

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580044196.3

[51] Int. Cl.

A61K 33/14 (2006.01)

A61K 31/09 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月30日

[11] 公开号 CN 101115489A

[22] 申请日 2005.12.22

[21] 申请号 200580044196.3

[30] 优先权

[32] 2004.12.22 [33] US [31] 60/638,100

[86] 国际申请 PCT/CN2005/002282 2005.12.22

[87] 国际公布 WO2006/066511 英 2006.6.29

[85] 进入国家阶段日期 2007.6.21

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 P·M·G·范侯特 支志明

苏国辉 岑晓彤

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 黄可峻

权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 6 页

[54] 发明名称

二氮烯-桥连的冠醚锂化合物及其使用方法

[57] 摘要

本发明提供了一种对患者治疗眼疾的方法，所述方法包括：提供当曝光时释放活性成分以治疗眼疾的感光前药；对受治疗者给予在药学上可接受的载体中的前药，将受治疗者的眼睛暴露于外部光源，使前药释放活性成分。本发明还提供了一种用于治疗青光眼的组合物，所述组合物包含含有在含冠醚或氮杂-冠醚的色烯或二氮烯衍生物中螯合锂离子的化合物和药学上可接受的载体。

1.一种用于保护受治疗者视网膜神经节细胞退化的方法，所述方法包括：

- (a)提供当曝光时释放活性成分以治疗眼疾的感光前药；
- (b)对受治疗者的眼睛给予在药学上可接受的载体中的前药；和
- (c)将受治疗者的眼睛暴露于外部光源，使前药释放活性成分。

2.权利要求1的方法，其中所述视网膜神经节细胞退化由眼疾引起。

3.权利要求2的方法，其中所述眼疾为青光眼。

4.权利要求1的方法，其中所述前药释放锂。

5.权利要求1的方法，其中通过将前药引入受治疗者的血流将所述前药给予受治疗者的眼睛。

6.权利要求1的方法，其中所述前药从色烯、二氮烯或其衍生物的冠醚或氮杂-冠醚部分释放锂。

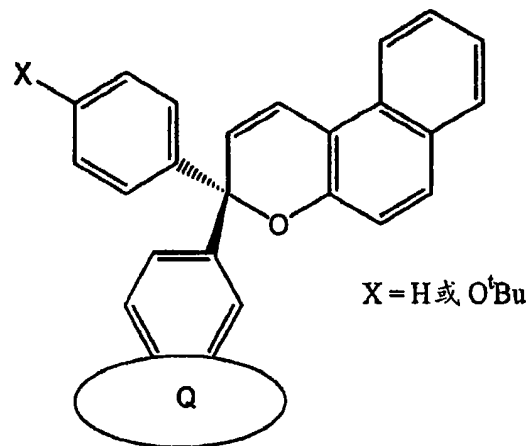
7.权利要求5的方法，其中当暴露于进入受治疗者眼睛的光时所述前药释放锂。

8.权利要求4的方法，其中所述锂离子与冠醚或氮杂-冠醚部分螯合，形成曝光时释放锂离子的螯合锂化合物。

9.权利要求4的方法，其中所述锂离子通过冠醚或氮杂-冠醚部分与二氮烯或色烯衍生物可逆地结合，形成释放锂离子的色烯或二氮烯衍生物，从而当受治疗者的眼睛曝光时释放锂离子。

10.一种用于保护视网膜神经节细胞退化的组合物，所述组合物包含有效量的在色烯、二氮烯或其衍生物中的释放锂的冠醚或氮杂冠醚部分和药学上可接受的载体。

11.权利要求10的组合物，其中所述视网膜神经节细胞退化由青光眼引起或为青光眼的症状。



其中 Q 为任何大小的冠醚或氮杂-冠醚，X 为 H 或叔丁氧基。

16. 一种治疗青光眼的方法，所述方法包括使锂与权利要求 14 的组合物可逆地结合得到前药，向需要这种治疗的患者的眼睛给予有效治疗青光眼量的在药学上可接受的载体中的前药，将患者的眼睛暴露于外部光源以释放锂至患者的眼睛。

17. 一种治疗青光眼的方法，所述方法包括使锂与权利要求 15 的组合物可逆地结合得到前药，向需要这种治疗的患者的眼睛给予有效治疗青光眼量的在药学上可接受的载体中的前药，将患者的眼睛暴露于外部光源以释放锂至患者的眼睛。

二氮烯-桥连的冠醚锂化合物及其使用方法

本申请要求 2004 年 12 月 22 日提交的美国临时申请 60/638,100 的优先权, 该临时申请的内容通过引用结合到本申请中来。

在整个申请中, 参考了各种出版物。这些出版物的完整引用可在权利要求书之前直接找到。这些出版物所公开的内容通过引用结合到本申请中来, 以便更充分地描述本发明所述和要求保护领域的状况。

发明背景

青光眼为一种进行性丧失视力的人类疾病, 其为世界上不可逆失明的最主要的原因之一。世界卫生组织(WHO)估计在 1977 年青光眼病例总数为 105,000,000 人。仅在中国, Foster 和 Johnson 在 2001 年报道受该疾病折磨的估计有 9,400,000 人(对于 40 岁以上的年龄组), 其中有 5,200,000 人(55%)至少一只眼睛失明。

青光眼视网膜神经节细胞丧失的一种假设为细胞死亡基因诱导, 或者由于阻滞退行性轴突运输或是由于增加眼睛内有毒物质的产生。因此, 本实验的目的为利用我们已建立的青光眼动物模型, 使用巩膜外层和缘静脉激光凝固法阻断眼房水的流出来增加眼内压力。此外, 我们先前的研究表明, 氯化锂为眼睛的神经保护因子。将 LiCl 或其他感光锂化合物注入鼠中, 检测其在鼠青光眼模型中保护视网膜神经节细胞死亡中的作用。该模型用于研究锂在防止青光眼细胞死亡中的机理。由于仅在眼内活化, 因此感光锂化合物具有非常低的副作用, 因此该方法可用于患有青光眼疾病的患者。

青光眼的主要病理特征为视网膜神经节细胞(RGS)死亡, 视神经头凹陷和萎缩导致丧失视力。(Leske, 1983; Osborne, 1999; Quigley,

1979)。青光眼视神经病逐渐降低视力，且通常没有症状。许多患者在青光眼早期阶段没有意识到病理病症，直至发展成完全失明。与中枢神经系统(CNS)的其他神经元类似，RGC 一旦被破坏通常不再生。但是，在许多类型的眼疾中，如果在早期阶段进行治疗，则可防止影响 RGC 轴突的进行性视野丧失。因此，在许多类型的视神经病中重要的是防止 RGC 退化。

