(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103327981 A
(43)申请公布日 2013.09.25

(21)申请号 201180065255.0
(22)申请日 2011.11.18
(30)优先权数据
61/419,660 2010.12.03 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.07.17
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2011/061370 2011.11.18
(87)PCT申请的公布数据
WO2012/074788 EN 2012.06.07
(71)申请人 阿勒根公司
地址 美国加利福尼亚
(72)发明人 J·X·库萨里 S·X·周 M·田
E·U·帕迪洛 S·S·饶
D·W·吉尔 L·A·惠勒
(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
代理人 张广育 姜建成
(51)Int.Cl.
A61K 31/5513(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)

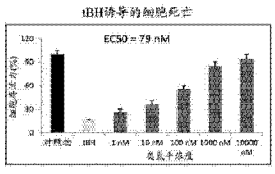
权利要求书1页 说明书12页 附图10页

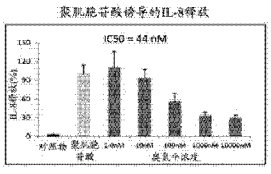
(54)发明名称

用于治疗视网膜疾病的方法

(57)摘要

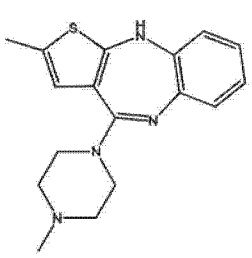
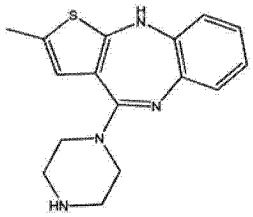
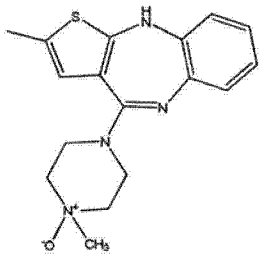
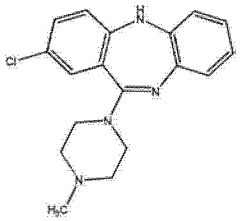
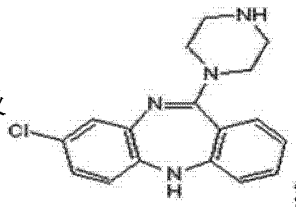
本文公开了一种治疗视网膜病症的方法，所述方法包括向需要这种治疗的患者施用选自由奥氮平、它的某些代谢物、氯氮平以及n-去甲基氯氮平组成的组的化合物。





CN 103327981 A

1. 一种用于治疗由氧化应激引起或加重的视网膜病症的方法，所述方法包括向有需要的患者施用选自由以下各项组成的组的化合物：


、

、

、

以及

或其药学上可接受的盐。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述视网膜病症选自由以下各项组成的组：湿性和干性年龄相关性黄斑变性、色素性视网膜炎、斯塔加特氏疾病视锥细胞营养不良和视网膜色素上皮的图形状营养不良、黄斑水肿、视网膜脱离、视网膜外伤、视网膜肿瘤和与所述肿瘤相关联的视网膜疾病、先天性视网膜色素上皮肥厚、急性后极部多发性鳞状色素上皮病变、以及急性视网膜色素上皮炎。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述视网膜病症选自由以下各项组成的组：湿性和干性年龄相关性黄斑变性、色素性视网膜炎、斯塔加特氏疾病视锥细胞营养不良和视网膜色素上皮的图形状营养不良、先天性视网膜色素上皮肥厚、急性后极部多发性鳞状色素上皮病变、以及急性视网膜色素上皮炎。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述化合物是口服施用。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述化合物是通过将它注射到眼睛中施用。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述化合物是局部施用至眼睛。

用于治疗视网膜疾病的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2010年12月3日提交的美国临时申请第61/419,660号的权益，所述申请是以引用的方式全部并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 用“视网膜疾病”，申请人意指由氧化应激引起或加重的视网膜的或围绕它的组织的任何病状。这些病状包括黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、脉络膜新生血管膜、黄斑水肿（还称为囊样黄斑水肿和黄斑肿胀）、视网膜前膜（黄斑皱褶）、黄斑裂孔、色素性视网膜炎、黄斑营养不良（如斯塔加特氏幼年期黄斑变性、贝斯特氏（Best’s）卵黄状营养不良、视锥细胞营养不良、以及视网膜色素上皮的图形状营养不良）、视网膜脱离、视网膜外伤、视网膜肿瘤和与其相关联的视网膜疾病、先天性视网膜色素上皮肥厚、急性后极部多发性鳞状色素上皮病变、以及急性视网膜色素上皮炎。

[0005] 黄斑变性，还称为年龄相关性黄斑变性，是美国50岁或年龄更大的那些人的视力丧失的最常见原因，并且它的患病率随着年龄增加。AMD被分类为湿性（新生血管性）或干性（非新生血管性）。所述疾病的干性形式是最常见的。它在中央视网膜已经扭曲、着色、或最常见的，变薄（与视网膜色素上皮的萎缩和黄斑感光细胞的丧失相关联的过程）时发生。结果是中央地图样萎缩。所述疾病的湿性形式造成了最严重的视力丧失。湿性形式通常与老化相关联，但是可以引起湿性黄斑变性的其它疾病包括严重近视和一些眼内感染如组织胞浆菌病，所述疾病可能在患有AIDS的个体中恶化。湿性形式的特征为异常血管生长穿过视网膜色素上皮，从而导致出血、渗出作用、瘢痕形成、或视网膜脱离。

[0006] 与糖尿病相关联的视网膜病变是1型糖尿病中失明的主要原因，并且在2型糖尿病中也常见。视网膜病变的程度取决于糖尿病的持续时间，并且通常在糖尿病发病之后十年或更多年开始发生。糖尿病性视网膜病变可以分类为(1)非增生性或背景性视网膜病变，其特征为增加的毛细管渗透性、水肿、出血、微动脉瘤、以及渗出物；或2)增生性视网膜病变，其特征为新生血管形成从视网膜延伸至玻璃体、瘢痕形成、纤维组织形成、以及视网膜脱离的潜在可能。糖尿病性视网膜病变被认为是至少部分地由因高血糖所致的糖基化蛋白的发展而引起。糖基化蛋白产生自由基，从而导致组织氧化损伤和细胞活性氧物种(ROS)清除剂（如谷胱甘肽）的耗尽。

[0007] 在脉络膜新生血管膜中，源于脉络膜的异常血管生长穿过视网膜层。脆弱的新血管容易破裂，从而引起血液和液体郁滞在所述视网膜层内。

[0008] 在可以由于疾病、损伤或外科手术而发生的黄斑水肿中，液体收集在黄斑的层内，从而引起模糊的、扭曲的中央视力。

[0009] 视网膜前膜是形成在黄斑上，从而通过引起模糊和扭曲来影响中央视力的玻璃纸样膜。随着它进行，黄斑上膜的牵引可以引起肿胀。所述疾病最常见于75岁以上的人。

[0010] 色素性视网膜炎是以夜盲和周边视力的进行性丧失、最终导致全盲为特征的视网膜变性；检眼镜检查的变化包括暗的马赛克样视网膜色素沉着、视网膜血管的减弱、视神经盘的蜡样苍白、以及晚期形式的黄斑变性。在一些情况下可能缺乏色素沉着色素性视网膜

炎可能与玻璃体的变性浑浊、以及白内障相关联。

[0011] 黄斑营养不良是适用于共同为大量人群中严重视力丧失的原因的异质群体的疾病的术语。黄斑营养不良的共同特征是由视网膜黄斑中感光细胞的变性造成的中央视力的进行性丧失。在黄斑营养不良的许多形式中，所述疾病的终末期导致法定盲。已知多于 20 种类型的黄斑营养不良。这些中的一些是（例如）年龄相关性黄斑营养不良、斯塔加特样显性黄斑营养不良、隐性斯塔加特氏疾病、非典型性卵黄样黄斑营养不良 (VMD1)、乌谢尔综合征 (Usher Syndrome) 1B 型、常染色体显性新生血管性炎性玻璃体视网膜病变、家族性渗出性玻璃体视网膜病变、以及贝斯特氏黄斑营养不良（还称为遗传性黄斑营养不良或贝斯特氏卵黄样黄斑营养不良 (VMD2)。

[0012] 斯塔加特样显性黄斑营养不良（还称为常染色体显性斑状萎缩）是一种幼年发病型黄斑变性。患有这种疾病的患者作为幼儿通常具有正常视力，但是在儿童期过程中，视觉丧失开始，所述视觉丧失快速进行至法定盲。在临床上，它以具有尖锐边界的萎缩性黄斑病变的存在为特征并且经常与黄色底斑点相关联。

[0013] 贝斯特氏黄斑营养不良是未知生物化学起因的遗传性常染色体显性黄斑营养不良。所述疾病具有的发病年龄可以是在从儿童期至 40 岁以后的范围内。在早期，临床症状包括黄色材料脂褐质在黄斑下面的视网膜色素上皮 (RPE) 中的异常积聚。这导致 RPE 的特征性“蛋黄”外观和视觉敏锐度的逐渐丧失。随着年龄增长，RPE 变得越来越紊乱，因为脂褐质积聚分散并且瘢痕形成和新生血管形成发生。这些变化伴随进一步视力丧失。

[0014] 斯塔加特样显性黄斑营养不良和贝斯特氏黄斑营养不良中所见的病理特征在许多方面与年龄相关性黄斑营养不良 (AMD) 中所见的特征类似，年龄相关性黄斑营养不良是在发达国家中较年长患者失明的主要原因。

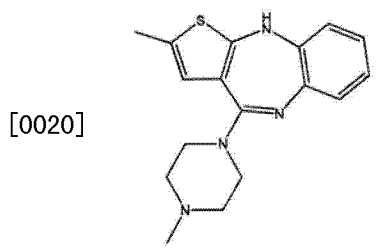
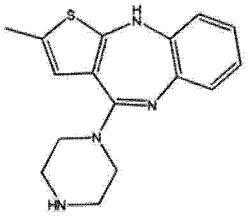
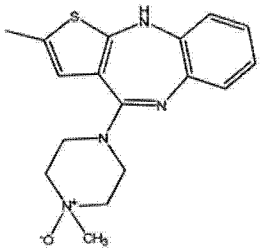
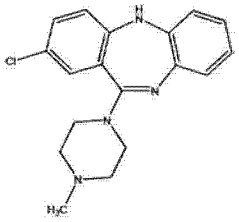
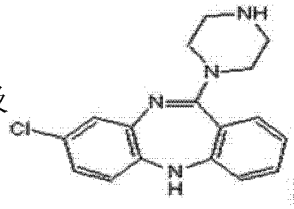
[0015] 视网膜脱离是在视网膜的感觉层开始从它们的视网膜色素上皮的下层支持组织和脉络膜分离时发生。一般来说，视网膜脱离是由视网膜撕裂或玻璃体牵引的存在引起，两者中的任一个可以自发地发生或可以由于外伤而发生。视网膜脱离还可以由病理如早产儿中的早产儿视网膜病变或糖尿病个体中的糖尿病性视网膜病变造成。视网膜脱离的症状是无痛和一只眼睛的突然分节 (sudden segmental) 或全部视力丧失。当存在撕裂时，或当存在引起视网膜从它的下层结构分离的牵引时，液体玻璃体穿过开口并且进入视网膜下间隙，从而诱导视网膜下间隙中的进一步渗出作用。视网膜逐渐从下层视网膜色素上皮分离并且脱离。这剥夺了外视网膜的从脉络膜的正常氧和营养素供给。随着时间推移，视网膜脱离还导致视力丧失，这是由于定位在视网膜的外部部分中的感光细胞的丧失。

