



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104768533 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201380042670. 3

A61K 47/30(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 06. 06

A61P 27/02(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/658304 2012. 06. 11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 02. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/044617 2013. 06. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/188217 EN 2013. 12. 19

(71) 申请人 马库克利尔公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 P. A. 路易斯 W. H. 沃勒

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 罗文锋 吕彩霞

(51) Int. Cl.

A61K 9/08(2006. 01)

A61K 31/495(2006. 01)

权利要求书2页 说明书31页 附图4页

(54) 发明名称

治疗性制剂和治疗方法

(57) 摘要

本公开内容涉及在用制剂治疗眼疾病和病况中的含胍屈嗪的药物制剂。本公开内容还涉及制备所述药物制剂的方法。

1. 一种眼用组合物,其包含:  
量介于约 0.02-2 wt% 的含有胍屈嗪的药学活性药物;  
pH 介于 3.9-4.5 之间、量介于 8-12 wt% 之间的乙酸盐缓冲溶液;  
量介于 0.5-2 wt% 之间的丙二醇;  
量介于 0.25-1 wt% 之间的氯化钠;  
量介于 0.015-0.06 wt% 之间的羟苯甲酸甲酯;  
以介于 0.01-0.04 wt% 的量存在的呈 50% 溶液形式的苯扎氯铵;和  
量介于 0.008-0.030 wt% 之间的依地酸二钠;  
其中所述组合物的 pH 介于 4.0-4.4 之间。
2. 权利要求 1 的组合物,其中所述药物是盐酸胍屈嗪。
3. 权利要求 2 的组合物,其中所述药物以介于 0.5-2 wt% 之间的量存在。
4. 权利要求 1-3 中任一项的组合物,其中所述乙酸盐缓冲溶液的 pH 为 4.2,并且以 10 wt% 的量存在。
5. 权利要求 1-3 中任一项的组合物,其中所述乙酸盐缓冲溶液由乙酸钠和 2N 乙酸组成。
6. 权利要求 1-5 中任一项的组合物,其中丙二醇以 1 wt% 的量存在。
7. 权利要求 1-6 中任一项的组合物,其中羟苯甲酸甲酯以 0.03 wt% 的量存在。
8. 权利要求 1-7 中任一项的组合物,其中呈 50% 溶液形式的苯扎氯铵以 0.02 wt% 存在。
9. 权利要求 1-8 中任一项的组合物,其中依地酸二钠以 0.015 wt% 存在。
10. 一种用于制备眼用制剂的方法,所述方法包括:  
将水与 pH 为 3.9-4.5 的乙酸盐缓冲溶液混合得到第一临时混合物,乙酸盐缓冲溶液以在制剂中提供介于约 8-12 wt% 之间的乙酸盐缓冲溶液的量加入;  
将依地酸二钠加入第一临时混合物中得到第二临时混合物,依地酸二钠以在制剂中提供介于约 0.008-0.030 wt% 之间的依地酸二钠的量加入;  
将丙二醇加入第二临时混合物中得到第三临时混合物,丙二醇以在制剂中提供介于约 0.5-2 wt% 之间的丙二醇的量加入;  
将氯化钠加入第三临时混合物中得到第四临时混合物,氯化钠以在制剂中提供介于约 0.25-1 wt% 之间的氯化钠的量加入;  
将苯扎氯铵加入第四临时混合物中得到第五临时混合物,苯扎氯铵以在制剂中提供介于约 0.01-0.04 wt% 之间的苯扎氯铵的量加入;和  
将羟苯甲酸甲酯加入第五临时混合物中得到第六临时混合物,羟苯甲酸甲酯以在制剂中提供介于约 0.015-0.06 wt% 之间的羟苯甲酸甲酯的量加入;  
将包含胍屈嗪的药学活性药物加入第六临时混合物中得到所述制剂。
11. 权利要求 10 的方法,其中一个或多个加入步骤包括在加入的同时混合。
12. 权利要求 10-11 中任一项的方法,其中所述乙酸盐缓冲溶液以在制剂中提供 10 wt% 乙酸盐缓冲液的量加入。
13. 权利要求 10-12 中任一项的方法,其中所述乙酸盐缓冲溶液由乙酸钠和 2N 乙酸组成。

14. 权利要求 10-13 中任一项的方法,其中依地酸二钠以在制剂中提供 0.015 wt% 依地酸二钠的量加入。

15. 权利要求 10-14 中任一项的方法,其中丙二醇以在制剂中提供 15 wt% 丙二醇的量加入。

16. 权利要求 10-15 中任一项的方法,其中氯化钠以在制剂中提供 0.5 wt% 氯化钠的量加入。

17. 权利要求 10-16 中任一项的方法,其中苯扎氯铵以在制剂中提供 0.02 wt% 苯扎氯铵的量加入。

18. 权利要求 10-17 中任一项的方法,其中羟苯甲酸甲酯以在制剂中提供 0.03 wt% 羟苯甲酸甲酯的量加入。

19. 权利要求 10-18 中任一项的方法,其中所述药学活性药物是以介于 0.5-2 wt% 之间存在于制剂中的胍屈嗪。

20. 用于治疗黄斑变性的权利要求 1-9 中任一项的眼用组合物。

21. 权利要求 20 的组合物,其中所述黄斑变性是干性年龄相关性黄斑变性。

22. 一种用于治疗黄斑变性的方法,所述方法包括:

将权利要求 1-9 中任一项的眼用组合物或依据权利要求 10-19 中任一项的方法制备的制剂给予有黄斑变性风险或诊断为黄斑变性的受试者的眼部。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述黄斑变性是年龄相关性干性黄斑变性。

## 治疗性制剂和治疗方法

### [0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求 2012 年 6 月 11 日提交的美国临时申请号 61/658,304 的权益,该申请通过引用以其整体结合到本文中。

### 技术领域

[0002] 本文所述主题涉及眼制剂和以其对眼的治疗。

### [0003] 发明背景

老龄化是引起细胞、组织和器官(包括眼的脉络膜血管、视网膜色素上皮细胞(RPEC)和玻璃膜)变性的一个慢性过程。动脉硬化性老化改变脉络膜血管,特别是黄斑脉络膜毛细血管,导致整个毛细血管血流量减少。因此,视网膜色素上皮开始蓄积玻璃疣和脂褐素,改变细胞形状、密度、色素沉着、溶酶体活性和胞外基质形成。逐渐地,玻璃膜出现增厚和透性降低,导致可使脉络膜新血管形成(CNV)出现的破坏,这最终导致新血管性年龄相关性黄斑变性(亦称湿性年龄相关性黄斑变性)和失明。临床证据表明,缺血或脉络膜血流量减少可能与包括年龄相关性黄斑变性(AMD或ARMD)的许多严重的视网膜疾病有关(Grunwald等人,1998,Invest Ophthalmol Vis Sci.,39(2):385-390;Grunwald等人,2005,Invest Ophthalmol Vis Sci.,46(3):1033-1038;Ciulla等人,1999,Am J. Ophthalmol,128(1):75-80;Metelitsina等人,2006,Br J Ophthalmol,90(3):342-346;Metelitsina等人,2008,Invest Ophthalmol Vis Sci,49(1):358-363)。眼部血管因素和全身性血管因素两者(例如全身性高血压和高眼压症)被视为在AMD的发生中和在脉络膜新血管形成中起作用(Metelitsina 2006;Metelitsina 2008;Nathanson 等的美国专利号 5,500,230)。因此,需要鉴定防止脉络膜新血管形成和/或提高脉络膜血流量的作用剂。

[0004] 已尝试了多种方法以治疗年龄相关性黄斑变性但未成功。它们包括针对脉络膜新血管形成的激光光凝术、放射治疗、中央凹下潜隐性脉络膜新血管形成的经瞳孔温热疗法、黄斑下手术、限制性黄斑移位术、手术辅助治疗、用于玻璃疣的氩激光(argon laser to drusen)、用于治疗湿性 AMD 的红外线二极管激光光凝术。最近,用于治疗非新血管性或干性 AMD 的包含降血压剂(例如肼屈嗪)的组合物描述于 Chiou 的美国专利号 8,088,773,其通过引用结合到本文中。

[0005] 相关技术和与之有关的限制的上述实例意图为说明性的而非排它性的。在阅读本说明书和研究附图之后,相关技术的其它限制对于本领域技术人员而言将变得显而易见。

### [0006] 发明简述

下面描述和说明的以下方面及其实施方案意在示例性和说明性的,而非限制范围。

[0007] 在一方面中,描述了眼用组合物。在一个实施方案中,眼用组合物含量介于约 0.02-2 wt%之间的含有肼屈嗪的药理学活性药物和以下的一种或更多种:pH 介于 3.5-4.5 之间的一种或更多种缓冲溶液、一种或更多种螯合剂、一种或更多种等渗剂、一种或更多种防腐剂、一种或更多种粘度增强剂和一种或更多种稀释剂。在一个实施方案中,组合物的 pH

介于 4.0-4.4 之间。在另一个实施方案中,眼用组合物含量介于约 0.02-2 wt% 之间的含有胍屈嗪的药学活性药物、pH 介于 3.9-4.5 之间量介于 8-12 wt% 之间的乙酸盐缓冲溶液、量介于 0.5-2 wt% 之间的丙二醇、量介于 0.25-1 wt% 之间的氯化钠、量介于 0.015-0.06 wt% 之间的羟苯甲酸甲酯、以介于 0.01-0.04 wt% 的量存在的呈 50% 溶液形式的苯扎氯铵和量介于 0.008-0.030 wt% 之间的依地酸二钠。在一个实施方案中,组合物的 pH 介于 4.0-4.4 之间。

[0008] 药学活性药物可包含盐酸胍屈嗪。在另一个实施方案中,该药物以介于 0.5-2 wt% 之间的量存在。

[0009] 在另一个实施方案中,乙酸盐缓冲溶液的 pH 为约 4.2 并以约 10 wt% 的量存在。乙酸盐缓冲溶液可由乙酸钠和 2N 乙酸组成。

[0010] 在一个实施方案中,丙二醇以约 1 wt% 的量存在。在另一个实施方案中,羟苯甲酸甲酯以约 0.03 wt% 的量存在。在又另一实施方案中,苯扎氯铵呈 50% 溶液的形式并以约 0.02 wt% 的量存在。在另外的实施方案中,依地酸二钠以约 0.015 wt% 的量存在。

[0011] 在另一方面中,考虑了用于制备眼用制剂的方法。在一个实施方案中,所述方法包括将稀释剂和 pH 介于约 3.5-4.5 的一种或更多种缓冲溶液混合形成第一临时混合物,将一种或更多种螯合剂加入第一临时混合物中形成第二临时混合物,将一种或更多种润滑剂加入第二临时混合物中形成第三临时混合物,将一种或更多种等渗剂加入第三临时混合物中形成第四临时混合物,将一种或更多种防腐剂加入第四临时混合物中形成第五临时混合物,将包含胍屈嗪的药学活性药物加入第五临时混合物中形成眼用制剂。

[0012] 在一个实施方案中,缓冲液是 pH 为约 3.9-4.5 的乙酸盐缓冲溶液,其以在制剂中提供介于约 8-12 wt% 之间的乙酸盐缓冲溶液的量加入。在另一个实施方案中,乙酸盐缓冲溶液以在制剂中提供约 10 wt% 乙酸盐缓冲液的量加入。在进一步的实施方案中,乙酸盐缓冲溶液由乙酸钠和 2N 乙酸组成。

[0013] 在一个实施方案中,螯合剂是依地酸二钠,其以在制剂中提供介于约 0.008-0.030 wt% 之间的依地酸二钠的量加入。在进一步的实施方案中,依地酸二钠以在制剂中提供约 0.015 wt% 依地酸二钠的量加入。

[0014] 在一个实施方案中,润滑剂是以在制剂中提供介于约 0.5-2 wt% 之间的丙二醇的量加入的丙二醇。在进一步的实施方案中,丙二醇以在制剂中提供约 15 wt% 丙二醇的量加入。

[0015] 在进一步的实施方案中,等渗剂是以在制剂中提供介于约 0.25-1 wt% 之间的氯化钠的量加入的氯化钠。在一个实施方案中,氯化钠以在制剂中提供约 0.5 wt% 氯化钠的量加入。

[0016] 在又另一个实施方案中,防腐剂是以在制剂中提供介于约 0.01-0.04 wt% 之间的苯扎氯铵的量加入的苯扎氯铵。在另一个实施方案中,苯扎氯铵以在制剂中提供约 0.02 wt% 苯扎氯铵的量加入。在进一步的实施方案中,加入第二防腐剂,其中第二防腐剂是以在制剂中提供介于约 0.015-0.06 wt% 之间的羟苯甲酸甲酯的量加入的羟苯甲酸甲酯。在又另一个实施方案中,羟苯甲酸甲酯以在制剂中提供约 0.03 wt% 羟苯甲酸甲酯的量加入。

[0017] 在实施方案中,药学活性药物是以介于约 0.5-2 wt% 之间存在于制剂中的胍屈嗪。在进一步的实施方案中,药学活性药物是盐酸胍屈嗪。在具体的实施方案中,药学活性药物

是以约 1 wt% 存在于制剂中的盐酸胍屈嗪。

[0018] 在实施方案中,一个或多个添加步骤另外包括在添加的同时混合。

[0019] 在另外的方面中,考虑了用于治疗黄斑变性的方法。在实施方案中,所述方法包括将本文所述或通过本文所述方法制备的眼用组合物给予有黄斑变性风险或诊断为黄斑变性的受试者的眼中。在一个实施方案中,所述黄斑变性是年龄相关性黄斑变性。在具体的实施方案中,所述年龄相关性黄斑变性是干性年龄相关性黄斑变性。

[0020] 应了解,上述实施方案可与描述的另外的实施方案的一个或多个或全部组合。除上述示例性方面和实施方案以外,另外的方面和实施方案通过参照附图和研究下面的描述将变得显而易见。

[0021] 根据下面的描述、附图、实施例和权利要求书,本发明方法和组合物的另外实施方案等将是显而易见的。由前面和下面的描述可了解,本文描述的每个特征以及两个或多个这些特征的每个组合都包含在本公开内容的范围内,只要包括在所述组合中的特征并非相互不一致。另外,任何特征或特征的组合可明确地排除在本发明的任何实施方案以外。本发明的另外方面和优势在下面的描述和权利要求书中给出,特别是当结合随附实施例和附图考虑时。

[0022] 附图简述

图 1 是在滴注 1% 盐酸胍屈嗪制剂后 0、30、60 和 120 分钟脉络膜血流量 ( $\mu\text{l}/\text{分钟}/\text{mg}$ ) 的示意图。

[0023] 图 2 是在给予 0%、0.5%、1% 和 2% 盐酸胍屈嗪制剂后通过荧光素测量的 CNV 面积 ( $\text{mm}^2$ ) 的示意图。

[0024] 图 3 是在给予 0%、0.5%、1% 和 2% 盐酸胍屈嗪制剂后通过脉络膜平铺片测量的 CNV 面积 ( $\mu\text{m}^2$ ) 的示意图。

[0025] 图 4 是显示大鼠视网膜中 1.0% 盐酸胍屈嗪制剂对  $\text{NaIO}_3$  诱导的 RPE 变性的作用的 ERG c-波信号 (伏特) 的示意图 (均值  $\pm$  标准差; \*\*= $P<0.01$  或 \*\*\*= $P<0.01$ )。

[0026] 发明详述

现在在下文中更充分地描述各个方面。然而,这样的方面可以许多不同的形式体现,并且不应解释为限于本文给出的实施方案;更确切地说,提供这些实施方案使得本公开内容会是彻底的和完整的,且会向本领域技术人员充分传达其范围。

[0027] I. 定义

本说明书所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数所指物,除非文中另有明确规定。因此,例如提及“药物”时包括单一药物以及两种或更多种相同或不同药物,提及“赋形剂”时包括单一赋形剂以及两种或更多种相同或不同赋形剂,等等。

[0028] 浓度、量、pH 值等通常以范围形式呈现。范围形式的描述只出于方便和简明,不应解释为对本发明范围的不可变更的限制。因此,范围的描述应视为已明确公开所有可能的亚范围以及该范围内的各个数值。例如,对例如 3.8-4.4 的 pH 范围的描述应视为具有明确公开的亚范围例如 3.8-4.4、3.8-4.2、3.8-4.0、4.0-4.4、4.2-4.4、3.9-4.2、4.0-4.2 等,以及该范围内的各个数值,例如 3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3 和 4.4。不论范围广度如何在本公开内容的所有上下文中,该解释均适用。

[0029] “治疗有效量”是指可用于预防、治疗视觉障碍或视力减退或眼疾病或减慢视觉障

碍或视力减退或眼疾病的进展的药学活性物质、作用剂或药物的量。

[0030] 在本文中提及的“药物”或“作用剂”或通过名称提及的任何具体组合物或化合物，例如胍屈嗪，包括药理活性化合物及其制药可接受的盐、前药例如酯或醚、或前药的盐、或溶剂化物例如乙醇化物、或药理活性化合物的其它衍生物。本文提及的“药物或其盐”或“作用剂或其盐”或通过名称例如胍屈嗪与“或其盐”联用提及的任何具体化合物或组合物，意指该药物的药理活性剂和任何制药可接受的盐。所述药理活性药物的盐可由无机或有机酸和碱衍生。无机酸的实例包括但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸和磷酸。碱的实例包括但不限于碱金属（例如钠）氢氧化物、碱土金属（例如镁）氢氧化物、氨和式 $N-W_4^+$ （其中W为 $C_{1-4}$ 烷基）的化合物。有机盐的实例包括：乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、十一烷酸盐、双羧基酸盐（palmoate）、环戊烷丙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、乳酸盐、马来酸盐、富马酸盐、樟脑酸盐、烟酸盐、果胶酸盐（pectinate）、苦味酸盐、新戊酸盐、甲苯磺酸盐、葡萄糖酸盐、二葡萄糖酸盐、半硫酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、2-羟基乙磺酸盐、十二烷基硫酸盐、樟脑磺酸盐、苯磺酸盐、2-萘磺酸盐、硫氰酸盐、磷酸盐、甘油磷酸盐和苯丙酸盐。其它盐列于 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1995), 第83章（以下称为 REMINGTON）。