迄今为止，似乎没有适当的疗法保护避免青光眼视网膜神经节细胞死亡。目前临床治疗青光眼为使用少数可得的神经营养剂延迟 RGC 进行性丧失，更多的研究致力于在各种视神经病病症中防止 RGC 死亡和凋亡。对各种视神经病病症例如青光眼视神经病、局部缺血视神经病、炎性视神经病、压迫性视神经病和创伤视神经病机理的认识是开发新疗法的关键。已建立各种动物青光眼模型以模拟致病病症，包括视神经横切(Cheung, 2002; Cho, 1999; Cho, 2001; Lu, 2003; You, 2002)和眼压过高(Garcia-Valenzuela, 1995; Laquis, 1998; McKinnon, 2002; Mittag, 2000; Morrison, 1997; Sawada, 1999; Ueda, 1998)。本发明者开发了一种使用氩激光光致凝固缘和巩膜外层静脉的眼压过高模型(Ji, 2004; WoldeMussie, 2001; WoldeMussie, 2002)。

氯化锂为临床治疗躁狂和抑郁的一种常用药物。近来的研究表明，通过各种细胞内信号传导途径，包括增量调节抗凋亡基因 Bcl-2 和抑制糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)，氯化锂对受损伤的 CNS 具有神经保护作用。锂-诱导的 Bcl-2 增量调节对神经保护免受谷氨酸兴奋性神经毒性和支持受损伤的轴突内部生长势起到关键的作用。GSK-3 β 为在受损伤的 CNS 中调节凋亡的 PI3-激酶/Akt 信号传导途径关键的下游靶。使用眼压过高模型研究青光眼的病理生理学，So 和他的同事说明氯化锂可防止 RGC 退化(Ji, 2002)。

尽管锂具有巨大的治疗价值，但存在严重的长期关联的并发症。这些并发症包括严重的粗大震颤、皮肤病恶化、白细胞增多、甲状

腺功能减退、甲状旁腺功能减退以及破坏肾功能(Birch, 1999 和 1999)。不合需要的副作用可能由锂缓慢渗透通过血脑屏障和通过其他膜引起,导致作用延迟开始,因此必须使用高剂量(Shanzer, 1983)。因此,本发明的一个目的为利用感光化合物治疗各种疾病的新用途提供新的治疗和方法。

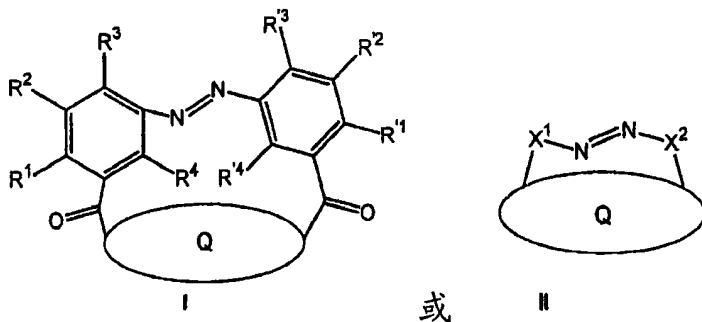
感光体系(包括含有光致变色单元例如二氮烯或色烯的那些感光体系)广泛用于不相关的领域,例如光学记录和信息存储装置(Ishige, 1980; Loerincz, 2003; Matsui, 1994)、光控介质(Levy, 1997; Natansohn, 1999; Nunzi, 1996)、液晶显示器和有机发光器件(Shinbo, 2002; Zhang X. H., 2001)、分子开关(Ikeda, 2000; Yoon, 2003; Zhang Zhihua, 2003)以及用于防伪商标的安全油墨(Fan, 1997)。更具体地讲,本发明所述的感光体系包括与螯合部分相连或掺入其中的感光部分,这种感光螯合剂用于检测(Alward, 1998; Rompotis, 2002)和提取金属离子(Alward, 1998; Blank, 1981; Shinkai, 1980; Shinkai, 1981)。

发明概述

本发明提供了一种对受治疗者治疗眼疾的方法,所述方法包括:提供当曝光时释放活性成分以治疗疾病的感光前药,对受治疗者给予在药学上可接受的载体中的前药,将受治疗者的眼睛暴露于外部光源,使前药释放活性成分。

本发明还提供了一种保护受治疗者视网膜神经节细胞退化的方法,所述方法包括(a)提供当曝光时释放活性成分以治疗眼疾的感光前药;(b)对受治疗者的眼睛给予在药学上可接受的载体中的前药;和(c)将受治疗者的眼睛暴露于外部光源,使前药释放活性成分。

本发明还提供了一种具有以下结构之一的化合物:



其中 Q 为任何大小的冠醚或氮杂-冠醚；其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^2 、 R^3 、 X^1 和 X^2 相同或不同，且各自选自整个或部分苯环或取代的苯环、氢、卤素、羟基以及未取代或取代的低级烷基、环烷基、芳基、酰基、烷氧基、酰基氨基、芳烷基氰基羧基、硫代、乙烯基、苯乙烯基、烷氧基羰基、氨基甲酰基、氨基羰基、苯氧基羰基，取代基为以上所列的金属、氢、卤素和羟基以及公认的供电子和受电子基团，且其中各取代基可组合在一起形成具有任何环中原子数的取代或未取代、饱和或不饱和的环。

附图概述

图 1 为感光锂离子载体(1)/配体(1)，一种在暗处与锂离子结合，当照射时释放锂离子的二氮烯-桥连的冠醚(Shinkai, 1980)。

图 2 为包含不同大小的不同二氮烯或二氮杂-冠醚和二氮烯-桥连的冠醚衍生物的体系，看起来功能与感光锂离子载体(1)/配体(1)相同。

图 3 为感光锂离子载体(2)/配体(2)，一种包含色烯的在暗处与锂离子结合，当照射时释放锂离子的冠醚(Stauffer, 1997)。

图 4 为包含不同大小的冠醚的色烯体系的衍生物，看起来功能与感光锂离子载体(2)/配体(2)相同。

图 5 表示在使用锂络合物(1)治疗的三组不同的鼠中视网膜神经节细胞丧失百分比结果。

图 6 表示在使用锂络合物(1)的剂量实验中视网膜神经节细胞丧失百分比结果。

优选实施方案详述

定义

可使用本领域技术人员已知的任何各种方法和递药系统实现或进行本文使用的“给予”药物。所述给予可例如通过静脉内、通过脑脊髓液、口服、经鼻、通过植入物、透粘膜(transmucosally)、透皮、肌内和皮下进行。

