



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101252924 B

(45) 授权公告日 2013.06.19

(21) 申请号 200680031233.1

(22) 申请日 2006.07.10

(30) 优先权数据

60/698,512 2005.07.11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.02.26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/026770 2006.07.10

(87) PCT申请的公布数据

W02007/008821 EN 2007.01.18

(73) 专利权人 矫正诊疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 K·威德 J·利希特 N·L·马塔

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 31/07(2006.01)

A01N 31/04(2006.01)

A61K 35/44(2006.01)

(56) 对比文件

US 6875767 B2, 2005.04.05, 说明书第8栏第38-45行.

US 4665098 A, 1987.05.12, 说明书第1栏第8-42行.

US 6034211 A, 2000.03.07, 说明书第14栏第25-34行.

US 2002/0143062 A1, 2002.10.03, 说明书第3页第0029-0035段.

US 6051692 A, 2000.04.18, 说明书第33栏第10-32行.

Lewis K. C., et al..Effects of chronic administration of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) in rats on vitamin A metabolism in the eye.European Journal of Cancer. 1996, 32A(10), 1803-1808.

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

Frank G. Holz, et al..Fundus Autofluorescence and Development of Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2001, 42(5), 1051-1056.

审查员 郑少君

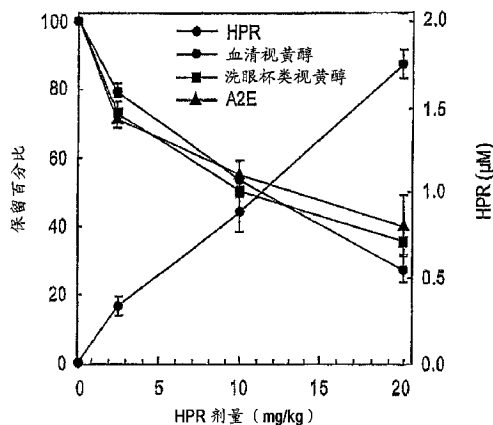
权利要求书1页 说明书51页 附图18页

(54) 发明名称

通过血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP调节治疗眼部疾病的方法和组合物

(57) 摘要

降低血清视黄醇、血清RBP和/或血清视黄醇-RBP水平的化合物,可以用于治疗与在视觉循环过程中蓄积的废物的过度产生有关的疾病。本发明描述了方法和组合物,其中使用这些化合物和它们的衍生物来治疗例如黄斑变性和营养不良,或减轻与这些眼部疾病有关的症状。这些化合物和它们的衍生物可以作为单药剂治疗使用,或者与其他药剂或治疗联合使用。



CN 101252924 B

1. 有效量的 N-(4- 羟基苯基) 视黄酰胺 (HPR) 或 N-(4- 甲氧基苯基) 视黄酰胺 (MPR) 在制备用于治疗人类个体 Stargardt 病的药物中的用途, 其中所述药物使得该人类个体的血清视黄醇水平相对于治疗前水平降低至少 20%。

2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述人类个体携带突变的 ABCA4 基因。

3. 根据权利要求 1 中任一项所述的用途, 其中所述血清视黄醇水平相对于治疗前水平降低至少 50%。

4. 根据权利要求 1 中任一项所述的用途, 其中所述血清视黄醇水平降低保持至少 6 个月。

5. 根据权利要求 1 中任一项所述的用途, 其中所述血清视黄醇水平降低保持至少 1 年。

6. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中 N-(4- 羟基苯基) 视黄酰胺 (HPR) 被用来制备所述药物。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的用途, 其中所述药物是一种适于全身性地施用于人的剂型。

8. 根据权利要求 7 所述的用途, 其中所述药物是一种适于经口服施用于人的剂型。

9. 根据权利要求 8 所述的用途, 其中所述药物的剂型为片剂、粉末、丸剂、糖锭、胶囊、凝胶、糖浆、酞剂、浆液或悬浮液。

10. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中所述药物通过多次给药。

11. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中所述药物还包含溶血磷脂胆碱、甘油一酯和脂肪酸。

12. 根据权利要求 9 所述的用途, 其中所述药物还包含玉米油和非离子表面活性剂。

13. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的用途, 其中所述药物还包含至少一种选自降低人的 RBP 水平的试剂、降低人的 TTR 水平的试剂、一氧化氮诱导物、抗炎剂、生理可接受的抗氧化剂、生理可接受的矿物质、带负电荷的磷脂、类胡萝卜素、抗血管生成药、基质金属蛋白酶抑制剂、和 13- 顺式维甲酸的另外试剂。

14. 根据权利要求 13 所述的用途, 其中所述一氧化氮诱导物是他汀类药物。

15. 根据权利要求 13 所述的用途, 其中所述抗血管生成药是白藜芦醇或其他反式二苯乙烯化合物。

通过血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白 (RBP) 和 / 或 血清视黄醇 -RBP 调节治疗眼部疾病的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求 2005 年 7 月 11 日提交的美国临时专利申请 60/698,512 的权益。本专利申请涉及 2005 年 6 月 10 日提交的美国专利申请 11/150,641 ;2005 年 12 月 7 日提交的 11/296,909 ;和 2005 年 11 月 4 日提交的 11/267,395,将它们全部以整体通过参考引入本文。

技术领域

[0003] 本文所述的方法和组合物涉及眼部疾病的治疗。

背景技术

[0004] 视觉循环或类视黄醇循环是一系列由光驱动和酶催化的反应,其中活性的视觉生色团视紫质被转变成全反式异构体,然后又随即再生。循环的一部分发生在视杆的外节,而循环的一部分发生在视网膜色素上皮细胞 (RPE) 中。该循环的组分包括各种脱氢酶和异构酶,以及在光感受体和 RPE 之间运输中间体的蛋白质。

[0005] 与视觉循环有关的其他蛋白质负责运输、清除和 / 或处理由于视觉循环的类视黄醇例如全反式视黄醛 (atRAL) 的过量产生而蓄积的化合物和毒性产物。例如, N- 亚视黄基 -N- 视黄基乙醇胺 (A2E) 来源于全反式视黄醛和磷脂酰乙醇胺的缩合。尽管光感受器和 RPE 对一定水平的发射橙色的荧光团是耐受的,但如果过量仍会导致不良反应,包括脂褐素的产生,和在黄斑下可能出现玻璃疣。参见,例如 Finnemann, S. C., Proc. Natl. Acad. Sci, 99 :3842-47 (2002)。此外,A2E 对 RPE 可能是有细胞毒性的,这会导致对视网膜的损害和破坏。玻璃疣是细胞外沉着物,其蓄积于 RPE 下面,是发展成与年龄相关的黄斑变性的危险因素。参见,例如 Crabb, J. W., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 99 :14682-87 (2002)。因此,清除和处理来自于视觉循环副反应的毒性产物是十分重要的,因为一些证据表明,过度蓄积的毒性产物是与黄斑变性和视网膜营养不良有关的症状的部分原因。

[0006] 与年龄相关的黄斑变性一般分为两类:湿性和干性。干性黄斑变性在所有病例中占约 90%,也称做萎缩性、非渗出性、或玻璃疣性黄斑变性。在干性黄斑变性中,玻璃疣典型地蓄积于视网膜的 RPE 组织下。然后,当玻璃疣干扰黄斑中光感受器的功能时,就会发生视觉丧失。该型的黄斑变性导致在很多年中视觉逐渐丧失。

[0007] 湿性黄斑变性占有所有病例的约 10%,也称作脉络膜新血管生成,视网膜下新生血管形成,渗出性、或盘状变性。在湿性黄斑变性中,在黄斑下可以形成异常的血管生长;这些血管可以渗漏出血液和液体进入黄斑中并损害感光细胞。研究表明,干性黄斑变性可以导致湿性黄斑变性。湿性黄斑变性可快速发展,导致对中央视觉的严重损害。

[0008] Stargardt 病,也称作 Stargardt 黄斑营养不良或黄点状眼底,是最频繁遇到的青少年发作型的黄斑营养不良。研究表明,该病症作为常染色体隐性遗传性状在 ABCA4 基因 (也称作 ABCR 基因) 中传递。该基因是基因的 ABC 超家族中的一员,其编码与广谱物质的

能量依赖性跨膜传输有关的跨膜蛋白质。

[0009] Stargardt 病的症状包括中央视觉的减退和暗适应困难,这些问题一般随着年龄的增大而恶化,使得许多受到 Stargardt 病困扰的人视力丧失了 20/100 到 20/400。由于全反式视黄醛过度产生的潜在可能,通常要求患有 Stargardt 病的人避开亮光。

[0010] 诊断 Stargardt 病的方法包括观测黄斑中出现的衰退的萎缩性或“青铜铂”外观,以及在出现萎缩的中央黄斑损害区周围的视网膜内发生的大量淡黄白色斑的存在。其他诊断检测包括使用视网膜电流图、眼电图、和暗适应测试。另外,可以用荧光素血管造影片来确认该诊断。在后一个测试中观测到的“暗”或“沉默”脉络膜的出现,与脂褐素在患者视网膜色素上皮中的蓄积有关,这正是黄斑变性的早期症状之一。

[0011] 当前,对于黄斑变性和黄斑营养不良的治疗选择是很有限的。一些患有干性 AMD 的患者对于高剂量的维生素和矿物质产生应答。此外,一些研究表明,玻璃疣的激光光凝术阻止或延缓了玻璃疣的发展,玻璃疣可以导致干性 AMD 更加严重的症状。最后,一些研究表明,体外电流渗法 (rheophoresis) 对于患有干性 AMD 的患者是有益的。

[0012] 然而,上述的成功是很有限的,人们仍然强烈地要求有新的方法和治疗来对付和限制与黄斑变性和营养不良有关的视觉丧失。

[0013] 发明简述

[0014] 本发明提供方法、组合物和制剂,用于 (a) 治疗眼部病症,和 (b) 控制预示 (例如危险因子) 或与这些眼部病症有关的症状,其中该组合物和制剂在用于治疗眼部疾病或控制预示 (例如危险因子) 或与这些眼部病症有关的症状的浓度下不直接抑制或拮抗任意的视觉循环蛋白。在一个方面,这些方法和制剂包含视黄基衍生物的使用。在另外的方面,该方法和制剂包括使用试剂来通过降低患者体内的血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白 (RBP) 和 / 或血清视黄醇 -RBP 水平来治疗眼部疾病。在另外的方面,眼部疾病是视网膜病。在另外的方面,眼部疾病是基于脂褐素的视网膜疾病。在另外的方面,基于脂褐素的视网膜疾病是黄斑变性、黄斑营养不良和视网膜营养不良。在另外的方面,该方法和制剂用于保护哺乳动物的眼免遭光的损害;在另外的方面,该方法和制剂用于限制哺乳动物眼中的全反式视黄醛、N- 亚视黄基 -N- 视黄基乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、脂褐素、地理性萎缩、暗点、光感受器变性和 / 或玻璃疣的形成。在另外的方面,这些方法和制剂包括使用可以导致患者中视杆占优势的最大 ERG a 波振幅减小的药剂。在另外的方面,该方法和制剂与其他治疗方式组合使用。

[0015] 在另一个方面是一种治疗基于脂褐素的视网膜疾病的方法,包括调节哺乳动物体内的视黄醇、RBP 和 / 或视黄醇 -RBP 的血清水平,包括下列实施方案,其中 (a) 基于脂褐素的视网膜疾病是青少年黄斑变性,包括 Stargardt 病;(b) 基于脂褐素的视网膜疾病是干性与年龄相关的黄斑变性;(c) 基于脂褐素的视网膜疾病是视锥 - 视杆营养不良;(d) 基于脂褐素的视网膜疾病是视网膜色素变性;(e) 基于脂褐素的视网膜疾病是湿性与年龄相关的黄斑变性;(f) 基于脂褐素的视网膜疾病是或存在地理性萎缩和 / 或光感受器变性;或 (g) 基于脂褐素的视网膜疾病是基于脂褐素的视网膜变性。

[0016] 在另一个方面是在哺乳动物中治疗基于脂褐素的视网膜疾病的方法,包括将哺乳动物中血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白 (RBP) 和 / 或血清视黄醇 -RBP 水平降低期望的百

分比。在一些实施方案中,血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP降低的期望的百分比是相对于治疗前的水平;在可替代的实施方案中,血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP降低的期望的百分比是相对于预定的阈水平。在一些实施方案中,血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP降低的期望的百分比是至少约10%,至少约20%,至少约30%,至少约40%,至少约50%,至少约60%,至少约70%或至少约80%。在一些实施方案中,血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP降低的期望的百分比不超过约30%,不超过约40%,不超过约50%,不超过约60%,不超过约70%,不超过约80%,不超过约85%,不超过约90%或不超过约95%。在一些实施方案中,血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP降低的期望的百分比是治疗前基线值的约20到约75%。在一些实施方案中,血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP降低的期望的百分比维持至少1周,至少1个月,至少6个月,至少1年,哺乳动物的终生。

[0017] 在另一个方面是在哺乳动物中治疗基于脂褐素的视网膜疾病的方法,包括将哺乳动物的血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP水平维持在期望的范围内。在一些实施方案中,血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP的期望的范围是大于导致与维生素A缺乏有关的疾病或病症的水平,并小于在哺乳动物的至少一只眼中A2E蓄积增加的水平。在一些实施方案中,在哺乳动物的至少一只眼中A2E蓄积增加时血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP的水平是治疗前血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP水平的至少约10%,至少约20%,至少约30%,至少约40%,至少约50%,至少约60%,至少约70%或至少约80%。在一些实施方案中,导致与维生素A缺乏有关的疾病或病症的血清视黄醇,血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP的水平是不超过治疗前血清视黄醇,血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP水平的约30%,不超过约40%,不超过约50%,不超过约60%,不超过约70%,不超过约80%,不超过约85%,不超过约90%或不超过约95%。在一些实施方案中,血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP降低的期望的百分比是在治疗前基线值的约20%到约75%。在一些实施方案中,血清视黄醇、血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP降低的期望的百分比维持至少1周,至少1个月,至少6个月,至少1年,哺乳动物的终生。在一些实施方案中,哺乳动物中血清视黄醇,血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP水平是以周期水平测定的,以确保血清视黄醇,血清视黄醇结合蛋白(RBP)和/或血清视黄醇-RBP水平维持在期望的范围内。

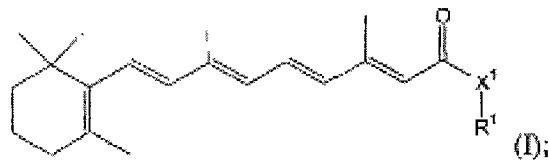
[0018] 在另一个方面是在哺乳动物中治疗基于脂褐素的视网膜疾病的方法,包括在哺乳动物的至少一个RPE中将视黄醇水平降低期望的百分比。在一些实施方案中,视黄醇降低的期望的百分比是相对于治疗前的水平;在可替代的实施方案中,视黄醇降低的期望的百分比是相对于预定的阈水平。在一些实施方案中,视黄醇降低的期望的百分比是至少约10%,至少约20%,至少约30%,至少约40%,至少约50%,至少约60%,至少约70%或至少约80%。在一些实施方案中,视黄醇降低的期望的百分比不超过约30%,不超过约40%,不超过约50%,不超过约60%,不超过约70%,不超过约80%,不超过约85%,不超过约90%或不超过约95%。在一些实施方案中,RPE视黄醇降低的期望的百分比是治疗前基

线的约 20% 到约 75%。在一些实施方案中,视黄醇降低的期望的百分比维持至少 1 周,至少 1 个月,至少 6 个月,至少 1 年,哺乳动物的终生。

[0019] 血清视黄醇、血清 RBP 和血清视黄醇-RBP 的水平是相关的。这些生物学物质任一的水平降低将导致另外两种生物学物质的水平降低。因此,在下文中,“血清视黄醇”指血清视黄醇、血清 RBP 和血清视黄醇-RBP 中的任一种或全部。

[0020] 在另外的一个方面,通过下列方法调节哺乳动物体内血清视黄醇水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物:

[0021]



[0022] 其中 X^1 选自 NR^2 、O、S、 CHR^2 ; R^1 是 $(CHR^2)_x-L^1-R^3$, 其中 x 是 0、1、2 或 3; L^1 是单键或 $-C(O)-$; R^2 是选自 H、 (C_1-C_4) 烷基、F、 (C_1-C_4) 氟烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-(C_1-C_4)$ 烷基胺、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 氟烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基胺、和 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷氧基的部分; R^3 是 H 或一个任选被 1-3 个独立选择的取代基取代的部分,该取代基选自 (C_2-C_7) 烯基、 (C_2-C_7) 炔基、芳基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_5-C_7) 环烯基、和杂环,条件是当 x 是 0 并且 L^1 是单键时, R^3 不是 H;或其活性代谢物,或药学可接受的前药或溶剂化物。

[0023] 在另外的一个方面是降低哺乳动物眼中全反式视黄醇的方法,包括通过给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物来调节哺乳动物的血清视黄醇水平。

[0024] 另外的一个方面是减少哺乳动物眼中 N-亚视黄基-N-视黄基乙醇胺、N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-乙醇胺、N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺形成的方法,包括通过给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物来调节哺乳动物的血清视黄醇水平。

[0025] 另一个方面是减少哺乳动物眼中脂褐素的形成的方法,包括通过给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物来调节哺乳动物的血清视黄醇水平。

[0026] 另一方面是在哺乳动物眼中减少玻璃疣产生的方法,包括通过给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物来调节哺乳动物的血清视黄醇水平。

[0027] 另一个方面是哺乳动物眼中减少和/或抑制脉络膜新生血管形成的方法,包括通过给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物来调节哺乳动物的血清视黄醇水平。在一个进一步的实施方案中,该化合物是抗血管生成剂。

[0028] 另一个方面是治疗哺乳动物眼中黄斑变性的方法,包括通过给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物来调节哺乳动物的血清视黄醇水平。在该方面一个进一步的实施方案中,黄斑变性是青少年黄斑变性,包括 Stargardt 病。在该方面一个进一步的实施方案中,(a) 黄斑变性是干性与年龄相关的黄斑变性或 (b) 黄斑变性是视锥-视杆营养不良。在该方面一个进一步的实施方案中,黄斑变性是湿性与年龄相关的黄斑变性。在该方面一个进一步的实施方案中,黄斑变性是脉络膜新生血管形成、视网膜下新

生血管形成、渗出性或盘状变性。

[0029] 在另一方面是在哺乳动物眼中减少地理性萎缩和 / 或光感受器变性的形成或者限制地理性萎缩和 / 或光感受器变性扩散的方法, 包括通过给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物来调节哺乳动物的血清视黄醇水平。

[0030] 在另一方面是在哺乳动物眼中减少黄斑下异常血管生长的产生的方法, 包括通过给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物来调节哺乳动物的血清视黄醇水平。

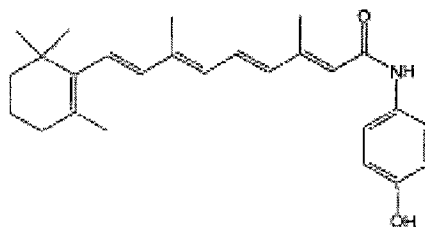
[0031] 在另一方面是在哺乳动物的任一眼中保护光感受器的方法, 包括通过给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物来调节哺乳动物的血清视黄醇水平。

[0032] 在另一方面是保护哺乳动物的眼睛免受光损害的方法, 包括通过给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第一化合物来调节哺乳动物的血清视黄醇水平。

[0033] 在另一方面是式 (I) 的化合物在制备用于治疗哺乳动物的眼部疾病或病症的药物中的应用, 其中至少一种视觉循环蛋白质的活性导致了该疾病或病症的病理学和 / 或症状。在该方面的一个实施方案中, 视觉循环蛋白质选自卵磷脂 - 视黄醇酰基转移酶、RPE65、脱氢酶、异构酶和细胞视黄醛结合蛋白。在该方面的另一个或进一步的实施方案中, 眼部疾病或病症是视网膜病。在一个进一步或可替代的实施方案中, 该眼部疾病或病症是基于脂褐素的视网膜疾病。在一个进一步或可替代的实施方案中, 基于脂褐素的视网膜疾病是黄斑变性。在一个进一步或可替代的实施方案中, 该疾病或病症的症状是在哺乳动物眼中形成全反式视黄醛、N- 亚视黄基 -N- 视黄基乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺、N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、脂褐素、光感受器变性、地理性萎缩、暗点、脉络膜新生血管形成和 / 或玻璃疣。

[0034] 在上述任一方面的进一步的实施方案中, (a) X^1 是 NR^2 , 其中 R^2 是 H 或 (C_1-C_4) 烷基; (b) 其中 x 是 0; (c) x 是 1 并且 L^1 是 $-C(O)-$; (d) R^3 是任选取代的芳基; (e) R^3 是任选取代的杂芳基; (f) X^1 是 NH 并且 R^3 是任选取代的芳基, 包括进一步的实施方案, 其中 (i) 该芳基具有一个取代基, (ii) 该芳基具有一个选自卤素、OH、 $O(C_1-C_4)$ 烷基、 $NH(C_1-C_4)$ 烷基、 $O(C_1-C_4)$ 氟烷基、和 $N[(C_1-C_4)$ 烷基]₂ 的取代基, (iii) 该芳基具有一个取代基, 其为 OH, (v) 该芳基是苯基, 或 (vi) 该芳基是萘基; (g) 该化合物是

[0035]



[0036] 或其活性代谢物, 或药学可接受的前药或溶剂化物; (h) 该化合物是 4- 羟苯基视黄酰胺, 或其活性代谢物, 或药学可接受的前药或溶剂化物; (i) 该化合物是 4- 甲氧苯基视黄酰胺, 或 (j) 4- 氧代芬维 A 胺, 或其活性代谢物, 或药学可接受的前药或溶剂化物。

[0037] 在上述任一方面中, 其中大于与哺乳动物的至少一只眼中 A2E 蓄积增加有关的水平的所测定的血清视黄醇水平是一种指示, 指导了应当增加具有式 (I) 结构的化合物的下

一剂量。在一些实施方案中,小于与维生素 A 缺乏有关的水平的所测定的血清视黄醇水平是一种指示,指导了应当减少具有式 (I) 结构的化合物的下一剂量。在任一实施方案中,哺乳动物的健康和 A2E 蓄积的水平是附加的因素,可以在调节具有式 (I) 结构的化合物的后续剂量前予以考虑。

[0038] 在上述任一方面中,用于降低哺乳动物的血清视黄醇水平的化合物的量不足以抑制哺乳动物视觉生色团的再生。

[0039] 在上述任一方面的进一步的实施方案中,其中 (a) 有效量的化合物是全身性地施用于哺乳动物;(b) 有效量的化合物是口服施用于哺乳动物;(c) 有效量的化合物是由静脉内施用于哺乳动物;或 (d) 有效量的化合物是通过注射施用于哺乳动物。

[0040] 在上述任一方面的进一步的实施方案中,哺乳动物是人,其包括一些实施方案,其中 (a) 该人是 Stargardt 病的突变 ABCA4 基因的携带者,或该人具有 Stargardt 病的突变 ELOV4 基因,或者在与年龄相关的黄斑变性有关的补体因子 H 中有基因变异,或 (b) 该人具有眼部病症或者特征,该病症或者特征选自 Stargardt 病、隐性视网膜色素变性、地理性萎缩、暗点、光感受器变性、干性 AMD、隐性视锥-视杆营养不良、渗出性与年龄相关的黄斑变性、视锥-视杆营养不良、和视网膜色素变性。在上述任一方面的进一步的实施方案中,哺乳动物是视网膜变性的动物模型,其例子将在本文中提供。

[0041] 在上述任一方面的进一步的实施方案中,包括有效量化合物的多次施用,包括进一步的实施方案,其中,(i) 多次施用之间的时间是至少 1 周;(ii) 多次施用之间的时间是至少 1 天;和 (iii) 化合物是每日施用于动物的;或 (iv) 化合物是每 12 小时施用于动物的。

[0042] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括施用至少一种其他的药剂,选自一氧化氮产生的诱导物、抗炎剂、生理可接受的抗氧化剂、生理可接受的矿物质、带负电荷的磷脂、类胡萝卜素、他汀类药物、抗血管生成药、基质金属蛋白酶抑制剂、白藜芦醇和其他反式二苯乙烯化合物、在视杆感光细胞的盘外发生的视觉循环步骤中抑制、拮抗或使之短路的药剂和降低血清视黄醇水平的药剂。在进一步的实施方案中:

[0043] (a) 该其他的药剂是一氧化氮产生的诱导物,在所包括的实施方案中一氧化氮产生的诱导物选自瓜氨酸、鸟氨酸、亚硝化的 L-精氨酸、亚硝酰化的 L-精氨酸、亚硝化的 N-羟基-L-精氨酸、亚硝酰化的 N-羟基-L-精氨酸、亚硝化的 L-高精氨酸和亚硝酰化的 L-高精氨酸;

[0044] (b) 该其他的药剂是抗炎剂,在所包括的实施方案中抗炎剂选自非甾体类抗炎药、脂氧合酶抑制剂、泼尼松、地塞米松、和环氧合酶抑制剂;

[0045] (c) 该其他药剂是至少一种生理可接受的抗氧化剂,在所包括的实施方案中生理可接受的抗氧化剂选自维生素 C、维生素 E、 β -胡萝卜素、辅酶 Q、和 4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧基,或如下实施方案,其中 (i) 至少一种生理可接受的抗氧化剂与具有式 (I) 结构的化合物一起施用;或 (ii) 至少两种生理可接受的抗氧化剂与具有式 (I) 结构的化合物一起施用;

[0046] (d) 该其他药剂是至少一种生理可接受的矿物质,在所包括的实施方案中生理可接受的矿物质选自锌 (II) 化合物、铜 (II) 化合物、硒 (II) 化合物,或进一步包括给哺乳动物施用至少一种生理可接受的抗氧化剂的实施方案;

[0047] (e) 该其他药剂是带负电荷的磷脂,在所包括的实施方案中带负电荷的磷脂是磷脂酰甘油;

[0048] (f) 该其他药剂是类胡萝卜素,在所包括的实施方案中类胡萝卜素选自叶黄素、虾青素和玉米黄素;

[0049] (g) 该其他药剂是他汀类药物,在所包括的实施方案中他汀类药物选自罗苏伐他汀、匹伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、西立伐他汀、美伐他汀、velostatin、氟伐他汀、康帕丁、洛伐他汀、达伐他汀、fluidostatin、阿伐他汀、阿伐他汀钙,和二氢康帕丁;

[0050] (h) 该其他药剂是抗血管生成药,在所包括的实施方案中抗血管生成药选自Rhufab V2、色氨酸-tRNA 合成酶、PEG 化的抗-VEGF 适体、角鲨胺、乙酸阿奈可他、考布他汀 A4 前药、Macugen™、米非司酮、眼腱下用的(subtenon) 曲安奈德、玻璃体内用的晶状曲安奈德、AG3340、氟轻松和 VEGF-Trap;

[0051] (i) 该其他药剂是基质金属蛋白酶抑制剂,在所包括的实施方案中基质金属蛋白酶抑制剂选自金属蛋白酶的抑制剂、 α_2 -巨球蛋白、四环素、氧肟酸盐、螯合剂、合成的 MMP 片段、琥珀酰巯嘌呤、膦酰胺化物、和羟基甲酸;

[0052] (j) 该其他药剂是在视杆感光细胞的盘外发生的视觉循环步骤中抑制、拮抗或使之短路的药剂,包括 13-顺式视黄酸、11-顺式视黄酸或在美国专利申请公开 20060069078(将其内容通过参考引入本文)的第 111-765 段公开的任意药剂;

[0053] (k) 该其他药剂是白藜芦醇或其他反式二苯乙烯化合物;

[0054] (l) 该其他药剂降低了哺乳动物的血清视黄醇水平;

[0055] (m) 该其他药剂 (i) 在施用具有式 (I) 结构的化合物前施用, (ii) 在施用具有式 (I) 结构的化合物后施用, (iii) 与具有式 (I) 结构的化合物同时施用,或 (iv) 在施用具有式 (I) 结构的化合物前和后施用;或

[0056] (n) 该其他药剂和具有式 (I) 结构的化合物在相同的药物组合物中施用。

[0057] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括给哺乳动物施以体外电渗法。

[0058] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括在哺乳动物的饮食中减少维生素 A 的量。

[0059] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括给哺乳动物施以治疗,该治疗选自限制视网膜移位、光动力学疗法、玻璃疣激光术、黄斑裂孔术、黄斑移位手术、 φ -移动、质子束疗法、视网膜剥离和玻璃体手术、巩膜扣带术、黄斑下手术、经瞳孔热疗法、光系统 I 疗法、微电流刺激法、抗炎剂、RNA 干扰、施用眼药例如碘依可酯或二乙氧膦酰硫胆碱或碳酸酐酶抑制剂、微芯片植入法、干细胞疗法、基因替代疗法、核酶基因疗法、光感受器/视网膜细胞移植、和针灸。

[0060] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括施用激光光凝术从哺乳动物的眼中消除玻璃疣。

[0061] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的具有式 (I) 结构的第二化合物,其中第一化合物与第二化合物不同。

[0062] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括 (a) 监测哺乳动物眼中玻璃疣的形成;(b) 通过自发荧光测定哺乳动物眼中脂褐素的水平;(c) 测定哺乳动物眼的视敏度;(d) 对哺乳动物的眼进行视野检查,在所包括的实施方案中视野检查是 Humphrey 视野检查和

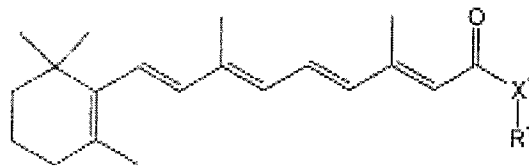
/或微视野检查;(e)在哺乳动物眼中测定N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-乙醇胺、和/或N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺的自发荧光或吸收光谱;(f)进行阅读速度和/或阅读敏度检查;(g)测定暗点大小;或(h)测定地理性萎缩损害的大小和数量。

[0063] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括确定该哺乳动物是否是 Stargardt 病的突变 ABCA4 等位基因的携带者,或是否具有 Stargardt 病的突变 ELOV4 等位基因,或者是否在与年龄相关的黄斑变性有关的补体因子 H 中有基因变异。

[0064] 在上述任一方面的进一步实施方案中,包括对视网膜变性的其他治疗。

[0065] 另一方面是药物组合物,包含有效量的具有下列结构的化合物或其活性代谢物,或药学可接受的前药或溶剂化物和药学可接受的载体:

[0066]



[0067] 其中 X^1 选自 NR^2 、O、S、 CHR^2 ; R^1 是 $(CHR^2)_x-L^1-R^3$, 其中 x 是 0, 1, 2, 或 3; L^1 是单键或 $-C(O)-$; R^2 是选自 H、 (C_1-C_4) 烷基、F、 (C_1-C_4) 氟烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-(C_1-C_4)$ 烷基胺、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 氟烷基、 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷基胺、和 $-C(O)-(C_1-C_4)$ 烷氧基的部分; R^3 是 H 或一个任选被 1-3 个独立选择的取代基取代的部分,该取代基选自 (C_2-C_7) 烯基、 (C_2-C_7) 炔基、芳基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_5-C_7) 环烯基、和杂环,条件是当 x 是 0 并且 L^1 是单键时, R 不是 H;。

[0068] 在药物组合物方面的进一步实施方案中, (a) 药学可接受的载体包括溶血磷脂胆碱,甘油一酯和脂肪酸;(b) 药学可接受的载体进一步包含面粉、增甜剂和湿润剂;(c) 药学可接受的载体包含玉米油和非离子型表面活性剂;(d) 药学可接受的载体包含二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、大豆油、叔丁醇和水;(e) 药学可接受的载体包含乙醇、烷氧基化蓖麻油、和非离子型表面活性剂;(f) 药学可接受的载体包含延长释放的制剂;或 (g) 药学可接受的载体包含快速释放的制剂。