[0031] 本文所用的“眼疾病”意指引起视力丧失、模糊或中心近视（central close-up）视力和远视视力减弱、盲点、显现不同颜色或形状的物体、血管性眼疾病的神经眼科表现的所有各种疾病、损伤或缺陷，其包括缺血性视神经病变、前部缺血性视神经病变、视网膜动脉闭塞、无症状视网膜栓子、无症状视网膜栓子或视网膜组织缺血、视网膜水肿、一过性黑矇、视野缩小、眼血管闭塞、微动脉内血流滞留、白内障、青光眼、眼球突出、眼睑退缩、限制性肌病、复视（复视觉）、压迫性视神经病变和/或暴露性角膜病变。在一个实施方案中，眼疾病是黄斑变性或糖尿病性眼病。在另外的实施方案中，眼疾病是年龄相关性黄斑变性。在更另外的实施方案中，眼疾病是干性或非新血管性年龄相关性黄斑变性。在另一个实施方案中，眼疾病是糖尿病性黄斑水肿。应了解，“眼疾病”可包括一种或更多种眼疾病。即，本发明制剂可治疗、预防眼疾病和/或减慢/中止一种或更多种眼疾病的进展。本发明不意图限于治疗导致视力缺陷或受损的任何具体的基础性疾病。

[0032] 本文所用的“黄斑变性”意指引起部分黄斑恶化的任何病况。这种变性可以是部分的或完全的，且不意图限于该疾病的晚期。例如，关于年龄相关性黄斑变性，“黄斑变性”意图包括即使受试者没有视觉减退的任何症状但诊断有玻璃疣的受试者。在非限制性的实施方案中，黄斑变性可指年龄相关性黄斑变性。

[0033] 如本文中所使用，化合物“起减少脉络膜新血管形成的功能”意指在例如通过激光或因眼疾病所致眼玻璃膜的物理破坏后，在给予化合物一段时间之后，通过本领域已知方法（例如通过荧光素血管造影术）测量，脉络膜新血管形成在统计上显著减少。本文描述了用于鉴定起减少脉络膜新血管形成的功能的化合物的方法的详述。

[0034] “异构体”意指由相同比例的相同元素组成但在原子的三维排列上不同的两种或更多种物质的任一种，包括对映（即镜像）和非对映异构体。

[0035] 本文所用的术语“盐”是指在保持所需功能（例如生物活性）的同时与本文所包含的鉴定出的化合物形成复合物的任何盐。这类盐的实例包括但不限于与无机酸（例如盐

酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等)形成的酸加成盐和与例如但不限于以下有机酸形成的盐:乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸、富马酸、马来酸、抗坏血酸、苯甲酸、单宁酸、双羟萘酸、藻酸、多聚谷氨酸、萘磺酸、萘二磺酸和聚半乳糖醛酸。盐化合物还可作为本领域技术人员已知的制药可接受的季盐给予,所述季盐具体包括式  $-NR, R', R''^+Z^-$  的季铵盐,其中  $R, R', R''$  独立地为氢、烷基或苄基,  $Z$  为反电荷离子,其包括但不限于氯离子、溴离子、碘离子、醇根(alkoxide)、甲苯磺酸根、甲基磺酸根、磺酸根、磷酸根或羧酸根(例如苯甲酸根、琥珀酸根、乙酸根、羟乙酸根、马来酸根、苹果酸根、富马酸根、柠檬酸根、酒石酸根、抗坏血酸根、肉桂酸根(cinnamate)、扁桃酸根和二苯基乙酸根)。

[0036] “不良药物反应”意指在用于预防、诊断或治疗的剂量的情况中出现的有害和/或非意图的对药物的任何反应,其包括副作用、毒性、超敏反应、药物相互作用、并发症或其它特异反应性。副作用通常是因其对非意图器官系统的药理作用所产生的由药物的治疗血清水平产生的不良症状(例如因抗胆碱能的抗组胺所致视力模糊)。毒副作用是由过量或长期化学暴露于药物中产生的不良症状或其它作用(例如洋地黄毒性和肝脏毒性)。超敏反应是免疫介导的不良反应(例如过敏反应、变态反应)。药物相互作用是产生于与其它药物、食物或疾病状态相互作用的作用,通常为不良作用(例如华法林和红霉素、西沙必利和葡萄柚、洛哌丁胺和艰难梭菌结肠炎)。并发症是由药物引起的疾病(例如NSAID诱导的胃溃疡、雌激素诱导的血栓形成)。不良药物反应可能由已知或未知机制介导(例如与氯霉素或氯氮平有关的粒细胞缺乏症)。可通过受试者观察、本领域已知测定法或动物模型测定这类不良药物反应。

[0037] 术语“衍生物”当涉及化合物使用时是指在应用(例如给予受试者)时,能够直接或间接提供所述化合物所公开具有的功能(尽管衍生物可具有升高或降低的功能)的类似结构。例如,用一个原子取代化合物中的另一原子提供类似结构的化合物,例如,碳原子取代氮原子。类似结构的化合物可能能够具有例如减少脉络膜新血管形成的类似功能。某些要求保护的实施方案意图包括化学结构上较小的变化,只要衍生物可治疗、预防眼疾病、终止或减慢眼疾病的进展。

[0038] 术语“管理”当与疾病或病况联用时意指向给予预防剂或治疗剂的受试者提供有益作用,所述预防剂或治疗剂不导致疾病治愈。在某些实施方案中,给予受试者一种或更多种预防剂或治疗剂以管理疾病,以便防止疾病的进展或恶化。

[0039] 本文所用的术语“预防”包括预防疾病的复发、扩散或发作。不意图本发明限定为完全预防。在一些实施方案中,发作延迟,或疾病的严重程度降低。

[0040] “受试者”意指任何动物,优选人类患者、家畜或家养宠物。

[0041] 本文所用的术语“治疗”不限于其中受试者(例如患者)被治愈和疾病被根治的情况。相反地,本发明还考虑仅仅减轻症状、改善视力(到某种程度)、延缓和/或终止疾病进展的治疗。

[0042] 本文所用的术语“制药可接受的”意指经联邦或州政府的管理机构批准或列于美国药典或其它公认药典中用于动物,更特别用于人。

[0043] II. 制药眼用制剂

在第一个方面中,提供眼用组合物或制剂。药物制剂包含如现将描述的在总体上提供有利组合物的降血压剂和特定的其它组分,所述降血压剂包括但不限于胍屈嗪或其盐、取

代的衍生物或未取代的衍生物。

[0044] 在为支持要求保护的组合物和方法而进行的研究中,包含肼屈嗪的眼用制剂按实施例 1 所述制备。在一个实施方案中,制剂包含肼屈嗪和提供改进的稳定性和 / 或生物利用度的选定赋形剂。

#### [0045] 肼屈嗪

肼屈嗪是一种先前用作降血压剂的苯并吡嗪衍生物。已充分研究了肼屈嗪在动物和人中的生物化学、生理学、代谢和排泄 (Velliquette 等人, 2003, J Pharmacol Exp Ther, 307(3):1104-1111; Carmody 等人, 2007, Cardiol Rev, 15(1):46-53; Adorisio 等人, 2006, Heart Fail Rev, 11(2):109-123; Artman 等人, 1984, Circulation, 69(5):949-954; Cameron 等人, 1984, 289(6442):410-412; 以及 Perry 等人, 1973, Am J Med, 54(1):58-72)。肼屈嗪是一种引起微动脉肌舒张的直接起效的抗高血压药物,其通过尚未完全了解的机制发挥外周血管扩张作用 (Freemantle 等人, 2008, Coch Dat Sys Rev, 2008(2):1-5; Brunton 等人编辑, 2008, Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics, 第 11 版, New York; Apresoline® 药品说明书, Ciba-Geigy, 1995)。提出了肼屈嗪改变钙代谢,从而干扰血管平滑肌内的钙运动,引起收缩状态的开始或延长。外周血管扩张作用导致几种心脏作用:动脉血压降低(舒张期超过收缩期);外周血管阻力减少;和心率、每搏量和心排血量增加。肼屈嗪通常可能响应于反射交感神经冲动发放而增加血浆中的肾素活性。还发现该药物保持或增加肾和脑血流量。在眼中血管扩张药(作为一个类别)的一些预期的潜在作用包括微动脉扩张,预期这可改善脉络膜和视网膜中的循环、对动脉或微动脉壁痉挛(由于眼中的损害或其它挛缩所致)的舒张及对硬化症的回避 (Laws, 1964, Can Med Assoc J, 91:325-330)。

[0046] 肼屈嗪通过胃肠道充分吸收,在快速乙酰化个体中全身生物利用度为 16%,在慢速乙酰化个体中为 35% (Brunton 2008; Hydralazine hydrochloride USP package insert (盐酸肼屈嗪 USP 药品说明书), Par Pharmaceuticals, 2005)。肼屈嗪在肠和 / 或肝中被 N-乙酰化。肼屈嗪的血浆半寿期为 3-7 小时,但是其降血压作用可持续长达 12 小时 (Par 2005)。肼屈嗪与  $\alpha$ -酮酸快速结合形成腓,主要代谢物为肼屈嗪丙酮酸腓。因为呈乙酰化形式的肼屈嗪是无活性的,因此快速乙酰化个体通常需要比慢速乙酰化个体大的剂量,然而约一半的美国人口为快速乙酰化个体;乙酰化速率在生物利用度中是个要素,但在药物的全身清除中不是,这是因其高的肝清除速率所致(全身清除率为 50 mL/kg/分钟,这超过了肝的血流量)。口服给予的肼屈嗪的血浆峰浓度和最大降血压作用发生在给予的 30-120 分钟内。肌内注射肼屈嗪诱导组织提取物中的缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 蛋白,其进而调节血管内皮生长因子 (Knowles 等人, 2004, Circ Res, 95(2):162-169—表明肼屈嗪发挥促血管生成作用,并且在缺血性心脏病中可能是有益的)。已提出视网膜中血流量减少和局灶性缺血是 AMD 的进展中的重要因素 (Grunwald 1998, Metelitsina 2006, Spraul 等人, 1998, Invest Ophthalmol Vis Sci, 39(11):2201-2202; Pournaras 等人, 2006, Invest Ophthalmol Vis Sci, 47(4):1581-1586; Feigl 等人, 2007a, Clin Exp Optom, 90(4):263-271; Feigl 等人, 2007b, Eye, 21(6):689-696)。

[0047] 在一个实施方案中,用于制剂中的肼屈嗪是肼屈嗪盐例如盐酸肼屈嗪。盐酸肼屈嗪是一种白色至灰白色的无气味的晶体粉末,其具有 196.64 的分子量和式  $C_8H_8N_4 \cdot HCl$ 。盐

酸胍屈嗪 USP 1:25 溶于水, 1:500 溶于酒精。水中 2% 溶液的 pH 为约 3.5-4.2, 在约 3.5-4.5 的 pH 下显得非常稳定。pH 特性表明盐酸胍屈嗪在 3.5 的 pH 附近极其稳定, 其中该药物呈阳离子形式。当呈阳离子形式时, 在 25°C、pH 3.5 下的速率常数为 1.5 年, 损失小于 10% (通过外推得知)。

[0048] 优选胍屈嗪制剂是包含胍屈嗪或其盐、取代或未取代的衍生物的眼部或眼用溶液或制剂。在一个具体实施方案中, 制剂包含盐酸胍屈嗪。在另一个实施方案中, 制剂包含胍屈嗪的乙酸盐。在实施方案中, 眼用溶液是水性溶液。

#### [0049] 赋形剂

制剂中所包括的示例性赋形剂包括吸收促进剂、增稠剂和稳定增强剂、缓冲剂、防腐剂、螯合剂、润滑剂、等渗剂、调节 pH 的酸和碱和 / 或稀释剂。

[0050] 合适的缓冲剂是本领域已知的, 包括而不限于乙酸盐、抗坏血酸盐、三羟甲基氨基甲烷、乙酸钠三水合物、乙酸、柠檬酸盐缓冲剂、硼酸盐、碳酸盐、乙酸盐和 / 或磷酸盐。在实施方案中, 使用一种或更多种缓冲剂。在一个非限制性实施方案中, 将用以保持溶液或软膏剂处于生理上可耐受的范围内的适量缓冲剂包含于溶液或软膏剂中。在非限制性的实施方案中, 将适于保持约 3.8-7.5 或 3.8-4.4 的 pH 的量的缓冲剂加入溶液或软膏剂中。眼用溶液的 pH 范围一般为约 3.0-7.7, 大部分眼用溶液的 pH 为约 5-7。在实施方案中, 本发明制剂的 pH 介于约 3.0-7.7 或约 5-7 之间。在其它实施方案中, 眼用溶液的 pH 为约 3.5-4.5、3.5-4.2、3.5-4.0、3.8-4.4 或 4.0-4.5。应了解, 所用缓冲剂将取决于要维持的 pH。在其它实施方案中, 可将 pH 调节剂用来调节制剂的 pH。应了解, 可以使用本领域已知的和适于局部给予眼的任何 pH 调节剂。在非限制性的实施方案中, pH 调节剂选自氢氧化钠和 / 或盐酸。示例性缓冲剂包括乙酸钠三水合物 USP 和乙酸 USP (2N)。另外的示例性缓冲剂为包含乙酸钠三水合物 USP 和乙酸 USP 的乙酸盐缓冲溶液 USP。

[0051] 考虑任何合适的螯合剂, 包括而不限于依地酸二钠二水合物 (edetate disodium dehydrate)。合适的润滑剂包括但不限于丙二醇、聚乙二醇、聚乙烯醇和甘油。示例性螯合剂为依地酸二钠二水合物 USP。示例性润滑剂为丙二醇 USP。

[0052] 等渗剂一般是生理上耐受的并赋予制剂合适的张度以防止水跨越与制剂接触的细胞膜的净扩散的作用剂或化合物。合适的等渗剂包括但不限于盐 (包括氯化钠) 和糖 (例如右旋糖和乳糖)。眼的重量摩尔渗透压浓度为约 290 mOsmol/kg。眼用溶液的重量摩尔渗透压浓度范围一般介于约 250-350 mOsmol/kg, 其大部分落入约 290-300 mOsmol/kg 之间。在实施方案中, 本发明制剂的重量摩尔渗透压浓度应处于或接近眼的重量摩尔渗透压浓度。在具体的非限制性实施方案中, 本发明制剂的重量摩尔渗透压浓度一般介于约 250-350 mOsmol/kg 之间或介于约 290-300 mOsmol/kg 之间。在一个具体实施方案中, 本发明制剂的重量摩尔渗透压浓度为约 300 mOsmol/kg。示例性等渗剂是氯化钠 USP。

[0053] 在一个实施方案中, 制剂的 pH 介于约 3.5 和 4.5 之间。在一个优选的实施方案中, 制剂的 pH 介于约 3.8 和 4.4 之间。在另一个实施方案中, 制剂的 pH 介于约 4.0 和 4.4 之间。

[0054] 合适的防腐剂是本领域已知的, 包括但不限于苯扎氯铵、羟苯甲酸甲酯 (methylparaben)、三氯叔丁醇、硫柳汞 (thimerol)、对羟基苯甲酸丙酯和聚季铵盐 -1 (polyquaternium-1)。按照 FDA Advisory Review Panel on OTC Ophthalmic Drug

Products（日期为1979年12月的最终报告），用于眼用制剂的苯扎氯铵 USP 的最大浓度为0.013%，羟苯甲酸甲酯 NF 的最大浓度为0.1-0.2%。苯扎氯铵 USP 抗细菌最有活性，但被认为抗假单胞菌和霉菌较弱。羟苯甲酸甲酯 NF 抗真菌和革兰氏阳性细菌最有活性，但被认为抗革兰氏阴性细菌较弱。示例性防腐剂包括苯扎氯铵 NF 和 / 或羟苯甲酸甲酯 NF。

[0055] 合适的稀释剂是本领域已知的，包括但不限于纯净水 USP 和注射用水。示例性稀释剂包括水，尤其是注射用水 USP 和盐水。

[0056] 合适的粘度增强剂是本领域已知的，包括但不限于聚乙烯醇、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。

[0057] 表1提供了示例性胍屈嗪制剂，实施例1中给出了制备制剂的示例性方法。

[0058] 表1：胍屈嗪制剂

| 成分              | 功能  | 量                        |
|-----------------|-----|--------------------------|
| 盐酸胍屈嗪 USP       | 活性剂 | 1.0% w/w                 |
| 乙酸钠三水合物 USP     | 缓冲剂 | 10% w/w <sup>1</sup>     |
| 乙酸 USP (2N)     | 缓冲剂 |                          |
| 依地酸二钠二水合物, USP  | 螯合剂 | 0.015% w/w <sup>1</sup>  |
| 丙二醇, USP        | 润滑剂 | 1.00% w/w <sup>1</sup>   |
| 氯化钠, USP        | 等渗剂 | 0.50% w/w <sup>1</sup>   |
| 苯扎氯铵 50% 溶液, NF | 防腐剂 | 0.02% w/w <sup>1</sup>   |
| 羟苯甲酸甲酯, NF      | 防腐剂 | 0.03% w/w <sup>1</sup>   |
| 水               | 稀释剂 | 88.435% w/w <sup>1</sup> |

<sup>1</sup>%w/w 不包括胍屈嗪

更概括地讲，制剂包括活性治疗剂胍屈嗪和载体。术语“载体”是指活性化合物与之一起给予的稀释剂、辅助剂、赋形剂或溶媒。这类制药载体可为液体，例如水和油，包括石油、动物、植物或合成来源的油，例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。制药载体可以是水、包括磷酸缓冲盐水的盐水、水性溶剂、聚亚烷基二醇、基于石油的胶冻、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、金合欢树胶、明胶、淀粉浆、滑石、角蛋白、胶态硅石、脲等。水可以是当静脉内给予活性化合物时的溶媒。盐水溶液和右旋糖水溶液和甘油水溶液也可用作液体载体。合适的制药载体还包括赋形剂，例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。另外合适的载体包括但不限于甘氨酸和透明质酸。如有需要，本发明的组合物还可含有润湿剂或乳化剂和 / 或 pH 缓冲剂。另外，可以使用辅助剂、稳定剂、增稠剂、乳化剂、润滑剂和 / 或着色剂。