本文使用的“药学上可接受的载体”是指本领域技术人员已知的任何各种载体。

使用各种常规使用的药物载体的以下递药系统仅为预计给予本发明组合物的许多实施方案的代表。

可注射药物递药系统包括溶液、混悬液、凝胶、微球体和聚合物注射剂，且可包含赋形剂例如溶解度改变剂(例如乙醇、丙二醇和蔗糖)和聚合物(例如聚辛内酯(polycaprylactone)和 PLGA)。可植入的体系包括棒和盘，且可包含赋形剂例如 PLGA 和聚辛内酯。

口服递药系统包括片剂和胶囊。这些可包含赋形剂，例如粘合剂(例如羟丙基甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、其他纤维素材料和淀粉)、稀释剂(例如乳糖和其他糖、淀粉、磷酸二钙和纤维素材料)、崩解剂(例如淀粉聚合物和纤维素材料)和润滑剂(例如硬脂酸盐和滑石粉)。

透粘膜递药系统包括贴剂、片剂、栓剂、子宫托、凝胶和乳膏剂，且可包含赋形剂，例如增溶剂和促进剂(例如丙二醇、胆汁盐和氨基酸)和其他载体(例如聚乙二醇、脂肪酸酯及衍生物和亲水聚合物例如羟丙基甲基纤维素和透明质酸)。

皮肤递药系统包括例如含水和无水凝胶、乳膏剂、复合型乳剂、微乳、脂质体、软膏、含水和无水溶液、洗液、气溶胶、烃基质(bases)和粉末，且可包含赋形剂例如增溶剂、渗透促进剂(例如脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇和氨基酸)和亲水聚合物(例如聚卡波菲(polycarbophil))

和聚乙烯基吡咯烷酮)。在一个实施方案中, 药学上可接受的载体为脂质体或透皮促进剂。

用于可再生递药系统的溶液、混悬液和粉末包括各种载体, 例如悬浮剂(例如树胶、zanthans、纤维素和糖)、湿润剂(例如山梨糖醇)、增溶剂(例如乙醇、水、PEG 和丙二醇)、表面活性剂(例如十二烷基硫酸钠、Spans、Tweens 和十六烷基吡啶)、防腐剂和抗氧化剂(例如对羟基苯甲酸酯类、维生素 E 和 C 以及抗坏血酸)、防结块剂和涂布剂。

本文使用的“有效量”是指足以治疗受眼疾或其并发症折磨的患者的量。

本文使用的“治疗”疾病是指减慢、停止或逆转疾病的进展。

优选的实施方案

为了说明本发明, 使用锂治疗青光眼的光线疗法用作一个实例, 不应理解为局限于青光眼的治疗或使用锂的方法。目的是要可控传递锂用于眼睛治疗。设计完整和稳定的锂前药(包括携带锂离子的药物递送系统)使得锂在暗处为非活性形式, 但当照射 UV 或可见光时释放活性锂离子。锂离子可在暗处被药物递送系统包封, 或优选与药物递送系统整合。锂前药可在整个身体内以惰性形式存在, 仅当直接接触外部光时才在眼睛内具有治疗作用。该方法可降低活性剂量和使目前阻碍可用治疗的不合需要的副作用减至最低。可通过口服、局部或注射传递前药。

药物递送系统包括与整合部分相连或掺入其中的感光部分。在感光部分辐射诱导的变化能可逆或不可逆地影响整合部分的结合性能。例如当照射时在药物递送系统中可有两种变化:

1. 感光部分进行异构化, 引起药物递送系统整体构象变化, 从而阻碍整合部分的结合能力; 或

2.感光部分移出螯合部分的电子密度,因此使得螯合部分失去其结合能力。

这些实例用于说明本发明的观念,而不是要以任何方式局限本发明。可设计体系使得当暴露于任何类型的辐射时,感光部分能可逆或不可逆地影响螯合部分的结合性能。

优选螯合部分为冠醚或其衍生物之一或氮杂-冠醚或其衍生物之一。可选择不同环大小的冠醚或氮杂-冠醚或其衍生物用于选择性结合例如不同的金属离子。但是,螯合部分的选择不局限于环状化合物。

优选感光部分为能改变冠醚衍生物的电子密度的共轭分子,或能改变冠醚衍生物环大小的感光异构体,从而影响其选择性结合能力。感光部分不必共轭,不必具有改变螯合部分电子密度的能力,也不必能进行感光异构化。

出于该目的,在下文中药物递送系统方便地称为感光锂离子载体(X)或配体(X)。在下文中,包含在感光锂离子载体(X)/配体(X)中螯合的锂离子的前药方便地称为锂络合物(X)。

实施例 1 感光锂离子载体(1)/配体(1)

感光锂离子载体(1)/配体(1)为二氮烯-桥连的冠醚(Shinkai, 1980),感光部分为二氮烯或偶氮苯衍生物,螯合部分为二氮杂-18-冠-6 醚。在暗处二氮烯部分采用 E 或反式构象,冠醚与锂离子螯合。当暴露于近 UV 光下数秒时,二氮烯部分进行感光异构化,采用 Z 或顺式构象,使得冠醚部分扩环,从而释放锂离子(图 1)。包含不同大小的不同的二氮烯或冠醚或二氮杂-冠醚或二氮烯-桥连的冠醚的衍生物的其他类似的体系看起来功能与感光锂离子载体(1)/配体(1)相同(图 2)。

二氮烯-桥连的冠醚的衍生物(图 2)可包括任何大小的冠醚或氮杂-冠醚和二氮烯上的 R^1 - R^3 和/或 R^1 - R^3 和/或 X^1 和/或 X^2 基团,其中 R^1 、

R^2 、 R^3 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X^1 和 X^2 相同或不同，且各自选自：整个或部分苯环或取代的苯环、氢、卤素、羟基以及未取代或取代的低级烷基、环烷基、芳基、酰基、烷氧基、酰基氨基、芳烷基氰基羧基、硫代、乙烯基、苯乙烯基、烷氧基羰基、氨基甲酰基、氨基羰基、苯氧基羰基，取代基为以上所列的金属、氢、卤素和羟基以及公认的供电子和受电子基团，其中各取代基可组合在一起形成具有任何环中原子数的取代或未取代、饱和或不饱和的环。

实施例 2 感光锂离子载体(2)

