



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1527704 B

(45) 授权公告日 2011.05.18

(21) 申请号 02813991.7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2002.07.15

A61K 31/135(2006.01)

(30) 优先权数据

60/386,227 2001.07.13 US

60/377,556 2002.05.03 US

60/377,845 2002.05.03 US

60/377,847 2002.05.03 US

(56) 对比文件

WO 0048591 A, 2000.08.24, 说明书 4-5 页, 实施例.

审查员 孟晋东

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2004.01.12

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2002/022449 2002.07.15

(87) PCT 申请的公布数据

W02003/006002 EN 2003.01.23

(73) 专利权人 奥克斯吉尼有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 戴维·谢里斯 马克·伍德

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 4 页

(54) 发明名称

治疗眼病的组合物和微管蛋白结合剂用法

(57) 摘要

本发明涉及使用血管靶剂、特别是微管蛋白结合剂,治疗眼血管再生、眼瘤、糖尿视网膜病、早产性视网膜病、成视网膜细胞瘤和黄斑变性等症。

1. 药物有效剂量的 combretastatin A-4 磷酸盐在制备治疗或防止眼病的药物中的应用,其中,所述眼病是良性血管增生症,且所述药物适于对患者的眼部通过玻璃体内注射、结膜下注射、眼部周围注射、眼球囊下注射,或使用滴眼液、眼胶、眼膏,或采用电离子透入法、眼部植入和 / 或眼部插入进行体系外给药。

2. 权利要求 1 的应用,其中所述眼病表现为眼血管再生。

3. 权利要求 2 的应用,其中所述眼血管再生包括脉络膜血管再生。

4. 权利要求 3 的应用,其中所述眼病是黄斑变性。

5. 权利要求 4 的应用,其中所述的眼病是湿型黄斑变性。

6. 权利要求 2 的应用,其中所述眼血管再生包括视网膜血管再生。

7. 权利要求 6 的应用,其中所述眼病是黄斑变性,糖尿病视网膜病,或者早产性视网膜病。

8. 权利要求 2 的应用,其中所述眼病表现为角膜血管再生。

9. 权利要求 8 的应用,其中所述角膜血管再生与感染,角膜移植,角膜烧伤,营养缺乏,或外伤有关。

10. 权利要求 1 的应用,其中所述给药剂量的范围是 0.1-120 毫克 / 平方米。

11. 一种治疗眼病的药剂,其包括减少眼部血管再生的治疗上有效量的 combretastatin A-4,以及用药所需的药用载体、赋形剂、稀释剂或辅剂,所得药剂对需要的患者的眼部进行体系外给药,其中所述眼病是良性血管增生症。

12. 权利要求 11 的药剂,其中所述眼病表现为眼血管再生。

13. 权利要求 12 的药剂,其中所述眼血管再生包括脉络膜血管再生。

14. 权利要求 13 的药剂,其中所述眼病是黄斑变性。

15. 权利要求 14 的药剂,其中所述的眼病是湿型黄斑变性。

16. 权利要求 12 的药剂,其中所述眼血管再生包括视网膜血管再生。

17. 权利要求 16 的药剂,其中所述眼病是黄斑变性,糖尿病视网膜病,或者早产性视网膜病。

18. 权利要求 12 的药剂,其中所述眼病表现为角膜血管再生。

19. 权利要求 18 的药剂,其中所述角膜血管再生与感染,角膜移植,角膜烧伤,营养缺乏,或外伤有关。

20. 一种治疗眼病的药剂,其包括减少眼部血管再生的治疗上有效量的 combretastatin A-4 磷酸盐,以及用药所需的药用载体、赋形剂、稀释剂或辅剂,所述药剂对需要的患者的眼部进行体系外给药,其中所述眼病包括黄斑变性,糖尿病视网膜病,或者早产视网膜病。

21. 一种治疗眼病的药剂,其包括减少眼部血管再生的治疗上有效量的 combretastatin A-4 磷酸盐,以及对受体用药所需的药用载体、赋形剂、稀释剂或辅剂,所述药剂对需要的患者的眼部进行体系外给药,其中所述眼病是湿型黄斑变性。

22. 权利要求 20 或 21 的药剂,其中所述 combretastatin A-4 磷酸盐是 combretastatin A-4 磷酸盐。

23. 权利要求 22 的药剂,其中所述 combretastatin A-4 磷酸盐是 combretastatin A-4 磷酸二钠。

24. 权利要求 20 或 21 的药剂,其中所述方式是玻璃体内注射、结膜下注射、眼部周围注射、眼球囊下注射,或使用滴眼液、眼胶、眼膏,或采用电离子透入法、眼部植入和 / 或眼部插入。

25. 权利要求 20 或 21 的药剂,其中治疗上有效量提供范围是 0.1-120 毫克 / 平方米的给药剂量。

26. 权利要求 20-25 中任何一项的药剂的药剂单元形式。

27. 一种局部用药于眼病患者眼部的药用组合物,该组合物在悬液、乳浊液或溶液中含有:

(a) 用量范围在 0.1-100 毫克 / 毫升的 CA4P;

(b) 5 毫克 / 毫升羧甲基纤维素;

(c) 9 毫克 / 毫升氯化钠;

(d) 最终 pH 值在 6.6-8.6 的范围内;

(e) 渗透压在 291-492mosmol/kg H₂O 范围内;且

(f) 粘度在 50-66mPa · s 范围内。

28. 根据权利要求 27 的药用组合物,其中所述眼病包括视网膜血管再生、脉络膜血管再生、糖尿视网膜病、早产性视网膜病、角膜血管再生和黄斑变性。

治疗眼病的组合物和微管蛋白结合剂用法

[0001] 发明领域

[0002] 本发明涉及使用血管靶剂、特别是微管蛋白结合剂，治疗眼病。

[0003] 发明背景

[0004] 眼睛是人生中最重要器官之一。由于损害视力的年老、疾病和其它因素，保持眼睛健康的能力最为重要。导致失明的主要原因是无法将药物或治疗剂导入眼部，并在眼部无法维持药物或治疗剂的有效浓度。通过药物口服、或眼外注射在体系内提供药物。然而，特别对眼部，体系内用药不能产生有效的药物含量，因此，为了达到眼内的有效浓度，需要经常以不能接受的高浓度用药。

[0005] 黄斑是含有高浓度感光细胞的视网膜区域，感光细胞是产生清晰视觉的原因（人类眼睛的常规解剖图如图 1 所示）。黄斑变性是不准确的历史名称，其错误理解了导致黄斑感光细胞功能丧失的疾病类型。黄斑变性的结果是丧失了重要的中心视力和明细视力。黄斑变性患者的视野中心是空白点，经常会丧失阅读小字体的能力。（来源：黄斑变性基金，San Jose, CA :www.eyesight.org）

[0006] 超过一千二百万美国人患有某些类型的黄斑变性。年龄在 55 到 64 岁的美国人中 6 人中有 1 人患有黄斑变性，并且其发病率随年龄升高。估计在一千两百万黄斑变性患者中每年有一百二十万严重丧失了中心视力。每年二十万患者的单目或双目丧失了全部中心视力。

[0007] 尽管黄斑变性的确切原因不得而知，但是黄斑结构提供的线索表明此疾病是如何引发的。黄斑含有消耗大量能量的高活性光受体。产生高能量需要丰富的氧与营养供应。黄斑具有供应血管（又名脉络膜）中最高血液流速。干扰此丰富血液供应的任何情况都能够导致黄斑的机能失调。缺氧黄斑做出反应，生成细胞因子，其为内皮细胞增长和血管再生发出信号。

[0008] 黄斑变性具有两个基本类型：干型黄斑变性与湿型黄斑变性。大约 85% -90% 的病例属于干型病症。干型病症中，视网膜退化与黄斑下黄色沉淀物（公称为脉络膜疣）的生成有关。脉络膜疣沉淀物与构成黄斑的视网膜细胞厚度降低相关联。中心视力的损失程度直接关联于脉络膜疣导致视网膜变薄的位置与程度。与湿型疾病相比，干型黄斑变性的病情发展更缓慢。没有有效的疗法治疗干型黄斑变性。小部分干型黄斑变性患者发展成湿型黄斑变性。图 2 说明了正常黄斑和干型黄斑变性。

[0009] 湿型黄斑变性是迅速恶化的疾病，几乎全部造成严重的视力损失。湿型黄斑变性造成的视力损失是视网膜下血管再生的结果。视网膜下血管迅速生长产生了紧扣视网膜细胞的覆盖层，并将视网膜与营养丰富的脉络膜分离。湿型黄斑变性的极端病例中，增生的血管穿透视网膜并且渗入玻璃体。存在一些治疗湿型血管再生的方法，然而都远不能令人满意。图 3 说明了正常黄斑与湿型黄斑变性。

[0010] 当前治疗黄斑变性的常规方法是激光凝固法。实行激光凝固的眼科学家用荧光血管造影定位异常血管，再用激光消融技术有选择的灼烧异常血管。激光手术的副作用是破坏了直接覆盖在异常血管上的视网膜层。经过激光凝固治疗后，病体的视力遭受了可测的

损失,这是不能令人接受的副作用。总之,激光手术仅被认定为具有适度缓解病症效果的权宜疗法。

[0011] 光动力疗法是业内治疗黄斑变性的现有水平。美国食品与药物管理局批准了注射光反应化合物 (Visudyne™ developed by Ciba Vision & QLT), 治疗与年老相关的湿型黄斑变性。用光动力疗法治疗的病体被注射了光反应化合物 (verteporfin) 后,立即用非破坏性眼部激光治疗。实行手术的眼科学家识别异常血管,再用激光束照射异常血管。当受到激光活化时,光反应化合物瞬间释放能量,从而有效地烧焦活化分子邻近的所有细胞。(来源:卫生和福利部新闻,美国卫生和福利部,2000 年 4 月 13 日)

[0012] 电离照射可用于杀死增生的血管(与静息细胞相比,增生细胞对照射更敏感)。电离照射通常是以足够能量照射患者的大部分眼球。在 1993 年,北爱尔兰贝尔法斯特大学的研究组报道称,他们对少数湿型黄斑变性患者使用 X 射线。其积极的结论已经得到了欧洲其它研究小组所做一些使用 X 射线相似研究的支持。

[0013] 衰弱视力的另一种疾病是早产性视网膜病 (ROP)。早产性视网膜病是大部分早产婴儿会得的眼病。足月分娩的后 12 周(第 28 周到第 40 周)是胎儿眼部发育特别活跃的时期。在第 16 周起,视网膜供血(脉络膜)的出生前发育从视神经开始,并以径向方式向视网膜前区域延伸,直至出生(第 40 周)。如果早产,视网膜脉管系统没有足够的时间充分发育,视网膜前缘将会缺氧。前缘视网膜缺氧是早产性视网膜病的潜在原因。(来源:早产性视网膜病和相关疾病协会, Franklin, MI)

[0014] 早产婴儿中,相当一部分前缘视网膜缺少充足的供血。缺氧的前缘视网膜做出反应,信号引发了新血管的生长。在前缘与后缘视网膜之间的区域内,异常血管再生引发了一连串产生严重病理结果的作用。当新血管响应化学信号生长时,在血管化后缘视网膜与无血管前缘视网膜之间区域内生成了动脉-静脉短路。这些血管短路会逐渐变大、变厚,并且不断增多。这些新血管伴随着浸润成纤维细胞,而成纤维细胞产生了纤维状疤痕组织。最后,生成了附着视网膜与玻璃体的环状疤痕组织。环状疤痕组织沿着眼睛内部向 360 度延伸。当疤痕组织收缩时,牵拉视网膜,从而造成视网膜分离。如果生成充足的疤痕组织,能够将视网膜完全分离。早产的新生儿存在发展成早产性视网膜病的危险,因为他们已经离开了子宫的保护环境,暴露于各种血管来源的刺激中,包括药物、高浓度氧、和光与温度的变化。这些中的部分或全部因素会对早产性视网膜病发展起到作用。幸运地是,大部分早产婴儿没有发展成早产性视网膜病,大部分患有早产性视网膜病的婴儿都自发地得到了恢复。不管出生时的孕龄,如果早产性视网膜病情发展,通常出现在受孕后的 34-40 周。

