



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2187880 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/135 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.04.28
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.12.18
(86)	Europeisk søknadsnr	08830106.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.09.12
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.05.26
(30)	Prioritet	2007.09.12, US, 993379 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	The Trustees of Columbia University in the City of New York, Office Of The General Counsel, 412 Low Library Mail Code 4308 535 West 116th Street, New York, NY 10027, USA
(72)	Oppfinner	WASHINGTON, Ilyas, 29-35 West 119 StreetApt. 61, New York, NY 10026, USA
(74)	Fullmektig	Murgitroyd & Company, 165-169 Scotland Street, GB-G58PL GLASGOW, Storbritannia

(54)	Benevnelse	Sammensetninger og fremgangsmåter for behandling av maculadegenerasjon
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2006 089 411 US-A1- 2007 015 827 WO-A1-02/072528 WO-A1-2005/065669 WO-A1-95/04018 WO-A2-2005/087210 WO-A2-2007/019503 GOLLAPALLI D R ET AL: "The specific binding of retinoic acid to RPE65 and approaches to the treatment of macular degeneration" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, US LNKD- DOI:10.1073/PNAS.0401936101, vol. 101, no. 27, 6 July 2004 (2004-07-06) , pages 10030-10035, XP003023101 ISSN: 0027-8424 RADU ET AL.: 'Treatment with isotretinoin inhibits lipofuscin accumulation in a mouse model of recessive Stargardt's macular degeneration' PNAS vol. 100, no. 8, 15 April 2003, pages 4742 - 4747, XP002590514 TRAVIS G H ET AL: "Diseases Caused by Defects in the Visual Cycle: Retinoids as Potential Therapeutic Agents" ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY, ANNUAL REVIEW INC., PALO ALTO, CA, US LNKD- DOI:10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.47.120505.105 225, vol. 47, 1 February 2007 (2007-02-01), pages 469-512, XP002555339 ISSN: 0362-1642 [retrieved on 2006-09-12] WALKER: 'New/Old Findings on Unique Vitamin E', [Online] 1992, XP008131646 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.enerex.ca/articles/new_old_findings_on_unique_vitamin_e.htm> [retrieved on 2008-12-01]

Sammensetninger og fremgangsmåter for behandling av maculadegenerasjon

OPPFINNELSENS OMRÅDE

- 5 Den foreliggende oppfinnelse angår forbindelser, sammensetninger og anvendelser derav for å saktne lipofuscindannelse/-akkumulering for å behandle eller forbedre en oftalmologisk lidelse, slik som f.eks. maculadegenerasjon uten, eller med reduserte, synsmessige bivirkninger. Den foreliggende oppfinnelse angår nærmere bestemt forbindelser og sammensetninger som kan anvendes til å behandle eller forbedre en oftalmologisk lidelse, slik som f.eks. maculadegenerasjon, ved å saktne eller begrense akkumuleringen av alderspigmenter eller lipofuscin i netthinnens retinale pigmentepitelceller («RPE»-celler). Den foreliggende oppfinnelse angår også sammensetninger til anvendelse i behandling eller forbedring av en oftalmologisk lidelse, slik som f.eks. maculadegenerasjon, hos et pattedyr.

15

BAKGRUNNEN FOR OPPFINNELSEN

- Macula er plassert på baksiden av øyet i netthinnens senter. Når de millioner av celler i dette lyssensitive flerlagsvevet blir dårligere, går sentralsynet tapt sammen med evnen til å utføre gjøremål slik som lesning, skrivning, kjøring og å se farge. Denne «maculadegenerasjon» rammer først og fremst eldre, og har en prevalens på cirka 3% i populasjoner mellom 75-79 år og på cirka 12% i populasjoner over 80 år.(1) I yngre populasjoner opptrer maculadegenerasjon hos individer med genetiske lidelser, slik som Stargardts, vitelliform eller best (VMD), Sorsby fundusdystrofi og malattia leventinese (doyme honeycomb eller dominant radial drusen). Stargardts sykdom er den mest alminnelige form for nedarvet juvenil maculadegenerasjon, idet den rammer cirka 1 av 10 000 barn.

- Det er for tiden ingen terapier tilgjengelige for genetisk eller tørr (ikke-neovaskulær) aldersrelatert maculadegenerasjon. I noen kliniske studier har vitamintilskudd, slik som antioksidanter, og kostholdsendringer, slik som fettfattig kosthold, vist seg å saktne sykdomsutviklingen. For flertallet av pasienter etterfølges imidlertid diagnosen av et progressivt tap av sentralsyn.(2-4)

- De ovenfor angitte maculadystrofier kjennetegnes alle av akkumuleringen av lipofuscin, fluorescerende opphopninger, i det retinale pigmentepitelcellelag (RPE-cellelag) (5-11). De eneste forbindelser som har blitt karakterisert som å stamme fra RPE-lipofuscin, A2E (N-retinyliden-N-retinyletanolamin) og ATR-dimer (all-*trans*-retinaldimer), er avledet fra reaksjoner av all-*trans*-retinal, en isomer av 11-*cis*-retinal, synspigmentenes kromofor (12, 13). Disse toksiske retinale dimere har vist seg å forårsake RPE-celledød, som menes å føre

til degenerasjon av fotoreseptorceller samt synstap (2, 14-22). Å saktne synssyklusen under anvendelse av RPE 65-antagonister (23-25) eller ved å forsinke leveringen av A-vitamin (retinol) til RPE-et ved hjelp av f.eks. å begrense kostinntaket av A-vitamin (26) eller ved å blokkere retinolbindende proteiner i serum (27) har vist seg hos dyremodeller å hindre RPE-lipofuscindannelse eller sette den ut av kraft. Omvendt fører økning av mengden av all-*trans*-retinal i ytre segmenter, slik som finner sted med mutasjonene i *abcr*^{-/-} (årsak til recessiv Stargardts sykdom), til hurtig akkumulering av lipofuscinpigmenter (8).

Det ovenfor anførte bevis fører frem til konklusjonen at lipofuscin og/eller A2E og ATR-dimer i RPE-celler kan nå nivåer som bidrar til et fall i cellefunksjon etterfulgt av synstap, og at A-vitamin spiller en viktig rolle i okular lipofuscindannelse. (28)

Det har vist seg at atskillige A-vitamin-analoger begrenser lipofuscindannelse i en musemodell ved å saktne synssyklusen. ABCR^{-/-}-musemodellen har blitt anvendt til å teste tilnærmingsmåter for begrensning av RPE-lipofuscindannelse. Mus som mangler ABCR (også kjent som ABCA4)-genet som koder en fotoreseptorspesifikk adenosintrifosfat (ATP)-bindende kassett-transportør, mangler evnen til på riktig måte å transportere A-vitamin (i form av retinal) i øyet. ABCR^{-/-}-mus ble utviklet som en dyremodell av human recessiv Stargardts sykdom (8). Som hos mennesker med recessiv Stargardts sykdom, akkumulerer ABCR^{-/-}-mus store opphopninger av lipofuscin i RPE-cellene i øynene, som vist i fig. 1, og opplever etterhvert forsinket mørketilpasning. Lipofuscinakkumulering og synstap som observeres i denne musemodellen, antas også å være relevant for aldersrelatert maculadegenerasjon (AMD) og andre maculadystrofier.

I bestrebelser på å saktne synssyklusen har synssyklusenzymer blitt utsett. I slike tilnærmingsmåter har små molekyler blitt foreslått som antagonisert for synssyklusenzymer. I denne metodologien binder legemidlet (ofte et A-vitamin-derivat) seg til synssyklusproteiner, hvilket blokkerer proteinenes delaktighet i synssyklusen og saktner synssyklusen. En annen tilnærmingsmåte for å saktne synssyklusen innbefatter å hindre leveringen av A-vitamin fra blodet til øyet.

Legemiddelkandidater for å inhibere lipofuscindannelse ved å saktne synssyklusen har blitt evaluert ut fra deres evne til å bevirke forsinket mørketilpasning (en bivirkning av en forringet synssyklus) og deres evne til å hindre den aldersrelaterte akkumulering av lipofuscin i øyet som målt ved konsentrasjonen av A2E og andre biprodukter av synssyklusen, f.eks. ATR-dimer. Eksempler på slike legemiddelkandidater og deres tilsvarende virkningsmåter for å saktne synssyklusen, er sammenfattet nedenfor:

- 13 *cis*-retinsyre (Accutane eller isotretinoin) er antatt å inhibere enzymene 11-*cis*-retinoldehydrogenase og RPE65 som er involvert i synssyklusen.(19, 24) Når administrert har 13 *cis*-retinsyre vist seg å bevirke forsinket mørketilpasning. Når 3 måneder gamle ABCR-knockout-mus (n=3) fikk administrert 13-*cis*-retinsyre ved 40 mg/kg/dag i én måned, fremviste musene et fall i A2E-dannelse på cirka 40-50% sammenlignet med kontrollgruppe ABCR-knockout-mus (n=3).(24) Videre, når 2 måneder gamle ABCR-knockout-mus fikk administrert 13-*cis*-retinsyre ved 20 mg/kg/dag i to måneder, fremviste musene også et fall i lipofuscindannelse i RPE-cellelaget som bedømt ved elektronmikroskopi.
- 10 (12E,16E)-13,17,21-trimetyldocosa-12,16,20-trien-11-on (TDT) antas å inhibere RPE65.(23) Når TDT administreres til mus, observeres forsinket mørketilpasning. Når 2 måneder gamle ABCR-knockout-mus (n=2) fikk administrert TDT ved 50 mg/kg/to ganger i uken i to måneder, fremviste de et fall i A2E-dannelse på cirka 50-85% sammenlignet med kontrollgruppe ABCR-knockout-mus (n=2).(23)
- 15 (2E,6E)-N-heksadekyl-3,7,11-trimetyldodeca-2,6,10-trienamin (TDH) antas også å inhibere RPE65, og bevirker, når gitt til mus, forsinket mørketilpasning.(23) Når 2 måneder gamle ABCR-knockout-mus (n=2) fikk administrert TDH ved 50 mg/kg to ganger i uken i to måneder, fremviste de et fall i A2E-dannelse på cirka 50% sammenlignet med kontrollgruppe ABCR-knockout-mus (n=2).(23)
- 20 All-*trans*-retinylamin (Ret-NH₂) antas å inhibere RPE65, og resulterer, når administrert til mus, i alvorlig forsinket mørketilpasning. Når 1 måned gamle ABCA4-knockout-mus ble gitt Ret-NH₂ ved 40 mg/kg to ganger i uken i to måneder, fremviste de et fall i A2E-dannelse på cirka 50% sammenlignet med kontrollgruppe ABCA4-knockout-mus.(25)
- 25 N-(4-hydroksyfenyl) retinamid (fenretinid) saktner innstrømmingen av retinol til øynene ved å redusere nivåene av A-vitamin bundet til retinolbindende protein i serum. Behandling med fenretinid senker således nivåene av A-vitamin i øyet, hvilket fører til forsinket mørketilpasning. Når 2 måneder gamle ABCA4-knockout-mus (n=3) fikk administrert fenretinid ved 20 mg/kg/dag i én måned, fremviste de et fall i A2E-dannelse på cirka 40-50% sammenlignet med kontrollgruppe ABCA4-knockout-mus (n=3).(27)
- 30 Nylig foreslåtte behandlingsmessige tilnærmingsmåter for å begrense lipofuscindannelse er således basert på å saktne synssyklusen (1, 10, 11, 12). Det finnes imidlertid ulemper knyttet til å saktne synssyklusen som et middel for å hindre lipofuscindannelse i den hensikt å forebygge f.eks. maculadegenerasjon. Det blir redegjort for fire av disse ulempene nedenfor.

En umiddelbar ulempe ved å saktne synssyklusen er at det fører til forsinket mørketilpasning og dårlig syn i dempet belysning eller om natten. Dårlig nattesyn (skotopisk dysfunksjon) er allerede en funksjonell markør for tidlig aldersrelatert maculopati (ARM), og har blitt knyttet til forekomsten av fall og kjøretøykollisjoner. (29, 30) Det forventes at en ytterligere saktning av synssyklusen vil gjøre nattesynet dårligere hos pasienter som allerede lider av dårlig nattesyn.

For det andre, for å hindre lipofuscindannelse i tilstrekkelig grad vil man måtte saktne synssyklusen i en langvarig tidsperiode. Men langvarig saktning av synssyklusen fører til fotoreseptor-celledød og synstap. (31, 32) Svekkelse av synssyklusen er faktisk årsaken til en rekke retinasykdommer, slik som Stargardts sykdom, retinitis pigmentosa, Lebers kongenitale amaurose, fundus albipunctatus, aldersrelatert maculadegenerasjon og stasjonær medfødt nattblindhet.

For det tredje anvender den ovennevnte metodologi ofte A-vitamin-analoger for å hemme proteiner som er involvert i A-vitamin-prosessering i øyet. A-vitaminanaloger med ulike strukturer, farmakologiske profiler, reseptoraffiniteter og biologiske aktiviteter har imidlertid vist seg å være toksiske. I eksperimentelle dyremodeller, cellemodeller, epidemiologiske data og kliniske utprøvinger har det faktisk vist seg at tallrike A-vitaminanaloger inhiberer eller forsinket ulike biologiske funksjoner slik som for eksempel benvekst, reproduksjon, celledeling, celledifferensiering og regulering av immunsystemet. (33-37). Inhibering av A-vitamin-prosessering i øyet forventes således også å forsinke noen av disse grunnleggende kroppsfunksjonene, hvilket kan føre til signifikante uønskede bivirkninger.

Eksempelvis har A-vitamin-analoger som for tiden anvendes til å behandle visse kreftformer og/eller psoriasis, slik som f.eks. beksaroten (Targretin), etretinat (Tegison), acitretin (Soriatane), fenretinid (*N*-(4-hydroksyfenyl) retinamid eller 4-HPR) og 13 *cis*-retinsyre (Accutane eller isotretinoin) bivirkninger som innbefatter f.eks. tørr nese, neseblødninger, sprukne lepper, munnsår, økt tørste, sår tunge, blødende tannkjøtt, tørr munn, forkjølelsessår, tørre eller irriterte øyne, tørr hud, avskallende eller flassende hud, hårtap, lett oppstående blåmerker, muskelsmerter, kvalme, omgangssyke, hoste eller oppsvulmede hender eller føtter, synsproblemer, brystsmerte, tetthet i brystet, unormal puls, svimmelhet, oppkast, alvorlig hodepine og gulning av øyne/hud (gulsott). (38-40)

For det fjerde, i dyremodeller har kandidatlegemidler med henblikk på å begrense lipofuscindannelse vist seg å være effektive kun i relativt store doser. Eksempelvis anvender studier på musemodeller typisk omkring 11-40 mg/kg/dag. Men aktuelle A-vitamin-analoger anvendes typisk på klinikken i doser på 1-3 mg/kg/dag for å minimere bivirkninger. Større

doseringsregimer vil føre til økte bivirkninger.