[0016] 用“治疗”，发明人意指在医学上处理。所述术语包括施用本发明的化合物以便缓解视网膜疾病的症状，如伴随黄斑变性的视觉敏锐度的下降；以及解决与所述疾病相关联的生理学变化，如伴随所述病状的异常血管生长。

[0017] 发明概述

[0018] 本文公开了通过向需要这种治疗的患者施用氯氮平、n- 去甲基氯氮平、奥氮平、奥氮平的某些代谢物以及如本文以下列出的各种其它化合物来治疗影响视网膜的疾病的方法。

[0019] 本发明公开了一种治疗由氧化应激引起或加重的视网膜病症的方法，所述方法包括向有需要的患者施用选自由以下各项组成的组的化合物：

[0020]  、 、 、 以及 或其药学上可接受的盐。;

[0021] 在另一个实施方案中，寻求治疗的视网膜病症选自由以下各项组成的组：湿性和干性年龄相关性黄斑变性、色素性视网膜炎、斯塔加特氏疾病(Stargardt's disease)视锥细胞营养不良和视网膜色素上皮的图形状营养不良、黄斑水肿、视网膜脱离、视网膜外伤、视网膜肿瘤和与所述肿瘤相关联的视网膜疾病、先天性视网膜色素上皮肥厚、急性后极部多发性鳞状色素上皮病变、以及急性视网膜色素上皮炎。

[0022] 在另一个实施方案中，所述视网膜病症选自由以下各项组成的组：湿性和干性年龄相关性黄斑变性色素性视网膜炎、斯塔加特氏疾病视锥细胞营养不良和视网膜色素上皮的图形状营养不良、先天性视网膜色素上皮肥厚、急性后极部多发性鳞状色素上皮病变、以及急性视网膜色素上皮炎。

[0023] 在另一个实施方案中，所施用的化合物是口服施用。

[0024] 在另一个实施方案中，所施用的化合物是通过将它注射到眼睛中来施用。

[0025] 在另一个实施方案中，所施用的化合物是局部施用到眼睛。

[0026] 附图简述

[0027] 图1示出奥氮平以剂量反应模式显著地保护视网膜色素上皮(RPE)细胞免于氧化应激(tBH)诱导的细胞凋亡(A)，并且抑制聚肌胞苷酸(Poly I:C)诱导的从RPE细胞分泌IL-8(B)。误差线，SEM

[0028] 图2示出奥氮平、它的代谢物、以及氯氮平保护RPE免于tBH诱导的细胞死亡。误差线，SEM

[0029] 图3示出奥氮平显著地保护蓝光暴露的大鼠的上视网膜厚度。在蓝光暴露之前2天开始药物处理。使动物每天一次接受奥氮平IP注射，持续3天，并且最后一次给药是在蓝光暴露之前1小时。在将大鼠暴露于具有约6至7k的勒克斯(lux)强度的蓝光4小时之前，将它们暗适应24小时。就在所述蓝光暴露之后，在所述大鼠返回到正常室内光照(12小时光照/12小时黑暗)之前将它们再次暗适应另外3天。光学相干断层扫描(OCT)用于评价在蓝光暴露之后7至10天时由蓝光引起的视网膜厚度变化。误差线，SEM。OS＝左眼，OD＝右眼。

[0030] 图4示出奥氮平显著地保护蓝光暴露的大鼠的视网膜a波和b波。药物处理和暗适应与图3中描述的类似。在蓝光暴露之后7至10天时记录视网膜电图。误差线，SEM。BL＝蓝光。

[0031] 图5示出奥氮平显著地保护蓝光暴露的大鼠的外核层。药物处理和暗适应与图3

中描述的类似。在蓝光暴露之后 2 至 3 周时进行 H&E 染色。B-L ＝蓝光。ONH ＝视神经头。

[0032] 图 6 示出奥氮平显著地保护由蓝光暴露引起的视网膜视紫质丧失。药物处理和暗适应与图 3 中描述的类似。在蓝光暴露之后 2 至 3 周时进行免疫 - 组织化学研究。B-L ＝蓝光。ONH ＝视神经头。

[0033] 图 7 示出奥氮平显著地保护 RPE65 丧失并且部分地抑制 GFAP 上调。药物处理和暗适应与图 3 中描述的类似。在蓝光暴露之后 2 至 3 周时进行免疫 - 组织化学研究。B-L ＝蓝光。ONH ＝视神经头。

[0034] 图 8 示出奥氮平的玻璃体内递送显著地预防蓝光暴露的大鼠的 ERG 变更。对于玻璃体内注射 (IVT)，动物在蓝光暴露之前 1 小时接受奥氮平。水在 IVT 注射过程中用作平行对照媒介物。在将大鼠暴露于具有约 6 至 7k 的勒克斯强度的蓝光 4 小时之前将它们暗适应 24 小时。就在所述蓝光暴露之后，在所述大鼠返回到正常室内光照 (12 小时光照 /12 小时黑暗) 之前将它们再次暗适应另外 3 天。CTRL ＝未试验过的对照，Veh ＝水，0.04、0.2、或 1ug 的奥氮平 / 眼睛。左图＝来自每只眼睛的数据的散点图，并且右图＝平均结果的直方图。在蓝光暴露之后 7 至 10 天时记录视网膜电图。误差线，SEM。

[0035] 图 9 示出奥氮平的局部眼睛给药显著地保护蓝光暴露的 SD 大鼠的视网膜 a 波和 b 波信号。对于局部施用，在蓝光暴露之前 24 小时 (BID) 和一小时 (QI)，给予药物。水在局部施用过程中用作平行对照媒介物。在将大鼠暴露于具有约 6 至 7k 的勒克斯强度的蓝光 4 小时之前将它们暗适应 24 小时。就在所述蓝光暴露之后，在所述大鼠返回到正常室内光照 (12 小时光照 /12 小时黑暗) 之前将它们再次暗适应另外 3 天。在蓝光暴露之后 7 至 10 天时记录视网膜电图。误差线，SEM。

[0036] 图 10 示出奥氮平显著地减弱高氧症诱导的视网膜新生血管形成。将几窝新生小鼠和它们的母鼠在 P7 至 P12 时放置在 75％氧室中。所述腔室含有足够持续 5 天的食物和水并且仅打开以允许向所述动物施用药物。在 P12 时，使小鼠返回到具有正常含氧量的室内空气。在水中的奥氮平或 VEH(水) 每日一次通过管饲法施用，从 P10 开始并且持续直到 P16。在所述动物暴露于室内空气 5 天之后，在 P17 时评价视网膜新生血管形成。误差线，SEM。

[0037] 图 11 示出奥氮平显著地抑制大鼠中激光诱导的脉络膜新生血管形成。误差线，SEM。

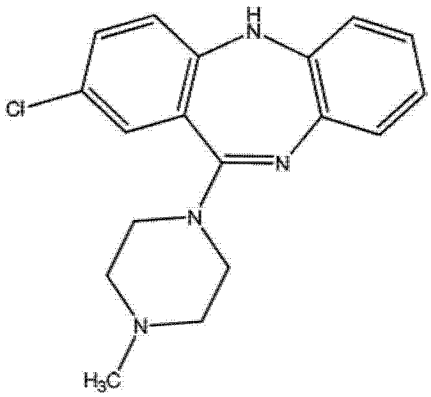
[0038] 发明详述

[0039] 本发明的化合物

[0040] 本发明的方法通过向需要这种治疗的患者施用氯氮平、奥氮平、或奥氮平的某些代谢物来治疗视网膜疾病。所述化合物是熟知的。

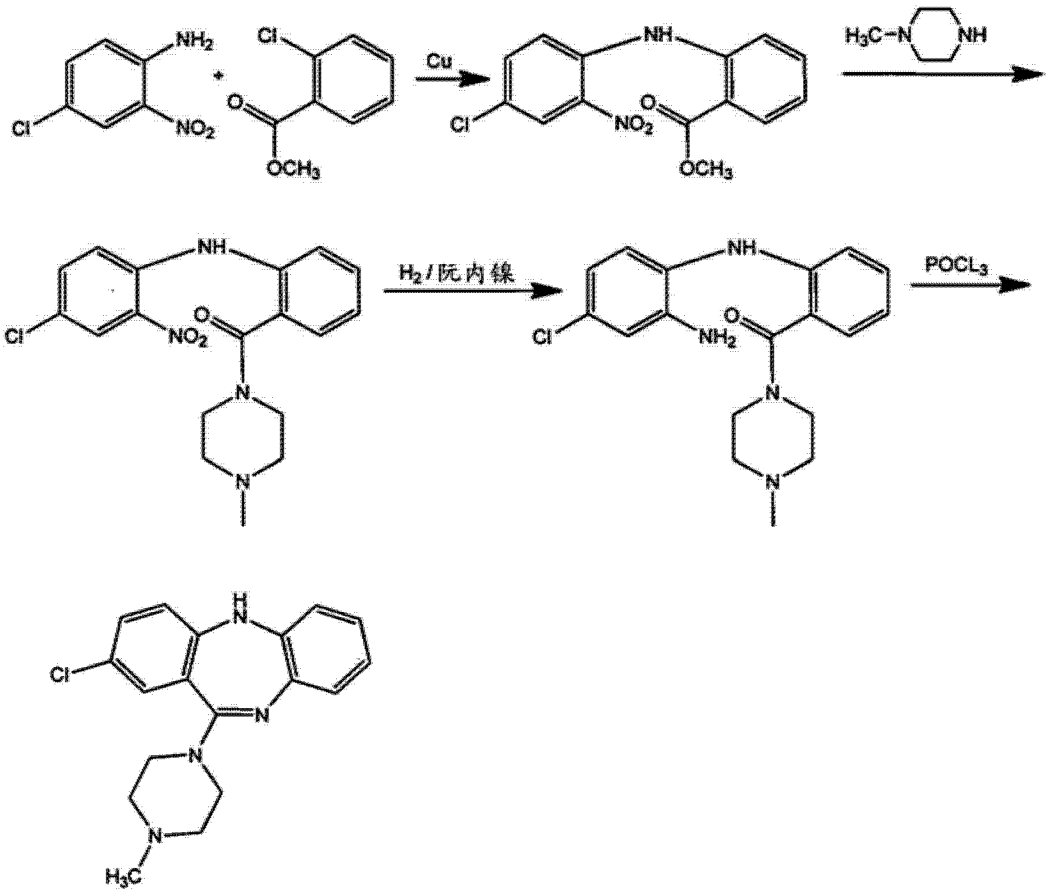
[0041] 氯氮平自 20 世纪 70 年代起就已经被处方作为抗精神病药物。它具有以下结构：