[0059] 当给予受试者时，制药可接受的溶媒优选是无菌的。合适的灭菌方法是本领域已知的，包括但不限于热灭菌、化学灭菌和 / 或经过滤灭菌。在另一个实施方案中，一种或更多种成分可单独灭菌，且制剂在无菌条件下制备。

[0060] 本发明的组合物可呈溶液、混悬剂、乳剂、缓释制剂的形式或适于使用的任何其它形式。在一个实施方案中，制药可接受的溶媒是眼用溶液、混悬剂、乳剂、药膏剂或软膏剂。

[0061] 给予的组合物可任选包括适于给予眼以减轻给予部位疼痛的局部麻醉药。所述成分一般单独供应或在单位剂型中混合在一起。

[0062] III. 制备制剂的方法

在一个方面中，制剂可通过逐步添加各成分来制备。在实施方案中，所述方法包括首先在搅拌下将适量的缓冲溶液加入适量的纯净水中。优选将纯净水装入大小合适的容器中以

容纳最终制剂的体积。任何合适的混合方法都是可接受的。优选的方法是例如通过本领域技术人员熟知的搅拌盘 (stir plate) 和旋转棒 (spin bar) 提供的连续混合。缓冲溶液可单独制备或可以市售购买。在一个非限制性实施方案中,缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。在一个非限制性实施方案中,乙酸盐缓冲溶液包含乙酸钠、乙酸和纯净水。这样的缓冲溶液可购买或制备。可选择有合适 pH 的缓冲液。在一个示例性实施方案中,乙酸盐缓冲溶液的 pH 为约 4.2-4.6。在具体的实施方案中,缓冲液的 pH 为 4.2。作为非限制性实例,乙酸盐缓冲溶液可通过将 1.75 g 乙酸钠和 18.6 ml 乙酸 2N 加入 1L 量瓶中,用适量纯净水补充至 1000 mL 来制备。此示例性缓冲溶液的 pH 应为约 4.2。应了解,当缓冲溶液是制备的而非购买的时,会需要制备缓冲溶液的在前步骤。

[0063] 第二,在搅拌的同时将适量的一种或更多种螯合剂(例如依地酸二钠二水合物)加入缓冲溶液中,将所得溶液(A)混合直到螯合剂完全或几乎溶解。第三,在搅拌的同时将一种或更多种润滑剂加入 A 溶液中。将所得溶液(B)混合直到润滑剂完全或几乎溶解。考虑适用于眼用制剂的任何润滑剂。在一个非限制性实施方案中,润滑剂是丙二醇。第四,在搅拌的同时将一种或更多种等渗剂加入 B 溶液中。将所得(C)溶液混合直到等渗剂完全或几乎完全溶解。第五,在搅拌的同时将一种或更多种防腐剂加入 C 溶液中。将所得(D)溶液混合直到防腐剂完全或几乎完全溶解。第六,在搅拌的同时将一种或更多种治疗剂(包括但不限于盐酸胍屈嗪)加入 D 溶液中。将所得(E)溶液混合直到治疗剂完全或几乎完全溶解。应了解,其中使用一种以上类型的成分(例如两种或更多种防腐剂)的情况下,成分可一起或单独加入。其中单独加入成分的情况下,可在加入下一种成分之前将溶液彻底混合或几乎彻底混合。可测量制剂参数,并以此调制剂剂。例如,需要的情况下可测量并调节 pH。

[0064] 实施例 2 中详细描述了示例性制剂的制备。如实施例 2 中提供的数据所表明的,该制备方法得到意想不到的稳定制剂。如表 8-10 所见,0.5% 和 1.0% 盐酸胍屈嗪制剂在滴瓶容器(droptainer container)中在所有 3 种温度下为有利稳定的。即对于大部分制剂,在所有 3 种温度下储存 1 和 2 个月后,活性剂的 w/w% 减少远小于约 1%。对于许多制剂,在所有 3 种温度下储存 1 和 2 个月后,活性剂的 w/w% 减少远小于约 0.5%。尤其在 4°C 和 25°C 下储存时,0.5% 和 1% 制剂在 1、2 和 3 个月后非常稳定。2% 制剂也非常稳定,并且在 25°C 下储存时是最稳定的。在约 4.0-6.6 的 pH 下制剂也非常稳定(数据未显示)。在 4.0-5.5 的 pH 下,制剂在储存用玻璃小瓶中保存(1 周-1 个月)后,回收 100% 的活性剂。

#### [0065] 定量给予

有效治疗或预防年龄相关性黄斑变性的活性化合物的量可通过标准研究技术确定。例如,可有效治疗或预防年龄相关性黄斑变性的活性化合物的剂量可通过将活性化合物给予模型(例如本领域技术人员已知的动物模型或诸如计算机模型等其它模型)中的动物来确定。另外,可任选应用体外测定法辅助鉴定最佳剂量范围。

[0066] 具体的有效剂量的选择可由技术人员在考虑对本领域技术人员已知的若干因素的基础上确定(例如通过临床试验确定)。这些因素包括待治疗或预防的疾病、所涉及的症状、受试者的体重、受试者的免疫状态和技术人员已知的其它因素。

[0067] 待给予受试者(例如人)的活性化合物的剂量是可变的,可进行独立判断。在一日中的不同时间给予活性化合物的日剂量通常是可行的。然而,在任何指定情况下,所给予

的活性化合物的量会取决于如活性组分的溶解度、所使用的制剂、受试者状况（例如体重）和 / 或给予途径等这类因素。

[0068] 活性化合物单独或与另一种预防剂或治疗剂的组合的有效量的大致范围为约 0.001 mg/ 天 - 约 1000 mg/ 天, 更优选约 0.001 mg/ 天 - 750 mg/ 天, 更优选约 0.001 mg/ 天 - 500 mg/ 天, 更优选约 0.001 mg/ 天 - 250 mg/ 天, 更优选约 0.001 mg/ 天 - 100 mg/ 天, 更优选约 0.001 mg/ 天 - 75 mg/ 天, 更优选约 0.001 mg/ 天 - 50 mg/ 天, 更优选约 0.001 mg/ 天 - 25 mg/ 天, 更优选约 0.001 mg/ 天 - 10 mg/ 天, 更优选约 0.001 mg/ 天 - 1 mg/ 天。当然, 将化合物的日剂量在一日中的不同时间分批给予通常是可行的。然而, 在任何指定情况下, 所给予化合物的量将取决于活性组分的溶解度、所使用的制剂、受试者状况（例如体重）和 / 或给予途径等这类因素。

#### [0069] IV. 治疗方法

在一方面中, 制剂可用于治疗眼疾病。在一些非限制性实施方案中, 制剂可用于治疗、预防黄斑变性、中止和 / 或减慢黄斑变性的进展。在其它非限制性实施方案中, 制剂可用于治疗糖尿病性黄斑水肿。

##### [0070] A. 黄斑变性

黄斑变性是由视网膜的中心部分（称为黄斑）—负责中央视觉聚焦于眼中的区域—退化引起的。黄斑变性意指影响 50 岁以下个体的黄斑营养不良以及年龄相关性黄斑变性 (AMD 或 ARMD) 两者。

[0071] 年龄相关性黄斑变性是 50 岁以上成人视力丧失的主要原因和全球失明的第三位主要综合原因 (National Eye Institute)。AMD 可表征为干性（萎缩性、非新血管性、非渗出性）或湿性（新血管性、渗出性）形式。

[0072] 虽然造成 AMD 的发生和进展的细胞变化和分子变化之间的关系尚未被清楚了解, 但该临床进程却被较好地阐明。AMD 始于对黄斑下的支持性视网膜色素上皮 (RPE) 和玻璃膜的非渗出性（干性）衰老改变。非渗出性 AMD 可发展到更严重的萎缩性 AMD（亦称为地图样萎缩 (geographic atrophy)），并且还形成特征为自黄斑下面生长的病理性脉络膜新血管膜的渗出性（湿性）形式。严重视力丧失通常与发生渗出性形式的全部 AMD 患者的 10-15% 有关；然而, 高达 20% 的由 AMD 引起的法定盲是因晚期萎缩性非渗出性形式所致。

[0073] 干性形式是非新血管性的, 占 AMD 病例的约 90%, 以多个小的圆形的黄 - 白色的称为玻璃疣的斑点鉴别。这些斑点通常位于眼后外视网膜的层面上。有这些斑点的受试者可能有良好的视力, 并且无症状。玻璃疣可在视网膜和脉络膜之间蓄积, 这可能引起视网膜脱落。非渗出性 AMD 具有 3 个临床分期：早期、中期和晚期。除 RPE 中的异常程度以外, 这些分期的临床特征还在于在黄斑下方黄色玻璃疣沉积物的程度和大小。在早期非渗出性 AMD 的情况下, 玻璃疣在大小上为小到中等, 存在极少至无的色素异常。到非渗出性 AMD 已经发展成地图样萎缩时, 临床结果已经过了广泛性黄斑玻璃疣的病期, 并显示 RPE 局部性消失。如果位于中心黄斑（即小凹）以下, 则 RPE 的地图样萎缩导致上覆的感光器和功能性视力丧失。

[0074] 在新血管性湿性形式中, 新产生的异常血管在视网膜的中心以下生长。这些血管渗漏, 出血, 并使视网膜留下瘢痕, 扭曲视觉或破坏中央视觉。视觉扭曲可始于一只眼中, 并且随后可影响另一只眼。湿性形式占 AMD 病例的 10%, 但占由 AMD 引起的视力丧失的 90%。

估计每年 10% 的干性 AMD 病例发展成湿性 AMD。

[0075] 若干因素可能是造成 AMD 的发生和进展的原因。心脏病和 AMD 共有作为风险因素的高血压和临床症状不显的动脉粥样硬化的观察结果,导致 AMD 发病机制的血液动力学模型(亦称为血管模型)的形成。以类似于全身性血管疾病的方式,这个模型声称 AMD 是一种形式的血管疾病,其中硬化沉积物、眼组织顺应性降低和通过脉络膜血管系统的血流量减少导致疾病发展。具体地说,该模型声称,黄斑内脂质的进行性浸润和沉积降低眼组织的顺应性,并使黄斑脉络膜毛细血管层狭窄。这种脉络膜毛细血管层狭窄使与年龄有关的平常狭窄恶化,并以升高的流体静压进一步减少血流量。这进而减少脂蛋白和由 RPE 分泌的其它物质的清除。结果是临床上清晰的玻璃疣和色素改变以及玻璃膜钙化和破碎,这导致了脉络膜新血管形成。

[0076] 越来越多的证据表明,炎症也在 AMD 中起作用。补体成分是 AMD 中最了解的炎症介质。已在玻璃疣中检测出补体 C5 和由补体成分 5b-9 组成的膜攻击复合体。同样,各种研究已经证明位于玻璃疣、RPE 细胞和 / 或玻璃膜的免疫复合物、补体和 / 或补体调节蛋白的存在。另外,多项遗传研究支持补体在 AMD 中的作用。另外,认为组织破坏性巨噬细胞使 AMD 恶化。因此,治疗上提高脉络膜血流量,降低氧化应激和 / 或控制慢性炎症中的一种或更多种可显著地治疗 AMD 和 / 或减慢 AMD 的进展。

[0077] 黄斑变性的一种症状是中央视觉改变。患者在阅读时可注意到模糊的中央视觉或页面上的空白点。患者可注意到视觉扭曲例如直线的弯曲。影像可显得较小。一些患者注意到色彩感知改变,而一些感受到光感觉异常。这些症状可能突然出现,并逐步变得更烦扰。

[0078] 本文所用的黄斑变性诊断可能需要对受试者的黄斑变化或功能的任何分析。不意图限于任何具体方法。例如眼检查者如医生,可用滴眼剂散瞳,并检查眼内,针对眼病变、玻璃疣的黄色隆起的存在或针对黄斑的总体变化例如变薄,查看视网膜。眼检查者还可给予视野测试,寻找中央视觉中的空白斑点。检查者可要求荧光素血管造影术(静脉内注射荧光染料接着视觉检测和眼后照相术)以确定视网膜中的血管是否渗漏。

[0079] 引起患有黄斑变性的一些风险因素包括年龄、吸烟和富含饱和脂肪的饮食。其它可因基因遗传或环境暴露而有黄斑变性的风险。

[0080] 在实施方案中,本文所述方法涉及对年龄相关性黄斑变性的治疗或预防,优选预防性预防和治疗。在其它实施方案中,本文所述方法涉及用本文所述制剂预防年龄相关性黄斑变性或减慢年龄相关性黄斑变性的进展。在一个实施方案中,考虑用本文所述制剂防止或减慢诊断有非渗出性或渗出性 AMD 的患者的 CNV 的方法。

[0081] 在一个实施方案中,将 1% (w/w) 胍屈嗪眼用溶液滴注在一只或更多只受累眼中至少每日一次,而在其它实施方案中,介于每日 1-5 次之间。在其它实施方案中,将 0.5%-4% w/w 胍屈嗪眼用溶液滴注在一只或更多只受累眼中至少每日一次,而在其它实施方案中,每日 1-5 次。在又另外的实施方案中,将 0.5%-2% w/w 胍屈嗪眼用溶液滴注在一只或更多只受累眼中至少每日一次,而在其它实施方案中,每日 1-5 次。在一个具体实施方案中,将 1% w/w 胍屈嗪眼用溶液滴注在一只或更多只受累眼中至少每日一次,而在其它实施方案中,每日 1-3 次。

[0082] 如从实施例 3 中所示的安全数据所见,按照本文所述方法制备的盐酸胍屈嗪眼用

溶液,在人中是安全的且一般耐受性良好,具有低发生率的治疗突发性不良事件(AE)(所述不良事件在两个受试者人群中相对均匀分布且严重程度一般为轻度的)。在研究期间没有严重不良事件(SAE)、无死亡、无其它临床上重大的安全结果。眼充血是最常报告的治疗相关性眼AE(在该研究中由大多数受试者报告)。眼充血的发生率与胥屈嗪的外周血管扩张作用一致,并非意料之外。因此,重复剂量的局部盐酸胥屈嗪制剂在人中是安全的,并且耐受性良好(Ralston等人,2010,ARVO Abstracts,摘要号913/A196)。

[0083] 实施例4和5使用按照本文所述方法制备的本文所述制剂,阐明了单剂量和重复剂量研究。在实施例5中,使用兔模型的28天GLP依从性重复剂量眼研究显示,在最初给药时发生的眼刺激在重复给药期间变得耐受性良好。对任何显著剂量相关性毒性的缺乏进一步表明,在这个特别敏感的动物模型中,对于用至少高达2.0% w/w的盐酸胥屈嗪的浓度的安全性的合理潜力。

[0084] 已提出脉络膜血流量减少和局灶性缺血可能是导致早期AMD的事件进展的病因因素(Feigl等人,2007b)。此外,已提出脉络膜和视网膜中缺氧的长期作用是造成从早期到晚期AMD发展所特有的内皮生长因子上调和脉络膜新血管生长发生的原因(Feigl等人,2007b)。如实施例6中所示,用胥屈嗪1.0%滴眼剂滴注在兔眼模型中显著改善脉络膜血流量。如图1所见,滴注1%胥屈嗪制剂后30分钟脉络膜血流量并不仅仅自起始点保持,并且实际上还改善了。相比之下,用对照滴注导致脉络膜血流量减少(达约40%,见图1)。在30分钟后,用1%胥屈嗪制剂治疗导致脉络膜血流量比对照高至少约75%,或是对照的至少约3-4倍。相比之下,用对照治疗导致脉络膜血流量减少达约40%。同样如图1所见,在用胥屈嗪制剂滴注后60分钟,脉络膜血流量比对照高至少约65%,或是对照的至少约2-3倍。在120分钟后,用1%胥屈嗪制剂治疗导致比对照高至少约50%,或是对照的至少约2倍的脉络膜血流量。相比之下,用对照治疗导致脉络膜血流量减少达约30%。与对照相比,脉络膜血流量的增加保持至少2小时。在激光诱导的CNV模型中,滴注胥屈嗪滴眼剂(在所有浓度下)4周显著减小CNV形成的面积,参见实施例7。胥屈嗪制剂(0%、0.5%、1%和2% w/w)对CNV形成的作用展示于图2和3(分别通过荧光素或通过脉络膜平铺片测量)。如图2所见,每一种胥屈嗪制剂减少CNV面积(所述CNV面积通过荧光素测量)。0.5%制剂减少CNV面积约33%。1%制剂减少CNV面积约30%,而2%制剂减少CNV面积约26%。如图3所见,每一种胥屈嗪制剂减少CNV面积(所述CNV面积通过脉络膜平铺片测量)。0.5%制剂减少CNV面积约20-25%。1%制剂减少CNV面积约25%,而2%制剂减少CNV面积约30-35%。此外,如实施例8所述,胥屈嗪体外防止由HUVEC产生的血管形成,这可视为抗新血管形成活性的迹象。这些数据表明,胥屈嗪可能具有多种作用机制,并可通过改善脉络膜血流量和防止新血管形成来降低CNV形成的程度。

[0085] 碘酸钠对RPE细胞的选择性毒性已知多年(Noell,1953,Am J Ophthalmol, 36(6:2):103-116)。对RPE的损害和RPE的功能障碍被认为是AMD进展的早期事件之一。因此,在视网膜的RPE层中选择性地产生化学诱导的损害的这种方法已被用来研究AMD的潜在疗法(Li等人,2006,Invest Ophthalmol Vis Sci, 47(4):1646-1652;Obata等人,2005, Eye, 19(4):464-468)。如实施例9和10所示,体外高浓度的 $\text{NaIO}_3$ 对人RPE细胞是有毒的。与文献报道一致, $\text{NaIO}_3$ 的单次静脉内注射以时间和剂量依赖性方式对大鼠视网膜造成明显损害。高剂量的 $\text{NaIO}_3$ 引起经组织病理学证实的整个视网膜的损害并抑制源

于感光器细胞(a波)、神经视网膜(b波)和RPE细胞(c波)的电生理学信号。通过调节NaIO<sub>3</sub>的注射剂量,在大鼠中鉴定出其中损害显得局限于RPE细胞的条件。ERG c波信号被抑制,但a波和b波信号保持在正常水平。NaIO<sub>3</sub>诱导的c波信号的选择性抑制持续超过4周。因此,这些参数可用作非渗出性AMD的大鼠模型。