Eksempelvis anvendes for tiden fenretinid (*N*-(4-hydroksyfenyl) retinamid eller 4-HPR) til å behandle kreft, og kliniske utprøvinger for AMD er under utførelse. De vanligste bivirkninger rapportert blant 1432 pasienter som gjennomgikk behandling med dette legemiddel ved en dose på 200 mg/dag i en femårsperiode, var: svekket mørketilpasning, kumulativ insidens (16%) og dermatologiske lidelser (16%). Mindre vanlige virkninger var gastrointestinale symptomer (8%) og lidelser i den okulære overflate (8%).(41) Ved denne relativt lave dose ble en forsinkelse i mørketilpasning, en vurdering av et legemiddels effektivitet med hensyn til å hindre lipofuscindannelse, kun observert hos 16% av pasientene. I en annen studie hvor pasientene fikk administrert større orale doser på 600 eller 900 mg/m² bid i 6-ukerssykluser, ble milde til moderate bivirkninger rapportert hos 43 (95%) av de 45 pasientene, noe som muligvis var knyttet til fenretinid. Disse bivirkningene innbefattet: tretthet, hodepine, hudendringer (tørr hud, pruritt og rash) og fordøyelseskanalsymptomer (magesmerter, kramper, diaré, stomatitt og munntørrehet). Grad 2 toksisiteter rapportert som muligvis forbundet med fenretinid-behandling, innbefattet anfall og konfusjon.(42)

En pasient med et anaplastisk astrocytom som hadde mottatt behandling med fenretinid ved dosen på 600 mg/m² bid i én syklus, fremviste hodepine, kvalme og oppkast, og viste seg å ha en liten intrakranial blødning i basalganglier-området. Han restituerte uten mangler og fortsatte behandling uten ytterligere hendelser. En annen pasient, som også gjennomgikk behandling ved 600 mg/m² bid-doseringen, og mottok oral antikoagulasjon med warfarin for dyp venetrombose, døde etter å ha utviklet en ukontrollerbar neseblødning (internasjonalt normalisert ratio (INR) > 6,0). Av de fire pasientene som ble behandlet ved dosen på 900 mg/m² bid, hadde én grad 3-oppkast, grad 2 talevansker og grad 1 hukommelsessvikt, hvilket ble bedre uten restsymptomer.(42)

En typisk dose 13 *cis*-retinsyre (Accutane eller isotretinoin) for behandling av akne er 0,5 til 1 mg/kg/dag for barn og 2,0 mg/kg/dag for voksne i fjorten dager etter hverandre, etterfulgt av en pause på 14 dager. Dette tjueåtte dager lange forløpet gjentas vanligvis ytterligere fem ganger.(40) Disse doser er cirka 10 til 80 ganger mindre enn det som ble anvendt hos mus for å hindre A2E-dannelse.(24) For større doser 13 *cis*-retinsyre anvendt for å behandle kreft, innbefattet bivirkninger som oppsto hos mer enn 30% av brukerne, hodepine, feber, tørr hud, tørre slimhinner (munn, nese), bensmerte, kvalme og oppkast, rash, munnsår, kløe, svetting og synsendringer.(43, 44)

Bivirkninger som oppstod hos 10-29% av brukere av 13 *cis*-retinsyre innbefatter ryggsmerte, smerter i muskler og ledd, allergiske reaksjoner, magesmerter, dårlig appetitt, svimmelhet,

døsighet, søvnløshet, angst, nummenhet og prikking i hender og føtter, svakhet, depresjon, hårtap (fortynning), tørre øyne, sensitivitet for lys (se øyeproblemer), redusert nattesyn, som kan vedvare etter at behandlingen er stanset, oppsvulming av føtter eller ankler, og lav blodprosent.(44) I tillegg har det blitt observert at hvite og røde blodceller og blodplater kan

5 minskes midlertidig, hvilket kan gjøre pasienten mer utsatt for infeksjon, anemi og/eller blødning. Bivirkninger innbefattet også abnorme blodprøver: økte triglyserid-, kolesterol- og/eller blodsukknivåer.

De ovennevnte ulempene gjør saktning av synssyklusen til en vanskelig metodologi å tilpasse

10 alene for den kliniske behandling av oftalmologiske lidelser, f.eks. maculadegenerasjon.

I WO 2007/019503 beskrives at et legemiddel kan anvendes i fremstillingen av et medikament for behandlingen eller forebyggingen av en oftalmologisk lidelse, hvor legemidlet inhiberer, antagoniserer eller kortslutter synssyklusen på et trinn i synssyklusen som finner

15 sted utenfor en stavfotoreseptorcelles plate.

I WO 2005/087210 beskrives forbindelser som er i stand til å inhibere synssyklusen og/eller mørketilpasningen og deres anvendelse for behandling og forebygging av ikke-degenerative retinasykdommer, med særlig vekt på forebyggingen og behandlingen av diabetisk retinopati,

20 retinopati hos premature (ROP), grenarterieokklusjon (BRVO), sentralarterieokklusjon (CRVO), åpenvinkelglaukom, neovaskulært glaukom og andre lidelser i netthinnenerven og/eller den optiske nerve, hvor en ubalanse mellom metabolsk etterspørsel og blodtilførsel bidrar til utviklingen av vevsskade.

25 **KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN**

Følgelig ville det være fordelaktig å tilveiebringe behandlinger for oftalmologiske lidelser, f.eks. maculadegenerasjon, hvilke behandlinger ikke har, eller begrenser, én eller flere de ovenfor sammenfattede bivirkningene. Nærmere bestemt ville det være fordelaktig å

30 tilveiebringe forbindelser, sammensetninger og fremgangsmåter for å hindre eller stanse akkumuleringen av lipofuscin eller alderspigmenter i RPE-cellene i retina uten å saktne, eller saktne minimalt, synssyklusen.

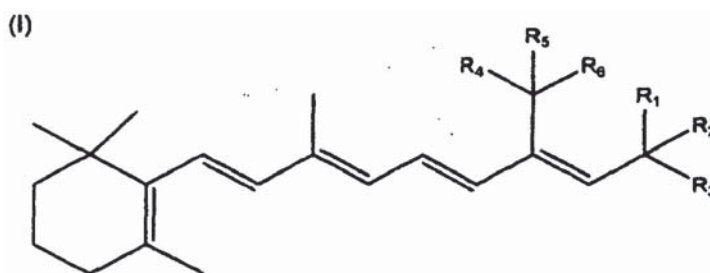
I dette henseende er én utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse en sammensetning ifølge formel I for anvendelse i å forsinke dannelsen av et lipofuscinpigment i

35 retina. Et substituert C₂₀-retinoid kan anvendes i en mengde som er tilstrekkelig for å redusere akkumulering av et lipofuscinpigment i retina.

En annen utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse er en sammensetning ifølge formel I for anvendelse i behandling eller forbedring av virkningene av en lidelse som er karakterisert ved en akkumulering av et lipofuscinpigment i en retina.

- 5 En ytterligere utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse er en sammensetning ifølge formel I for anvendelse i å forsinke eller forebygge dannelse av A2E. Denne anvendelse innbefatter fortrinnsvis trinnet av å skifte ut et all-*trans*-retinal (ATR)-substrat med et C₂₀-D₃-retinoids substrat under betingelser som er tilstrekkelige for å hindre dannelsen av A2E.
- 10 En ytterligere utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse er en sammensetning for anvendelse i å forsinke dannelse av et lipofuscinpigment i retina, hvilken sammensetning inneholder et substituert C₂₀-retinoid ifølge formel I og farmasøytisk akseptabel bærer.

- En ytterligere utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en sammensetning som omfatter en
- 15 farmasøytisk akseptabel bærer og en forbindelse ifølge formel I:



hvor:

- R₁ er okso eller H;
- R₂ er H eller ingenting;
- 20 R₃ er hydroksy eller okso eller CHR₇¹, hvor R₇ danner et karotenoid, og
- R₄, R₅ og R₆ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av ¹H, ²H, ³H, halogen og C₁₋₈-alkyl, hvor R₄, R₅ og R₆ er ikke hver ¹H.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

25

- Fig. 1 viser HPLC- og UV-vis-profiler av lipofuscinpigmenter ekstrahert fra «eyecups» (seks av dem minus retina) fra 5,5-6 måneder gamle ABCR^{-/-}-mus. Lipofuscinpigmenter slik som A2E og ATR-dimer, representert ved toppunkter 2, 3 og 4 har blitt karakterisert og er avledet fra all-*trans*-retinal. Andre lipofuscinpigmenter, slik som toppunkter 1 og 5, er også avledet fra
- 30 all-*trans*-retinal, imidlertid har de ikke blitt fullstendig karakterisert. De ovennevnte pigmenter finnes også hos mennesker og antas å bidra til maculadegenerasjon.

¹ O.a. Skal muligvis være =CHR₇. Oversatt i henhold til kildetekst.

Fig. 2 er et reaksjonsskjema som viser biosyntesen av A2E og ATR-dimer fra all-*trans*-retinal og et biologisk amin.

Fig. 3A viser HPLC-profiler av reaksjonsblandinger av C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal og all-*trans*-retinal med etanolamin for dannelsen av A2E. Fig. 3B er en utvidet visning av fig. 3A. A2E-dannelse ble overvåket over tid ved å måle tilsynekomsten av toppunkter startende ved cirka 15 min. Begge HPLC-traser ble målt cirka 30 timer inn i reaksjonene. For all-*trans*-retinal hadde en betydelig mengde A2E dannet seg, så vel som en uidentifisert forbindelse med en retensjonstid på cirka 14,5 min, som vist i den utvidede visning. På den annen side er A2-dannelse for C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal mye langsommere, og toppunktet ved 14,5 min er nesten fraværende. Fig. 3C er et plott av A2E-dannelse over tid for de ovennevnte reaksjonene. C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal danner A2E omkring 7 ganger langsommere enn all-*trans*-retinal.

Fig. 4 viser HPLC-profiler av reaksjonsblandinger av C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal (A) og all-*trans*-retinal (B) med prolin for dannelsen av ATR-dimer. ATR-dimer-dannelse ble overvåket over tid ved å måle tilsynekomsten av toppunkter startende ved cirka 8 min. Begge HPLC-traser ble målt cirka 1 time inn i reaksjonene. For all-*trans*-retinal hadde en betydelig mengde ATR-dimer dannet seg. På den annen side er ATR-dimer-dannelse for C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal mye langsommere. Fig. 4C er et plott av ATR-dimer-dannelse over tid for de ovennevnte reaksjonene. C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal danner A2E omkring 14 ganger langsommere enn all-*trans*-retinal.

Fig. 5 viser HPLC-profiler for lipofuscinpigmenter ekstrahert fra eyecups (seks av dem minus retina) fra 5,5-6 måneder gamle ABCR^{-/-}-mus alet opp på en diett av enten retinolacetat (trase A (fig. 5A)) eller C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat (trase B (fig. 5B)). Mus alet opp på retinolacetat, utviser betydelig akkumulering av lipofuscinpigmenter som vist av HPLC-toppunktene. På den annen side var lipofuscinpigmenter ikke-detekterbare i mus som var alet opp på C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat-dietten. Fig. 5C viser plotter av totale retinol- og retinolester- eller D₃-retinol- og D₃-retinolesterkonsentrasjoner i de ovennevnte mus som var alet opp på henholdsvis enten retinolacetat- eller C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat-dietten. Begge grupper hadde omtrent den samme mengden retinol i øyet på tross av at de hadde forskjellige konsentrasjoner av lipofuscinpigmenter.

Fig. 6 viser elektronmikrografer av RPE-lag fra 5,5-6 måneder gamle ABCR^{-/-}-mus alet opp på en diett av enten retinolacetat (fig. 6A og 6B) eller C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat (fig. 6C og 6D). På grunn av usikkerheten i å skjelle lipofuscin fra melaninlegemer. Sammenligninger ble gjort mellom antallet av alle mørke, elektrontette legemer funnet i RPE-et mellom mus på retinolacetatdietten i forhold til de på C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetatdietten. I tillegg til de

elektrontette lipofuscin- og melaninlegemer er RPE-fagosomer, mitokondria og lipiddråper er også til stede, men var ultrastrukturelt distinkte. Mus som var alet opp på C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat-dietten, har betydelig mindre elektrontette legemer (dvs. lipofuscinlegemer) sammenlignet med mus alet opp på retinolacetatdietten.

5

Fig. 7A viser total A2E som målt ved HPLC-toppunktområde på 445 nm, for rotter (tre hunner per gruppe) behandlet/alet opp på enten retinal, C₂₀-D₃-retinal, retinal pluss fenretinid (FEN) eller retinal pluss TDH. Dyr behandlet med retinal hadde den største mengde A2E-lipofuscin (normalisert til 100%). Dyr behandlet med C₂₀-D₃-retinal eller retinal pluss fenretinid eller RPE65-antagonisten TDH, fremviste derimot mindre A2E-lipofuscin. Fig. 7B viser at alle fire grupper av dyr hadde omtrent den samme mengde øyeretinol. Fig. 7C viser at nivåene av all-*trans*-retinal i øyet hadde økt i C₂₀-D₃-retinal-gruppen.

10

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

15

I den foreliggende oppfinnelse er det drøfting av fremgangsmåter for å saktne lipofuscindannelse, hvilke fremgangsmåter ikke setter sin lit til å saktne synssyklusen eller små molekyler som inhiberer synssyklusen (dvs. synssyklusantagonister). Mange av ulempene, slik som forsinket mørketilpasning, ikke-dannet synspigment, som kan føre til synshemming og synstap, høye legemiddeldoser og de potensielle uønskede bivirkninger av tidligere fremgangsmåter, unngås således.