感光锂离子载体(2)/配体(2)为包含色烯的冠醚(Stauffer, 1997)，感光部分为色烯衍生物，螯合部分为苯并-15-冠-5 醚。在暗处，苯并-冠醚与锂离子螯合。当暴露于近 UV 光下数秒至数分钟时，色烯部分从苯并-冠醚中移出电子密度，使冠失去其金属离子结合能力(图 3)。包含不同大小冠醚的色烯体系的其他衍生物看起来功能与感光锂离子载体(2)/配体(2)相同(图 4)。

本发明提供了一种对患者治疗眼疾的方法，所述方法包括提供当曝光时释放活性成分以治疗眼疾的感光前药；对患者给予在药学上可接受的载体中的前药，将眼睛暴露于外部光源，使前药释放活性成分。

本发明还提供了上述方法，其中前药可在整个身体内以非活性形式存在，仅当接触外部光时才在眼睛内具有治疗作用。

本发明还提供了上述方法，其中所述方法用于治疗青光眼，或其中所述前药为锂前药。锂前药可包括包含与锂螯合部分相连或掺入其中的感光部分的药物递送系统。

本发明还提供了上述方法，其中锂前药中的锂离子在暗处螯合，当照射时释放。前药可包括感光部分和螯合部分，当照射时感光部分不可逆或可逆地影响螯合部分对锂离子的结合能力。前药还包括可释放的活性剂。可释放的活性剂可为锂。当曝光时锂可释放。感

光部分可与螯合部分相连或掺入其中。感光部分可不可逆或可逆地影响螯合部分的结合性能。感光部分可为二氮烯或其衍生物或色烯或其衍生物。螯合部分可为冠醚或其衍生物、氮杂-冠醚或其衍生物。

当照射时感光部分可进行异构化，从而改变螯合部分的构象和大小，使螯合部分失去与锂离子的结合能力。当照射时，感光部分还可从螯合部分移出电子密度，从而使螯合部分失去与锂离子的结合能力。

本发明还提供了上述方法，其中所述眼疾为青光眼，前药释放锂，且通过注射对患者给予前药。

本发明还提供了上述方法，其中前药从包含色烯或二氮烯衍生物的冠醚或氮杂-冠醚释放锂。

本发明还提供了上述方法，其中前药在患者眼睛以外的身体中保持非活性。

本发明还提供了上述方法，其中锂离子与冠醚或氮杂-冠醚衍生物螯合，形成包含螯合锂的螯合部分，所述螯合部分当曝光时释放锂。

本发明还提供了上述方法，其中锂离子可逆地与包含二氮烯或色烯衍生物的冠醚或氮杂-冠醚结合，形成释放锂的色烯或二氮烯化合物，当患者的眼睛曝光时释放锂。

本发明还提供了上述方法，其中当照射时感光部分进行异构化，从而改变螯合部分的构象和/或大小，使螯合部分失去与锂离子的结合能力。

本发明还提供了上述方法，其中当照射时感光部分从螯合部分移出电子密度，从而使螯合部分失去与锂离子的结合能力。

本发明还提供了一种用于治疗青光眼的组合物，所述组合物包含含有锂离子-二氮烯或色烯衍生物的可注射化合物，其中通过含冠醚或氮杂-冠醚的化合物螯合锂离子。

本发明还提供了一种用于治疗青光眼的组合物，所述组合物包含在药学上可接受的载体中的感光部分，所述感光部分包括通过冠醚或氮杂-冠醚部分与色烯或二氮烯衍生物结合的锂离子。

本发明还提供了一种对受治疗者治疗眼疾的方法，所述方法包括给予受治疗者有效量包含感光部分和螯合部分的前药，从而当曝光时感光部分影响螯合部分的结合性能，将受治疗者的眼睛曝光，从而使能治疗眼疾的活性剂释放。眼疾可为青光眼。药物组合物可通过静脉内、局部、口服给予或直接给予受治疗者的眼睛。受治疗者可为人。

本发明还提供了一种用于治疗青光眼的组合物，所述组合物包含有效量的由至少一个锂离子和冠醚或氮杂-冠醚衍生物形成的螯合物，其中通过冠醚或氮杂-冠醚部分螯合锂离子。

最后，本发明提供了用于治疗青光眼的试剂盒，所述试剂盒包括盛有用于治疗青光眼的组合物的光保护的安瓿或注射器和对患者给药的说明书，所述组合物包括可注射化合物，所述可注射化合物含有在含冠醚或氮杂-冠醚的色烯或二氮烯衍生物中螯合的锂离子。

用于实施例 3 和 4 的前药为锂络合物(1)，锂离子在感光锂离子载体(1)/配体(1)中螯合。还存在用作平衡阴离子的氯阴离子。

实施例 3 使用锂络合物(1)治疗的青光眼模型

将该实验的鼠分为三组：安慰剂组(12 小时曝光)、暗组(24 小时暗处)和亮组(12 小时曝光)。通过腹膜内注射连续 14 天给予暗组和亮组的鼠剂量等于 85 μ g/kg LiCl 的锂络合物(1)。随后将鼠处死，制备视网膜，计数视网膜神经节细胞。

结果表明，安慰剂组和暗组都有约 6-7%的视网膜神经节细胞丧失，而 12 小时曝光组的数据具有对以上两组的统计上显著差异(图 5)。在 12 小时曝光组中，没有必然的视网膜中视网膜神经节细胞丧失。因此，使用锂络合物(1)治疗亮组观察到神经保护效果。

实施例 4 使用 1/10 剂量的锂络合物(1)治疗的青光眼模型

除实施例 3 中所述的三组以外, 该实验还包括额外的一组, 1/10 剂量组。对 1/10 剂量组的鼠给予剂量等于 $8.5\mu\text{g}/\text{kg}$ LiCl(为初始剂量的 1/10)的锂络合物(1), 在与实施例 3 中的亮组相同的条件下曝光 12 小时。

结果表明, 1/10 剂量组具有与实施例 3 的亮组类似的神经保护效果。1/10 剂量组和使用初始剂量的亮组之间在神经保护效果上没有统计上显著差异(图 6)。1/10 剂量组也不必出现视网膜中视网膜神经节细胞丧失。