[0086] 在该模型中使用这些经优化的条件(35 mg/kg NaIO<sub>3</sub>和注射后4周),已经证实实验的4周持续时间内每日3次滴注胍屈嗪1.0%眼用溶液显著降低通过注射NaIO<sub>3</sub>产生的ERG c波信号中所观察到的电生理学缺陷(实施例10)。如图4所见,与对照相比,滴注NaIO<sub>3</sub>导致ERG c波降低70%。滴注1%胍屈嗪制剂仅导致ERG c波信号降低约50%。因此,与仅NaIO<sub>3</sub>注射相比,滴注1%胍屈嗪制剂保持约20%的ERG c波信号。实施例10中所述数据还证实,局部滴注将足够的胍屈嗪递送到视网膜中以发挥保护作用。胍屈嗪保护RPE免受NaIO<sub>3</sub>诱导的损害的机制可能与药物提高脉络膜血流量的能力或其抗氧化性质有关。通过增加流向视网膜的血液和氧气,胍屈嗪可能延迟非渗出性年龄相关性黄斑变性的发生,并可用作早期(干性)AMD的治疗。在实施方案中,本文所述制剂可用于在诊断有非渗出性或渗出性AMD的患者中增加脉络膜血流量的方法。

[0087] 如实施例9和10所述大鼠中NaIO<sub>3</sub>诱导的干性AMD模型的结果表明,盐酸胍屈嗪制剂有能力保护视网膜色素上皮(RPE)细胞免受暴露于NaIO<sub>3</sub>诱导的损害,因此保护并可能恢复干性AMD患者的视觉功能。

[0088] 已提出,RPE细胞的丢失是AMD早期阶段的主要表现(Cai等人, Prog Retin Eye Res, 2000, 19(2):205-221)。氧化应激可能在RPE细胞的丢失和AMD的发病机制中起作用(Beatty等人, 2000, Surv Ophthalmol, 45(2):115-134;Finkel等人, 2000, Nature, 408(6809):239-247)。由已有保护机制减少或活性氧类别(ROS)的数目和浓度增加引起的氧化应激的提高被认为部分地促成AMD发病机制(Boulton等人, 1994, Br J Ophthalmol, 78(2):125-129)。胍屈嗪具有可能有益于AMD治疗的抗氧化和血管扩张性质。

[0089] 另据报道,缺氧通过氧化应激诱导机制可引起RPE细胞死亡(Cai 2000)。存在几种与缺氧和氧化损伤有关的作用(Emerit等人,1998, Handbook of Free Radical and Antioxidants in Biomedicine, Quintanilha编辑, CRC Press),其包括线粒体氧化磷酸化的解偶联和腺苷三磷酸降解为腺苷二磷酸。此外,O<sub>2</sub>压力的突然降低允许从严格控制的电子传递链释放自由基,且这些ROS与邻近的膜脂质的反应导致膜和细胞损害。为了评价胍屈嗪保护细胞抵抗缺氧诱导的损害的能力,将ARPE-19细胞在暴露于低氧控制室中的缺氧环境(1% O<sub>2</sub>)中的同时与不同浓度的胍屈嗪一起孵育24~72小时。在48小时和72小时,1 μg/mL的胍屈嗪制剂显著降低对ARPE-19细胞的缺氧诱导的损害。这个数据表明,胍屈嗪可防止缺氧诱导的细胞损害,而非意在化学模拟缺氧的化学(NaN<sub>3</sub>)诱导的细胞损害。在不受理论限制的情况下,这种差异可能是因化学试剂NaN<sub>3</sub>和在缺氧条件下从线粒体释放的ROS引起的细胞损害的不同机制所致。

[0090] 如实施例11所述,体外使用人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19细胞)以研究胍屈嗪的抗氧化性质,并评价胍屈嗪保护细胞免受ROS相关损害或缺氧相关损害的能力。

[0091] 自由基是一种具有奇数的不配对电子的分子;这种不配对电子使分子不稳定并有高反应性(Fantone等人, 1985, Hum Pathol, 16(10):973-978;Thompson等人,

1986, Prog Cardiovasc Dis, 28(6):449-462;McCord 等人, 1985, N Engl J Med, 312(3):159-163)。氧自由基、超氧阴离子 ( $O_2^-$ )、羟基自由基 ( $OH^\cdot$ ) 及其中间类型过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 被认为在缺血期间和在再灌注时在组织中产生。这些 ROS 可能通过多种途径对细胞是有细胞毒性的,所述途径包括:与脂肪酸反应,这导致膜中脂质过氧化物的形成;蛋白质中氨基酸的氧化;巯基的氧化;和多肽链切断 (Thompson 1986,McCord 1985,Kloner 等人, 1989, Circulation, 80(5):1115-1127)。

[0092] 叔丁基氢过氧化物 (t-BHP), 一种有机氢过氧化物 (Rush 等人, 1985, Toxicol Appl Pharmacol, 78(3):473-483), 可以在肝细胞中通过谷胱甘肽过氧化物酶代谢, 产生氧化型谷胱甘肽 (Alia 等人, 2006, Toxicol Appl Pharmacol, 212(2):110-118)。谷胱甘肽 (GSH) 耗尽和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化与钙稳态改变有关, 导致失去细胞存活力 (Martin 等人, 2001, Biochem Pharmacol, 62(6):705-712)。或者, t-BHP 可通过细胞色素 P450 酶和通过游离铁依赖性反应转化为其过氧基和烷氧基自由基。这些自由基随后可开始脂质过氧化作用, 与细胞分子 (例如 DNA 和蛋白质) 形成共价键, 进一步降低 GSH 水平。后面的作用, 除改变钙稳态以外, 还影响线粒体膜电位, 最终引起细胞死亡 (Van der Zee 等人, 1996, Free Radic Biol Med, 20(2):199-206;Hix 等人, 2000, Chem Res Toxicol, 13(10):1056-1064)。显然, ROS (Martin 2001;Lima 等人, 2006, Life Sci, 79(21):2056-2068)、t-BHP 基团 (Van der Zee 1996;Davies, 1989, Biochem J, 257(2):603-606) 和胞内铁离子 (Hix 2000) 涉及 t-BHP 的毒性;对这些参数的直接作用可倾向于降低损害的水平。 $H_2O_2$  可通过与胞内铁进行 Fenton 反应而形成高反应性羟基自由基 ( $OH^\cdot$ ), 其能够降解大多数有机物质 (Pesakhov 等人, 2007, Biochim Biophys Acta, 1768(3):590-597)。按照实施例 11 所示数据, 胍屈嗪能够保护细胞抵抗 t-BHP 和  $H_2O_2$  诱导的细胞毒性。

[0093] 如实施例 11 和本文所述, 将 3 种氧化应激诱导剂 ( $H_2O_2$ 、t-BHP 和  $NaN_3$ ) 用于评价胍屈嗪保护 ARPE-19 细胞抵抗 ROS 诱导的损害和抵抗缺氧诱导的损害的能力。数据表明, 胍屈嗪制剂以浓度依赖性方式抑制 t-BHP 和  $H_2O_2$  诱导的氧化应激损害, 但对由  $NaN_3$  引起的损害几乎没有或没有作用。

[0094] 胍屈嗪制剂显示, 在用 0.01 mM 和 0.03 mM 的 tBHP 攻击后, 以明显浓度依赖性方式统计显著性地抑制 tBHP 诱导的细胞损害。用 0.01 和 0.03 mM tBHP 攻击后的最大存活力保护作用都在用 100  $\mu$ g/mL 胍屈嗪的情况下观察到。

[0095] 胍屈嗪制剂显示, 在用 0.3 mM 和 1.0 mM 的  $H_2O_2$  攻击后, 以明显浓度依赖性方式统计显著性地抑制  $H_2O_2$  诱导的细胞损害。用 0.3 mM  $H_2O_2$  攻击后的最大存活力保护作用在用 30  $\mu$ g/mL 的胍屈嗪的情况下观察到。最大恢复作用在用 1  $\mu$ g/mL 胍屈嗪的情况下于 48 小时和 72 小时观察到。

[0096] 线粒体毒素可提供谷氨酸盐中毒 (由谷氨酰胺引起的中毒, 谷氨酰胺是一种在胞内部位诱导钙泛滥以杀死细胞的刺激剂 (excitatory agent)) 的替代方式以修正体内短暂性缺血期间发生的可逆性能量缺乏。叠氮化钠 ( $NaN_3$ ) 已被用来在细胞培养物 (Varming 等人, 1996, J Neurosci Res, 44(1):40-46;Grammatopoulos 等人, 2004, Neurosci Res, 50(3):299-306;Grammatopoulos 等人, 2002, Brain Res Mol Brain Res, 99(2):114-124) 以及体内实验 (Vecsei 等人, 2001, J Neural Transm, 108(3):273-278)

中诱导“化学缺血”。其确切的作用机制仍有部分未明。该作用通常归因于细胞色素 c 氧化酶呼吸链复合体 IV 抑制,并且在电子传递链阻断后,超氧化物可能是从线粒体释放的主要产物 (Duranteau 等人,1998, J Biol Chem, 273(19):11619-11624)。在未显示的其它实验中,将 ARPE-19 细胞暴露于仅  $\text{NaN}_3$  或在胍屈嗪 (以 1、3、10、30、100  $\mu\text{g/mL}$  的浓度) 存在下暴露于  $\text{NaN}_3$ 。在用  $\text{NaN}_3$  (0.1~100 mM) 攻击和用胍屈嗪处理后有活力的 ARPE 细胞的比例通过 MTT 测定法测量,在胍屈嗪处理的 ARPE-19 细胞中未观察到对  $\text{NaN}_3$  化学诱导的缺氧的显著作用。在这些实验中,胍屈嗪不会逆转  $\text{NaN}_3$  诱导的细胞毒性,这可表明胍屈嗪将不拮抗线粒体来源的 ROS。

[0097] 因此,胍屈嗪制剂在体外针对缺氧诱导的对 ARPE-19 细胞的损害提供显著的保护。在不受限于理论的情况下,该作用可是由于胍屈嗪猝灭 ROS 的自由基清除作用所致。虽然对参与氧化应激介导的对 RPE 细胞的损害的胞内信号转导的了解仍然不足,但是鉴定 RPE 细胞中参与抗氧化防御或氧化应激响应的调节的化学药品应允许未来开发针对 AMD 的治疗策略。胍屈嗪具有保护 RPE 细胞抵抗由缺氧和 ROS 引起的损害的潜力,由此治疗年龄相关性黄斑变性 (AMD) 和缺血性视网膜病。

[0098] 基于先前非临床和临床研究及超过 50 年的全身使用历史,胍屈嗪的眼和全身安全特性已充分确定,并且得到充分了解。该数据得到实施例 6 用盐酸胍屈嗪眼用溶液治疗干性 AMD 的结果的支持。

#### [0099] B. 糖尿病性黄斑水肿或糖尿病性黄斑变性

在另一个非限制性实施方案中,本文公开的制剂可用于治疗或预防糖尿病性黄斑水肿或糖尿病性黄斑变性。糖尿病性黄斑变性是因糖尿病引起的黄斑衰退。黄斑囊样变性是因黄斑区的液体充填区域 (fluid-filled areas) (囊肿) 所致的黄斑中的视力丧失。这可能是其它病症、炎症或高度近视的结果。

## 实施例

[0100] 下面的实施例在本质上是说明性的,并且决不意图是限制性的。

### [0101] 实施例 1

#### 胍屈嗪制剂

制备用作胍屈嗪眼用溶液的制剂。用旋转棒混合的同时,将 5306 g 纯净水 USP 加入 6L 长颈瓶中。在搅拌的同时,将包含乙酸钠和乙酸 (2N) 的 600 g 乙酸盐缓冲溶液 (pH 4.2) 加入 6L 长颈瓶中的纯净水中。继续混合直到达到均匀。将 0.9 g 依地酸二钠 USP 加入长颈瓶中,混合直到溶解。接下来,将 60 g 丙二醇 USP 加入长颈瓶中,混合直到溶解。接下来,将 30 g 氯化钠 USP 加入长颈瓶中,混合直到溶解。将 1.2 g 苯扎氯铵 50% 溶液 NF 加入长颈瓶中,混合直到均匀。最后,将 1.8 g 羟苯甲酸甲酯 NF 加入长颈瓶中,混合直到溶解。所得溶液的 pH 为 4.4。

[0102] 为了制备胍屈嗪制剂,然后将一定量的盐酸胍屈嗪加入溶液中,混合直到均匀。

### [0103] 实施例 2

#### 胍屈嗪制剂的储存稳定性

基本按实施例 1 所述制备 0.5%、1% 和 2% 盐酸胍屈嗪制剂以评价制剂的稳定性。下表 3 中给出了制剂的成分和百分比。

[0104] 表 3 :制剂概况

| 成分                      | CAS#                              | 0.5%制剂<br>(w/w%)  | 1.0%制剂<br>(w/w%)  | 2.0%制<br>剂<br>(w/w%) | 对照<br>(w/w%) |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|--------------|
| 纯净水, USP                | 7732-18-5                         | 88.045            | 87.615            | 86.775               | 88.435       |
| 乙酸盐缓冲<br>溶液 4.2 USP     | 6161-90-4<br>7732-18-5<br>64-19-7 | 10.00             | 10.00             | 10.00                | 10.00        |
| 依地酸二钠,<br>USP           | 6381-92-6                         | 0.015             | 0.015             | 0.015                | 0.015        |
| 丙二醇, USP                | 57-55-6                           | 1.00              | 1.00              | 1.00                 | 1.00         |
| 氯化钠, USP                | 7647-14-5                         | 0.35              | 0.24              | 0                    | 0.50         |
| 苯扎氯铵,<br>50%, 溶液,<br>NF | 8001-54-5<br>7732-18-5<br>64-17-5 | 0.02              | 0.02              | 0.02                 | 0.02         |
| 羟苯甲酸甲<br>酯, NF          | 99-76-3                           | 0.03              | 0.03              | 0.03                 | 0.03         |
| 盐酸胍屈嗪,<br>USP           | 304-20-1                          | 0.54 <sup>*</sup> | 1.08 <sup>*</sup> | 2.16 <sup>*</sup>    | 0            |

\*因生产损失和原料纯度而允许 8%超额。

将对照制剂装入带有橡胶内衬盖的 8 mL E-C 琥珀玻璃样品小瓶 (产品 224735, 批号 1402565, Wheaton, Millville, NJ) 中。将盐酸胍屈嗪制剂装入具有带 13 mm LDPE 受控滴液头、40  $\mu$ L 和 13 mm-425 聚丙烯最终封口 (finish closure) 的珠滴瓶 (bead droptainer) 的 6 cc 圆柱体 LDPE 圆形物 (Comar Packaging, Buena, NJ) 中。将制剂在 4°C  $\pm$  2°C、25°C  $\pm$  2°C 和 40°C  $\pm$  2°C 下保存 3 个月以评价在室温、用冷藏和加速下的储存。在时间为零时测试活性成分的 pH、重量摩尔渗透压浓度和 w/w%, 其结果见下表 4。在 1 个月后、在 2 个月后和在 3 个月后测试活性成分的 pH、外观和 w/w%, 其结果见下表 5-13。

[0105] 对照的琥珀玻璃小瓶测试在 1 个月后因 pH 在测定结果中偏移和下降 (结果未显示) 所致中止。pH 的变动疑是因玻璃小瓶的碱度所致。

[0106] 表 4 :初始制剂测量

| wt% 盐酸胍屈嗪 | pH  | 重量摩尔渗透压浓度 (mOsmol/Kg) | 测定    |
|-----------|-----|-----------------------|-------|
| 0.0       | 4.3 | 313                   | 0     |
| 0.5       | 4.4 | 312                   | 0.540 |
| 1.0       | 4.3 | 316                   | 1.083 |
| 2.0       | 4.4 | 318                   | 2.180 |

表 5 :在 4°C  $\pm$  2°C 下储存 1 个月后的制剂测量

| wt% 盐酸胍屈嗪 | pH  | 描述     | 测定    |
|-----------|-----|--------|-------|
| 0.5       | 4.3 | 通过     | 0.539 |
| 1.0       | 4.1 | 通过     | 1.076 |
| 2.0       | 4.3 | 大的晶体形成 | 2.162 |

表 6 :在 25℃ ±2℃下储存 1 个月后的制剂测量

| wt% 盐酸胍屈嗪 | pH  | 描述 | 测定    |
|-----------|-----|----|-------|
| 0.5       | 4.3 | 通过 | 0.538 |
| 1.0       | 4.1 | 通过 | 1.080 |
| 2.0       | 4.3 | 通过 | 2.171 |

表 7 :在 40℃ ±2℃下储存 1 个月后的制剂测量

| wt% 盐酸胍屈嗪 | pH  | 描述   | 测定    |
|-----------|-----|------|-------|
| 0.5       | 4.3 | 通过   | 0.536 |
| 1.0       | 4.1 | 通过   | 1.074 |
| 2.0       | 4.2 | 轻微变暗 | 2.157 |

表 8 :在 4℃ ±2℃下储存 2 个月后的制剂测量

| wt% 盐酸胍屈嗪 | pH  | 描述     | 测定     |
|-----------|-----|--------|--------|
| 0.5       | 4.2 | 通过     | 0.5374 |
| 1.0       | 4.0 | 通过     | 1.0843 |
| 2.0       | 4.2 | 大的晶体形成 | 2.1755 |

表 9 :在 25℃ ±2℃下储存 2 个月后的制剂测量

| wt% 盐酸胍屈嗪 | pH  | 描述 | 测定     |
|-----------|-----|----|--------|
| 0.5       | 4.2 | 通过 | 0.5364 |
| 1.0       | 4.0 | 通过 | 1.0788 |
| 2.0       | 4.1 | 通过 | 2.1757 |

表 10 :在 40℃ ±2℃下储存 2 个月后的制剂测量

| wt% 盐酸胍屈嗪 | pH  | 描述   | 测定     |
|-----------|-----|------|--------|
| 0.5       | 4.1 | 通过   | 0.5338 |
| 1.0       | 3.9 | 通过   | 1.0795 |
| 2.0       | 4.0 | 轻微变暗 | 2.1480 |