[0069] 在药物组合物方面的进一步实施方案中,该药物组合物进一步包含有效量的至少一种其他药剂,该其他药剂选自一氧化氮产生的诱导物、抗炎剂、生理可接受的抗氧化剂、生理可接受的矿物质、带负电荷的磷脂、类胡萝卜素、他汀类药物、抗血管生成药、基质金属蛋白酶抑制剂、白藜芦醇和其他反式二苯乙烯化合物、在视杆感光细胞的盘外发生的视觉循环步骤中抑制、拮抗或使之短路的药剂和降低血清视黄醇水平的药剂,包括 13-顺式视黄酸、全反式视黄酸或在美国专利申请公开 20060069078 (将其内容通过参考引入本文) 的第 111-765 段公开的任意药剂。在进一步的实施方案中, (a) 该其他药剂是生理可接受的抗氧化剂;(b) 该其他药剂是一氧化氮产生的诱导物;(c) 该其他药剂是抗炎剂;(d) 该其他药剂是生理可接受的矿物质;(e) 该其他药剂是带负电荷的磷脂;(f) 该其他药剂是类胡萝卜素;(g) 该其他药剂是他汀类药物;(h) 该其他药剂是抗血管生成药;(i) 该其他药剂是基质金属蛋白酶抑制剂;(j) 该其他药剂是在视杆感光细胞的盘外发生的视觉循环步骤中抑制、拮抗或使之短路的药剂和降低血清视黄醇水平的药剂,包括 13-顺式视黄酸、全反

式视黄酸或在美国专利申请公开 20060069078(将其内容通过参考引入本文)的第 111-765 段公开的任意药剂;或 (k) 白藜芦醇和其他反式二苯乙烯化合物。

[0070] 本文也描述了治疗与视网膜有关的疾病的患者的方法和组合物,包括通过施用至少一种调节性化合物调节患者的 RBP 或 TTR 水平。在一个进一步的实施方案中,与视网膜有关的疾病是基于脂褐素的视网膜疾病。在一个进一步的实施方案中,调节患者的 RBP 或 TTR 水平可以降低患者的血清视黄醇水平。在一个进一步的实施方案中,患者的血清视黄醇水平降低导致了患者至少一只眼中类视黄醇减少。在一个进一步的实施方案中,患者的血清视黄醇水平导致患者至少一只眼中 A2E 水平降低。在一个进一步的实施方案中,该调节性化合物具有式 (I) 的结构。在一个进一步的实施方案中,该调节性化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该调节性化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0071] 在一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的调节所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 结合的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平减少了哺乳动物眼中全反式视黄醛的形成。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0072] 本文描述的方法和组合物也用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的提高所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 清除率的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平减少了哺乳动物眼中全反式视黄醛的形成。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0073] 在一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的调节所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 结合的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平减少了哺乳动物眼中 N-亚视黄基-N-视黄基乙醇胺的形成。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0074] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的提高所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 清除率的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平减少了哺乳动物眼中 N-亚视黄基-N-视黄基乙醇胺的形成。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0075] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的提高所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 清除率的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平减少了哺乳动物眼中脂褐素的形成。在一个实施方案

中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0076] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的调节所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 结合的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平减少了哺乳动物眼中玻璃疣的形成。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0077] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的提高所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 清除率的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平减少了哺乳动物眼中玻璃疣的形成。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0078] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的调节所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 结合的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平调节了哺乳动物眼中卵磷脂 - 视黄醇酰基转移酶的形成。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0079] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的提高所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 清除率的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平调节了哺乳动物眼中卵磷脂 - 视黄醇酰基转移酶的形成。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0080] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的调节所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 结合的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平防止了哺乳动物眼中与年龄有关的黄斑变性或营养不良。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0081] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的提高所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 清除率的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平防止了哺乳动物眼中与年龄有关的黄斑变性或营养不良。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0082] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的调节所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 结合的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平保护哺乳动物的眼免受光的损害。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0083] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的提高所述哺乳动物中 RBP 与 TTR 清除率的药剂,其中,所述调节 RBP 或 TTR 水平保护哺乳动物的眼免受光的损害。在一个实施方案中,该药剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0084] 在一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于调节哺乳动物视黄醇结合蛋白 (RBP) 或运甲状腺素蛋白 (TTR) 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的至少一种选自 RBP 清除剂、TTR 清除剂、RBP 拮抗剂、RBP 激动剂、TTR 拮抗剂和 TTR 激动剂的化合物。

[0085] 在另一个实施方案中,RBP 清除剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在另一个实施方案中,RBP 激动剂或拮抗剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在一个进一步的实施方案中,该化合物不具有式 (I) 的结构,但选自本文所述的该调节性化合物,并通过使用本文所述的筛选方法选择。

[0086] 本文描述的方法和组合物用于治疗与年龄有关的黄斑变性或营养不良,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的第一化合物,其中所述第一化合物调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平。在一个实施方案中,该第一化合物增加哺乳动物中 RBP 或 TTR 的清除。在另一个实施方案中,该第一化合物抑制了 RBP 与 TTR 的结合。

[0087] 本文描述的方法和组合物用于减少哺乳动物眼中全反式视黄醛 的形成,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的第一化合物,其中所述第一化合物调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平。在一个实施方案中,该第一化合物增加哺乳动物中 RBP 或 TTR 的清除。在另一个实施方案中,该第一化合物抑制了 RBP 与 TTR 的结合。

[0088] 在一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于减少哺乳动物眼中 N- 亚视黄基 -N- 视黄基乙醇胺的形成,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的第一化合物,其中所述第一化合物调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平。在一个实施方案中,该第一化合物增加哺乳动物中 RBP 或 TTR 的清除。在另一个实施方案中,该第一化合物抑制了 RBP 与 TTR 的结合。

[0089] 在一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于减少哺乳动物眼中脂褐素的形成,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的第一化合物,其中所述第一化合物调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平。在一个实施方案中,该第一化合物增加哺乳动物中 RBP 或 TTR 的清除。在另一个实施方案中,该第一化合物抑制了 RBP 与 TTR 的结合。

[0090] 在一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于减少哺乳动物眼中玻璃疣的形成,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的第一化合物,其中所述第一化合物调节哺乳动物

物的 RBP 或 TTR 水平。在一个实施方案中,该第一化合物增加哺乳动物中 RBP 或 TTR 的清除。在另一个实施方案中,该第一化合物抑制了 RBP 与 TTR 的结合。

[0091] 在一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于保护哺乳动物的眼免受光的损害,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的第一化合物,其中所述第一化合物调节哺乳动物的 RBP 或 TTR 水平。在一个实施方案中,该第一化合物增加哺乳动物中 RBP 或 TTR 的清除。在另一个实施方案中,该第一化合物抑制了 RBP 与 TTR 的结合。

[0092] 在另一个实施方案中,本文描述的方法和组合物用于治疗与视黄醇有关的疾病,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的至少一种选自 RBP 清除剂、TTR 清除剂、RBP 拮抗剂、RBP 激动剂、TTR 拮抗剂和 TTR 激动剂的化合物。

[0093] 在一个实施方案中,RBP 清除剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在另一个实施方案中,TTR 清除剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。在另一个实施方案中,RBP 激动剂或拮抗剂是选自具有式 (I) 结构的化合物。在一个进一步的实施方案中,该化合物是芬维 A 胺或其活性代谢产物。

[0094] 本文所述的方法和组合物的其他目的、特征和优点从下面的详细描述中将变得显而易见。但应当理解的是,当说明具体的实施方案时,这些详细描述和具体的实施例仅仅是通过解释说明的方式给出,因为从该详述出发在本发明的精神和范围内的各种改变和变更对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0095] 本文所引用的所有参考文献,包括专利、专利申请和出版物,都以整体一并引入本文作为参考。

[0096] 附图简述

[0097] 附图 1a-1c 显示了血清的乙腈提取物的各种反相 LC 分析。该血清来自于施用 14 天 DMSO (附图 1a)、10mg/kg N-4-(羟苯基)视黄酰胺 (HPR) (附图 1b)、或 20mg/kg HPR (附图 1c) 的小鼠。

[0098] 附图 2a 显示了在 小鼠中注射 10mg/kg HPR 后,作为时间的函数的全反式视黄醇 (atROL) 和 HPR 的眼部浓度。

[0099] 附图 2b 显示了在 小鼠中用 DMSO、10mg/kg HPR、或 20mg/kg HPR 治疗 14 天后,全反式视黄醇和 HPR 的血清浓度;附图 7 是本附图的更新和校正版本。

[0100] 附图 3a 显示了通过荧光猝灭测定的视黄醇和视黄醇结合蛋白质间相互作用的对照结合测定。

[0101] 附图 3b 显示了当存在 HRP (2 μ M) 时,通过荧光猝灭测定的视黄醇和视黄醇结合蛋白质间相互作用的结合测定。

[0102] 附图 4a 显示了在 abca4 无效突变小鼠中 HPR 对 A2PE-H₂ 生物合成的影响。

[0103] 附图 4a 显示了在 abca4 无效突变小鼠中 HPR 对 A2E 生物合成的影响。

[0104] 附图 5 显示的是用荧光猝灭测定的 N-4-(甲氧苯基)视黄酰胺 (MPR) 对细胞视黄醛结合蛋白 (RBP) 与运甲状腺素蛋白 (TTR) 结合的调节。

[0105] 附图 6 显示的是通过尺寸排斥色谱和 UV/可见光谱测定的 MPR 对 RBP 与 TTR 结合的调节。

[0106] 附图 7 显示了血清视黄醇作为芬维 A 胺浓度的函数的分析。

[0107] 附图 8 显示了在 ABCA4 无效突变小鼠中芬维 A 胺浓度相对于视黄醇、A2PE-H₂ 和 A2E 减少的相互关系图。

[0108] 附图 9 显示了在光适应的用 DMSO 和 HPR 处理的小鼠中的类视黄醇组合物 (图 A); HPR 对视觉生色团再生的影响 (图 B); HPR 对漂白的生色团再循环的影响 (图 C); 和视杆功能 (图 D)、视杆和视椎功能 (图 E) 和从光漂白中恢复 (图 F) 的电生理学测定。

[0109] 附图 10 显示了 A2PE-H₂ 水平作为芬维 A 胺剂量和治疗周期函数的分析 (图 A-F), 和在 ABCA4 无效突变小鼠的 RPE 中脂褐素自发荧光作为芬维 A 胺治疗的函数的分析 (图 G-I)。

[0110] 附图 11 显示了来自用 DMSO 和 HPR 处理的动物的视网膜光学显微镜检查影像。

[0111] 附图 12 显示了血清 HPR 水平与血清视黄醇水平和类视黄醇和 A2E 的眼部水平的关系。

[0112] 附图 13 显示了与视黄醇结合蛋白结合的视黄醇和 HPR 的非限制性例子。

[0113] 附图 14 显示了不同剂量的 HPR 对于眼中类视黄醇的蓄积的效果。

[0114] 附图 15 显示了 HPR 对于适应黑暗和适应光的 *abca4*^{-/-} 小鼠中 11-顺-视黄醛和全反式视黄醛水平的效果。

[0115] 附图 16 显示了 10mg/kg HPR 的 28-天治疗期后, 在 *abca4*^{-/-} 小鼠 中类视黄醇的稳态水平和视觉生色团再生的速率。

[0116] 附图 17 显示的是在用 13-顺-维甲酸治疗的野生型和 *abca4*^{-/-} 小鼠和用 HPR 治疗的 *abca4*^{-/-} 小鼠中恢复黑暗敏感度所需的时间延迟。

[0117] 附图 18 显示的是 3 个月大的 3 个系列的小鼠的 A2E、A2PE 和 A2PE-H₂ 的相对浓度。

[0118] 发明详述

[0119] 具有式 (I) 结构的化合物已经用于癌症的治疗。具体地, 化合物 N-(4-羟苯基) 视黄酰胺, 也称作芬维 A 胺、HPR 或 4-HPR, 对治疗乳腺癌已经进行了广泛的试验。Moon, 等人, *Cancer Res.*, 39:1339-46(1979)。在 U. S. 4, 190, 594 和 4, 323, 581 中描述了芬维 A 胺。另外, 制备芬维 A 胺的其他方法也是已知的, 此外, 也已制备出了芬维 A 胺的大量类似物, 并测定了它们对治疗癌症的效力。参见, 例如美国专利申请公开号 U. S. 2004/0102650; U. S. 6, 696, 606; Villeneuve 和 Chan, *Tetrahedron Letters*, 38:6489-92(1997); Um, S. J., 等人, *Chem. Pharm. Bull.*, 52:501-506(2004)。但是, 令人忧虑的是, 这些化合物的一般倾向是在人类患者中产生一定的副作用, 包括损害夜视力。参见, 例如 Decensi, A., 等人, *J. Natl. Cancer Inst.*, 86:1-5-110(1994); Mariani, L., *Tumori.*, 82:444-49(1996)。最近的研究也提供了一些证据, 表明 N-(4-羟苯基) 视黄酰胺能够在某些培养的人 RPE 细胞中诱导神经元样分化。参见, Chen, S., 等人, *J. Neurochem.*, 84:972-81(2003)。

[0120] 令人惊奇地, 式 (I) 的化合物可以为患有或易患黄斑变性和营养不良, 包括但不限于干性与年龄相关的黄斑变性和 Stargardt 病的患者提供益处。具体地, 式 (I) 的化合物为这些人类患者提供如下的益处中的至少一些: 减少全反式视黄醛 (atRAL) 的量, 减少 A2E 的产生, 减少脂褐素的产生, 减少玻璃疣的产生, 和降低光敏度。在眼和视觉组织中形成 A2E 的趋势降低, 部分地是通过降低这些组织中全反式视黄醛的过度蓄积而导致的。由于 A2E 本身对 RPE 是有细胞毒性的 (其可导致视网膜死亡), 因此施用具有式 (I) 结构的化

合物（如上所述，单独，或与其他药剂组合）降低了细胞毒素剂 A2E 的蓄积率，这样就为患者提供了益处。此外，由于 A2E 是脂褐素的主要荧光团，在眼和视觉组织中减少 A2E 的量也会降低这些组织中脂褐素蓄积的趋势。因此，在一些方面，可以认为所述的方法和组合物是基于脂褐素的治疗，因为施用具有式 (I) 结构的化合物（如上所述，单独，或与其他药剂组合）减少、降低或影响了在眼和 / 或视觉组织中脂褐素的蓄积。在眼和 / 或视觉组织中脂褐素蓄积率的降低对患有例如黄斑变性和 / 或营养不良等疾病或病症的患者是有益的。

[0121] 此外，由于干性与年龄相关的黄斑变性一般是湿性与年龄相关的黄斑变性的前兆，使用式 (I) 的化合物也可以用作对后一种眼部病症的预防疗法。此外，式 (I) 的化合物可以为湿性与年龄相关的黄斑变性提供进一步的治疗效果，因为这些化合物另外还有抗血管形成活性。

[0122] 视觉循环。脊椎动物的视网膜包含两种类型的感光细胞 - 视杆和视锥。视杆是专用于低光条件下的视觉。视锥的敏感度较低，以较高的时间和空间分辨率提供视觉，并提供色觉。在日光条件下，视杆应答是饱和的，视觉完全由视锥来介导。这两种细胞类型都包含称作外节的结构，其包含一套膜盘。视觉转导反应发生在这些膜盘的表面，视觉的第一步是由视蛋白 - 色素分子（视紫质）吸收光子，这涉及生色团从 11- 顺式到全反式的异构化作用。在恢复光敏度之前，所生成的全反式视黄醛必须在多酶过程中转化回 11- 顺式视黄醛，该多酶过程发生在靠近视网膜的单层细胞 - 视网膜色素上皮中。

[0123] 在眼中维生素 A 适当的内稳态依赖于视黄醇从血清向 RPE 中的递送和细胞内维生素 A 贮存的处理。在进入视网膜色素上皮细胞 (RPE) 后，视黄醇酯通过视黄醇酰基转移酶 (LRAT) 转化为脂肪酰酯（全反式视黄酯）。全反式视黄酯通过连续的水解 / 异构化和氧化，分别通过 Rpe65 和 11- 顺式特异性视黄醇脱氢酶 (11cRDH) 转变为视觉生色团 (11- 顺式视黄醛)。细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP) 结合 11- 顺式视黄醛并将其运输到 RPE 的顶突位。在通过光感受器间基质传递后，11- 顺式视黄醛与视蛋白结合，在视网膜的感光细胞中形成视紫质。光暴露下将 11- 顺式视黄醛异构化为全反式视黄醛，并开始转导串联，产生视觉刺激。通过全反式视黄醇脱氢酶 (atRDH) 促进了将全反式视黄醛还原为全反式视黄醇。全反式视黄醇剩余下感光细胞，并通过 RPE 的顶位再进入视觉循环。

[0124] 除了视觉生色团的合成和再循环，RPE 也在维持视网膜的感光细胞的健康中发挥重要作用。在此方面，关键的过程是白天脱落的光感受器外节 (POS) 盘膜的吞噬作用。POS 盘的远侧部的约 10% 脱落到 RPE 中并被其消化。在 POS 和感光细胞体之间的连接纤毛之间不断形成了新生的盘膜，盘膜替代了脱落的盘，因此维持了感光细胞的长度、结构和功能。

[0125] 脂褐素在 RPE 细胞中蓄积是富集视黄醛的 POS 碎片的不完全消化导致的。在眼部脂褐素中主要的毒性荧光团是二 - 类视黄醇化合物、N- 亚视黄基 -N- 视黄基乙醇胺 (A2E)。A2E 显示出可以通过不同的机制损害 RPE 细胞的完整性，最终导致 RPE 细胞死亡。RPE 支持作用的缺失导致视网膜死亡，最终导致视力丧失。在 ABCA4 基因中包含突变体的小鼠和人中发现了脂褐素和 A2E 的水平升高。ABCA4 编码光感受器 - 特异性蛋白 (ABCR)，后者从光感受器外节中除去视黄醛 - 脂结合物。导致该蛋白缺失的病理学可以容易地在由 abca4^{-/-} 小鼠制备的 RPE 的电子显微图像中观测到。

[0126] 在 abca4^{-/-} 小鼠的眼组织中获得的提取物的生物化学分析确定了全反式视黄醛是 A2E 生物合成途径的第一反应物。通过在全黑暗中饲养年龄较小的 abca4^{-/-} 小鼠证明

了 A2E 生物合成的光 - 依赖性。该治疗阻止了 A2E 的蓄积,产生了下列假说:在视觉循环中限制光漂白的程度和 / 或降低视黄醛的水平将减少 A2E 的蓄积。

[0127] 黄斑或视网膜变性和营养不良。黄斑变性 (也称视网膜变性) 是一种涉及视网膜的中央部分 - 黄斑的变性的一种眼部疾病。在黄斑变性的病例中约 85% 到 90% 是“干”(萎缩或非新生血管) 性类型。在干性黄斑变性中,视网膜的变性与黄斑下小的黄色沉积物,即玻璃疣的形成有关;此外,在 RPE 中脂褐素的蓄积导致了光感受器变性和地理性萎缩。该现象导致了黄斑的变薄和干燥。在视网膜中玻璃疣导致的变薄的位置和量与中央视觉丧失的量直接相关。视网膜的色素层和玻璃疣上的光感受器的变性变成萎缩性的,并可以导致中央视觉的缓慢丧失。最后,视网膜色素上皮和其下的感光细胞的丧失导致了地理性萎缩。给哺乳动物施用至少一种具有式 (I) 结构的化合物可以在哺乳动物眼中减少光感受器变性和 / 或地理性萎缩的产生,或限制它们的扩散。仅仅是用于举例,给哺乳动物施用 HPR 和 / 或 MPR 可以用于在哺乳动物眼中治疗光感受器变性和 / 或地理性萎缩。

[0128] 在“湿性”黄斑变性中,新血管形成 (即,新生血管形成) 以改善向视网膜组织,特别是黄斑下的血液供应,黄斑是负责我们的清晰中央视觉的视网膜的一部分。该新血管是容易被损坏的,有时会破裂,导致出血和伤害周围的组织。尽管在所有的黄斑变性病例中仅有约 10% 发生湿性黄斑变性,但它是约 90% 与黄斑变性有关的失明发生的原因。新生血管形成可以导致视觉的快速丧失,最终导致视网膜组织的瘢痕化和眼出血。该瘢痕组织和血液在视觉中产生了暗的、变形的区域,通常导致眼睛在法律上失明。湿性黄斑变性通常从中央视野的变形开始。直线变成了波浪状。许多患有黄斑变性的人也报告在他们的视野中发生视力模糊和空白斑 (暗点)。生长促进蛋白,也称作血管内皮生长因子或 VEGF, 已被发现触发眼内的这种异常血管生长。这个发现引导人们积极地研究抑制或阻断 VEGF 的实验性药物。研究表明,抗 VEGF 剂可以用于阻断和预防异常的血管生长。这些抗 VEGF 剂停止或抑制了 VEGF 的刺激作用,因此使血管生长较少。这些抗 VEGF 剂也可以成功地抗血管生成或阻断 VEGF 诱导视网膜下血管生长的能力,以及阻止血管渗漏。给哺乳动物施用至少一种具有式 (I) 结构的化合物可以在哺乳动物眼中减少湿性与年龄相关的黄斑变性的产生,或限制其扩散。仅仅是用于举例,给哺乳动物施用 HPR 和 / 或 MPR 可以用于在哺乳动物眼中治疗湿性与年龄相关的黄斑变性。类似地,式 (I) 的化合物 (仅仅是用于举例,包括 HPR 和 / 或 MPR) 可以用于治疗哺乳动物眼的脉络膜新生血管形成和黄斑下异常血管的形成。这些治疗作用可以导致很多效果:降低血清视黄醇,因此降低了眼部视黄醇水平;抗血管形成活性和 / 或抑制地理性萎缩。

[0129] Stargardt 病是在儿童期发生的表现为隐性黄斑变性的黄斑营养不良。参见,例如 Allikmets 等人, *Science*, 277 :1805-07 (1997); Lewis 等人, *Am. J. Hum. Genet.*, 64 :422-34 (1999); Stone 等人, *Nature Genetics*, 20 :328-29 (1998); Allikmets, *Am. J. Hum. Gen.*, 67 :793-799 (2000); Klevering, 等人, *Ophthalmology*, 111 :546-553 (2004)。Stargardt 病的临床特征是,中央视觉的逐步丧失和黄斑上的 RPE 的逐步萎缩。编码 Rim 蛋白 (RmP) 的人 ABCA4 基因的突变是 Stargardt 病发生的原因。在该病程的早期,患者表现为暗适应迟缓,但视杆功能正常。从组织学上讲,Stargardt 病与 RPE 细胞中脂褐素色素颗粒的沉积有关。

[0130] ABCA4 的突变也涉及隐性视网膜色素变性,参见例如 Cremers 等人, *Hum. Mol.*

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

[0131] 此外, 有几种类型的黄斑变性影响到儿童、青少年或成人, 通常称作早发性或青少年性黄斑变性。这些类型中许多都是遗传性的, 可以看作是黄斑营养不良, 而不是变性。黄斑营养不良的一些例子包括: 视椎 - 视杆营养不良、角膜营养不良、Fuch 营养不良、Sorsby 黄斑营养不良、贝斯特病、和青少年性视网膜劈裂症, 以及 Stargardt 病。

[0132] 化学术语

[0133] “烷氧”基涉及 (烷基)O- 基团, 其中烷基如本文所述定义。

[0134] “烷基”涉及脂肪族烃基。烷基部分可以是“饱和烷基”基团, 这意味着其不包含任何烯烃或炔烃部分。“烯烃”部分是指包含至少两个碳原子和至少一个碳 - 碳双键的基团, “炔烃”部分是指包含至少两个碳原子和至少一个碳 - 碳三键的基团。无论饱和还是不饱和的烷基部分, 都可以是有支链的、直链的, 或环状的。

[0135] “烷基”部分可以有 1 到 10 个碳原子 (无论其在何时出现, 数值范围例如“1 到 10”均指在给定范围内的每个整数; 例如“1 到 10 个碳原子”是指烷基可以包含 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子, 等等, 乃至并包括 10 个碳原子, 尽管该定义也包括了没有指出数值范围的术语“烷基”的情况)。烷基也可以是具有 1 到 5 个碳原子的“低级烷基”。所述化合物的烷基可以被指定为“C₁-C₄ 烷基”或类似的定义。仅仅是用于举例, “C₁-C₄ 烷基”是指在烷基链上有 1 到 4 个碳原子, 即该烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。典型的烷基包括但不限于, 甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、乙烯基、丙烯基、丁烯基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基等等。

[0136] 术语“烷基胺”涉及 -N(烷基)_xH_y 基团, 其中 x 和 y 选自 x = 1, y = 1 和 x = 2, y = 0。当 x = 2 时, 烷基可一起任选地形成环系统。

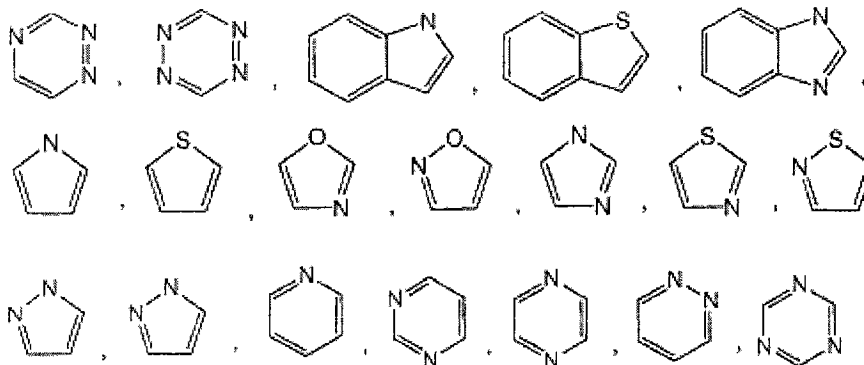
[0137] 术语“烯基”是指烷基的一种类型, 其中烷基最先的 2 个原子形成双键, 其中该双键不属于芳香基的一部分。即, 烯基是以原子 -C(R) = C-R 开始的, 其中 R 是指烯基的剩余部分, 其可以相同或不同。烯基的非限制性例子包括 -CH = CH、-C(CH₃) = CH、-CH = CCH₃ 和 -C(CH₃) = CCH₃。烯基部分可以是支链的、直链的, 或环状的 (在该情况下, 也可称作“环烯基”)。

[0138] 术语“炔基”是指烷基的一种类型, 其中烷基最先的 2 个原子形成三键。即炔基是以原子 -C ≡ C-R 开始的, 其中 R 是指炔基的剩余部分, 其可以相同或不同。炔基的非限制性例子包括 -C ≡ CH、-C ≡ CCH₃、-C ≡ CCH₂CH₃。炔基部分的“R”部分可以是支链的、直链的, 或环状的。

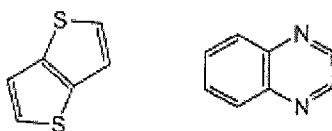
个或多个骨架链原子选自碳以外的原子,例如氧、氮、硫、磷或它们的组合。

[0150] 术语“杂芳基”或“杂芳香基”是指包含一个或多个选自氮、氧和硫的环杂原子的芳基。包含 N 的“杂芳香基”或“杂芳基”部分是指环的至少一个骨架原子是氮原子的芳香基团。多环杂芳基可以是稠环的或非稠环的。杂芳基的示例性例子包括下列的部分:

[0151]



[0152]

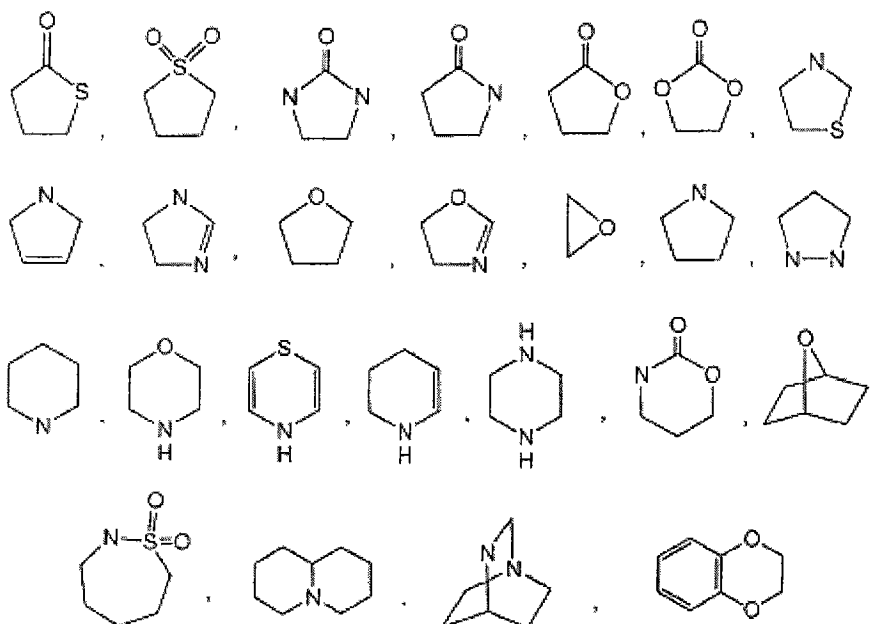


[0153] 等等。

[0154] 术语“杂环”是指包含 1 到 4 个分别选自 O、S 和 N 的杂原子的杂芳香环和杂脂肪环基,其中每个杂环基在其环系统上有 4 到 10 个原子,条件是所述基团的环不包含 2 个邻近的 O 或 S 原子。非芳香杂环基包括在其环系统上仅有 4 个原子的基团,但芳香杂环基在其环系统上必须有至少 5 个原子。杂环基包括苯并稠合环系统。4 元杂环基的一个例子是氮杂环丁基(来自氮杂环丁烷)。5 元杂环基的一个例子是噻唑基。6 元杂环基的一个例子是吡啶基、10 元杂环基的一个例子是喹啉基。非芳香杂环基的例子是吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢噻喃基、哌啶子基、吗啉代基、硫吗啉基、噻噁基、哌嗪基、氮杂环丁基、环氧丙基、硫杂环丁烷基、高哌啶基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基、氧代杂萘基、二氮杂萘基、硫代杂萘基、1,2,3,6-四氢哌啶基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、二氢吲哚基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二噁烷基、1,3-二氧戊环基、吡唑啉基、二噻烷基、二硫代戊基、二氢吡喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡咯烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、3-氮杂双环并[3.1.0]环己基、3-氮杂双环并[4.1.0]环戊基、3H-吲哚基和喹啉基。芳香杂环基的例子是吡啶基、咪唑基、嘧啶基、吡唑基、噻唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噻唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、吲哚基、酞嗪基、哒嗪基、三嗪基、异吲哚基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、噻二唑基、氟咱基、苯并氟咱基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹啉基、喹噁啉基、蔡啶基和呋喃并吡啶基。上述基团,当衍生自上述基团时,如果可能,可以是 C-连接或 N-连接的。例如,衍生自吡咯的基团可以是吡咯-1-基(N-连接)或吡咯-3-基(C-连接)。此外,衍生自咪唑的基团可以是咪唑-1-基或咪唑-3-基(均是 N-连接),或咪唑-2-基、咪唑-4-基或咪唑-5-基(均是 C-连接)。这些杂环基包括苯并稠合的环系统和被一个或两个氧(=O)部分取代的环系统,例如吡咯烷-2-酮。