[0015] 一种称为冷冻疗法的技术已经在治疗早产性视网膜病方面表现出有益的作用。冷冻疗法涉及将零度下的探针放置在眼球外壁(巩膜)。此探针在巩膜与玻璃体之间的视网膜表面产生冰结晶区域。为了治疗全部的无血管区域,多次使用冷冻疗法,该无血管区域位于新血管脊的前面。避免对新血管脊进行冷冻处理,因为如果结冰,新血管脊会出血,并造成玻璃体出血。

[0016] 冷冻疗法作用机理尚不完全清楚。现行的假说认为,冷冻疗法可能损伤了无血管前缘视网膜层。该损伤造成了视网膜变薄,从而促进氧扩散到剩余的活细胞。此外,低温处理的视网膜具有较少的活细胞,因此降低了氧需求。降低的氧需求阻抑了血管来源刺激,并且阻止了血管再生。经发现,冷冻疗法降低了视网膜分离率,从未经处理眼球的 43%降低到

经处理眼球的 21%。然而,冷冻疗法具有潜在的并发症,此过程通常在全身麻醉下进行,这对于早产婴儿存在危险。

[0017] 如上文所述,激光凝固法应用相似的原理治疗早产性视网膜病。激光治疗应用于缺少供血的前缘视网膜。此治疗目的是,在异常血管产生足以造成视网膜分离的疤痕组织前,将其去除。此外,更象冷冻疗法,激光将无血管前缘视网膜边缘变薄,降低了氧需求,阻抑了血管来源的刺激。激光疗法直接作用于视网膜,而不是整个厚度的眼球壁,因此优于冷冻疗法。因为激光疗法涉及较少的组织,不受痛苦,治疗后炎症大为减少。当与冷冻疗法相比,激光治疗降低了麻醉需要,因此更有优势。

[0018] 如果激光治疗或冷冻疗法不能成功地停止早产性视网膜病情发展,那么可以使用一些外科疗法。由于纤维-血管疤痕组织产生的较小牵引,存在程度较浅的视网膜分离,称为巩膜坚固的方法可能有益治疗。巩膜坚固法涉及,将硅橡胶带环绕眼球的中纬线并拉紧,使其轻微地凹入眼球内部。此硅橡胶带缓解了玻璃体对纤维疤痕组织和视网膜的牵引。它使视网膜在眼球壁上压平,并恢复其正常功能。接受巩膜坚固的婴儿可以保持良好的视力,特别是对黄斑没有分离的婴儿。数月或数年后,通常需要去除环绕的硅橡胶带,因为眼球会不断长大,产生逐渐增大的眼球压力和诱导近视。

[0019] 在早产性视网膜病晚期,由于视网膜上的疤痕组织,视网膜完全分离,因此巩膜坚固不能充分地释放此牵引。对于这些婴儿,可以使用玻璃体切除法。玻璃体切除涉及在眼球上做一些小切口,使用抽吸或截切设备去除玻璃体。用盐溶液替换玻璃体保持眼球形状,在缺少玻璃体的情况下,眼球能够长时期内保持其形状与压力。去除玻璃体后,可以去除或剥离视网膜上的疤痕组织,使视网膜放松,恢复贴近眼球壁。手术后数周视网膜可以再次附着眼球,如果在手术过程中视网膜出现孔或裂缝,视网膜通常不再附着。为了完全切除疤痕组织,通常不得不去除眼睛的晶状体,但是有些新技术试图保留晶状体。

[0020] 然而,治疗早产性视网膜病的玻璃体切除成功率很有限。公布的解剖成功率范围是手术患者的 25-50%,解剖成功指的是视网膜再次附着眼球壁。功能性成功指的是恢复良好的视力,但成功率很低。经过“成功”玻璃体手术的患者(解剖成功),只有四分之一能够恢复良好的视力,看到物体或识别图案。

[0021] 损害视力的另一种疾病出现在糖尿病患者中间。大约一千四百万美国人患有糖尿病。除了造成大量体系并发症外(例如肾衰竭、高血压和心血管疾病),糖尿病是工作年龄美国人中致盲的主要原因之一。事实上,糖尿病患者的致盲率是普通人群的 26 倍。很多糖尿眼病患者尽管患有危害视力的疾病,但是无任何症状。如果糖尿眼病得不到治疗,它将导致严重的视力损害。糖尿病可以按照多种机理造成视力下降,并且治疗需要适合病体的个人需要。(来源:疾病控制中心,“预防和治疗糖尿病-保健护理专业人员指南”:www.cdc.gov/health/disease.htm)

[0022] 当其血糖含量特别高或特别低时,很多糖尿病人的视力会短暂模糊。这种视力模糊是由眼睛晶状体形状改变造成的,当血糖恢复正常时会好转。糖尿病是一种既影响病体血糖含量又影响血管的疾病。与糖尿病有关的症状(包括血压升高)造成了微血管循环系统的损伤,包括与视网膜有关的毛细血管。毛细血管的损伤造成了流向视网膜分离区域的血液减少。此外,受损血管渗血,造成了视网膜内肿胀。

[0023] 有两种类型的糖尿眼病。第一种类型称为背景糖尿视网膜病或非增生性视网膜

病。实质上,它是糖尿视网膜病的最早期阶段。此阶段以视网膜小血管受损为特征,从而造成了血液渗入视网膜。此阶段的视力损失大部分是由于血液在黄斑中积累造成的。此血液积累被称为黄斑水肿,并造成了暂时性或永久性的视力减退。第二类糖尿视网膜病被称为增生性糖尿视网膜病。增生性视网膜病是糖尿病引起的视网膜毛细血管床(脉络膜)损伤的最终结果。脉络膜损伤造成了视网膜缺氧。视网膜组织对缺氧环境做出反应,产生血管来源的细胞因子,其刺激了血管再生。如前所述,视网膜血管再生造成了眼球出血、生成视网膜疤组织、视网膜分离、以及能够造成视力下降或失明的任何一种症状。糖尿病患者通常患有新血管绿内障,其在潮红中表明虹膜上的血管生长,从而造成了视角封闭。

[0024] 尽管糖尿视网膜病在一型患者中越来越普遍,越来越严重,但是它既可以在一型糖尿病患者(在40岁以前糖尿病发作)中出现,也可以在二型糖尿病患者(在40岁后糖尿病发作)中出现。因为二型糖尿病经常不能被诊断出来,直到病人患病多年,糖尿病人发现患有糖尿病的同时,发现患有糖尿视网膜病。

[0025] 治疗糖尿视网膜病是由多种因素决定的,包括视网膜病的类型与程度,相关的视力因素,例如白内障或玻璃体出血,以及患者的病史。选择的疗法包括治疗早产性视网膜病讨论的相同选择,既激光凝固法、低温疗法(冷冻)、和玻璃体切除手术。在大部分情况下,糖尿视网膜病导致的失明是可以预防的。

[0026] 任何类型的眼内癌质瘤都是罕见的。然而,眼瘤最严重的情况是,眼癌广泛转移到身体其它部位,或癌症从身体其它部位转移到眼部。最普通的早期恶性眼瘤、黑素瘤,每年在百万大众人口中出现7例,比肺癌发病率的十分之一还低。成视网膜细胞瘤作为儿童疾病,发病率大概与血友病相同。这两种眼内瘤存在很大的差别,只是解剖近似使两者联系在一起。治疗眼瘤的选择取决于下列因素:癌症在眼睛的部位,扩散程度,病人的健康状况和年龄。(来源:眼癌网站:www.eyecancer.com;相关链接:cancer.med.upenn.edu)

[0027] 成视网膜细胞瘤是在儿童中出现的单目或双目癌症。美国每年大约有350件新确诊病例。在美国,每15,000-30,000个新生儿中有一例患有成视网膜细胞瘤。成视网膜细胞瘤会在所有种族的儿童中出现,包括男孩和女孩。

[0028] 成视网膜细胞瘤起源于视网膜、使眼睛可见的感光层。对于每位患者,治疗成视网膜细胞瘤要根据个体情况加以考虑,决定因素有儿童的年龄、单目或双目患病、癌症是否已经扩散到身体的其它部位。如果未加以治疗,患病儿童将会死去。成视网膜细胞瘤的治疗方法有摘除、外部波束照射、放射板疗法、激光治疗、低温疗法和化学减数法。

[0029] 摘除是治疗成视网膜细胞瘤的最普通方法。在摘除过程中,眼睛被手术摘除。这是需要的,因为它是完全清除癌症的唯一方法。不去除整个眼球的情况下,从眼球内去除癌症是不可能的。尽管部分摘除对一些眼癌是可行的,但是存在危险,甚至会促使成视网膜细胞瘤患者癌扩散。

[0030] 当双目患病时,有时切除更严重的眼睛,同时采用一种保护视力的疗法治疗另一支眼睛,例如下列所述的外部波束照射、放射板疗法、低温疗法、激光治疗和化学减数法。

[0031] 自从二十世纪早期,已经使用外部波束照射,作为保护眼睛与视力的一种方法。成视网膜细胞瘤对照射敏感,因此治疗频繁成功。放射治疗门诊患者,每星期五次,持续3-4周。为患者定制石膏模子,防止患者头部在治疗过程中移动,有时治疗前让患者服用镇定剂。

[0032] 外部波束照射后,肿瘤通常变小(还原),并呈瘢痕状,但是很少完全消失。事实上,当肿瘤缩小时,它们甚至会更加明显,因为粉红色-灰色肿瘤物质被白色钙取代。刚完成治疗时,皮肤会出现晒斑,后脑射线穿出位置的小块头发会脱落。外部波束照射后的长期影响有白内障、放射性视网膜病(出血和视网膜渗出液)、视力减弱、暂时性骨抑制(头部一侧骨骼生长异常)。对于身体每个细胞携带异常基因的孩子,放射也会增加其在眼睛以外其它部位成瘤的危险。

[0033] 放射板是二十世纪三十年代为照射成视网膜细胞瘤开发的放射材料板。今天,使用同位素碘 125,并为每位儿童定制放射板。通常,患病儿童一定要在医院接受此方法的治疗,并且在 3 到 7 天内接受分开的两次手术(一次是插入放射板,另一次是取出放射板)。

[0034] 激光疗法,有时称为激光凝固法或激光高温法(它们是两种不同的技术),是治疗成视网膜细胞瘤的非侵袭性疗法。激光有效地摧毁了更小的成视网膜细胞瘤。进行激光治疗,是将激光穿过瞳孔,聚焦在眼睛癌变位置周围。最近新型激光传输系统,称为 diopexy 探头,已经能够使激光穿过眼球壁治疗癌症,而不需要瞄准瞳孔。激光治疗是在局部或全身麻醉下进行的,通常手术后没有任何相关疼痛,也不需要服用药物。激光可以单独使用,或与外部波束放射、放射板疗法或低温疗法共同使用。

[0035] 成视网膜细胞瘤患者也可以采用低温疗法。低温疗法在局部或全身麻醉下进行,冷冻更小的成视网膜细胞瘤。将笔形探针放置在肿瘤与巩膜的连接部位,冷冻肿瘤。为了成功地摧毁所有癌细胞,冷冻疗法通常需要重复很多次。冷冻疗法的副作用是,它使眼睑与眼球肿胀 1-5 天;有时肿胀得很厉害,儿童许多天都不能睁开眼睑。为了消肿,要经常使用滴眼液或软膏。