表 11 :在 4℃ ±2℃下储存 3 个月后的制剂测量

| wt% 盐酸胍屈嗪 | pH  | 描述     | 测定     |
|-----------|-----|--------|--------|
| 0.5       | 4.3 | 通过     | 0.5361 |
| 1.0       | 4.1 | 通过     | 1.0734 |
| 2.0       | 4.3 | 大的晶体形成 | 2.0895 |

表 12 :在 25℃ ±2℃下储存 3 个月后的制剂测量

| wt% 盐酸胍屈嗪 | pH  | 描述   | 测定     |
|-----------|-----|------|--------|
| 0.5       | 4.3 | 通过   | 0.5367 |
| 1.0       | 4.1 | 通过   | 1.0786 |
| 2.0       | 4.2 | 轻微变暗 | 2.1639 |

表 13 :在 40℃ ±2℃下储存 3 个月后的制剂测量

| wt% 盐酸胍屈嗪 | pH  | 描述     | 测定     |
|-----------|-----|--------|--------|
| 0.5       | 4.2 | 通过     | 0.5319 |
| 1.0       | 4.0 | 轻微变暗   | 1.0628 |
| 2.0       | 3.6 | 极暗的琥珀色 | 1.9718 |

用于制剂描述的“通过”是指通过视觉观察是清澈的无色溶液。pH 用 Fischer Scientific Accumet Basic pH 计测量。

**[0107] 实施例 3**

给予胍屈嗪制剂后对脉络膜血流量的作用

对年龄为 50 岁以上的三十一 (31) 名患者进行了单一中心开放标记研究:20 名患者没有任何临床上明显的眼疾病或异常,且斯内伦等效最佳矫正视力 (Snellen equivalent best-corrected visual acuity, BCVA) 优于 20/30,11 名患者具有早期非渗出性年龄相关性黄斑变性 (干性 AMD) 的征兆和症状。在 3 天时间内 7 次局部眼部给予盐酸胍屈嗪制剂后,评价了安全性、舒适性和脉络膜血流量。

**[0108]** 干性 AMD 组中的受试者在黄斑中有小和中等玻璃疣、最小或无色素异常 (即 AREDS 简化分级量表中的风险因素 2) 的证据,且斯内伦等效最佳矫正视力 (BCVA) 等于或优于 20/100。所有受试者都具有足够透明的眼介质以允许正确测量脉络膜血流量。该研究显示短暂增加结膜充血,但没有其它安全性或耐受性顾虑。

**[0109]** 患者在一只眼接受 1 滴试验材料,并在对侧眼接受溶媒对照。患者在临床情况下给予每天的第一剂,在规定时间点自我给予每天剩余的 2 剂。对下列参数进行了评价:

视力 (斯内伦)

眼内压

完全前段裂隙灯检查

散瞳后段裂隙灯检查

AE 集合 (引发的和观察到的)

生命体征 (vital signs)

使用 Gevaltec AG (Switzerland) 提供的小型激光多普勒血流仪评价的脉络膜血流量。

**[0110]** 研究的主要目的是评价按实施例 1 所阐明制备的盐酸胍屈嗪眼用溶液的安全性和舒适性。然而,为了获得对盐酸胍屈嗪眼用制剂活性的早期临床药理学数据,还评价了试验材料对患者脉络膜血流量的作用。在给予每天的第 1 剂之前,针对视力 (通过斯内伦视力表)、生命体征、眼内压 (IOP)、一般眼部健康状况 (通过活组织显微镜检查) 和脉络膜血流量对患者进行评价。在给予每天的第 1 剂后,在 1 或 4 小时时间内监测患者的舒适性、脉络膜血流量、IOP 和一般眼部健康状况。在第 1 天,在给予盐酸胍屈嗪后 30、60、120 和 240 分钟进行评价。在第 2 和 3 天,在前 2 个时间点后进行评价。在第 3 天早晨给予第 7 剂。在最后剂量后的 7 天,通过电话联系患者以评价任何研究后不良事件或问题。

**[0111] 脉络膜血流量**

针对眼内压 (IOP)、视力 (VA)、前段和后段活组织显微镜检查研究结果和生命体征,在任一眼中未发现相对于基线的临床显著改变。未报告其它安全相关问题。

**[0112]** 在 26 (84%) 名受试者中发生眼不良事件 (AE),其全部在性质上是轻度的。所有眼 AE 在研究期间都被解决,1 件异物感 AE 除外,其被归类为未知。

**[0113]** 最常见的治疗相关眼 AE 是眼充血,其发生在 21 个盐酸胍屈嗪治疗眼 (AMD 组中 7 [64%] 名受试者和正常 / 健康组中 14 [70%] 名受试者) 中,但仅发生在 1 个溶媒治疗眼中。对于所有受试者,眼充血的所有情况都得到解决,其解决的平均时间为 1.85 天 (范围为 1-4 天)。

**[0114]** 在用盐酸胍屈嗪制剂治疗的眼中发现的眼充血的发生率与其活性成分 (一种经

批准具有充分确立的外周血管扩张作用的直接作用的抗高血压药物) 的已知药理学作用一致。

[0115] 发现在 2 个受试者组中, 在刚刚滴剂滴注时盐酸胍屈嗪眼用溶液比溶媒稍微不适, 但在滴剂滴注后 30 分钟未发现舒适评分有可观的差异。

[0116] 在每天第 1 次给予试验材料后, 对脉络膜血流量、速度和容积进行了评价。在第 1 天, 在给药后 30、60、120 和 240 分钟进行了脉络膜血流量测量, 在第 2 和 3 天, 只在前 2 个时间点进行了测量。测量使用激光多普勒血流仪装置进行, 该装置是用于观察和测量中央凹下脉络膜血流量的现代化的非侵入性定量法。

[0117] 整体结果表明, 盐酸胍屈嗪眼用制剂在局部给予眼后具有药理学活性:

在盐酸胍屈嗪治疗眼中平均脉络膜血量和速度值有增加的趋势, 其在第 1 天局部给予眼后约 2 小时达到峰值, 并在给药后约 4 小时 (即 2 小时后) 回到基线值。在 AMD 组中, 还发现在盐酸胍屈嗪治疗的眼中, 早在第 1 天给药后 30 分钟血量就增加。

[0118] 对于脉络膜血流量, 在 AMD 受试者的盐酸胍屈嗪治疗的眼中有向平均分提高的趋势。相比之下, 在正常 / 健康受试者中, 平均值和相关标准差 (SD) 两者在第 1 天的所有时间点上依旧低。

[0119] 评价了第 1 天 AMD 和正常组之间脉络膜血流量结果的优势比分析。组差异的检验基于应用 SAS 9.2 版 (SAS, 2009) 的 FREQ 程序计算的费希尔精确检验。对于脉络膜血量, 优势比从 60 分钟时间点的 0.22 ( $p=0.337$ ) 到 120 分钟时间点的 6.67 ( $p=0.106$ ) 变化, 表明了 AMD 患者中在 120 分钟时间点较高盐酸胍屈嗪响应的可能性。

[0120] 该研究的结果表明, 盐酸胍屈嗪眼用溶液是安全的, 并且通常是耐受良好的, 具有低发生率的严重程度为轻度且相对均匀地分布在 2 个受试者群中的治疗突发性 AE。在研究期间没有 SAE, 无死亡, 并且没有其它临床上明显的安全结果。眼充血是最常报告的治疗相关性眼 AE, 其在该研究中由大多数受试者报告。然而, 眼充血的发生率与盐酸胍屈嗪的外周血管扩张作用一致, 并非意料之外。脉络膜血液数据的分析表明在局部眼滴注后, 盐酸胍屈嗪可达到眼后黄斑区以改善脉络膜血液循环。由于血流量减低可能是干性 AMD 进展的起作用的因素, 因此这些结果表明盐酸胍屈嗪对于干性 AMD 的治疗可为有益的治疗剂。

[0121] 实施例 4

胍屈嗪制剂单剂量毒性

用胍屈嗪眼用制剂的单剂量眼刺激性研究显示, 使用兔模型按照 Draize 程序, 制剂产生眼刺激性极小到轻微的趋势。

[0122] 使用不同剂量的胍屈嗪 (0.0%、0.5%、1.0% 和 2.0% [w/w]) 完成了几项研究以评价胍屈嗪作为眼刺激物的潜力。胍屈嗪制剂基本按实施例 1 所述制备。把年青的成年雌性 New Zealand 白兔分组成对照组和 3 个治疗组 (各组  $n=3$ )。把 0.1 mL 剂量 (对照或 0.5%、1.0% 或 2.0% 胍屈嗪制剂) 滴入每只兔的右眼, 左眼用作对照。由于兔的已证实的以在类似人响应的预测中有价值的方式响应眼刺激物的能力, 因此这些研究将兔用作测试模型。已知兔模型对一些刺激物比人略更敏感 (Millichamp 1999a, Millichamp 1999b)。采用已知引起短暂眼刺激的 4.2 的缓冲 pH 和防腐剂以确保稳定性和剂量完整性。

[0123] 总之, 所测试的所有制剂在采用兔模型的初步眼刺激性研究中显示最小的眼刺激性。用 2.0% 胍屈嗪测试的制剂展示比含有 0.0%、0.5% 或 1.0% 盐酸胍屈嗪的制剂略微较大

的刺激性；各浓度显示最大平均总 Draize 评分为 2.0，并被归类为最小刺激性。

#### [0124] 实施例 5

##### 胍屈嗪制剂重复剂量毒性

基本按实施例 1 中所述，以 0.0%（溶媒）、0.5% 盐酸胍屈嗪、1.0% 盐酸胍屈嗪和 2.0% 盐酸胍屈嗪的浓度，制备盐酸胍屈嗪眼用溶液。如表 2 所示，将制剂、溶媒或对照每天给予 40 只 Dutch Belted 兔（每组 5 只雄性和 5 只雌性）的规定眼中持续 28 天。

[0125] 表 2：动物重复剂量毒性研究概要

| 组 | 治疗            | 剂量              |               |
|---|---------------|-----------------|---------------|
|   |               | 左眼              | 右眼            |
| 1 | 溶媒(0.0%盐酸胍屈嗪) | 40 $\mu$ L/溶媒   | 40 $\mu$ L/盐水 |
| 2 | 0.5%盐酸胍屈嗪     | 40 $\mu$ L/0.5% | 40 $\mu$ L/溶媒 |
| 3 | 1.0%盐酸胍屈嗪     | 40 $\mu$ L/1.0% | 40 $\mu$ L/溶媒 |
| 4 | 2.0%盐酸胍屈嗪     | 40 $\mu$ L/2.0% | 40 $\mu$ L/溶媒 |

第 1 组在左眼接受溶媒，在右眼接受盐水，而第 2-4 组在左眼接受盐酸胍屈嗪（低 [0.5% 胍屈嗪，w/w, 0.2 mg/kg/ 剂量]、中 [1.0% 胍屈嗪 w/w, 0.4 mg/kg/ 剂量] 或高 [2.0% 胍屈嗪，w/w, 0.8 mg/kg/ 剂量] 剂量），在右眼接受溶媒。

[0126] 在局部眼治疗 28 天后，施用溶媒或盐酸胍屈嗪不导致发生显著的剂量相关性毒理学改变，其包括对例行的眼评价、眼压测量、体重、器官重量、临床化学、Dutch Belted 兔眼中眼病理学、炎症、变性或毒性的组织学证据的评价。

[0127] 在该研究中给予的最高剂量浓度是可使用眼用制备溶媒制备的同时保持胍屈嗪活性药物成分良好溶解度的可能的最大浓度。给予的最大剂量体积是可施用于兔动物模型的眼中的最大体积。这产生使用每剂 40  $\mu$ L 的总剂量体积给予的 0.8 mg/kg/ 剂的最大日剂量。

[0128] 摄食量在所有组中类似，且体重在组间没有统计显著性差异。在常规身体检查和临床检查中未发现治疗相关结果。没有计划外的死亡。

[0129] 对于第 28 天进行的测量，在第 1 组和第 2-4 组之间的雄性或雌性兔中，在肉眼眼检查结果中没有统计显著性差异。

[0130] 检查了给药前和第 29 天的光反射。在所有时间，所有治疗组的所有瞳孔反应均正常。

[0131] 将一种改良的 Hackett 和 McDonald 显微镜眼分级系统 (Hackett 1996) 应用于裂隙灯活组织显微镜的使用后的眼结果中，其包括插入蓝色滤光镜以评价荧光素染料滞留。对于任何所评价的显微镜眼检查参数，在给药前或第 29 天研究测量期间，在第 1 组和第 2-4 组之间的雄性或雌性兔中没有统计显著性差异。

[0132] 给药前和第 29 天对照和试验兔中 IOP 的平均眼压测量 (Tono-pen ;Reichert Ophthalmic Instruments, Depew, New York) 读数介于 15-25 mmHg 之间,这在正常的生理范围内。在终止前 (第 29 天),1 参数显示统计显著性差异:当与第 1 组均值相比时,第 4 组雌性的左眼平均 IOP 升高,但平均值 (22 mmHg) 在正常生理范围内;此外,第 4 组雌性中,左眼平均 IOP 与安慰剂治疗的右眼平均 IOP 没有不同。

[0133] 在研究的任何时期,组间未出现血液学指标的统计显著性差异,只是第 29 天样品中第 2 和 4 组雌性兔的 log 换算的绝对嗜酸性粒细胞计数低。

[0134] 在研究的任何时期,组间未出现血清化学指标的统计显著性差异,只是第 29 天样品第 2 和 4 组中雌性的胆固醇值低。

[0135] 对于雄性和雌性兔两者,第 1 组和第 2-4 组间的平均器官重量和相对器官重量没有统计显著性差异。在尸体剖检期间未观察到可能被视为剂量相关的重大总体病理改变。

[0136] 由各眼的颞、中心 (包括视神经) 和鼻矢状切片、泪腺和眼附器组成的四十 (40) 套苏木精和伊红染色的载玻片由委员会认证的兽医眼科医师进行组织病理学检查。在所有组中,研究结果由结膜淋巴滤泡、角膜上皮和 / 或视网膜皱襞的局灶性或弥散性丢失组成。这些结果在第 1- 第 4 组中以及在右眼和左眼之间以几乎同等频率出现,且与处理伪像有关,并视为偶然结果。在局部眼治疗 28 天后,每日施用高达 2.0% 盐酸胍屈嗪或溶媒不会导致 Dutch Belted 兔眼中出现眼病理学、炎症、变性或毒性的组织学证据。

[0137] 根据从所提议的制剂进行的这些眼给药研究获得的结果,可显现出高达 2.0% w/w 的盐酸胍屈嗪的配制剂量对用于人眼应是耐受性相当好的和安全的。

#### [0138] 实施例 6

##### 胍屈嗪制剂对脉络膜血流量的作用

##### 1.0% 胍屈嗪眼用溶液基本按实施例 1 所述制备。

[0139] 12 只雌性 New Zealand 白兔,体重为 2.5-3.0 kg,肌内用 35 mg/kg 氯胺酮和 5 mg/kg 赛拉嗪麻醉。每小时给予初始剂量的一半以保持麻醉。

[0140] 通过前房穿刺升高左眼的眼内压至 40 mmHg 以建立高眼压模型,来产生高眼压模型。通过右颈动脉将导管插入左心室以注射微球体 (microsphere) (IMT-Stason Laboratories, Irvine CA)。将导管插入股动脉用于采血样。

[0141] 将作为对照的 50  $\mu$ L 盐水溶液 (n=5) 或 1.0% 胍屈嗪眼用溶液 (n=7) 局部滴到左眼中。之后在 0、30、60 和 120 分钟用有色微球体测量脉络膜血流量。在各个时间点上,将 0.2 mL 不同颜色的微球体注射入左心室作为参比,在注射微球体后的确切 1 分钟从股动脉抽取血样。在肝素化管中收集血样,并记录体积。

[0142] 在最后一次采血样后,注射 100 mg/kg 戊巴比妥钠使兔安乐死。摘出左眼,切离脉络膜。将组织样品称重,消化,用血细胞计数器对组织中的微球体计数。用下列方程式计算特定时间上各组织的血流量:

$$Q_m = (C_m \times Q_r) / C_r$$

其中  $Q_m$  为组织的血流量,以  $\mu$ L/ 分钟 /mg 为单位,  $C_m$  为每 mg 组织的微球体计数,  $Q_r$  为血样的流速,以  $\mu$ L/ 分钟为单位,  $C_r$  为参比血样中的总微球体计数。

[0143] 发现与对照相比,在药物滴注后 30 和 60 分钟,1.0% 浓度的胍屈嗪滴眼剂显著提高兔的脉络膜血流量 ( $P < 0.05$ ),其结果见图 1。

**[0144] 实施例 7**

胍屈嗪制剂对激光诱导的脉络膜新血管形成的体内作用

0.5%、1.0% 和 2.0% 胍屈嗪眼用溶液基本如实施例 1 所述制备。

[0145] 25 只 Brown-Norway 大鼠, 重为 150-180 g, 肌肉用 35 mg/kg 氯胺酮和 5 mg/kg 赛拉嗪麻醉。局部施用 1% 托吡卡胺 (Bausch & Lomb ;Tampa, Fla.) 和 2.5% 去氧肾上腺素散瞳。用 VOLK 超级瞳孔 XL 活组织显微镜检查透镜 (Keeler Instrument, Inc., Broomall, PA) 观察眼底。使用双频 Nd:YAG 激光器 Laserex LP3532 ;Lumenis Inc., Salt Lake City UT) 以 532 nm 波长穿透玻璃膜。光点直径为 100  $\mu$ m。所递送的功率为 200 mW, 应用 0.15 秒曝光。在距视神经大致相等距离上使眼底产生 6 个损伤。只包括有气泡形成的激光点。不包括有大量视网膜出血的损伤。

[0146] 紧接激光处理后, 两侧滴注包含 0.5% (n=5)、1.0% (n=10) 或 2.0% (n=5) 盐酸胍屈嗪的胍屈嗪滴眼剂或盐水滴眼剂 (n=5) 每天 3 次达 4 周。紧接激光处理后的给药被视为用于干性 AMD 的较好模型, 与其中在激光攻击后 2 周左右在发生出血的点上给予药物的标准激光诱导的 CNV (湿性 AMD) 模型不同。