[0155] “杂脂肪环”基是指包含至少一个选自氮、氧和硫的杂原子的环烷基。该基团可以与芳基或杂芳基稠合。杂环烷基的示例性例子包括：

[0156]



[0157] ，等等。术语杂脂肪环也包括糖类的所有环状形式，包括但不限于单糖、二糖和寡糖。

[0158] 术语“元环”可以包括所有的环状结构。术语“元”是指构成环的骨架原子的数目。因此，例如环己基、吡啶、吡喃和噻喃是 6 元环，环戊基、吡咯、呋喃和噻吩是 5 元环。

[0159] “异氰氧基”是指 $-NCO$ 基团。

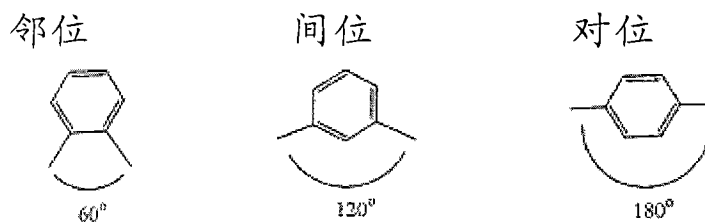
[0160] “异氰硫基”是指 $-NCS$ 基团。

[0161] “缩硫基”是指 (烷基)S- 基团。

[0162] 此处的术语“亲核试剂”和“亲电子试剂”具有在合成和 / 或物理有机化学中熟知的通常含义。碳亲电子试剂典型地包含一个或多个烷基、烯基、炔基或芳香族 (sp^3 、 sp^2 或 sp 杂化) 碳原子，其被 Pauling 电负性大于碳本身的任意原子或基团取代。碳亲电子试剂的例子包括但不限于，羰基 (醛、酮、酯、酰胺)、肟、腙、环氧化物、氮丙啶、烷基、烯基，和芳基卤化物、酰基、磺酸酯 (芳基、烷基等等)。碳亲电子试剂的其他例子包括与吸电子基团电子共轭的不饱和碳原子，例如在 α - 不饱和酮中的 β - 碳或在氟代芳基中的碳原子。制备碳亲电子试剂，特别是制备精确控制的产物的方法，是有机合成领域的技术人员已知的。

[0163] 芳族取代基的相对排列 (邻位、间位和对位) 赋予了这些立体异构体的特征性的化学作用，而且在芳族化学领域是公认的。对位和间位的取代类型使这两种取代基进入了不同的定向。邻位排列的取代基相互之间定向于 60° ；间位排列的取代基相互之间定向于 120° ；对位排列的取代基相互之间定向于 180° 。

[0164]



[0165] 取代基的相对排列,即,邻位、间位和对位,也会影响取代基的电子性质。不受任何特定类型或水平的理论的限制,已知邻位和对位排列的取代基相互之间的电子影响程度大于相应的间位-排列的取代基。间位-二取代的芳族通常用不同于相应的邻位和对位-二取代芳族的途径来合成。

[0166] 术语“部分”是指分子的特定片段或官能团。化学部分是包埋或附着于分子上的公认的化学个体。

[0167] 术语“键”或“单键”是指当通过键连接的原子被认为是较大亚结构的一部分时,两个分子或两个部分之间的化学键。

[0168] “亚磺酰基”是指 $-S(=O)-R$, 其中 R 选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳键合)和杂脂肪环(通过环碳键合)。

[0169] “磺酰基”是指 $-S(=O)_2-R$, 其中 R 选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳键合)和杂脂肪环(通过环碳键合)。

[0170] “氰硫基”是指 $-CNS$ 。

[0171] 术语“任选取代”是指所述基团可以被一个或多个其他的基团分别和独立地取代,该其他的基团选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂脂肪环、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、烷基硫、芳基硫、氰基、卤素、羰基、硫代羰基、异氰基、氰硫基、异氰硫基、硝基、全卤代烷基、全氟代烷基、甲硅烷基和氨基,包括单和双取代氨基,以及它们的保护性衍生物。可以形成上述取代基的保护性衍生物的保护基是本领域已知的,而且可以在参考文献例如 Greene 和 Wuts 的上述文献中找到。

[0172] 上述的化合物可以具有一个或多个手性中心,每个中心可以以 R 或 S 构型存在。所述的化合物包括所有的非对映体、对映异构体、差向异构体以及它们适当的混合物。如果需要,可以通过本领域已知的方法,例如通过手性色谱柱分离立体异构体来获得立体异构体。

[0173] 本文所述的方法和制剂包括使用具有式 (I) 结构的化合物的 N-氧化物、晶体形式(也称作多晶形物)、或药学可接受的盐,以及具有同样类型活性的这些化合物的活性代谢物。仅仅是用于举例,芬维 A 胺的一种已知的代谢物是 N-(4-甲氧苯基)视黄酰胺,也被称作 4-MPR 或 MPR。芬维 A 胺的另一种已知的代谢物是 4-氧代芬维 A 胺。在一些情况中,化合物可以作为互变异构体存在。所有的互变异构体都包括在本文所述化合物的范围内。此外,所述化合物可以与药学可接受的溶剂例如水、乙醇等以非溶剂化以及溶剂化的形式存在。所述化合物的溶剂化形式也被认为是本文所公开的。

[0174] 药物组合物

[0175] 另一方面是药物组合物,包含式 (I) 的化合物和药学可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

[0176] 术语“药物组合物”是指式 (I) 的化合物和其他化学组分,例如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、助悬剂、增稠剂和 / 或赋形剂的混合物。该药物组合物促进了将化合物施用到

机体中。在本领域存在施用化合物的多种技术,包括但不限于:静脉内、口服、气雾剂、胃肠外、眼部、肺部和局部施用。

[0177] 术语“载体”是指相对无毒性的化学化合物或药剂,其有利于化合物结合到细胞或组织中。

[0178] 术语“稀释剂”是指在递送前用于稀释感兴趣的化合物的化学化合物。稀释剂也可以用于稳定化合物,因为它们能提供更稳定的环境。溶解在缓冲溶液中的盐(其也可以提供 pH 的控制或维持)在本领域中用作稀释剂,包括但不限于磷酸盐缓冲盐溶液。

[0179] 术语“生理学可接受的”是指例如载体或稀释剂的物质,其不会消除化合物的生物活性或性质,并且是无毒性的。

[0180] 术语“药学可接受的盐”是指不会对所施用的机体产生显著刺激并不会消除化合物的生物活性或性质的化合物的制剂。药学可接受的盐可以如下获得,将式(I)的化合物与酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等等反应。药学可接受的盐也可以如下获得,将式(I)的化合物与碱反应,形成盐,例如铵盐、碱金属盐,例如钠或钾盐、碱土金属盐,例如钙或镁盐、有机碱例如二环己胺, N-甲基-D 葡萄糖胺,三(羟基甲基)甲胺的盐,和氨基酸例如精氨酸,赖氨酸等等的盐,或使用本领域已知的其他方法。

[0181] 本文所公开的化合物的“代谢物”是在化合物代谢时形成的该化合物的衍生物。术语“活性代谢物”是指在化合物代谢时形成的化合物的生物活性衍生物。术语“代谢”是指机体转变特定物质的全过程(包括但不限于,水解反应和由酶催化的反应)。因此,酶可以对化合物产生特定的结构改变。例如,细胞色素 P450 催化多种氧化和还原反应,而二磷酸尿苷葡萄糖醛酰基转移酶催化活化的葡萄糖醛酸分子转变成芳香醇、脂肪醇、羧酸、胺和游离巯基。关于代谢的其他信息可以从 The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第 9 版, McGraw-Hill (1996) 中获得。

[0182] 本文所公开的化合物的代谢物的鉴定包括,给宿主施用化合物并分析宿主的组织样本,或者在体外将化合物和肝细胞一起培养,然后分析所得到的化合物。这两种方法都是本领域公知的。

[0183] 仅仅用于举例,MPR 是已知的 HPR 的代谢物,这两种物质都包含在式(I)的结构中。MPR 在用 HPR 长期治疗的患者体内全身性地蓄积。MPR 全身性蓄积的一个原因是由于 HPR 被代谢为 MPR,而 MPR 仅能(即使有的话)缓慢地代谢。此外,MPR 可能具有相对较慢的清除率。因此,(a) 当施用 HPR 并确定其生物利用度时,必须考虑 MPR 的药代动力学和药效学,(b) 对于代谢,MPR 比 HPR 更稳定,和 (c) 在吸收后 MPR 比 HPR 能更迅速地生物利用。芬维 A 胺的另一种已知的代谢物是 4-氧代芬维 A 胺。

[0184] MPR 也可以被认为是一种活性代谢物。如附图 9 和 10 所示,MPR(类似于 HPR)可以与视黄醇结合蛋白(RBP)结合并阻止 RBP 结合到运甲状腺素蛋白(TTR)上。因此,当 HPR 或 MPR 施用于患者时,所得到的期望的特征之一是 MPR 将蓄积并结合到 RBP 上,抑制视黄醇与 RBP 的结合以及 RBP 与 TTR 的结合。因此,MPR 可以 (a) 作为视黄醇与 RBP 结合的抑制剂,(b) 作为 RBP 与 TTR 结合的抑制剂,(c) 限制视黄醇向某些组织,包括眼组织的运输,和 (d) 被 RBP 运输到某些组织,包括眼组织。MPR 所显示出的与 RBP 的结合比 HPR 更弱,因此,它是视黄醇与 RBP 结合强度较小的抑制剂。尽管如此,预计 MPR 和 HPR 都可以近似等价

地抑制 RBP 与 TTR 的结合。在这些方面,MPR 的作用模式与 HPR 相同,可以作为所述方法和组合物中的治疗剂。

[0185] “前药”是指在体内转换成母体药物的药剂。前药通常是有用的,因为在一些情况下,它们比母体药物更易于施用。它们可以,例如通过口服而生物利用,而母体药物却不能。与母体药物相比,前药在药物组合物中的溶解性也能改善。前药的一个非限制性的例子是式 (I) 的化合物,其作为酯 (“前药”) 施用可以促进跨细胞膜递送,在细胞膜处水溶性对于移动是不利的,然后其一旦进入水溶性有利的细胞内,即代谢水解成作为活性个体的羧酸。前药的另一个例子是结合到酸基上的短肽 (聚氨基酸),其中该肽经代谢露出活性部分。

[0186] 可以给人类患者施用所述化合物本身,或者在其与其他活性成分、或适当的一种或多种载体或赋形剂混合的药物组合物中施用作为联合治疗。本申请的化合物的制备和施用技术可以在 “Remington :The Science and Practice of Pharmacy, ” 20th ed. (2000) 中找到。

[0187] 给药途径

[0188] 适当的给药途径可以是,例如,包括口服、直肠、经粘膜、经皮、肺或肠内施用;胃肠外递送,包括肌内、皮下、静脉、髓内注射,以及鞘膜内、直接心室内、腹膜内或鼻内注射。

[0189] 或者,人们可以用局部而非全身性给药的方式施用该化合物,例如,通常在长效或持续释放制剂中将该化合物直接注射到器官中。该脂质体将靶向至器官并被器官选择性地吸收。此外,药物可以为快速释放制剂的形式,延长释放制剂的形式,或中级释放制剂的形式。

[0190] 组合物 / 制剂

[0191] 包含式 (I) 的化合物的药物组合物可以用本身已知的方法制备,例如通过常规混合、溶解、粒化、制糖衣、研磨、乳化、包囊、陷入或压缩的方法。

[0192] 药物组合物可以按常规的方法,用一种或多种生理可接受的载体,包括赋形剂和辅料来配制,其中所述赋形剂和辅料有助于将活性化合物加工为药学上可用的制剂。适当的制剂取决于所选择的给药途径。任何公知的技术、载体和赋形剂都是可以适当使用的,并且是本领域技术可以理解的;例如,在上述 Remington' s Pharmaceutical Sciences 中。

[0193] 式 (I) 的化合物可以通过各种方法施用,包括全身性地,例如口服或静脉内施用。

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

[0195] 有用的水混悬液也可以包含一种或多种聚合物作为助悬剂。有用的聚合物包括水溶性聚合物例如纤维素聚合物如羟丙基甲基纤维素,和水不溶性聚合物例如交联的含羧基聚合物。有用的组合物也可以包含眼科可接受的粘膜粘着的聚合物,选自例如羧甲基纤维素、卡波姆 (丙烯酸聚合物)、聚 (甲基异丁烯酯)、聚丙烯酰胺、聚卡波非、丙烯酸 / 丙烯酸丁酯共聚物、海藻酸钠和葡聚糖。

[0196] 有用的组合物也可以包括有助于式 (I) 的化合物溶解的增溶剂。术语 “增溶剂” 一般包括导致该药剂的胶束溶液或真正的溶液形成的试剂。一些可接受的非离子型表面活

性剂,例如聚山梨酯 80 可以用作增溶剂,以及可接受的乙二醇、聚乙二醇例如聚乙二醇 400 和乙二醇醚。

[0197] 有用的组合物也可以包含一种或几种 pH 调节剂或缓冲剂,包括酸,例如乙酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸和盐酸;碱,例如氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、乳酸钠和氨基丁三醇;和缓冲剂,例如柠檬酸/葡萄糖、碳酸氢钠和氯化铵。包含一定量的所述酸、碱和缓冲液,以维持该组合物的 pH 值在可接受的范围内。

[0198] 有用的组合物也可以包含一定量的一种或多种可接受的盐,该盐的量是能将组合物的重量摩尔渗透压浓度调整到可接受的范围内所需要的。这些盐包括含有钠、钾或铵阳离子和氯、柠檬酸、抗坏血酸、硼酸、磷酸、碳酸氢、硫酸、硫代硫酸或重亚硫酸阴离子的盐;适当的盐包括氯化钠、氯化钾、硫代硫酸钠、重亚硫酸钠和硫酸铵。

[0199] 其它有用的组合物也可以包含一种或多种可接受的防腐剂,以抑制微生物的活性。适当的防腐剂包括含汞的物质,例如硼酸苯汞和硫柳汞;稳定的二氧化氯;和季铵类化合物例如苯扎氯胺、西曲溴胺和西吡氯胺。

[0200] 其它有用的组合物可以包含一种或多种可接受的表面活性剂,以增强物理稳定性或用于其它目的。适当的非离子型表面活性剂包括聚氧乙烯脂肪酸甘油酯和植物油,例如聚氧乙烯(60) 氢化蓖麻油;和聚氧乙烯烷基醚和烷基苯基醚,例如辛苯聚醇 10、辛苯聚醇 40。

[0201] 需要时其它有用的组合物可以包含一种或多种抗氧化剂,以增强化学稳定性。仅仅是用于举例,适当的抗氧化剂包括,抗坏血酸和偏重亚硫酸钠。

[0202] 水混悬液组合物可以包装在单剂量的不可再密闭的容器中。或者,也可使用多剂量的可再密闭的容器,在此情况下典型地在组合物中包含防腐剂。

[0203] 对于静脉注射,式(I)的化合物可以配制成水溶液,优选是生理上相容的缓冲液,例如汉克斯溶液、林格溶液或生理盐水缓冲液。对于经粘膜施用,在制剂中使用适合透过屏障的渗透剂。这些渗透剂是本领域公知的。对于其它胃肠外注射,适当的制剂可以包括水或非水溶液,优选含生理上相容的缓冲液或赋形剂。这些赋形剂是本领域公知的。

[0204] 仅仅是用于举例,用于增溶较大量的式(I)的化合物的一种有用的制剂是带有阴性、阳性或中性电荷的磷脂、或胆汁盐/磷酸卵磷脂混合的脂类聚集系统,例如在 Li, C. Y., 等人, Pharm. Res. 13 :907-913(1996) 中所述。可以用于相同目的的含有具有式(I)结构的化合物的其他制剂包括使用包含醇例如乙醇和烷氧化蓖麻油的组合溶剂。参见,例如美国专利公开号 U. S. 2002/0183394。或者,包含式(I)的化合物的制剂是乳剂,其由分散在水相的类脂、稳定量的非离子型表面活性剂、任选的溶剂和任选的等渗剂组成。出处同上。包含式(I)的化合物的另一种制剂包含玉米油和非离子型表面活性剂。参见 U. S. 4, 665, 098。包含式(I)的化合物的另一种制剂包含溶血磷脂胆碱、甘油一酯和脂肪酸。参见 U. S. 4, 874, 795。包含式(I)的化合物的另一种制剂包含面粉、增甜剂和湿润剂。参见国际公开号 W02004/069203。包含式(I)的化合物的另一种制剂包含二豆蔻酰磷脂酰胆碱、大豆油、叔丁醇和水。参见美国专利申请公开号 U. S. 2002/0143062。

[0205] 对于口服,可以容易地配制式(I)的化合物,包括将活性物质和本领域公知的药学可接受的载体或赋形剂组合。这些载体能将所述化合物配制成片剂、粉末、丸剂、糖锭、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆剂、酞剂、膏剂、混悬液等等,以供要治疗的患者口服。供口服的药物

制剂可以如下获得,将一种或多种固体赋形剂与一种或多种所述的化合物混合,任选粉碎所得的混合物,如果需要,在加入适当的辅料后处理颗粒的混合物,以获得片剂或糖锭核。特别地,适当的赋形剂是,填充剂例如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇;纤维素制剂例如,玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;或其它,例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP或聚维酮)或磷酸钙。如果需要,可以加入崩解剂,例如交联羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐例如海藻酸钠。

[0206] 可以为糖锭核提供适当的包衣。为此目的,可以使用浓的糖溶液,其任选可包含阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、聚羧乙烯凝胶、聚乙二醇、和/或二氧化钛、漆溶液和适当的有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或色素加入到片剂或糖锭的包衣中,以识别或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0207] 可以用于口服的药物制剂,例如包括由明胶制成的推入配合式胶囊,以及由明胶和增塑剂例如甘油或山梨糖醇制成的密封软胶囊;或硬凝胶胶囊或片剂。推入配合式胶囊可以包含与填充剂例如乳糖,粘合剂例如淀粉,和/或润滑剂例如滑石或硬脂酸镁,和任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性化合物可以溶解或悬浮在适当的液体,例如脂肪油、液状石蜡或液体聚乙二醇中。另外,可以加入稳定剂。供口服的所有制剂应为适合这种施用的剂量。

[0208] 对于含服或舌下含化,该组合物可以采用以常规方法配制成的片剂、锭剂或凝胶的形式。

[0209] 用于施用具有式(I)结构的化合物的另一种有用的制剂可以使用透皮递送装置(“贴剂”)。这些透皮贴剂可以用于以可控的量为本发明的化合物提供连续或非连续的输注。递送药剂的透皮贴剂的构造和使用是本领域公知的,参见例如U. S. 5, 023, 252。这些贴剂可以构造成用于药剂的连续、脉冲或按需要递送。另外,可以通过离子电渗贴剂等等实现式(I)的化合物的透皮递送。透皮贴剂可以为化合物提供可控的递送。通过使用控速膜或通过化合物包埋到聚合物基质或凝胶中可以减慢吸收速率。相反地,可以使用吸收增强剂来增加吸收。适合透皮施用的制剂可以作为分离的贴剂存在,可以是亲脂的乳剂或缓冲水溶液,其溶解和/或分散在聚合物或粘合剂中。

[0210] 对于通过吸入施用,式(I)的化合物以喷雾剂的形式进行方便的递送,该喷雾剂来自于加压包装或雾化器,并使用适当的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适当的气体。在加压气雾剂的情况下,剂量单位可以通过一个阀门来决定,以递送经计算的量。供吸入剂或吸入器使用的例如明胶胶囊和药筒可以配制成包含该化合物和适当的粉末基质例如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0211] 该化合物可以配制成通过注射,例如通过快速注射或连续输注进行胃肠外施用。用于注射的制剂可以以单位剂量形式存在,例如在安瓿或者多剂量容器中,其还包含添加的防腐剂。组合物可以采用在油性或水性载体中的混悬液、溶液或乳剂的形式,可以包含配制剂例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0212] 用于胃肠外施用的药物制剂包括水溶性形式的活性化合物的水溶液。此外,活性化合物的混悬液可以制备成适当的油性注射混悬液。适当的亲脂溶剂或载体包括脂肪油,例如芝麻油,或合成的脂肪酸酯,例如油酸乙酯或甘油三酯,或脂质体。水性注射混悬液可

以包含增加混悬液粘性的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,该混悬液也包含适当的稳定剂或增加化合物溶解性的药剂,以允许制备高度浓缩的溶液。

[0213] 或者,活性成分可以是粉末形式,在使用前用适当的载体例如不含热原的灭菌水配制。

[0214] 该化合物也可以配制成直肠用组合物,例如直肠凝胶、直肠泡沫剂、直肠气雾剂、栓剂或保留灌肠剂,例如包含常规的栓剂基质如可可脂或其他的甘油酯。

[0215] 除了前述的制剂以外,该化合物也可以配制成长效制剂。这些长效制剂可以通过植入(例如皮下或肌内)或通过肌内注射来施用。因此,例如,该化合物可以与适当的聚合或疏水性物质(例如作为在可接受油中的乳剂)或离子交换树脂一起配制,或作为略溶的衍生物,例如略溶的盐。

[0216] 可注射的长效剂型的制备,包括在生物可降解的聚合物中形成式(I)的化合物的微囊化基质(也被称为微囊基质)。取决于药物和聚合物的比例以及所使用的特定聚合物的性质,药物释放的速率是可控的。长效可注射制剂的制备,也可以包括将药物包埋到脂质体或微乳液中。仅仅是用于举例,可以使用近巩膜后长效制剂作为式(I)的化合物的一种施用方式。巩膜是一个薄的无血管层,其在大部分脊椎动物眼周围包含高度有序的胶原网状结构。由于巩膜是无血管的,因此其可以用作一个天然的贮存所,注射的物质不能从其中快速清除或从眼中除去。用于将该化合物施用到眼睛巩膜层的制剂可以是任何适于通过适合注射到巩膜层中的小直径插管注射而应用于巩膜的剂型。可注射应用的剂型的例子是溶液、混悬液或胶体混悬液。

[0217] 疏水性的式(I)的化合物的药物载体是包含苯甲醇、非极性表面活性剂、可与水混溶的有机聚合物和水相的共溶剂系统。该共溶剂系统可以是10%乙醇、10%聚乙二醇300、10%聚乙二醇40、蓖麻油(PEG-40 蓖麻油)和70%水的溶液。该共溶剂系统良好地溶解疏水性化合物,在全身性施用其自身产生的毒性较小。自然地,该共溶剂系统的比例可以有较大的不同而不破坏其溶解性和毒性性质。此外,共溶剂组分可以不同:例如,可以使用其他的低毒性非极性表面活性剂替代PEG-40 蓖麻油,聚乙二醇300的份数可以不同;可以用其他生物相容的聚合物代替聚乙二醇,例如聚乙烯吡咯烷酮;而且在水溶液中可以包括其他的糖或多糖。

[0218] 或者,可以使用疏水性药物化合物的其他递送系统。脂质体和乳剂是疏水性药物的递送媒介物或载体的公知例子。尽管通常有较大的毒性,但也可以使用某些有机溶剂,例如N-甲基吡咯烷酮。此外,可以用持续释放系统,例如包含治疗剂的固体疏水性聚合物的半渗透性基质来递送该化合物。各种持续释放物质是已确定的,并且是本领域技术人员公知的。取决于其化学性质,持续释放胶囊可以在几周到超过100天内释放该化合物。根据治疗剂的化学性质和生物稳定性,可以使用稳定蛋白质的其他策略。

[0219] 一种施用具有式(I)结构的化合物的制剂已经与芬维A胺一起用于治疗成神经细胞瘤、前列腺和卵巢癌,其由Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama)以Lym-X-Sorb™的名称出售。该制剂包含有组织的脂质基质,其中该基质包括溶血磷脂胆碱、甘油单酯和脂肪酸,该制剂经设计以改善芬维A胺的口服利用度。该制剂,即包括溶血磷脂胆碱、甘油单酯和脂肪酸的口服制剂也可以改善具有式(I)结构的化合物的生物利用度,用于治疗眼部和视觉疾病和病症,包括但不限于黄斑变性和营养不良。该制剂可以在口服

组合物的范围内施用,包括例如,胶囊和粉末,可以悬浮在水中形成可饮用的组合物。

[0220] 本文所述的所有制剂都可以从抗氧化剂、金属螯合剂、含硫醇的化合物和其他常用的稳定剂中获得益处。这些稳定剂的例子包括但不限于 (a) 约 0.5% 到约 2% w/v 甘油, (b) 约 0.1% 到约 1% w/v 甲硫氨酸, (c) 约 0.1% 到约 2% w/v 单硫代甘油, (d) 约 1mM 到约 10mM EDTA, (e) 约 0.01% 到约 2% w/v 抗坏血酸, (f) 0.003% 到约 0.02% w/v 聚山梨酯 80, (g) 0.001% 到约 0.05% w/v 聚山梨酯 20, (h) 精氨酸, (i) 肝素, (j) 硫酸葡聚糖, (k) 环糊精, (l) 聚硫酸戊聚糖和其他类肝素, (m) 二价阳离子例如镁和锌; 或 (n) 它们的组合。

[0221] 许多式 (I) 的化合物可以提供为与药学上相容的平衡离子形成的盐。药学上相容的盐可以由很多酸来制备,包括但不限于,盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等等。与相应的游离酸或碱形式相比,盐在水性或其他质子溶剂中溶解度更大。

[0222] 治疗方法、剂量和联合治疗

[0223] 术语“哺乳动物”是指所有的哺乳动物,包括人。仅仅是用于举例,哺乳动物包括人、非人的灵长类、牛、狗、猫、山羊、绵羊、猪、大鼠、小鼠和兔。

[0224] 此处的术语“有效量”涉及所施用的化合物的量,其能在某种程度上减轻所要治疗的疾病、病症或病患中的一种或几种症状。

[0225] 包含本文所述化合物的组合物可以施用于预防性和/或治疗性疗法。所使用的术语“治疗”涉及预防性和/或治疗性疗法。在治疗性应用中,给已经患有疾病、病症或疾患的患者施用该组合物,其量足以治愈或至少部分地阻止该疾病、病症或疾患的症状。所使用的有效量取决于疾病、病症或疾患的严重度和病程,先前的治疗,患者的健康情况和对药物的应答,以及治疗医生的判断。可以认为,通过常规试验(例如,剂量增加的临床试验)来确定该治疗有效量在本领域的技术范围内

[0226] 在预防性应用中,给对特定疾病、疾患或病症敏感或有患病危险的患者施用包含所述化合物的组合物。该量定义为“预防有效量或剂量”。在该应用中,精确的剂量也取决于患者的健康状况、体重,等等。可以认为,通过常规试验(例如,剂量增加的临床试验)来确定该预防有效量在本领域的技术范围内。

[0227] 术语“增强”是指在效力或持续时间上提高或延长所需效应。因此,对于增强治疗剂的效果,术语“增强”涉及在效力或持续时间上提高或延长其他治疗剂对系统的作用的能力。此处的“增强有效量”涉及足以增强另一种治疗剂在所需的系统中的效果的量。当在患者中使用时,这样使用的有效量取决于疾病、病患或病症的严重度和病程,先前的治疗,患者的健康情况和对药物的应答,以及临床医生的判断。

[0228] 在患者的病症没有改善的情况中,经医生决定,可以长期地施用该化合物,也即,在较长的时间,包括贯穿患者生命的时间里施用,以改善或控制或限制患者疾病或病症的症状。

[0229] 在患者情况改善的情况下,经医生决定,可以连续地使用该化合物;或者,药物的施用可以暂时停止一定的时间(即,“休药期”)。

[0230] 一旦患者的情况发生改善,如果必要则施用维持剂量。随后,施用的剂量或频率,或两者,都可以作为症状的函数降低到保持疾病、病患或病症改善的水平。然而,一旦发生任何症状的复发,患者都可能需要长期的间歇性治疗。

[0231] 相应于所述量的给定药剂的量将根据各种因素而不同,例如特定的化合物、疾病

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

[0232] 在某些情况中，可适当地施用至少一种所述化合物（或其药学可接受的盐、酯、酰胺、前药或溶剂化物）和另一种治疗剂的组合。仅仅用于举例，如果患者接受一种所述化合物后产生的副作用之一是炎症，那么可适当地施用抗炎剂和初始治疗剂的组合。或者仅仅用于举例，施用佐剂来增强所述一种化合物的治疗有效性（即，佐剂本身仅有很小的治疗益处，但与另一种治疗剂组合时，可以增强对患者的总体治疗益处）。或者仅仅用于举例，施用一种所述化合物和也具有治疗益处的另一种治疗剂（其也包括一种治疗方案）可以增加患者所得到的益处。仅仅用于举例，在包括施用一种所述化合物的黄斑变性的治疗中，施用治疗黄斑变性的其他治疗剂或疗法也能为患者增加治疗益处。在所有情况中，无论所要治疗的疾病、疾患或病症如何，患者所得到的总体益处可能仅仅是两种治疗剂的加成作用，或者患者可以得到协同作用。

[0233] 具体地，可能的联合治疗的非限制性例子包括使用至少一种式 (I) 的化合物和一氧化氮 (NO) 诱导物、他汀类药物、带负电荷的磷脂、抗氧化剂、矿物质、抗炎剂、抗血管生成药、基质金属蛋白酶抑制剂和类胡萝卜素。在某些情况中，适当的组合药剂落在多重分类内（仅仅用于举例，叶黄素是抗氧化剂和类胡萝卜素）。此外，式 (I) 的化合物也可以与为患者提供益处的其它药剂一起施用，仅仅用于举例，包括 环孢霉素 A。

[0234] 此外，式 (I) 的化合物也可以和对患者产生叠加或协同益处的方法组合使用，仅仅用于举例，包括使用体外电渗法（也称作膜差别过滤法）、施用可植入的小型窥镜、玻璃疣的激光光凝术和微刺激疗法。

[0235] 抗氧化剂的使用也对黄斑变性或营养不良的患者显示了益处。参见例如，Arch. Ophthalmol., 119 :1417-36 (2001) ; Sparrow, 等人, J. Biol. Chem., 278 :18207-13 (2003)。可以与至少一种具有式 (I) 结构的化合物组合使用的适当的抗氧化剂的例子包括维生素 C、维生素 E、 β -胡萝卜素和其他类胡萝卜素、辅酶 Q、4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧基（也称 Tempol）、叶黄素、丁羟甲苯、白藜芦醇、trolox 类似物 (PNU-83836-E)、和越桔提取物。

[0236] 某些矿物质的使用也对黄斑变性或营养不良的患者显示了益处。参见例如，Arch. Ophthalmol., 119 :1417-36 (2001)。可以与至少一种具有式 (I) 结构的化合物组合使用的适当的矿物质的例子包括含铜的矿物质，例如氧化铜（仅仅用于举例）；含锌的矿物质，例如氧化锌（仅仅用于举例）和含硒的化合物。

[0237] 某些带负电荷的磷脂的使用也对黄斑变性或营养不良的患者显示了益处。参见例如，Shaban 和 Richter, Biol. Chem., 383 :537-45 (2002) ; Shaban, 等人, Exp. Eye Res., 75 :99-108 (2002)。可以与至少一种具有式 (I) 结构的化合物组合使用的适当的带负电荷的磷脂的例子包括心磷脂和磷脂酰甘油。当与具有式 (I) 结构的化合物组合使用时，带正电荷和 / 或中性的磷脂也能为患有黄斑变性或营养不良的患者提供益处。