[0036] 化学减数法是采用化学疗法治疗成视网膜细胞瘤。化学疗法经常给孩子在静脉内通过血流用药,如果成功数周内肿瘤收缩。可以一次、两次或多次采用化学疗法,使用一种或多种药物。取决于药物与机构,治疗期间孩子可以住院治疗,也可以不住院。化学治疗后,孩子经过复查,可以采用低温疗法、激光法或放射板法,治疗剩余的肿瘤。孩子需要治疗二十次,并且每三周在麻醉下复查眼睛。

[0037] 这种情况极少出现,尽管成视网膜细胞瘤及时得到治疗,但仍扩散(转移)到眼部以外的脑、中枢神经系统(脑和脊椎)和骨骼。在这种情况下,儿科肿瘤学家会采取化学疗法,并且在首次确诊转移疾病后的数月至数年期间通过外围血管用药进入大脑。

[0038] 成视网膜细胞瘤和黑素瘤以外的肿瘤出现在眼部,通常是其它部位病症的先兆。脉络膜转移是最频繁出现的眼内恶性肿瘤,可以作为体系恶性肿瘤的初始表现。脉络膜转移类似于无色素的黑色素瘤。它们在荧光脉管图上表现相似,在超声图上表现出轻微差异的反射图形。然而,脉络膜转移增长更迅速,更可能造成大面积渗出性视网膜分离。

[0039] 总之,一旦在眼部发现转移性疾病,预测的成活率就很低了。然而,随着体系癌症患者的成活率得到改善,眼转移疾病的成功治疗在保证良好的生活质量方面起到了越来越重要的作用。

[0040] 初级眼淋巴瘤是最引人注目的一种眼内肿瘤。其与初级中枢神经系统淋巴瘤、视网膜下色素上皮间隙(此间隙不存在淋巴组织)之间的关系,就是强攻击性淋巴瘤吸引人的两个方面。初级眼淋巴瘤的临床表现众所周知,由于其与良性眼色素层炎实体相象,因此使确诊延误了数月。眼淋巴瘤的肿瘤细胞可以被限制在视网膜色素上皮与布路氏膜

(Bruch's membrane) 之间的间隙中。因为与淋巴瘤聚集体相关的玻璃体炎经常含有反应性淋巴细胞,所以玻璃体活组织检查不能确诊。事实上,当外科医生采集不到肿瘤细胞时,就会造成误解,给眼内细胞学的理解造成困难。如果外科医生通过 retinotomy 在视网膜下色素上皮间隙进行抽吸活组织检查,在一些病例中,会增加眼内活组织检查的确定结果。初级眼淋巴瘤含有大型非典型细胞,该细胞在白细胞共同抗原染色下呈阳性。抽吸通常与大量坏死的细胞碎片联系起来。过去,免疫表型分析一直存在问题。一些早期研究不能找出任何表面标记,认为眼淋巴瘤是无表面标记的肿瘤。用透柠檬酸酶预处理细胞,增加了免疫病理学研究的成果。

[0041] 眼癌的另一种形式是脉络膜黑素瘤。脉络膜黑素瘤是眼癌的主要形式。它是由眼脉络膜的着色细胞引起的,而不是从其它身体部位开始扩散到眼睛的肿瘤。尽管有些脉络膜黑素瘤比其它黑素瘤更危及生命,只要它们是恶性肿瘤,几乎都应该进行治疗。有些脉络膜黑素瘤好像处于休眠状态,没有生长。大部分脉络膜黑素瘤随着时间缓慢增长,并导致失明。这些肿瘤可以扩散到身体的其它部位,从而最终导致死亡。已经报道了眼黑素瘤转移到肝脏的许多病例。(来源:眼癌网站:www.eyecancer.com)

[0042] 多年来,摘除一直是脉络膜黑素瘤的常规疗法。如果肿瘤尚未扩散到身体的其它部位,摘除眼球通常可以彻底摆脱肿瘤。自从二战以来,放射疗法已经用于治疗脉络膜黑素瘤。过去 20 年内,这种治疗方法已经得到了改进。采用适当剂量率与物理形式的放射疗法将会除去增生的肿瘤细胞,而不会对正常组织造成需要摘除眼睛的损伤。随着细胞死亡,肿瘤收缩,但是通常不会完全消失。使用放射介质治疗脉络膜黑素瘤的最有前景广泛使用的方法涉及,制成将放射性颗粒粘贴在一侧的小型板。然而,放射疗法通常伴随着副作用,例如呕吐和脱发。

[0043] 从回旋加速器释放的高能量粒子(氦离子或质子束照射)也可以用于照射肿瘤。首先进行外科手术,将小金属夹缝合到巩膜上,确保粒子束能够准确瞄准。治疗会持续数天。这类治疗所需的设备世界上只有少数医疗中心可以提供。已经报道出一些患者取得了良好的治疗效果,但是有些采用此方法治疗的病人只存活了几年。因此,此等类型放射疗法的长期效果与更常用的放射板相比尚不得而知。

[0044] 多年以来,人们已经为少量的患者采用了其它疗法。已经采用了光凝固法,使用白光或激光灼烧小型肿瘤,并且也采用了低温疗法,通过冷冻杀死肿瘤。人们认为,这些技术只能治疗非常小型的肿瘤。一些医生将激光疗法或冷冻疗法与放射疗法结合使用,但是这种治疗只处于实验阶段。一些患者做了眼球壁切除手术,或从眼睛去除肿瘤的相关手术。大部分医生认为这些方法处于实验阶段,只可用于少量的肿瘤。没有任何疗法能够保证可以摧毁肿瘤、保护视力,或保证患者会享有正常的寿命。

[0045] 另一种眼癌是眼内黑素瘤、一种罕见的癌症,其癌细胞出现在称为眼色素层的部位。眼色素层含有黑素细胞,该黑素细胞含有色素。当这些细胞变成癌性细胞时,此癌症称为黑素瘤。眼色素层包括虹膜(眼睛的有色部分)、睫状体(眼睛中的肌肉)、脉络膜(眼睛后部的组织层)。虹膜打开关闭,调节进入眼睛的光线量。睫状体改变眼睛内部晶状体的形状,使其能够聚光。脉络膜层靠近视网膜、眼睛成像的部位。如果在虹膜首先出现黑素瘤,那么虹膜就好像是块黑斑。如果黑素瘤出现在睫状体或脉络膜,患者会视力模糊或毫无症状,癌症在被发现前会继续发展。(来源:眼癌网站:www.eyecancer.com)

[0046] 治愈眼内黑素瘤的几率（预测）取决于癌症的细胞类型与大小、癌症在眼中的位置、以及癌症是否扩散。对于眼内黑素瘤的所有患者，有多种治疗方法。通常采用三种治疗方法，即手术疗法（去除癌症）、放射疗法（使用高剂量 X 射线或其它高能射线“杀死”癌细胞）、光凝固疗法（摧毁为肿瘤供血的血管）。

[0047] 外科手术是治疗眼内黑素瘤的最普通疗法。医生会进行下列一种手术，去除癌症。

[0048] 一 虹膜切除术 一 只切除部分虹膜；

[0049] 一 虹膜滤帘切除术 一 切除部分虹膜、围绕角膜的支撑组织、覆盖眼睛正面的明层；

[0050] 一 虹膜睫状体切除术 一 切除部分虹膜和睫状体；

[0051] 一 脉络膜切除术 一 切除部分脉络膜；

[0052] 一 摘除术 一 切除全部眼球。

[0053] 放射疗法也可以使用 X 射线或其它高能量射线，照射癌细胞存在的部位，以杀死癌细胞并缩小肿瘤。放射疗法可单独使用或与外科手术结合使用。也可以使用光凝固疗法，用一束极小的光（通常是激光）照射眼球，从而摧毁血管杀死肿瘤。

[0054] 治疗眼病、特别是视网膜下血管再生和眼瘤，提议的决大多数疗法首先是手术疗法或放射疗法。当患者单独采用药物治疗或手术后服用药物，用药方式通常是体系内用药，可以通过注射或口服用药。如前所述，采用手术疗法与放射疗法，治疗眼病都同样痛苦，通常需要较长的恢复期，并伴随着副作用。此外，采用口服方式或眼外部位注射方式，体系内用药通常不能提供有效的用量，为了保持眼内有效浓度，需要经常以不能令人接受的高浓度用药。因此，对有效治疗眼病（例如角膜和视网膜血管再生）的体系外疗法，存在较大的需求。此外，在没有副作用的情况下，向眼睛输送药物仍就是较大的挑战。本发明提供了一种治疗方法，将微管蛋白结合剂以有效的体系外用方式治疗眼病，并且产生最小的副作用。

[0055] 发明概述

[0056] 本发明涉及使用血管靶剂、特别是微管蛋白结合剂（“VTV”），治疗眼组织中的恶性或良性血管增生症。

[0057] 眼组织血管再生是以血管增生为特征的病状，并在各种眼病中出现，造成不同程度的视力丧失。使用血管靶剂，药理性控制与良性血管增生症（例如湿型黄斑变性、增生性糖尿视网膜病或早产性视网膜病）有关的血管再生，有可能会使缺少治疗方法的患者受益。

[0058] 在另一实施方案中，本发明提供了应用血管靶剂，药理性控制与恶性血管增生症（例如眼瘤）有关的血管再生。

[0059] 血 - 视网膜屏障 (BRB) 是由专化无孔紧密连接的内皮细胞构成，在视网膜的毛细血管和组织之间，该内皮细胞形成了某些物质的运输屏障。患视网膜病的角膜和视网膜的新生脉管是异常的，它们更像是实性肿瘤的脉管。微管蛋白结合剂、微管蛋白聚合抑制剂和血管靶剂能够攻击异常脉管，因为这些脉管不具有与血 - 视网膜屏障相似的结构。微蛋白结合剂会阻止疾病的恶化，更像是在肿瘤 - 脉管系统中起了作用。采用玻璃体内注射、眼球囊下注射，滴眼液、电离子透入法、眼部植入和 / 或眼部插入，能够将微管蛋白结合剂局部（体系外）输送到眼部。将微管蛋白结合剂用药于血流中，可以实现体系内用药，在离患病

器官或组织一定距离的位置用药,该药剂可以找到目标。体系内用药的优选方式是肠道外或口服用药。

[0060] 说明书下文中提供了本发明一个或多个详细的优先实施方案。尽管与文中所述相似或等效的任何方法与材料可以用于实施或测试本发明,但是已经说明了优选的方法与材料。本发明的其它特征、目的和优点在说明书中显而易见。在实施例和权利要求中,除非本文有明确说明,否则单数形式也包含复数形式,文中使用的所有技术与科学术语具有与业内普通技术人员理解的相同含义。说明书引用的所有专利与出版物通过在此引述合并于本文。

[0061] 附图详述

[0062] 参考下图可以更好地理解本发明:

[0063] 图 1 是哺乳动物眼球简化的正侧面解剖图;

[0064] 图 2A 说明正常的黄斑;

[0065] 图 2B 说明干型黄斑变性;

[0066] 图 2C 说明湿型黄斑变性;

[0067] 图 3A 和 3B 是部分角膜的放大照片,说明了与赋形剂对照眼相比,使用 CAP4P 后第 28 天对脉管生长的抑制。

[0068] 图 4A 和 4B 说明了与赋形剂对照眼相比,使用 CAP4P 后第 28 天角膜显微镜可见的组织变化(抑制脉管生长)。

[0069] 图 5A 说明了成视网膜细胞瘤动物模型中,单次剂量的 CA4P 对眼瘤血管形成的作用。

[0070] 图 5B 说明了成视网膜细胞瘤动物模型中,CA4P 多次用药后肿瘤退化的程度。

[0071] 发明详述

[0072] 人类眼睛具有许多独特的结构特征:它暴露在环境中,而且很虚弱,虽然眼睛脉络膜中血流速很高,但是前房与玻璃体全都不含血管,孤立 in 循环系统之外。眼睛的这种特殊结构为输送微管蛋白结合剂提供了充足的机会,采取一种或多种体系外的用药方法,治疗眼部症状、病症、肿瘤和紊乱。眼睛解剖简图如图 1 所示。