[0042]



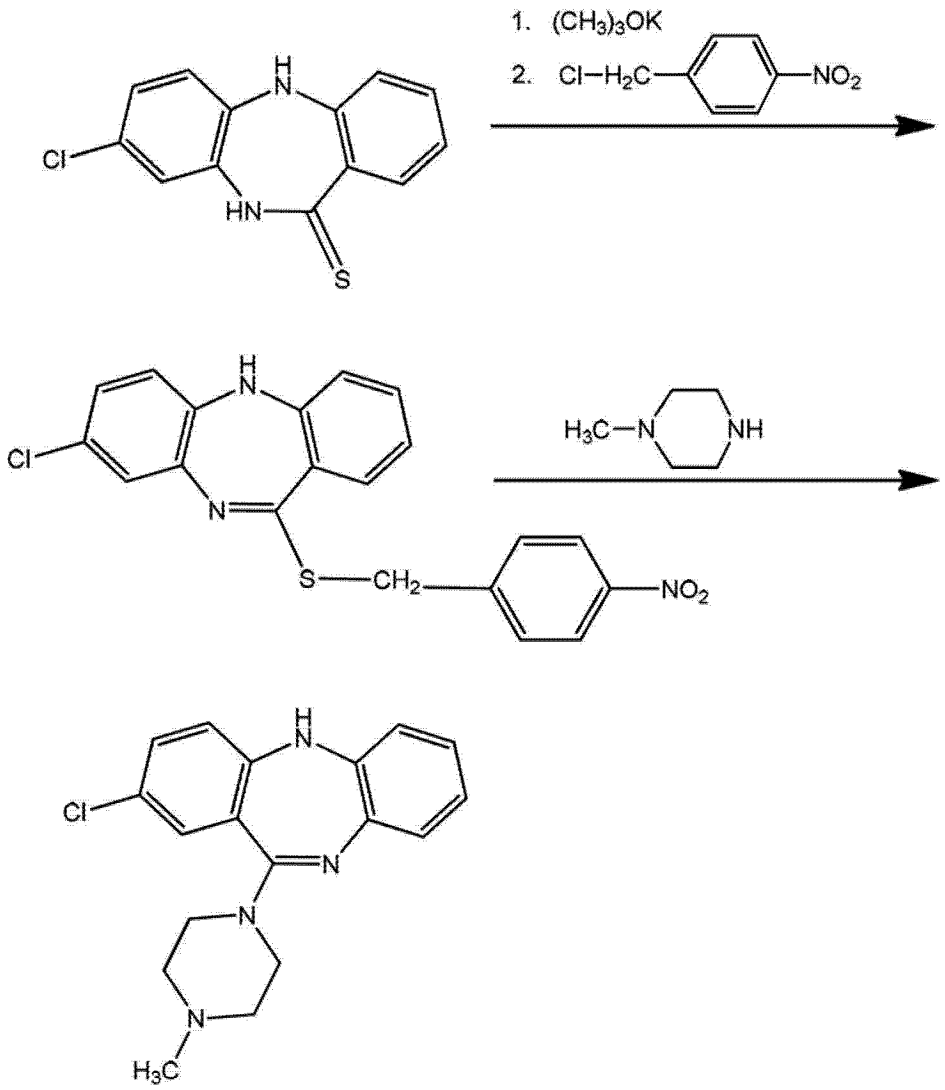
[0043] 它的化学名是 2- 氯代 -11-(4- 甲基哌嗪 -1- 基)-5H- 二苯并 [b,e][1,4] 二氮杂卓。它可以以不同方式合成。一种方式是如下 :

[0044]



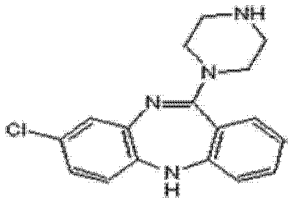
[0045] 另一种方式是如下 :

[0046]



[0047] N- 去甲基氯氮平，其具有结构：

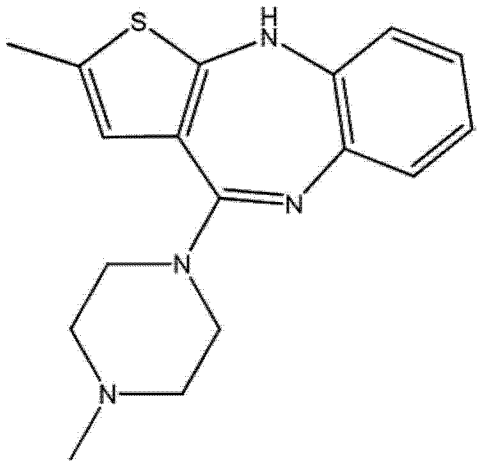
[0048]



[0049] 可以从 Tocris 获得。

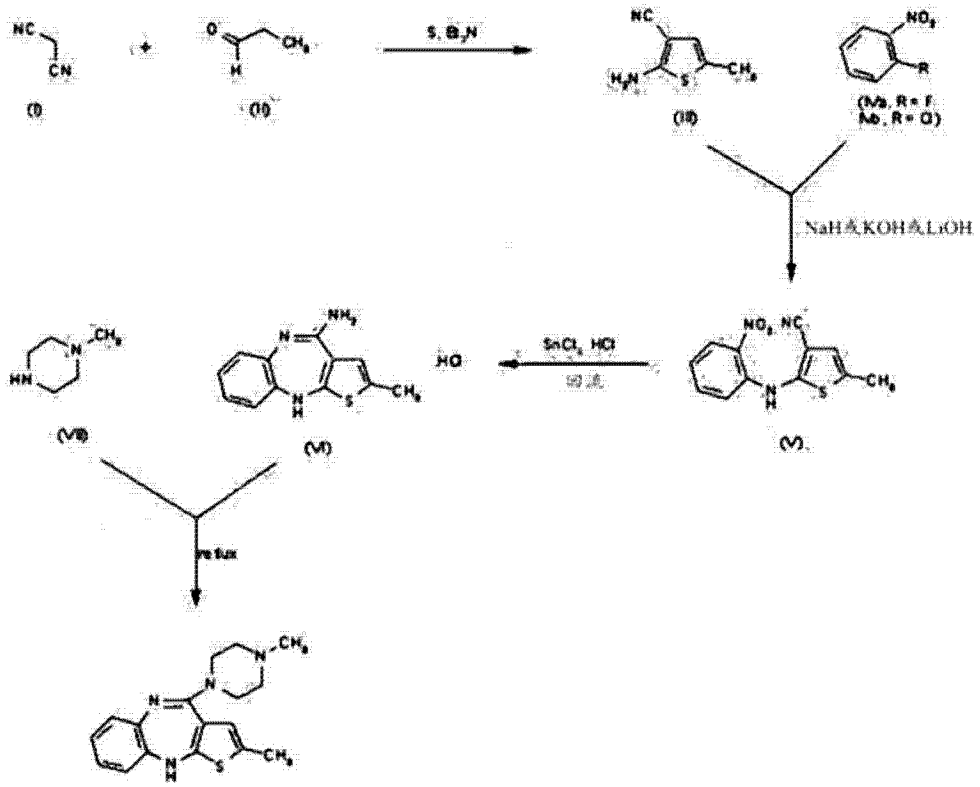
[0050] 奥氮平是另一种熟知的抗精神病药物。它具有以下结构：

[0051]



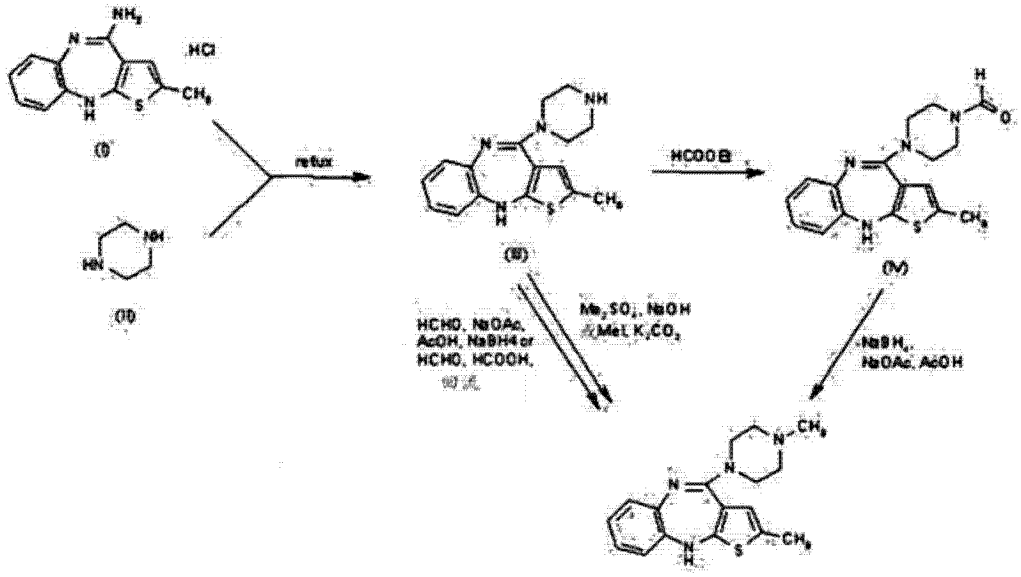
[0052] 它的化学名是 2- 甲基 -4-(4- 甲基哌嗪 -1- 基)-10H- 苯并 [b] 噻吩并 [2,3-e] [1,4] 二氮杂卓。Elli Lilly and Company 以商品名 Zyprexa 出售所述药物。制备奥氮平的一种方式是如下。它在美国专利第 5,631,250 号中公开,所述专利的内容是以引用的方式并入本文 :

[0053]



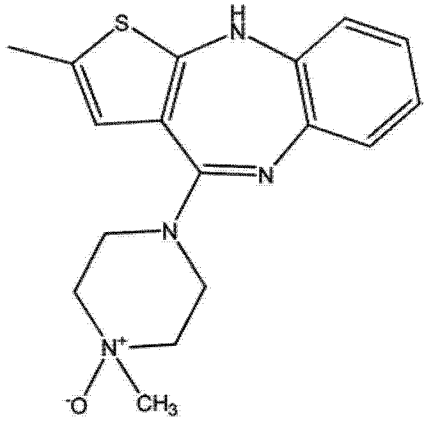
[0054] 另一种方式是如下。它在美国专利申请公布第 2006/035887 号中公开,所述专利的内容是以引用的方式并入本文 :

[0055]