[0147] 使用数码眼底照相机 (TRC-50 EX ;Topcon, Japan) 和标准荧光素滤光镜 (fluorescein filter), 在治疗 4 周后, 在被麻醉的散瞳动物中进行荧光素血管造影术。以 0.14 mL/100 g 的体重, 通过舌下静脉, 静脉内注射 0.3 ml 的 10% 异硫氰酸荧光素-葡聚糖 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO)。在 20 分钟内拍摄荧光素照片, 选择质量最清晰的照片用于应用 Imagenet 2000 数码成像系统 (Topcon Medical Systems, Inc., Paramus NJ) 测量 CNV 形成的面积, 其结果见图 2。

[0148] 在拍摄荧光素血管造影术照片后, 处死大鼠, 摘出眼, 并固定在 10% 磷酸盐缓冲的福尔马林中。切离角膜和晶状体, 小心地切取完整的视网膜。从脉络膜边缘到中纬线产生脉络膜的径向切口 (通常 4-6 个), 脉络膜面朝上, 将视杯平展铺片。在 Axioskop 显微镜 (Zeiss, Thornwood, NY) 上, 通过荧光显微术对平铺片成像, 应用 Image-Pro Plus 软件 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) 测量 CNV 的面积, 其结果见图 3。

[0149] 在治疗 4 周后, 对于荧光素染色, 所有治疗组显示显著减少的 CNV 面积 ( $P < 0.05$ , 对于 2.0%;  $P < 0.01$ , 对于 0.5% 和 1.0%)。对于脉络膜平铺片, 显示相同结果 ( $P < 0.01$ , 对于所有组)。

[0150] 在这两项分析中, 至少用 1.0% 盐酸胍屈嗪眼用溶液观察到显著减少, 其还显示脉络膜血流量显著减少。

**[0151] 实施例 8**

胍屈嗪制剂对管形成的体外作用

在适合的生长条件下在基质凝胶表面上生长时, 内皮细胞体外可形成管状结构。该研究测量了胍屈嗪制剂体外抑制管形成的能力, 并代表了体外抗血管生成测定法。

[0152] 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 购自 ScienceCell (San Diego, CA)。培养基用内皮基础培养基 (EBM-2 ;Lonza Walkersville Inc., Walkersville, MD)、10% 胎牛血清和内皮生长培养基 (EGM-2 SingleQuots ;Lonza Walkersville Inc.) 制备, 其含有 2 mM 谷氨酰胺、100 单位 /mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素。将胍屈嗪以 0 (对照)、1、3、10、30 和 100  $\mu$ g/mL 的浓度在时间 0 时加入培养基中。在 5%  $\text{CO}_2$  和 95% 空气的气氛下, 在 2.5% 基质凝

胶上于 37℃ 培养细胞,并且将 HUVEC 孵育 48 小时。采用常规显微照相术 (Zeiss),获得细胞形态学图像。研究由于 HUVEC 所致的管形成的体外实验重复 3 次。

[0153] 发现用 1 mg/mL 胍屈嗪的治疗与对照没有不同。用 3  $\mu$ g/mL 的胍屈嗪时,一些 HUVEC 无法生长成管,在 30  $\mu$ g/mL 的胍屈嗪下这种作用变得更明显。100  $\mu$ g/mL 的胍屈嗪引起细胞凋亡。

#### [0154] 实施例 9

对碘酸钠诱导的非渗出性年龄相关性黄斑变性大鼠模型的体外作用

静脉内注射碘酸钠 ( $\text{NaIO}_3$ ) 对视网膜色素上皮 (RPE) 中的细胞产生选择性毒性 (Noell 1953)。对 RPE 的作用取决于  $\text{NaIO}_3$  的剂量。该方法用来产生非渗出性 AMD 大鼠模型,其中可评价胍屈嗪制剂的潜在保护作用。

[0155] 体外使用人视网膜色素上皮细胞系 (ARPE-19; American Type Culture Collection, Manassas, VA) 来评价  $\text{NaIO}_3$  的毒性。将细胞在 5%  $\text{CO}_2$  和 95% 空气的潮湿环境中于 37℃ 孵育。生长培养基由 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 和含有 1.2 g/L 碳酸氢钠、2.5 mM L-谷氨酰胺、15 mM HEPES、0.5 mM 丙酮酸钠和 10% 胎牛血清 (全部来自 Invitrogen) 的 Ham F12 培养基的 1:1 混合物组成。通过用 0.25% 胰蛋白酶-0.2g/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) (Sigma-Aldrich) 消化,收获汇合的培养物。对于细胞增殖测定,使 ARPE-19 细胞在 96 孔组织培养板生长过夜。然后培养基用含有不同浓度的  $\text{NaIO}_3$  (0、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100  $\mu$ g/mL) 的新鲜培养基更换。在孵育 48 小时后,细胞用 Dulbecco 磷酸缓冲盐水洗涤 1 次,再用 100  $\mu$ L 的 10% 溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5 二苯基四唑鎓 (MTT) 孵育正好 4 小时。然后通过吸出弃去培养基,将 100  $\mu$ L DMSO 加入各孔中,使培养皿振荡 2 分钟以溶解细胞和有色的甲臜产物。使用 SpectraCount 读板仪 (Packard BioScience, Meriden, CT),读取 570 nm 处各孔中的吸光度 (OD570)。所加入的  $\text{NaIO}_3$  对细胞存活力的作用计算为  $\text{NaIO}_3$  暴露细胞的 OD570 与对照细胞的 OD570 的比率,以对照的百分比表示。在各实验期间使用各组 6 孔重复实验 6 次。

[0156] MTT 比色测定用来体外量化  $\text{NaIO}_3$  对 RPE 细胞的毒性作用。在 10  $\mu$ g/mL 或更低的  $\text{NaIO}_3$  浓度下,细胞的生长没有显著减缓。30  $\mu$ g/mL 和 100  $\mu$ g/mL 的  $\text{NaIO}_3$  浓度减少有活力的 ARPE-19 细胞数分别到对照中所观察到的水平的约 65% 和 40%。

#### [0157] 实施例 10

碘酸钠诱导的非渗出性年龄相关性黄斑变性的体内大鼠模型

为了建立  $\text{NaIO}_3$  模型,将 28 只 8 周龄雄性 Brown Norway 大鼠 (Texas A&M University, Texas) 关养在具有 12:12 小时循环照明方案的标准动物室中。给动物饲喂正常食物和水。所有程序遵守眼科与视觉研究动物使用 (Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) 的 ARVO 决议。

[0158] 将  $\text{NaIO}_3$  (Sigma-Aldrich) 以 3.0% 的浓度溶于盐水中。大鼠通过舌下静脉接受  $\text{NaIO}_3$  单次注射,剂量为 0、7.5、15、20、30、40 和 60 mg  $\text{NaIO}_3$ /kg 体重 (各 4 只大鼠 / 浓度组)。

[0159] 在介于注射后 3 和 56 天之间的时间点,选择性地检查功能改变 (ERG、眼底照片和荧光素血管造影术) 和组织学改变。

[0160] 对于用胍屈嗪 1.0% 眼用溶液 (Pam Lewis Associates, San Antonio, TX) 的实验,

只给正常组两侧滴注盐水,而无  $\text{NaIO}_3$  注射。在单次注射 35 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  后,只给  $\text{NaIO}_3$  组滴注盐水,而在注射 35mg/kg  $\text{NaIO}_3$  后,给胼屈嗪 1.0% +  $\text{NaIO}_3$  组滴注胼屈嗪 1.0% 滴眼剂。所有滴眼剂每天滴注 3 次持续 4 周,恰在注射后开始。

[0161] 采用 EPIC-2000 视觉电反应诊断测试系统 (LKC Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) 进行视网膜的功能测试。通过 Grass Instruments PS22 光刺激器 (Grass Instruments Co., Waltham, MA) 施加闪光刺激。将光刺激器放在距眼 5 英寸的位置。在各个终点 (2 和 4 周), 如下测量所有大鼠的视网膜电位图 (ERG) c 波。使大鼠暗适应过夜,然后用肌肉给予的 35 mg/kg 氯胺酮加 5 mg/kg 赛拉嗪麻醉。之后每小时给予初始剂量的一半以保持麻醉。用阿托品 1%、托吡卡胺 1% 和去氧肾上腺素 2.5% 各 1 滴使所有大鼠散瞳。记录前,使用 1 滴 optacaine 用于表面麻醉。在 ERG 测量期间,给所有动物保暖。

[0162] 从神经视网膜层到感光器和 RPE 细胞层,大鼠视网膜不可逆地被高剂量  $\text{NaIO}_3$  损伤。高剂量的  $\text{NaIO}_3$  诱导严重的视网膜毒性;至于较低剂量,未发现这么多或这么严重的改变。这些结果表明,中等剂量的  $\text{NaIO}_3$  可适于治疗干性 AMD 的动物模型;对于用于该动物模型中,30mg/kg-40mg/kg  $\text{NaIO}_3$  将是最适宜的。

[0163] 先通过 DC-ERG 记录然后通过 ACERG 记录测量每只大鼠。对于 AC-ERG 记录,轻轻放入 Ag/AgCl 电极与角膜接触作为参比电极。在角膜和电极之间使用 1 滴 NaCl 0.9% 以建立稳定的信号传导。将不锈钢长电极插入两眼之间的前额皮肤下,将另一个不锈钢短电极皮下插入腿中作为接地电极。使用单次暗视白色闪光 (20 ms 持续时间) 以激发 ERG 和 b 波。刺激的强度为 628 cds/m<sup>2</sup>,带通自 0.3 到 500 Hz 过滤。对于 DC-ERG,按前述方法 (Peachey 等人, 2002, Vis Neurosci, 19(6):693-701), 使用充满 Hank 平衡盐溶液 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的具有丝极的 1 mm 直径玻璃毛细管 (Sutter Instruments, Novato, CA) 与带有附属连接器的 Ag/AgCl 丝电极接触。毛细管与大鼠角膜表面接触。将另一个类似的电极置于对侧眼的表面用作参比导联。反应被放大 (DC-100 Hz, 增益 = 1000X) (DP-301; Warner Instruments, Hamden, CT), 并在 10 Hz 或 1000 Hz 下数字化。通过 iWORX LabScribe 数据记录软件 (iWorx0CB Sciences, Dover, NH) 分析数据。光刺激来自使用 fiber-lite 高强度照明器 (Dolan-Jenner Industries, Boxborough, MA) 的光通道,中性密度滤光片 (Oriol, Stratford, CT) 置于光程中以调节刺激亮度。用于该实验的刺激亮度为 3.22 log cd/m<sup>2</sup>,持续时间为 4 分钟。用聚焦于大鼠眼位于其中的光纤束的输出端的 Minolta (Ramsey, NJ) LS-110 光度计,进行亮度校准。

[0164] 在 AC-ERG 记录期间,测量从基线到第一负波谷的 a 波;测量从第一负波谷 (a 波) 到 b 波的第一正波峰的最大 b 波振幅 (Vbmax)。对于 DC-ERG 记录,接着 b 波的第二正波峰为 c 波,其振幅从 b 波后的波谷 (其为后电位; AP) 到 c 波的波峰测量。测量从 c 波波峰到 F0 波谷的快振荡 (F0) 的振幅。测量从 F0 波谷到 LP 最大 (Peachey 2002) 的光波峰 (LP)。

[0165] 使用数码眼底照相机 (TRC-50EX; TOPCON) 和 Imagenet 2000 数字成像系统 (Topcon Medical Systems) 拍摄视网膜彩色照片和荧光素血管造影片。在使用荧光素血管造影片时,通过大鼠舌下静脉注射 10 mg 的荧光素钠。如上所述进行麻醉和散瞳。

[0166] 在功能检查后,将全部大鼠处死。在约 16 只大鼠 (来自不同的胼屈嗪治疗组) 中,取出眼,在 2.5% 戊二醛中固定 2 小时,然后在 5% 福尔马林中过夜;每只动物的 1 只眼用于组织学和免疫组织学研究,制备另一只眼用于平铺片的自身荧光测量。对于组织学评价,以

3  $\mu\text{m}$  厚度将石蜡包埋组织切片。沿垂直经线从角膜到视神经头把眼切开,然后用苏木精和伊红染色。使用 Axioskop 显微镜 (Zeiss) 拍摄图像。对于平铺片的制备,摘出每只动物的 1 只眼。固定后,将眼的前部以及角膜、晶状体和感觉器官视网膜轻轻取出,将剩余的视杯在 PBS 中洗涤。从边缘到中心切 4 个切口以助于将视杯在玻璃载玻片铺平。研究平铺片中 RPE 的自身荧光,并使用氩激光器 (波长 488 nm) 在共焦显微镜 (Zeiss LSM510;Zeiss) 上拍摄。

[0167] 斯图登 t 检验用来进行统计分析。单尾 t 检验用于体内实验,双尾 t 检验用于体外测定。

[0168] 荧光素血管造影术和眼底照相术

在 60 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  剂量组中,早在注射后 3 天就观察到完整视网膜上的强荧光;然而,在这个早期时间点上,眼底照片中未见明显变化。在 40 mg/kg 和 30 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  剂量组两者中,在注射后 3 天可见部分视网膜强荧光,但作用不如 60 mg/kg 组中所观察到的那么明显。在注射后较长时间 (定义为介于 28 和 56 天之间),外周视网膜中的弱荧光明显。在全部 3 个组中早在 7 天,便可观察到与  $\text{NaIO}_3$  剂量有关并且表示坏死的从外周到中心视网膜的黄色斑点或瘢痕。在 20 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  组中,在眼底照片和荧光素血管造影术两者中变化不明显直到 28 天。

[0169]  $\text{NaIO}_3$  对 ERG 的作用

单次注射 40 或 60 mg/kg 剂量的  $\text{NaIO}_3$  对最大 b 波振幅 ( $V_{b\max}$ ) 具有巨大作用,这在注射后 3 和 7 天清晰可见。在 60 mg/kg 组中,在治疗后 28 天,ERG b 波完全消失。在 40 mg/kg 组中,在注射后 3 天 b 波幅度显著降低,并在随后的所有时间点继续降低;到 56 天,没有可测量的 b 波。在第 7 天,二十 (20) mg/kg  $\text{NaIO}_3$  降低 b 波幅度,但在 14 天及之后恢复到对照组中所观察到的水平。

[0170] 15 或 7.5 mg/kg 的  $\text{NaIO}_3$  剂量不抑制任何时间点上的任何 ERG 波。在注射后 7 天,单次注射 30 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  引起全部 ERG 波下降。在 30 mg/kg 剂量组中,a 波和 b 波信号似乎在较晚时间点 (14 天和 28 天) 恢复。相比之下,在 30 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  注射后,在所有时间点上 c 波信号都被抑制。测量了相对于 c 波的 F0 和 LP 指标,该指标反映 c 波数据中所观察到的  $\text{NaIO}_3$  剂量反应。

[0171] ERG c 波产生自 RPE。 $\text{NaIO}_3$  对 ERG c 波信号的抑制作用与已知的该化合物的毒性作用一致。ERG c 波信号的长期抑制支持将该大鼠模型用于非渗出性 AMD 的研究。

[0172] 对视网膜组织病理学的作用

在 30 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  组中,一些视网膜坏死出现在注射后 3 天,这在较高剂量组 (即 40 或 60 mg/kg  $\text{NaIO}_3$ ) 或在注射后较长时间变得更严重。在较低剂量组 (< 30 mg/kg) 中大鼠视网膜中没有明显的组织学改变。同样,在视网膜平铺片上,RPE 单层检查显示在较高剂量组中在注射后 3 天坏死明显;在 30 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  和较低剂量组中未观察到明显改变。在 60 mg/kg 组中,在注射后 3 天或更长时间,大鼠视网膜中 RPE 细胞和感光器细胞两者的密度降低明显。在 40 mg/kg 剂量组中,在注射后 7 天开始观察到类似变化。在 30 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  剂量组中,在注射后 7 天开始注意到 RPE 细胞中黑素颗粒数减少。在 20 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  剂量组中未观察到明显变化。

[0173] 在平铺片制备物中,通过共焦显微术测量 RPE 细胞的激光诱导的自身荧光。在 30

mg/kg  $\text{NaIO}_3$  或更高的剂量后 3 天, 在 RPE 中观察到小孔, 其数目在注射后更久的时间增加。RPE 自身荧光信号的这些缺陷表明 RPE 细胞坏死的区域。在 20 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  剂量组中, 从 7 天开始, 观察到 RPE 自身荧光中的小孔, 且数目比在较高剂量组中观察到的少。

#### [0174] 胍屈嗪制剂阻断 $\text{NaIO}_3$ 诱导的损害的能力

根据上述时间和剂量依赖性实验的结果, 选择 35 mg/kg  $\text{NaIO}_3$  的浓度和 28 天的时间点用于实验以测试胍屈嗪阻断  $\text{NaIO}_3$  对大鼠 ERG 模式的作用的能力。正常组不接受任何  $\text{NaIO}_3$ , 接受仅盐水的滴眼剂。在以 35 mg/kg 的剂量注射  $\text{NaIO}_3$  后的 4 周, ERG c 波振幅显著下降至对照组的 31% ( $P < 0.01$ )。胍屈嗪 1.0% +  $\text{NaIO}_3$  组的 ERG c 波振幅下降至对照组的 50% ( $P < 0.05$ )。在 1.0% 胍屈嗪 +  $\text{NaIO}_3$  组中观察到的 c 波信号的幅度显著大于仅  $\text{NaIO}_3$  组的信号 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。这就表明了胍屈嗪 1.0% 滴眼剂在该模型中的保护作用; 胍屈嗪阻断 (或恢复) 因  $\text{NaIO}_3$  注射引起的 RPE 细胞的损害的 61%。

#### [0175] 实施例 11

胍屈嗪对视网膜色素上皮细胞的抗氧化作用

细胞损害诱导的氧化应激的定量测定

将人 RPE 细胞系 ARPE-19 (ATCC ;Manassas, VA) 在补充了 10% 胎牛血清、50 单位 /mL 青霉素 - 链霉素和 2.5 mM 谷氨酰胺的 Dulbecco 改良必需培养基 (DMEM) 中在 37° 温育与 5%  $\text{CO}_2$  下培养。细胞系不被转化, 并具有 RPE 体内特有的结构和功能性质。将细胞接种在 96 孔板中, 在 3-10 次传代内研究亚汇合的细胞单层。在开始实验程序之前, 取出培养基, 更换为补充 1% 小牛血清、0.06% 谷氨酰胺和 1% 青霉素 - 链霉素的无酚红低葡萄糖 DMEM。