[0073] 如上文所述,眼组织的血管再生是出现于各种眼病的症状,并与不同程度的视力衰弱相关联。药理控制血管再生有可能会使多种疾病的患者受益,例如湿型黄斑变性、增生性糖尿视网膜病和早产性视网膜病。

[0074] 在细胞有丝分裂过程中,通过结合微管蛋白-结合辅助因子或辅助因子-微管蛋白复合体,微管蛋白结合剂抑制了微管蛋白组合,从而阻止了细胞分裂,因此抑制了细胞增生。微管蛋白结合剂包括一大组化合物,它们可以抑制微管蛋白的聚合,通常起到肿瘤选择性血管靶剂的作用,用于癌症的化学治疗,以及其它非癌症应用,例如眼病。

[0075] 如上所述,治疗眼病体系内用药的缺点之一是,特别对眼部,体系内用药通常不能提供有效的药物含量。由于达到眼睛之前,体系内用药的药物就已经被身体代谢了,为了获得有效的眼内浓度,需要以更高浓度用药。直接向眼病患者眼部局部或体系外用,可以达到所用药物的有效浓度,给患者带来不可估量的益处。

[0076] 按照本发明,将微管蛋白结合剂体系外用治疗的眼病症状有,以角膜、视网膜、或脉络膜血管再生为特征的良性血管增生疾病,以及恶性血管增生疾病,例如眼瘤和眼癌。

角膜血管再生出现在下列疾病中：沙眼（衣原体沙眼）、病毒性间质角膜炎、微生物角膜结膜炎、角膜移植和烧伤。并由下列情况产生，感染（沙眼、疱疹、利什曼病、盘尾丝虫病）、移植、烧伤（热烧伤、碱烧伤）、创伤、营养缺乏和隐形眼镜造成的伤害。视网膜和 / 或脉络膜的血管再生出现在下列疾病中，黄斑变性、糖尿视网膜病、和早发性视网膜病。前房血管再生出现在绿内障中。

[0077] 本发明中微管蛋白结合剂体系外用方法有，玻璃体内用药（注射）、结膜下用药、眼部周围用药、眼球囊下注射、电离子透入法运送药物，使用滴眼液、眼胶、眼膏局部用药，眼部植入和 / 或眼部插入。

[0078] 通过直接注射到眼玻璃体中，将微管蛋白结合剂玻璃体内用药。也可以采用结膜下注射，将微管蛋白结合剂结膜下用药，并且可以通过眼部周围注射，将微管蛋白结合剂眼部周围用药。

[0079] 也可以使用钝尖的 Connor 套管，注射入眼球囊下的间隙，将微管蛋白结合剂用药。采用适当技术，专业性地使用一定剂量的微管蛋白结合剂，就可以避免穿刺眼球，损伤视神经。完成药物输送后，注射位点经过烧灼，成为了药物的补给站。与玻璃体内注射相比，眼球囊下间隙用药具有较少的侵袭性。

[0080] 本发明的另一实施方案中，微管蛋白结合剂可以设计成含有微管蛋白结合剂生物相容的、可生物降解的、和 / 或易受生物侵蚀的眼植入片或插入片，从而长时期提供缓慢释放的药物，并且保持有效的药物浓度。含有药物易受生物侵蚀的眼植入片可用于植入或插入哺乳动物眼球，内容参见专利、例如美国专利 5,904,144 和 5,766,242，其所有内容通过在此引述合并于本文。通常，眼植入片是由放在眼球所需位置的胶囊组成。胶囊可以含有一种或多种药剂，或者含有能够持续产生生物活性分子的细胞，并控制性地将其释放到眼中。在实施方案中，使用的药物用量各不相同，取决于药物的有效剂量、植入片或插入片从眼球内部或表面释放药物的速率。

[0081] 因为巩膜是暴露的，电离子透入法的探针会应用在眼球表面。电离子透入法使用电流驱使离子化合物流穿过细胞膜。当前应用此技术，穿过皮肤输送离子药物。电离子透入法运输药物的两个主要机理是：(a) 电离子透入法，带电离子被相同电性的电极排斥；(b) 电渗析法，溶剂迁移运动，穿过带电“孔道”，当施加电场时，反电荷离子会优先通过。

[0082] 微管蛋白结合剂也会设计成滴眼液，以无菌方式局部用药于眼球。

[0083] 根据本发明，优选的微管蛋白结合剂是 combretastatin A4 (“CA4”)，有效的血管靶剂。CA4 基本不溶于水。该特性妨碍了此化合物药用制备的设计。因此，采用更优选的 combretastatin A4 的前药形式 (“CA4P”)，弥补 CA4 通常很差的溶解性。然而，本发明并不受限于此方面，CA4 的配方可以发挥良好的作用，甚至优于 CA4P。

[0084] Combretastatin 来源于热带和亚热带灌木和 Combretaceae 科的树木，该科树木是实际尚未勘察的大宝库，其中包含具有潜在实用价值生物特性的新物质。举例说明，在非洲和印度原始药学实践中，Combretum 属的 25 个物种（总量的 10%）众所周知，以各种方式治疗麻风（参见：Watt, JM 等人，“南非与东非的药物和有毒植物”E&S. Livingstone, Ltd, London, 1962, p194）(Combretum sp. root) 和癌症 (Combretum latifolium)。

[0085] 已经发现，Combretastatins 是抗肿瘤物质。许多 Combretastatins 已经被分离出来、经过结构分析，并被合成出来。美国专利 5,409,953 和 5,59,786 公开了命名为 A-1、

A-2、A-3、B-1、B-2、B-3 和 B-4 的 Combretastatins 的分离与合成。这些专利的全部内容通过在此引述合并于本文。相关的 Combretastatins, 命名为 Combretastatins A4, 公开于美国专利 4, 996, 237, 其全部内容通过在此引述合并于本文。

[0086] CA4P 是美国专利 5, 561, 122 公开的天然 Combretastatin A4 亚型的衍生物, 该专利公开的全部内容通过在此引述合并于本文。优选的 CA4P 化合物用磷酸二钠衍生物替代了 CA4 结构中的羟基基团, 其可以在体内将 CA4P 代谢转化回不溶于水的 CA4。然而, 本发明不限于磷酸衍生物, 其它前药的部分也可以替代 CA4 化合物中的羟基基团。此外, 除了 CA4P 二钠盐外, 其它磷酸盐前药也被认为, 可以按照相同方法达到本发明的目的。其它磷酸盐前药的实例参见 PCT 专利申请 W002/22626 和 W099/35150, 其公开内容合并于此。

[0087] CA4P 是抗肿瘤血管靶剂新类别药物的先驱, 此类药物有选择地靶向并摧毁血管生成形成的肿瘤特异性血管, 从而使实性肿瘤收缩。抗肿瘤血管靶向法和抑制血管生成法是相关的癌症疗法, 从根本上区别于癌症的常规疗法。与直接攻击癌症细胞的传统方法相反, 这些新药物靶向肿瘤生命支持系统、由血管生成产生的新出现的血管网络、从原有血管萌生的新血管。临床前的研究已经表明, 应用这些疗法能够使肿瘤收缩, 并最终消失。此外, 当 CA4P 以体内和体外方式用于动物细胞模型时, 它表现出明显专一的血管毒性 (Int. J Radiat Oncol. Biol. Phys. 42(4) :895-903, 1998 ;Cancer Res. 57(10) :1839-1834 1997)。

[0088] 尽管血管生成抑制剂和抗肿瘤血管靶剂 (例如 combretastatin) 都靶向肿瘤血管, 它们在方法与最终结果上存在差异。血管生成抑制剂的目的是, 抑制生成支撑并向肿瘤供血的肿瘤特异性血管, 从而阻止肿瘤生长。另一方面, 抗肿瘤血管靶剂的目的是, 有选择地攻击并摧毁存在的肿瘤特异性血管, 使这些血管迅速且不可逆地消亡。这种效果在抗血管生成药物的应用中是观察不到的。只有抗血管靶向活性能够摧毁支持肿瘤生长的现存血管。Combretastatin 也具有抑制内皮细胞增生的能力 (抗血管生成活性), 该内皮细胞生成并排列了新肿瘤血管。因此, 可以认定, Combretastatin 既可以作为抗肿瘤血管靶剂, 也可以作为血管生成药物。在临床前的研究中, 两种疗法已经表明, 未攻击与未受感染正常组织的血管。本发明涉及以 CA4P 单独用药和 / 或与现有药剂结合用药, 治疗眼病。

[0089] 除了癌症以外, 已经在许多疾病中观察到血管生成形成的脉管系统, 其中包括眼病, 例如黄斑变性、增生性糖尿视网膜病、早产性视网膜病。在佛罗里达大学兽医学院眼科系 DonaldArmstron 博士的实验室, 完成了减少实验性眼模型脉管系统的初期工作, 并实验证明, CA4P 加速了实验动物模型眼中预先形成血管的退化速度。图 3A、3B、4A 和 4B 说明了实验研究中兔眼预先形成血管的退化。

[0090] 当前正在使用 CA4 和 CA4P, 进行治疗各种疾病与病症的临床实验, 包括将其用作抗肿瘤血管靶剂、血管生成抑制剂。此外, CA4P 已经显示出治疗眼病的能力, 例如治疗视网膜下血管再生的能力。

[0091] 本发明也涉及应用下列文献公开的 Combretastatins 合成类似物, Med. Chem Lett11(2001)871-874, 3073-3076, J MedChem(2002), 45 : 1697-1711, W002/50007, W001/12579, W000/35865, W000/48590, W001/12579, 美国专利 5, 525, 632, 美国专利 5, 674, 906 和美国专利 5, 731, 353。

[0092] 可以作为血管靶剂的其它微管蛋白结合剂包括下列药剂或其前药 :2,3- 二取代苯并 [b] 噻吩 (美国专利 5, 886, 025 ;6, 162, 930 和 6, 350, 777), 2,3- 二取代苯并 [b] 呋喃

(W098/39323), 2,3- 二取代吡啶 (W001/19794), 二取代二氢萘 (W001/68654), 或秋水仙素类似物 (W099/02166)。此外, 专利 W000/48606 公开了其它无细胞毒素前药的血管靶剂, 在血管增生部位有选择地诱导了内皮酶浓度的升高, 在内皮酶的作用下, 无细胞毒素前药充分地转换为细胞毒素药物。

[0093] 可以按照本发明用药的其它公知微管蛋白结合剂有 taxanes、长春碱、秋水仙碱、dolastatins、足叶草毒素、steganacins、amphetethiniles、黄烷类、rhizoxins、curacins A、ephothilones A 和 B、welwistatins、phenstatins、2-stryl 喹唑啉 -4(3H)- 酮、二苯乙烯、2- 芳基 -1,8- 二氮杂萘 -4(1H)- 酮和 5,6- 二氢吡啶 (2,1-a) 异喹啉。

[0094] 将微管蛋白结合剂用药传递到所需受体眼部, 重要的是考虑到人眼具有的许多独特结构特征: 它暴露在环境中, 而且很虚弱, 虽然眼睛脉络膜中血流速很高, 但是前房与玻璃体全都不含血管, 孤立 in 循环系统之外。眼睛的这种特殊结构为选择药物输送方法提供了充足机会。在这方面, 本发明涉及四种体系外的用药方式, 即玻璃体内用药 (注射)、眼球囊下注射、电离子透入输送、植入 / 插入输送、或滴眼液输送。

[0095] 实施例部分说明了, 角膜、脉络膜、或视网膜血管再生的动物模型中, 使用 CA4P 后, 眼刺激和体内分布研究和抑制血管生长的结果。

[0096] 同样, 因为如下原因, 新血管的视网膜病和眼瘤成为 CA4P 疗法和其它微管蛋白结合剂的可实施对象:

[0097] ●微管蛋白结合剂可以攻击与视网膜病有关的异常新生血管, 因为这些脉管不具有与血 - 视网膜屏障相似的结构。微管蛋白结合剂可以抑制肿瘤的恶化, 更像是在实性肿瘤脉管系统中起作用。此外, 临床前研究中已经发现, 微管蛋白结合剂可以使新生血管退化。

[0098] ●既然对于视网膜下血管再生没有 100% 有效的疗法, 当与现有治疗方法结合使用时, 微管蛋白结合剂可以是有效的药剂。

[0099] ●现今批准的视网膜病治疗方法涉及手术插入, 不仅痛苦, 而且需要长时间恢复。微管蛋白结合剂的体系内或体系外用药是非手术的治疗形式。

[0100] ●在角膜、视网膜或脉络膜血管生成的动物模型以及眼瘤的动物模型中, 当体系内或体系外用药时, CA4P 作为血管靶剂表现出良好的前景。

[0101] 如前所述, 在角膜、视网膜或脉络膜血管生成、以及其它眼病和眼瘤模型中, 当体系内用药时, CA4P 以及其它血管靶剂和微管蛋白结合剂表现出良好的前景。体系内用药的优选方式有非肠道用药和口服用药。非肠道用药是在一层或多层皮肤或粘液膜下注射的用药线路。非肠道用药线路定义为, 包括口服 - 肠胃道 (肠内) 线路以外的任何线路。非肠道用药包括静脉线路、肌肉线路和皮下线路。

[0102] 本发明的药用组合物设计为适合预定的用药线路。眼局部用药的药用组合物可以包括眼溶液、眼胶、喷雾、软膏、灌注液和插入物。微管蛋白结合剂的局部输送配方应该在充足时间内保持稳定, 从而获得所需的治疗效果。另外, 药剂必须透过眼表面结构, 在病患部位积累足够的浓度。此外, 药剂的局部输送不应该造成局部的过量毒性。

[0103] 滴眼液形式的眼溶液通常由水介质构成。为了广泛适应不同极性的药物, 可以加入缓冲液、有机载体、无机载体、乳化剂和润湿剂等。用于眼局部配方的药用缓冲液包括磷酸缓冲液、硼酸缓冲液、乙酸缓冲液、glucuronate 缓冲液以及其它。药用载体可以包括水、

低碳烷醇与水混合物、植物油、烷撑二醇、石油基凝胶、乙基纤维素、油酸乙酯、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、肉豆蔻酸异丙酯。眼喷雾通常产生与滴眼液相似的效果,并可用相似的方法制备。一些眼药在透过眼屏障方面具有很差的渗透性,不能以滴眼液或喷雾方式使用。因此,可以用做软膏延长接触时间,增加药物的吸收量。将聚乙烯管放入结膜囊中,使药剂溶液连续不断地灌注眼球。通过微型泵系统调节灌注液流速,产生对眼球的连续冲洗。插入物与放在角膜上的柔软隐型眼镜相似,只是插入物通常放在上面的盲管中,偶尔也放置在下面的结膜囊中,而不是附着在敞开的角膜上。插入物通常由生物可溶性材料制成,当释放药剂时它能够溶解在眼液中或自行分解。

[0104] 在一实施方案中,活性化合物被包裹在植入眼球的插入物或植入物中。本发明涉及的植入物实例是来自 Oculex 药品公司 (Sunnyvale CA) 的一种植入物。Oculex 植入物是一种可生物降解的商标为 BDD™ 药物传输装置,并由可生物降解的微小聚合物系统构成,该微小聚合物系统可以被制成微胶囊植入眼球。在预定的时期内,可以从数天到数月以及数年,植入物使所需药剂直接释放到需要药物的眼球部位。

[0105] 以药剂单元形式配置局部组合物的特殊优点是易于用药和剂量统一。文中所用的药剂单元形式指的是配合治疗病体单一剂量的物理分散单元;含有预定活性化合物剂量的每个单元经计算产生与所需药用载体关联的治疗效果。活性化合物的独特特点、需要达到的特殊疗效、配合该活性化合物治疗患者的固有局限性规定并直接限制了本发明药剂单元形式的规格。可以在本领域标准文献中查阅本发明配方方法的其它公知信息,例如“Remington 的制药学”,Mack Publishing Co, Easter, PA, 15thEd (1975)。

[0106] 除了上述体系外用线路之外,体系内用药线路的实例包括非肠道用药,例如静脉内用药、皮层内用药、皮下用药,口服用药(例如吸入用药),透过粘膜用药,和直肠用药。非肠道或皮下使用的溶液或悬液可以包括下列成分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇、或其它合成溶剂;抗菌剂,例如苯甲醇或羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸、或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲液,例如乙酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、或磷酸缓冲液;调节渗透压的药剂,例如氯化钠或葡萄糖。PH 值可以由酸或碱调节,例如盐酸或氢氧化钠。非肠道制剂可以封闭在由玻璃或塑料制成的细颈瓶、一次性注射器、多倍剂量的管形瓶中。

[0107] 适合注射的药用组合物包括临时制备无菌注射液或分散液的无菌水溶液(水溶性)或无菌分散液和无菌粉末。静脉用药的适合载体有生理盐水、抑菌水、Cremophor EL (BASF, Parsippany, NJ) 或磷酸缓冲盐溶液 (PBS)。所有情况下,组合物必须是无菌的,应该具有易于注射的流动性。在制备与储存的条件下必须是稳定的,并且不被微生物污染,例如细菌和真菌。载体可以是溶剂或分散剂介质,其中含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇及其类似物)和其适当混合物。例如,通过使用包衣(例如卵磷脂)和表面活性剂,在作为分散剂的情况下保持所需颗粒尺寸,从而提供适当的流动性。使用不同的抗菌剂和抗真菌剂抑制微生物作用,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、噻汞撒等。在一些情况下,组合物优选含有等渗剂,例如糖,多元醇、例如甘露醇、山梨醇,氯化钠。组合物含有延迟吸收的溶剂,例如一硬脂酸铝和凝胶,造成注射组合物的延迟吸收。

[0108] 按照要求,先将适当溶剂中所需用量的活性化合物(例如血管靶剂)与上文列举的一种或组合成分混合,再过滤灭菌,制备无菌注射溶液。通常,将活性化合物与无菌赋形

剂混合制备分散剂,该无菌赋形剂含有基本分散介质和其它上文所列的需要成分。为了制备无菌注射溶液的无菌粉末,其制备方法采用真空干燥、冷冻干燥,从而生成活性成分的粉末,外加来自原无菌过滤溶液的其它任何所需成分。

[0109] 通常,口服组合物含有惰性稀释剂或可食用载体。它们被封装在凝胶胶囊中或被压缩成片剂。为了口服用药,活性化合物与赋形剂混合,以片剂、锭剂或胶囊形式用药。也可以使用液体载体制备口服组合物,用作漱口药,其中口腔内使用液体载体的化合物,漱口、吐出或吞服。也可以含有药用亲和结合剂和/或其它辅助材料,作为部分组合物。片剂、丸剂、胶囊、锭剂可以含有任何下列成分或相似性质的化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄耆胶或凝胶;赋形剂,例如淀粉、乳糖;崩散剂,例如褐藻酸、Primogel、或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁、或 Sterotes;助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或矫臭剂,例如薄荷、水杨酸甲酯、或桔子香料。

[0110] 对于吸入用药,该化合物采用气溶胶喷雾的形式,从加压容器或分配器中释放,该加压容器或分配器含有适当的发射剂,例如气体、如二氧化碳,或雾化剂。

[0111] 体系内用药也可以通过透过粘膜方式或透过皮肤方式用药。对于透过粘膜或透过皮肤用药,适合于所要穿透屏障的浸透剂可用于此配方中。该浸透剂为业内所公知,例如对于透过粘膜用药,其中含有去污剂,胆汁盐和梭链孢酸衍生物。可以使用鼻喷雾或栓剂,实现透过粘膜用药。对于透过皮肤用药,活性化合物可以配制成业内公知的软膏、油膏、凝胶、或膏状物。

[0112] 该化合物也可以栓剂形式制备(常规栓剂的主要成分,例如可可油和其它甘油酯),或以保留灌肠剂形式制备用于直肠用药。

[0113] 除了上述的微管蛋白结合剂之外,本发明还涉及使用药用组合物和药用配方,其中含有与药用载体关联的微管蛋白结合剂、稀释剂或赋形剂,例如水、葡萄糖、乳糖、羟丙基甲基纤维素、以及业内公知的其它药用组合物、稀释剂或赋形剂,且不限于此。

[0114] 如文中所用,名词“药理学有效用量”、“制药学有效剂量”、或“制药学有效用量”指的是药物或药剂的用量,该用量会引发临床医师或研究者希望获得组织、系统、动物、或人的生理或药物反应。将 CA4P 用药于病体眼球(体系外用药)的用量范围是大约 0.01—100 毫克/毫升。眼中达到的 CA4P 浓度应该药理性对应,浓度范围在 1 毫微摩尔—100 毫摩尔。眼中更优选的 CA4P 浓度范围是大约 1—100 毫摩尔。当 CA4P 体系内用药时,优选采用非肠道用药,CA4P 用药范围在大约 0.1—120 毫克/平方米。

[0115] 按照本发明制备体系内或体系外用药的微管蛋白结合剂,计划用药于哺乳动物,特别是人类。然而,本发明不限于此方面,也可以按照兽医标准设计配方,用药于动物。

[0116] 下列实例进一步说明本发明。对本领域技术人员为显而易见的是,在不超出本发明目的与宗旨的情况下,材料与方法的多种变化同样是可行的。

[0117] 实例

[0118] 实例 1. 以三种用药线路局部用药,研究

[0119] 眼刺激和测定 CA4P 的平均容忍量

[0120] (i) 玻璃体内用药

[0121] 对鼠玻璃体内注射后,评价检测物品 CA4P 可能造成的眼内刺激。全身麻醉后,将 0.2 毫升剂量的 CA4P 在 8 只鼠的右眼用药。再将 0.2 毫升剂量 0.9% 氯化钠 USP 溶液在鼠

左眼用药,作为阴性对照。测定 4 种不同浓度 CA4P。4 种浓度 (0.1 毫克 / 毫升,1 毫克 / 毫升,10 毫克 / 毫升,100 毫克 / 毫升) 的每种浓度用药于 2 只鼠的右眼。用药后大约 48 小时,用生物显微狭缝灯和间接眼底镜检查眼球。记录结果后,安乐死处理实验鼠。安乐死后,立即吸出玻璃状液的样品,用血球计数器测定血细胞数量。认定数量少于或等于 200 个细胞 / 立方毫米的样品为合格。

[0122] 在生物显微狭缝灯和间接眼底镜检查中,对照的眼组织没有明显变化。测试处理的眼球中,1 毫克 / 毫升浓度处理的一只鼠和 100 毫克 / 毫升浓度处理的两只鼠都观察到了刺激的迹象。受到 0.1 毫克 / 毫升浓度处理的眼球中,玻璃状液的平均细胞记数是 9 个细胞 / 立方毫米;受到 1 毫克 / 毫升浓度处理的眼球中,玻璃状液的平均细胞记数是 962 个细胞 / 立方毫米;受到 10 毫克 / 毫升浓度处理的眼球中,玻璃状液的平均细胞记数是 10 个细胞 / 立方毫米;受到 100 毫克 / 毫升浓度处理的眼球中,玻璃状液的平均细胞记数是 409 个细胞 / 立方毫米;对照眼球中,玻璃状液的平均细胞记数是 5 个细胞 / 立方毫米。