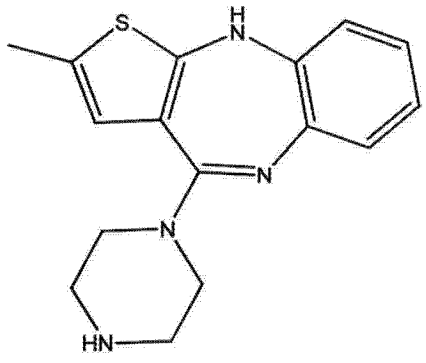
[0056] 奥氮平代谢为以下化合物，它们两者也可用于本发明的方法中：

[0057]



代谢物 A

[0058]



代谢物 B

[0059] 奥氮平 -N- 氧化物（代谢物 A）和 N- 去甲基奥氮平（代谢物 B）可以从 Toronto Research Chemical 获得。

[0060] 在一个实施方案中，以药学上可接受的盐的形式施用本发明的化合物。药学上可

接受的盐是适合用于施用至动物或人的母体化合物的任何盐。药学上可接受的盐还指可以由于施用酸、另一种盐、或转化成酸或盐的前药而体内形成的任何盐。盐包括所述化合物的一种或多种离子形式，如与一种或多种相应抗衡离子相关联的共轭酸或碱。盐可以由一种或多种去质子化酸性基团（例如羧酸）、一种或多种质子化碱性基团（例如胺）、或两者（例如两性离子）形成或将其结合在内。

[0061] 酸性官能团的药学上可接受的盐可以衍生自有机或无机碱。所述盐可以包含单价或多价离子。特别感兴趣的是无机离子、锂、钠、钾、钙、以及镁。可以用胺制备有机盐，特别是铵盐如单、二、以及三烷基胺或乙醇胺。关于适合的盐的评论，参见 Stahl 和 Wermuth 的 Handbook of Pharmaceutical Salts :Properties,Selection,and Use(Wiley-VCH,2002)。

[0062] 制剂和施用

[0063] 本发明的化合物可以经由口服、经皮（例如通过使用贴片）、鼻内、舌下、直肠、或肠胃外途径施用。在一个优选的实施方案中，所述化合物是通过将它注射到眼睛中来递送。

[0064] 在一个实施方案中，所述化合物是以每天约 0.25mg 至高达约 1500mg 范围的剂量施用；在另一个实施方案中，所述化合物是以每天 0.25 至约 300mg 的剂量以单一或分次剂量施用；在另一个实施方案中，所述化合物是以每天每公斤体重 0.01mg 至约 10mg 的剂量施用，但是取决于所治疗的受试者的体重和病状以及所选择的具体施用途径、连同个体对治疗的反应、所选择的制剂、以及患者被治疗的时间的长度，必然将发生变化。在一些情况下，小于 0.25mg/ 天的剂量可能是足够的，而在其它情况下，可以采用仍然更大的剂量而不会引起任何有害副作用，条件是将所述更大剂量首先分成几个小剂量用于全天施用。

[0065] 活性化合物可以单独或与药学上可接受的载体或稀释剂相组合、通过以上指示的几种途径中的任一种来施用。更具体地说，所述活性化合物可以以广泛多种不同的剂型施用，例如，它们可以与各种药学上可接受的惰性载体以片剂、胶囊剂、溶液剂、混悬剂等等的形式进行组合。所述载体包括固体稀释剂或填充剂、无菌水性介质以及各种无毒有机溶剂。此外，口服药物组合物可以适当地加甜味剂和 / 或加调味剂。一般来说，活性化合物在所述剂型中以约 5.0 重量％至约 70 重量％范围的浓度水平存在。

[0066] 在本发明的一个实施方案中，氯氮平可以局部递送至眼睛或通过注射递送至眼睛中。用于此目的的适合的制剂包括液体剂、混悬剂、乳剂等等。眼部药物产品的局部制剂是本领域熟知的并且被描述于例如美国专利申请公布第 20050059583 号、第 20050277584 号、第 20070015690 号、以及第 20070015691 号以及美国专利第 5,474,979 号和第 6,582,718 号中，所有专利的公开内容均是以引用的方式并入本文。

[0067] 在一个实施方案中，氯氮平制剂作为眼药水施用；在典型施用中，将 25 至 50μl 的所述制剂施用至眼睛。所述制剂可以每日施用一次、两次、三次、四次、或更多次。

实施例

[0068] 本发明通过以下实施例进行说明。

[0069] 将来自 ATCC 的 ARPE-19 细胞生长在增补有 10％胎牛血清 (FBS) 的 DEME/F12 培养基中并且以每孔 10,000 个细胞的密度将它们分到 96 孔板中。在添加化合物 / 药物之前将细胞在 0.1％ FBS 培养基中培育过夜。制备不同浓度的所感兴趣的化合物的储备液并且经一小时将它们添加至在 0.1％ FBS 培养基中的 ARPE-19 细胞中。

[0070] 细胞存活力测定：在一小时的化合物/药物预处理之后，将细胞用0.3mM叔丁基过氧化氢(tBH)培育3小时，接着是三次洗涤和用新鲜药物和培养基(0.1％ FBS培养基)置换过夜。通过细胞增殖测定试剂盒(Millipore，2210)来测定细胞存活力。误差线，SEM。n＝3。结果在图1、2以及12中示出。

[0071] IL-8测定：在一小时的药物预处理之后，将细胞用1ug/ml聚肌胞苷酸培育24小时。细胞培养上清液用于使用IL-8 ELISA试剂盒(R&D Systems，D8000C)测量IL-8的产生。误差线，SEM。n＝3。结果在图1中示出。

[0072] 蓝光研究：四至五月龄老年斯普拉格-杜勒(Sprague-Dawley，SD)雄性大鼠用于以下研究中。在蓝光暴露之前2天开始药物处理。使动物每天一次接受奥氮平IP注射，持续3天，并且最后一次给药是在蓝光暴露之前1小时。

[0073] 对于玻璃体内注射(IVT)，使动物在蓝光暴露之前1小时接受奥氮平(具有以下示出的结构)。对于局部施用，在蓝光暴露之前24小时(BID)和一小时(QI)，给予药物。水用于平行对照媒介物IP/IVT注射或局部施用。在将大鼠暴露于具有约6至7k的勒克斯强度的蓝光持续4小时之前将它们暗适应24小时。就在所述蓝光暴露之后，在所述大鼠返回到正常室内光照(12小时光照/12小时黑暗)之前将它们再次暗适应另外3天。光学相干断层扫描(OCT)用于评价在蓝光暴露之后7至10天由蓝光引起的视网膜厚度变化。误差线，SEM。(图3)。

[0074] 视网膜电图学(ERG)测定：使用Espion E^2视网膜电图学系统记录SD大鼠的双侧闪光视网膜电图。在ERG的当天，将动物暗适应至少30分钟。将它们的眼睛用托品酰胺HCl盐(1％)和Ak-dilate(10％)扩大。在ERG记录之前，将所述动物通过肌肉注射40mg/ml氯胺酮HCL盐和12mg/ml塞拉嗪HCL盐来进行麻醉，并且放置在加热的平台上。将接地针放置在手臂下的皮肤中并且将参比针放置在头上的皮肤中。在0.1Hz下使用1cd.s/m2闪光用于平均10条迹线来刺激视网膜。将记录过滤器设置在300Hz下。使用Espion E^2和微软excel程序来分析ERG反应。从a波的波谷至b波的波峰测量b波振幅，并且a波测量为在发病时的记录与负偏移的波谷之间的振幅的差异。误差线，SEM。(图4、8、以及9)

[0075] 大鼠眼睛组织处理与H&E染色：将蓝光暴露之后2至3周的斯普拉格-杜勒雄性大鼠用CO_2安乐死并且摘出眼眶。在室温下将眼睛在达维德松固定剂(Davidson's fixative)中固定过夜并且转移至70％乙醇中持续24小时。通过在80％、95％以及100％酒精和丙炔酸(Propar)中连续脱水、接着石蜡包埋来进行进一步组织处理。使用切片机(RM2255；Leica Microsystems)从鼻侧开始至颞侧在垂直子午线上横向切割全大鼠眼睛。使用视神经头作为界标，将具有5微米/切片的总计45个连续切片收集在15个载玻片上。将载玻片号1、5、10以及15脱蜡并且按照标准方案使用苏木精(细胞核)和曙红(细胞质)顺序地染色以便比较实验组之间的感光细胞/RPE病变。剩余的载玻片用于使用特异性抗体通过标准免疫-组织化学技术来测定视紫质、RPE65以及GFAP的表达。结果在图5至7中示出。

[0076] 氧诱导的视网膜病变：使用由Smith等人(Smith LE，Wesolowski E，McLellan A等人Oxygen-induced retinopathy in the mouse.Invest Ophthalmol Vis Sci.1994；35(1)：101-111)报告的方案在C57B6小鼠中诱导氧诱导的视网膜病变(OIR)/高氧症。将几窝新生小鼠和它们的母鼠在P7至P12时放置在75％氧室中。所述腔室含有足够持续5

天的食物和水并且仅打开以允许向所述动物施用药物。在 P12 时，使小鼠返回到具有正常含氧量的室内空气。将在水中的奥氮平或 VEH（水）每日一次通过管饲法施用，从 P10 开始并且持续直到 P16。在所述动物暴露于室内空气 5 天之后在 P17 上评价视网膜新生血管形成。

[0077] 视网膜血管造影和量化。如先前所述 (Smith LE,Wesolowski E,McLellan A 等人 Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994 ;35(1) : 101-111)，通过在经受 OIR 的小鼠中进行血管造影来评价视网膜新生血管形成。将 P17 小鼠深度麻醉并且然后用含有 50mg 高分子量 (2000kDa) 荧光素 - 葡聚糖 (Sigma,St. Louis,MO) 的 1mLPBS 通过左心室灌注。将眼睛摘出并且在 4％多聚甲醛中固定 24 小时。在去除晶状体之后，将视网膜切开并且用甘油 - 明胶进行全标本包埋。如先前所描述 (Chen J,Connor KM,Aderman CM,Smith LE. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. J Clin Invest. 2008 ;118(2) :526-533)，进行视网膜新生血管形成的量化。将在 4 倍放大率下在落射荧光显微镜 (Olympus,Center Valley,PA) 上取得的视网膜全标本包埋的图像输入到 Adobe Photoshop 7.0 软件 (Adobe Systems,Mountain View,CA) 中并且合并以便产生整个视网膜的图像。如先前所描述 (Bai Y,Ma JX,Guo J 等人 Müller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. J Pathol. 2009 ;219(4) :446-454)，量化新生血管形成。Photoshop 手绘工具用于描绘新生血管丛形成的区域，并且新生血管形成（以像素为单位）的面积表示为整个视网膜（以像素为单位）的面积的百分比。为了避免偏差，由对动物处理遮蔽的观察者进行新生血管形成的量化。结果在图 10 中示出。