实验细节

SD 鼠的青光眼模型和视网膜神经节细胞死亡

使用重 250-300g 的成熟雌性 SD 鼠。对于所有的操作使用甲苯噻嗪/氯胺酮混合物或戊巴比妥麻醉所有的动物。

在每个动物的右眼诱导实验青光眼, 左眼用作参照。使用氩激光(Coherent, 功率 1V; 光点 $50\text{-}100\mu\text{m}$, 持续时间 0.1 秒)光致凝固右眼的巩膜外层和缘静脉(Siu 等, 2002; Ji 等, 2003)。在两个巩膜外层静脉上应用约 15-20 个光点, 在缘静脉周围应用 60 个光点。7 天后使用相同设置的第二次激光治疗。该方法一贯地使动物眼内压力升高为正常值的 1.5 倍。

在手术之前使用 Tonopen XL 眼压计测定每只鼠双眼的 IOP, 在手术之后每周测定一次。每只眼睛得到 10 次 IOP 测定的平均值。

在第一次激光后允许动物存活 2、4 或 8 周, 每个时间点使用 6 只动物。处死前一周, 在除去上面的皮质后, 将 6%的 Fluoro-Gold (FG) 施用于两个上丘的表面。FG 被视网膜神经节细胞(RGC)的轴突末端吸收, 并逆行运输至两个视网膜体。

在适当的存活时间, 采用过量的甲苯噻嗪/氯胺酮混合物处死动物。摘除眼睛, 固定在 4%的多聚甲醛中 60 分钟。制备完整的视网

膜,使用荧光显微镜计数 FG 标记的 RGC。在目镜栅格($200 \times 200\mu\text{m}$)下,沿着各象限的中线从视盘至视网膜的外缘,以 $500\mu\text{m}$ 的间隔计数 RGC。计算整个视网膜、中心视网膜(距视盘 1-1.5mm)和外围视网膜(距视盘 3.5-4mm)的 RGC 的平均密度。RGC 密度的变化用比较相同动物经激光处理的和对侧的对照眼睛的 RGC 丧失百分数表示。

结果表明,在两周、四周和八周的动物中,RGC 分别有约 13%、21%和 25%丧失。因此,我们提出一种具有一致 RGC 死亡的鼠慢性青光眼模型。

使用氯化锂或感光锂化合物治疗青光眼

诱导右眼青光眼,动物接受腹膜内注射锂(LiCl, Sigma, St. Louis, USA; $85\mu\text{g}/\text{kg}$ 在无菌水中)或锂络合物(1) (63.5 或 $6.35\text{mg}/\text{kg}$, 相当于 85 或 $8.5\mu\text{g}/\text{kg}$ LiCl, 在 2ml Sigma C5135 Cremophor、1ml 乙醇和 36ml 无菌水中),每天两次,共 14 天。14 天时处死动物($n = 8/\text{组}$)。在适当的存活时间除去青光眼和对照视网膜,使用上述三种方法处理。如果需要,使用更早的时间点。

视网膜神经节细胞的细胞死亡机理

为了研究凋亡是否为在青光眼模型中细胞死亡的主要机理和 Li 是否会阻碍凋亡,使用 TUNEL 法、DAPI 核染色法和 Cleaved Caspase-3 免疫组织化学来定量评价 RGC 凋亡。准备上述右眼诱导青光眼的鼠。为了研究激光凝固法后的早期情况,在第一次激光后允许动物存活 2、4、8 和 14 天($n = 3/\text{时间点}/\text{组}$)。在适当的存活时间,将动物灌注,除去双眼,并准备石蜡包埋。得到视网膜的径向连续切片($5\mu\text{m}$),相邻切片经处理用于 TUNEL、DAPI 核染色法和 Cleaved Caspase-3 免疫组织化学。结果表明,许多细胞以随时间而变的方式在视网膜神经节细胞层凋亡,在较后期的时间点观察到更多的凋亡细胞。

参考文献

1. Alward M, Driscoll CM 和 Weber SG, “Photochemical Control Of Metal-Ion Binding(金属-离子结合的光化学控制)”, 216th ACS National Meeting, Boston(1998).

2. Birch NJ, *Uses Of Inorganic Chemistry In Medicine(无机化学在医药中的应用)*, Ed:Farrell, N. P. Cambridge, The Royal Society Of Chemistry (1999), 第 11-25 页。

3. Birch NJ, “Inorganic Pharmacology Of Lithium(锂的无机药理学)”, *Chem. Rev.* (1999), 第 99 卷, 第 1659-2682 页。

4. Blank M, Soo LM, Wassermann NH 和 Erlanger BF, “Photoregulated Ion Binding(光调节的离子结合)”, *Science* (1981), 第 214 卷, 第 70-72 页。

5. Cheung ZH, So KF, Lu Q, Yip HK, Wu W, Shan JJ, Pang PK 和 Chen CF, “Enhanced Survival And Regeneration Of Axotomized Retinal Ganglion Cells By A Mixture Of Herbal Extracts(通过草药提取物的混合物增强轴突切开的视网膜神经节细胞的存活和再生)”, *J. Neurotrauma* (2002), 第 19 卷, 第 369-378 页。

6. Cho KS, Chan PM, So KF, Yip HK 和 Chung SK, “Ciliary Neurotrophic Factor Promotes The Regrowth Capacity But Not The Survival Of Intraorbitally Axotomized Retinal Ganglion Cells In Adult Hamsters(睫状神经营养因子促进成年仓鼠的眼眶内轴突切开的视网膜神经节细胞的再生能力而不是存活)”, *Neuroscience* (1999), 第 34 卷, 第 623-628 页。

7. Cho KS, Chung SK, Yip HK 和 So KF, “Differential Effects Of Intravitreal Optic Nerve And Sciatic Nerve Grafts On The Survival Of Retinal Ganglion Cells And The Regeneration Of Their Axons(玻璃体内视神经和坐骨神经移植物对视视网膜神经节细胞的存活及其轴突的再生的不同效果)”, *J. Neurocytol.* (2001), 第 30 卷, 第 983-991 页。

8. Fan M, Yu L, Ming Y, Meng X 和 Zhao W, 中国专利 1158882 (1997)。

9. Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J 和 Sharma S, “Programmed Cell Death Of Retinal Ganglion Cells During Experimental Glaucoma(在实验青光眼过程中视网膜神经节细胞的程序性细胞死亡)”, *Exp. Eye Res.* (1995), 第 61 卷, 第 33-44 页。

10. Ikeda T, Tsutsumi O 和 Wu Y, “Optical Switching And Image Storage By Means Of Photochromic Liquid Crystals(借助于光致变色液晶的光学开关和图像存储)”, *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol., Sect. A*(2000), 第 347 卷, 第 1-13 页。