[0238] 使用某些类胡萝卜素与在感光细胞中必需的光防护的维持有关。类胡萝卜素是

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

[0239] 在人体中,视网膜主要选择性地蓄积两种类胡萝卜素:玉米黄素和叶黄素。这两种类胡萝卜素被认为有助于保护视网膜,因为它们是强大的抗氧化剂并吸收蓝光。用鹌鹑进行的研究表明,缺乏类胡萝卜素的饮食的组使得视网膜只含低浓度的玉米黄素,并遭受了严重的光损害,这可以由数量很高的凋亡感光细胞来证明,而高玉米黄素浓度的组只有很小的损害。与至少一种具有式(I)结构的化合物组合的适当类胡萝卜素的例子包括叶黄素和玉米黄素,以及上述的任何类胡萝卜素。

[0240] 适当的一氧化氮诱导物包括在体内刺激内源性 NO 或提高内源性内皮细胞衍生舒张因子(EDRF)水平升高的化合物,或者其是一氧化氮合酶的底物。这些化合物包括,例如,L-精氨酸、L-高精氨酸和 N-羟基-L-精氨酸,包括它们的亚硝化和亚硝酰化类似物(例如亚硝化 L-精氨酸、亚硝酰化 L-精氨酸、亚硝化 N-羟基-L-精氨酸、亚硝酰化 N-羟基-L-精氨酸、亚硝化 L-高精氨酸和亚硝酰化 L-高精氨酸)、L-精氨酸的前体和/或其生理可接受的盐、包括,例如瓜氨酸、鸟氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸,包含至少一个所述氨基酸的多肽,精氨酸酶的抑制剂(例如 N-羟基-L-精氨酸和 2(S)-氨基-6-硼己酸)和一氧化氮合酶的底物,细胞因子、腺苷、缓激肽、钙网织蛋白、双醋苯啶和酚酞。EDRF 是一种内皮分泌的血管松弛因子,经鉴定是一氧化氮或其密切相关的衍生物(Palmer 等人, *Nature*, 327:524-526(1987); Ignarro 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9265-9269(1987))。

[0241] 他汀类药物可以作为降血脂剂和/或适当的一氧化氮诱导物。此外,他汀类药物的使用和延缓黄斑变性发生或发展之间的关系也得到了证实。G. McGwin, 等人, *British Journal of Ophthalmology*, 87:1121-25(2003)。因此,当与式(I)的化合物联合施用,他汀类药物能为患有眼部病症(例如黄斑变性和营养不良,和视网膜营养不良)的患者提供益处。仅仅是用于举例,适当的他汀类药物包括罗苏伐他汀、匹伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、西立伐他汀、美伐他汀、velostatin、氟伐他汀、康帕丁、洛伐他汀、达伐他汀、fluidostatin、阿伐他汀、阿伐他汀钙(其是阿伐他汀的半钙盐)和二氢康帕丁。

[0242] 仅仅用于举例,与式(I)的化合物一起使用的适当抗炎剂可以包括,阿司匹林和其他水杨酸盐、色甘酸钠、奈多罗米、茶碱、齐留通、扎鲁司特、孟鲁司特、普伦司特、吲哚美辛和脂氧合酶抑制剂;非甾体类抗炎药(NSAIDs)(例如布洛芬和 naproxin);泼尼松、地塞米松、环氧合酶抑制剂(即 COX-1 和/或 COX-2 抑制剂,例如 NaproxenTM 或 CelebrexTM);他汀类药物(仅仅用于举例,罗苏伐他汀、匹伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、西立伐他汀、美伐他汀、velostatin、氟伐他汀、康帕丁、洛伐他汀、达伐他汀、fluidostatin、阿伐他汀、阿伐他汀钙(其是阿伐他汀的半钙盐)和二氢康帕丁);和分离的类固醇。

[0243] 适当的基质金属蛋白酶 (MMPs) 抑制剂也可以与式 (I) 的化合物联合施用, 以治疗与黄斑或视网膜营养不良相关的眼部病症或症状。已知 MMPs 水解细胞外基质的大部分组分。这些蛋白酶在许多生物学过程例如正常组织重建、胚胎发生、创口愈合和血管发生中发挥主要的作用。但是在许多疾病状况, 包括黄斑变性中观察到了 MMP 的过度表达。已经鉴定出了许多 MMP, 它们中的大部分是多域锌内肽酶。很多的金属蛋白酶抑制剂是已知的 (参加例如 Whittaker M. 等人, Chemical Reviews 99(9):2735-2776 (1999) 对 MMP 抑制剂的综述)。MMP 抑制剂的代表性例子包括金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMPs) (例如, TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 或 TIMP-4)、 α_2 -巨球蛋白、四环素类 (例如, 四环素、米诺环素和多西环素)、氧膦酸盐 (例如 BATIMASTAT、MARIMISTAT 和 TROCADE)、螯合剂 (例如, EDTA、半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、D-青霉胺和金盐)、合成的 MMP 片段、琥珀酰疏嘌呤、膦酰胺化物、和羟基甲酸。仅仅用于举例, 可以与式 (I) 的化合物联合使用的 MMP 的例子包括, 上述任意的抑制剂。

[0244] 抗血管生成药或抗 -VEGF 药的使用也能为患有黄斑变性和营养不良的患者提供益处。可以与至少一种具有式 (I) 结构的化合物联合使用的适当的抗血管生成药或抗 -VEGF 药的例子包括 RhufabV2 (Lucentis™)、色氨酸-tRNA 合成酶 (TrpRS)、Eye001 (抗 -VEGF PEG 化适体)、角鲨胺、Retaane™ 15mg (乙酸阿奈可他, 用于长效混悬液; Alcon, Inc.)、考布他汀 A4 前药 (CA4P)、Macugen™、Mifeprex™ (米非司酮 -ru486)、眼睫下用的曲安奈德、玻璃体内用的晶状曲安奈德、普琳司他 (AG3340-合成的基质金属蛋白酶, Pfizer)、氟轻松 (包括氟轻松眼内植入物, Bausch&Lomb/Control Delivery Systems)、VEGFR 抑制剂 (Sugen) 和 VEGF-Trap (Regeneron/Aventis)。可以从核桃或红葡萄的皮中提取的白藜芦醇显示除了抗血管形成活性, 可以用作第二或其他药剂用于本文的联合治疗。此外, 期望其他的反式二苯乙烯化合物显示类似的活性。

[0245] 可以用于缓解视力减弱的其他药物治疗可以与至少一种式 (I) 的化合物联合使用。这些治疗包括但不限于, 与非热激光使用的药剂, 例如 Visudyne™、PKC 412、Endovion (NeuroSearch AJS)、神经营养因子, 仅仅是用于举例, 包括胶质细胞衍生的神经营养因子和睫状节神经细胞营养因子、diatazem、多佐胺、Phototrop、9-顺式视黄醛、眼用药物 (包括回波治疗) 包括碘依可酯或二乙氧膦酰疏胆碱或碳酸酐酶抑制剂、AE-941 (AEterna Laboratories, Inc.)、Sirna-027 (SirnaTherapeutics, Inc.)、pegaptanib (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences)、神经营养因子 (仅仅用于举例, 包括 NT-4/5、Genentech)、Cand5 (Acuity Pharmaceuticals)、ranibizumab (Genentech)、INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals)、整联蛋白拮抗剂 (包括来自 JeriniAG 和 Abbott Laboratories 的那些)、EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.)、BDM-E (BioDiem Ltd.)、沙利度胺 (例如 EntreMed, Inc 制造的)、心营养因子-1 (Genentech)、2-甲氧雌二醇 (Allergan/Oculex)、DL-8234 (Toray Industries)、NTC-200 (Neurotech)、四硫钼酸盐 (University of Michigan)、LYN-002 (Lynkeus Biotech)、微海藻类化合物 (Aquasearch/Albany, MeraPharmaceuticals)、D-9120 (Celltech Group pic)、ATX-S10 (Hamamatsu Photonics)、TGF- β 2 (Genzyme/Celtrix)、酪氨酸激酶抑制剂 (Allergan, SUGEN, Pfizer)、NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences)、Opt-24 (OPTIS France SA)、视网膜细胞神经节神经保护物 (Cogent Neurosciences)、N-硝基吡唑衍生物 (Texas A&M University System)、KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals)、和环孢霉素 A。参见美国专

利申请公开号 U. S. 20040092435。

[0246] 在任何情况中,可以以任何顺序或者甚至同时施用多种的治疗剂(其中之一是本文所述化合物之一)。如果是同时,多种治疗剂可以以单个的统一形式,或多重形式(仅仅用于举例,作为单个丸剂或作为两个分离的丸剂)提供。治疗剂中的一种可以在多剂量中提供,或者两者都可以在多剂量中提供。如果不是同时,多剂量之间的时间可以从大于 0 周到小于 4 周不等。此外,组合的方法、组合物和制剂并不限于只使用两种药剂;我们设想可以使用多治疗组合。仅仅用于举例,具有式 (I) 结构的化合物可以与至少一种抗氧化剂和至少一种带负电荷的磷脂一起提供;或具有式 (I) 结构的化合物可以与至少一种抗氧化剂和至少一种一氧化氮产生的诱导物和至少一种带负电荷的磷脂一起提供;等等。

[0247] 此外,式 (I) 的化合物也可以与为患者提供叠加或协同益处的方法联合使用。提出的或被认为会缓解视力减弱的已知方法包括但不限于“有限的视网膜移位”、光动力学疗法(仅仅用于举例,包括受体-靶向 PDT, Bristol-Myers Squibb, Co.; 用于与 PDT 一起注射的吡吩姆钠; 维替泊芬, QLT Inc.; 用于 PDT 的罗培泊芬, Miravent Medical Technologies; 用于 PDT 的他拉泊芬钠, Nippon Petroleum; 莫特沙芬钠, Pharmacyclics, Inc.)、反义寡核苷酸(仅仅用于举例,包括由 Novagali Pharma SA 测试的产品和 ISIS-13650, Isis Pharmaceuticals)、激光光凝术、玻璃疣激光术、黄斑裂孔手术、黄斑移位手术、可植入的小型窥镜、 φ -移动血管造影术(也称显微激光疗法或供给管治疗)、质子束疗法、微刺激疗法、视网膜剥离和玻璃体手术、巩膜扣带术、黄斑下手术、经瞳孔的热疗法、光系统 I 疗法、使用 RNA 干扰 (RNAi)、体外电渗法(也称作膜差别过滤法和电流疗法)、微芯片植入法、干细胞疗法、基因替代疗法、核酶基因疗法(包括用于低氧反应元件的基因疗法, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; PDEF 基因疗法, GenVec)、光感受器/视网膜细胞移植(包括可移植的视网膜上皮细胞, Diacrin, Inc.; 视网膜细胞移植物, Cell Genesys, Inc.)、和针灸。

[0248] 可以为个体提供益处的其他组合包括使用遗传学测试来确定个体是否是已知的与某些眼部病症有关的突变基因的携带者。仅仅用于举例,人们认为,人 ABCA4 基因的缺陷与 5 种不同的视网膜表型有关,包括 Stargardt 病、视椎-视杆营养不良、与年龄相关的视网膜变性和视网膜色素变性。参见例如 Allikmets 等人, *Science*, 277:1805-07 (1997); Lewis 等人, *Am. J. Hum. Genet.*, 64:422-34 (1999); Stone 等人, *Nature Genetics*, 20:328-29 (1998); Allikmets, *Am. J. Hum. Gen.*, 67:793-799 (2000); Klevering, 等人, *Ophthalmology*, 111:546-553 (2004)。此外,在 ELOV4 基因中的突变会导致 Stargardt 病的常染色体显性形式。参见 Karan, 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2005)。具有上述任意突变体的患者预期在本文所述方法中会获得治疗性和/或预防性的益处。

[0249] 此外,式 (I) 的化合物或导致血清视黄醇水平降低的其它药剂可以与治疗或缓解血清视黄醇降低引起的副作用的药剂(在其施用之前、施用期间或之后)施用。这些副作用包括皮肤干燥和眼干燥。因此,缓和或治疗皮肤干燥和眼干燥的药剂可以与式 (I) 的化合物或导致血清视黄醇水平降低的其它药剂施用。

[0250] 维生素 A 水平的调节

[0251] 维生素 A (全反式视黄醇) 是重要的细胞营养素,其不能从头合成,因此必须从食物来源获得。维生素 A 是一种总称,其命名的是具有视黄醇的生理活性,包括结合活性的任

意化合物。一种视黄醇等价物 (RE) 相当于 $1 \mu\text{g}$ 的全反式视黄醇 (3.33IU) 或 $6 \mu\text{g}$ (10IU) 的 β -胡萝卜素的特异性生物学活性。 β -胡萝卜素、视黄醇和视黄醛 (维生素 A 醛) 都具有有效的和可靠的维生素 A 活性。这些化合物中的每一种都是来自植物前体分子, 胡萝卜素 (一族称作类胡萝卜素 A 的分子中的一个成员)。包括在它们醛基末端连接 2 个分子的视黄醛的 β -胡萝卜素也称作原维生素型的维生素 A。

[0252] 摄取的 β -胡萝卜素在肠的内腔通过 β 胡萝卜素双氧合酶分裂得到视黄醛。视黄醛通过视黄醛还原酶还原成视黄醇, 所述酶是在肠内 NADPH 需要的酶, 其后酯化成棕榈酸。

[0253] 在摄取后, 在食物中视黄醇运输到肝中结合到脂类聚集物上。参见 Bellovino 等人, *MoI. Aspects Med.*, 24 :411-20 (2003)。当在肝中时, 视黄醇与视黄醇结合蛋白 (RBP) 形成了复合物, 然后分泌到血液循环中。在视黄醇-RBP 全蛋白质递送到肝外的靶组织例如眼中前, 它必须与运甲状腺素蛋白 (TTR) 结合。Zanotti 和 Berni, *Vitam. Horm.*, 69 : 271-95 (2004)。它是次级复合物, 允许视黄醇较长时间保留在循环中。与 TTR 结合促进了 RBP 从肝细胞中释放, 并阻止 RBP-视黄醇复合物的肾过滤。视黄醇-RBP-TTR 复合物递送到吸收视黄醇的靶组织中, 并用于各种细胞过程。视黄醇经由 RBP-TTR 复合物通过循环递送到细胞中是细胞和组织获得视黄醇的主要途径。

[0254] 通过将 RBP 结合到靶细胞的细胞感受器上以从复合的视黄醇-RBP-TTR 型的视黄醇摄取到细胞中。该相互作用导致了 RBP-感受器复合物的胞吞作用和视黄醇随后从复合物中释放, 或视黄醇结合到细胞的视黄醇结合蛋白 (CRBP) 上, 并随后 apoRBP 通过细胞释放到血浆中。其他途径试图使用可替代的机制使视黄醇进入到细胞中, 包括单独摄取视黄醇进入细胞中。参见 Blomhoff (1994) 的综述。

[0255] 本文所述的方法和组合物可以用于在哺乳动物患者中调节维生素 A 的水平。特别地, 可以通过在哺乳动物中调节视黄醇结合蛋白 (RBP) 和运甲状腺素蛋白 (TTR) 的利用率来调节维生素 A 的水平。本文所述的方法和组合物用于在哺乳动物患者中调节 RBP 和 TTR 的水平, 接着调节维生素 A 的水平。在患者中提高或降低维生素 A 的水平可以影响视黄醇在靶器官和组织中的利用率。因此, 提供一种调节视黄醇或视黄醇衍生物利用率的方法, 可以相应地调节由于靶器官和组织内局部视黄醇或视黄醇衍生物缺乏或过量而导致的疾病状况。

[0256] 例如, A2E 是脂褐素的主要荧光团, 其是在黄斑或视网膜变性或营养不良, 包括与年龄有关的黄斑变性和 Stargardt 病中形成的, 原因在于视觉循环中类视黄醇、全反式视黄醛 (A2E 的一种前体) 的过量产生。因此, 在视网膜中维生素 A 和全反式视黄醛的减少将会有利于减少 A2E 和脂褐素的产生, 有利于与年龄有关的黄斑变性的治疗。研究已经证实, 降低血清视黄醇对减少 RPE 中的 A2E 和脂褐素具有有益效果。例如, 维持缺乏维生素 A 的饮食的动物显示了脂褐素聚积显著减少。Katz 等人, *Mech. Ageing Dev.*, 35 :291-305 (1986); Katz 等人, *Mech. Ageing Dev.*, 39 :81-90 (1987); Katz 等人, *Biochim. Biophys. Acta*, 924 : 432-41 (1987)。降低维生素 A 水平可以有利于黄斑变性和营养不良发展的进一步证据是 Radu 和他的同事提供的, 其中眼部维生素 A 水平的减少导致了脂褐素和 A2E 都减少。Radu 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 :4742-7 (2003); Radu 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 :5928-33 (2004)。

[0257] 施用维甲酸类似物、N-4-(羟基苯基) 视黄酰胺 (HPR 或芬维 A 胺) 已经表明可以导

致血清视黄醇和RBP降低。Formelli等人, *Cancer Res.* 49 :6149-52 (1989) ;Formelli等人, *J. Clin Oncol.* ,11 :2036-42 (1993) ;Torrison等人, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* , 3 :507-10 (1994)。体外研究证明, HPR 干扰了 TTr 与 RBP 之间的正常作用。Malpeli 等人, *Biochim. Biophys. Acta* 1294 :48-54 (1996) Holven 等人, *Int. J. Cancer* 71 :654-9 (1997)。

[0258] 因此,通过阻止视黄醇与 apo RBP 或 holo RBP (RBP+ 视黄醇) 与其运输蛋白结合,或增加 RBP 和 TTR 肾脏排泄来抑制视黄醇递送到细胞中的调节剂(例如 HPR) 可以用于降低血清维生素 A 水平和在靶组织例如眼中视黄醇和其衍生物的产生。

[0259] 类似地,降低视黄醇运输蛋白、视黄醇结合蛋白(RBP) 和运甲状腺素蛋白(TTR) 利用率的调节剂也可以用于降低血清维生素 A 水平和在靶组织例如眼中视黄醇和其衍生物的产生。例如,数据显示, TTR 是玻璃疣组成中的一个组分,提示 TTR 和与年龄有关的黄斑变性直接有关。Mullins, RF, *FASEB J.* 14 :835-846 (2000) ;Pfeffer BA, 等人, *Molecular Vision* 10 :23-30 (2004)。

[0260] 因此本文所述的方法和组合物中的一个实施方案用于在哺乳动物中调节 RBP 或 TTR 水平,包括给哺乳动物施用至少一次有效量的至少一种选自 RBP 清除剂、TTR 清除剂、RBP 拮抗剂、RBP 激动剂、TTR 拮抗剂、TTR 激动剂和视黄醇结合蛋白受体拮抗剂的化合物。

[0261] 不论药剂降低患者的血清视黄醇的机制是什么,这种降低提供了新的途径来降低哺乳动物眼中类视黄醇的水平和 A2E 的水平(参见,例如实施例 22 和附图 12)。实际上,血清视黄醇的降低与哺乳动物眼中类视黄醇的水平和 A2E 的水平降低之间有明确和直接的关系(附图 12)。血清视黄醇降低可以用于治疗下列任意或全部的疾病:(a) 由眼中 A2E、N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-乙醇胺、N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺或类视黄醇蓄积引起的眼部疾病或病症;(b) 青少年黄斑变性,包括 Stargardt 病;(c) 基于脂褐素的视网膜疾病;(d) 干性与年龄相关的黄斑变性;(e) 视锥-视杆营养不良;(f) 视网膜色素变性;(g) 湿性与年龄相关的黄斑变性;(h) 存在地理性萎缩和/或光感受器变性的眼部疾病或病症;(i) 存在反式视黄醛蓄积的眼部疾病或病症;(j) 存在对光敏感的眼部疾病或病症;(k) 存在玻璃疣形成的眼部疾病或病症;(l) 由视觉循环蛋白(包括运输/伴侣蛋白)的过度活性导致的眼部疾病或病症;(m) 存在脂褐素蓄积的眼部疾病或病症;或(n) 基于脂褐素的视网膜变性。此外,对眼部疾病或病症的这种治疗可以在不直接抑制(即,结合到)视觉循环蛋白、视觉循环配体或视觉循环的其他组分的情况下完成。但是,如果需要,可以施用抑制视觉循环蛋白的第二药剂以在眼部疾病或病症的治疗中获得叠加和/或协同作用。使用降低和/或调节血清视黄醇水平的药剂可以具有另外的优点,例如广泛排除眼部总的类视黄醇浓度,而不要特定蛋白质或运输蛋白的抑制剂为眼内高浓度。

[0262] 视黄醇结合蛋白(RBP) 和运甲状腺素蛋白(TTR)

[0263] 视黄醇结合蛋白或 RBP 是一个多肽单链,分子量约为 21kD。已经克隆出了 RBP 和其序列,并确定了氨基酸序列。Colantuni 等人, *Nuc. Acids Res.* ,11 :7769-7776 (1983)。RBP 的三维结构显示了专门的疏水口袋,以用于结合和保护脂溶性的维生素视黄醇。Newcomer 等人, *EMBO J.* ,3 :1451-1454 (1984)。在体外试验中,培养的肝细胞显示了可以合成和分泌 RBP。Blaner, W. S., *Endocrine Rev.* ,10 :308-316 (1989)。随后的实验证明许多细胞包含

RBP 的 mRNA,提示 RBP 合成在整个身体内具有广泛的分布。参见 Blaner(1989)。大多数肝分泌的 RBP 包含 1 : 1 摩尔比的视黄醇,并且正常的 RBP 分泌需要结合到 RBP 上的视黄醇。

[0264] 在细胞中,RBP 与内质网中高浓度的视黄醇紧密结合。视黄醇与 RBP 的结合启动了视黄醇-RBP 从内质网向高尔基复合体的易位,然后从细胞中分泌出视黄醇-RBP。从肝细胞中分泌的 RBP 也有助于视黄醇从肝细胞易位到星形细胞,其中发生了视黄醇-RBP 直接分泌到血浆中。

[0265] 在血浆中,约 95%的血浆 RBP 与运甲状腺素蛋白(TTR)按 1 : 1 摩尔 / 摩尔比结合,其中基本上全部的血浆维生素 A 都结合到 RBP 上。TTR 是一种性质良好的血浆蛋白质,包含 4 个相同的亚单元,分子量为 54,980。通过 X 射线衍射说明的完整三维结构显示了广阔的四面体排列的 β -层。Blake 等人,J. Mol. Biol.,121 :339-356(1978)。一个通道通过四聚体的中心,在其中设置有两个甲状腺素的结合位点。但是,由于负协同性仅有 1 个甲状腺素分子可以正常地结合到 TTR 上。据认为,TTR 与 RBP-视黄醇的络合作用减少了视黄醇的肾小球过滤,因此,将视黄醇和 RBP 的血浆半衰期延长了约 3 倍。

[0266] 在患者中 RBP 或 TTR 结合或清除的调节

[0267] 在与 RBP 结合的视黄醇被运输到血流中以递送到眼中时,其必须与 TTR 复合。它是次级复合物,允许视黄醇在循环中保留较长的时间。当不存在 TTR 时,视黄醇-RBP 复合物会快速从尿中排出。类似地,当不存在 RBP 时,视黄醇在血流中运输和通过细胞吸收将会减少。

[0268] 因此,本发明的另一个实施方案是通过调节 RBP 或 TTR 的结合性质或清除率,来调节 RBP 或 TTR 的利用率以与血流中的视黄醇或视黄醇-RBP 复合。如上所述,TTR 与 RBP 全蛋白质的结合降低了 RBP 和视黄醇的清除率。因此,通过调节 RBP 或 TTR 的利用率,同样可以在需要的患者中调节视黄醇的水平。

[0269] 例如视黄醇与 RBP 结合的拮抗剂可以在本文所述的方法和组合物中使用。视黄醇与 RBP 结合的拮抗剂可以包括与视黄醇竞争性结合 RBP 的视黄醇衍生物或类似物。可替代地,拮抗剂可以包含与天然 RBP 竞争性地结合视黄醇但不会将视黄醇递送到细胞中的 RBP 片段。这可以包括对 RBP 与视黄醇结合蛋白受体在细胞上结合很重要的片段。可替代地,或除此以外,也可以使用例如在细胞表面上能与 RBP 或其它蛋白质结合的免疫球蛋白,只要它能干扰 RBP 结合视黄醇和 / 或通过 RBP 与视黄醇结合蛋白受体结合而吸收视黄醇的能力。如上,免疫球蛋白可以是单克隆或多克隆抗体。

[0270] 如上所述,可以调节 RBP 与视黄醇结合的方法是与 RBP 激动剂或拮抗剂例如视黄醇类似物竞争性结合。因此,本文所述的方法和组合物的一个实施方案是提供调节 RBP 水平的 RBP 激动剂或 RBP 拮抗剂。例如,施用维甲酸类似物 N-4-(羟基苯基)视黄酰胺(HPR 或芬维 A 胺)已经显示其导致了血清视黄醇和 RBP 较大程度的降低。Formelli 等人,Cancer Res. 49 :6149-52(1989);Formelli 等人,J. Clin. Oncol.,11 :2036-42(1993);Torrison 等人,Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.,3 :507-10(1994)。体外研究表明,HPR 干扰 TTR 与 RBP 正常的相互作用。参见 Malpeli 等人,Biochim. Biophys. Acta 1294 :48-54(1996);Holven 等人,Int. J. Cancer 71 :654-9(1997)。

[0271] RBP 水平的进一步可能的调节剂包括,例如具有通式 (I) 结构的化合物(其他实施方案也是本文关注的,使用本文所述的筛选方法和分析可以选择新的实施方案)。芬维 A

胺（下文称作羟基苯基视黄酰胺）是具有通式 (I) 结构的化合物的一个例子，特别适用于本文所述的组合物和方法。如下文所解释，芬维 A 胺可以用作视黄醇-RBP 结合的调节剂。在本文所述的方法和组合物的一些方面，芬维 A 胺的衍生物可以用于替代芬维 A 胺或与芬维 A 胺联合使用。如本文所使用，“芬维 A 胺衍生物”是指化学结构包含 4- 羟基部分和视黄酰胺的化合物。

[0272] 在一些实施方案中，可以使用的芬维 A 胺的衍生物包括但不限于 N-(4- 羟基苯基) 视黄酰胺-O- 葡萄糖醛酸苷的 C- 糖苷和芳酰胺类似物，包括但不限于 4-(视黄酰氨基) 苯基-C- 葡萄糖醛酸苷、4-(视黄酰氨基) 苯基-C- 葡萄糖苷、4-(视黄酰氨基) 苯基-C- 木糖苷、4-(视黄酰氨基) 苄基-C- 葡萄糖醛酸苷、4-(视黄酰氨基) 苄基-C- 葡萄糖苷、4-(视黄酰氨基) 苄基-C- 木糖苷；和视黄基 β - 葡萄糖醛酸苷类似物，例如 1-(β -D- 吡喃葡萄糖基) 视黄酰胺和 1-(D- 吡喃葡萄糖醛酸基) 视黄酰胺，如 U. S. 5, 516, 792、5, 663, 377、5, 599, 953、5, 574, 177 和 Bhatnagar 等人, Biochem. Pharmacol. , 41 :1471-7(1991) 所述，将上述每一篇都通过参考引入本文。

[0273] 类似地，TTR 结合的调节可以与 TTR 配体结合的竞争性结合剂例如甲状腺素或三碘甲状腺素或它们各自的类似物，或在 TTR 上 RBP 结合的竞争性结合剂一起发生。TTR 是一种四聚体蛋白质，包含相同的 127 个氨基酸 β - 层夹层亚单元，其三维构型是已知的。Blake, C, 等人, J. Mol. Biol. 61 :217-224(1971) ;Blake, C. 等人, J. Mol. Biol. 121 : 339-356(1978)。TTR 与全-RBP 复合，并通过阻止 RBP 和视黄醇的肾小球过滤而延长了视黄醇和 RBP 的半衰期。因此，调节 TTR 与全-RBP 的结合可以通过降低这些组合物的半衰期来调节 RBP 和视黄醇水平。

[0274] 与全-RBP 复合的 TTR 的三维结构显示了，TTR 的天然配体，甲状腺素不会干扰与 RBP 全蛋白质的结合。Monaco, H. L. , 等人 Science, 268 :1039-1041(1995)。但是，涉及甲状腺结合的竞争性抑制剂的研究表明，可以发生 TTR-RBP 全蛋白质复合物的分裂，导致患者血浆视黄醇水平降低。例如，代谢产物 3,4,3',4' - 四氯联苯减少了 TTR 上的 RBP 结合位点，抑制了 TTR-RBP 全蛋白质复合物的产生。参见 Brouwer, A. , 等人 Chem. Biol. Interact. , 68 :203-17(1988) ;Brouwer, A. , 等人, Toxicol. Appl. Pharmacol. 85 :310-312(1986)。因此，本文所述的方法和组合物中的一个实施方案包括羟基化多卤化的芳香烃代谢物在调节 TTR 或 RBP 利用率中的应用。

[0275] 仅仅是举例，其他的 TTR 调节剂包括双氯芬酸、双氯芬酸类似物、小分子化合物、内分泌激素类似物、黄酮类、非甾体抗炎药、二价抑制剂、强心剂、拟肽、适体和抗体。

[0276] 在一个实施方案中，非甾体抗炎药可以用作 TTR 调节剂，包括但不限于氟芬那酸、甲芬那酸、甲氯芬那酸、二氟尼柳、双氯芬酸、舒林酸或吲哚美辛。参见 Peterson, S. A. , 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 95 :12956-12960(1998) ;Purkey, H. E. , 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 98 :5566-5571(2001)，将这两篇都通过参考以整体引入本文。

[0277] 双氯芬酸类似物可以与本文所述的方法和组合物联合使用。双氯芬酸类似物的一些例子包括 2-[(2,6- 二氯苯基) 氨基] 苯甲酸；2-[(3,5- 二氯苯基) 氨基] 苯甲酸；3,5- 二氯-4-[(4- 硝基苯基) 氨基] 苯甲酸；2-[(3,5- 二氯苯基) 氨基] 苯乙酸和 2-[(2,6- 二氯-4- 羧酸- 苯基) 氨基] 苯乙酸。参见 Oza, V. B. 等人, J. Med. Chem. 45 : 321-332(2002，通过参考以整体引入本文。类似地，二氟尼柳类似物与本文所述的方法和组

合物联合使用。二氟尼柳类似物的例子包括 3',5'-二氟联苯-3-醇;2',4'-二氟联苯-3-羧酸;2',4'-二氟联苯-4-羧酸;2'-二氟联苯-3-羧酸;2'-二氟联苯-4-羧酸;3',5'-二氟联苯-3-羧酸;3',5'-二氟联苯-4-羧酸;2',6'-二氟联苯-3-羧酸;2',6'-二氟联苯-4-羧酸;联苯-4-羧酸;4'-氟-4-羟基联苯-3-羧酸;2'-氟-4-羟基联苯-3-羧酸;3',5'-二氟-4-羟基联苯-3-羧酸;2',4'-二氯-4-羟基联苯-3-羧酸;4-羟基联苯-3-羧酸;3',5'-二氟-4'-羟基联苯-3-羧酸;3',5'-二氟-4'-羟基联苯-4-羧酸;3',5'-二氯-4'-羟基联苯-3-羧酸;3',5'-二氯-4'-羟基联苯-4-羧酸;3',5'-二氯-3-甲酰联苯;3',5'-二氯-2-甲酰联苯;2',4'-二氯联苯-3-羧酸;2',4'-二氯联苯-4-羧酸;3',5'-二氯联苯-3-基-甲醇;3',5'-二氯联苯-4-基-甲醇;或 3',5'-二氯联苯-2-基-甲醇。参见 Adamski-Werner, S. L., 等人, *J. Med. Chem.* 47 :355-374(2004), 其教导通过参考以整体引入本文。与小分子类似物连接成一个化合物的二价抑制剂可以与本文所述的方法和组合物联合使用。Green, N. S., 等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 :13404-13414(2003)。