[0078] 脉络膜新生血管形成 (CNV) 测定 ：各重 250 至 300 克的棕色挪威 (Brown Norway) 大鼠 (Charles Rivers) 用于研究中。在激光处理之前 2 天开始药物处理。奥氮平每天腹腔注射 (i.p.)(1mg/kg) 一次，持续 3 天（第 -2、-1 以及 0 天）。在第 0 天的最后一个剂量是在激光处理之前约 1 小时递送。磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 用于平行对照媒介物 IP 注射。在激光程序的第零天，将大鼠眼睛（瞳孔）用托品酰胺 HCl 盐 (1％）和 Ak-dilate(10％）扩张。然后通过肌肉注射 40mg/ml 氯胺酮 HCL 盐和 12mg/ml 塞拉嗪 HCL 盐来麻醉大鼠。使用显微镜载玻片盖玻片用 Refresh Liquigel 眼药水作为光偶联剂将底部可视化。对于每个动物，在每 2 个视网膜血管之间用氩激光器 (Coherent Inc. ;Santa Clara,Ca.) 在视神经盘周围以大约相等的距离同心地在每只眼睛中制造 6 个激光斑点 (360mW 功率，0.07 秒持续时间，50μm 斑点大小）。在激光光凝固程序之后第 1、4 以及 6 天，将单个 5ul 体积的药物（奥氮平）或 PBS 注射到玻璃体腔中。在激光处理之后第 11 天，通过 CO2 暴露处死动物并且如先前所述测定 CNV 形成。简单地说，将眼睛摘出并且固定在 10％福尔马林溶液中持续 1 小时。将眼睛在 PBS 中漂洗 (5min×2)，或在 PBS 中保持过夜。充分清洗眼睛并且在皮氏 (Petri) 培养皿中切成两半，将眼杯和附着的视网膜留在适当地方。在 PBS 中洗涤眼杯 - 视网膜，并且将视网膜从脉络膜分离并且去除。将眼杯 - 脉络膜在于 PBS/0.5％ Triton×100 中的同工凝集素 (Isolectin)IB_4 缀合物 (10ug/ml) 中培育过夜。将眼杯 / 脉络膜在 PBS 中洗涤 (20min×3)，并且在四个位置处进行切割并且使用水性封片介质平封。使用 Metamorph 图像分析软件 (RPI,Natick,MA) 来量化荧光的面积。结果在图 11 中示出。

[0079] 实验确立了本发明的化合物保护 RPE 免于氧化应激（如以下所总结）和这类应激

引起的疾病。

[0080]

化合物	在 10uM 下保护（%）
奥氮平	116
代谢物 A	103
代谢物 B	129
氯氮平	99
n- 去甲基氯氮平	77

[0081]

[0082] 在本说明书中公开的每一个和所有参考文献，无论是非专利（例如，科学、期刊参考文献）还是专利（授权的专利或公开的专利申请），是出于所有目的以引用的方式全部并入本文。

[0083] 上述描述详述了可以用以实践本发明的具体方法和组合物，并且代表预期的最佳方式。它不应被解释为限制本文的整体范围；相反，本发明的范围仅由所附权利要求的合法构建来决定。

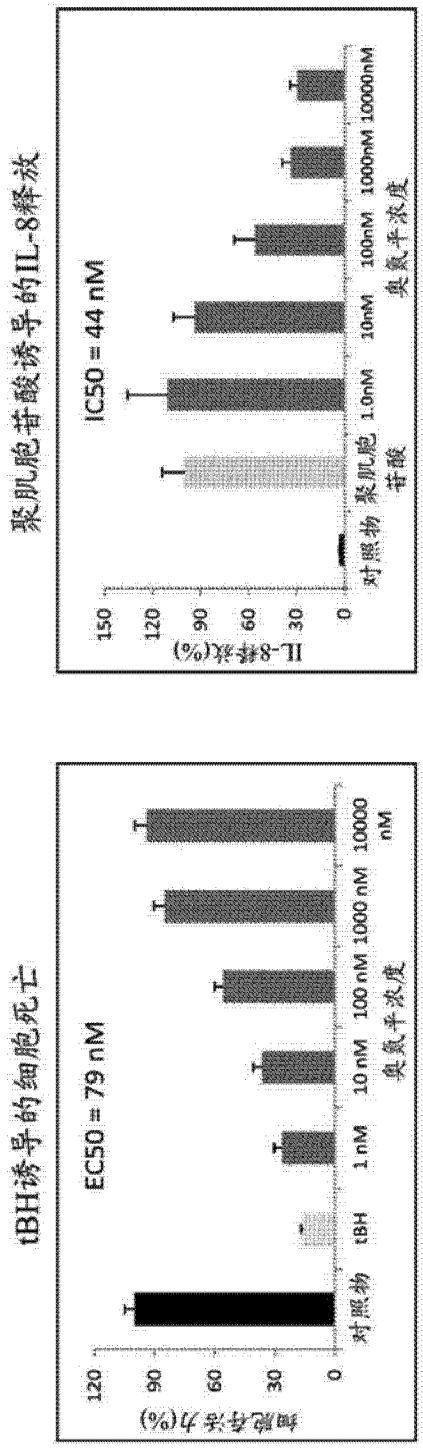

聚肌胞苷酸诱导的IL-8释放
IC50 = 44 nM
IL-8释放(%)
150
120
90
60
30
0
对照物
聚肌胞苷酸
1.0nM
10nM
100nM
1000nM
10000nM
奥氮平浓度
tBH诱导的细胞死亡
EC50 = 79 nM
细胞存活力(%)
120
90
60
30
0
对照物
tBH
1 nM
10 nM
100 nM
1000 nM
10000 nM
奥氮平浓度

图 1

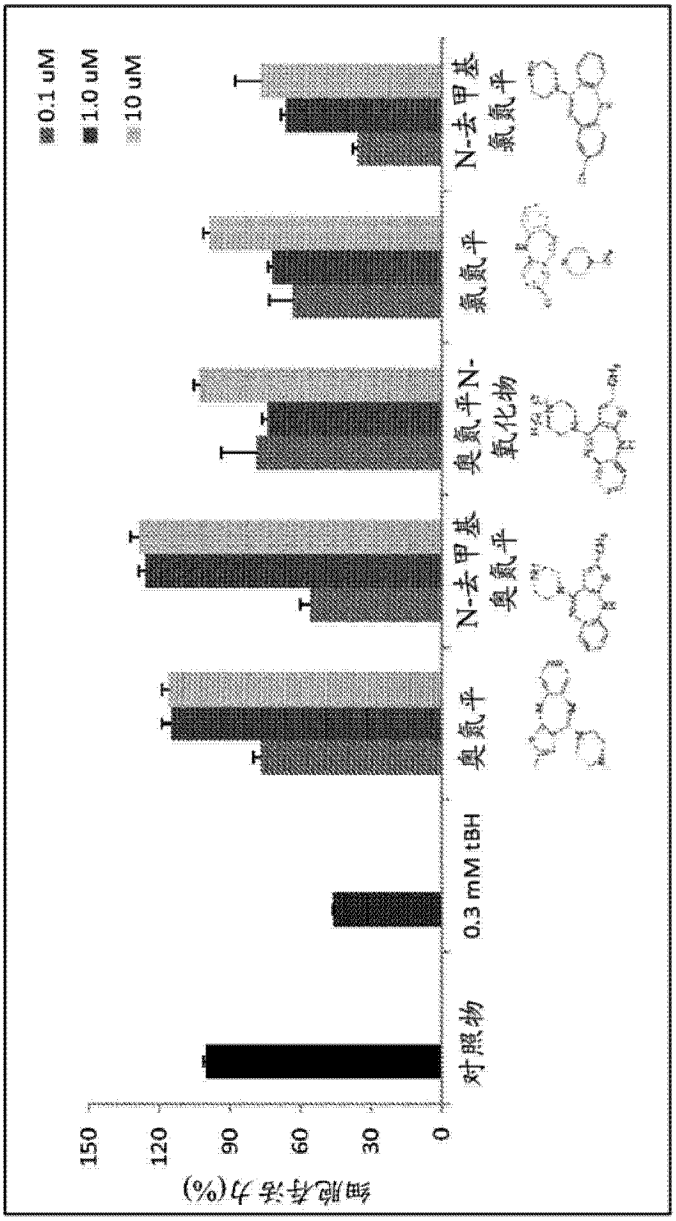

0.1 uM
1.0 uM
10 uM
细胞存活力(%)
150
120
90
60
30
0
对照物
0.3 mM tBH
奥氮平
N-去甲基奥氮平
奥氮平N-氧化物
氯氮平
N-去甲基氯氮平

图 2

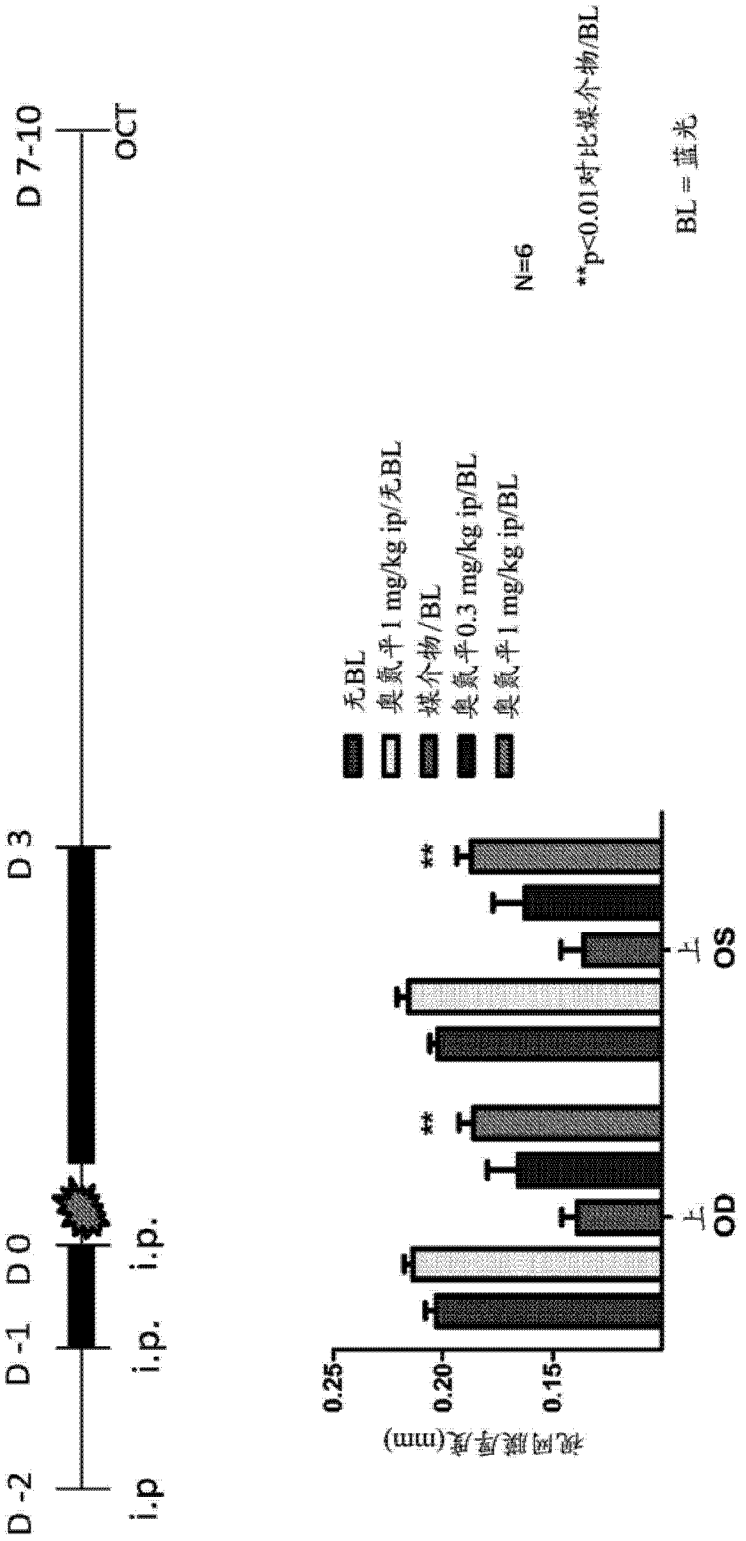

D -2
D -1
D 0
D 3
D 7-10
OCT
i.p
i.p.
i.p.
i.p.
无BL
奥氮平1 mg/kg ip/无BL
媒介物/BL
奥氮平0.3 mg/kg ip/BL
奥氮平1 mg/kg ip/BL
N=6
**p<0.01对比媒介物/BL
BL = 蓝光
视网膜厚度(mm)
0.25
0.20
0.15
上 OD
上 OS
**
**