[0176] 以  $1 \times 10^5$  个细胞 /mL 的浓度, 将培养的 ARPE-19 细胞接种到 96 孔板中。当细胞达到 80% 汇合时将其用于实验以防止接触抑制。将 ARPE-19 细胞暴露于经设计以模拟氧化应激 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ 、t-BHP) 或缺氧 ( $\text{NaIO}_3$ ) 的化学试剂中, 并测量不同浓度的胍屈嗪 (1、3、10、30 或 100  $\mu\text{g/mL}$ ) 阻断损害的能力。

[0177] 对于氧化应激和缺氧实验, 将具体的化学试剂和胍屈嗪制剂两者加入孔中 (或对于对照只加入化学试剂), 将板在 37°C 下温育 24 小时。使用溴化 3-(4, 5- 二甲基噻唑 -2- 基 )-2, 5- 二苯基四唑 鎇 (MTT) 测定法测定各培养物中活细胞的相对数目, 来评价细胞存活力 (仅活细胞具有将 MTT 分子转化成暗紫色物质甲 鎇 所需要的线粒体酶活性) (Swanson, 1992, Neurosci Lett, 147 (2): 143-146)。在 24 小时暴露后, 将 MTT 试剂溶液 (5 mg/mL) 以 1:10 MTT 试剂 : 培养基体积的比率加入各孔中。将培养物在 37°C 下与 MTT 试剂一起孵育 3 小时。在孵育结束时, 弃去 MTT 溶液, 将 0.1 mL 二甲亚砜 (DMSO) 加入各孔中以溶解紫色甲 鎇 产物。使用 SpectraCount 读板仪 (Packard BioScience, Meridan, CT), 通过测量各样品在 570 nm (A570) 处的光密度 (OD), 确定活细胞的比例。MTT 比色测定法中 OD 读数和确切细胞数之间的关系通过在相同密度下接种细胞, 然后对平行复制式培养物进行 MTT 测定法和手动血细胞计数器细胞计数而确定。将锥虫蓝加入血细胞计数器培养物中, 使得仅对活的排除染料的细胞计数。该方法使得能够建立 A570 相对于细胞数的标准曲线。

[0178] 采用 Swanson 等人 (Swanson 1992 ;Varming 1996) 描述的改进方法, 诱导化学缺氧。将 RPE 细胞洗涤, 并更换含有不同浓度的  $\text{NaN}_3$  (0.1 mM~100 mM) 的新鲜 DMEM-F12 培养基。然后加入胍屈嗪制剂, 将培养物和试验剂在 37°C 下孵育 24 小时。通过洗出培养基终

止反应。以 1:10 MTT 试剂 : 培养基体积的比率加入 MTT 试剂溶液 (5 mg/mL), 然后在 37°C 下孵育 3 小时。在孵育结束时, 弃去 MTT 溶液, 将 0.1 mL DMSO 加入各孔中以溶解紫色甲臜产物。使用 SpectraCount 读板仪 (Packard BioScience, Meridan, CT), 通过测量各样品在 570 nm 处的 OD 来确定活细胞的比例。

[0179] 所有数据以均值  $\pm$  标准误差提供。进行非配对斯图登 t 检验, 以分析在某一时间点 2 种方法间的显著性。在  $P < 0.05$  时差异被视为显著。一氧化氮测量的结果以  $\mu\text{M}$  亚硝酸盐和硝酸盐 /  $1 \times 10^6$  个细胞表示。

#### [0180] 胍屈嗪对 tBHP 诱导的毒性的作用

对照 (细胞仅用 tBHP 处理) 的细胞存活力在用 0.01 mM tBHP 攻击后降低到  $89.90\% \pm 2.80\%$ , 在用 0.03 mM tBHP 攻击后降低到  $55.80\% \pm 4.08\%$ 。在用 0.01 mM 和 0.03 mM 的 tBHP 攻击后, 胍屈嗪制剂以表观浓度依赖性方式抑制 tBHP 诱导的细胞损害。在用 0.01 和 0.03 mM tBHP 两者攻击后, 用 100  $\mu\text{g/mL}$  的胍屈嗪观察到最大存活力保护作用 ( $109.99\% \pm 2.41\%$ , 对于 0.01 mM tBHP;  $100.84\% \pm 13.00\%$ , 对于 0.03 mM tBHP); 与对照相比, 这些差异在统计上有显著性 ( $P < 0.001$ )。在用 0.01 mM tBHP 攻击后用 30  $\mu\text{g/mL}$  胍屈嗪 ( $P < 0.01$ ) 和在用 0.03 mM tBHP 攻击后用所有浓度的胍屈嗪 ( $P < 0.001$ ) 也观察到统计显著性保护作用。

#### [0181] ARPE-19 细胞中胍屈嗪对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的毒性的作用

对照 (细胞仅用  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理) 的细胞存活力在用 0.3 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  攻击后降低到  $48.74\% \pm 2.40\%$ , 在用 1.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  攻击后降低到  $41.28\% \pm 0.80\%$ 。在用 0.3 mM 和 1.0 mM 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  攻击后, 胍屈嗪制剂以表观浓度依赖性方式抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的细胞损害。在用 0.3 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  攻击后用 30  $\mu\text{g/mL}$  胍屈嗪观察到最大存活力保护作用 ( $74.30\% \pm 0.80\%$ ); 与对照相比, 这种差异在统计上有显著性 ( $P < 0.001$ )。在用 0.3 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  攻击后用 30  $\mu\text{g/mL}$  胍屈嗪观察到最大存活力保护作用 ( $68.04\% \pm 0.67\%$ ); 与对照相比, 这种差异在统计上有显著性 ( $P < 0.001$ )。在 0.3 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  用攻击后用 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0.001$ ) 和 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0.001$ ) 的胍屈嗪和在用 1.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  攻击后用 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $P < 0.001$ ) 的胍屈嗪也观察到统计显著性保护作用。

#### [0182] ARPE-19 细胞中胍屈嗪对缺氧诱导的细胞损害的作用

使用 ProOx 缺氧系统进行体外缺氧处理。允许 ARPE-19 细胞贴壁过夜, 然后在含氧量正常或缺氧条件下暴露于胍屈嗪 (0.1~100  $\mu\text{g/mL}$ ) 24、48 和 72 小时。在缺氧下, 使用温度和湿度受控制的环境 C-室 (C-chamber) 通过带有  $\text{N}_2$  和  $\text{CO}_2$  气体源的  $\text{O}_2$  和  $\text{CO}_2$  控制器 (ProOx 110 型和 ProCO2 120 型; BioSpherix Ltd., Redfield, NY), 保持 1%  $\text{O}_2$  的氧气浓度和 5%  $\text{CO}_2$ 。通过洗出培养基终止反应, 根据培养基的体积以 1:10 的稀释度在 37°C 下加入 5 mg/mL MTT 3 小时。在孵育结束时, 弃去 MTT 溶液, 以 0.1 mL/孔 DMSO 将细胞溶解。使用 SpectraCount 读板仪 (Packard BioScience, Meridan, CT), 通过测量各样品在 570 nm 处的 OD, 确定活细胞比例。

[0183] 对照 (细胞暴露于 1%  $\text{O}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$  且无胍屈嗪处理) 的细胞存活力在 48 和 72 小时时分别为  $98.91\% \pm 0.56\%$  和  $97.45\% \pm 0.52\%$ 。与对照相比, 胍屈嗪制剂显著逆转缺氧诱导的细胞损害。在 48 小时 ( $101.21\% \pm 0.54\%$ ;  $P < 0.001$ ) 和 72 小时 ( $103.55\% \pm 1.75\%$ ;  $P < 0.001$ ) 时用 1  $\mu\text{g/mL}$  胍屈嗪观察到最大逆转作用。

**[0184] 实施例 12**

ARPE-19 细胞中胍屈嗪对一氧化氮 (NO) 产生的作用

在暴露于胍屈嗪制剂并与上节所述化学品一起孵育后,提取无酚红和地塞米松的培养基的样品,使用亚硝酸盐 / 硝酸盐 Greiss 试剂系统,测定亚硝酸盐和硝酸盐 (一氧化氮 (NO) 相对稳定的最终产物) 的水平。将 60  $\mu\text{L}$  测定缓冲液中的五十 (50)  $\mu\text{L}$  无酚红培养基的等分试样与 10  $\mu\text{L}$  的硝酸盐还原酶制备物和硝酸盐还原酶辅因子制备物 (专用浓度) 的每一种在 96 孔微量测定板中在室温下孵育 60 分钟,这将硝酸盐转化成亚硝酸盐。在所需孵育时间后,将 10  $\mu\text{L}$  的 DAN 试剂加入各孔中,孵育 10 分钟,然后向各孔中加入 20  $\mu\text{L}$  的 NaOH 终止反应。使用 SpectraCount 读板仪 (Packard BioScience, Meridan, CT),通过测量各样品在 540 nm 处的 OD,确定总的亚硝酸盐 / 硝酸盐。数据用硝酸盐标准曲线计算。

**[0185]** 在用胍屈嗪制剂治疗后,未检出对 NO 产生的明显作用。

**[0186] 实施例 13**

用盐酸胍屈嗪眼用制剂治疗非渗出性年龄相关性黄斑变性 (干性 AMD)

本研究是溶媒对照的双盲单一中心研究,其中患有轻度到中度非渗出性 AMD 的 60 名个人的单眼随机分配以接受局部盐酸胍屈嗪 1% 或溶媒对照一天 3 次持续 2 年。当全部受试者完成 12、18 和 24 个月时,进行了主要终点和次要终点的分析。

**[0187]** 1% 盐酸胍屈嗪眼用溶液以含有 1% (10 mg/mL) 盐酸胍屈嗪的无色等渗溶液供应,其经过滤除菌。除苯扎氯铵和羟苯甲酸甲酯作为防腐剂以外,无活性成分包括:乙酸盐缓冲溶液中的依地酸二钠、氯化钠和丙二醇 (全为美国药典 [USP] 级), pH 范围为 3.8-4.4,重量摩尔渗透压浓度范围为 300-340 mOsmol/kg。

**[0188]** 溶媒按与盐酸胍屈嗪眼用溶液相同但没有活性剂的方式制备。每个瓶含有 7 mL,且瓶具有分配 40-50 微升 / 滴的滴管。

**[0189]** 制剂和溶媒对照由患者自我给药一天 3 次:早晨、下午和傍晚。每滴由 40-50  $\mu\text{L}$  含防腐剂的无菌盐水溶媒中的 1% 盐酸胍屈嗪活性成分液滴组成。通过将一滴滴入研究眼 TID 持续 24 个月,自我给予药物或溶媒。

**[0190]** 进行治疗前眼检查 (仅治疗眼),包括:ETDRS 视力、屈光、眼内压、瞳孔评价、裂隙灯检查 (评价眼睑 / 睫毛、结膜 / 巩膜、角膜、前房、虹膜、晶状体、前玻璃体) 和散瞳眼底检查 (评价视神经、玻璃体、血管、黄斑和周围部)。治疗眼的其它测试包括:暗适应、黄素蛋白荧光、脂褐素荧光、彩色眼底照相术、OCT 和脉络膜血流测定术。在治疗后 1 和 3 个月,在研究眼中进行眼检查,包括:ETDRS 视力、屈光、眼内压、瞳孔评价、裂隙灯检查 (评价眼睑 / 睫毛、结膜 / 巩膜、角膜、前房、虹膜、晶状体、前玻璃体) 和散瞳眼底检查 (评价视神经、玻璃体、血管、黄斑和周围部)。在 6、12、18 和 24 个月时,进行治疗眼的眼检查以及治疗眼的测试。

**[0191]** 通过经由计算就诊期间视杆截距 (rod intercept) 数据的斜率 (最佳线性拟合) 得到年变化率,比较治疗组的视杆截距从基线的变化,来分析主要的功效度量:暗适应 (视杆截距)。暗适应允许定量测定外视网膜参数例如视杆功能。其使用 Jackson 等人 (J Ocul Biol Dis Inform., 1:7-11, 2008) 所述方法,用计算机化暗适应计 (AdaptDx; Apeliotus Technologies, Atlanta, GA, USA) 测量。应用 Igor Pro (Wavemetrics, Portland, OR, USA) 对暗适应功能作图。主要终点是视杆截距,以分钟测量,并呈现在仪器中。其它测量法包括

视锥敏感性坪值、视杆－视锥断裂和视杆敏感性恢复斜率。在基线和治疗后 6、12、18 和 24 个月进行暗适应测试。

[0192] 对 12 个月数据进行了主要功效分析。在直到第 24 个月整个期间研究依旧为双盲的,在第 18 和 24 个月对功效和安全作进一步分析。

[0193] 如果受试者只贡献一种度量,则指定斜率为零。采用其中治疗分配是固定因素,基线视杆截距是协变量的协方差模型分析,检验了平均斜率的组间差异。如果组间有差异性遗漏,则对于遗漏斜率和指定零值的那些,用不同的分配方法进行敏感性分析。

[0194] 各组 30 的样品大小具有 90% 检验效能 (power) 以采用具有 0.05 两侧显著水平的两组 t 检验,检测均值差异与至少 0.863 的通用标准差的比率。

[0195] 实例:如果 SD 为 4 分钟,组间差异为 3.45 分钟 / 年,则使用 30 / 组时有 90% 检验效能 ( $3.45/4.00 = 0.863$ )。

[0196] 次要功效度量包括:ETDRS 视力、黄素蛋白荧光、脂褐素自身荧光、彩色照相、OCT、暗适应(视锥敏感性、视杆－视锥断裂、视杆敏感性恢复斜率)和脉络膜血流测定术。关键的次要终点分析包括:

当所有受试者完成 18 个月时,评价视杆截距时间自基线的变化

当所有受试者完成 24 个月时,评价视杆截距时间自基线的变化

黄素蛋白荧光的平均强度。OcuMet Beacon (OcuMet Beacon, OcuScience Inc., Ann Arbor, MI) 测量视网膜组织的黄素蛋白荧光 (FPF)。FPF 信号显示与视网膜组织中线粒体的代谢状态有关。单位为灰度单位 (gsu) 的 FPF 的平均强度和平均曲线宽度可用作功能性度量以区分与基线度量和对照受试者相比组织功能障碍的水平。从治疗眼获得 5 张中心位于小凹的 FPF 图像。对以 512x512 像素文件保存的 FPF 图像进行分析得到直方图。绘制治疗眼的范围为 0-65,536 灰度单位的像素强度直方图,得到平均灰度单位波形。在基线和治疗 6、12、18 和 24 个月后拍摄黄素蛋白荧光照片。应用 OcuScience, Inc 开发的计算机科学专门技术,以盲法进行分析。

[0197] 脂褐素荧光的平均强度:脂褐素来源于脂质的溶酶体降解,其在视网膜色素上皮 (RPE) 内的蓄积是 RPE 疾病和感光器变性的有用标志物。相反地,由于 RPE 细胞丧失,因此脂褐素荧光丢失可能是 AMD 中地图样萎缩的征兆。因此,眼底自身荧光可用作监测 AMD 的疾病进展的有用方法。像黄素蛋白荧光定量一样,绘制治疗眼的像素强度直方图,得到平均灰度单位波形。另外,定性观察地图样萎缩。筛查、基线和治疗后 6、12、18 和 24 个月后,获得脂褐素荧光图像。

[0198] 通过光相干体层摄影术 (optical coherence tomography) 的平均视网膜厚度。采用其中治疗分配是固定因素,基线视杆截距是协变量的协方差模型分析,检验组间自基线的平均变化的差异。概要提供 2 种所观察的病例的结果和继续进行的最后观察。光谱域 (Spectral domain) OCT (Heidelberg Spectralis, Heidelberg Engineering Inc., Heidelberg, Germany) 允许约 5 微米分辨率的中心黄斑的横截面图像。成像后分析可量化中心视网膜厚度、内段 / 外段 (IS/OS) 破坏的完全性、玻璃体牵引的存在、用增强深度成像的脉络膜厚度和脉络膜新血管膜或色素上皮脱落的存在。OCT 在筛查、基线和治疗后 6、12、18 和 24 个月拍摄。

[0199] 1. 一种眼用组合物,其包含:

量介于约 0.02-2 wt% 的含有胍屈嗪的药学活性药物；  
pH 介于 3.9-4.5 之间、量介于 8-12 wt% 之间的乙酸盐缓冲溶液；  
量介于 0.5-2 wt% 之间的丙二醇；  
量介于 0.25-1 wt% 之间的氯化钠；  
量介于 0.015-0.06 wt% 之间的羟苯甲酸甲酯；  
以介于 0.01-0.04 wt% 的量存在的呈 50% 溶液形式的苯扎氯铵；和  
量介于 0.008-0.030 wt% 之间的依地酸二钠；  
其中所述组合物的 pH 介于 4.0-4.4 之间。