20

Nærmere bestemt drøftes fremgangsmåter for selektivt å skifte ut atomer på A-vitamin i den hensikt å hemme dets iboende reaktivitet til å danne A-vitamin-avledede lipofuscinpigmenter, slik som A2E og ATR-dimer, idet den kjemiske struktur til A-vitamin samtidig bevares, slik at deltakelsen i synssyklusen (binding til synssyklusproteiner) forstyrres minimalt. Fordi slike endringer i A-vitaminets struktur ikke forstyrrer normal A-vitamin-metabolisme eller -funksjon, er én av de praktiske nyttene ved den foreliggende oppfinnelse at mange potensielle bivirkninger unngås. Videre, fordi forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse (beskrevet mer detaljert nedenfor) ikke kjemper med naturlige retinoider om proteinbinding (f.eks. fordi de kan utføre naturlige retinoiders arbeid), kreves mindre doser for behandling av f.eks. maculadegenerasjon, sammenlignet med tidligere behandlinger som anvender f.eks. synssyklusantagonister.

30

I den foreliggende oppfinnelse, når C₂₀-hydrogenatomene i all-*trans*-retinoider skiftes ut med fluoratomer (F₃), elimineres dannelsen av A2E, som målt ved overvåkning av forsvinningen av C₂₀-F₃-all-*trans*-retinal og fraværet av den tilsvarende fluoriserte A2E ved HPLC. A2E og ATR-dimeren antas å dannes *in vivo* ved en flertrinnsreaksjonssekvens som involverer to

35

molekyler av all-*trans*-retinal, som vist i fig. 2. I det første trinn kondenserer all-*trans*-retinal med et biologisk amin for å danne iminet. Dette imin antas deretter å gjennomgå et [1,5] hydrogenshift som involverer et hydrogenatom ved karbon C₂₀ (trinn 2). Etterfølgende reaksjon (trinn 3) med et annet molekyl av retinal enten ved 1,2- eller 1,4-addisjon etterfulgt av sykliseringer (trinn 4) gir henholdsvis A2E eller ATR-dimerprekursorer. A2E dannes etterfølgende etter spontan oksidasjon i luft, og ATR-dimer etter eliminasjon (trinn 4).

Det har vist seg at å skifte ut visse C-H-bindinger med C-F-bindinger i retinal (dvs. C₂₀-F₁₋₃-retinal) hemmer reaktiviteten til all-*trans*-retinal, og saktner eller eliminerer således dannelsen av A2E *in vitro*. Ved å skifte ut hydrogenatomer ved C₂₀ med fluor, blokkeres [1,5]-hydrogenshift-trinnet. Følgelig forventes C₂₀-F₁₋₃-retinal å saktne A2E og ATR-dimerbiosyntese merkbart.

En liten endring i reaksjonshastigheten til all-*trans*-retinal for å danne dets toksiske dimerer, forventes å translateres til et stort fall i RPE-lipofuscindannelse over en levetid. De heri drøftede fremgangsmåter vil saktne dannelsen av de toksiske pigmenter og vil ikke saktne (eller vil ikke saktne vesentlig) synssykluskinetikk, fordi regenerasjonen av 11-*cis*-retinal ikke involverer å bryte C₂₀-hydrogenbindingen. Behandling med et C₂₀-F₁₋₃-retinoid (som kan omdannes til C₂₀-F₁₋₃-retinal i kroppen) vil derfor være særlig nyttig i å hindre lipofuscindannelse hos mennesker som lider av Stargardts sykdom eller andre lidelser eller tilstander som er forbundet med lipofuscindannelse og/eller maculadegenerasjoner.

C₂₀-D₁₋₃-retinoid ifølge den foreliggende oppfinnelse vil også være nyttig som en behandlingsform for å behandle eller forbedre maculadegenerasjon, uten uønskede (eller i det vesentlige uønskede) synseffekter. Når C₂₀-hydrogenatomer skiftes ut med deuteriumatomer, er A2E-dannelse omkring sju ganger langsommere (fig. 3) og ATR-dimerdannelse omkring 15 ganger langsommere (fig. 4). Denne kinetiske isotopeffekt vil saktne A2E og ATR-dimer-dannelse *in vivo*. Deuterert A-vitamin er bredt anvendt i mennesker og utviser ingen toksisitet (45, 46). En behandling som anvender et C₂₀-D₁₋₃-retinoid bør således være en effektiv og ikke-toksisk behandlingsform for å behandle eller forbedre maculadegenerasjon uten uønskede bivirkninger.

I betraktning av det foregående er én utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse en sammensetning ifølge krav 1-6 for anvendelse i å forsinke dannelsen av et lipofuscinpigment i retina. Denne anvendelse kan innbefatte å administrere til en pasient som har behov for det, et substituert C₂₀-retinoid i en mengde som er tilstrekkelig til å redusere akkumulering av et lipofuscinpigment i retinaen. Det foretrekkes at det substituerte C₂₀-retinoid er valgt fra gruppen bestående av et C₂₀-D₁₋₃-retinoid og et C₂₀-F₁₋₃-retinoid. Det foretrekkes at

lipofuscinpigmentet er valgt fra gruppen bestående av A2E, all-*trans*-retinoid (ATR)-dimer, og kombinasjoner derav.

Det foretrekkes at det substituerte C₂₀-retinoid er del av en farmasøytisk eller nutrasøytisk sammensetning. Det foretrekkes at det substituerte C₂₀-retinoid er en enhetsdoseringsform.

I den foreliggende oppfinnelse kan pasienten være et pattedyr, fortrinnsvis et menneske. I denne utførelsesform er det substituerte C₂₀-retinoid en forbindelse eller kombinasjon av forbindelser beskrevet heri, fortrinnsvis forbindelser ifølge formel I, herunder formel Ic-le og formel II, som er definerte nedenfor.

I denne utførelsesform vil en mengde som er tilstrekkelig til å redusere akkumulering av et lipofuscinpigment i retinaen, variere fra pasient til pasient og det bestemte substituerte C₂₀-retinoid som anvendes. En slik mengde vil typisk være cirka 0,05 til cirka 300 mg/dag, herunder f.eks. 0,5-50, 1-25, og 3-10 mg/dag.

En annen utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse er en sammensetning ifølge krav 1-6 for anvendelse i behandling eller forbedring av virkningene av en oftalmologisk lidelse, slik som f.eks. en sykdom karakterisert ved en akkumulering av et lipofuscinpigment i en retina. Denne anvendelse kan innbefatte å administrere til en pasient som har behov for det, et substituert C₂₀-retinoid i en mengde som er tilstrekkelig til å redusere akkumulering av et lipofuscinpigment i retinaen. Det foretrekkes at det substituerte C₂₀-retinoid er valgt fra gruppen bestående av C₂₀-D₁₋₃-retinoider og C₂₀-F₁₋₃-retinoider. Det foretrekkes at lipofuscinpigmentet er valgt fra gruppen bestående av A2E, ATR-dimer, og kombinasjoner derav.

Det foretrekkes at det substituerte C₂₀-retinoid er del av en farmasøytisk eller nutrasøytisk sammensetning. Det foretrekkes at det substituerte C₂₀-retinoid er en enhetsdoseringsform.

I denne utførelsesform kan sykdommen være valgt fra gruppen bestående av Stargardt, Vitelliform eller Bests (VMD), Sorsby fundusdystrofi, aldersrelatert maculadegenerasjon og malattia leventinese. Det foretrekkes at sykdommen er maculadegenerasjon.

Et administrasjonstrinn kan innbefatte å skifte ut en komponent i pasientens diett som inneholder retinoid(er) eller A-vitamin, med en komponent som inneholder et substituert C₂₀-retinoid. Ved å «skifte ut en komponent i en pasients diett» skal det forstås at en del av dietten som inneholder A-vitamin eller dets prekursorer (herunder, men ikke begrenset til, karotenoider), skiftes ut med en komponent som inneholder et substituert C₂₀-retinoid. Det

foretrekkes at cirka 1% til cirka 95%, herunder f.eks. fra cirka 5-75%, 10-50% eller 20-30% av retinoidet/retinoidene i pasientens diett skiftes ut med et substituert C₂₀-retinoid. Utskiftningen kan skje gjennom f.eks. å administrere substituerte C₂₀-retinoidinnholdende næringsmidler eller gjennom behandling med sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelse,

5 herunder farmasøytika eller nutrasøytika, i stedet for å konsumere retinoid- eller A-vitamin-inneholdende næringsmidler som ellers ville ha blitt konsumert.

En ytterligere utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse er en sammensetning for å forsinke dannelse av et lipofuscinpigment i retina, hvilken sammensetning inneholder et

10 substituert C₂₀-retinoid og en farmasøytisk akseptabel bærer. Det foretrekkes at det substituerte C₂₀-retinoid velges fra gruppen bestående av C₂₀-D₁₋₃-retinoid og C₂₀-F₁₋₃-retinoid. Det foretrekkes at sammensetningen er i en enhetsdoseringsform. Det foretrekkes at sammensetningen er et vitamintilskudd eller en farmasøytisk formulering.

15 En ytterligere utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse er en sammensetning ifølge krav 1-6 for anvendelse i å forsinke dannelse av et lipofuscinpigment, valgt fra gruppen bestående av et A2E, en ATR-dimer, og kombinasjoner derav. Denne fremgangsmåte omfatter å skifte ut et all-*trans*-retinal (ATR)-substrat med et C₂₀-D₃-retinoids substrat under betingelser som er tilstrekkelige til å hindre dannelsen av A2E, ATR-dimer, eller begge, eller

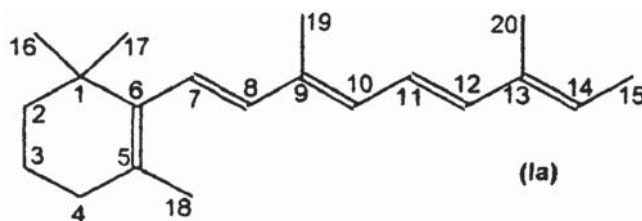
20 et A2E- og/eller et ATR-dimer-derivat. Som anvendt i den foreliggende oppfinnelse er betingelser som er tilstrekkelige til å hindre dannelsen av A2E, ATR-dimer, eller begge, velkjente innenfor teknikken eller kan fastsettes empirisk dersom det er ønskelig. Utskiftningstrinnet i denne utførelsesform blir beskrevet mer detaljert i det følgende.

25 En ytterligere utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse er en sammensetning ifølge krav 1-6 for anvendelse i å forsinke dannelse av A2E. Denne fremgangsmåte innbefatter trinnet av å skifte ut et all-*trans*-retinal (ATR)-substrat med et C₂₀-D₃-retinoids substrat under betingelser som er tilstrekkelige for å hindre dannelsen av A2E. Utskiftningstrinnet i de siste to utførelsesformer kan oppnås under anvendelse av kjent fremgangsmåte, herunder de

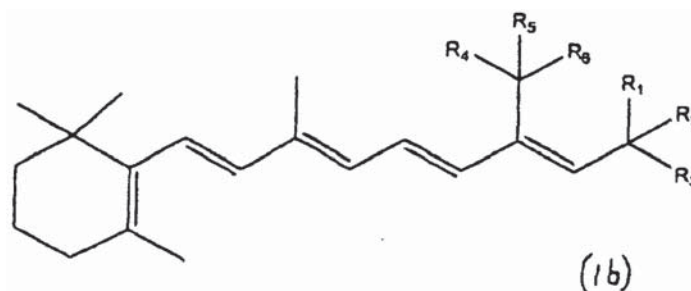
30 ovenfor beskrevne fremgangsmåter. Eksempelvis kan substratutskiftningen finne sted i pasientens øye, f.eks. kan substratet administreres direkte til øyet ved hjelp av øyedråper, salve eller injeksjon. Alternativt kan substratet administreres systematisk ved hjelp av f.eks. inntak av en pille eller kapsel eller absorpsjon gjennom et plaster eller ved injeksjon.

35 I den foreliggende oppfinnelse innbefatter det «substituerte C₂₀-retinoid» alle retinoler, retinolacetater, retinolestere og retinsyrer som definert nedenfor så vel som farmasøytiske salter derav og metabolitter derav. For formålene med den foreliggende oppfinnelse skal nummerordningen som fremlegges i formel Ia for retinoider, anvendes:

13



Således har retinol, retinolacetat, retinolpalmitat, retinsyre og betakaroten de følgende strukturer:



5 hvor

R_4 , R_5 og R_6 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av ^1H , ^2H , ^3H , halogen og C_{1-8} -alkyl, hvor R_4 , R_5 og R_6 er ikke hver ^1H ;

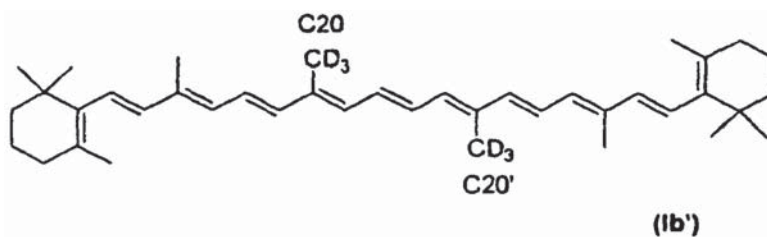
R_1 og R_2 er begge H, og R_3 er OH (retinol); eller

R_1 og R_2 er begge H, og R_3 er OCOCH_3 (retinolacetat); eller

10 R_1 og R_2 er begge H, og R_3 er OCOR (retinolester, slik som f.eks. retinolpalmitat) eller

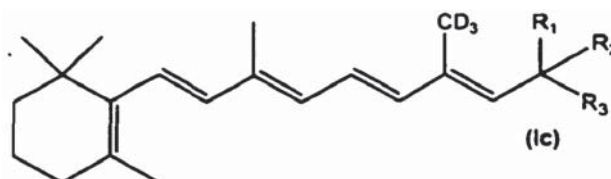
R_1 er =O, R_2 er ingenting, og R_3 er OH (retinsyre) eller

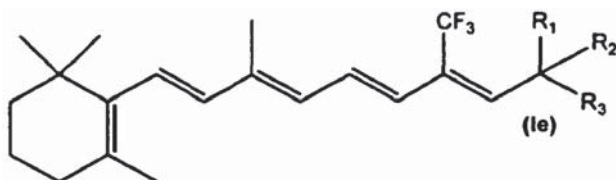
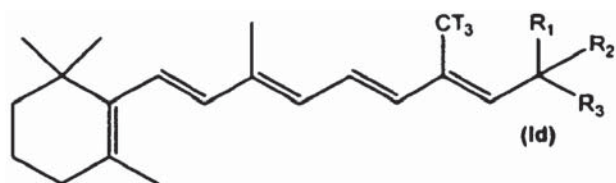
R_1 er H, R_3 er ingenting, og R_2 er $=\text{CH-R}_7$, hvor R_7 danner et karotenoid. I denne utførelsesform utgjør R_7 sammen med resten av forbindelsen, f.eks. et betakaroten eller et annet pro-A-vitamin-karotenoid slik som det deutererte betakaroten vist i formel Ib' nedenfor:



15

Eksempler på substituerte C_{20} -retinoidforbindelser som kan anvendes i sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelse, innbefatter de følgende (forbindelser Ic-Ie):

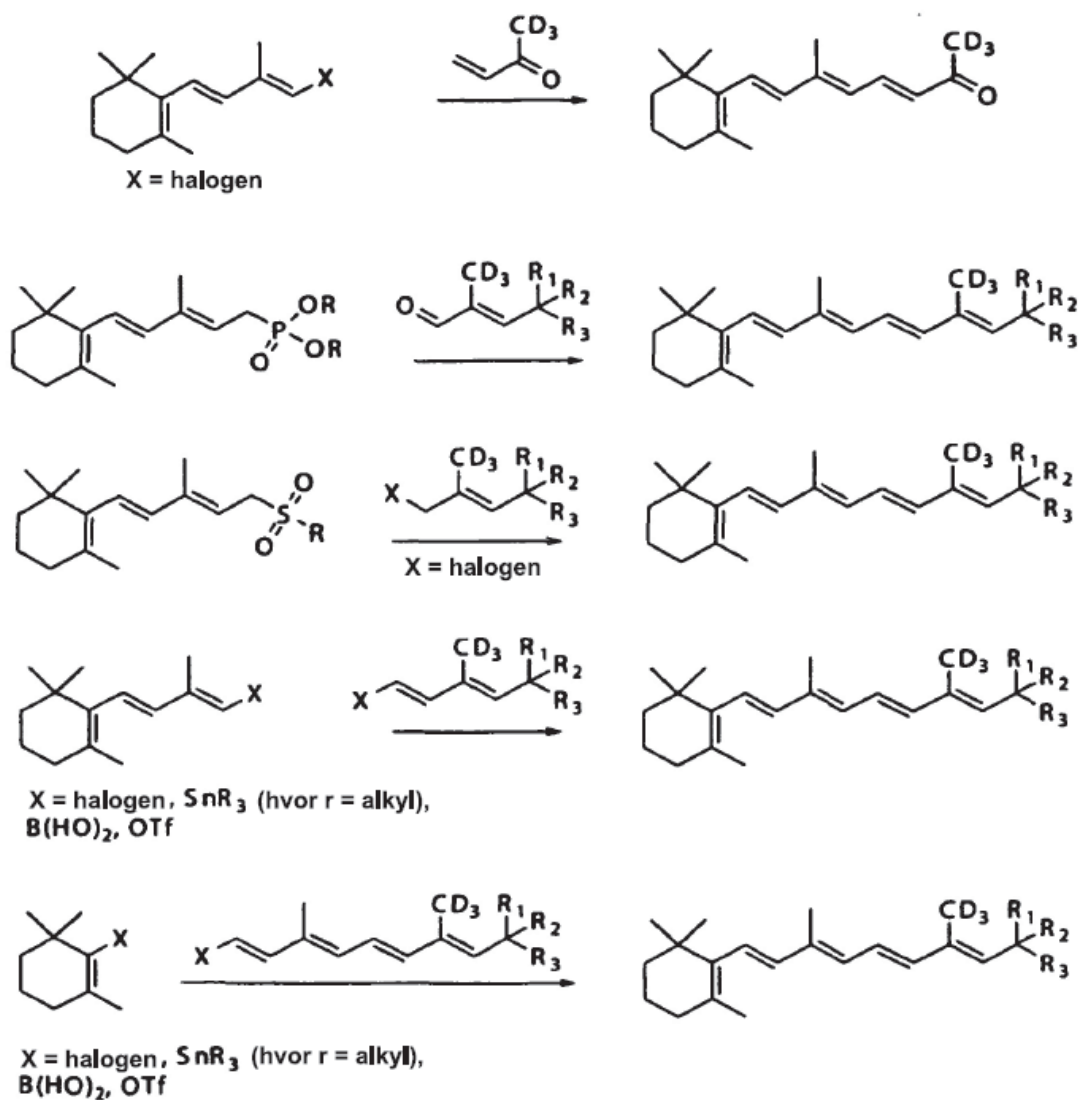




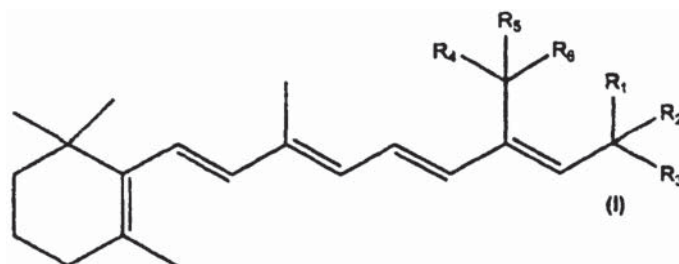
hvor R_1 , R_2 og R_3 er som definert i formel Ib.

5

Eksempler på fremgangsmåter og reaksjonsskjemaer for å lage substituert C20-retinoidforbindelser ifølge den foreliggende oppfinnelse, er fremlagt nedenfor:



I en annen utførelsesform er oppfinnelsen en sammensetning som omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og en forbindelse ifølge formel I:



hvor:

5 R_1 er okso eller H;

R_2 er H eller ingenting;

R_3 er hydrokso eller okso eller $=CH-R_7$, hvor R_7 danner et karotenoid: og R_4 , R_5 og R_6 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av 2H (D), 3H (T), halogen og C_{1-8} -alkyl. Det foretrekkes at halogenet er fluor (F).

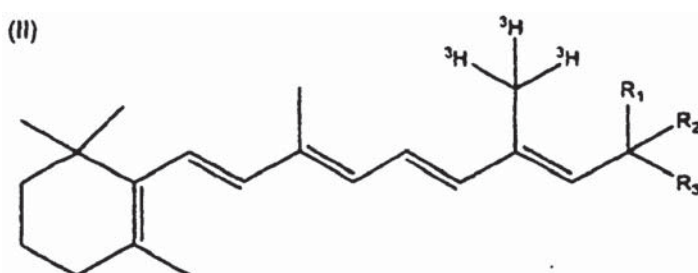
10

I denne utførelsesform kan R_4 , R_5 og R_6 også være uavhengig valgt fra H, forutsatt at R_4 , R_5 og R_6 er ikke hver 1H . Heri drøftes også en substituent som saktner lipofusindannelse, en substituent som saktner dannelsen av i det minste én av A2E- og ATR-dimer-dannelse, eller en substituent som saktner hydrogenabstraksjon eller -migrasjon på C_{20} -posisjonen

15

sammenlignet med et retinoid som ikke substitueres på C_{20} -posisjonen, f.eks. et $C_{20}-H_3$ -retinoid.

I sammensetningen ifølge den foreliggende oppfinnelse foretrekkes det at forbindelsen har strukturen ifølge formel II:



20

hvor:

R_1 er okso eller H;

R_2 er H eller ingenting; og

R_3 er hydrokso eller okso eller $=CH-R_7$, hvor R_7 danner et karotenoid.

25

I den foreliggende oppfinnelse kan sammensetningene videre inneholde et tilskudd. Representative, ikke-begrensede eksempler på et tilskudd ifølge den foreliggende oppfinnelse er synssyklusantagonister, molekyler som inhiberer innstrømming av et retinoid inn i et øye, eller kombinasjoner derav.

Ikke-begrensende eksempler på synssyklusantagonister ifølge den foreliggende oppfinnelse innbefatter TDH, TDT, 13-*cis*-retinsyre, ret-NH₂, og kombinasjoner derav. Et ikke-begrensende eksempel på en synssyklusantagonist ifølge den foreliggende oppfinnelse er fenretinid. Andre synssyklusantagonister innenfor omfanget av den foreliggende oppfinnelse innbefatter de som er beskrevet i R. Rando, U.S.-søknad med serienr. 11/199,594, inngitt 8. august 2005.

I den foreliggende oppfinnelse kan ett eller flere tilsetningsstoffer innbefattes i sammensetningene. Ikke-begrensende eksempler på tilsetningsstoffer som kan innbefattes i sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelse, innbefatter sink, E-vitamin, D-vitamin og kombinasjoner derav.

Sink-, E-vitamin- og D-vitamintilsetningsstoffene kan være til stede i sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelse i mengder som er virkningsfulle for f.eks. å øke biotilgjengeligheten til de substituerte C₂₀-retinoidforbindelser ifølge den foreliggende oppfinnelse, herunder formel I, formel Ic-e og formel II. I den foreliggende oppfinnelse kan sink således være til stede i sammensetningen ved mellom cirka 3 til cirka 80 mg, fortrinnsvis mellom cirka 3 til cirka 10 mg eller mellom cirka 10 til cirka 80 mg. E-vitamin kan være til stede i sammensetningen ved mellom cirka 3 til cirka 3000 mg, fortrinnsvis mellom cirka 3 til cirka 15 mg eller mellom cirka 15 til cirka 3000 mg. D-vitamin kan være til stede i sammensetningen ved mellom cirka 0,005 til cirka 0,1 mg, fortrinnsvis mellom cirka 0,005 til cirka 0,015 mg eller mellom cirka 0,015 til cirka 0,1 mg.

Sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan også innbefatte ett eller flere ytterligere tilsetningsstoffer, herunder for eksempel øyeoksidanter, mineraler, negativt ladde fosfolipider, karotenoider, og kombinasjoner derav. Anvendelsen av antioksidanter har vist seg å gagne pasienter med maculadegenerasjoner og dystrofier. Se f.eks. Arch. Ophthalmol., 119: 1417-36 (2001); Sparrow, et al., J. Biol. Chem., 278:18207-13 (2003). Eksempler på egnede antioksidanter som kan anvendes i sammensetningen ifølge den foreliggende oppfinnelse i kombinasjon med en forbindelse ifølge formel I, herunder formel Ic-le og II, innbefatter C-vitamin, E-vitamin, betakaroten og andre karotenoider, koenzym Q, OT-551 (Othera Pharmaceuticals Inc.), 4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylpiiperidin-N-oksyl (også kjent som Tempol), butylert hydroksytoluen, resveratrol, en troloxanalog (PNU-83836-E), blåbærekstrakt, og kombinasjoner derav.

Anvendelsen av visse mineraler har også vist seg å gagne pasienter med maculadegenerasjoner og dystrofier. Se f.eks. Arch. Ophthalmol., 119: 1417-36 (2001). Den foreliggende oppfinnelse betrakter således den valgfrie inkludering av ett eller flere slike

mineraler. Eksempler på egnede mineraler som kan anvendes i en sammensetning ifølge den foreliggende oppfinnelse, innbefatter kobberholdige materialer, slik som kobberoksid (kun som eksempel); sinkholdige mineraler, slik som sinkoksid (kun som eksempel); og selenholdige forbindelser, og kombinasjoner derav.

5

Anvendelsen av visse negativt ladde fosfolipider har også vist seg å gagne pasienter med maculadegenerasjoner og dystrofier. Se f.eks. Shaban & Richter, Biol. Chem., 383:537-45 (2002); Shaban, et al., Exp. Eye Res., 75:99-108 (2002). Eksempler på egnede negativt ladde fosfolipider som valgfritt kan anvendes i sammensetningen ifølge den foreliggende oppfinnelse, innbefatter kardiolipin, fosfatidylglyserol, og kombinasjoner derav. Positivt ladde og/eller nøytrale fosfolipider kan også være gagnlig for pasienter med maculadegenerasjoner og dystrofier når de anvendes i kombinasjon med en sammensetning ifølge den foreliggende oppfinnelse.

10

15 Anvendelsen av visse karotenoider har blitt korrelert med vedlikeholdet av fotoproteksjon som er nødvendig i fotoreseptorceller. Karotenoider er naturlig forekommende gule til røde pigmenter i terpenoidgruppen som kan finnes i planter, alger, bakterier og visse dyr, slik som fugler og skaldyr. Karotenoider er en stor klasse molekyler hvor mer enn 600 naturlig forekommende karotenoider har blitt identifisert. Karotenoider innbefatter hydrokarboner (karotener) og deres oksygenerte alkoholderivater (xantofyller). De innbefatter aktinioerytrol, 20 astaxantin, kanthaxantin, kapsantin, kapsorubin, beta-8'-apo-karotenal (apo-karotenal), beta-12'-apo-karotenal, alfakaroten, betakaroten, «karoten» (en blanding av alfa- og betakarotener), gammakarotener, beta-kryptoxantin, lutein, lykopen, violerytrin, zeaxantin, og estere av hydroksyl- eller karboksylinnholdende elementer derav. Mange av karotenoidene 25 forekommer i naturen som *cis*- og *trans*-isomere former, mens syntetiske forbindelser ofte er racemiske blandinger.

Hos mennesker akkumulerer retinaen selektivt hovedsakelig to karotenoider: zeaxantin og lutein. Disse to karotenoider antas å bistå i beskyttelse av retinaen fordi de er kraftige 30 antioksidanter og absorberer blått lys. Eksempler på egnede karotenoider for valgfri anvendelse i en sammensetning ifølge den foreliggende oppfinnelse innbefatter lutein og zeaxantin, så vel som hvilke som helst av de tidligere nevnte karotenoider og kombinasjoner derav.