图 3

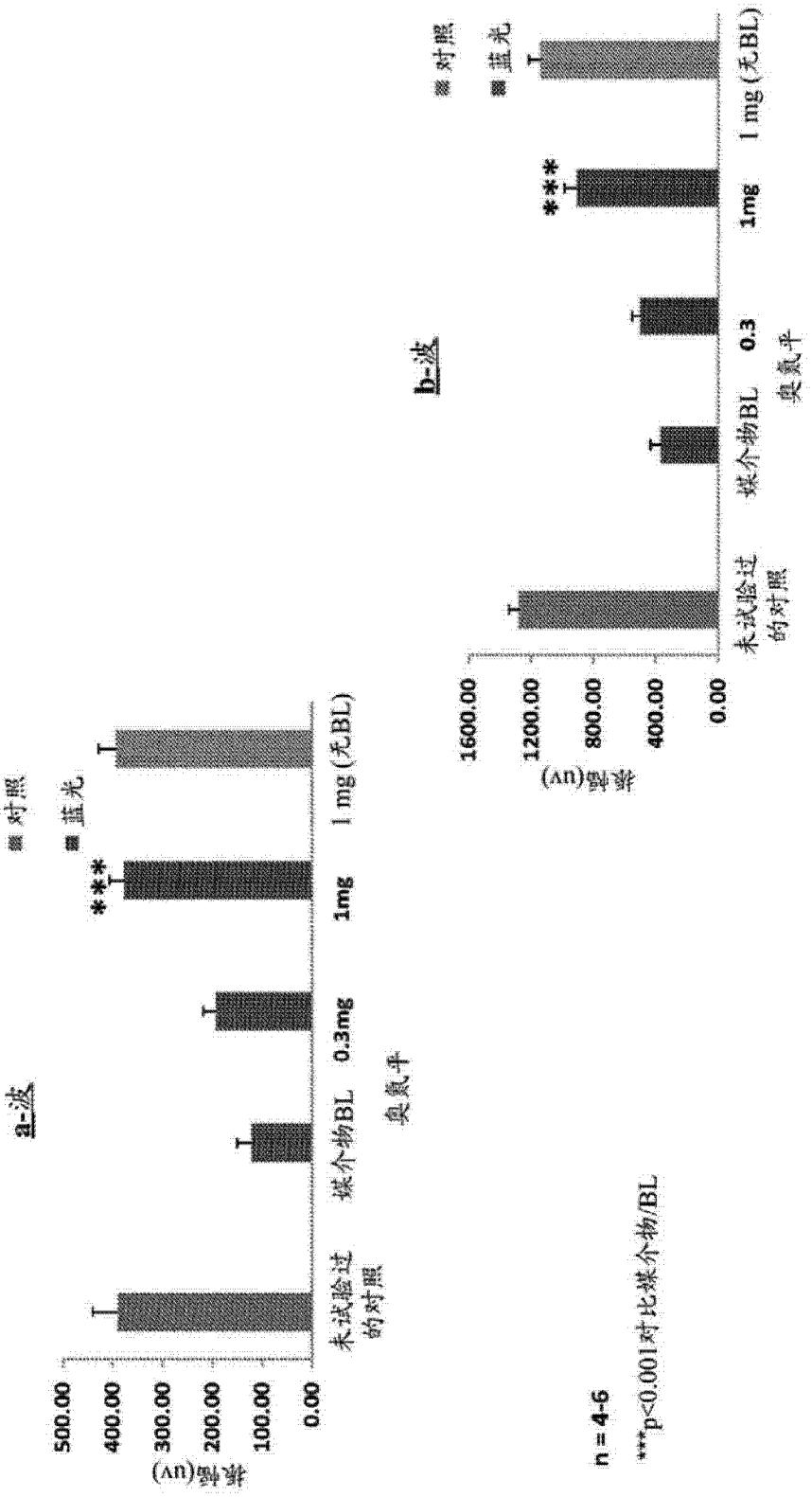

a-波
对照
蓝光
***
未试验过的对照
媒介物BL
0.3mg
1mg
1 mg (无BL)
臭氧平
振幅(uV)
500.00
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
b-波
对照
蓝光
***
未试验过的对照
媒介物BL
0.3
1mg
1 mg (无BL)
臭氧平
振幅(uV)
1600.00
1200.00
800.00
400.00
0.00
n = 4-6
***p<0.001对比媒介物/BL

图 4

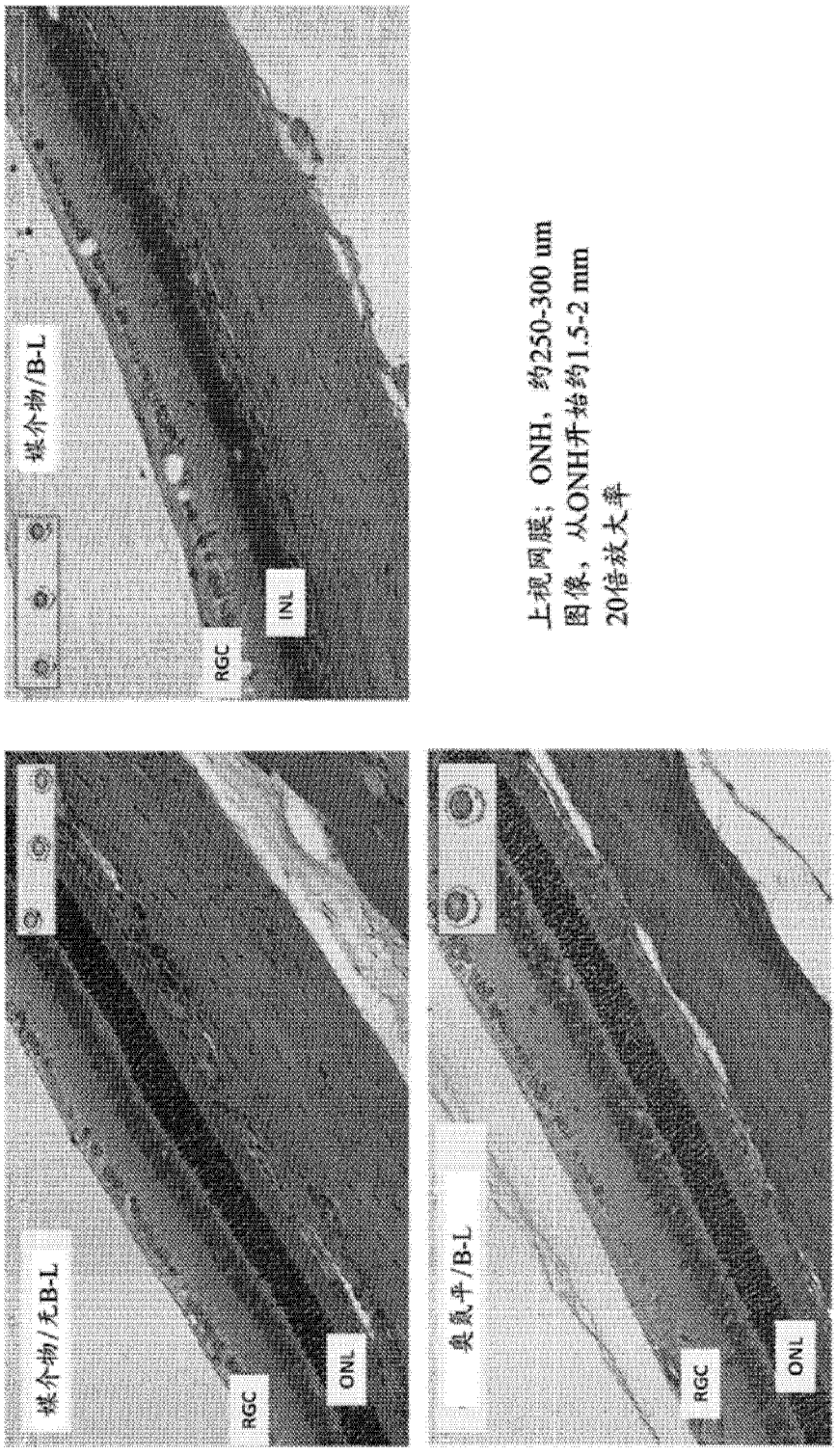

媒介物/B-L
RGC
INL
上视网膜；ONH，约250-300 um
图像，从ONH开始约1.5-2 mm
20倍放大率
媒介物/无B-L
RGC
ONL
奥真平/B-L
RGC
ONL