11. Ishige S, Saeki K 和 Usui H, 美国专利 4,220,356 (1980)。

12. Ji JZ, “Signaling Pathways And Neuroprotection Of Retina Ganglion Cells In A Rat Glaucoma Model(在鼠青光眼模型中视网膜神经节细胞的信号传导途径和神经保护)” (2002), 香港大学, 香港。

13. Ji JZ, Elyaman W, Yip HK, Lee VW, Yick LW, Hugon J 和 So KF, “CNTF Promotes Survival Of Retinal Ganglion Cells After Induction Of Ocular Hypertension In Rats: The Possible Involvement Of STAT3 Pathway(在鼠中诱导眼压过高后 CNTF 促进视网膜神经节细胞存活: 可能包含的 STAT3 途径)”, *Eur. J. Neurosci* (2004), 第 19 卷, 第 265-272 页。

14. Laquis S, Chaudhary P 和 Sharma S, “The Patterns Of Retinal Ganglion Cell Death In Hypertensive Eyes(在高压眼中视网膜神经节细胞死亡模型)”, *Brain Res* (1998), 第 784 卷, 第 100-104 页。

15. Leske MC, “The Epidemiology Of Open-Angle Glaucoma: A Review(开角青光眼的流行病学: 综述)”, *Am. J. Epidemiol.* (1983), 第 118 卷, 第 166-191 页。

16. Levy D, “Recent Applications Of Photochromic Sol-Gel Materials(光致变色溶胶-凝胶材料的近来应用)”, *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol., Sect. A* (1997), 第 297 卷, 第 31-39 页。

17. Loerincz E, Szarvas G, Koppa P, Ujhelyi F, Erdei G, Sueto A, Varhegyi P, Sajti S, Kerekes A, Ujvari T 和 Ramanujam PS, “Polarization Holographic Data Storage Using Azobenzene Polyester As Storage Material(使用偶氮苯聚酯作为存储材料的偏振全息数据存储)”, *Proceedings Of SPIE-The International Society For Optical Engineering* (2003), 第 4991 卷, 第 34-44 页。

18. Lu Q, Cui Q, Yip HK 和 So KF, “c-Jun Expression In Surviving And Regenerating Retinal Ganglion Cells: Effects Of Intravitreal Neurotrophic Supply(视网膜神经节细胞的存活和再生的 c-Jun 表达: 玻璃体内神经营养供给的效果)”, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2003), 第 44 卷, 第 5342-5348 页。

19. Matsui F, Taniguchi H, Yokoyama Y, Sugiyama K 和 Kurita Y, “Application Of Photochromic 5-Dimethylaminoindolylfulgide To Photon-Mode Erasable Optical Memory Media With Non-Destructive Readout Ability Based On Wavelength Dependence Of Bleaching Quantum Yield(光致变色 5-二甲基氨基吡咯基俘精酸酐在基于依赖波长的漂白量子产率具有非破坏性读取能力的光子模式可擦光学存储介质中的应用)”, *Chem. Lett.* (1994), 第 1869-1872 页。

20. Mckinnon SJ, Lehman DM, Tahzib NG, Ransom NL, Reitsamer HA, Liston P, Lacasse E, Li Q, Korneluk RG 和 Hauswirth WW, “Baculoviral IAP Repeat-Containing-4 Protects Optic Nerve Axons In A Rat Glaucoma Model(在鼠青光眼模型中 Baculoviral IAP Repeat-Containing-4 保护视神经轴突)”, *Mol. Ther.* (2002), 第 5 卷, 第 780-787 页。

21. Mittag TW, Danias J, Pohorenec G, Yuan HM, Burakgazi E, Chalmers-Redman R, Podos SM 和 Tatton WG, “Retinal Damage After

3 To 4 Months Of Elevated Intraocular Pressure In A Rat Glaucoma Model(在鼠青光眼模型中眼内压力升高 3-4 个月后视网膜损伤)”，*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2000)，第 41 卷，第 3451-3459 页。

22. Morrison J, Moore C, Deppmeier L, Gold B, Meshul C 和 Johnson E, “A Rat Model Of Chronic Pressure-Induced Optic Nerve Damage(慢性压力诱导的视神经损伤的鼠模型)”，*Exp. Eye Res.* (1997)，第 64 卷，第 85-96 页。

23. Natansohn A 和 Rochon P, “Photoinduced Motions In Azobenzene-Based Amorphous Polymers: Possible Photonic Devices(在偶氮苯基的无定形聚合物中的光诱导作用：可能的光子装置)”，*Adv. Mater.* (1999)，第 11 卷，第 1387-1391 页。

24. Nunzi JM, Charra F, Delysse S, Lefin P 和 Pfeffer N, “Limits Of Use Of Polymer Thin-Films For Spatial Light Modulation(对于空间光调制聚合物薄膜的使用限制)”，*Proceedings Of SPIE-The International Society For Optical Engineering* (1996)，第 2969 卷，第 138-144 页。

25. Osborne NN, Wood JP, Chidlow G, Bae JH, Melena J 和 Nash MS, “Ganglion Cell Death In Glaucoma: What Do We Really Know?(在青光眼中的神经节细胞死亡：我们到底知道些什么?)”，*Br. J. Ophthalmol* (1999)，第 83 卷，第 980-986 页。

26. Quigley HA 和 Green WR, “The Histology Of Human Glaucoma Cupping And Optic Nerve Damage: Clinicopathologic Correlation In 21 Eyes(人青光眼凹陷和视神经损伤的组织学：21 只眼睛中的临床病理学相互关系)”，*Ophthalmology* (1979)，第 86 卷，第 1803-1830 页。

27. Rompotis S, Parissi-Poulou M, Gikas E, Kazanis M, Vavayannis A 和 Panderi I, “Determination Of Valproic Acid In Human Plasma By HPLC With Fluorescence Detection(使用荧光检测通过 HPLC 确定人血浆中的丙戊酸)”，*J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* (2002)，第 25 卷，第 2833-2847 页。

28. Sawada A 和 Neufeld A, “Confirmation Of The Rat Model Of Chronic Moderately Elevated Intraocular Pressure(证实慢性适度升高的眼内压力的鼠模型)”, *Exp. Eye Res.* (1999), 第 69 卷, 第 525-531 页。

29. Shanzer A, Samuel D 和 Korenstein R, “Lipophilic Lithium Ion Carriers(亲脂性锂离子载体)”, *J. Am. Chem. Soc.* (1983), 第 105 卷, 第 3815-3818 页。

