性成分混悬在由例如卡波泊-940 等组合产品制备的亲水基质中来制备无菌的眼用凝胶制剂；可以加入防腐剂和张度剂。

如果局部给药，将化合物优选配制成为 pH 值大约 4 至 8 的局部眼用混悬剂或溶液剂。在所述制剂中通常含有 0.001%至 5%(重量)、优选 0.01%至 2%(重量)的所述化合物。因此，对于局部给药而言，根据熟练的临床医生的决定，将 1 至 2 滴所述制剂递送至眼睛表面，每天 1 至 4 次。

将下列实施例引入，以便举例说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解，公开在下面的实施例中的技术代表了发明人发现的能很好地实施本发明的技术，因此可以认为对于其实施而言，所述技术构成了优选的方式。然而，本领域技术人员应该理解：根据本说明书，在不背离本发明精神和范围的情况下，可以对所公开的具体实施方案进行许多变化，并且仍然得到相似的或相近的结果。

根据熟练的临床医生的决定，按照本发明每天给药 1-4 次，下列局部眼用制剂是有用的。

实施例 1

成分	量(重量%)
沙非酰胺	0.01-2%
羟丙基甲基纤维素	0.5%
磷酸氢二钠(无水的)	0.2%
氯化钠	0.5%
EDTA 二钠(依地酸二钠)	0.01%
吐温 80	0.05%

苯扎氯铵	0.01%
氢氧化钠/氢氯酸	用于调节 pH 至 7.3-7.4
纯净水	适量至 100%

实施例 2

成分	量(重量%)
沙非酰胺	0.01-2%
甲基纤维素	4.0%
磷酸氢二钠(无水的)	0.2%
氯化钠	0.5%
EDTA 二钠(依地酸二钠)	0.01%
吐温 80	0.05%
苯扎氯铵	0.01%
氢氧化钠/氢氯酸	用于调节 pH 至 7.3-7.4
纯净水	适量至 100%

实施例 3

成分	量(重量%)
化合物	0.01-2%
瓜尔胶	0.4-6.0%
磷酸氢二钠(无水的)	0.2%
氯化钠	0.5%
EDTA 二钠(依地酸二钠)	0.01%
吐温 80	0.05%
苯扎氯铵	0.01%
氢氧化钠/氢氯酸	用于调节 pH 至 7.3-7.4
纯净水	适量至 100%

实施例 4

成分	量(重量%)
化合物	0.01-2%
白色凡士林和矿物油和羊毛脂	软膏稠度
磷酸氢二钠(无水的)	0.2%
氯化钠	0.5%
EDTA 二钠(依地酸二钠)	0.01%
吐温 80	0.05%
苯扎氯铵	0.01%
氢氧化钠/氢氯酸	用于调节 pH 至 7.3-7.4

实施例 5

100 mM IV 溶液剂 w/v%	
沙非酰胺	0.384% (大约 4%)
L-酒石酸	2.31%
氢氧化钠	pH 3.8
氢氯酸	pH 3.8
纯净水	适量至 100%