[0123] 在研究条件下,如人们所预料的那样,眼科检查和玻璃体分析对照,没有观察到明显的反应。对于测试处理鼠,以 100 毫克 / 毫升浓度用药的两只鼠在眼科检查中都表现出刺激与炎症,从玻璃体白血球分析中表现出炎症迹象。对于所有低药剂浓度 (0.1 毫克 / 毫升,1.0 毫克 / 毫升和 10 毫克 / 毫升),没有刺激或炎症的迹象。

[0124] (ii) 眼球囊下用药

[0125] 评价检测物品 CA4P 的初始眼刺激。将 2 支适当 CA4P 浓度 (0.1、1.0、10 和 100 毫克 / 毫升) 的 0.1 毫升注射剂注射到 2 只鼠右眼球囊下的间隙中。再将 0.2 毫升部分缓冲盐溶液注射入左眼球囊下间隙中,作为阴性对照。在试样注射后 24 小时、48 小时和 72 小时,测定眼球的反应。第三天,将鼠安乐死处理,取出眼球。并将标本固定、嵌入,再进行显微分析。重点检查眼球囊下间隙的变化,从而记录下眼组织的病理学变化。

[0126] 在此研究条件下,与对应的阴性对照眼球相比,以 0.1 和 1 毫克 / 毫升浓度处理的眼球中,没有观察到刺激现象。与对应阴性对照眼球相比,以 10 和 100 毫克 / 毫升浓度处理的眼球中,观察到轻微的刺激现象。

[0127] (iii) 局部使用滴眼液

[0128] 评价测试物品 CA4P 的初始眼刺激。0.2 毫升单一剂量的 CA4P 稀释剂 (0.1、1.0、10 和 100 毫克 / 毫升) 放置在左眼下部的结膜囊中,作为可比对照。对侧眼球受到缓冲盐溶液的处理。在试样滴注后 24 小时、48 小时、72 小时,检测眼反应。

[0129] 在研究条件下,与其对照相比,所有测试物品稀释剂的目视反应都被认为不明显。目视认定,与缓冲盐溶液对照物品相比,测试物品不属于刺激物。

[0130] 结果汇总列于下表中:

[0131] Draize 结果:

[0132]

用药	刺激*	
局部用药	0-10 毫克	无刺激
玻璃体内用药	<1 毫克	无刺激
	10 毫克	刺激
眼球囊下用药	0-10 毫克	无刺激

[0133] * 剂量范围 :0.001、0.01、0.1、1.0、10 毫克

[0134] 实例 2. 当采用不同用药线路在眼中局部用药时

[0135] 评价 CA4P 的体内分布

[0136] 为了有效治疗眼血管再生,体系外的用药方式必须穿过相关的眼结构,将有效剂量的药物输送到患病部位。为了确定不同体系外注射能够产生有效的 CA4P 体内分布,进行放射性同位素示踪药物实验。

[0137] 方法:

[0138] 除非下文说明,每个体内分布实验都遵循下述实验方案。

[0139] 将 ^{14}C -CA4P(OxiGENE Inc. Watertown, MA) 悬浮在 100 μl 体积的盐溶液中,再用 30G 注射针注射入麻醉的雄性新西兰鼠(4 个月大,1.8-2.5 公斤,每个试样 3 支)的右眼中。对应分别使用 1、5 和 5 μCi 放射性试剂,检测 3 种不同浓度的 ^{14}C -CA4P(1、10、100 毫克/毫升)。空白对照组也包括其中。麻醉实验鼠,在 1、6、24、48 小时提取血样。血液采集完成后,将鼠安乐死处理注射鲁米那,摘除所有实验鼠处理过的右眼。从角膜、水状体、玻璃体、脉络膜、或视网膜切除眼组织试样,再放入 20 毫升玻璃闪烁管中,再用 500 μl 消化液培养 24 小时。通过离心(1,800g,持续 10 分钟)从全血分离血浆。放射记数前,室温下用 16 毫升商标为 Hionic Fluor™ 闪烁液培养血浆和眼组织试样 24 小时。用 Betamatic V 计数器(Bio-Tek Kontron Instruments, St Quentin en Yvelines, France)为每个样品计数 5 分钟。使用 ^{14}C 标准的校准曲线和由 ^{14}C 标准增强的各自空白基体猝光曲线,贝它计数器自动完成每分钟次数(“cpm”)向每分钟分解量(“dpm”)的转换。按照 CA4P 毫微克当量(毫微克当量/克组织)测定药剂浓度,该 CA4P 毫微克当量是由测定的 dpm 值、组织样品重量和药物特异放射性(0.37mCi/mg)计算而成,然后再减去对照眼组织的对应背景值。1 μM CA4P 的组织浓度等量于 440 毫微克当量/克组织。

[0140] 结论:

[0141] (i) 玻璃体内用药

[0142] 表 1 记录了玻璃体注射后体内分布的结果。在所有检测的组织中,眼渗透程度取决于眼球表面 CA4P 的浓度。用药后一小时内达到眼内最高的药物浓度(“ C_{max} ”)。在检测的所有浓度下,相应治疗浓度的药物(>1 μM)都输送到了视网膜。在玻璃体与巩膜内也发现了药物的高浓度。在水状液或血浆中发现了相对少量的药物。

[0143] 表 1:玻璃体注射后 CA4P 的体内分布

[0144]

眼组织试样	剂量 (毫克/毫升)	C _{max} (μM)
水状液	100	460
	10	0.79
	1	0.15
玻璃体	100	10,039
	10	757
	1	75
视网膜	100	10,696
	10	1,981
	1	160
角膜	100	5,871
	10	969
	1	95
巩膜	100	16,112
	10	153
	1	19
血浆	100	0.78
	10	0.2
	1	0.4

[0145] (ii) 眼球囊下用药

[0146] (1) 体内分布

[0147] 表 2 记录了眼球囊下注射后体内分布的结果。在所有检测的组织中,眼渗透程度取决于眼球表面 CA4P 的浓度。用药后一小时内达到眼内最高的药物浓度。在 100 和 10 毫克 / 毫升用药剂量下,相应治疗浓度的药物 (>1 μM) 输送到了视网膜和脉络膜。在巩膜内也发现了药物的高浓度。在玻璃体、水状液或血浆中发现了相对少量的药物。

[0148] 表 2 :眼球囊下注射后 CA4P 的体内分布

[0149]

眼组织试样	剂量 (毫克/毫升)	C _{max} (μM)
水状液	100	5.92
	10	1.8
	1	0.3
玻璃体	100	3.9
	10	0.13
	1	0.019
视网膜	100	171
	10	7.1
	1	0.85
脉络膜	100	861
	10	6.2
	1	1.2
血浆	100	9.3
	10	0.49
	1	0.07

[0150] (iii) 结膜下用药

[0151] 以 0.1、1、10、和 100 毫克 / 毫升剂量结膜下注射用药。用 0.24% 10N 氢氧化钾和 0.01% 氯苯甲炔铵配制 ¹⁴C-CA4P 溶液,再用 100 μl 所得溶液注射。向实验动物右眼结膜下注射放射量为 5 μCi 的药剂。注射完成后,轻微闭合眼睛 2-5 秒钟。实验结果记录在表 3 中。

[0152] 用药后一小时内达到眼内最高的药物浓度。在 100、10 和 1 毫克 / 毫升用药剂量下,相应治疗浓度的药物 (>1 μM) 输送到了角膜、视网膜和脉络膜。在玻璃体或血浆中也发现了相对少量的药物。

[0153] 表 3:结膜下注射后 CA4P 的体内分布

[0154]

眼组织试样	剂量 (毫克/毫升)	C _{max} (μM)
角膜	100	761
	10	143
	1	13
	0.1	1.5
玻璃体	100	15.7
	10	2.1
	1	0.02
	0.1	0.005
视网膜	100	174
	10	39.6
	1	1.7
	0.1	0.13

[0155]

脉络膜	100	908
	10	188
	1	1.9
	0.1	2.3
血浆	100	8
	10	0.9
	1	0.025
	0.1	0.017

[0156] (iv) 眼周围用药

[0157] 表 4 记录了眼周围注射后体内分布的结果。在所有检测的组织中,眼渗透程度取决于眼球表面 CA4P 的浓度。用药后一小时内达到眼内最高的药物浓度。在所有用药剂量下,相应治疗浓度的药物 (>1 μM) 输送到了视网膜和脉络膜。在巩膜内也发现了高浓度的药物。在玻璃体、或血浆中发现了相对少量的药物。

[0158] 表 4 :眼周围注射后 CA4P 的体内分布

[0159]

眼组织试样	剂量 (毫克/毫升)	C _{max} (μM)
玻璃体	100	3.35
	10	0.34
	1	0.03
视网膜	100	169
	10	54
	1	4.4

[0160]

脉络膜	100	1,040
	10	74.5
	1	14.3
巩膜	100	3,366
	10	280
	1	18
血浆	100	12.3
	10	0.79
	1	0.07

[0161] (v) 局部配方

[0162] 开发局部凝胶和溶液,作为适合 CA4P 局部用药于眼表面的局部配方。在 0.9% NaCl 溶液中直接配制局部溶液 (1、3、10%),然后用 0.2 μm 过滤器 (pH6.4-8.5,摩尔渗透压 290-459mosmol/kg 水) 灭菌。在 0.5%羧甲基纤维素 (Sigma Aldrich Chimie, St QuentinFallavier Cedex, France) 和 0.9%氯化钠中制备低粘度的局部凝胶 (1、3、10%)。每种凝胶的生化标准列于表 5 中。

[0163]

	1%CA4P 凝胶		3%CA4P 凝胶		10%CA4P 凝胶	
测试	标准	结果	标准	结果	标准	结果
pH	7.4-8.1	7.796	7.7-8.4	8.203	8.1-8.8	8.491
摩尔渗透压	330-370	354	290-330	315	475-515	495
粘度 (mPa.s)	30-80	49	30-80	58	50-100	71

[0164] 将 50 μ l 施用放射量为 5 μ Ci 局部配方施用到右眼表面。从角膜取样,而不是从巩膜。在 0.5、1、6 和 24 小时取样。

[0165] 表 6 记录了每个局部 CA4P 凝胶配方用药后体内分布的结果。在所有检测的组织中,眼渗透程度取决于每个凝胶配方中 CA4P 浓度。用药后一小时内达到眼内最高的药物浓度。所有 3 种凝胶配方的情况下,相应治疗浓度的药物 (>1 μ M) 输送到了角膜、视网膜和脉络膜。在血浆中发现了相对少量的药物。

[0166] 表 6 :凝胶局部用药后 CA4P 的体内分布

[0167]

眼组织试样	剂量 (毫克/毫升)	C _{max} (μM)
角膜	10	2.92
	3	118
	1	82
水状液	10	13
	3	8.2
	1	2.4
脉络膜	10	22.5
	3	10.7
	1	2.8
视网膜	10	5.8
	3	5.8
	1	1.0
血浆	10	1.63
	3	0.56
	1	0.09

[0168] 表 7 记录了每个局部 CA4P 溶液配方用药后体内分布的结果。在所有检测的组织中,眼渗透程度取决于每个溶液配方中 CA4P 浓度。用药后一小时内达到眼内最高的药物浓度。所有 3 种溶液配方的情况下,相应治疗浓度的药物 (>1 μM) 输送到了角膜,同时 10 毫克 / 毫升剂量的用药将有效用量的药物输送到视网膜和脉络膜。

[0169] 表 7 :溶液配方局部用药后 CA4P 的体内分布

[0170]

眼组织试样	剂量 (%CA4)	C _{max} (μM)
角膜	10	104
	3	34
	1	10
水状液	10	4.1
	3	1.9
	1	0.6
脉络膜	10	15.6
	3	1.9
	1	0.87
视网膜	10	4.2
	3	0.39
	1	0.27
血浆	10	1.27
	3	0.84
	1	0.07