30. Shinbo K, Baba A, Kaneko F, Kato T, Kato K, Advincula RC 和 Knoll W, “In Situ Investigations On The Preparations Of Layer-By-Layer Films Containing Azobenzene And Applications For LC Display Devices(原位研究包含偶氮苯的多层薄膜的制备和在 LC 显示器中的应用)”, *Mater. Sci. Eng.* (2002), 第 C22 卷, 第 319-325 页。

31. Shinkai S, Nakaji T, Nishida Y, Ogawa T 和 Manabe O, “Photoresponsive Crown Ethers 1. Cis-Trans Isomerism Of Azobenzene As A Tool To Enforce Conformational Changes Of Crown Ethers And Polymers(感光冠醚 1.偶氮苯的顺-反异构作为增强冠醚和聚合物的构象变化的工具)”, *J. Am. Chem. Soc.* (1980), 第 102 卷, 第 5860-5865 页。

32. Shinkai S, Nakaji T, Ogawa T, Shigematsu K 和 Manabe O, “Photoresponsive Crown Ethers 2. Photocontrol Of Ion Extraction And Ion Transport By A Bis(Crown Ether) With A Butterfly-Like Motion(感光冠醚 2.使用类蝴蝶运动通过双(冠醚)的光控离子萃取和离子传输)”, *J. Am. Chem. Soc.* (1981), 第 103 卷, 第 111-115 页。

33. Siu, A.W., Leung, M.C.P., To, C.H., Siu, F.K.W., Ji, J.Z. 和 So, K-F, “Total Retinal Nitric Oxide Production Is Increased In Intraocular Pressure-Elevated Rats(在眼内压力-升高的鼠中总视网膜一氧化氮的产生增加)”, *Experimental Eye Research* (2002), 第 75 卷, 第 401-406 页。

34. Stauffer MT, Knowles DB, Brennan C, Funderburk L, Lin F-T 和 Weber SG, “Optical Control Over Pb²⁺ Binding To A Crown Ether-Containing Chromene(光学控制 Pb²⁺ 与包含冠醚的色烯的结合)”, *Chem. Commun.* (1997), 第 287-288 页。

35. Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T, Abe H 和 Ozawa H, “Experimental Glaucoma Model In The Rat Induced By Laser Trabecular Photocoagulation After An Intracameral Injection Of India Ink(在前房内注射墨汁后通过激光柱光致凝固法在鼠中诱导的实验青光眼模型)”, *Jpn. M. Ophthalmol.* (1998), 第 42 卷, 第 337-344 页。

36. Woldemussie E, Ruiz G, Wijono M 和 Wheeler LA, “Neuroprotection Of Retinal Ganglion Cells By Brimonidine In Rats With Laser-Induced Chronic Ocular Hypertension(在具有激光-诱导的慢性眼压过高的鼠中通过溴莫尼定神经保护视网膜神经节细胞)”, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2001), 第 42 卷, 第 2849-2855 页。

37. Woldemussie E, Yoles E, Schwartz M, Ruiz G 和 Wheeler LA, “Neuroprotective Effect Of Memantine In Different Retinal Injury Models In Rats(在不同的鼠视网膜损伤模型中美金刚的神经保护效果)”, *J. Glaucoma* (2002), 第 11 卷, 第 474-480 页。

38. Yoon HC, Shin HK, Kim C 和 Kwon YS, “Fabrication Of Azobenzene-Terminated Dendrimers And Application To Photoswitching Devices(偶氮苯封端的树型化合物的制备以及在光学开关装置中的应用)”, *Synth. Mat.* (2003), 第 137 卷, 第 1427-1428 页。

39. You SW, Bedi KS, Yip HK 和 So KF, “Axonal Regeneration Of Retinal Ganglion Cells After Optic Nerve Pre-Lesions And Attachment Of Normal Or Pre-Degenerated Peripheral Nerve Grafts(在视神经预损伤以及连接正常或预退化的外围神经移植物后视网膜神经节细胞的轴突再生)”, *Vis. Neurosci.* (2002), 第 19 卷, 第 661-668 页。

40. Zhang XH, Chen BJ, Lin XQ, Wong OY, Lee CS, Kwong HL, Lee ST 和 Wu SK, “A New Family Of Red Dopants Based On Chromene-Containing Compounds For Organic Electroluminescent Devices(用于有机电致发光器件的基于包含色烯的化合物的一族新型红色掺杂剂)”, *Chem. Mater.* (2001), 第 13 卷, 第 1565-1569 页。

41. Zhang Z, Burns DC, Kumita JR, Smart OS 和 Woolley GA, “A Water-Soluble Azobenzene Cross-Linker For Photocontrol Of Peptide Conformation(用于光控肽构象的水溶性偶氮苯交联剂)”, *Bioconjugate Chem.* (2003), 第 14 卷, 第 824-829 页。

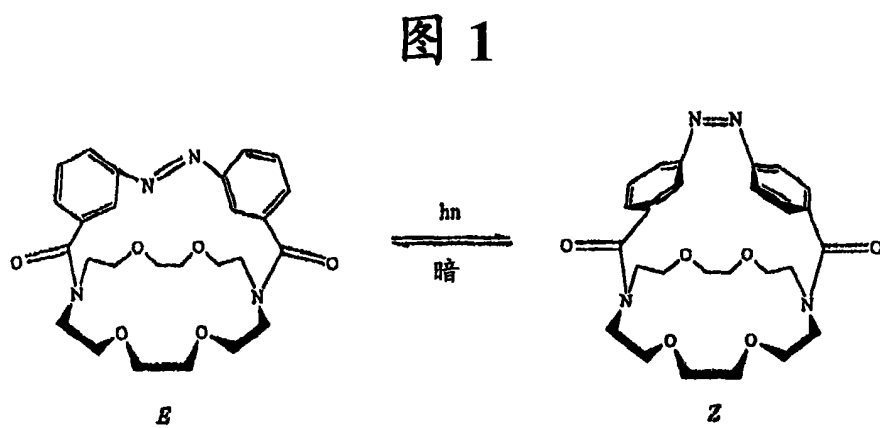
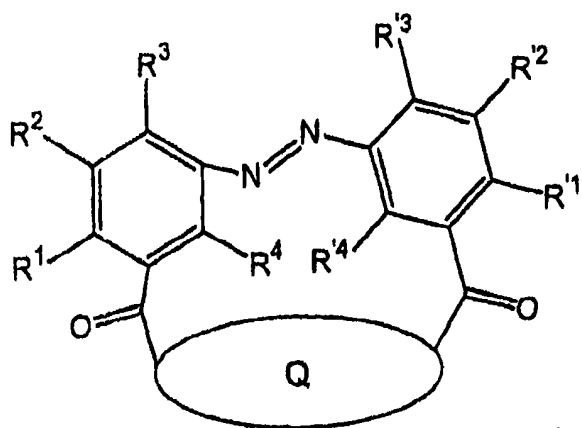
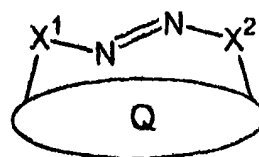