[0278] 黄酮类和有关的化合物也显示与甲状腺素竞争性地结合 TTR。仅仅是举例,可以与本文所述的方法和组合物联合使用的一些黄酮类包括 3-甲基-4',6-二羟基-3',5'-二溴黄酮或 3',5'-二溴-2',4,4',6-四羟基橙酮。与黄酮有关的 Flavenoids 和类黄酮也可以用作 TTR 结合的调节剂。此外,强心剂也显示与甲状腺素竞争性地结合 TTR。参见 Pedraza, P., 等人, *Endocrinology* 137 :4902-4914(1996), 通过参考引入本文。仅仅是举例,这些试剂包括米利酮和氨吡酮。参见 Davis, PJ, 等人, *Biochem. Pharmacol.* 36 :3635-3640(1987);Cody, V., *Clin. Chem. Lab. Med.* 40 :1237-1243(2002)。

[0279] 此外,激素类似物、激动剂和拮抗剂显示了是甲状腺激素包括甲状腺素和三碘甲状腺素的有效的竞争性抑制剂。例如一种雌激素拮抗剂己烯雌酚显示可以结合并抑制甲状腺素结合。参见 Morais-de-Sa, E., 等人, *J. Biol. Chem. Epub.* (Oct. 6, 2004), 通过参考以整体引入本文。甲状腺素-丙酸、甲状腺素乙酸和 SKF-94901 是可以作为 TTR 结合的调节剂的甲状腺素类似物的一些例子。参见 Cody, V. (2002)。此外,维甲酸也已经显示可以抑制甲状腺素与人运甲状腺素蛋白结合。Smith, TJ, 等人, *Biochim. Biophys. Acta*, 1199 :76(1994)。

[0280] 其他实施方案包括使用小分子抑制剂作为 TTR 结合的抑制剂。一些例子包括 N-苯基邻氨基苯甲酸、甲基红、媒染橙 I、二芳胺、N-苄基-对氨基苯甲酸、呋塞米、芹菜配基、白藜芦醇、二苯并呋喃、尼氟酸或舒林酸。参见 Baures, P. W., 等人 *Bioorg. & Med. Chem.* 6 :1389-1401(1998), 通过参考引入本文。

[0281] 在本文中使用的调节剂也意欲包括蛋白质、多肽或肽,包括但不限于结构蛋白、酶、细胞因子(例如干扰素和/或白细胞介素)、抗生素、多克隆或单克隆抗体或其有效部分,例如 Fv 片段(其抗体或其部分可以是天然的、合成的或来自人的)、多肽激素、受体、信号分子或其他蛋白质;核酸,如下定义但不限于寡核苷酸或修饰寡核苷酸、反义寡核苷酸或修饰反义寡核苷酸、cDNA、染色体 DNA、人造或天然的染色体(例如酵母人工染色体)或其一部分、RNA 包括 mRNA、tRNA、rRNA 或核酶,或核酸肽(PNA);病毒或病毒样颗粒;核苷酸或核糖核苷酸或其合成类似物,其可以是修饰的或未修饰的;氨基酸或其类似物,其可以是修饰的或未修饰的;非肽(例如,甾类)激素;蛋白多糖;脂类;或糖类。也包括小分子,其包括无机和有机化学物,结合并占据了多肽的活性位点,因此使得催化部位难以接近底物,而

使正常的生理学活动被阻断。小分子的例子包括但不限于小肽或肽样分子。

[0282] 调节活性的检测

[0283] 本文所述的化合物和组合物可以用于通过常规方法检测对 RBP 或 TTR 利用率干扰的分析。例如,可以用本文所述的任意化合物或组合物治疗患者,并用常规技术定量 RBP 或 TTR 水平。参见 Sundaram, M., 等人, *Biochem. J.* 362 :265-271 (2002)。例如,典型的非竞争性夹层分析是在 U. S. 4, 486, 530 中所述的分析法,通过参考引入本文。在该方法中,夹层复合物,例如免疫复合物是在分析培养基中形成的。该复合物包含被分析物、第一抗体或与被分析物结合的结合成员,和第二抗体,或与被分析物或被分析物与第一抗体的复合物结合的结合成员,或结合成员。随后,检测该夹层复合物,并涉及在样品中被分析物的存在和 / 或量。由于在复合物中存在标记物,其中第一抗体和第二抗体之一或两者、或结合成员中包含标记物或能与标记物结合的取代物。样品可以是血浆、血、粪便、组织、肌肉、泪、唾液或尿,例如检测对 RBP 或 TTR 清除率的调节。对该方法更详细的描述,参见 U. S. Pat. Nos. Re 29, 169 和 4, 474, 878, 将其有关内容通过参考引入本文。

[0284] 在上述夹层分析的变化方法中,在适当培养基中的夹层与标记的抗体或被分析物的结合成员接触,并培养较长的时间。然后,将培养基同与第二抗体结合的载体或被分析物的结合成员接触。在培养期过后,从培养基中分离载体并洗涤除去未结合的试剂。检查载体或培养基是否存在标记物,其与被分析物的存在或量有关。对该方法更详细的描述,参见 U. S. Pat. No. 4, 098, 876, 将其有关内容通过参考引入本文。

[0285] 本文所述的调节剂也可以用于体外分析,以检测 RBP 或 TTR 活性的干扰。例如,调节剂可以加入到包含 RBP、TTR 和视黄醇的样品中以检测复合物分裂。可以标记一种组分,例如 RBP、TTR、视黄醇或调节剂以确定是否发生复合物形成的分裂。可以通过常规方法,例如上述的夹层分析来检测和 / 或测定复合物形成和随后的分裂。其他检测系统例如 RBP-TTR-视黄醇复合物形成的 FRET 检测可以用于检测对 RBP 或 TTR 结合的调节。参见 U. S. 临时专利申请 No. 60/625, 532 " Fluorescence Assay for Modulators of retinol Binding", 通过参考以整体引入本文。

[0286] 体外基因表达分析可以用于检测本文所述的调节剂对 RBP 或 TTR 转录或翻译的调节。例如,如 Wodicka 等人, *Nature Biotechnology* 15 (1997), (通过参考以整体引入本文) 所述,因为 mRNA 杂交与基因表达水平有关,因此可以比较杂交模式来确定不同的基因表达。作为一个非限制性的例子,可以用调节剂处理的样品的杂交模式与没有进行处理或用其他化合物或不同量的相同化合物处理的样品的杂交模式进行比较。用 DNA 排列技术来分析这些样品,参见 U. S. 6, 040, 138, 通过参考以整体引入本文。也可以通过在体外分析中分析由 RBP 或 TTR 启动子区驱动的报告蛋白的表达,用重组 DNA 技术来分析 RBP 或 TTR 活性的基因表达分析。参见,例如, Rapley 和 Walker, *Molecular Biotechnology Handbook* (1998); Wilson 和 Walker, *Principals and Techniques of Practical Biochemistry* (2000), 通过参考以整体引入本文。

[0287] 也可以使用体外翻译分析来检测本文所述的 RBP 或 TTR 调节或翻译。仅仅是举例,调节剂对翻译的调节可以通过使用无细胞的蛋白翻译系统来检测,例如大肠杆菌提取物、兔网织红细胞裂解物和麦胚提取物,参见 Spirin, A. S., *Cell-free protein synthesis bioreactor* (1991), 通过参考以整体引入本文,包括在存在或不存在本文所述的调节剂的

条件下比较蛋白质的翻译。调节剂对蛋白质翻译的影响也可以用蛋白质胶电泳或免疫复合分析来检测以确定在加入调节剂后质和量的差异。

[0288] 此外,包括但不限于小分子、多肽、核酸和抗体的其他可能的调节剂也可以用上述的体外检测法来筛选。例如,根据上述的教导,本文所述的方法和组合物可以用于筛选小分子库、核酸库、肽库或抗体库。筛选库例如组合库或上述所列的其他库的方法,可以参见 U. S. Pat. Nos. 5, 591, 646 ;5, 866, 341 ;和 6, 343, 257, 通过参考以整体引入本文。

[0289] 调节剂活性的体内检测

[0290] 除了上述的体外方法,本文所述的方法和组合物也可以与体内检测和 / 或对 TTR 或 RBP 利用率的调节活性的定量结合使用。例如,将标记的 TTR 或 RBP 注射到患者中,其中候选的调节剂是在注射标记的 TTR 或 RBP 之前、其间或之后加入。患者可以是哺乳动物,例如人 ;但是也可以使用其他哺乳动物,例如灵长类、马、狗、绵羊、山羊、兔、小鼠或大鼠。然后从患者中移出生物样品,检测标记物以确定 TTR 或 RBP 的利用率。生物样品可以包含但不限于血浆、血、尿、粪便、肌肉、组织、泪或唾液。根据标记物的性质,本文所述的对标记试剂的监测可以用本领域普通技术人员已知的任意常规方法来进行。检测化学发光、放射性标记或其他标记的化合物的监测装置的例子在 U. S. Pats. No. 4, 618, 485 ;5, 981, 202 中有记载,其有关内容通过参考引入本文。

[0291] HPR 作用机制

[0292] HPR 系统性地作用以减少眼中类视黄醇的含量。在循环中,HPR 和饮食中的视黄醇竞争性地与 RBP 结合。一旦结合到 RBP 上,HPR 就阻止了与 TTR 的络合。TTR 是一种血清产生的蛋白质,其必须与 RBP- 视黄醇络合,以维持循环中 RBP 和视黄醇的高稳态水平。因此,HPR 治疗的瞬即效应是降低血清中 RBP 和视黄醇的水平。与其他能从血清(例如,肾、睾丸、肺和脂肪组织)中吸收游离视黄醇或视黄酯的肝外组织不同,RPE 对 RBP 递送的视黄醇具有独特需求。因此,与其他组织相比,RPE 对血清 RBP- 视黄醇降低更为敏感。RBP- 视黄醇向 RPE 的运输减少导致通过视觉循环的类视黄醇流降低,最终减少了视网膜的荧光团。

[0293] 对 HPR 视觉循环类视黄醇和视紫质再生的影响 - 当血清 RBP- 视黄醇降低时,HPR 不会直接干扰视觉循环的酶和 / 或蛋白质。这个问题已经在一系列的研究中进行了探索,其中所述研究体内检查了 HPR 对视觉循环的类视黄醇的影响。

[0294] 在一个研究中,给予野生型小鼠不同剂量的 HPR(5-20mg/kg/ 日, i. p. 在 DMSO 中),共 7 天。对照小鼠仅接受 DMSO。在整个治疗期将小鼠保持在 12 小时 /12 小时光 / 暗循环中。在研究结束时,通过高效液相色谱法 (HPLC) 确定眼部的类视黄醇含量。得到了适应光的,而不是适应黑暗的类视黄醇图,以便可以得到类视黄醇的测定值,同时视觉循环积极地再生了生色团。该数据证明,在 RPE 内剂量依赖地适度地蓄积了 HPR(4-6 μ M)。但是,尽管在 RPE 细胞中存在 HPR,但在整个试验方案中适应光的类视黄醇水平没有显著的差异(附图 14)。这些数据表明,HPR 对于视觉循环内的类视黄醇的生物合成没有直接作用。该发现与分析用 13- 顺式维甲酸治疗的小鼠时得到的数据形成了鲜明的对比。在该研究(Radu RA 等人, Proc Natl Acad Sci USA. 2003 ;100(8) :4742-4747) 中,增加 13- 顺式维甲酸的剂量显著地降低了 11- 顺式视黄醛的水平。此外,在未治疗的小鼠中几乎不能检测到 11- 顺式视黄酯,而 11- 顺式视黄酯引人注目地随着 13- 顺式维甲酸的增加而增加。这些结果是通过抑制 11cRDH 活性可以预测的。降低 11cRDH 活性将导致 11- 顺式视黄醛的水平降低

和 11- 顺式视黄醇的蓄积。游离的 11- 顺式视黄醇经 LRAT 活动快速酯化, 导致 11- 顺式视黄酯增加。13- 顺式维甲酸对于类视黄醇生物合成的这种作用也可以在 Sieving PA 等人, Proc Natl Acad Sci USA. 2001 ;98(4) :1835-40 的大鼠中观测到。

[0295] 在另一个研究中检验 HPR 对视觉生色团生物合成的作用, 在该研究中在 7 天的时间里给 *abca4*^{-/-} 小鼠施用单剂量的 HPR(10mg/kg/ 日)。在暗 - 和光 - 适应的小鼠中进行的 HPR 和视黄醛含量的 HPLC 分析表明, 眼组织中 HPR 的存在对于稳态的视黄醛水平或视觉生色团的再生基本上没有影响 (附图 15)。

[0296] 长期施用 HPR 减少了视觉循环的类视黄醇, 但不会影响视紫质的再生率 - 很多的生化和生理学研究表明, 短期的 HPR 治疗 (7 天) 对于视觉生色团生物合成基本上没有干扰。该发现是重要的, 因为 HPR 会蓄积在 RPE 组织中 (尽管程度有限)。但是, 仅仅在较长的治疗期后观测到了 HPR 对于停止 *abca4*^{-/-} 小鼠中 A2E 的蓄积的治疗作用。例如, 与仅接受 DMSO 的同一批小鼠相比, 接受 28 天每天 10mg/kg HPR 的 *abca4*^{-/-} 小鼠蓄积的 A2E 少 ~ 50% (附图 10F)。有趣的是, 该治疗期期间, 循环中 RBP- 视黄醇的水平也降低了 ~ 50%。因此 A2E 的减少与 RPE 摄取的视黄醇的利用率降低有关。

[0297] 在 *abca4*^{-/-} 小鼠中, 在用 10mg/kg HPR 进行的 28 天的治疗期后评价稳态的视黄醛水平或视觉生色团再生的速率。与仅接受 DMSO 的对照动物相比, 所有视觉循环的类视黄醇的光 - 适应水平降低了 ~ 50% (附图 16A)。尽管 HPR 是存在于 RPE 组织中 (~ 10 μ M), 但视紫质的再生速率 (附图 16B) 和漂白的产物的消除 (附图 16C) 并未受到影响。对于 DMSO- 和 HPR- 治疗的小鼠, 所计算的视觉生色团再生的时间常数几乎是相等的 (完全再生视觉生色团的时间常数是 0.37 小时, 附图 16D)。

[0298] 这些数据表明, 治疗剂量的 HPR 不会影响视觉生色团生物合成的速率。因此, HPR 不会与视觉循环的酶相互作用。所观察到的 A2E 水平的降低是由于眼部类视黄醇的稳态水平降低而引起的, 其中稳态水平降低是由于循环中 RBP- 视黄醇的水平降低。HPR、血清视黄醇、眼部类视黄醇和 A2E 之间的关系如附图 12 所示。该分析表明, 血清视黄醇中 HPR 剂量依赖性降低导致了眼部类视黄醇和 A2E 产生与之相当的降低。

[0299] HPR 对阻止 A2E 蓄积的潜伏效应 - 在 HPR 实验中鉴定出的一个特征是在 HPR 停药后的治疗潜伏效应。在这些研究中, 在 28 天后停止 *abca4*^{-/-} 小鼠的长期治疗 (10mg HPR/kg, i. p.)。然后在最后一次 HPR 给药后 12、28 和 42 天测定 A2E 水平。与未治疗、年龄匹配的对照小鼠相比, A2E 水平在低位持续保持了数周。而在 13- 顺式维甲酸治疗的动物中没有观测到这种效应, 其中该治疗效果是由于 RPE 细胞具有适应并维持低稳态类视黄醇水平的能力。此外, 在 13- 顺式维甲酸停药后光感受器功能和眼部类视黄醇水平很快恢复到基线值。这些发现表明, 为达到治疗效力, 必须维持竞争性抑制剂例如 13- 顺式维甲酸的高稳态水平。

[0300] HPR 对视网膜电生理学的作用 - *abca4*^{-/-} 小鼠表现的突出的电生理表型是延迟 - 暗适应。具有 ABCA4 基因突变和患有 AMD 的人也会经历延迟 - 暗适应。该作用是由于视杆光感受器中伪光化产物瞬间升高而产生的。在正常的生理条件下, 视紫质的光漂白作用在视杆盘的腔内产生全反式视黄醛 - 视蛋白结合物 (称作变视紫质 II, MII)。MII 活化光信号转导结构, 然后快速去活化, 以恢复视杆细胞的暗敏感性。在 MII 去活化后, 结合全反式视黄醛和视蛋白的化学键水解, 释放出全反式视黄醛, 随后将其从盘的腔中除去。在一

些情况中, MII 去活化, 但是全反式视黄醛 - 视蛋白保持完整。该物质称作伪光化产物继续温和地刺激光信号转导结构, 并产生背景“噪声”, 其延长了视杆细胞恢复暗敏感性所需的时间。

[0301] 降低视紫质再生速率的化合物 (例如, 13- 顺式维甲酸) 可以进一步加剧延迟 - 暗适应。尽管降低眼部总类视黄醇水平的化合物例如 HPR 也有助于延迟 - 暗适应, 但该作用较不明显。在检验 13- 顺式维甲酸或 HPR 长期 (1 个月) 施用对视网膜电生理学作用的研究中说明了这一点。数据 (附图 17) 表明, 13- 顺式维甲酸在 40mg/kg 下实现了 A2E ~ 50% 的降低, 在野生型和 *abca4*^{-/-} 小鼠中 13- 顺式维甲酸显著地延迟了恢复暗敏感性所需的时间。在暴露于漂白了约 40% 的视觉生色团的光源时, 野生型小鼠需要 ~ 1 小时恢复暗敏感性 (y 轴上值为 1.0); 未治疗的 *abca4*^{-/-} 小鼠需要 ~ 3-4 小时。13- 顺式维甲酸治疗将恢复暗敏感性所需的时间延迟了数小时。相反, HPR 在 10mg/kg 下实现了相同水平的治疗效力, 它不会显著恶化 *abca4*^{-/-} 小鼠中存在的固有的延迟暗适应表型 (右图)。该发现与用 AMD 影响的人类患者有关。与 *abca4*^{-/-} 小鼠类似, 这些患者大量蓄积视黄醛荧光团, 也显示延迟 - 暗适应。最好用化合物例如 HPR 治疗这些患者, 其不会进一步危害暗光环境中的视觉。

[0302] 通式 (I) 的化合物的合成

[0303] 可以用本领域技术人员已知的标准合成技术或将本领域已知的方法与本文所述方法联合使用合成通式 (I) 的化合物。参见, 例如美国专利申请公开 2004/0102650; Um, S. J., 等人, Chem. Pharm. Bull., 52:501-506 (2004)。此外, 数种通式 (I) 的化合物, 例如芬维 A 胺, 可以购自不同的商品供应商。作为进一步的指导, 也可以利用下列的合成方法。

[0304] 通过亲电子试剂和亲核试剂反应形成共价键

[0305] 共价键和获得共价键的前体官能团的所选择的例子在标题为“共价键和其前体的例子”的表中给出。前体官能团以亲电子基团和亲核基团显示。在有机物上的官能团可以直接附着, 或经任意有用的间隔基或下述定义的连接体附着。

[0306] 表 1: 共价键和其前体的例子

[0307]

共价键产物	亲电子试剂	亲核试剂
氨甲酰	活化酯	胺 / 苯胺
氨甲酰	酰基叠氮	胺 / 苯胺
氨甲酰	酰基卤	胺 / 苯胺
酯	酰基卤	醇 / 苯酚
酯	酰基腈	醇 / 苯酚
氨甲酰	酰基腈	胺 / 苯胺
亚胺	醛	胺 / 苯胺
脘	醛或酮	胍
脞	醛或酮	羟基胺
烷基胺	烷基卤	胺 / 苯胺
酯	烷基卤	羧酸
硫醚	烷基卤	硫醇
酯	烷基卤	醇 / 苯酚
硫醚	烷基磺酸盐	硫醇
酯	烷基磺酸盐	羧酸
酯	烷基磺酸盐	醇 / 苯酚
酯	酰	醇 / 苯酚

氨甲酰	酰	胺 / 苯胺
苯硫酚	芳基卤	硫醇
芳基胺	芳基卤	胺
硫醚	azindine	硫醇
硼酸酯	硼酸盐	二醇
氨甲酰	羧酸	胺 / 苯胺
酯	羧酸	醇
肼	酰肼	羧酸
N- 酰基脲或 酰	碳二亚胺	羧酸
酯	重氮烷	羧酸
硫醚	环氧化物	硫醇
硫醚	卤代乙酰胺	硫醇
氨基三嗪	卤代三嗪	胺 / 苯胺
三嗪醚	卤代三嗪	醇 / 苯酚
脘	亚胺酯	胺 / 苯胺
脲	异氰酸盐	胺 / 苯胺
氨基甲酸乙 酯	异氰酸盐	醇 / 苯酚
硫脲	异硫氰酸盐	胺 / 苯胺
硫醚	马来酰亚胺	硫醇
亚磷酸酯	亚磷酰胺	醇
甲硅烷基醚	甲硅烷基卤 化 物	醇
烷基胺	磺酸酯	胺 / 苯胺
硫醚	磺酸酯	硫醇
酯	磺酸酯	羧酸
酯	磺酸酯	醇
氨苯磺胺	磺酰基卤化 物	胺 / 苯胺
磺酸酯	磺酰基卤化 物	苯酚 / 醇

[0308] 一般地,碳亲电子试剂对互补的亲核试剂,包括碳亲核试剂的攻击是敏感的,其中进行攻击的亲核试剂为碳亲电子试剂带来一个电子对,以便在亲核试剂和碳亲电子试剂之间形成新键。

[0309] 适当的碳亲核试剂包括但不限于,烷基、烯基、芳基和炔基 Grignard,有机锂化物,有机锌化物,烷基-、烯基-、芳基-和炔基-锡药剂(有机锡化物),烷基-、烯基-、芳基-和炔基-硼烷药剂(有机硼烷化物和有机硼酸盐);这些碳亲核试剂具有在水或极性有机溶剂中动力学稳定的优点。其他碳亲核试剂包括磷的内鎓盐、烯醇和烯醇化物药剂;这些碳亲核试剂具有相对容易由合成有机化学领域技术人员公知的前体产生的优点。当与碳亲电子试剂一起使用时,碳亲核试剂在碳亲核试剂和碳亲电子试剂之间形成了新的碳碳键。

[0310] 适合与碳亲电子试剂偶合的非碳亲核试剂包括但不限于伯胺和仲胺、硫醇、硫醇化物和硫醚、醇、醇盐、叠氮化物、氨基脲等等。当与碳亲电子试剂一起使用时,这些非碳亲核试剂典型地形成了杂原子键(C-X-C),其中X是杂原子,例如氧或氮。

[0311] 保护基的使用

[0312] 术语“保护基”是指在除去该保护基前阻断一些或全部的反应性部分并阻止这些

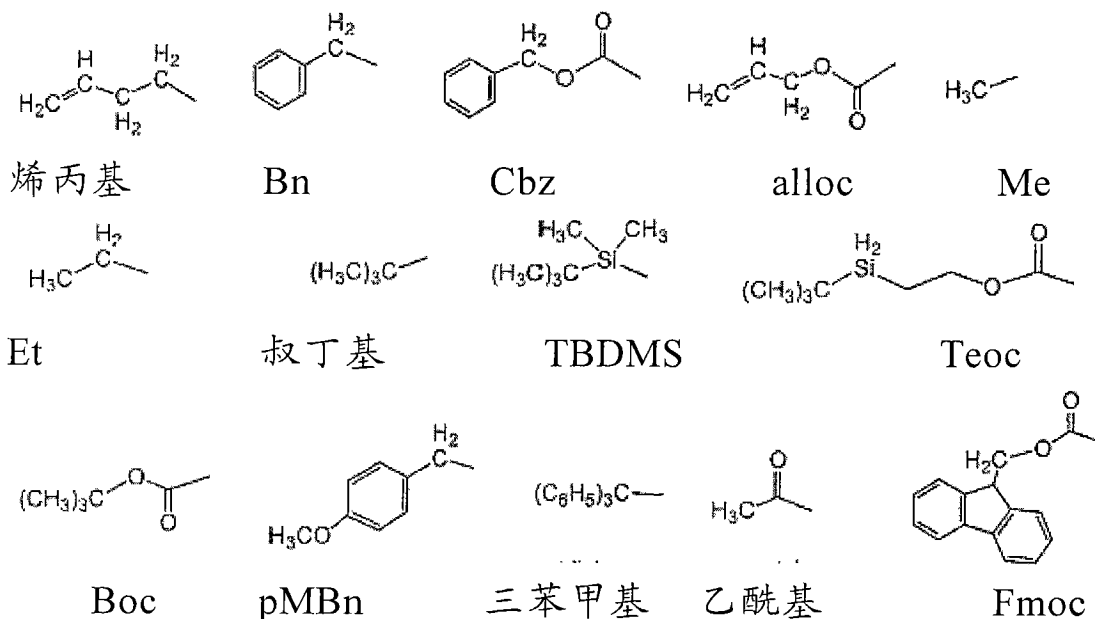
基团参加化学反应的化学部分。优选每个保护基可以通过不同的方法除去。在完全不同的反应条件下切除的保护基满足了对差别性除去的要求。可以用酸、碱和氢解来除去保护基。基团例如三苯甲基、二甲氧三苯甲基、乙缩醛和叔丁基二甲硅烷基是对酸敏感的,可以在用 Cbz 基保护的氨基存在下用于保护羧基和羟基反应性部分,其可用氢解和对碱敏感的 Fmoc 基来除去。羧酸和羟基反应性部分可以在用对酸敏感的基团例如叔丁基氨基甲酸酯或用对酸和碱稳定但可水解除去的氨基甲酸酯阻断的氨基存在下,用对碱敏感的基团来阻断,例如但不限于,甲基、乙基和乙酰基。

[0313] 羧酸和羟基反应性部分也可以用可水解除去的保护基例如苄基来阻断,而能与酸通过氢键结合的胺基可以用对碱敏感的基团例如 Fmoc 来阻断。作为一个例子,羧酸反应性部分可以通过转化成如本文举例的简单的酯类衍生物获得保护,或者它们可以用可氧化除去的保护基例如 2,4-二甲氧苄基阻断,而共存的氨基可以用对氟化物不稳定的甲硅烷基氨基甲酸酯来阻断。

[0314] 在酸和碱保护基存在下,烯丙基阻断基是有用的,因为烯丙基是稳定的,并且随后可以通过金属或 π -酸催化剂除去。例如在对酸敏感的叔丁基氨基甲酸酯或对碱稳定的乙酸胺保护基存在下,用烯丙基阻断的羧酸可以用 Pd₀-催化反应脱保护。另一种形式的保护基是化合物或中间体可以附着到其上的树脂。只要残基附着到树脂上,就能阻断官能团,并且不发生反应。一旦从树脂中释放出来,官能团就可以用于反应。

[0315] 典型地,阻断/保护基可以选自:

[0316]



[0317] 在 Greene 和 Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第三版, John Wiley&Sons, New York, NY, 1999 中描述了其他保护基,将其整体引入本文作为参考。

[0318] 用作说明的实施例

[0319] 下面的实施例用于说明测定通式 (I) 的化合物的有效性和安全性的方法。这些实施例仅仅是用于说明的目的,而不是限制所述权利要求的范围。

[0320] 人体研究

[0321] 黄斑或视网膜变性的检测。可以用血管造影术鉴定眼中的异常血管。该鉴定可以

帮助确定患者是否是使用候选物或其他治疗方法来阻止或预防进一步的视觉丧失的候选者。血管造影术对于治疗的随访以及进一步评价任何新血管的生长都是有用的。

[0322] 荧光素血管造影术（荧光素血管造影、荧光素血管透照法）是一种对眼睛后部的脉络膜和视网膜循环显影的技术。由静脉内注射荧光素染料，然后行多帧照相术（血管造影术）、检视镜评价（血管透照法）或 Heidelberg 视网膜血管造影术（一种共焦扫描激光系统）。此外，可以用 OCT 来检测视网膜，这是一种获得视网膜的高分辨率切面显像的非侵入性方法。通过分析为视网膜提供营养的血管的渗漏或可能的损害，荧光素造影术可以用于评价范围广泛的视网膜和脉络膜疾病。通过 Berkow 等人, *Am. J. Ophthalmol.* 97 : 143-7 (1984), 它也可以用于评价视神经和虹膜的异常。

[0323] 类似地, 使用靛青绿的血管造影术可以用于眼睛后部循环的显像。其中荧光素对于研究视网膜循环是最有效的, 靛青较好地用于观测较深的脉络膜血管层。当单用荧光素染料不能观测到新生血管生成时, 使用靛青血管造影术是有帮助的。

[0324] 具有通式 (I) 结构的化合物用于人的适当剂量可以用标准剂量增加研究来确定。但是在研究所述化合物在治疗癌症中的应用中可以获得一些指导。例如, 将 $4800\text{mg}/\text{m}^2$ 剂量的芬维 A 胺 - 一种具有通式 (I) 结构的化合物, 施用于患有各种癌症的患者。这些剂量每天施用 3 次, 只观测到很小的毒性。但是, 根据对可达到的血浆水平的上限的观测, 这些患者的推荐剂量是 $900\text{mg}/\text{m}^2$ 。此外, 芬维 A 胺的生物利用度随着进餐而升高, 在高脂肪餐后其血浆浓度是糖类膳食后的 3 倍。

[0325] 实施例 1: 测定通式 (I) 的化合物治疗黄斑变性的效力

[0326] 对于预试, 所有的患者都经过常规的眼科学检查, 包括荧光素血管造影术, 测定视敏度、电生理学参数和生化和流变参数。加入标准如下: 至少一只眼睛的视敏度在 20/160 到 20/32 之间, AMD 的指征例如玻璃疣、晕轮状萎缩、色素凝集、色素上皮剥离或视网膜下新生血管形成。将怀孕或者主动母乳喂养婴儿的患者排除出本研究。

[0327] 将诊断为黄斑变性或其眼中 A2E、脂褐素或玻璃疣进行性形成的 200 名患者分成约 100 名患者的对照组和 100 名患者的实验组。以每日为基础给实验组施用芬维 A 胺。用与给实验组施用芬维 A 胺相同的方法给对照组施用安慰剂。

[0328] 给患者施用芬维 A 胺或安慰剂可以是口服或胃肠外施用, 其量可以有效地抑制黄斑变性的发展或复发。有效剂量的范围是约 $1-4000\text{mg}/\text{m}^2$, 每日可高达三次。

[0329] 一种在对照和实验组中测定黄斑变性进展的方法是通过早期治疗糖尿病性视网膜病研究 (ETDRS) 图表 (Lighthouse, Long Island, NY) 用线条判定法和强制选择法 (Ferris 等人 *Am J Ophthalmol*, 94 :97-98 (1982)) 测定的最佳矫正视敏度。视敏度记录为 logMAR。在 ETDRS 图表上一条线条的变化相当于 0.1 logMAR。在对照和实验组中测定黄斑变性进展的另一种典型的方法包括使用视野检查, 包括但不限于 Humphrey 视野检查和微视野检查 (使用例如来自 NIDEK 的微视野计 MP-1), 和测定 / 监测患者眼中 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺和 / 或 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺的自发荧光或吸收光谱。可以用不同的设备来测定自发荧光, 包括但不限于共焦扫描激光检眼镜。参见 Bindewald, 等人, *Am. J. Ophthalmol.*, 137 :556-8 (2004)。

[0330] 在对照和实验组中测定黄斑变性进展的其他方法包括采用眼底照相、用

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

[0331] 为评价在施用药物期间统计学上的视觉改善，检查者使用 ETDRS (LogMAR) 图表，和标准化折射和视敏度方案。评价从基线到可获得的治疗后间隔随访的平均 ETDRS (LogMAR) 最佳矫正视敏度 (BCVA) 可以帮助确定统计学上的视觉改善。