[0171] 这些实验明显表明,以任何方式体系外输送 CA4P,都可以有效地达到角膜、视网膜、或脉络膜中药物的相应治疗浓度。这些中的每个组织都是眼血管再生的潜在部位。

[0172] 实例 3 采用电离子透入法眼用药 CA4P

[0173] CA4P 能够在生理 pH 条件下电离,因此可以采用电离子透入输送。采用视觉兔眼敷贴器 (IOMED Inc, Salt Lake City, UT),评价 CA4P(10 毫克 / 毫升) 用药时电离子透入法的输送效果 (transcleral),该敷贴器由 180 μ l 硅树脂容器体、连接导线、和单层水凝胶浸渍的聚乙烯醇缩醛基体构成,该 180 μ l 硅树脂容器体受到氯化银覆盖的银箔电流分配组件的支持。敷贴器的接触表面积是 0.54 平方厘米。它放置在新西兰白鼠 (3-3.5 公斤,每种处理 n = 6) 右眼的巩膜上方,角膜巩膜汇合点远侧前沿 1-2 毫米边缘上面的盲管内。采用商标 Phoresor II™ PM700 (IOMED Inc, Salt Lake City, UT) 电源,使用 2、3 和 4 毫安的每种敷贴器,进行直流阳极电离子透入处理 20 分钟。采用无源电离子透入处理 (0 毫安下持续 20 分钟) 作为对照。电离子透入完成后,安乐死处理实验动物,又过 30 分钟后摘除眼球,并用非蒸馏水冲洗,再在 -70℃ 冷冻。从这些样品中切除视网膜和脉络膜组织。

[0174] 采用层析法和质谱法 (“LC/MS/MS”),从大约 100 毫克组织中,定量测定 CA4P、CA

和内部标准的己烯雌酚 (Sigma Chemical Company)。将等分试样 2,2-二甲砒基丙烷提取物注射到配有高压液相色谱柱的 SCIEX API0 3000 LC/MS/MS 装置中。对应内部标准生成离子的峰值区域 m/z 267→237, 测定出 CA4 生成离子的峰值区域 m/z 315→285 和 CA4P 生成离子的峰值区域 m/z 395→379。每次实验以前立即制定确证的校正标准, 进行加权 ($1/x$) 线性最小二乘法回归分析, 进而完成定量分析。初始的 Combretastatin 用量明显高于定量范围, 因此分析后只能外推求解。如表 8 所列, 与无源输送相比, 采用电离子透入法输送到脉络膜和视网膜的全部 Combretastatin 放大了大约 15 倍。此含量超过所谓抑制微管蛋白结合的对治疗浓度 (2-3 μ M) 数千倍。然而, 当前它并不是传输到视网膜 / 脉络膜的可靠方法。

[0175] 表 8 Combretastatin 传输到视网膜 / 脉络膜的电离子透入放大

[0176] (平均值 $\pm$ 标准偏差)

[0177]

处理	输送的 CA4P 用量 (ng)	输送的 CA4P 用量 (ng)	输送的 Combretastatin 总量 (nmol/g)	放大 倍数
0 毫安, 20 分钟	<0.4	57 $\pm$ 37	1.6 $\pm$ 1.0	NA
2 毫安, 20 分钟	1.4 $\pm$ 0.5	910 $\pm$ 630	27 $\pm$ 15	17
3 毫安, 20 分钟	3.8 $\pm$ 1.5	710 $\pm$ 450	25 $\pm$ 17	16
4 毫安, 20 分钟	7.2 $\pm$ 6.3	670 $\pm$ 440	24 $\pm$ 10	15

[0178] 实验 4 以 CA4P 体系内用药治疗角膜血管再生

[0179] 为了模仿致病眼血管生成, 将 30 μ g 液体过氧化氢 (LHP) 角膜内注射到兔眼中用药, 诱发眼血管再生。7 到 14 天后, 由于液体过氧化氢的伤害, 受伤的眼睛中有血管生成。实验对象被分为两组; 一组接受 Combretastatin A4 磷酸二钠的静脉用药, 剂量是每天 400 毫克 / 公斤, 并持续 5 天; 另一组以不含 Combretastatin A4 磷酸二钠的载体用药, 其药剂是水, 并持续相同的周期。7 天后, 检测两组的眼球。在以 Combretastatin A4 磷酸二钠用药的组中观察到血管减少了 40% 或更多, 而另一组没有变化。

[0180] 实例 5 以 CA4P 体系内用药治疗角膜血管再生

[0181] 为了测定 CA4P 抑制角膜血管再生的能力, 通过亚油酸过氧化氢 (“LHP”) 注射 (Ueda et al, Angiogenesis, 1997, 1:174-184) 诱导兔角膜模型的血管再生。在角膜基质中注射亚油酸过氧化氢, 刺激角膜内局部生成血管来源的细胞因子。循环缘血管丛中的血管响应血管来源的刺激, 向亚油酸过氧化氢注射部位迁移。通过测定增生血管的长度, 评价体系内输送 CA4P 的治疗效果。

[0182] 实验方法:

[0183] 如下文表 9 所列, 在上方缘 5 毫米处, 向成年雄性新西兰鼠 (2.7-3.0 公斤) 注射 10 μ l 亚油酸过氧化氢 (60 μ g) 悬液, 从而诱导角膜血管再生。血管以 0.25 毫米 / 天速度生长。在血管生长 3 和 10 天后, 分别向组 2 和 4 腹膜内 (“IP”) 注射 50 毫克 / 公斤 CA4P。在亚油酸过氧化氢注射后第 3 和 10 天, 向处理组 1 和 3 注射对照盐溶液。在亚油酸过氧化氢注射后第 0、3、6、12、17、28 天, 拍摄角膜表面照片。每个拍照完成后, 在手术显微镜下观察角膜血管, 用 Castroviejo 卡尺测量最突出血管的长度。

[0184] 除了测量最长血管外, 在第 28 天进行组织学分析, 确定胞间质的溶解量、血管壁

厚度、和血管出枝程度。摘除安乐死动物的眼球,从每个眼球取出玻璃体后,将眼球固定,在4%促甲醛中浸泡45分钟,然后在0.2M卡可酸盐缓冲液(pH7.4)中浸泡过夜。将眼球嵌入石蜡中,切成3毫米厚度,再用溶血素和曙红染色。

[0185] 表9:实验设计

[0186]

组	样品数量	处理	天数	方案	死亡日
1	N = 4	载体 (PBS)	3	qd×5	28
2	N = 5	CA4P (50 毫克 / 公斤)	3	qd×5	28
3	N = 2	载体 (PBS)	10	qd×5 2 天休息 qd×5	28
4	N = 7	CA4P (50 毫克 / 公斤)	10	qd×5 2 天休息 qd×5	28

[0187] 结论:

[0188] 表10和11概括了CA4P在介入时间与处理次数方面对血管长度起到的效果。当CA4P处理在初始血管来源刺激(表10,组2)3天内介入,药物完全抑制了新血管的生长。相反,载体对照组中的血管继续生长。这种效果符合抑制血管生成或抗血管来源作用的要求。当CA4P处理在初始血管来源刺激后(表10,组2)第10天介入,其效果相同。

[0189] 表10:早期介入:处理从第3天开始

[0190]

组	第3天的血管 长度(毫米)	第6天的血管 长度(毫米)	第12天的血管 长度(毫米)
载体对照(组1) 50 毫克 / 公斤	0.8±0.12	1.9±0.04	3.7±0.13
CA4P(组2)	0.6±0.12	0.7±0.16	0.5±0.61
P 值		>0.001	>0.001

[0191] 表11:晚期介入:处理从第10天开始

[0192]

组	第1天的血管 长度(毫米)	第12天的血管 长度(毫米)	第24天的血管 长度(毫米)
载体对照(组3) 50 毫克 / 公斤	4.0±0.7	5.4±0.6	6.4±0.3
CA4P(组4)	2.6±0.29	2.8±0.49	1.4±0.46
P 值		>0.05	>0.05

[0193] 图3B是用CA4P处理的眼球在第28天的表面照片。这些照片进一步说明,与图3A记录的载体对照眼相比,以CA4P用药后第28天抑制了血管生长。

[0194] 图4A和4B呈现的显微照片(放大400倍)是从第28天相同动物获得的染色组织样品的实例。用载体处理的动物中(图4A),血管呈现圆形且数量众多。相反,用CA4P处理的动物中(图4B),血管狭窄且数量较少。此外,在CA4P介入后期,观察到血管退化的迹象(数据未列出)。很明显,CA4P可以降低生成血管的宽度,明显抑制血管出枝,这些都是

其它血管靶向作用的标志。

[0195] 实验 6 以 CA4P 体系内用药治疗黄斑变性

[0196] 动物模型的脉络膜血管再生

[0197] 脉络膜血管再生是年老病人或黄斑变性病人视力严重损失的主要原因。为了研究 CA4P 抑制脉络膜中血管生长的能力,检测脉络膜血管再生的鼠模型。

[0198] 在此模型中,研究者使用氩激光在 C57BL/6J 鼠的布鲁斯膜上产生创伤。每支眼球受到多处烧伤。烧伤引发了传统伤口的愈合反应,其中包括脉络膜中的血管再生。这种氩激光凝固法参见文献:Tobe 等人, Am. J. of Pathology, 1998, 153(5):1641-6。在动物子集中 (n = 19), 将 CA4P 体系内用药, 以 100 毫克 / 公斤 / 天的剂量腹膜内注射。采用组织病理学和荧光素血管造影术鉴别烧伤周围的血管再生。使用电子显微镜测定脉络膜血管损伤内有孔新脉管的管腔直径。表 12 说明了 CA4P 对于平均血管管腔面积的治疗效果。与用盐溶液处理的动物 (n = 33) 相比, 用 CA4P 处理的动物具有大约减少 50% 的血管管腔面积 (平方毫米)。结果的统计分析证明意义重大。

[0199] 表 12 用 CA4P 处理和载体对照的平均官腔面积

[0200]

鼠	CA4P(100 毫克 / 千克)	CA4P(20 毫 克 / 千克)	CA4P(10 毫 克 / 千克)	载体
组中鼠数量	19	11	10	33
平均血管官腔面 积 (平方毫米)	0.0076115	0.0110057	0.011858	0.0129886
标准偏差	0.0032669	0.0043229	0.0041457	0.0047336

[0201] 实例 7 以 CA4P 体系内用药治疗早产性

[0202] 视网膜病鼠模型的视网膜血管再生

[0203] 哺乳动物眼睛内部视网膜是从视网膜表面毛细血管床获得氧气。毛细血管床位于内衬膜下方, 此内衬膜作为内部视网膜与外部无血管玻璃体之间的界面。视网膜血管再生或视网膜病的病状是由视网膜内衬膜下缺血诱发的新脉管系统生长引起的, 再影响到玻璃体, 造成视力的严重损失, 通常导致视网膜分离。氧气诱导视网膜血管再生特征化的鼠模型近似模仿了早产婴儿表现的早产性视网膜病 (“ROP”), 并表现出与其它各种缺氧诱导视网膜病相同的特征, 其中包括糖尿视网膜病 (Smith et al, Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35:101-11)。在此模型中, 将新生鼠暴露在持续的高氧环境下 (75% 氧气、持续 7 天), 此环境抑制视网膜表面毛细血管床的发育。幼鼠从纯氧环境取出后放置到相对缺氧的环境中, 因此发育不足的视网膜表面毛细血管床不能向视网膜传输足量的氧气。视网膜响应氧气缺乏, 产生了造成严重病理结果的血管来源细胞因子。血管来源细胞因子的局部生成能够造成发育不足的视网膜表面毛细血管床产生新血管, 此新血管可以突破内衬膜。玻璃体内异常血管生长导致了形成紧凑的靶组织以及牵引引导的视网膜分离。