图 5

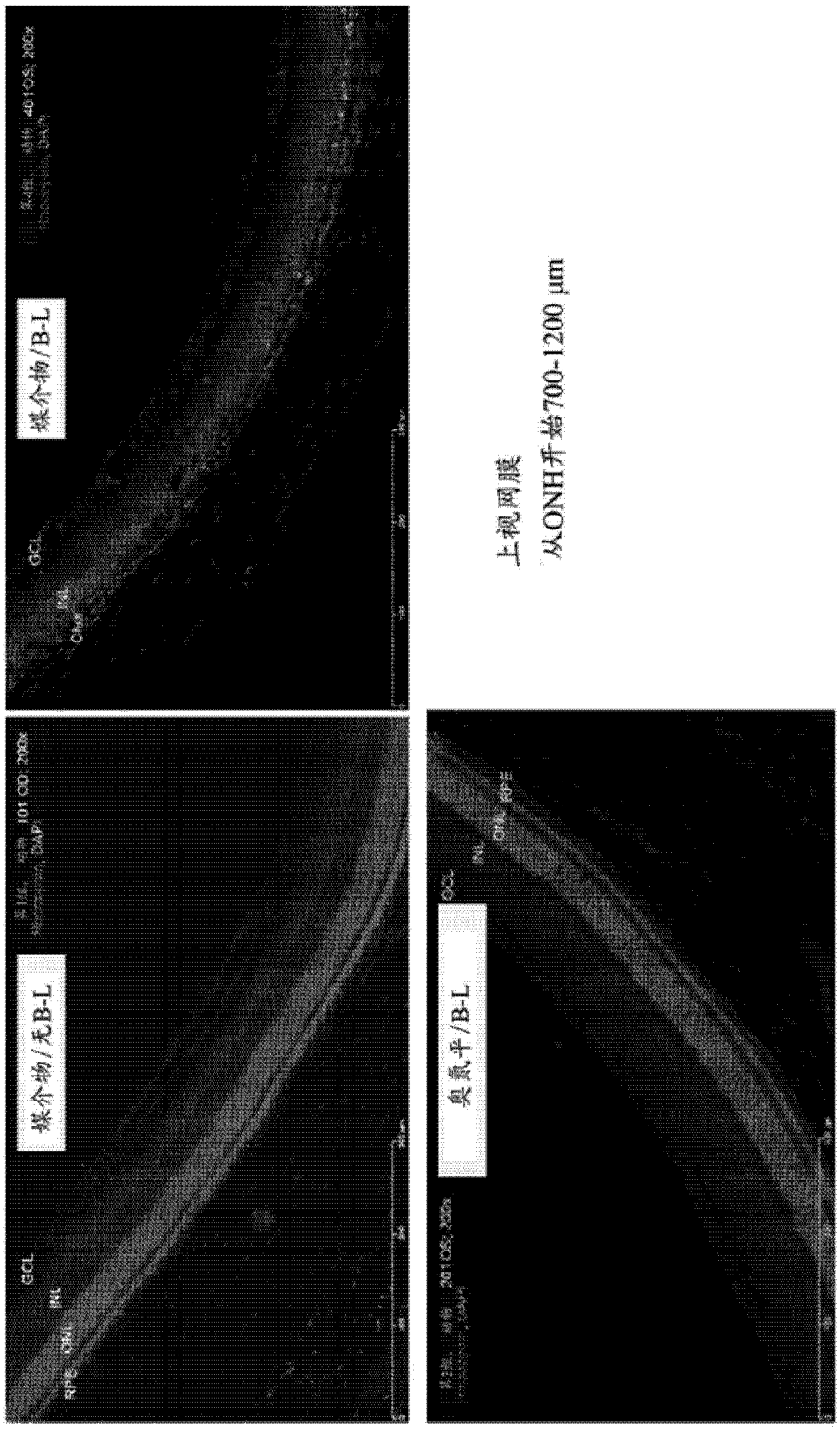


图 6

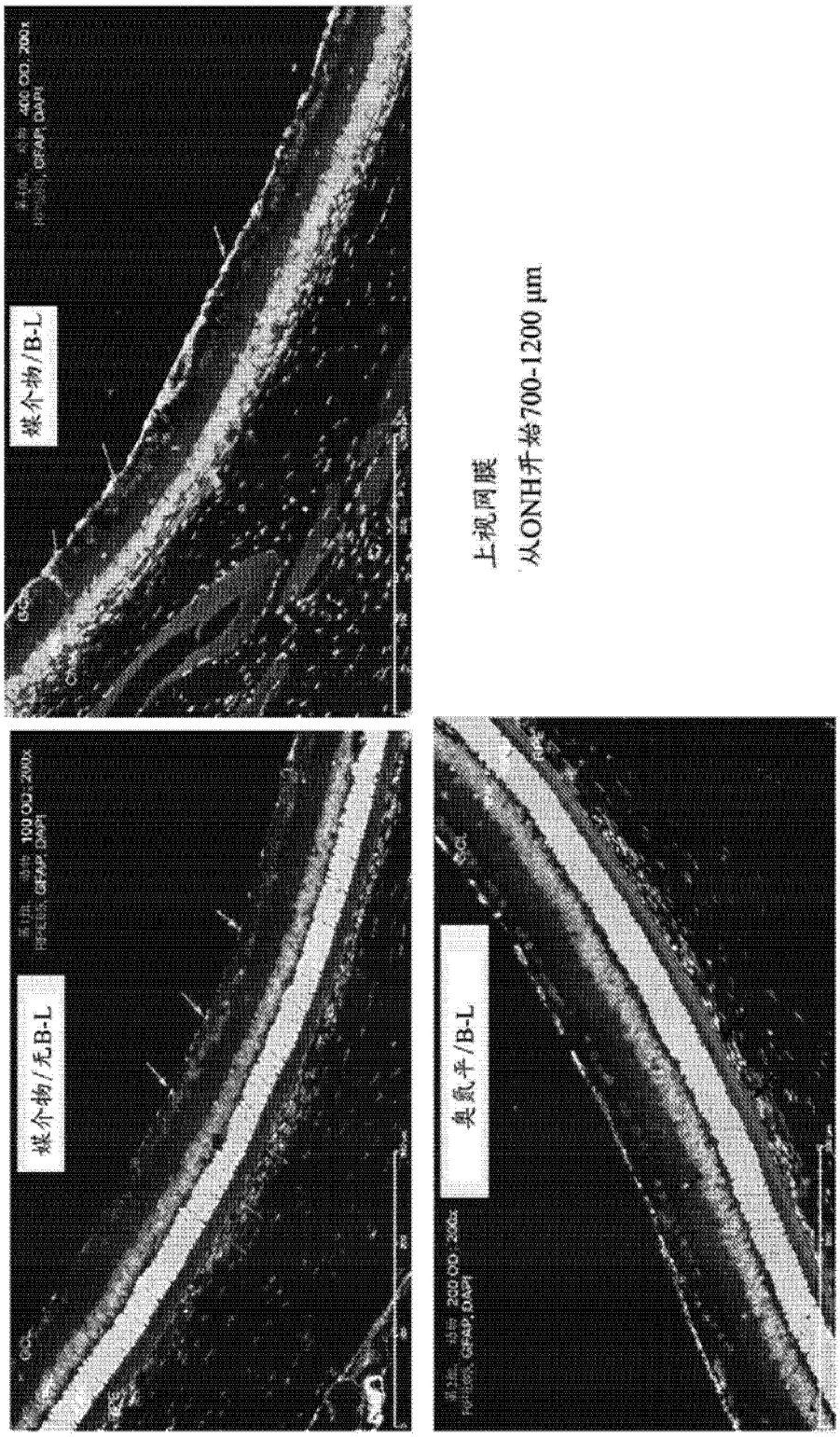


图 7

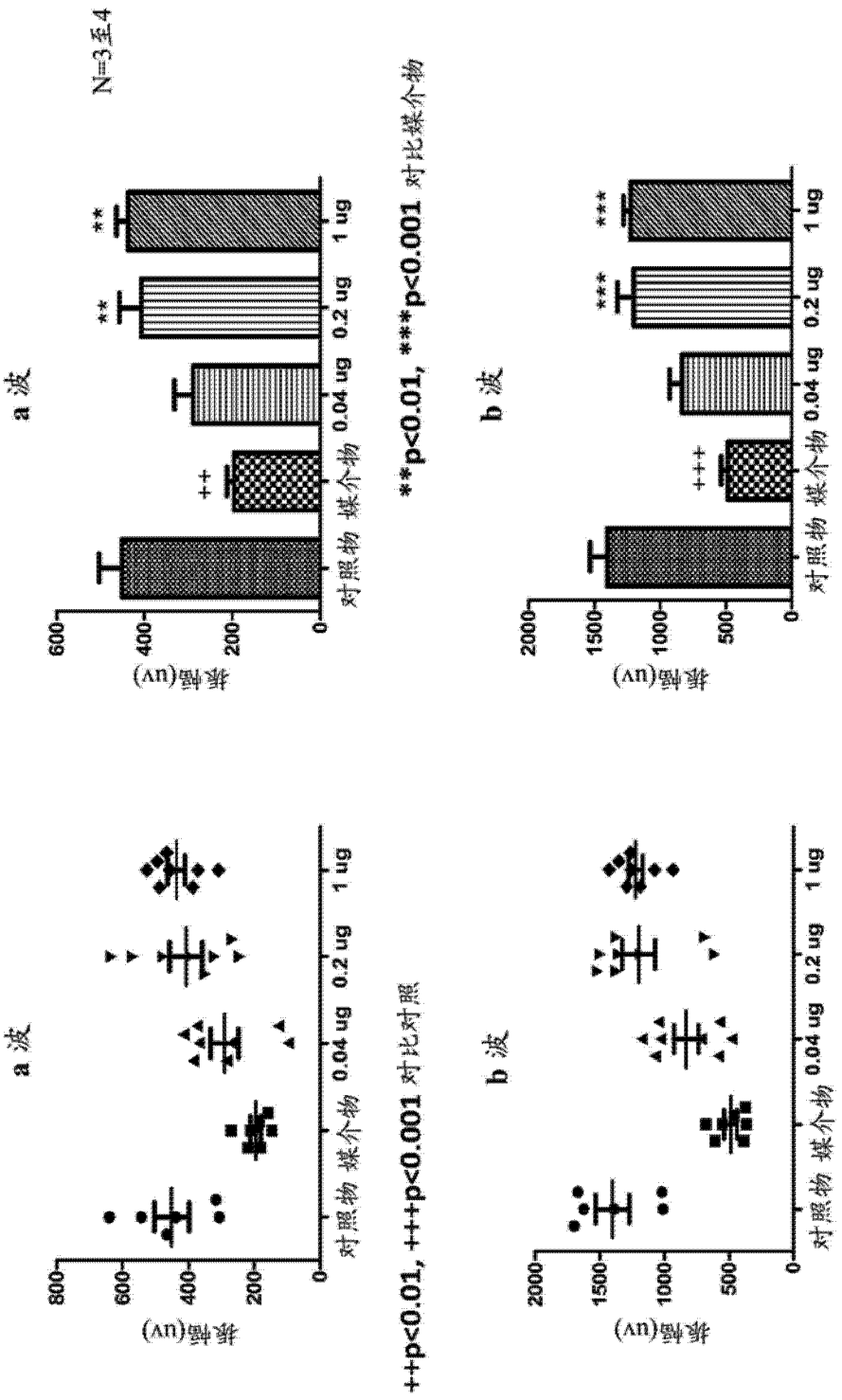

a 波
N=3至4
振幅(uV)
600
400
200
0
++
**
**
对照物 媒介物 0.04 ug 0.2 ug 1 ug
**p<0.01, ***p<0.001 对比媒介物
b 波
2000
1500
1000
500
0
+++
***
***
++p<0.01, +++p<0.001 对比对照
800