[0332] 为了评价对照组和实验组之间的 ANOVA (各组之间的方差分析)，用 SAS/STAT 软件 (SAS Institutes Inc, Cary, North Carolina) 用非结构协 方差的反复测定分析和两组 ANOVA 来比较从基线到可获得的治疗后间隔随访的 ETDRS (LogMAR) 视敏度的平均变化。

[0333] 在研究开始后的毒性评价包括在下一年每 3 个月、在第三年每 4 个月以及再后一年每 6 个月检查。也可以在这些访问中评价芬维 A 胺和其代谢物 N-(4- 甲氧苯基) 视黄酰胺、血清视黄醇和 / 或 RBP 的血浆水平。毒性评价包括使用芬维 A 胺的患者，以及对照组的患者。

[0334] 实施例 2 : 测定通式 (I) 的化合物减少 A2E 产生的效力

[0335] 如实施例 1 所述的相同的实验设计，包括预试、施用、服用和毒性评价方案，也可以用于测定通式 (I) 的化合物减少或限制患者眼中 A2E 产生的效力。

[0336] 测定或监测 A2E 产生的方法包括采用患者眼中的 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 磷脂酰乙醇胺、二氢 -N- 亚视黄基 -N- 视黄基 - 乙醇胺和 / 或 N- 亚视黄基 - 磷脂酰乙醇胺的自发荧光测定。可以用各种设备来测定自发荧光，包括但不限于共焦扫描激光检视镜，参见 Bindewald, 等人, Am. J. Ophthalmol., 137 :556-8 (2004), 或使用如实施例 1 所述的自发荧光或吸收光谱测定技术。其他可以作为特定治疗效力的替代标志的测定包括使用视敏度和视野检查 (包括，例如，微视野检查)，阅读速度和 / 或阅读敏度检查，测定暗点和 / 或地理性萎缩损害的大小和数量，如实施例 1 所述。可以使用实施例 1 所述的统计学分析。

[0337] 实施例 3 : 测定通式 (I) 的化合物减少脂褐素产生的效力

[0338] 如实施例 1 所述的相同的实验设计，包括预试、施用、服用和毒性评价方案，也可以用于测定通式 (I) 的化合物减少或限制患者眼中脂褐素产生的效力。也可以使用实施例 1 所述的统计学分析。

[0339] 可以作为特定治疗效力的替代标志的测定包括使用视敏度和视野检查 (包括，例如，微视野检查)，阅读速度和 / 或阅读敏度检查，测定暗点和 / 或地理性萎缩区损害的大小和数量，测定 / 监测患者眼中某些化合物的自发荧光，如实施例 1 所述。

[0340] 实施例 4 : 测定通式 (I) 的化合物减少玻璃疣产生的效力

[0341] 如实施例 1 所述的相同的实验设计，包括预试、施用、服用和毒性评价方案，也可以用于测定通式 (I) 的化合物减少或限制患者眼中玻璃疣产生或形成的效力。也可以使用实施例 1 所述的统计学分析。

[0342] 在对照和实验组中测定玻璃疣进行性形成的方法包括在基线、第 3, 6, 9 和 12 月的

随访中采用眼底照相和荧光素血管造影术。形态变化的资料包括下列的变化方法：(a) 玻璃疣的大小、性质和分布；(b) 脉络膜新生血管形成的发展和进展；(c) 其他间隔的眼底变化或异常。其他可以作为特定治疗效力的替代标志的测定包括使用视敏度和视野检查（包括，例如，微视野检查），阅读速度和 / 或阅读敏度检查，测定暗点和 / 或地理性萎缩区损害的大小和数量，及测定 / 监测患者眼中某些化合物的自发荧光，如实施例 1 所述。

[0343] 实施例 5：黄斑营养不良的遗传学测定

[0344] 人们认为，人 ABCA4 基因的缺陷与 5 种不同的视网膜表型有关，包括 Stargardt 病、视椎 - 视杆营养不良、与年龄相关的视网膜变性（干性和湿性）和视网膜色素变性。参见例如 Allikmets 等人，*Science*, 277 :1805-07 (1997)；Lewis 等人，*Am. J. Hum. Genet.*, 64 :422-34 (1999)；Stone 等人，*Nature Genetics*, 20 :328-29 (1998)；Allikmets, *Am. J. Hum. Gen.*, 67 :793-799 (2000)；Klevering, 等人，*Ophthalmology*, 111 :546-553 (2004)。此外，在 ELOV4 基因中的突变会导致 Stargardt 病的常染色体显性形式。参见 Karan, 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci.* (2005)。可以通过下列任意的测定来诊断患者患有 Stargardt 病：

[0345] - 直接测序的突变检测策略，包括测定 ABCA4 或 ELOV4 所有外显子和侧翼内含子区域的序列突变；

[0346] - 基因组的 Southern 分析；

[0347] - 微阵列分析，包括所有已知的 ABCA4 或 ELOV4 变异体；和

[0348] - 液相色谱串联质谱法分析，并联合使用抗体的免疫细胞化学分析和 Western 分析。

[0349] 眼底照相、荧光素血管造影和扫描激光检视镜成像连同患者和他 / 或她的家庭病史可以预测和 / 或证实该诊断。

[0350] 小鼠和大鼠研究

[0351] 在 *abca4*^{-/-} 小鼠中阻断 A2E 产生的通式 (I) 的化合物的最佳剂量可以用标准剂量增加研究来确定。下面是一个说明性的方法，利用的是芬维 A 胺——一种具有通式 (I) 结构的化合物。但是，相似的方法也可用于其他具有通式 (I) 结构的化合物。

[0352] 优选在包括人治疗剂量的剂量下确定芬维 A 胺对光适应小鼠视网膜中的全反式视黄醛的作用。优选的方法包括用单一的早晨腹膜内剂量处理小鼠。在整天中，可能需要增加注射频率来维持视网膜中全反式视黄醛的已降低的水平。

[0353] 敲除 ABCA4 的小鼠。ABCA4 编码 rim 蛋白 (RmP)，其为视椎和视杆光感受体的外节盘中的 ATP- 结合盒 (ABC) 运载体。RmP 运载的底物是未知的。*abca4* 基因中的敲除突变产生的小鼠可以用于 RmP 功能的研究以及候选物质有效性的体内筛选，参见 Weng 等人，*Cell*, 98 :13-23 (1999)。这些动物表现出复杂的眼部表型：(i) 减慢了光感受器变性，(ii) 延迟了在暴露于光中以后视杆敏感度的恢复，(iii) 在光漂白后，提高光感受器外节中的 atRAL 并降低 atROL，(iv) 组成地提高外节中的磷脂酰乙醇胺 (PE) 含量，和 (v) 脂褐素在 RPE 细胞中蓄积。参见，Weng 等人，*Cell*, 98 :13-23 (1999)。

[0354] 可以通过两种技术来监测处理和未处理的野生型和 *abca4*^{-/-} 小鼠中光感受器变性的速率。一种是通过 ERG 分析在不同时间对小鼠进行研究，其采纳自临床诊断程序。参见 Weng 等人，*Cell*, 98 :13-23 (1999)。将电极置于已麻醉小鼠的角膜表面，从视网膜记录对闪光的电应答。光感受器的光诱导超极化产生的 α -波的振幅是光感受器变性的灵敏指

标。参见, Kedzierski 等人, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 38 :498-509(1997)。对活的动物进行 ERG。因此,可以在时间过程研究中反复分析相同的小鼠。定量光感受器变性的确定技术是视网膜切片的组织学分析。通过计数在外核层中光感受器核的行数来确定在每个时间点视网膜中剩余的光感受器的数量。

[0355] 组织提取。在 1ml 的 PBS pH 7.2 中将眼睛样本在冰上解冻,然后用 Dual1 玻璃-玻璃均化器将其手工匀化。在加入 1ml 氯仿 / 甲醇 (2 : 1, v/v) 后将样本进一步匀化。转移样本至硅酸硼管中,将脂质萃取到 4ml 氯仿中。用 3ml PBS, pH 7.2 洗涤有机萃取物,然后将样本以 3,000xg 离心分离 10 分钟。倒出氯仿相,用另外的 4ml 氯仿再萃取水相。离心分离后,合并氯仿相,在氮气中将样本干燥。将样本的残余物重悬浮在 100 μ l 己烷中并如下所述通过 HPLC 进行分析。

[0356] HPLC 分析。在 Agilent Zorbax Rx-SiI 柱 (5 μ m, 4.6 \times 250mm) 上,使用装有荧光和二极阵列监测器的 Agilent 1100 系列液体色谱仪来完成色谱分离。以 1ml/分钟的速度递送流动相 (己烷 / 2-丙醇 / 乙醇 / 25mM KH_2PO_4 , pH 7.0 / 乙酸 ; 485/376/100/50/0.275, v/v)。通过与可信标准品的保留时间和吸收光谱比较来进行样本的峰鉴定。报告的数据为从荧光监测器获得的峰值荧光 (L. U.)。

[0357] 实施例 6 : 芬维 A 胺对 A2E 蓄积的作用

[0358] 给实验组小鼠施用芬维 A 胺,给对照组小鼠单独施用 DMSO,分析 A2E 的蓄积。实验组每天在 10 到 25 μ l DMSO 中给予 2.5 到 20mg/kg 的芬维 A 胺。如果在最高剂量 50mg/mg 时没有观察到效果,则试验更高的剂量。对照组单独给予 10 到 25 μ l DMSO 注射液。实验或对照物质通过腹膜内 (i. p.) 注射不超过 1 个月的不同实验时间段施用于小鼠。

[0359] 为测定 abca4^{-/-} 小鼠 RPE 中 A2E 的蓄积,每天通过腹膜内注射为 2 个月大的 abca4^{-/-} 小鼠提供 2.5 到 20mg/kg 的芬维 A 胺。一个月后,杀死实验组和对照组的小鼠,通过 HPLC 测定 RPE 中 A2E 的水平。此外,用 UV/Vis 分光光度计监测 N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、N-亚视黄基-N-视黄基-磷脂酰乙醇胺、二氢-N-亚视黄基-N-视黄基-乙醇胺和 / 或 N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺的自发荧光或吸收光谱。

[0360] 实施例 7 : 芬维 A 胺对脂褐素蓄积的作用

[0361] 给实验组小鼠施用芬维 A 胺,给对照组小鼠单独施用 DMSO,分析脂褐素的蓄积。实验组每天在 10 到 25 μ l DMSO 中给予 2.5 到 20mg/kg 的芬维 A 胺。如果在最高剂量 50mg/mg 时没有观察到效果,则试验更高的剂量。对照组单独给予 10 到 25 μ l DMSO 注射液。实验或对照物质通过腹膜内注射不超过 1 个月的不同实验时间段施用于小鼠。或者,可以用递送实验或对照物质的泵以 0.25 μ l / 小时的速度在不超过 1 个月的不同实验时间段内植入小鼠中。

[0362] 为测定芬维 A 胺对芬维 A 胺处理和未处理的 abca4^{-/-} 小鼠中脂褐素产生的作用,可以用电子或荧光显微镜法检查眼睛。

[0363] 实施例 8 : 芬维 A 胺对视杆细胞死亡或视杆功能损害的作用

[0364] 给实验组小鼠施用芬维 A 胺,给对照组小鼠单独施用 DMSO,测定芬维 A 胺对视杆细胞死亡或视杆功能损害的作用。实验组每天在 10 到 25 μ l DMSO 中给予 2.5 到 20mg/kg 的芬维 A 胺。如果在最高剂量 50mg/mg 时没有观察到效果,则试验更高的剂量。对照组单独

给予 10 到 25 μ l DMSO 注射液。实验或对照物质通过腹膜内注射不超过 1 个月的不同实验时间段施用于小鼠。或者,可以用递送实验或对照物质的泵以 0.25 μ l/小时的速度在不超过 1 个月的不同实验时间段内植入小鼠中。

[0365] 每天 2.5 到 20mg/kg 的芬维 A 胺处理约 8 周的小鼠,通过监测 ERG 记录和进行视网膜组织学检查来测定芬维 A 胺对视杆细胞死亡或视杆功能损害的作用。

[0366] 实施例 9 :测定对光损害的保护作用

[0367] 下列研究来自于 Sieving, P. A., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 98 : 1835-40 (2001)。为进行慢性光暴露研究,将 7 周大的雄性 Sprague-Dawley 大白鼠饲养在 5 勒白荧光的 12:12 小时光 / 暗循环中。通过腹膜内注射在 0.18ml DMSO 中的 20-50mg/kg 芬维 A 胺,为慢性大鼠每天给药 3 次,共 8 周。对照组通过腹膜内注射接受 0.18ml

[0368] DMSO。最后一次注射后 2 天,杀死大鼠。如果在最高剂量 50mg/mg 时没有观察到效果,则试验更高的剂量。

[0369] 对于急性光暴露研究,将大鼠进行暗适应过夜,在暗淡的红光下单独腹膜内注射在 0.18ml DMSO 中的 20-50mg/kg 芬维 A 胺,并在 ERG 测定前,在暴露于漂白光中之前保持在黑暗中 1 小时。将大鼠暴露在 2,000 勒白荧光中 48 小时。7 天后记录 ERG,并立即进行组织学检查。

[0370] 麻醉大鼠并取出眼睛。在横穿两个半球的每 200 μ m 测定外核层厚度和视杆外节 (ROS) 长度的细胞计数,平均该数目得到横穿整个视网膜的细胞改变的量度。在治疗的第 4 和 8 周记录慢性大鼠的 ERG。在急性啮齿目动物中,通过使用不引起视锥作用的刺激通过暗适应 ERG 来跟踪视杆从漂白光中的恢复。用光适应的 ERG 来跟踪视锥的复原。在 ERG 前,在弱的红光中准备好动物并麻醉。扩张瞳孔,通过使用金线角膜环来同时记录两只眼睛的 ERG。

[0371] 实施例 10 :涉及芬维 A 胺和异维甲酸的联合治疗

[0372] 用如实施例 6-9 所述的方法来测定小鼠和 / 或大鼠,但是具有另外的两个分组。在另外两个分组之一中,用提高剂量的异维甲酸,从每天 5mg/kg 至每天 50mg/kg 来治疗几组小鼠和 / 或大鼠。在第二个另外的分组中,用每天 20mg/kg 的芬维 A 胺和提高剂量的每天 5mg/kg 至每天 50mg/kg 异维甲酸的组合来治疗几组小鼠和 / 或大鼠。如实施例 6-9 所述来测定联合治疗的益处。

[0373] 实施例 11 :在 abca4 无效突变小鼠中芬维 A 胺对脂褐素 (和 / 或 A2E) 蓄积的效力 :阶段 I——剂量响应和对血清视黄醇的作用

[0374] 在动物和人受试者中 HPR 降低血清视黄醇的效果引导我们去探索其也可能实现降低脂褐素和毒性二 - 类视黄醇耦合物 A2E 的可能性。该途径的原理是基于科学证据的两个独立的线索 :1) 通过抑制已知的视觉循环酶 (11- 顺式视黄醇脱氢酶) 降低眼维生素 A 浓度导致了脂褐素和 A2E 显著减少 ;2) 用缺乏维生素 A 的食物维持的动物显示出脂褐素蓄积明显减小。因此,本实施例的目的是检查 HPR 在动物模型中的效果,该动物模型为 abca4 无效突变小鼠,用于证明眼组织中脂褐素和 A2E 的大量蓄积。

[0375] 通过检查 HPR 对血清视黄醇的作用来开始最初的研究。将动物分成 3 组,分别给予 DMSO、10mg/kg HPR 或 20mg/kg HPR,共 14 天。在研究期结束时,收集动物的血液,制备血清,用反相 LC/MS 分析血清的乙腈提取液。进行 UV- 可见光谱和质量 / 电荷分析来证实洗脱峰

的鉴定。从这些分析中获得的样本色谱图显示的是：附图 1a- 接受 HPR 载体 DMSO 的 abca4 无效突变小鼠的提取物；附图 1b-10mg/kgHPR；附图 1c-20mg/kg HPR。该数据清楚地表明了血清视黄醇剂量依赖性地减少。定量数据表明，当为 10mg/kg HPR 时，全反式视黄醇降低了 40%，见附图 7。对于 20mg/kg HPR，血清视黄醇降低了 72%，见附图 7。在血清 (20mg/kg HPR) 中视黄醇和 HPR 的稳态浓度分别确定为 2.11 μ M 和 1.75 μ M。

[0376] 基于这些发现，我们试着进一步探索在 HPR 治疗期间视黄醇减少的机理。一个站得住脚的假设是，通过在 RBP 上的视黄醇结合位点处竞争，HPR 可以取代视黄醇。与视黄醇类似，HPR 将会在蛋白质荧光的区域吸收（猝灭）光能；然而，与视黄醇不同，HPR 不会发射荧光。因此，人们可以通过观测蛋白质 (340nm) 和视黄醇 (470nm) 荧光的减少来测定视黄醇从 RBP 全蛋白质中的取代。我们用与上述 14 天 20mg/kg HPR 实验所确定的浓度类似的 RBP- 视黄醇 /HPR 浓度完成了竞争结合测定。从这些测定中获得的数据表明，在生理温度下 HPR 从 RBP 全蛋白质中有效地取代了视黄醇，见附图 3b。HPR 和 RBP 的竞争性结合是剂量依赖性的和可饱和的。在对照测定中，视黄醇荧光的降低伴随着蛋白质荧光的增加，见附图 3a。该效应被确定为是由于温度效应，即 RBP- 视黄醇解离常数在 37°C 下随着时间的增加而提高（亲和力降低）。总之，这些数据表明，相对于 RBP 全蛋白质（例如，1.0 μ M HPR），等摩尔当量的 HPR 将在体内从 RBP 取代视黄醇。使显著比例的视黄醇在体内从 RBP 中被取代。相对于 RBP 全蛋白质，超过等摩尔当量的 HPR 的增加（例如，2.0 μ M HPR 与 1.0 μ M RBP），将会产生与 HPR 极为相关的大量的 RBP。

[0377] 施用降低患者血清视黄醇水平的一种或多种药剂而不调节视觉循环中的至少一种酶有望用于治疗黄斑和 / 或视网膜营养不良和变性或与其相关的症状。分析，例如本文所述的那些可以用于选择具有该作用的其他药剂，包括选自具有式 (I) 的结构化合物及其他药剂。假定的前体化合物包括已知或已证明影响血清视黄醇水平的其他药剂。

[0378] 实施例 12：在 abca4 无效突变小鼠中芬维 A 胺对脂褐素（和 / 或 A2E）蓄积的效力：阶段 II——abca4 无效突变小鼠的长期治疗

[0379] 我们开始一个为期一月的研究来评价在 abca4 无效突变小鼠中 HPR 降低 A2E 和 A2E 前体的效果。每天将 HPR (20mg/kg, 腹膜内) 在 DMSO 中施用于 abca4 无效突变小鼠 (BL6/129, 2 个月大)，共 28 天。对照组的年龄 / 品种相匹配的小鼠仅接受 DMSO 载体。在 0、14 和 28 天（每组 n = 3）对小鼠取样，摘出眼珠并萃取氯仿可溶的组分（脂类、类视黄醇和脂类 - 类视黄醇偶联物）。用颈脱位法处死小鼠，摘出眼珠，并分别在冻存管中急剧冰冻。然后用装有联机荧光检测器的 HPLC 分析样本提取物。该研究的结果表明 A2E 前体 A2PE-H2 显著地在早期减少，见附图 4a，随后 A2E 减少，见附图 4b。定量分析表明在 HPR 治疗 28 天后，A2PE-H2 有 70% 的减少，A2E 有 55% 的减少。可以用类似的研究来确定 HPR 治疗对视网膜电描记和形态学表型的影响。

[0380] 实施例 13：涉及芬维 A 胺和他汀类药物的联合治疗

[0381] 用如实施例 6-9 所述的方法来测试小鼠和 / 或大鼠，但具有另外的两个分组。在另外两个分组之一中，以基于体重的最佳剂量用适当的他汀类药物，例如：Lipitor[®]（阿伐他汀）、Mevacor[®]（洛伐他汀）、Pravachol[®]（普伐他汀钠）、Zocor[™]（辛伐他汀）、Leschol（氟伐他汀钠）等等，治疗几组小鼠和 / 或大鼠。在第二个另外的分组中，用每天

20mg/kg 的芬维 A 胺和提高剂量的前一步骤使用的他汀类药物组合来治疗几组小鼠和 / 或大鼠。这些他汀类药物用于人的建议剂量例如是 :Lipitor[®] (阿伐他汀)10-80mg/ 天、Mevacor[®] (洛伐他汀)10-80mg/ 天、Pravachol[®] (普伐他汀钠)10-40mg/ 天、Zocor[™] (辛伐他汀)5-80mg/ 天、Leschol (氟伐他汀钠)20-80mg/ 天。用于小鼠和 / 或大鼠受试者的他汀类药物的剂量应当根据体重来计算。如实施例 6-9 所述来测定联合治疗的益处。

[0382] 实施例 14 :涉及芬维 A 胺、维生素和矿物质的联合治疗

[0383] 如实施例 13 所述的方法对小鼠和 / 或大鼠进行试验,但是使用选择的维生素和矿物质。芬维 A 胺和维生素以及矿物质的组合施用可以口服或胃肠外施用,其量为抑制黄斑变性发展或复发的有效量。开始时的试验剂量范围是芬维 A 胺每天约 20mg/kg, 和 100-1000mg 维生素 C, 100-600mg 维生素 E, 10, 000-40, 000IU 维生素 A, 50-200mg 锌和 1-5mg 铜, 共 15-20 天。如实施例 6-9 所述来测定联合治疗的益处。

[0384] 实施例 15 :运甲状腺素蛋白 (TTR) 结合到视黄醇结合蛋白 (RBP) 上的荧光猝灭研究

[0385] 室温下将 0.5 μ M 的脱辅基 -RBP 分别和 0、0.25、0.5、1 和 2 μ M 的 MPR 在 PBS 中温育 1 小时。作为对照,将相同浓度的脱辅基 -RBP 也与 1 μ M 的 HPR 或 1 μ M 的 atROL 温育。所有混合物包含 0.2% 乙醇 (v/v)。测定发射光谱在 290nm 到 550nm 之间,激发波长在 280nm 和 3nm 通带。

[0386] 如附图 5 所示,MPR 显示了对 RBP 荧光的浓度依赖性猝灭,1 μ M 的 MPR 饱和地猝灭 0.5 μ M 的 RBP。由于观测到的荧光猝灭可能是由于荧光的共振能在蛋白质芳香残基和结合的 MPR 分子之间转移引起的,提示 MPR 结合到 RBP 上。MPR 的猝灭程度小于 atROL 和 HPR, 后两者是结合到 RBP 上的另外两种配体。

[0387] 实施例 16 :TTR 与 RBP 结合的大小排阻研究

[0388] 室温下将 10 μ M 的脱辅基 -RBP 和 50 μ M 的 MPR 在 PBS 中温育 1 小时。然后向该溶液中加入 10 μ M 的 TTR,在室温下再温育该混合物 1 小时。通过 BioRad Bio-Sil SEC 125 凝胶过滤柱 (300 \times 7.8mm) 分析 50 μ l 加入和未加入 TTR 的样本混合物。在对照实验中,以相同方法分析 atROL-RBP 和 atROL-RBP-TTR 混合物。

[0389] 如附图 6a 所示,MPR-RBP 样本显示了 RBP 洗脱峰 (在 11ml),在 360nm 处有强烈光吸收,表明 RBP 结合到 MPR 上;与 TTR 温育后,该 360nm 光吸收与 RBP 洗脱峰一起保留,而 TTR 洗脱峰 (在 8.6ml) 不包含任何明显的 360nm 光吸收 (见附图 6b),表明 MPR-RBP 没有结合到 TTR 上。在 atROL-RBP 对照实验中,RBP 洗脱峰显示了强烈的 330nm 光吸收 (见附图 6c);在与 TTR 温育后,超过一半的该 330nm 光吸收转移到 TTR 洗脱峰 (见附图 6d) 上,表明 atROL-RBP 结合到 TTR 上。因此,MPR 抑制了 TTR 与 RBP 的结合。

[0390] 实施例 17 :作为 HPR 浓度函数的血清视黄醇的分析

[0391] 每日给予 ABCA4 无效突变小鼠在 DMSO 中的指定剂量的 HPR (i. p.), 共 28 天 (每剂量组 n = 4 只小鼠)。在研究期结束时,采集血样,制备血清。在用乙腈沉淀血清蛋白质后,通过 LC/MS 从溶解相确定视黄醇和 HPR 的浓度 (见附图 7)。洗脱化合物的鉴定通过 UV-vis 吸收光谱法以及样本峰和可信标准品的共洗脱得到了证实。

[0392] 实施例 18 :在 ABCA4 无效突变小鼠中 HPR 浓度与视黄醇、A2PE-H₂ 和 A2E 减少的关

系

[0393] 将实施例 19 (28 天时间点) 的附图 10 的图 A-G 所示数据的组平均数作图, 来显示血清 HPR 的升高与血清视黄醇的减少之间的密切相关性 (见附图 8)。血清视黄醇的减少与 A2E 和其前体化合物 (A2PE-H₂) 的减少之间高度相关。当血清视黄醇减少仅为 20% 时, 观测到在 2.5mg/kg 剂量组中 A2PE-H₂ 显著减少 (约 47%)。该不成比例的减少的原因与该组 2 个月大的动物比其它组固有的眼类视黄醇含量较低有关。很可能的是, 如果在一个较长的时间里这些动物维持 2.5mg/kg 剂量, 也能实现 A2E 更大地减少。

[0394] 实施例 19 :A2PE-H₂ 和 A2E 水平作为 HPR 剂量和治疗期的函数的分析

[0395] 在光适应的 DMSO- 和 HPR- 治疗的小鼠中类视黄醇组合物的分析 (附图 9, 图 A) 表明, 作为 HPR 治疗 (每日 10mg/kg, 28 天) 的结果, 视觉循环中类视黄醇减少了约 50%。附图 9 的图 B 和 C 表明, HPR 不会影响这些小鼠中视觉生色团的再生 (图 B 是视觉生色团生物合成, 图 C 是漂白的生色团再循环)。附图 9 的图 D-F 是视杆功能 (图 D)、视杆和视锥功能 (图 E) 和从光漂白恢复 (图 F) 的电生理测定值。唯一值得注意的差异是在 HPR- 治疗的小鼠中延迟了暗适应 (图 F)。

[0396] 每日给予 ABCA4 无效突变小鼠指定剂量的在 DMSO 中的 HPR 或仅给予 DMSO, 共 28 天 (n = 16 小鼠 / 治疗组)。在研究开始时, 2.5mg/kg 组的小鼠是 2 个月大, 在其它组的小鼠是 3 个月大。在指定时间, 从每组取代表性的小鼠 (n = 4) 以分析 A2E 前体化合物 (参见附图 10, A2PE-H₂, 图 A、C 和 E) 和 A2E (参见附图 10, 图 B、D 和 F)。摘除眼睛, 对半切开, 通过氯仿 / 甲醇 - 水相分配法从后极中提取脂溶性组分。通过 LC 分析样品提取物。通过 UV-vis 吸收光谱和用可信标准的样品共洗脱证实对所洗脱化合物的鉴定。注意: 在 10mg/kg 组中适当的年龄和品系 - 相配的小鼠的局限性导致难以在 14- 天间隔中分析。

[0397] 附图 10 的图 G-I 显示的是在 abcr 无效突变小鼠 (Stargardt 病的动物模型) 的 RPE 中 HPR 显著地降低脂褐素的自发荧光的形态学 / 组织学证据。治疗情况如上所述。HPR 治疗的动物中自发荧光的水平低于年龄匹配的野生型动物的水平。附图 11 显示了来自 DMSO- 和 HPR- 治疗的动物的视网膜的光学显微镜检查影像, 表明在视网膜细胞结构中没有异常形态学或完整性的破坏。

[0398] 脂褐素在视网膜色素上皮细胞 (RPE) 中的蓄积是在视网膜的各种变性疾病中观测到的共同的病理学特征。存在于脂褐素颗粒中的毒性的基于维生素 A 的荧光团 (A2E) 与 RPE 和光感受器细胞的死亡有关。在这些实验中, 我们使用了动物模型, 其通过证明脂褐素蓄积加速来评价根据血清维生素 A (视黄醇) 的降低的治疗途径的效力。芬维 A 胺有效地和可逆地降低了血清视黄醇。给 Stargardt' s 病基因 (ABCA4) 具有无效突变的小鼠施用 HPR 导致血清视黄醇 / 视黄醇结合蛋白大幅降低, 阻止了 RPE 中 A2E 和脂褐素自发荧光的蓄积。从生理学上讲, 由于适当地延迟了暗适应, 因此 HPR- 诱导的视觉生色团的降低是明显的; 生色团再生的动力学是正常的。重要的是, 也鉴定了 HPR 对维生素 A 酯化作用和生色团动员的特异性细胞内作用。这些发现表明 A2E 生物合成对维生素 A- 的依赖性并证实了容易地可转移到患基于脂褐素的视网膜疾病的人类患者的治疗途径。

[0399] 实施例 20 : 与 TTR 结合和 / 或抑制 TTR 的基因表达的化合物的鉴定

[0400] 纯化的 TTR 多肽包含谷胱甘肽 -S- 转移酶蛋白, 并吸收到 96- 孔微升板的谷胱甘肽衍生孔上, 将纯化的 TTR 多肽与来自小分子库的受试化合物在 pH 7.0 的生理缓冲溶液中

接触。该纯化的 TTR 多肽是本领域已经描述的。参见美国专利申请 20020160394, 将其以整体通过参考引入本文。受试化合物可以包含荧光标记。将样品温育 5 分钟到 1 小时。对照样品在没有受试化合物的条件下温育。

[0401] 将包含受试化合物的缓冲溶液从孔中洗出。通过孔内容物的荧光测定检测受试化合物与 TTR 多肽的结合。将孔中的荧光相对于不温育受试化合物的孔的荧光提高了至少 15% 的受试化合物鉴定为与 TTR 多肽结合的化合物。

[0402] 可以将鉴定的受试化合物施用于用 TTR 表达构造转染的人细胞的培养基上, 并在 37°C 下温育 10 到 45 分钟。将没有转染的相同类型的细胞的培养基在没有受试化合物的条件下温育相同时间, 作为阴性对照。

[0403] 然后如 Chirgwin 等人, Biochem. 18, 5294-99, 1979 所述, 从这两个培养基中分离 RNA。用 20 到 30 μ g 总 RNA 制备 Northern 印记, 并用 32 P- 标记的 TTR- 特异性探针杂交。前面已经描述了检测 TTRmRNA 转录物的探针。将比没有受试化合物得到的信号更低的 TTR- 特异性信号的受试化合物鉴定为 TTR 基因表达的抑制剂。

[0404] 实施例 21 : 与 RBP 结合和 / 或抑制 RBP 的基因表达的化合物的鉴定

[0405] 将纯化的 apo RBP 与来自小分子库的受试化合物在 pH 7.0 的生理缓冲溶液中接触。该纯化的 apo RBP 是本领域已经描述的。参见美国专利申请 20030119715, 将其以整体通过参考引入本文。受试化合物可以包含荧光标记。将样品温育 5 分钟到 1 小时。对照样品在没有受试化合物的条件下温育。也可以进行在 holo RBP (RBP 与视黄醇络合) 存在下的竞争性分析。

[0406] 将包含受试化合物的缓冲溶液从孔中洗出。通过孔内容物的荧光测定检测受试化合物与 apo RBP 的结合。将孔中的荧光相对于不温育受试化合物的孔的荧光提高了至少 15% 的受试化合物鉴定为与 apoRBP 结合的化合物。