35 Effektive doseringsformer, administrasjonsmåter og doseringsmengder, i tillegg til de ovenfor beskrevne, kan bestemmes empirisk, og å foreta slike bestemmelser er innenfor den kjente teknikk. Det vil være klart for fagfolk at doseringsmengden vil variere etter administrasjonsveien, ekskresjonsraten, behandlingens varighet, identiteten til eventuelle

- andre legemidler som administreres, alderen, størrelsen og arten på pattedyret, f.eks. human pasient, og lignende faktorer som er velkjente innenfor medisin- og veterinærmedisinteknikken. Generelt vil en egnet dose av en forbindelse ifølge oppfinnelsen være den mengde av forbindelsen som er den laveste dose som er effektiv for å frembringe
- 5 den ønskede effekt. Eksempelvis er en forbindelse ifølge oppfinnelsen til stede i sammensetningen på et nivå som er tilstrekkelig til å tilføre cirka 0,1 til cirka 90 mg/dag til en pasient. Den effektive dose av en forbindelse kan administreres som to, tre, fire, fem, seks eller flere subdoser, administrert separat ved passende intervaller i løpet av dagen.
- 10 En forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelse kan administreres på en hvilken som helst ønsket og effektiv måte: som farmasøytiske sammensetninger for oralt inntak, eller som en salve eller dråper for lokal administrasjon på øynene, eller for parenteral eller annen administrasjon på en hvilken som helst formålstjenlig måte, slik som intraperitonealt, subkutan, topisk, intradermalt, inhalasjon, intrapulmonalt, rektalt, vaginalt, sublingvalt,
- 15 intramuskulært, intravenøst, intraarterielt, intratekalt eller intralymfatisk. Videre kan en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelse administreres sammen med andre behandlinger. En forbindelse eller sammensetning ifølge den foreliggende oppfinnelse kan være innkapslet eller på annen måte beskyttet mot magesekresjoner eller andre sekresjoner, hvis det er ønskelig.
- 20 Selv om det er mulig at en forbindelse ifølge oppfinnelsen kan administreres alene, foretrekkes det å administrere forbindelsen som en farmasøytisk formulering (sammensetning) eller et vitamintilskudd eller et nutrasøytika. De farmasøytisk akseptable sammensetninger ifølge oppfinnelsen omfatter én eller flere forbindelser som et virkestoff i
- 25 blanding med ett eller flere farmasøytisk akseptable bærere og, valgfritt, én eller flere andre forbindelser, legemidler, ingredienser og/eller materialer. Uavhengig av den valgte administrasjonsvei formuleres forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse i farmasøytisk akseptable doseringsformer ved hjelp av konvensjonelle fremgangsmåter som er kjent for fagfolk. Se f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.,
- 30 Easton, Pa.).

- Farmasøytisk akseptable bærere er velkjente innenfor teknikken (se f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.) og The National Formulary (American Pharmaceutical Association, Washington, D.C.)), og innbefatter sukkere (f.eks.
- 35 laktose, sukrose, mannitol og sorbitol), stivelser, cellulosepreparater, kalsiumfosfater (f.eks. dikalsiumfosfat, trikalsiumfosfat og kalsiumhydrogenfosfat), natriumcitrat, vann, vandige løsninger (f.eks. saltløsning, natriumkloridinjeksjon, Ringers løsning, dekstroseinjeksjon, dekstrose- og natriumkloridinjeksjon, laktert Ringers løsning), alkoholer (f.eks. etylalkohol,

propylalkohol og benzylalkohol), polyoler (f.eks. glyserol, propylenglykol og polyetylglykol), organiske estere (f.eks. etyloleat og triglyserider), biologisk nedbrytbare polymerer (f.eks. polyaktid-polyglykolid, poly(ortoestere), og poly(anhydrid)), elastomermatriser, liposomer, mikrosfærer, oljer (f.eks. mais-, oliven-, ricinus-, sesam-, bomullsfrø- og jordnøtteolje),

5 kakaosmør, voks (f.eks. suppositorievoks), parafiner, silikoner, talkum, silicylat osv. Hver farmasøytisk akseptable bærer som anvendes i en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen, må være «akseptabel» i den forstand at den må være kompatibel med de øvrige ingrediensene i formuleringen og ikke skadelig for pasienten. Bærere som egner seg for en valgt doseringsform og tiltenkt administrasjonsvei er velkjente innenfor teknikken, og

10 akseptable bærere for en valgt doseringsform og fremgangsmåte for administrasjon kan bestemmes under anvendelse av vanlig fagkunnskap.

De farmasøytiske sammensetninger eller vitamintilskudd eller nutrasøytika ifølge oppfinnelsen kan valgfritt inneholde ytterligere ingredienser og/eller materialer som i

15 alminnelighet anvendes i slike farmasøytiske sammensetninger eller vitamintilskudd eller nutrasøytika. Disse ingredienser og materialer er velkjente innenfor teknikken og innbefatter (1) fyllmateriale eller fyllstoffer, slik som stivelser, laktose, sukrose, glukose, mannitol og kiselsyre; (2) bindemidler, slik som karboksymetylcellulose, alginater, gelatin, polyvinylpyrrolidon, hydroksypropylmetylcellulose, sukrose og akasie; (3) fuktighetsbevarende

20 midler, slik som glyserol; (4) desintegrerende midler, slik som agar-agar, kalsiumkarbonat, potet- eller tapiokastivelse, alginsyre, visse silikater, natriumstivelseglykolat, tverrbundet natriumkarboksymetylcellulose og natriumkarbonat; (5) oppløsningsforsinkende midler, slik som parafin; (6) absorpsjonsakseleratorer, slik som kvaternære ammoniumforbindelser; (7) fuktemidler, slik som cetylalkohol og glyserolmonosterat; (8) absorbenter, slik som kaolin og

25 bentonittleire; (9) smøremidler, slik som talkum, kalsiumstearat, magnesiumstearat, polyetylglykoler i fast form, og natriumlaurylsulfat; (10) suspenderingsmidler, slik som etoksylerte isostearylalkoholer, polyoksyetylenorbitol og sorbitanestere, mikrokrySTALLINSK cellulose, aluminiummetahydroksid, bentonitt, agar-agar og dragant; (11) bufringsmidler; (12) eksipienser, slik som laktose, melkesukker, polyetylglykoler, animalske og vegetabiliske

30 fettyper, oljer, voks, parafiner, kakaosmør, stivelser, dragant, cellulosederivater, polyetylglykol, silikoner, bentonitter, kiselsyre, talkum, salisylat, sinkoksid, aluminiumhydroksid, kalsiumsilikater og polyamidpulver; (13) inerte fortynningsmidler, slik som vann eller andre løsningsmidler; (14) conserveringsmidler; (15) overflateaktive stoffer; (16) dispergeringsmidler; (17) control-release- eller absorpsjonsforsinkende midler, slik som

35 hydroksypropylmetylcellulose, andre polymermatriser, biologiske nedbrytbare polymerer, liposomer, mikrosfærer, aluminiummonosterat, gelatin og voks; (18) opasifiserende midler; (19) adjuvanter; (20) fuktemidler; (21) emulgeringsmidler og suspenderingsmidler; (22), løsningshjelpemidler og emulgeringsmidler, slik som etylalkohol, isopropylalkohol,

etylkarbonat, etylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol, 1,3-butylenglykol, oljer (nærmere bestemt bomullsfrø-, jordnøtte-, mais-, oliven-, ricinus- og sesamolje), glyserol, tetrahydrofurylalkohol, polyetylenglykoler og fettsyreestere av sorbitan; (23) drivmidler, slik som klorfluorhydrokarboner og volatile ikke-substituerte hydrokarboner, slik som butan og propan; (24) antioksidanter; (25) midler som gjør formuleringen isotonisk med blodet til den tiltenkte mottaker, slik som sukkere og natriumklorid; (26) tykningsmidler; (27) belegningsmaterialer, slik som lecitin; og (28) søte-, smaks-, farge-, parfymerings- og preserveringsmidler. Hver slik ingrediens eller hvert slikt materiale må være «akseptabel(t)» i den forstand at den/det er kompatibel(t) med formuleringens andre ingredienser og ikke skadelig for pasienten. Ingredienser og materialer som egner seg for en valgt doseringsform og tiltenkt administrasjonsvei er velkjente innenfor teknikken, og akseptable ingredienser og materialer for en valgt doseringsform og fremgangsmåte for administrasjon kan bestemmes under anvendelse av vanlig fagkunnskap.

15 Farmasøytiske sammensetninger eller vitamintilskudd eller nutrasøytika som egner seg for oral administrasjon, kan være i form av kapsler, oblatkapsler, piller, tabletter, pulvere, granuler, en løsning eller en suspensjon i en vandig eller ikke-vandig væske, en olje-i-vann- eller vann-i-olje-væskeemulsjon, en eliksir eller sirup, en pastill, en bolus, et elektuarium eller en pasta. Disse formuleringer kan fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter som er kjente innenfor teknikken, *f.eks.* ved hjelp av konvensjonell pan-coating-, blandings-, granulerings- eller lyofiliseringsprosesser.

Faste doseringsformer for oral administrasjon (kapsler, tabletter, piller, drasjeer, pulvere, granuler og lignende) kan fremstilles ved å blande virkestoffet/virkestoffene med én eller flere farmasøytisk akseptable bærere og valgfritt ett eller flere fyllmaterialer, fyllstoffer, bindemidler, fuktighetsbevarende midler, desintegrerende midler, oppløsningsforsinkende midler, absorpsjonsakseleratorer, fuktemidler, absorbenter, smøremidler og/eller fargemidler. Faste sammensetninger av en lignende type kan benyttes som fyllstoffer i myke og hardt-fylte gelatinkapsler under anvendelse av en passende eksipiens. En tablett kan lages ved kompresjon eller støping, valgfritt med én eller flere hjelpeingredienser. Komprimerte tabletter kan fremstilles under anvendelse av et egnet bindemiddel, smøremiddel, inert fortynningsmiddel, preserveringsmiddel, desintegrerende middel, overflateaktivt middel eller dispergeringsmiddel. Støpte tabletter kan lages ved støping i en egnet maskin. Tablettene og andre faste doseringsformer, slik som drasjeer, kapsler, piller og granuler, kan valgfritt utstyres med delestrek eller fremstilles med belegg og hylstre, slik som enteriske belegg og andre belegg som er velkjente innenfor farmasøytisk formulering-teknikken. De kan også formuleres for å tilveiebringe langsom eller kontrollert frigjøring av virkestoffet deri. De kan steriliseres ved for eksempel filtrering gjennom et bakterietilbakeholdende filter. Disse

sammensetninger kan også valgfritt inneholde opasifiserende midler, og kan være av en slik sammensetning at de frigjør virkestoffet kun, eller fortrinnsvis, i en bestemt del av mage-tarm-kanalen, valgfritt på en forsinket måte. Virkestoffet kan også være i mikroinnkapslet form.

- 5 Flytende doseringsformer for oral administrasjon innbefatter farmasøytisk akseptable emulsjoner, mikroemulsjoner, løsninger, suspensjoner, siruper og eliksirer. De flytende doseringsformer kan inneholde passende inerte fortynningsmidler som vanligvis anvendes i teknikken. Foruten inerte fortynningsmidler kan de orale sammensetninger også innbefatte adjuvanter, slik som fuktemidler, emulgerings- og suspenderingsmidler, søte-, smaks-, farge-,
10 parfumerings- og conserveringsmidler. Suspensjoner kan inneholde suspenderingsmidler.

- Farmasøytiske sammensetninger for rektal eller vaginal administrasjon kan presenteres som et suppositorium som kan fremstilles ved å blande ett eller flere virkestoff(er) med én eller flere passende ikke-irriterende bærere som er faste ved romtemperatur, men flytende ved
15 kroppstemperatur, og som derfor vil smelte i rektum eller den vaginale kavitet og frigjøre den aktive forbindelse. Farmasøytiske sammensetninger som er passende for vaginal administrasjon, innbefatter også pessarer, tamponger, kremer, geler, pastaer, skum eller sprayformuleringer som inneholder slike farmasøytisk akseptable bærere som innenfor teknikken er kjent for å være formålstjenlige.

- 20 Doseringsformer for den topiske eller transdermale administrasjon innbefatter pulvere, sprayer, salver, pastaer, kremer, lotion, geler, løsninger, plastre, dråper og inhalasjonsmidler. Den aktive forbindelse kan blandes under sterile betingelser med en passende farmasøytisk akseptabel bærer. Salvener, pastaene, kremene og gelene kan inneholde eksipienser. Pulvere
25 og sprayer kan inneholde eksipienser og drivmidler.

- Farmasøytiske sammensetninger som er passende for parenterale administrasjoner omfatter én eller flere forbindelser i kombinasjon med én eller flere farmasøytisk akseptable sterile isotoniske vandige eller ikke-vandige løsninger, dispersjoner, suspensjoner eller emulsjoner,
30 eller sterile pulvere som kan rekonstitueres til sterile injiserbare løsninger eller dispersjoner akkurat forut for bruk, hvilke kan inneholde passende antioksidanter, buffere, løsningsprodukter som gjør formuleringen isotonisk med den tiltenkte mottakers blod, eller suspenderings- eller tykningsmidler. Hensiktsmessig fluiditet kan opprettholdes for eksempel ved anvendelsen av beleggingsmateriale, ved opprettholdelsen av den påkrevde
35 partikkelstørrelse når det gjelder dispersjoner, og ved anvendelsen av surfaktanter. Disse sammensetninger kan også inneholde passende adjuvanter, slik som fuktemidler, emulgeringsmidler og dispergeringsmidler. Det kan også være ønskelig å inkludere isotoniske midler. I tillegg kan forlenget absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske form fremkalles ved

inkluderingen av midler som forsinket absorpsjon.

- I noen tilfeller, for å forlenge virkningen av et legemiddel (f.eks. farmasøytisk formulering eller vitamintilskudd eller nutrasøytika), er det ønskelig å sakte dets absorpsjon fra subkutan eller intramuskulær injeksjon. Dette kan oppnås ved anvendelsen av en flytende suspensjon av krystallinsk eller amorf materiale som har dårlig vannløselighet.

- Legemiddelets absorpsjonshastighet avhenger da av dets oppløsningshastighet, som på sin side kan avhenge av krystallstørrelse og krystallinsk form. Alternativt kan forsinket absorpsjon av et parenteralt administrert legemiddel oppnås ved å oppløse eller suspendere legemidlet i en oljevehikkel. Injiserbare depotformer kan lages ved å danne mikrokapslingmatriser av virkestoffet i biologisk nedbrytbare polymerer. Avhengig av forholdet mellom virkestoffet og polymer, og den bestemte benyttede polymers beskaffenhet, kan hastigheten av virkestofffrigjøring kontrolleres. Depotinjiserbare formuleringer fremstilles også ved å fange legemidlet i liposomer eller mikroemulsjoner som er kompatible med kroppsvev. De injiserbare materialer kan steriliseres, for eksempel ved filtrering gjennom et bakterietilbakeholdende filter.

- Formuleringene kan fremstilles i forseglede enhetsdose- eller multidosebeholdere, for eksempel ampuller og hetteglass, og kan lagres i en lyofilisert tilstand, idet det kun kreves tilsetningen av den sterile flytende bærer, for eksempel vann til injeksjon, umiddelbart før anvendelse. Ekstemporane injeksjonsløsninger og suspensjoner kan fremstilles fra sterile pulvere, granuler og tabletter av typen som er beskrevet over.