图 2



I



II

图 3

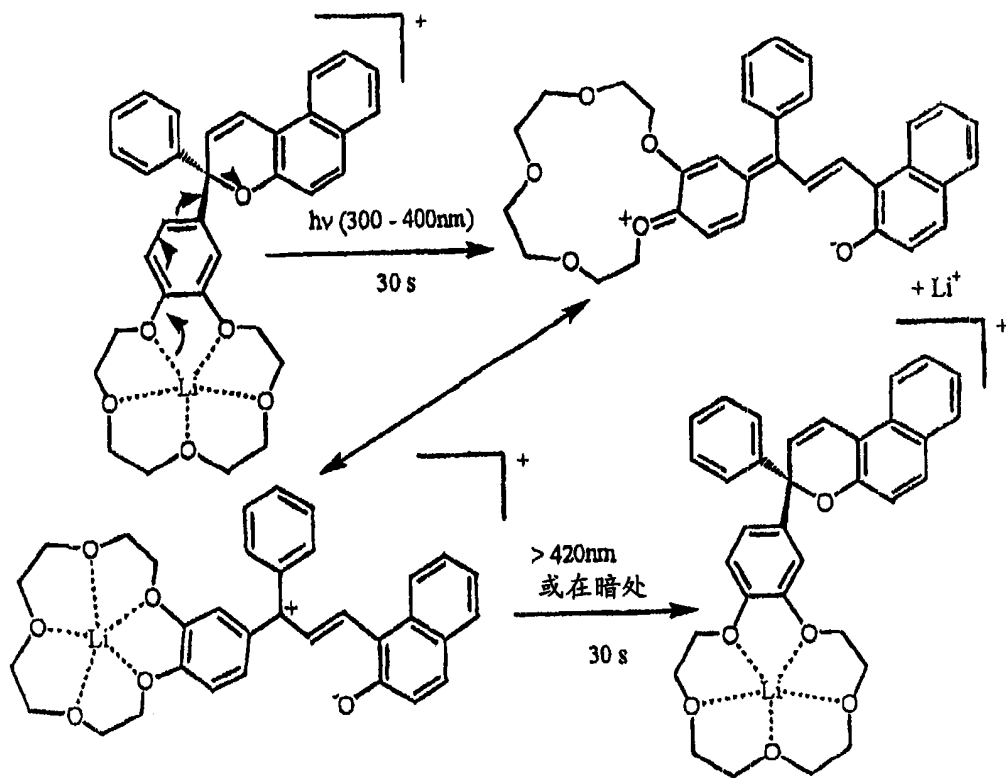


图 4

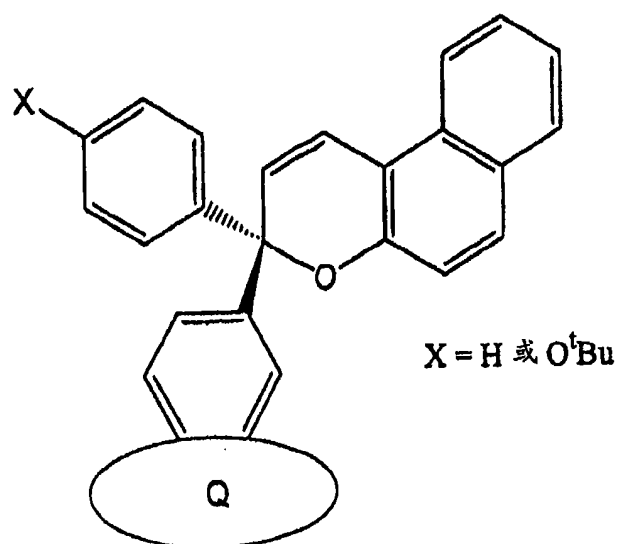


图 5

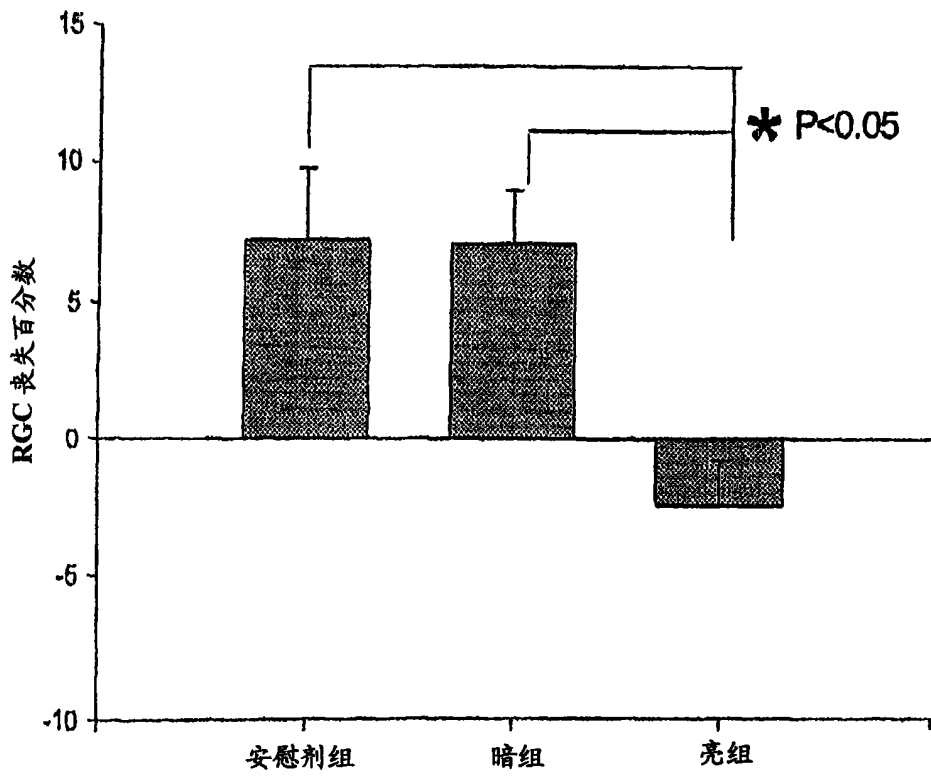


图 6