[0204] 可以预料, 立即用 CA4P 治疗来自高氧环境幼鼠的方法一定是早产性视网膜病的有效治疗方法。按照现存方法 (Majka et al, Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 2001, 42: 210-15), 通过计数治疗或非治疗眼睛视网膜组织切片中穿透内皮细胞的化学染色细胞核数量, 量化视网膜的血管再生。可以预料, 穿透内衬膜的细胞核数量在使用 CA4P 的眼球中明显降低。

[0205] 实例 8 以 CA4P 结膜下药物治疗成

[0206] 视网膜细胞瘤鼠模型的眼瘤

[0207] 使用成视网膜细胞瘤鼠的转基因模型,使 SV-40 大 T 抗原阳性鼠发育成与人儿科成视网膜细胞瘤类似的两侧成视网膜细胞瘤。在此模型中,肿瘤出现在第 4 周,并以稳定的可再生的方式发展 (Hayden et al, Arch. Ophthalmol. 2002 ;120 (3) :353-9)。在一实验中,用单一 20 μ l 体积 CA4P 试剂 (100 毫克 / 毫升) 结膜下仅注射右眼,治疗 12 周大的鼠 ($n = 48$)。使用平衡盐溶液 (“BSS”),注射对照鼠 ($n = 8$)。在注射后第 1、3、7、14、21、28 天摘除眼球,再从眼球中取样 (每个试样 $n = 8$)。试样经过固定、石蜡嵌入、连续切片、然后由 PAS、heometyoxilin、曙红先后染色。检查每个样品的组织病理学肿瘤血管的应答。如图 5A 所示,显而易见在第 1、3、和 7 天肿瘤内血管再生明显减少。

[0208] 在不同剂量的实验中,在 6 个连续双周中结膜下注射 20 μ l 体积 CA4P 治疗实验鼠,其浓度分别是 100、10、1、0.1、0.01 毫克 / 毫升 (每个试样 $n = 6$)。向对照组 ($n = 6$) 连续结膜下注射平衡盐溶液。处理后第 28 天摘除眼球,检查肿瘤体积变化。图 5B 说明,与对照相比,CA4P 对肿瘤血管体积具有剂量决定的效果。在治疗剂量超过 10 毫克 / 毫升的试样中,没有出现肿瘤性血管分布,在任何时间点或治疗剂量没有观察到毒性迹象。

[0209] 其它实施方案

[0210] 可以理解,尽管结合说明书已经详细描述了本发明,但是前述说明书仅用于说明本发明,而不是限制本发明范围,本发明范围由所附权利要求范围界定。

[0211] 还应理解,附图没有按比例绘制,只是概念性的图例。

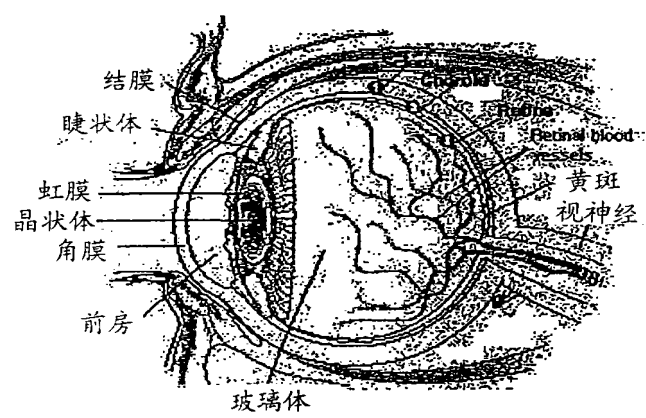


图 1

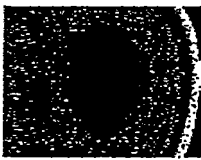


图 2A



图 2B

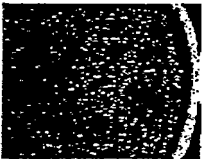


图 2C

抑制血管生长

第 28 天载体对照

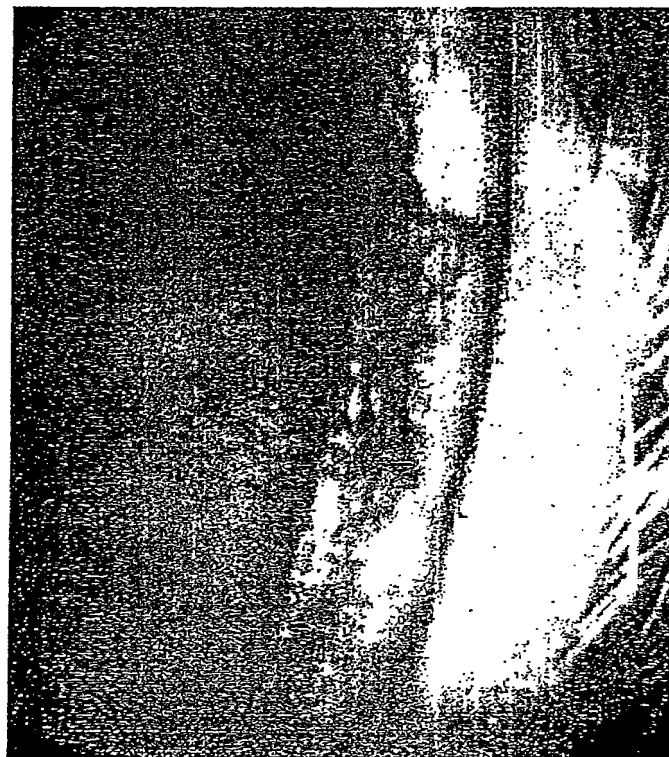


图 3A

第 28 天用 CA4P 治疗的试样



图 3B

抑制血管生长

第28天载体对照

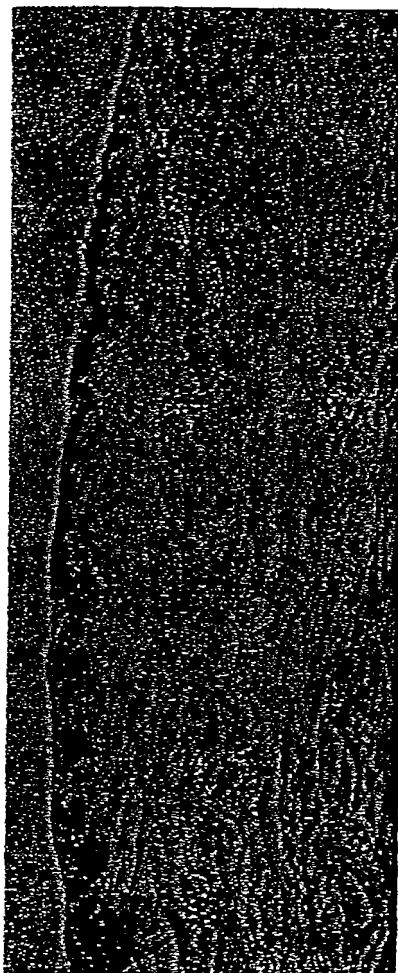


图 4A

第28天用 CA4P 治疗的试样

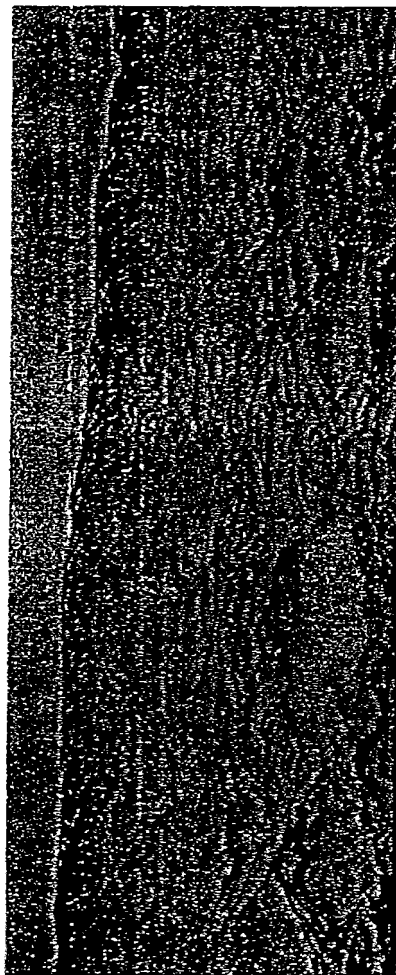


图 4B

H&E 染色
放大 400 倍

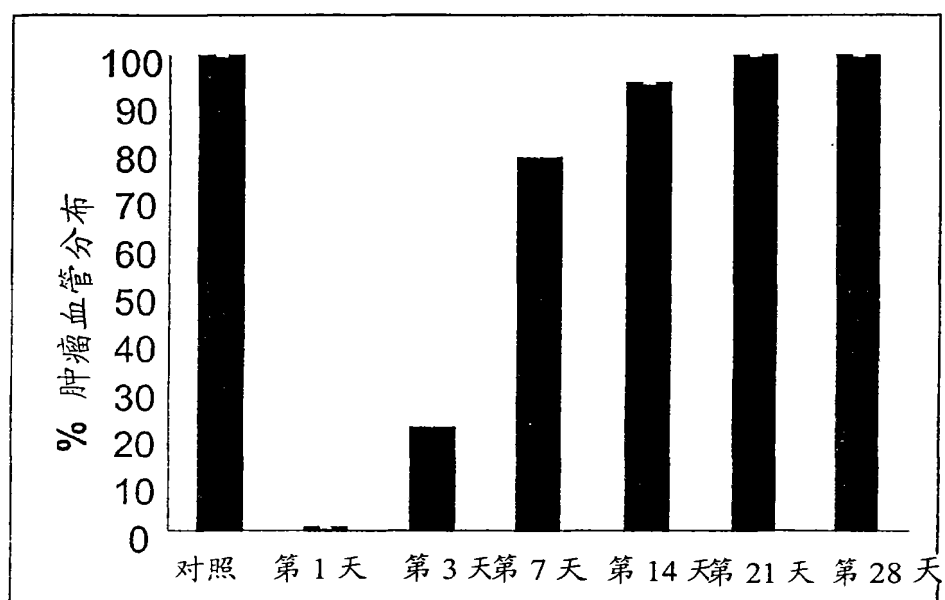


图 5A

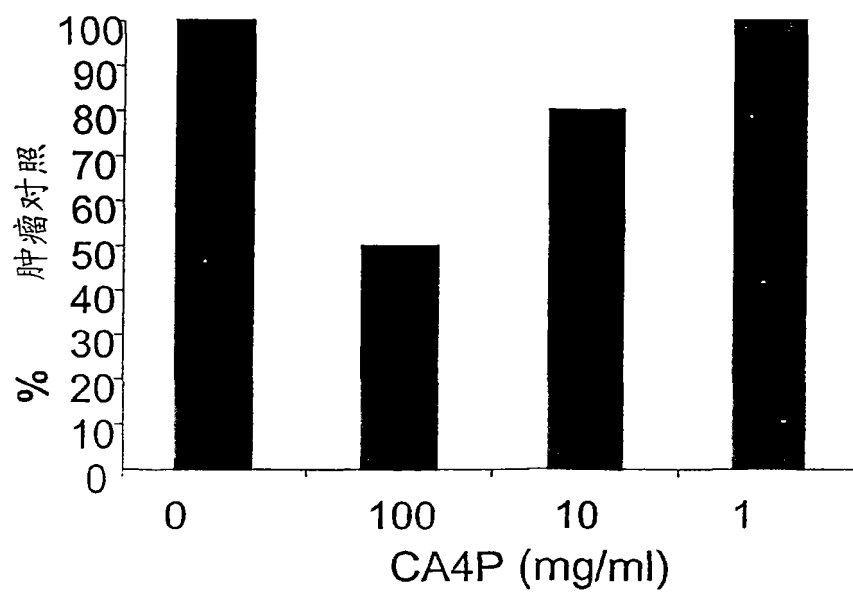


图 5B