- De følgende eksempler er tilveiebrakt for ytterligere å illustrere fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelse.

EKSEMPLER

EKSEMPEL 1

Utskiftning av C₂₀-hydrogenatomene i all-*trans*-retinal med deuteriumatomer saktner dannelsen av A2E *in vitro*.

- C₂₀-D₃-retinal ble fremstilt ifølge prosedyren i litteraturen(47) og dets *in vitro*-evne til å danne A2E sammenlignet med all-*trans*-retinal, ble målt ved hjelp av HPLC.

Fig. 3A plotter dannelsen av alle A2E for to reaksjonsblandinger inneholdende enten all-*trans*-

retinal eller C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal (16 mg), etanolamin (0,5 ekvivalenter) og eddiksyre (1,2 ekvivalenter). En typisk HPLC-trase er vist i fig. 3B for all-*trans*-retinal- og C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal-reaksjonsblandingene. Området under kurven svarer til mengden av A2E: jo større område, desto mer A2E. Konsentrasjonene av A2E i de to reaksjonsblandingene ble målt omkring hver 8. time i 50 timer. Konsentrasjonene ved hvert tidspunkt ble plottet, og datapunktene tilpasset til en linje for hver reaksjonsblanding. En sammenligning av helningene til de to linjene for de to reaksjoner avslørte at A2E-dannelse inntraff 7 ganger hurtigere for all-*trans*-retinal sammenlignet med C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal. Hydrogen-deuterium-utveksling ble ikke observert under reaksjonen med det merkede retinal, som målt ved hjelp av massespektrometri av reaksjonsblandingen etter 50 timer, som klart viste tilstedeværelsen av tri-deuterert retinal, tri-deuterert retinalhydroksylamin Schiff-base og tetra-deuterert A2E.

EKSEMPEL 2

Utskiftning av C₂₀-hydrogenatomene i all-*trans*-retinal med deuteriumatomer saktner dannelsen av A2R-dimer *in vitro*.

C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal ble fremstilt som beskrevet i eksempel 1, og dets *in vitro*-evne til å danne ATR-dimer sammenlignet med all-*trans*-retinal ble målt ved HPLC. All-*trans*-retinal eller C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal (10 mg) og prolin (2 ekvivalenter) i etanol ble blandet, og reaksjonen ble etterfulgt av HPLC, idet resultatene er fremstilt i fig. 4A. En typisk HPLC-trase er vist i fig. 4B for all-*trans*-retinal- og C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal-reaksjonsblandingene ved de samme tidspunkter. Konsentrasjonene av ATR-dimer i de to reaksjonsblandingene ble målt omkring hvert 15. minutt i 3 timer. Konsentrasjonen på hvert tidspunkt ble plottet, og datapunktene tilpasset til en linje for hver reaksjonsblanding. En sammenligning av de to linjenes helninger viste at C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal dannet ATR-dimer 15 ganger langsommere enn det umerkede retinal som vist i fig. 4C.

EKSEMPEL 3

30

Utskiftning av C₂₀-hydrogenatomene i all-*trans*-retinal med deuteriumatomer saktner dannelsen av A2E-lipofuscin i CD-1 (ICR)-mus.

C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal ble administrert til mus for å måle dets evne til å danne A2E i øyet sammenlignet med all-*trans*-retinal. Ni 8 uker gamle CD-1 (ICR)-mus (fra Charles River, Wilmington, MA) ble delt opp i to grupper på fem og administrert 1,5 mg av enten all-*trans*-retinal eller C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal ved intraperitoneal injeksjon (IP)-injeksjon i en 10% løsning av Tween-20 i saltløsning to ganger i uken i 6 uker. På slutten av denne seksukersperioden

ble hver mus gitt totalt 60 000 I.U. (18 mg) eller cirka 28 ganger den opprinnelige mengden A-vitamin i musens kropp. Massiv dosering med C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal skifter raskt normale A-vitaminlagre ut med C₂₀-D₃-analogen. Og det injiserte retinal akkumuleres hurtig i øyet (stavytre segmenter), hvor det ved høye nok konsentrasjoner vil reagere for å danne

5 lipofuscinpigmenter. Dette ligner akkumuleringen av all-*trans*-retinal i ABCR^{-/-}-musene og hos pasienter med Stargardts sykdom.

På slutten av seksukersperioden ble øyene dissekert, retinaene og eyecups poolet i grupper på 4 eller 5, og homogenert med 50 µL etanol. Homogenatet ble sentrifugert ved 13 000 rpm i 10 5 minutter, og 40 µL av supernatanten ble trukket ut og analysert for A2E-lipofuscin ved HPLC. Retinol og retinolestere ble analysert ved 325 nm, og A2E-lipofuscin ble målt ved 445 nm. Mus som fikk administrert C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal (n = 5) hadde 68% mindre A2E-lipofuscin sammenlignet med mus som fikk administrert all-*trans*-retinal (n = 4). Begge grupper av mus hadde omtrent de samme konsentrasjoner av retinol og retinolestere.

15

EKSEMPEL 4

Utskiftning av C₂₀-hydrogenatomene i all-*trans*-retinal med deuteriumatomer reduserer dannelsen av A2E i ABCR^{-/-}-mus

20

C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat ble fremstilt i henhold til litteraturprosedyren (47) og ble administrert til ABCR^{-/-}-mus (48, 49) for å måle dets evne til å føre til lipofuscin sammenlignet med den til all-*trans*-retinolacetat. Åtte 2 måneder gamle ABCR^{-/-}-mus alet opp på en standard gnagerdiett ble deretter gitt en diett som inneholdt 20 000 I.U./kg av enten C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat eller all-*trans*-retinolacetat i 3 måneder. På denne dietten fikk musene omtrent den daglig anbefalte mengden A-vitamin eller den samme mengden av C₂₀-D₃-A-vitamin-legemidlet, hvilket var mindre enn cirka 1 mg/kg/dag.

25

På slutten av 5-månedersperioden ble øynene dissekert, eyecups poolet i grupper på seks og 30 homogenert med 80 µL etanol. Homogenatet ble sentrifugert ved 13 000 rpm i 5 minutter, og 30 µL av supernatanten ble trukket ut og analysert for A2E-lipofuscin ved HPLC. A2E-lipofuscin ble målt ved 445 nm. Mus på 3-månedersdietten inneholdende C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat hadde 44-58% mindre A2E-lipofuscin sammenlignet med mus på en diett av all-*trans*-retinolacetat. Denne prosentandelen av A2E-reduksjon er i samme størrelsesorden som er observert i lignende studier på ABCR^{-/-}-mus med synssyklusantagonisten TDH, TDT, Ret-NH₂, 13-*cis*-retin, syre og fenretinid. I dette eksempel oppnås imidlertid A2E-reduksjon med doser av C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat som er 11 til 40 ganger mindre.

35

EKSEMPEL 5

- ABCR^{-/-}-mus alet opp utelukkende på en C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat-diett fremviser ikke-detekterbare mengder ekstraherbare lipofuscinpigmenter og reduserte opphopninger av lipofuscin.**

Som i eksempel 4 ble to grupper på fire ABCR^{-/-}-mus alet opp enten på dietter som inneholdt C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat eller all-*trans*-retinolacetat. I dette eksempel var musene imidlertid avkom av mødre på den samme diett, og de var således alet opp kun på deres respektive A-vitaminanaloger. Ved 5,5-6-månedersalderen ble musene avlivet, og eyecupsene ble analysert for lipofuscinpigmenter som beskrevet i eksempel 4. Resultatene er vist i fig. 5. Mens begge mus inneholdt den samme mengde øyeretinol og retinolestere (fig. 5C), var lipofuscinpigmenter ikke-detekterbare hos mus alet opp på C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat-dietten (fig. 5B), men var detekterbare hos mus alet opp på all-*trans*-retinolacetat-dietten (fig. 5A).

For å måle mengden av lipofuscingranuler i øynene til de ovennevnte mus på en normal diett i forhold til dietten inneholdende C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat, ble eyecups fra begge grupper mus (2 fra hver gruppe) evaluert ved elektronmikroskopi. Mus på C₂₀-D₃-all-*trans*-retinolacetat-dietten hadde mindre elektrontette opphopninger av lipofuscin sammenlignet med mus på en all-*trans*-retinolacetat-diett, som vist i fig. 6.

EKSEMPEL 6

- C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal saktner A2E-lipofuscindannelsen i tillegg til fenretinid og/eller TDH i villtype-rotter.**

45-50 dager gamle CD IGS-rotter av hunnkjønn (Charles River, Wilmington, MA) ble delt opp i fire grupper på tre. Tre av disse grupper fikk administrert all-*trans*-retinal, og den ene gruppen ble gitt C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal (IP-injeksjon i en 10% løsning av Tween-20 i saltløsning) på 3 mg, to eller tre ganger i uken i 8 uker (totalt 20 3 mg-injeksjoner). På slutten av 8-ukersperioden hadde dyrene således fått omtrent 20 ganger deres opprinnelige lagre av A-vitamin som retinal eller C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal. Massiv dosering med C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal skifter raskt normale A-vitaminlagre ut med C₂₀-D₃-analogen. Av de tre grupper som fikk administrert all-*trans*-retinal, ble én gruppe gitt fenretinid (50) og en annen TDH (23), i doser på omtrent 1,5 mg/dag/dyr (begge gitt i drikkevannet emulgert med 1g/L Nu-rice (RIBUS, Inc, St. Louis, MO)).

På slutten av de 8 ukene ble RPE, A2E-lipofuscin evaluert i hver av de fire grupper ved HPLC som beskrevet i eksempel 3 og i fig. 7. A2E-lipofuscinpigmenter var størst hos dyrene som fikk all-*trans*-retinal (kontrollgruppen). Mens dyr som fikk C₂₀D₃-all-*trans*-retinal hadde 35% mindre A2E-lipofuscin enn dyr som fikk all-*trans*-retinal. Likeledes hadde dyr som fikk fenretinid eller TDH 49% og 31% mindre A2E-lipofuscin sammenlignet med dyr som fikk administrert kun all-*trans*-retinal.

ANFØRTE DOKUMENTER

10 De følgende dokumenter har blitt nevnt ovenfor:

1. Friedman, D.S.; O'Colmain, B.J.; Muñoz, B.; Tomany, S.C.; McCarty, C.; DeJong, P.T.V.M.; Nemesure, B.; Mitchell, P.; Kempen, J.; Congdon, N. Prevalence of age related macular degeneration in the United States. Arch. Ophthalmol. **2004**, 122, 564-572.
- 15 2. Rattner, A.; Nathans, J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. Nat. Rev. Neurosci. **2006**, 7, 860-872.
3. Jong, P.T.V.M.d. Age-related macular degeneration N. Engl J Med **2006**, 355, 478-485.
4. Fine, S.L.; Berger, J.W.; Maguire, M.G.; Ho, A.C. Age-related macular degeneration N Engl J Med **2007**, 342, 483-492.
- 20 5. Jarc-Vidmar, M.; Kraut, A.; Hawlina, M. Fundus autofluorescence imaging in Best's vitelliform dystrophy. Klinische Monatsblätter Fur Augenheilkunde **2003**, 220, 861-867.
6. Capon, M.; Marshall, J.; Krafft, J.; Alexander, R.; Hiscott, P.; Bird, A. Sorsby's fundus dystrophy: a light and electron microscopic study. Ophthalmology **1989**, 95, 1969-1977.
7. Chong, N.; Alexander, R.; Gin, T.; Bird, A.; Luthert, P. TIMP-3 collagen, and elastin immunohistochemistry and histopathology of Sorsby's fundus dystrophy Invest Ophthalmol Vis Sci **2000**, 41, 898-902.
- 25 8. Alikmets, R.; Singh, N.; Sun, H.; Shroyer, N.F.; Hutchinson, A.; Chidambaram, A.; Gerrard, B.; Baird, L.; Stauffer, D.; Peiffer, A.; Rattner, A.; Smallwood, P.; Li, Y.; Anderson, K.L.; Lewis, R.A.; Nathans, J.; Leppert, M.; Dean, M.; R., L.J. A Photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. Nat. Genet. **1997**, 15, 236-246.
- 30 9. Haralampus-Grynaviski, N.M.; Lamb, L.E.; Clancy, C.M.R.; Skumatz, C.; Burke, J.M.; Sarna, T.; Simon, J.D. Spectroscopic and morphological studies of human retinal lipofuscin granules. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **2003**, 100.
- 35 10. Marmorstein, A.D.; Marmorstein, L.Y.; Sakaguchi, H.; Hollyfield, J.G. Spectral Profiling of Autofluorescence Associated with Lipofuscin, Bruch's Membrane, and Sub-RPE Deposits in Normal and AMD Eyes. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **2002**, 43, 2435-2441.
11. Smith, R.T.; Chan, J.K.; Busuioic, M.; Sivagnanavel, V.; Bird, A.C.; Chong, N.V.