[0407] 可以将鉴定的受试化合物施用于用 RBP 表达构造转染的人细胞的培养基上, 并在 37°C 下温育 10 到 45 分钟。将没有转染的相同类型的细胞的培养基在没有受试化合物的条件下温育相同时间, 作为阴性对照。

[0408] 然后如 Chirgwin 等人, Biochem. 18, 5294-99, 1979 所述, 从这两个培养基中分离 RNA。用 20 到 30 μ g 总 RNA 制备 Northern 印记, 并用 32 P- 标记的 RBP- 特异性探针杂交。将比没有受试化合物得到的信号更低的 RBP- 特异性信号的受试化合物鉴定为 RBP 基因表达的抑制剂。

[0409] 实施例 22 : HPR 对血清视黄醇、视杯类视黄醇和 A2E 水平的影响的进一步分析

[0410] HPR 治疗。将 HPR 每日施用于 ABCA4^{-/-} 小鼠 (1.5-15 μ g/ μ l, 在 25 μ l DMSO 中, i. p.), 共 28 天。在实验开始时小鼠 1-2 个月大, 并且是涂色 (129/SV) 的或白化体 (BALB/c) 株。在治疗期间将小鼠置于 12- 小时光 / 暗循环 (30-50lux) 下, 并通过 i. p. 注射氯胺酮 (200mg/kg) 和 (10mg/kg) 赛拉嗪麻醉, 然后通过颈脱位法处死。

[0411] 血清视黄醇的分析。用 HPR- 治疗 18 小时, 在最后的 HPR 剂量 (即, 第 28 天) 后的小鼠的尾部静脉中收集全血。在以 1,500xg 离心 10 分钟后从全血中获得血清。加入等体积的冰冷乙腈并离心 (10,000xg, 10 分钟) 以沉淀血清蛋白。从可溶相中移出测试用量部分, 并用装配有二极管阵列检测器的 Agilent 1100 系列毛细管液体色层分析仪通过 HPLC 分析。在用流速为 10 μ l/ 分钟的乙腈 / 水 / 冰醋酸 (80 : 18 : 2, v/v) 平衡的 Zorbax SB

C18 5 μ m 柱 (150 \times 0.5mm) 进行色谱分析。

[0412] 类视黄醇和 A2E 的提取和分析。在每日施用 (28 天) HPR 后, 确定 ABCA4^{-/-} 小鼠的视杯中类视黄醇和 A2E 的稳态水平 (附图 12)。处死小鼠, 摘除眼睛, 并将每只眼睛的后部分用于类视黄醇或 A2E 的提取。已经描述了用于从眼组织和 HPLC 分析技术中提取类视黄醇和 A2E 的方法。参见例如, Mata NL, Weng J, Travis GH. Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 ;97 :7154-7159 ;Weng J 等人 ;Cell. 1999 ;98 :13-23 ;Mata NL 等人 ;Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 2001 ;42 :1685-1690。使用吸收和荧光检测通过 HPLC 分析所有样品。在这些分析, 使用柱恒温器将溶剂和柱温度维持在 40 $^{\circ}$ C。通过在线光谱分析和通过用可靠的标准品共洗脱来进行指定化合物的鉴定。

[0413] 血清视黄醇、眼部类视黄醇和 A2E 之间的关系。实施例 22 (附图 12) 的数据表明, 血清视黄醇的降低与哺乳动物视杯中类视黄醇的水平和 A2E 的水平降低有直接的关系。显著地, 血清视黄醇的降低以剂量依赖的方式追踪着眼部类视黄醇水平和眼部 A2E 水平。例如, 芬维 A 胺不仅降低了哺乳动物的血清视黄醇水平, 而且另外地, 血清视黄醇的降低影响了与视网膜病和黄斑变性 / 营养不良有关的物质 (例如, A2E) 的水平。因此, 导致血清视黄醇降低的药剂例如芬维 A 胺也可以用于降低眼中 A2E 和类视黄醇水平, 可以用于治疗哺乳动物的基于脂褐素的视网膜疾病, 例如, 视网膜病和黄斑变性 / 营养不良。

[0414] 实施例 23 : 确认 RBP 作为治疗靶用于阻止 A2E 蓄积

[0415] 我们已经探求了降低脂褐素荧光团的非药理学方法以证实我们在患者中基于降低 RBP 水平的治疗途径。在该研究中, 通过基因操作降低了 RBP 蛋白质水平。已经产生了两种新品系的表达视黄醇结合蛋白 (RBP4) 杂交突变的小鼠。第一品系携带仅位于 RBP 部位的杂交突变 (RBP^{+/-}) ; 第二品系携带在 ABCA4 和 RBP 部位的基因突变 (ABCA4^{+/-}/RBP^{+/-})。因此, 两个品系都实现了 RBP 表达和血清视黄醇降低 \sim 50%。RBP^{+/-} 小鼠在 ABCA4 部位是野生型的, 因此, 不会蓄积过量的 A2E 荧光团。但是, ABCA4^{+/-} 小鼠将会蓄积 A2E 荧光团, 其水平是在 ABCA4^{-/-} (无效纯合) 小鼠中所观测到水平的约 50%。问题是在 ABCA4^{+/-}/RBP^{+/-} 小鼠中 RBP 的表达降低是否对 A2E 荧光团的蓄积有作用。

[0416] 已经在三个月的时间里每月检测这些小鼠中 A2E 和前体荧光团 (A2PE 和 A2PE-H₂) 的水平, 并与 ABCA4^{+/-} 小鼠的荧光团水平比较。该数据提供了在三个月大的三个品系的小鼠中的荧光团水平 (附图 18)。总的来说, ABCA4^{+/-}/RBP^{+/-} 小鼠总荧光团水平相对于 ABCA4^{+/-} 小鼠的水平降低了 \sim 70%。事实上, 在 ABCA4^{+/-}/RBP^{+/-} 小鼠中测定的荧光团水平与 RBP^{+/-} 小鼠中观测到的水平接近。这些数据证明了 RBP 可以作为治疗靶降低眼中的荧光团水平。进一步地, 这些数据表明在患者中抑制 RBP 转录或翻译的试剂或方法也会 (a) 降低患者的血清视黄醇水平, 和 (b) 为本文所述的与视网膜有关的疾病提供治疗益处。进一步地, 增强患者 RBP 清除的试剂或方法也会产生这样的作用和益处。

[0417] 根据本文公开, 不需要过多的试验即可实施并完成本文公开和要求保护的所有方法。对本领域技术人员显而易见地, 对于方法和本文所述方法的步骤或顺序可以使用各种变化而不脱离本发明的概念、精神和范围。尤其显而易见地, 某些涉及化学和生物学的试剂可以取代本文所述的试剂, 同时还达到了相同或相似的结果。所有这些对本领域技术人员显而易见的类似的替代方式和变更都在附属的权利要求定义的本发明的精神、范围和概念内。