[0200] 2. 实施方案 1 的组合物，其中所述药物是盐酸胍屈嗪。

[0201] 3. 单一或组合实施方案 1 或 2 的组合物，其中所述药物以介于 0.5-2 wt% 之间的量存在。

[0202] 4. 单一或组合实施方案 1-3 的组合物，其中所述乙酸盐缓冲溶液的 pH 为 4.2，并且以 10 wt% 的量存在。

[0203] 5. 单一或组合实施方案 1-4 的组合物，其中所述乙酸盐缓冲溶液由乙酸钠和 2N 乙酸组成。

[0204] 6. 单一或组合实施方案 1-5 的组合物，其中丙二醇以 1 wt% 的量存在。

[0205] 7. 单一或组合实施方案 1-6 的组合物，其中羟苯甲酸甲酯以 0.03 wt% 的量存在。

[0206] 8. 单一或组合实施方案 1-7 的组合物，其中呈 50% 溶液形式的苯扎氯铵以 0.02 wt% 存在。

[0207] 9. 单一或组合实施方案 1-8 的组合物，其中依地酸二钠以 0.015 wt% 存在。

[0208] 10. 一种用于制备眼用制剂的方法，所述方法包括：

将水与 pH 为 3.9-4.5 的乙酸盐缓冲溶液混合得到第一临时混合物，乙酸盐缓冲溶液以在制剂中提供介于约 8-12 wt% 之间的乙酸盐缓冲溶液的量加入；

将依地酸二钠加入第一临时混合物中得到第二临时混合物，依地酸二钠以在制剂中提供介于约 0.008-0.030 wt% 之间的依地酸二钠的量加入；

将丙二醇加入第二临时混合物中得到第三临时混合物，丙二醇以在制剂中提供介于约 0.5-2 wt% 之间的丙二醇的量加入；

将氯化钠加入第三临时混合物中得到第四临时混合物，氯化钠以在制剂中提供介于约 0.25-1 wt% 之间的氯化钠的量加入；

将苯扎氯铵加入第四临时混合物中得到第五临时混合物，苯扎氯铵以在制剂中提供介于约 0.01-0.04 wt% 之间的苯扎氯铵的量加入；和

将羟苯甲酸甲酯加入第五临时混合物中得到第六临时混合物，羟苯甲酸甲酯以在制剂中提供介于约 0.015-0.06 wt% 之间的羟苯甲酸甲酯的量加入；

将包含胍屈嗪的药学活性药物加入第六临时混合物中得到所述制剂。

[0209] 11. 实施方案 10 的方法，其中一个或多个加入步骤包括在加入的同时混合。

[0210] 12. 单一或组合实施方案 10-11 的方法，其中所述乙酸盐缓冲溶液以在制剂中提供 10 wt% 乙酸盐缓冲液的量加入。

[0211] 13. 单一或组合实施方案 10-12 的方法，其中所述乙酸盐缓冲溶液由乙酸钠和 2N 乙酸组成。

[0212] 14. 单一或组合实施方案 10-13 的方法,其中依地酸二钠以在制剂中提供 0.015 wt% 依地酸二钠的量加入。

[0213] 15. 单一或组合实施方案 10-14 的方法,其中丙二醇以在制剂中提供 15 wt% 丙二醇的量加入。

[0214] 16. 单一或组合实施方案 10-15 的方法,其中氯化钠以在制剂中提供 0.5 wt% 氯化钠的量加入。

[0215] 17. 单一或组合实施方案 10-16 的方法,其中苯扎氯铵以在制剂中提供 0.02 wt% 苯扎氯铵的量加入。

[0216] 18. 单一或组合实施方案 10-17 的方法,其中羟苯甲酸甲酯以在制剂中提供 0.03 wt% 羟苯甲酸甲酯的量加入。

[0217] 19. 单一或组合实施方案 10-18 的方法,其中所述药学活性药物是以介于 0.5-2 wt% 之间存在于制剂中的胍屈嗪。

[0218] 20. 一种用于治疗黄斑变性的方法,所述方法包括:

将权利要求 1-9 中任一项的眼用组合物或按照权利要求 10-19 的方法制备的制剂给予有黄斑变性风险或诊断为黄斑变性的受试者的眼部。

[0219] 21. 实施方案 20 的方法,其中所述黄斑变性是年龄相关性干性黄斑变性。

[0220] 22. 用于治疗黄斑变性的组合或单独的实施方案 1-9 的组合物或通过组合或单独的实施方案 10-19 的方法得到的眼用制剂。

[0221] 23. 用于治疗干性年龄相关性黄斑变性的实施方案 22 的组合物或制剂。

[0222] 虽然上文论述了多个示例性方面和实施方案,但是本领域技术人员应认识到某些修改、置换、添加及其亚组合。因此意图随附权利要求书和之后引入的权项解释为包括落入其真实精神和范围内的所有这类修改、置换、添加和亚组合。

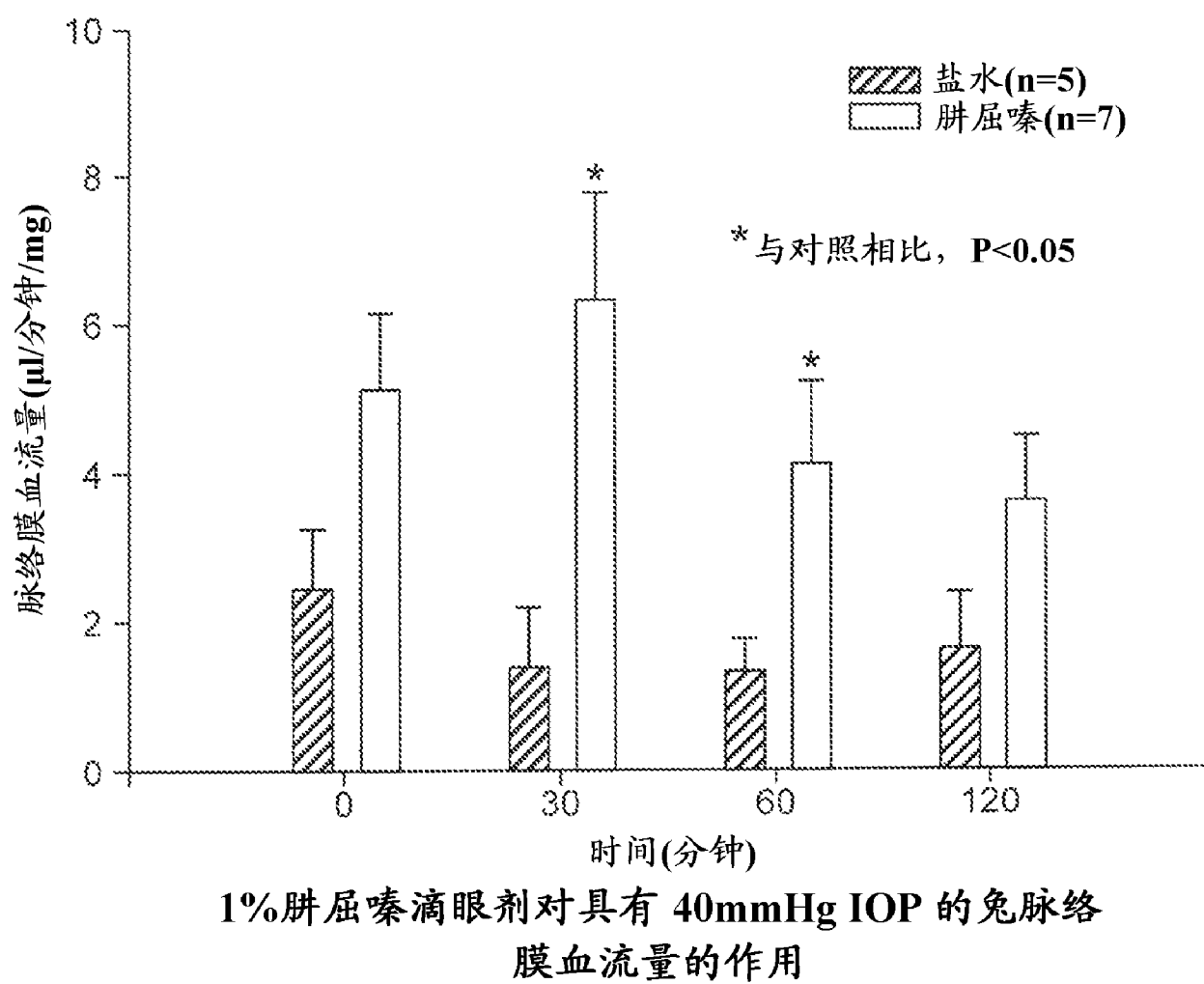


图 1

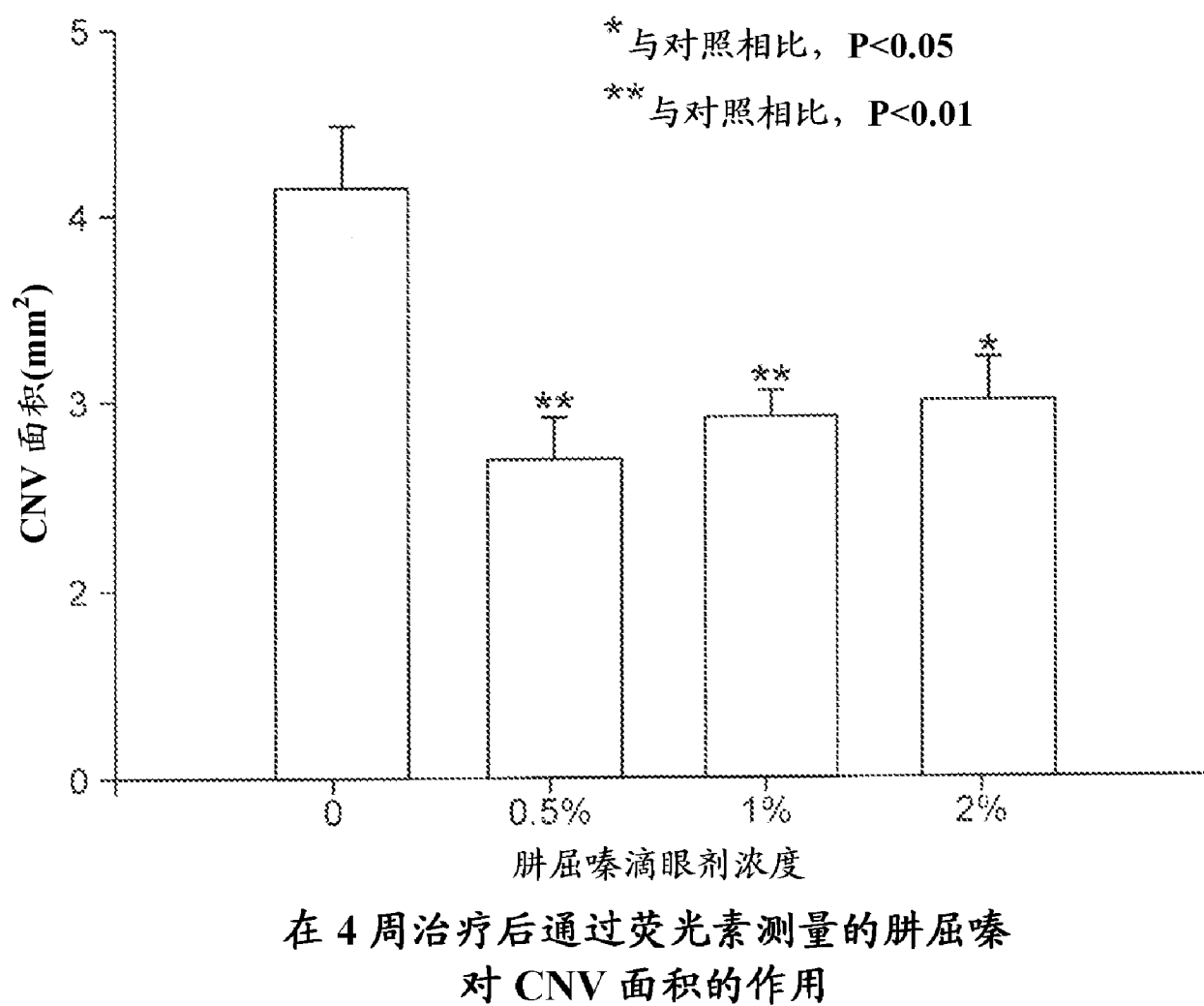
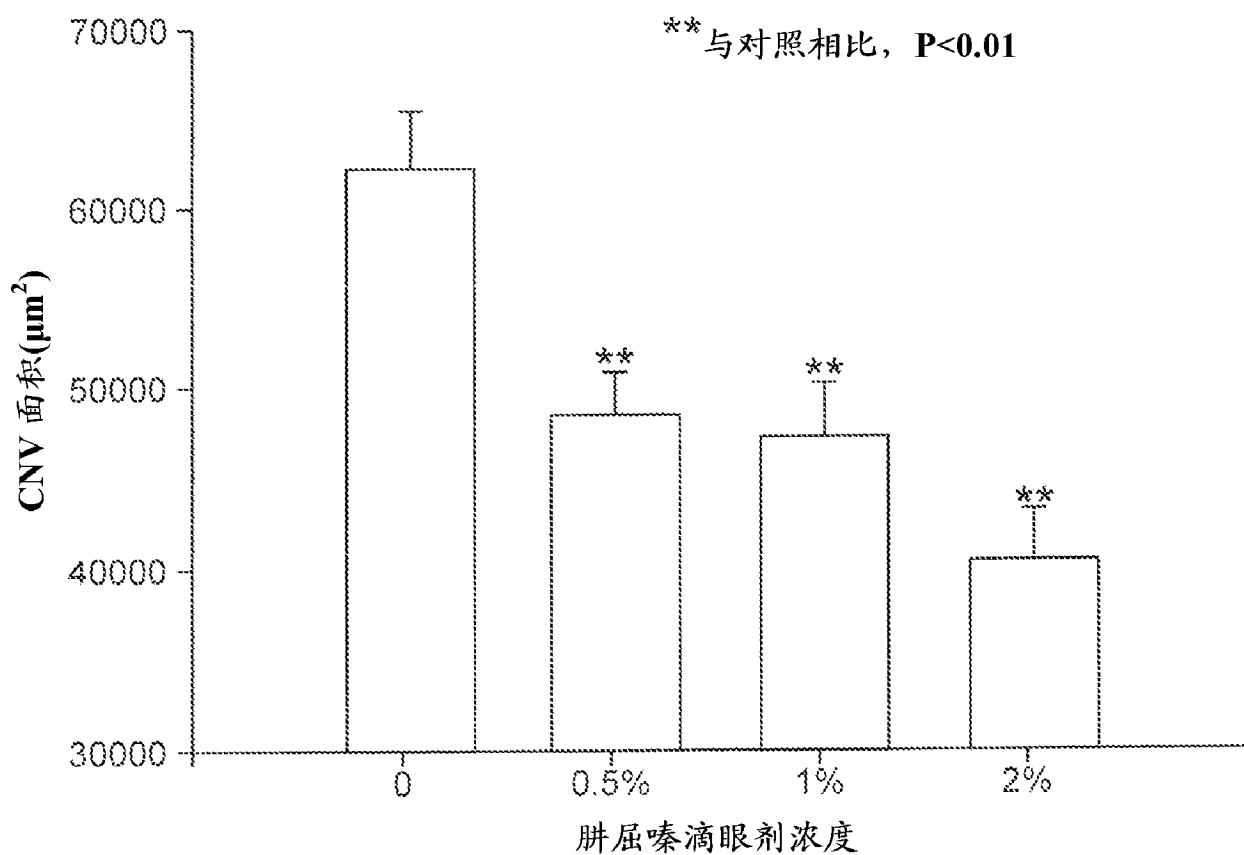
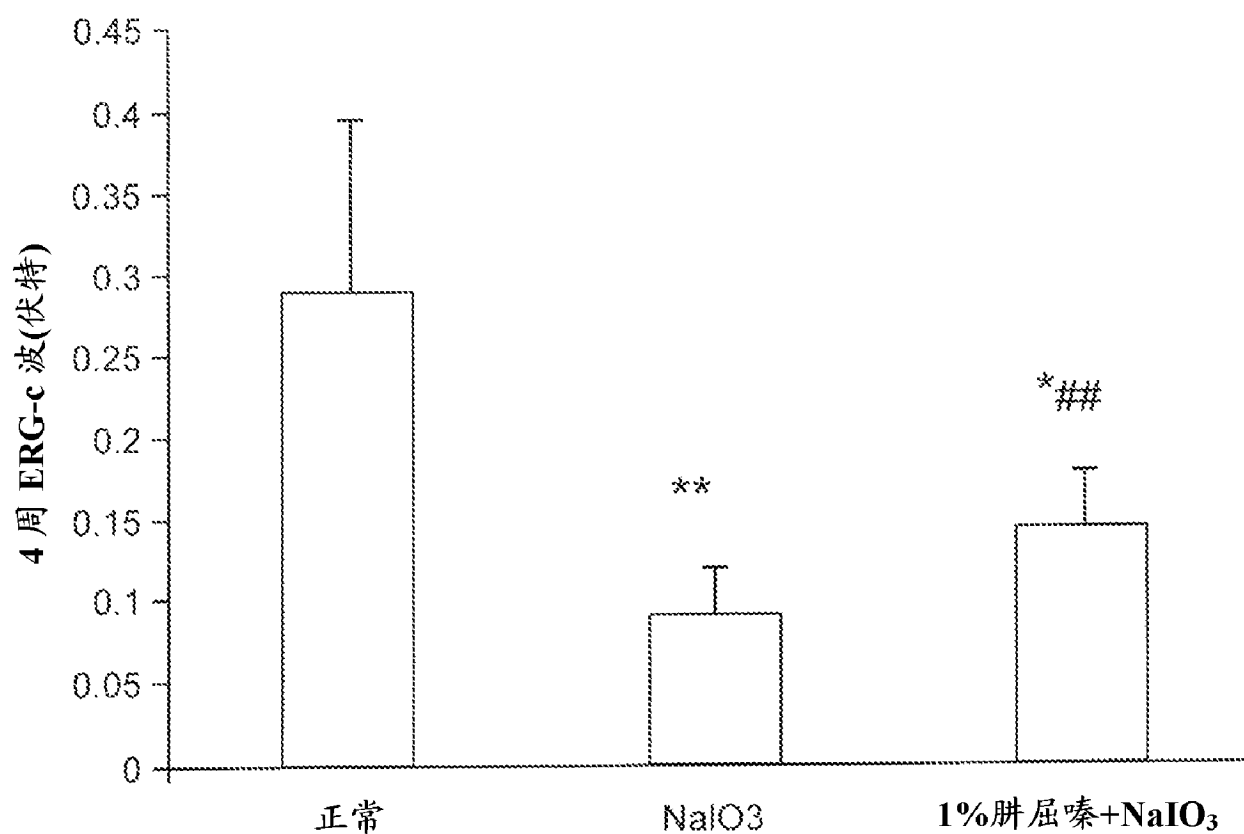


图 2



通过脉络膜平铺片测量的酮屈嗪对 CNV 面积的作用

图 3



大鼠眼中胍屈嗪滴眼剂对 35mg/kg NaIO<sub>3</sub> 诱导的 RPE 变性的作用

图 4