图 8

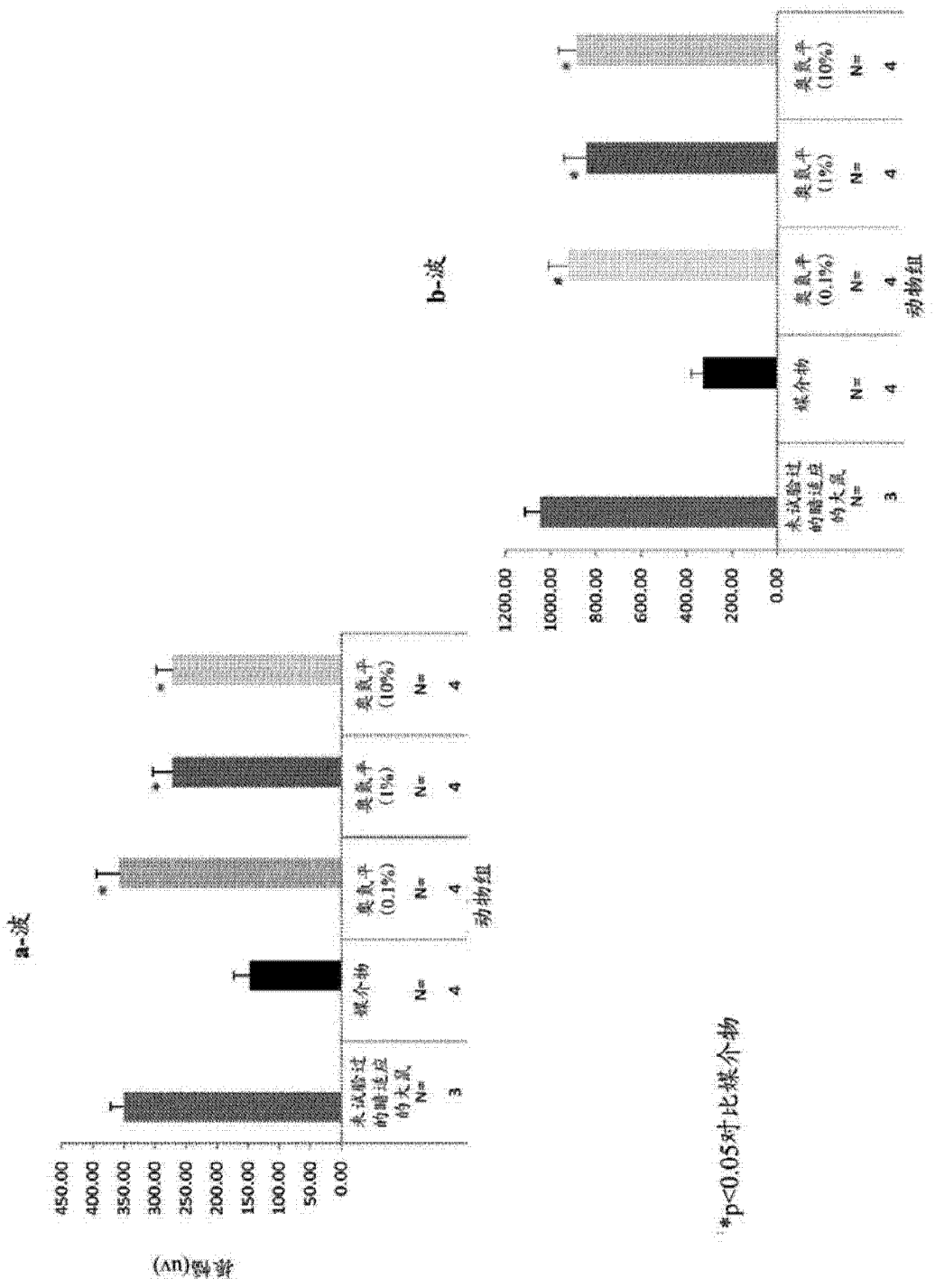

a-波
振幅(uV)
450.00
400.00
350.00
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
未试验过的睡适应的大鼠
媒介物
臭氧平(0.1%)
臭氧平(1%)
臭氧平(10%)
N=
3
4
4
4
4
动物组
*
b-波
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
*p<0.05对比媒介物

图 9

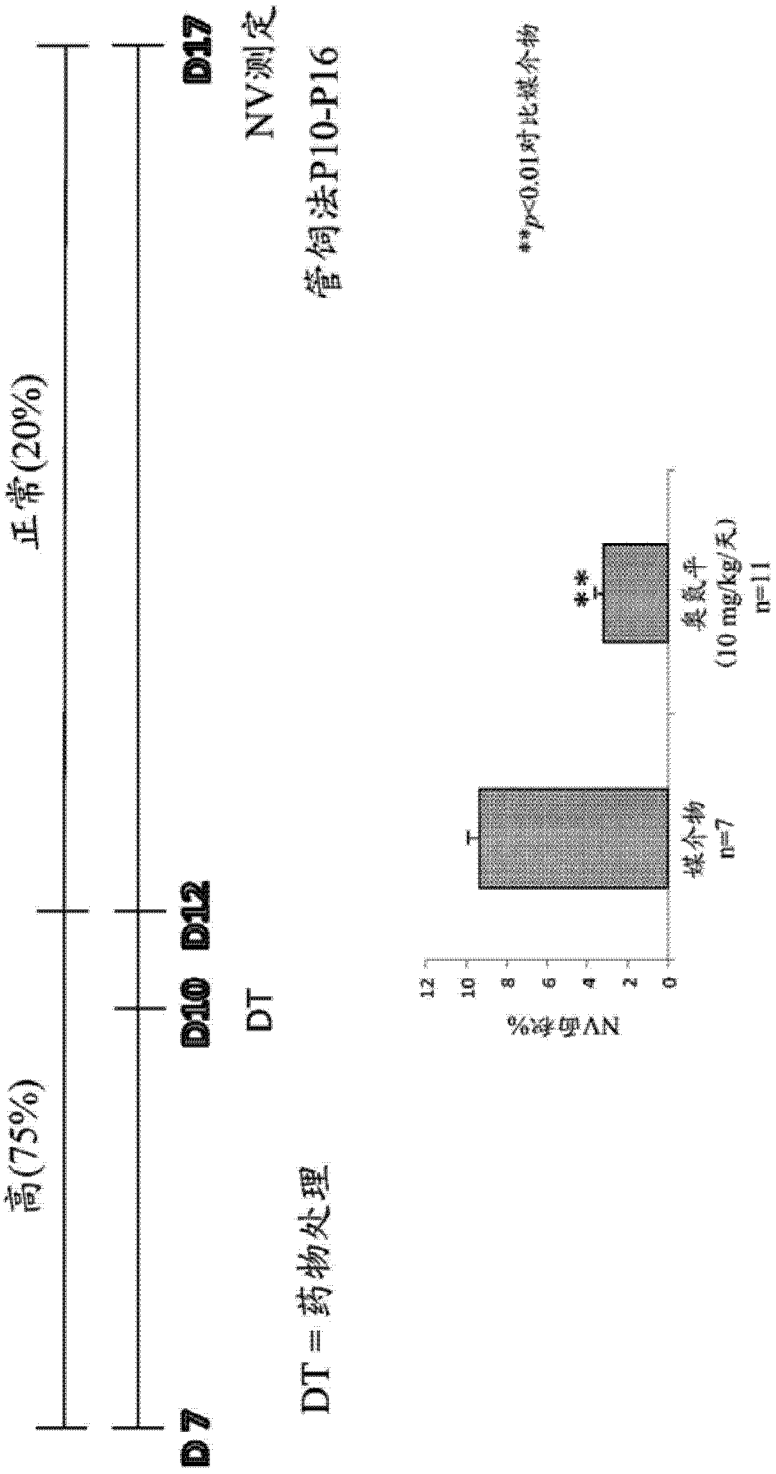

D17
NV测定
常饲法P10-P16
正常(20%)
D12
D10
DT
高(75%)
D7
DT = 药物处理
**p<0.01对比媒介物
**
媒介物
n=7
奥氮平
(10 mg/kg/天)
n=11
NV面积%
12
10
8
6
4
2
0

图 10

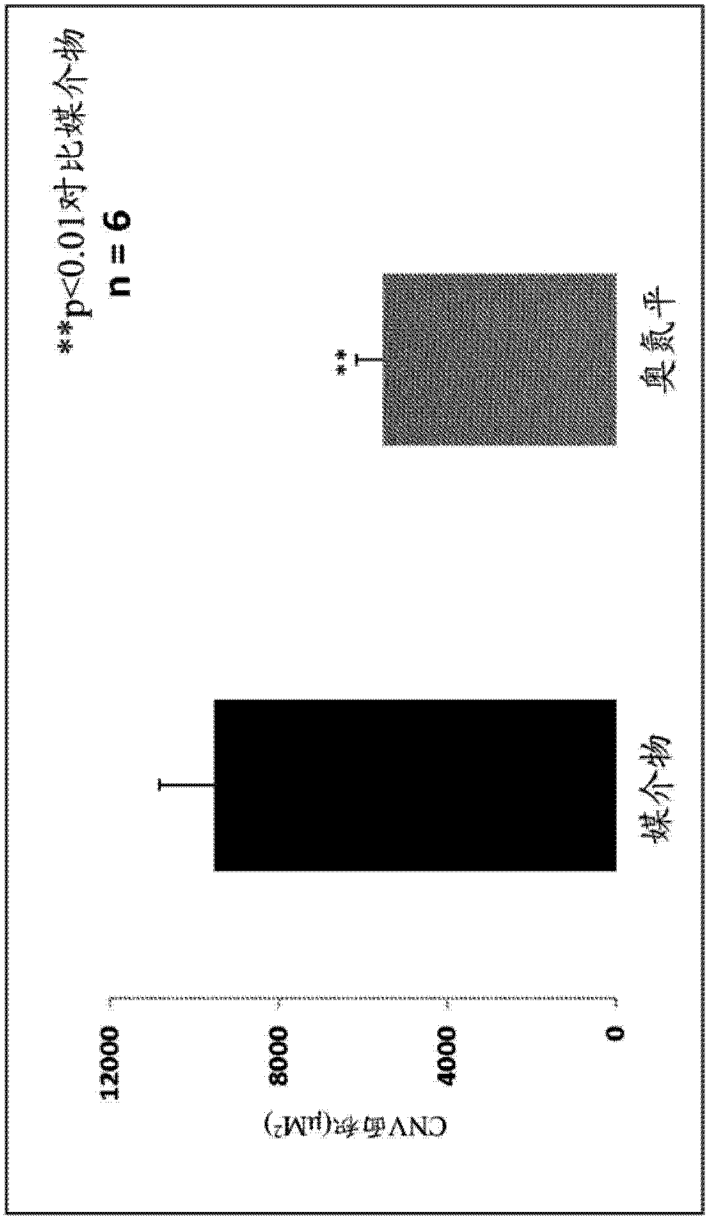


图 11