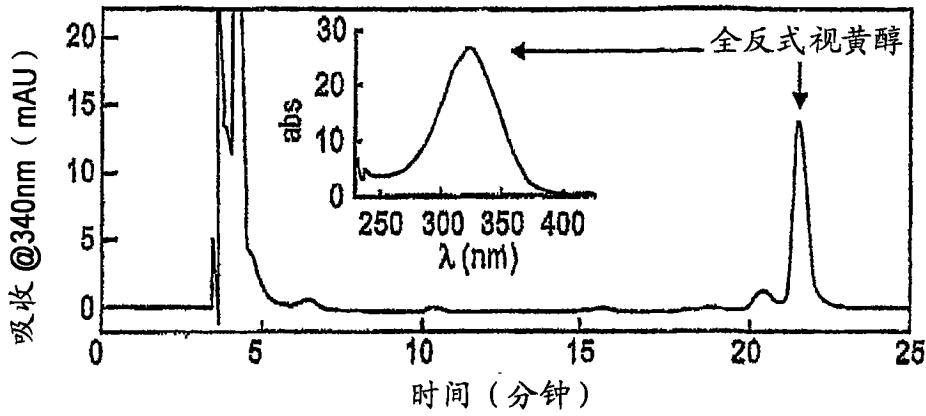


图 1A

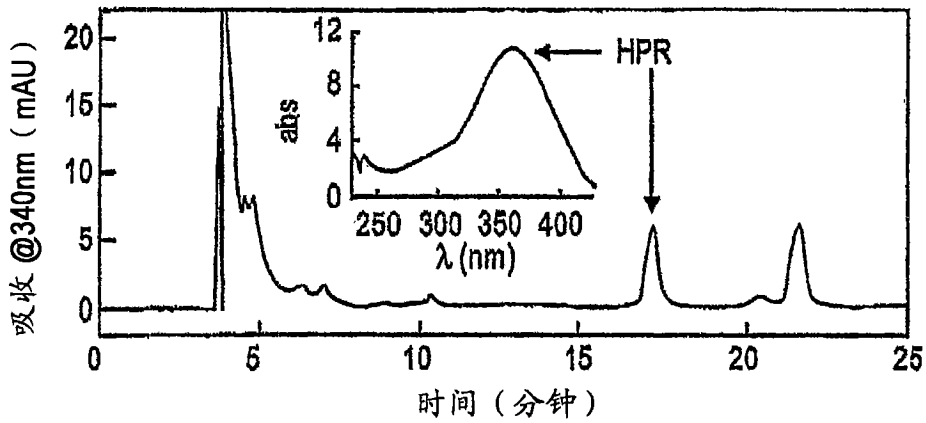


图 1B

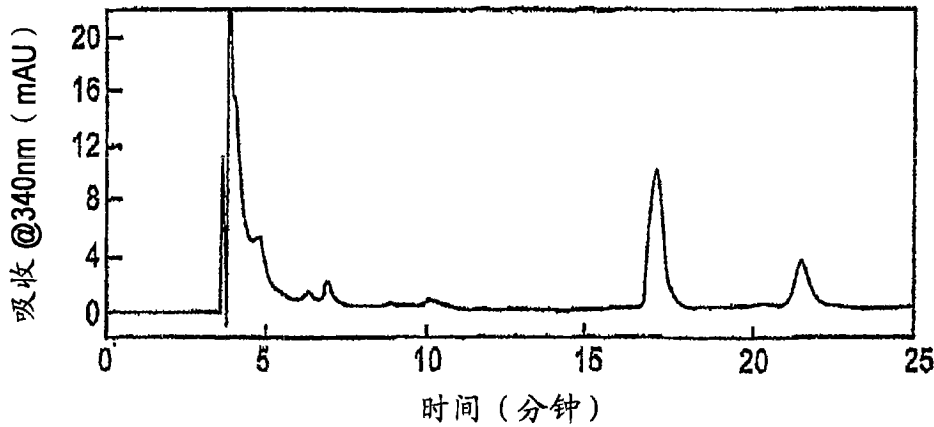


图 1C

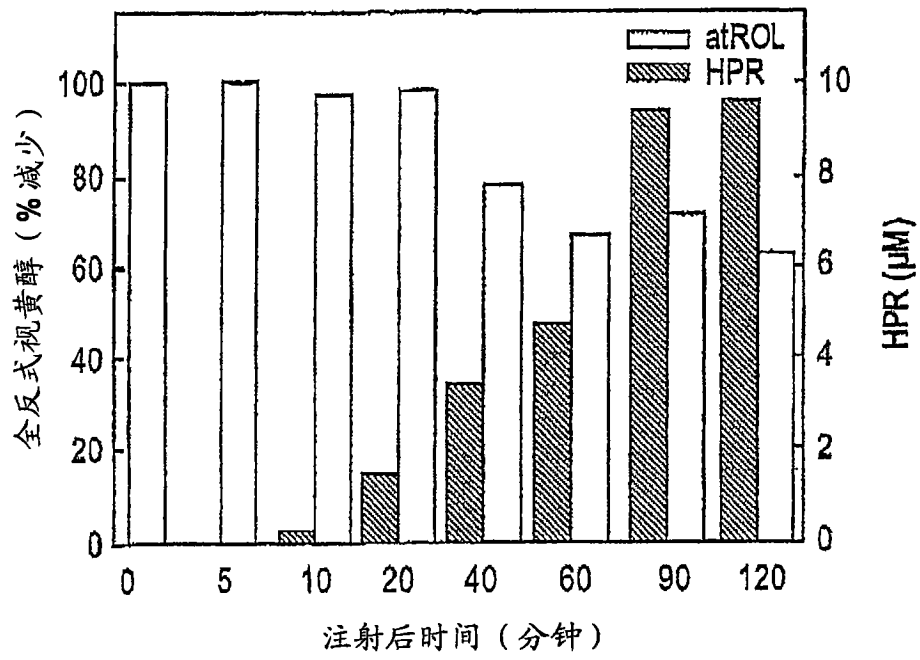


图 2A

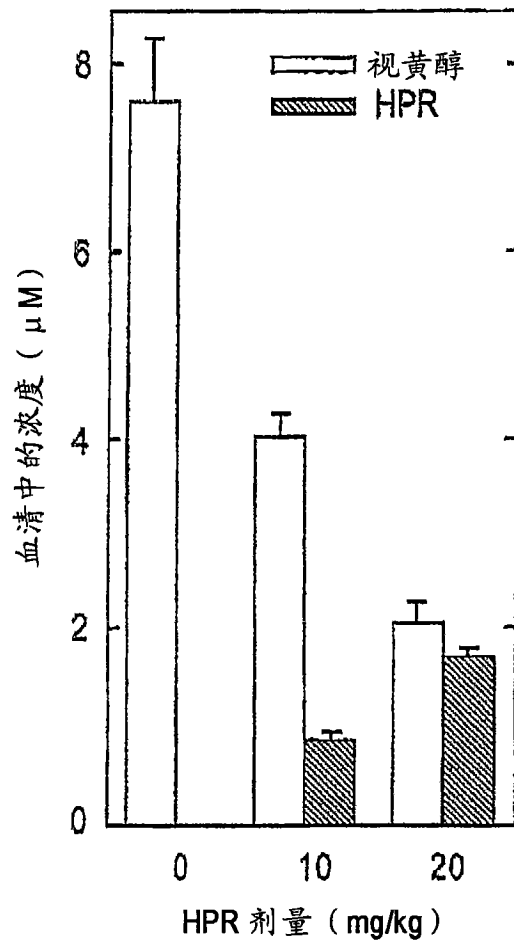


图 2B

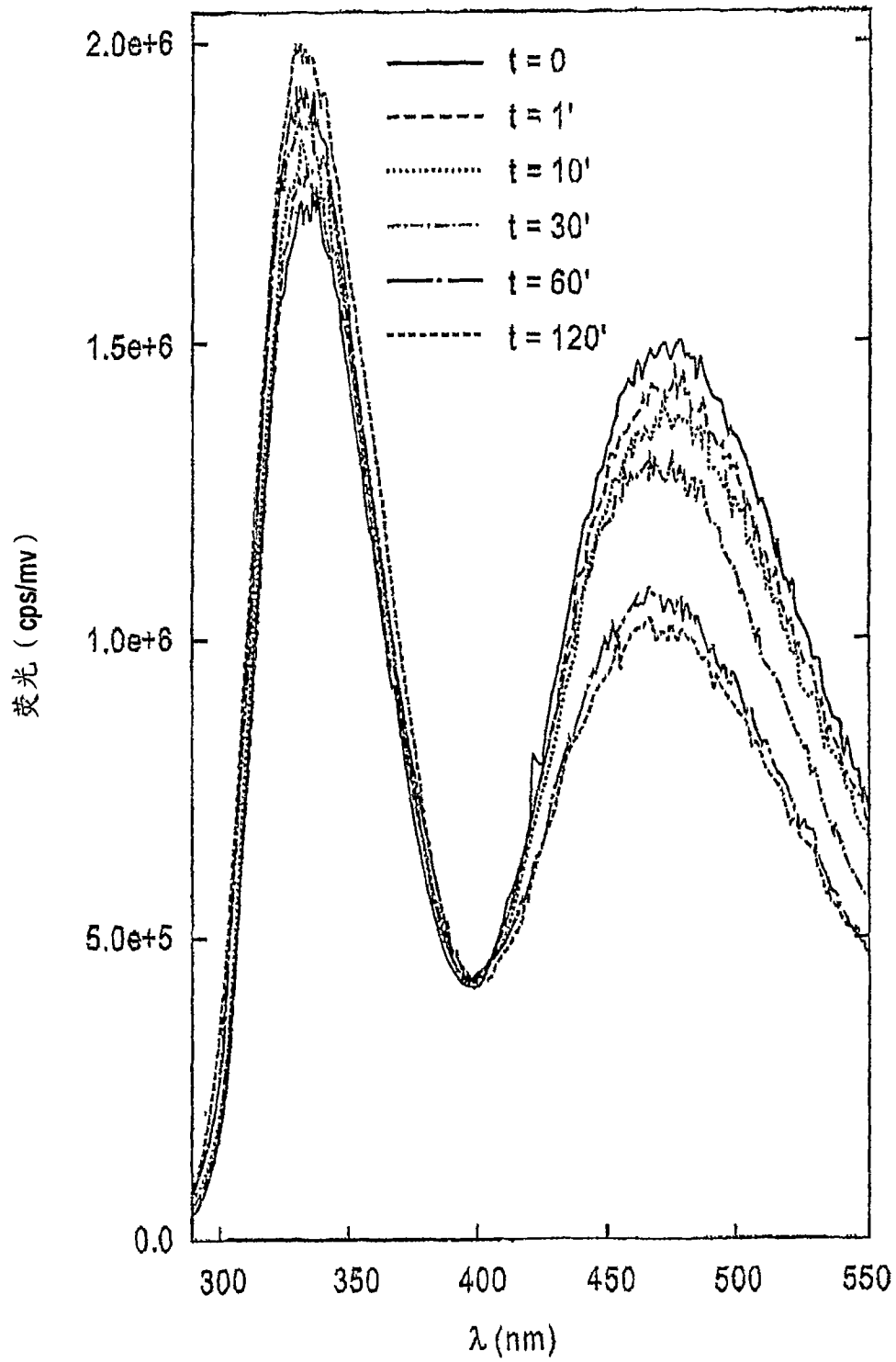


图 3A

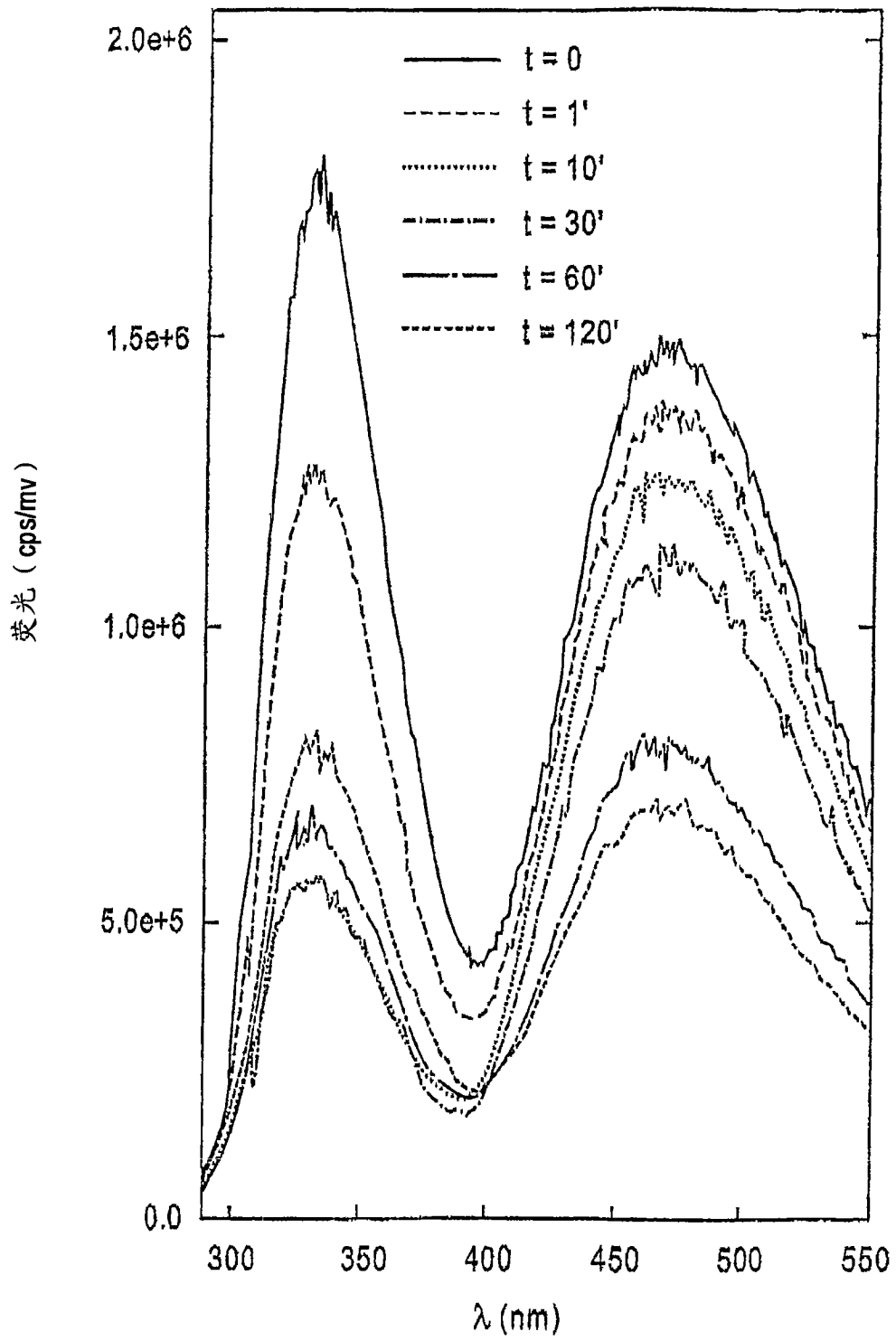


图 3B

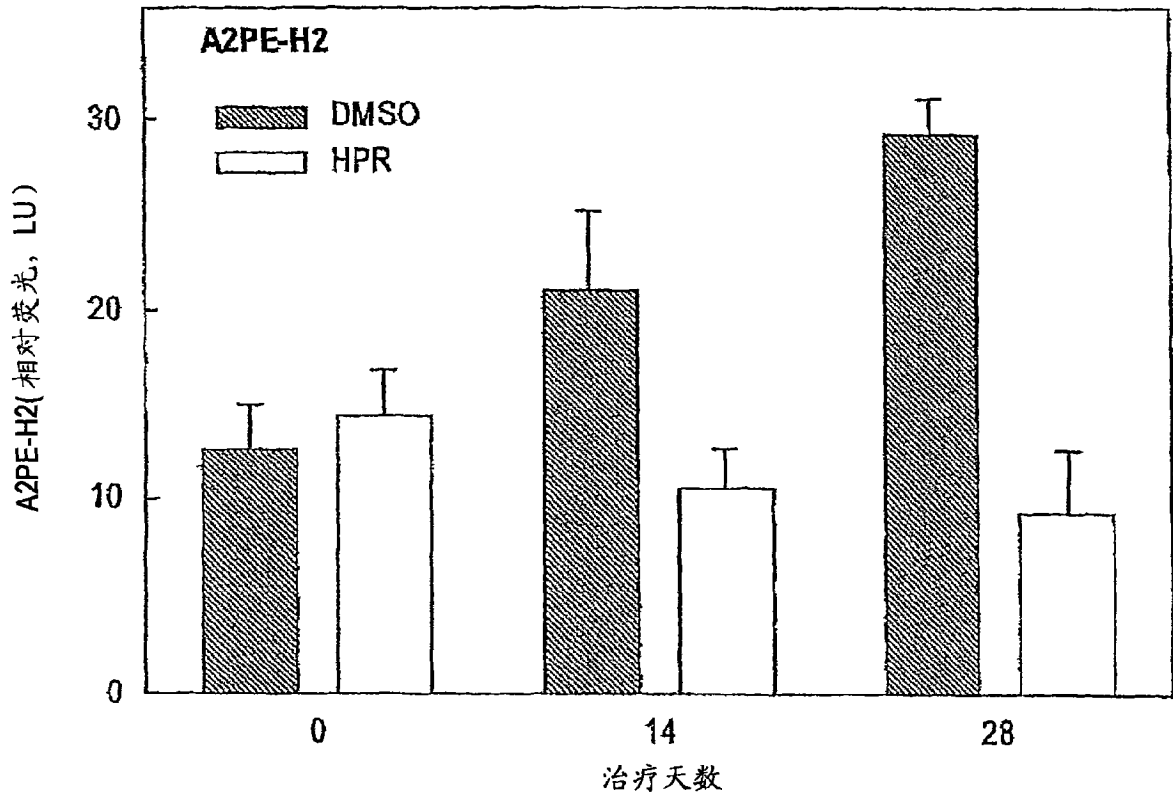


图 4A

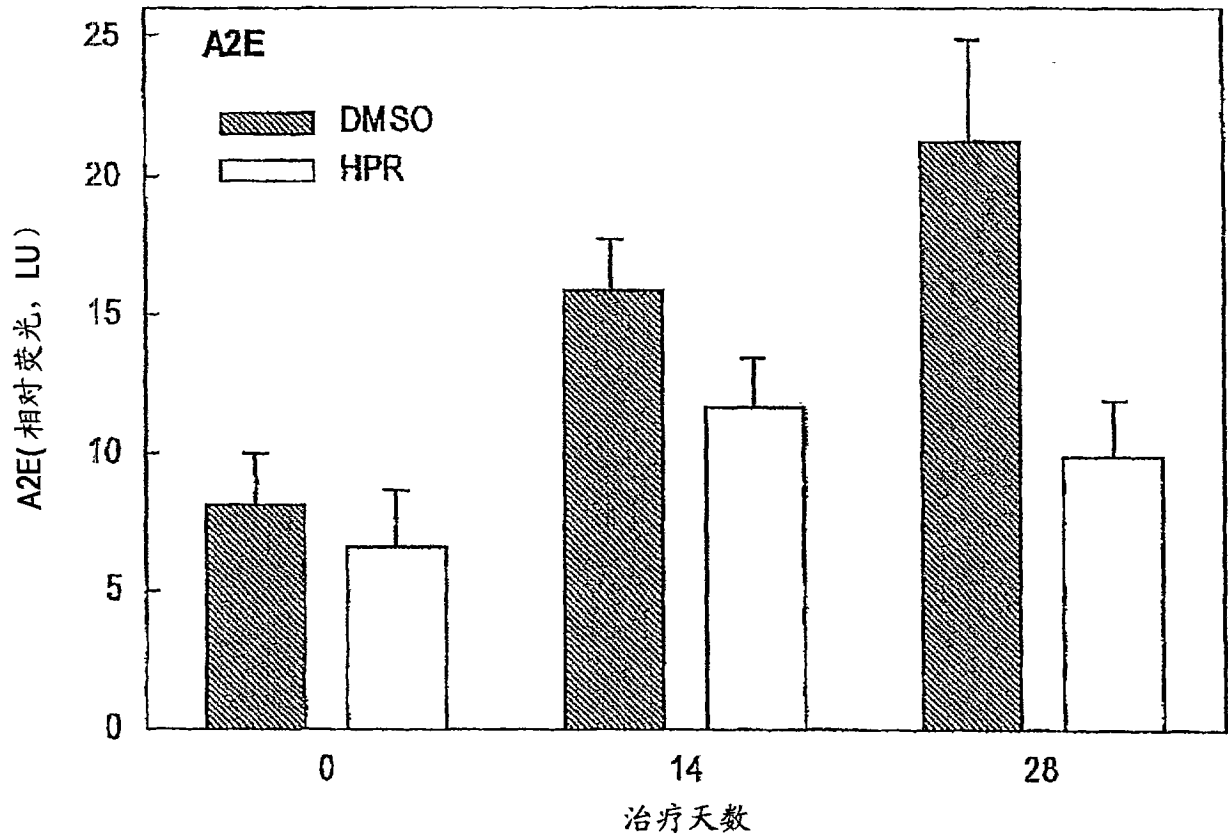


图 4B

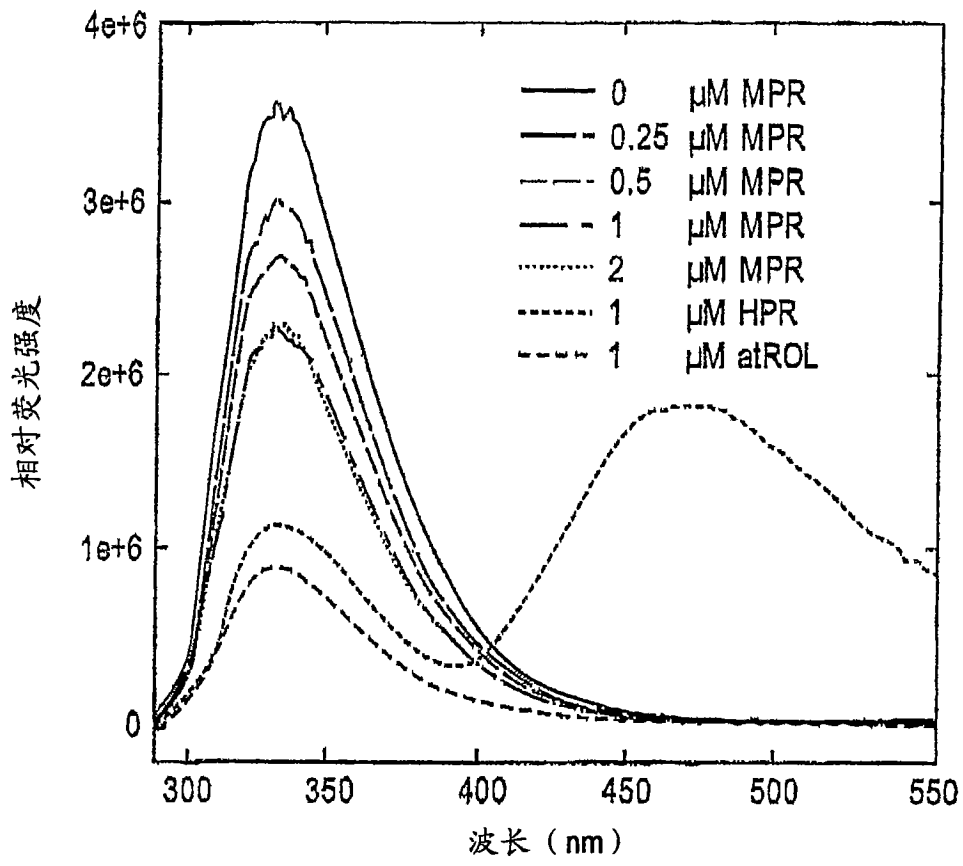


图 5

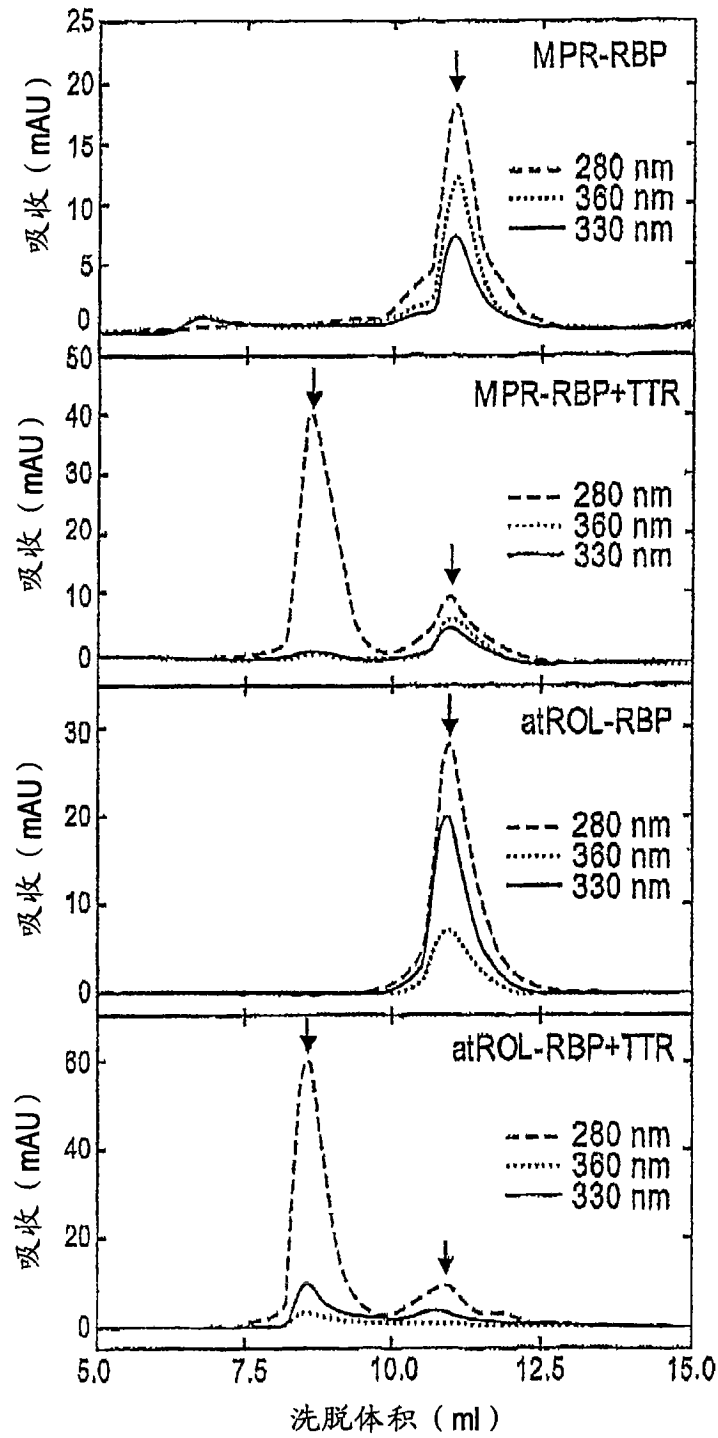


图 6

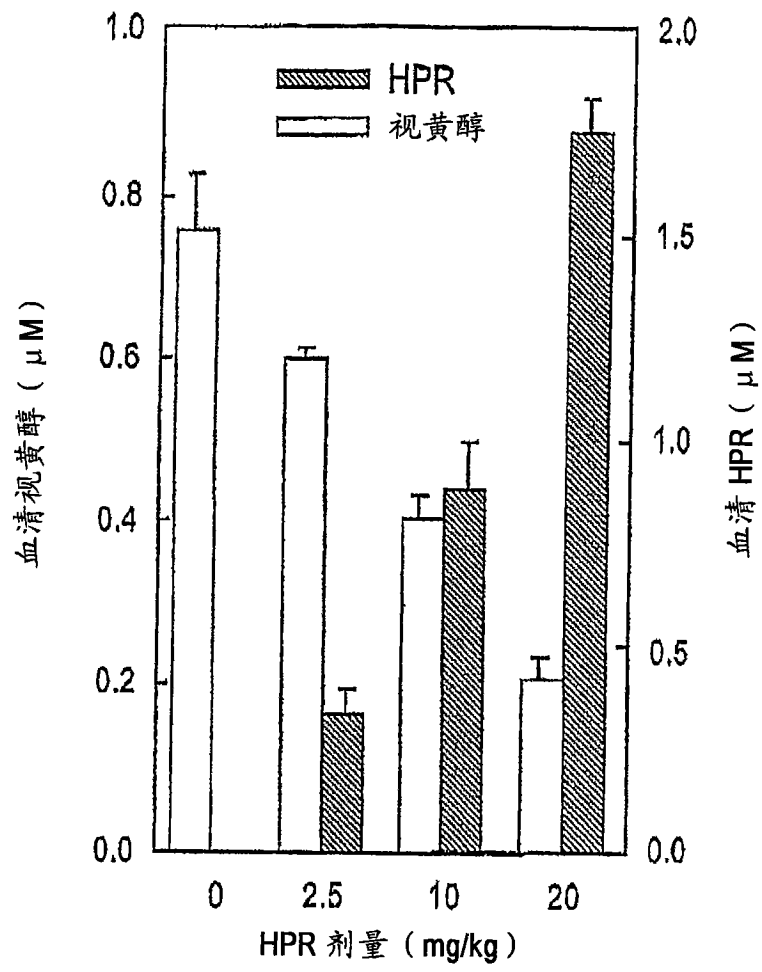


图 7

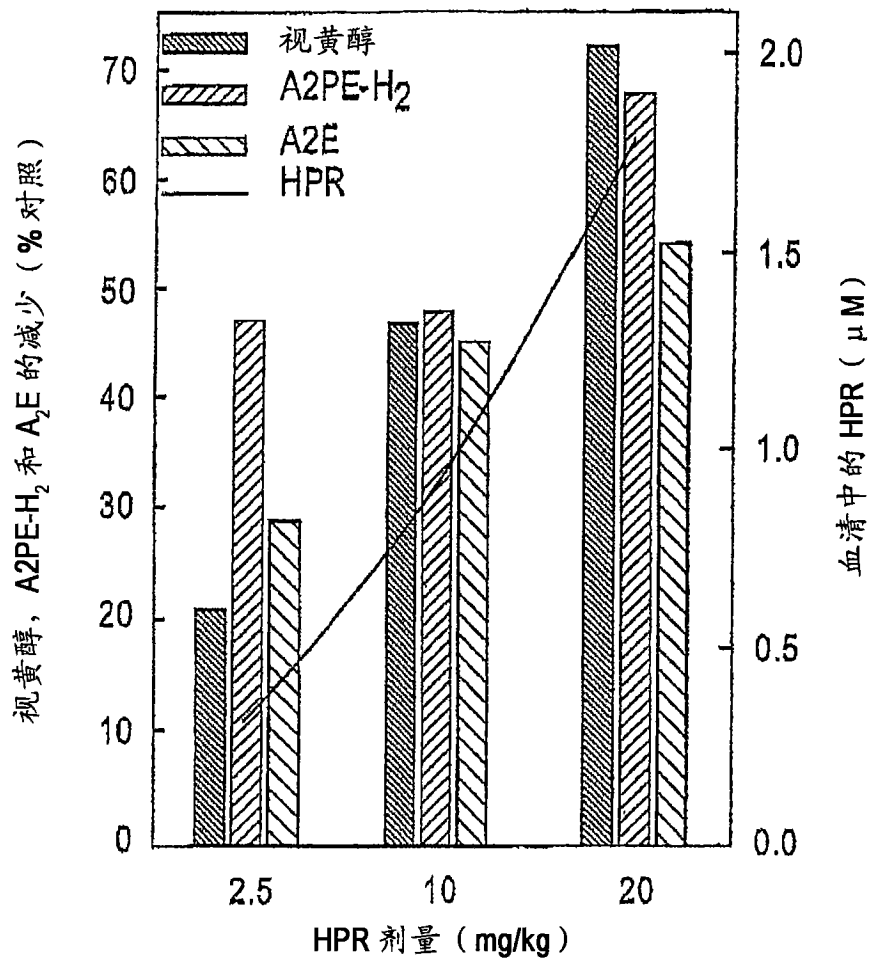


图 8

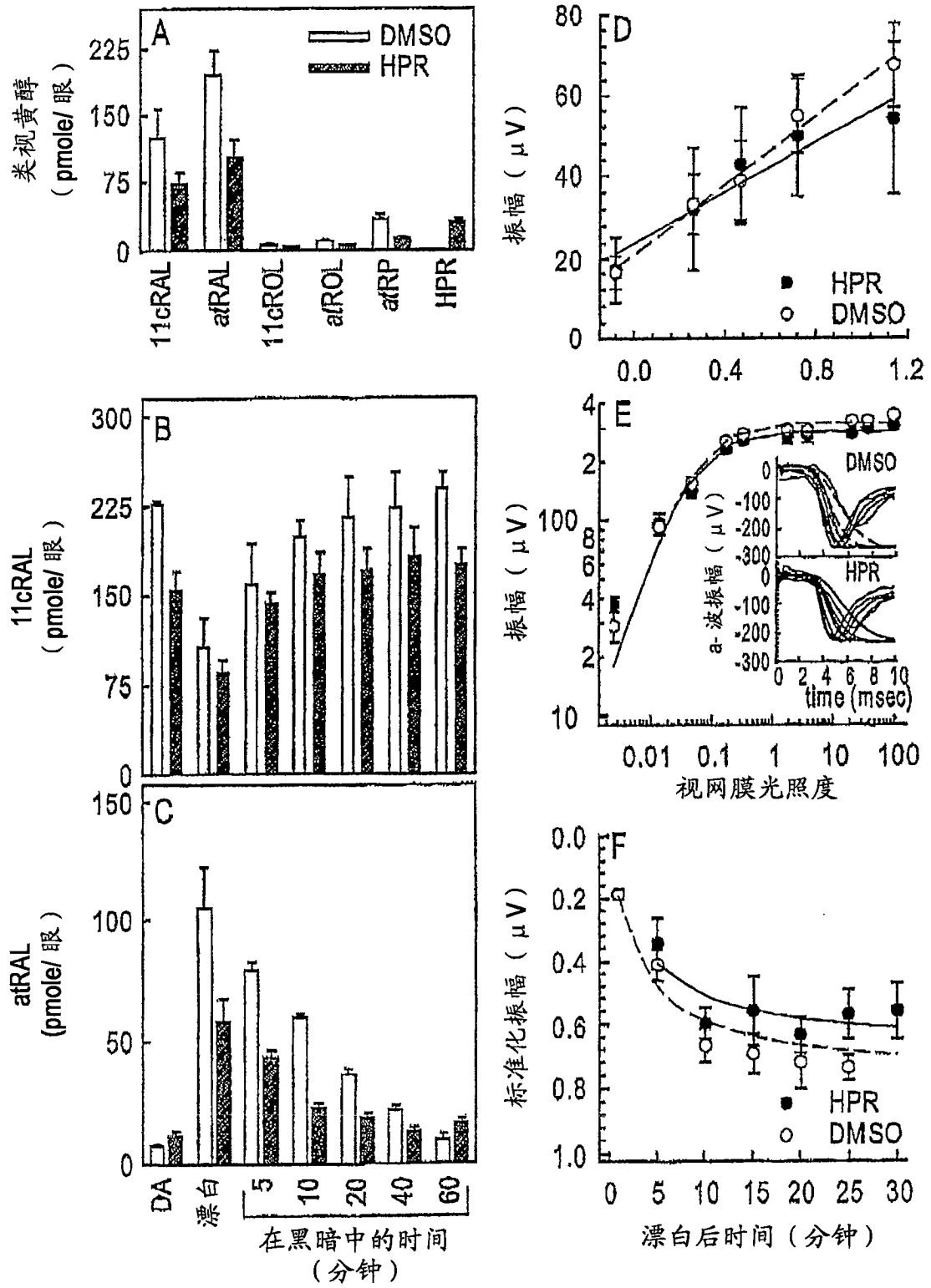


图 9

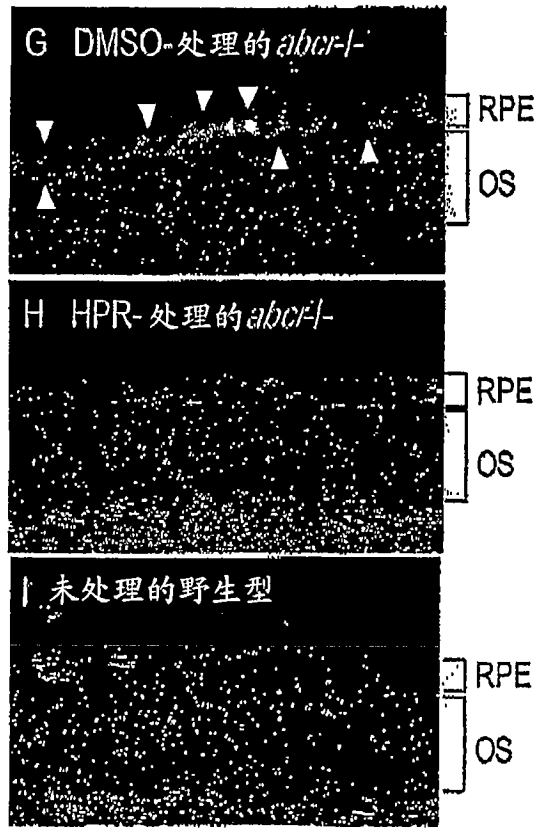
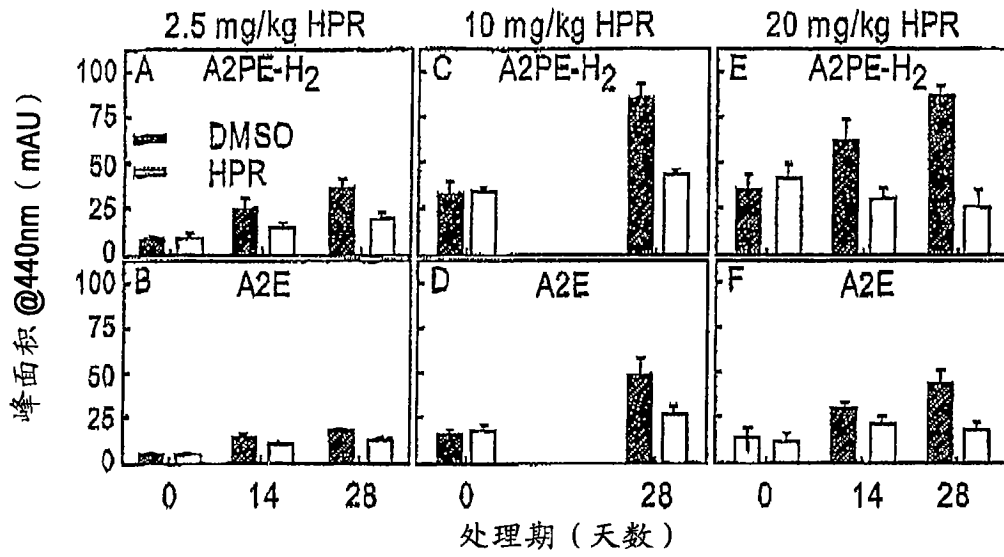


图 10

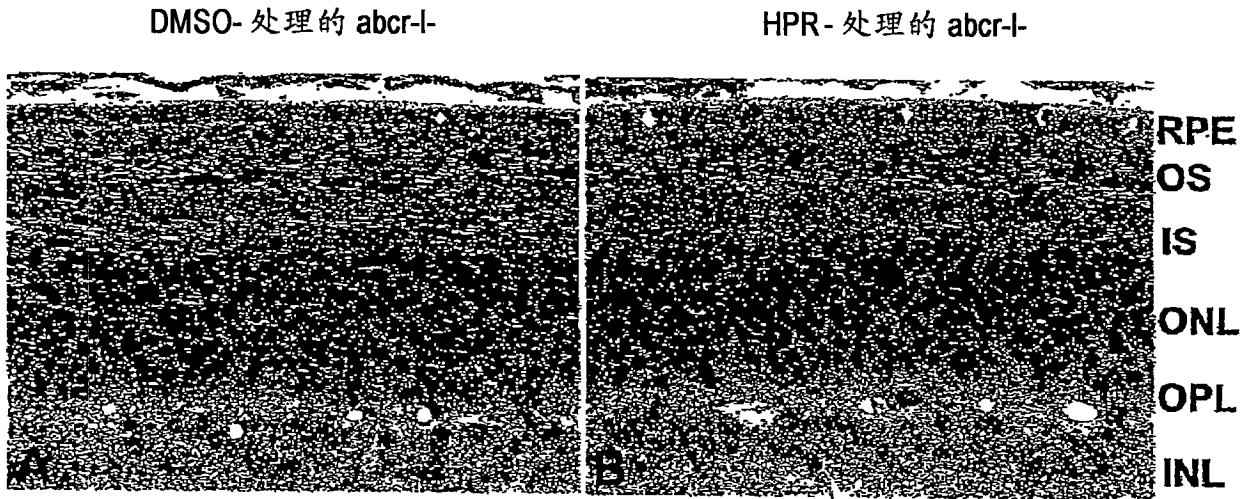


图 11

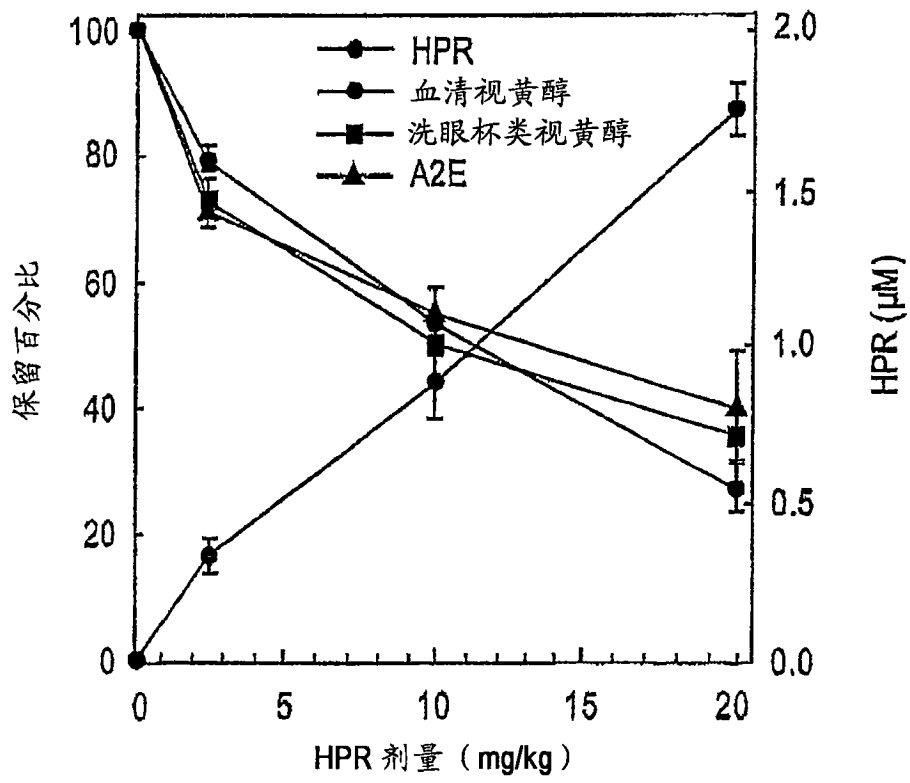
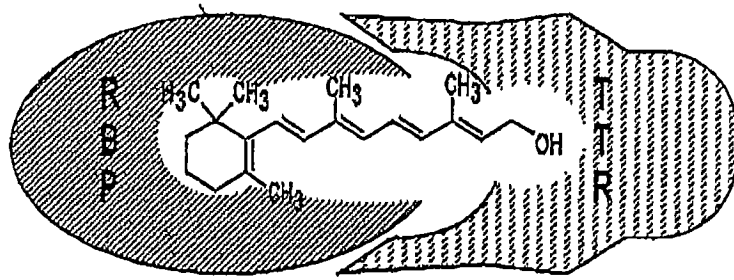
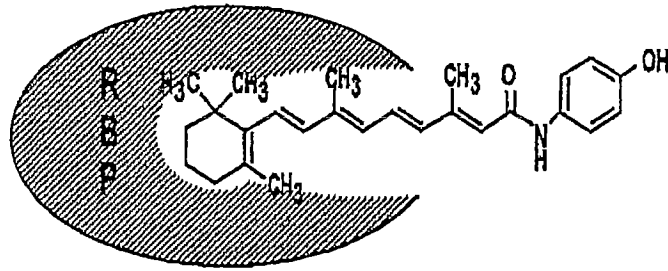


图 12



视黄醇结合蛋白 + 视黄醇 + 运甲状腺素蛋白



视黄醇结合蛋白 + N-(4-羟基苯基)视黄酰胺

图 13

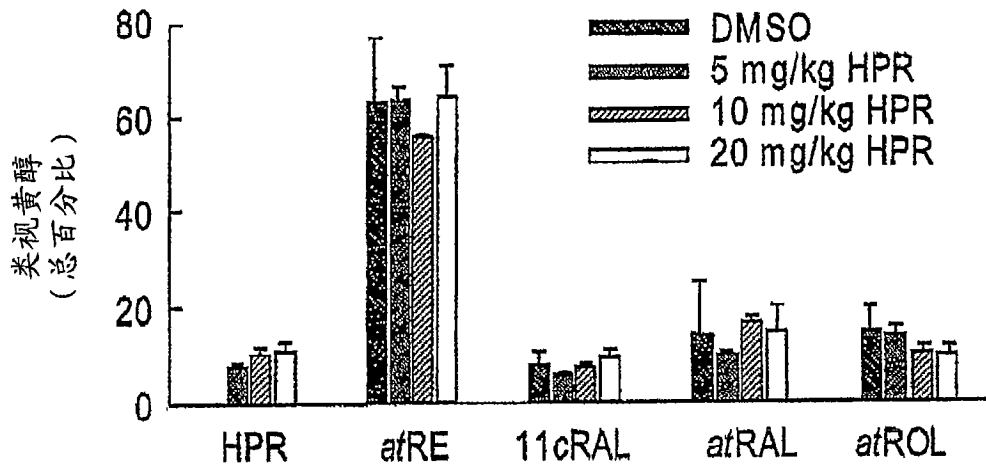


图 14

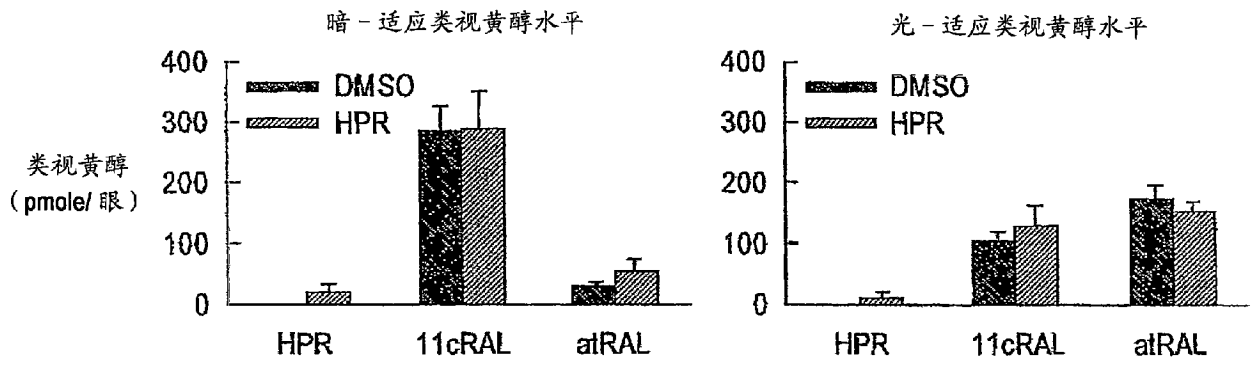


图 15

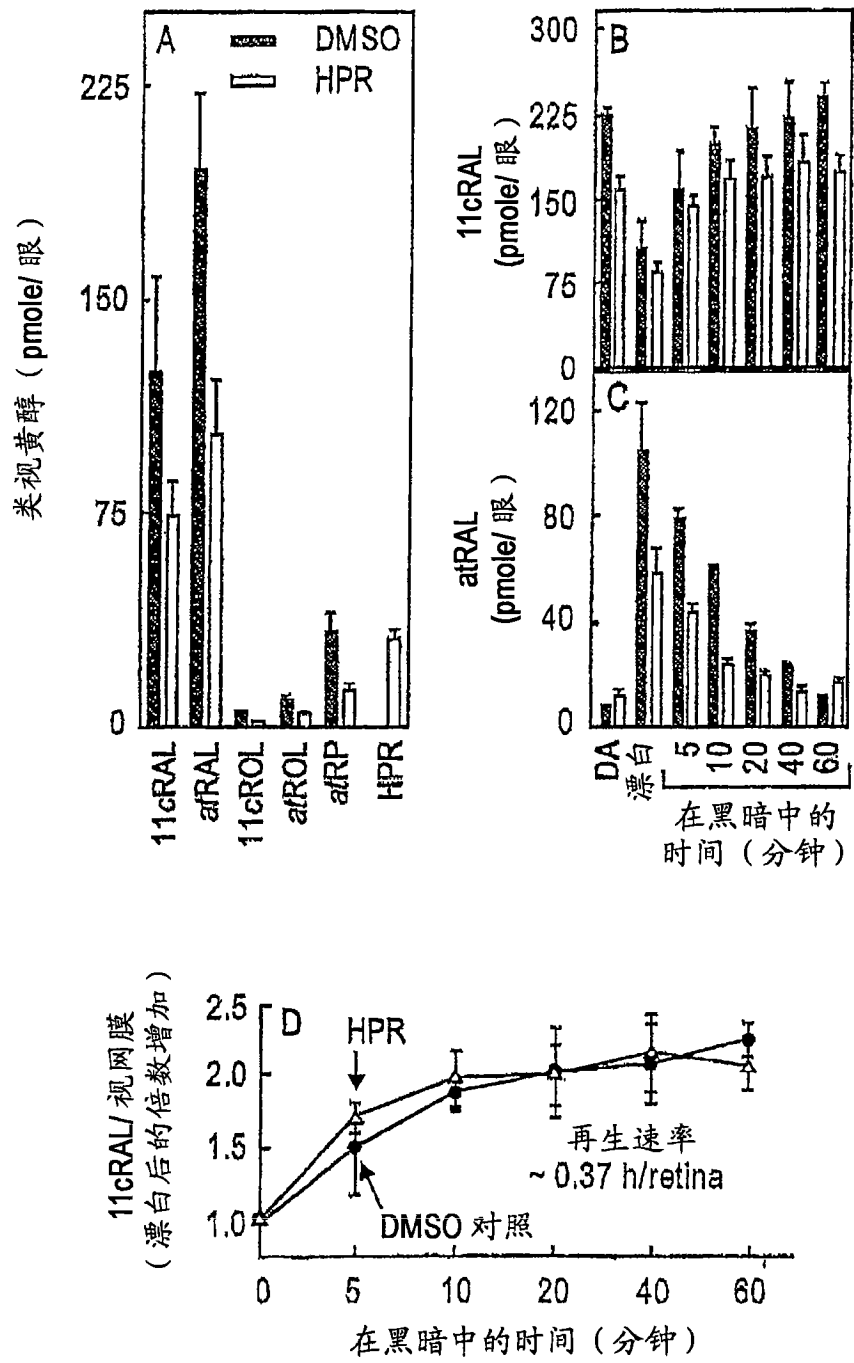


图 16

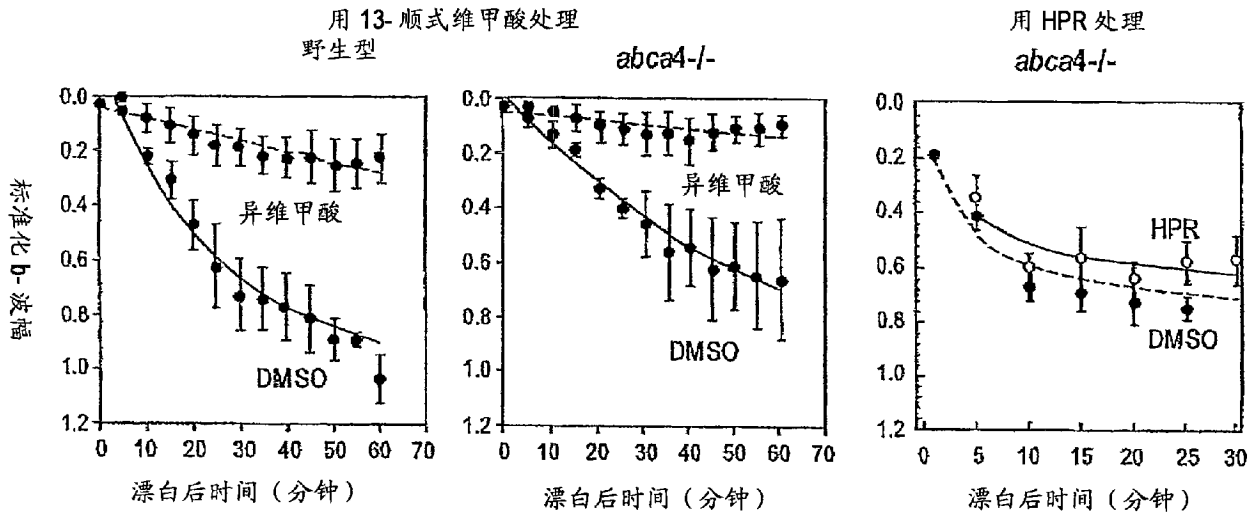


图 17

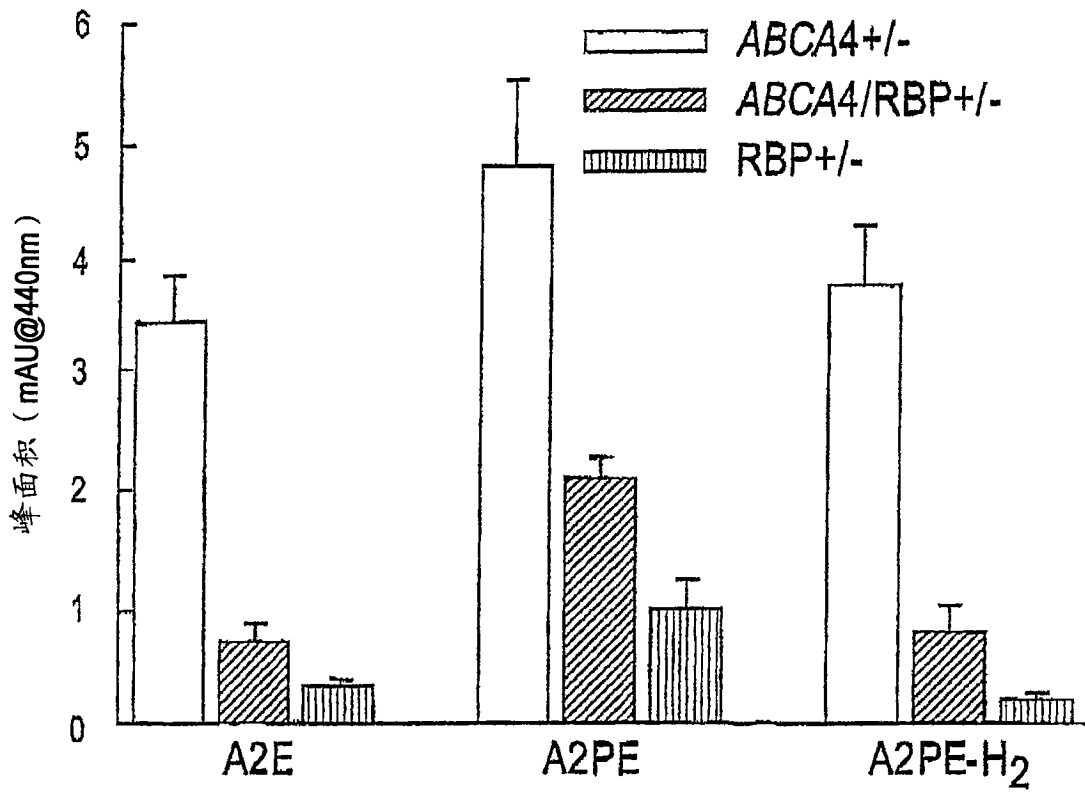


图 18