实施例 6

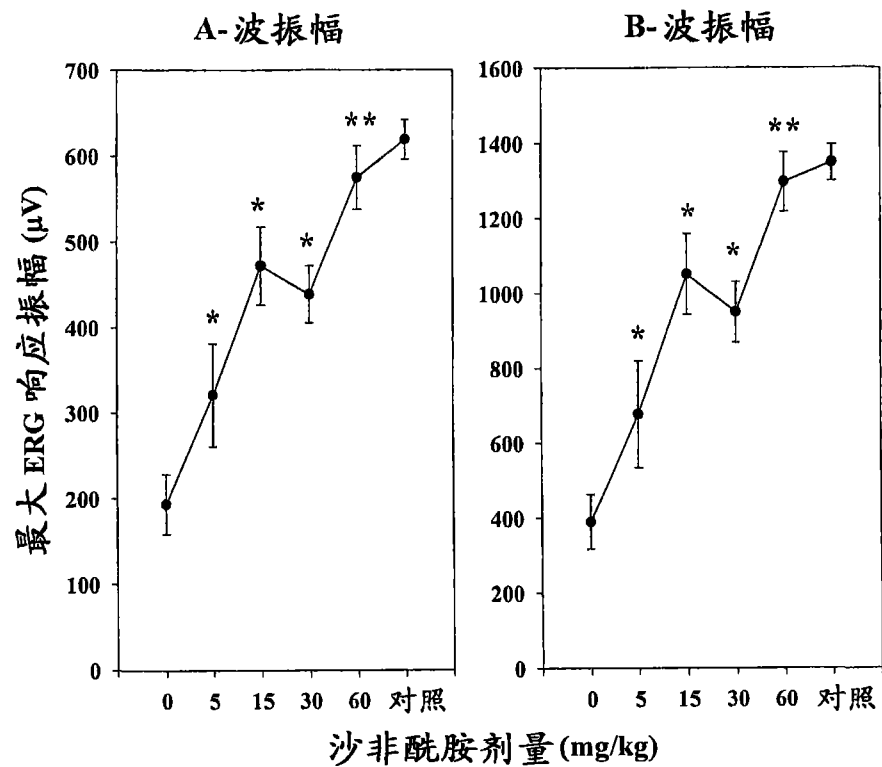
5 mg 胶囊	
成分	mg/胶囊 (总重 22a mg)
沙非酰胺	5
乳糖, 无水的	55.7
羧甲基钠淀粉	8

微晶纤维素	30
胶态二氧化硅	.5
硬脂酸镁	.8

根据本说明书，不需过度的实验，可以制备和实施文中公开和要求保护的所有组合物和/或方法。尽管已根据优选的实施方案描述了本发明的组合物和方法，但是对本领域技术人员来说，显而易见，可以将变通方案应用于文中所述的组合物和/或方法和方法的步骤或步骤序列中，同时不背离本发明的思想、精神和范围。更具体地，显而易见，某些化学和结构相关的物质可以用于替换文中所述的物质以获得相似的结果。认为所有这些对本领域技术人员为显而易见的替换和修改均包括在所附的权利要求书定义的发明的精神、范围和思想内。

将文中所引的参考文献特别引入文中作为参考，所述文献对文中所述的那些内容提供了示例性的方法或其它详细的补充。

沙非酰胺对光诱导的视网膜病变的预防
5天恢复



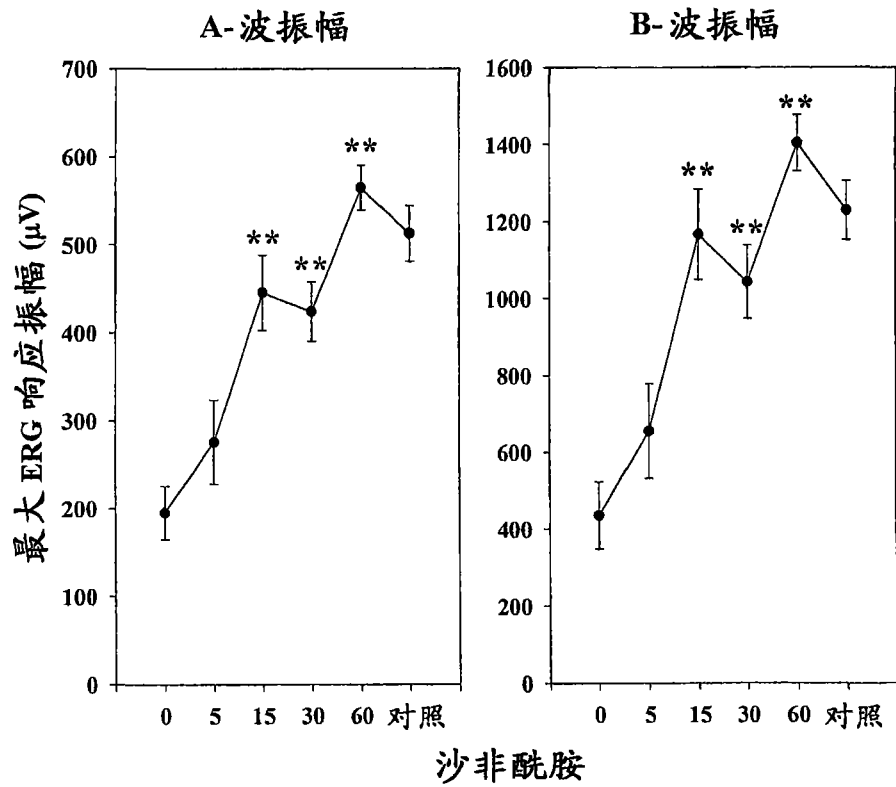
* 与溶媒相比显著更高的响应 ($p<0.05$).

** 与溶媒相比显著更高的响应 ($p<0.05$)且与正常的没有差别 ($p>0.05$).

图 1A

沙非酰胺对光诱导的视网膜病变的预防

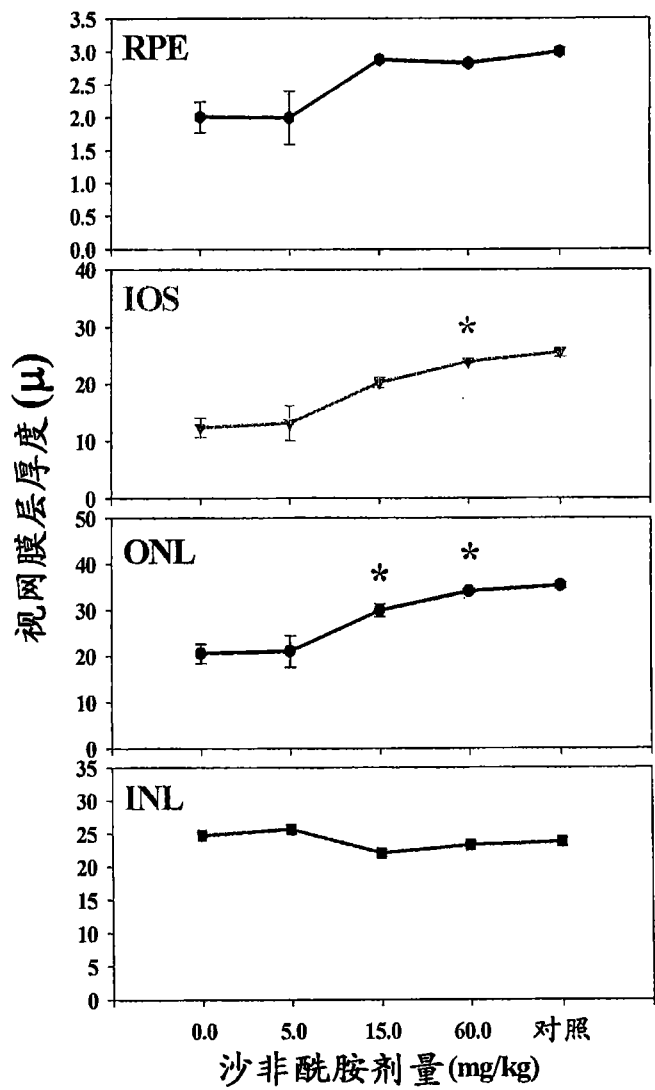
1个月恢复



** 与溶媒相比显著更高的响应 ($p<0.05$) 且与正常的没有差别 ($p>0.05$).

图 1B

用沙非酰胺治疗来预防视网膜损伤



* 与溶媒显著不同 (p < 0.05) 且与对照没有差别 (p > 0.05)

图 2