- Autofluorescence characteristics of early, atrophic, and high-risk fellow eyes in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2006**, *47*, 5495-5504.
12. Sakai, N.; Decatur, J.; Nakanishi, K.; Eldred, G.E. A2-E": An Unprecedented Pyridinium Bisretinoid. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1559-1560.
 - 5 13. Fishkin, N.E.; Sparrow, J.R.; Allikements, R.; Nakanishi, K. Isolation and characterization of retinal pigment epithelial cell fluorophore: An all-*trans*-retinal dimer conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *100*, 7091-7096.
 14. Sparrow, J.S.; Nakanishi, K.; Parish, C.A. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 1981-1989.
 - 10 15. Suter, M.; Reme, C.E.; Christian Grimm; Wenzel, A.; Jaattela, M.; Esser, P.; Kociok, N.; Leist, M.; Richter, C. Age-related Macular Degeneration: The lipofuscin component n-retinyl-n-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J. Bio. Chem.* **2000**, *275*, 39625-39630.
 - 15 16. Finnemann, S.; Leung, L.W.; Rodriguez-Boulan, E. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**, *99*, 3842-3847.
 17. De, S.; Sakmar, T.P. Interaction of A2E with model membranes. Implications to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *J Gen Physiol.* **2002**, *120*, 147-157.
 - 20 18. Bergmann, M.; Schütt, F.; Holz, F.G.; Kopitz, J. Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J.* **2004**, *18*, 562-564.
 19. Radu, R.A.; Mata, N.L.; Bagla, A.; Travis, G.H. Light exposure stimulates formation of A2E oxiranes in a mouse model of Stargardt's macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**, *101*, 5928-5933.
 - 25 20. Ben-Shabat, S.; Parish, C.A.; Hashimoto, M.; Liu, J.; Nakanishi, K.; Sparrow, J.R. Fluorescent pigments of the retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration. *Bioorg Med Chem Lett.* **2001**, *11*, 1533-1540.
 - 30 21. Schutt, F.; Bergmann, M.; Holz, F.G.; Dithmar, S.; Volcker, H.-E.; Kopitz, J. Accumulation of A2-E in mitochondrial membranes of cultured RPE cells. **2007**, *245*, 391-398.
 22. Schutt, F.; Davies, S.; Kopitz, J.; Holz, F.G.; Boulton, M.E. Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin. **41** **2000**, 2303-2308.
 - 35 23. Maiti, P.; Kong, J.; Kim, S.A.; Sparrow, J.S.; Allikmets, R.; Rando, R.R. Samll molecule RPE65 antagonists limit the visual cycle and prevent lipofuscin formation. *Biochemistry* **2006**, *45*, 852-860.
 24. Radu, R.A.; Mata, N.L.; Nusinowitz, S.; Liu, X.; Sieving, P.A.; Travis, G.H. Treatment

- with isotretinoin inhibits lipofuscin accumulation in a mouse model of recessive Stargardt macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 4742-4747.
25. Golczak, M.; Maeda, A.; Bereta, G.; Maeda, T.; Kiser, P.D.; Hunzelmann, S.; Lintig, J.V.; Blaner, W.S.; Palczewski, K. Metabolic Basis of Visual Cycle Inhibition by Retinoid and Nonretinoid Compounds in the Vertebrate Retina. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 9543-9554.
 26. Katz, M.L.; Drea, C.M.; Robison, W.G. Relationship between dietary retinol and lipofuscin in the retinal pigment epithelium. *Mech. Age. Dev.* **1986**, *35*, 291-305.
 27. Radu, R.A.; Han, Y.; Bui, T.V.; Nusinowitz, S.; Bok, D.; Lichter, J.; Widder, K.; Travis, G.H.; Mata, N.L. Reductions in serum vitamin A arrest Accumulation of toxic retinal fluorophores: A potential therapy for treatment of lipofuscin based retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2005**, *46*, 4393-4401.
 28. Wassell, J.; Boulton, M. A role for vitamin A in the formation of ocular lipofuscin. *Br J Ophthalmol* **1997**, *81*, 911-918.
 29. Owsley, C.; Jackson, G.R. Aging and scotopic dysfunction. *Perception* **2000**, *29*, Abstract Supplement.
 30. Owsley, C.; Jackson, G.R.; White, M.; Feist, R.; Edwards, D. Delays in rod-mediated dark adaptation in early age-related maculopathy. *Ophthalmology* **2001**, *108*, 1196-1202.
 31. Baehr, W.; Wub, S.M.; Birdc, A.C.; Palczewski, K. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Research* **2003**, *43*, 2957-2958.
 32. Maeda, A.; Maeda, T.; Golczak, M.; Imanishi, Y.; Leahy, P.; Kubota, R.; Palczewski, K. Effects of potent inhibitors of the retinoid cycle on visual function and photoreceptor protection from light damage in mice. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 1220-1229.
 33. Hong, W.K.; Itri, L.M. Retinoids and human cancer, Second Edition Ed.; Raven Press Ltd: New York, 1994.
 34. Gudas, L.J.; Sporn, M.B.; Roberts, A.B. *Cellular biology and biochemistry of retinoids*; Raven Press Ltd.: New York, 1994; 443-520 pp.
 35. Nason-Burchenal, K.; Dmitrovsky, E. *The retinoids: cancer therapy and prevention mechanisms*; Berlin, 1999; 301-322 pp.
 36. Dragnev, K.H.; Rigasa, J.R.; Dmitrovsky, E. The Retinoids and Cancer Prevention Mechanisms *Oncologist* **2003**, *5*, 361-368.
 37. Freemantle, S.J.; Spinella, M.J.; Dmitrovsky, E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7305-7315.
 38. Soriatan, RXlist.com, <http://www.rxlist.com/cgi/generic/acitretin.htm#>, besøkt 2. sept., 2008. 2008.
 39. Targretin, RXlist.com <http://www.rxlist.com/cgi/generic/bexarotene.htm>, besøkt 2. sept. 2008.

40. Acutane, RXlist.com, <http://www.rxlist.com/cgi/generic/isotret.htm>, besøkt 2. sept. 2008.
41. Camerini, T.; Mariani, L.; Palo, G.D.; Marubini, E.; Mauro, M.G.D.; Decens, A.; Costa, A.; Veronesi, U. Safety of the Synthetic Retinoid Fenretinide: Long-Term Results From a Controlled Clinical Trial for the Prevention of Contralateral Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 1664-1670.
42. Puduvalli, V.K.; Yung, W.K.A.; Hess, K.R.; Kuhn, J.G.; Groves, M.D.; Levin, V.A.; Zwiebel, J.; Chang, S.M.; Cloughesy, T.F.; Junck, L.; Wen, P.; Lieberman, F.; Conrad, C.A.; Gilbert, M.R.; Meyers, C.A.; Liu, V.; Mehta, M.P.; Nicholas, M.K.; Prados, M. Phase II Study of Fenretinide (NSC 374551) in Adults With Recurrent Malignant Gliomas: A North American Brain Tumor Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 4282-4289.
43. Villablanca, J.G.; Khan, A.A.; Avramis, V.I.; Seeger, R.C.; Matthay, K.K.; Ramsay, N.K.; Reynolds, C.P. Phase I trial of 13-cis-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* **1995**, *13*, 849-901.
44. Chemotherapy drugs, Isorettinoin, <http://www.chemocare.com/bio/isotretinoin.asp>, besøkt 8. september 2008.
45. Haskell, M.; Mazumder, R.M.; Peerson, J.M.; Jones, A.D.; Wahed, M.A.; Mahalanabis, D.; Brown, K.H. Use of deuterated-retinol-dilution technique to assess total body vitamin A stores of adult volunteers consuming different amounts of vitamin A1, 2, 3. *Amer. J. of Clinical Nutrition* **1999**, *70*, 874-880.
46. Bausch, J.; Rietz, P. Method for the assessment of vitamin A liver stores. *Acta Vitaminol Enzymol* **1977**, *31*, 99-112.
47. Pardo, J.A.; Mulder, P.P.J.; Van den Berg, E.M.M.; Lugtenburg, J. Synthesis of 8-, 9-, 12-, and 13-mono-¹³C-retinal. *Canadian Journal of Chemistry* **1985**, *63*, 1431-1435.
48. Weng, J.; Mata, N.L.; Azarian, S.M.; Tzekov, R.T.; Birch, D.G.; Travis, G.H. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* **1999**, *9*, 13-23.
49. Kim, S.; Fishkin, N.; Kong, J.; Nakanishi, K.; Allikmets, R.; Sparrow, J.R. Rpe65 Leu450Met variant is associated with reduced levels of the retinal pigment epithelium lipofuscin fluorophores A2E and iso-A2E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 11668-11672.
50. Soo-Jong; Kwon, Y.-J.; Han, H.-S.; Park, S.-H.; Park, M.-S.; Rho, Y.-S.; Sin, H.-S. Synthesis and Biological Activity of Novel Retinamide and Retinoate Derivatives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *52*, 501-506.

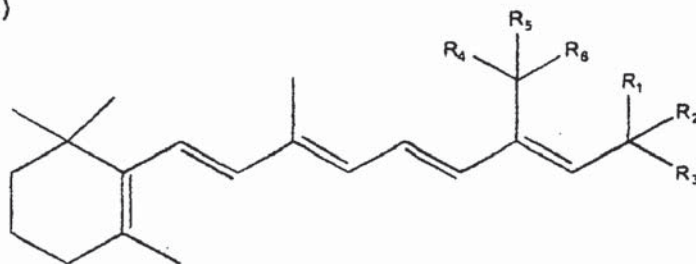
35

Omfanget av den foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset av beskrivelsen, eksemplene og foreslåtte anvendelser heri, og det kan foretas endringer forutsatt at de faller innenfor omfanget av de vedlagte krav og deres ekvivalenter.

Patentkrav

1. Sammensetning som omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og en forbindelse ifølge formel I substituert ved C₂₀-posisjonen eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

(I)



hvor:

R₁ er okso eller H;

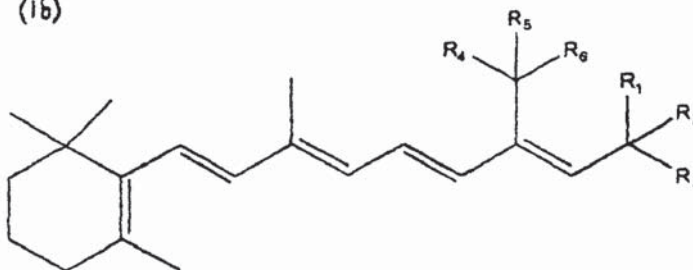
R₂ er H eller ingenting;

- 10 R₃ er hydroksy eller okso eller =CH-R₇, hvor R₇ danner et karotenoid; og
 R₄, R₅ og R₆ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av ¹H, ²H, ³H, halogen og C₁₋₈-alkyl;
 hvor R₄; R₅ og R₆ er ikke hver ¹H.

- 15 2. Sammensetning ifølge krav 1, hvor forbindelsen er C₂₀-D₃-all-*trans*-retinal.

3. Sammensetning som omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og en forbindelse ifølge formel Ib substituert ved C₂₀-posisjonen eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

(Ib)



hvor:

R₁ og R₂ er begge H, og R₃ er OH (retinol); eller

R₁ og R₂ er begge H, og R₃ er OCOCH₃ (retinolacetat); eller

R₁ og R₂ er begge H, og R₃ er OCOR (retinolester, fortrinnsvis retinolpalmitat); eller

- 25 R₁ er =O, R₂ er ingenting, og R₃ er OH (retinsyre) eller

- R_1 er H, R_2 er ingenting, og R_3 er $=CH-R_7$, hvor R_7 danner et karotenoid;
og
 R_4 , R_5 og R_6 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av 1H , 2H , 3H , halogen og C_{1-8} -alkyl;
5 hvor R_4 , R_5 og R_6 er ikke hver 1H .
4. Sammensetning ifølge krav 3, hvor forbindelsen er C_{20} -D₃-all-*trans*-retinolacetat.
 5. Sammensetning ifølge krav 1 eller 3, hvor R_4 , R_5 og R_6 er hver 3H eller hver F.
10
 6. Sammensetning ifølge krav 3, hvor R_4 , R_5 og R_6 er hver 2H .
 7. Sammensetning ifølge krav 1 til 6 for anvendelse som et terapeutisk middel.
 - 15 8. Sammensetning ifølge krav 1 til 6 for anvendelse i å forsinke dannelse av lipofuscin i retina.
 9. Sammensetning ifølge krav 1 til 6 for anvendelse i behandlingen av maculadegenerasjoner eller -dystrofier.
20
 10. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 8 eller 9, hvor: (i) når forbindelsen er ifølge formel I, velges R_1 , R_2 og R_3 som i krav 1, og R_4 , R_5 og R_6 er hver 3H eller hver F; og (ii) når forbindelsen er ifølge formel Ib, velges R_1 , R_2 og R_3 som i krav 3, og R_4 , R_5 og R_6 er hver 2H eller hver 3H eller hver F.
25
 11. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 10, hvor når forbindelsen er ifølge formel Ib, velges forbindelsen fra gruppen som innbefatter retinoler, retinolacetater, retinolestere eller betakaroten.
 - 30 12. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor slik sammensetning er i stand til å saktne eller forebygge lipofuscindannelse eller dannelsen av i det minste én av A2E eller ATR-dimer, og/eller hvor slik sammensetning er i stand til å inhibere hydrogenabstraksjon eller -migrasjon ved C_{20} -posisjonen.
 - 35 13. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, ytterligere omfattende i det minste ett kosttilskudd valgt fra gruppen bestående av:
 - (i) en synssyklus-antagonist,
 - (ii) et molekyl som inhiberer innstrømmingen av et retinoid inn i et øye,

- (iii) øyeantioksidanter,
 - (iv) mineraler,
 - (v) negativt ladde fosfolipider,
 - (vi) karotenoider,
 - 5 (vii) tilsetningsstoffer valgt fra gruppen bestående av sink, E-vitamin, D-vitamin og kombinasjoner derav;
og kombinasjoner derav.
14. Sammensetning ifølge krav 13, hvor:
- 10 (i) synssyklus-antagonisten velges fra gruppen bestående av TDH, TDT, 13-*cis*-retinsyre, ret-NH₂, og kombinasjoner derav;
 - (ii) molekylet som inhiberer innstrømming av et retinoid inn i et øye, er fenretinid,
 - (iii) øyeantioksidantene velges fra gruppen bestående av C-vitamin, E-vitamin, betakaroten, koenzym Q, OT-551, 4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylpiperidin-N-oksyd,
 - 15 butylert hydroksytoluen, resveratrol, en trolox-analog (PNU-83836-E), blåbærekstrakt, og kombinasjoner derav,
 - (iv) mineralene velges fra gruppen bestående av kobberoksid, sinkoksid; seleninnholdende forbindelser, og kombinasjoner derav,
 - (v) de negativt ladde fosfolipider velges fra gruppen bestående av kardiolipin,
 - 20 fosfatidylglyserol, og kombinasjoner derav, og
 - (vi) karotenoidene velges fra gruppen bestående av zeaxantin, lutein, og kombinasjoner derav.
15. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor forbindelsen er
- 25 til stede i sammensetningen på et nivå som er tilstrekkelig til å gi gjennomsnittlig cirka 0,1 til cirka 90 mg/dag til en pasient.
16. Enhetsdoseringsform som omfatter sammensetningen ifølge et hvilket som helst av de foregående krav.
- 30
17. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvilken sammensetning er et vitamintilskudd eller en farmasøytisk sammensetning.
18. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav i formen av en
- 35 farmasøytisk sammensetning for oralt inntak, eller som en salve eller dråper for lokal administrasjon på øynene, eller for parenteral eller annen administrasjon på en hvilken som helst formålstjenlig måte, slik som intraperitonealt, subkuttant, topisk, intradermalt, inhalasjon, intrapulmonalt, rektalt, vaginalt, sublingvalt, intramuskulært, intravenøst,

intraarterielt, intratekalt eller intralymfatisk.

19. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav for anvendelse i
behandlingen av macula- eller retinadegenerasjoner eller -dystrofier, slik som Stargardt,
5 Vitelliform eller Best (VMD), Sorsby fundusdystrofi, aldersrelatert maculadegenerasjon
eller malattia leventinese.

1/7

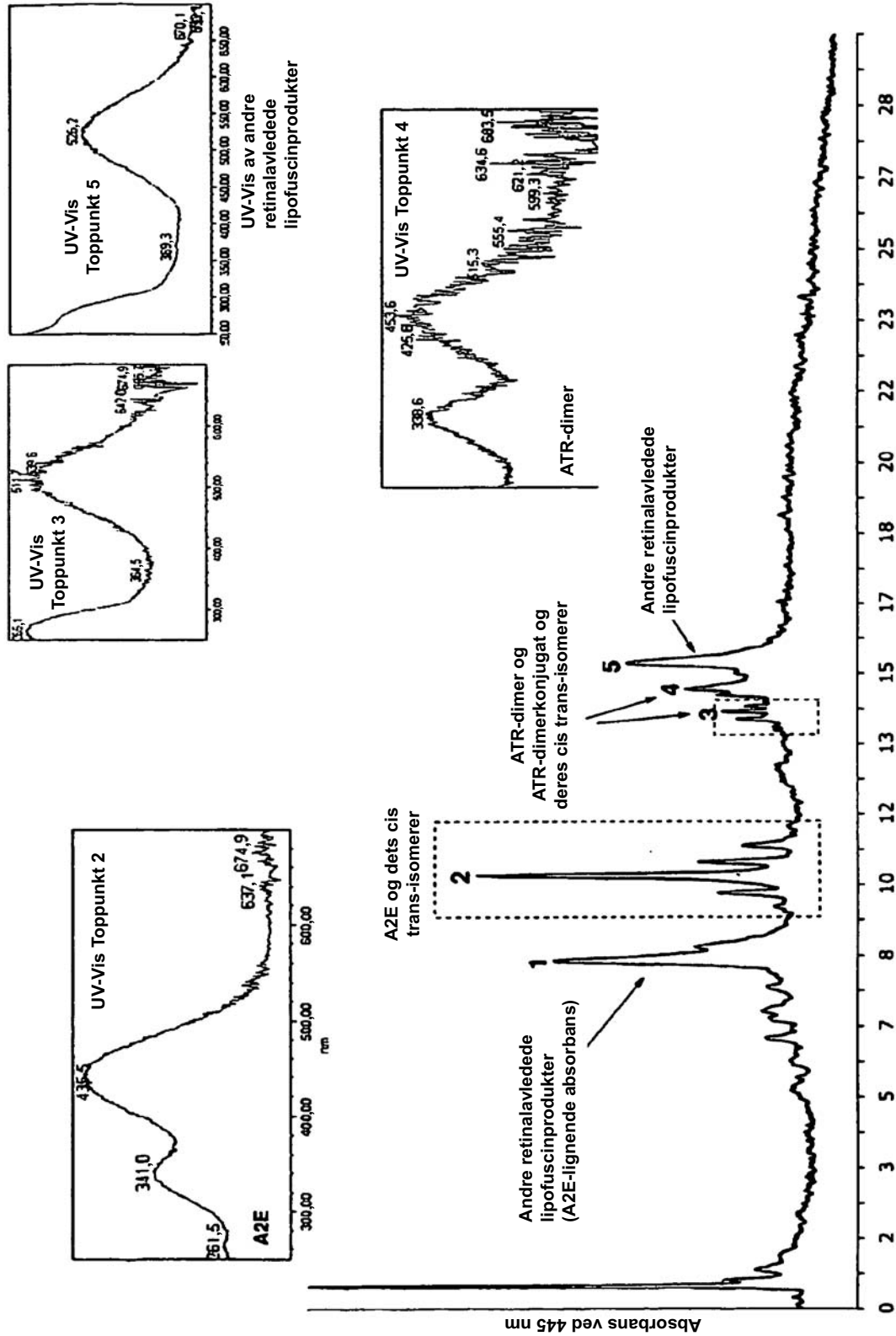


Fig. 1

2/7

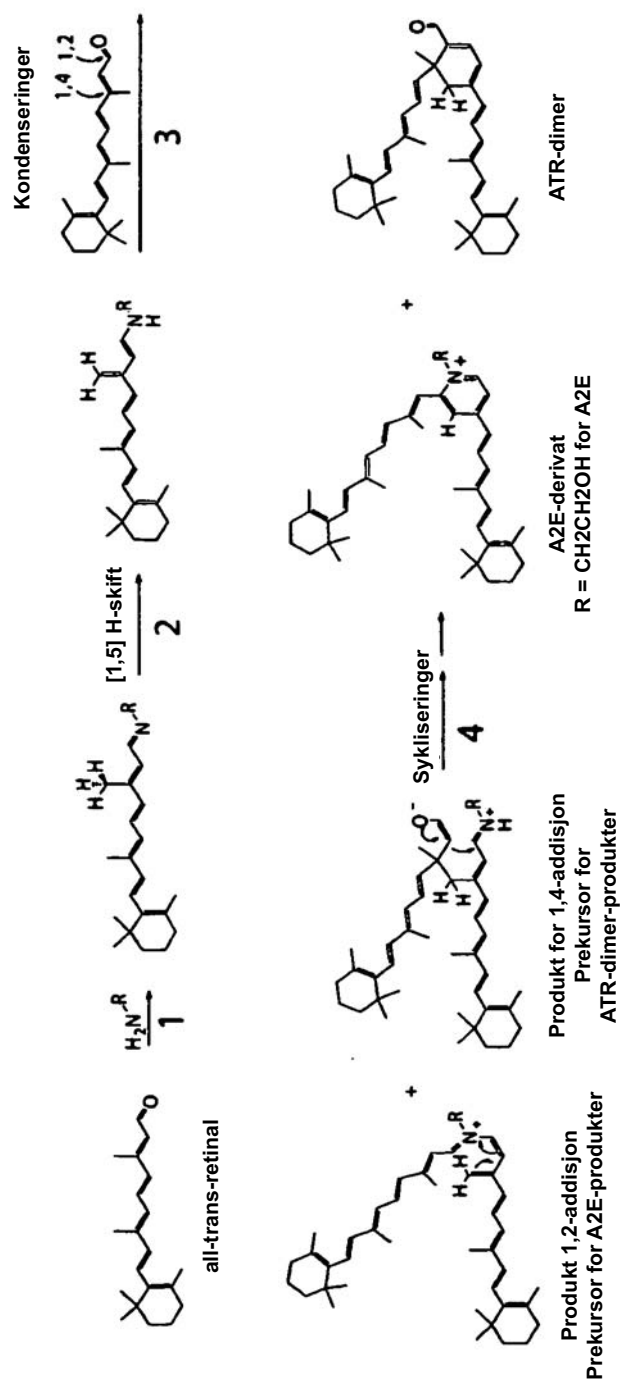


Fig. 2

3/7

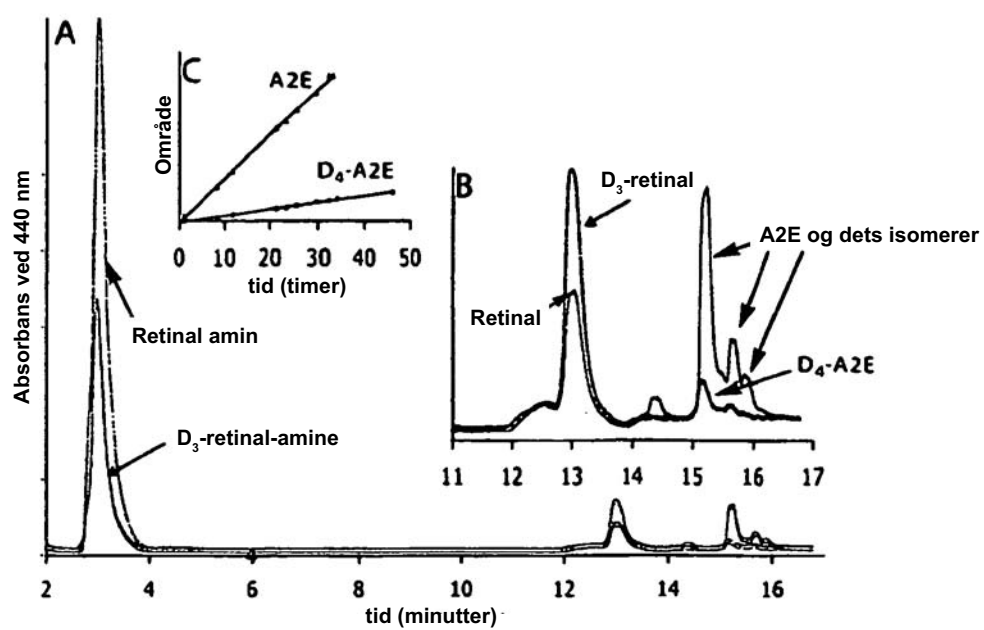


Fig. 3

4/7

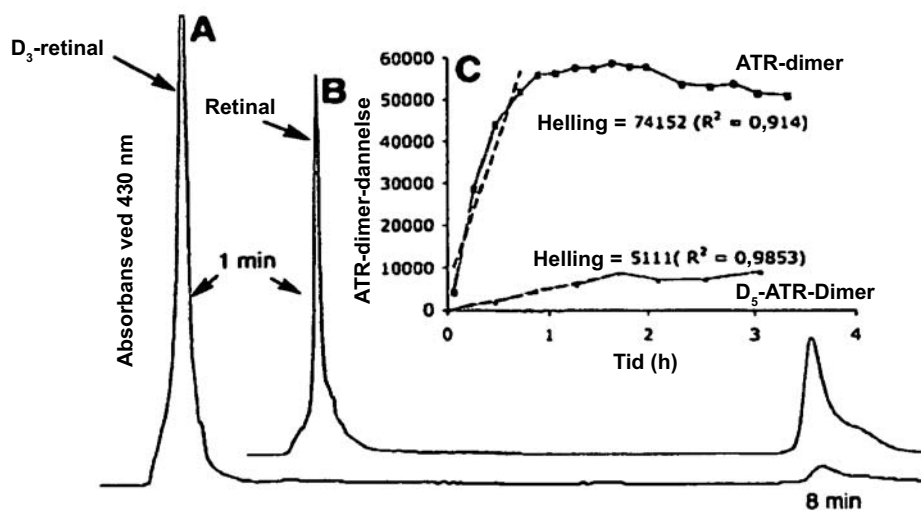


Fig. 4

5/7

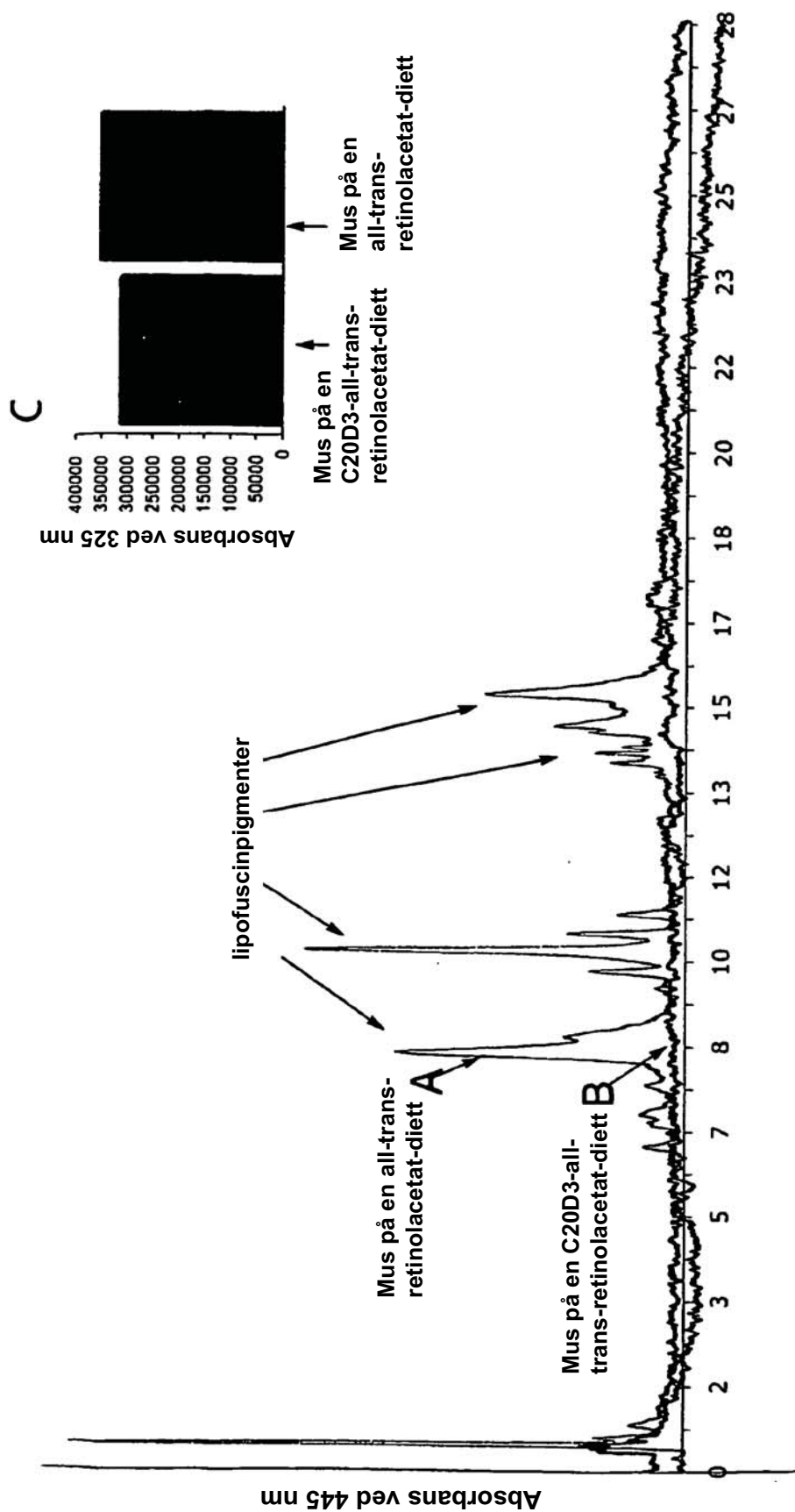


Fig. 5

6/7

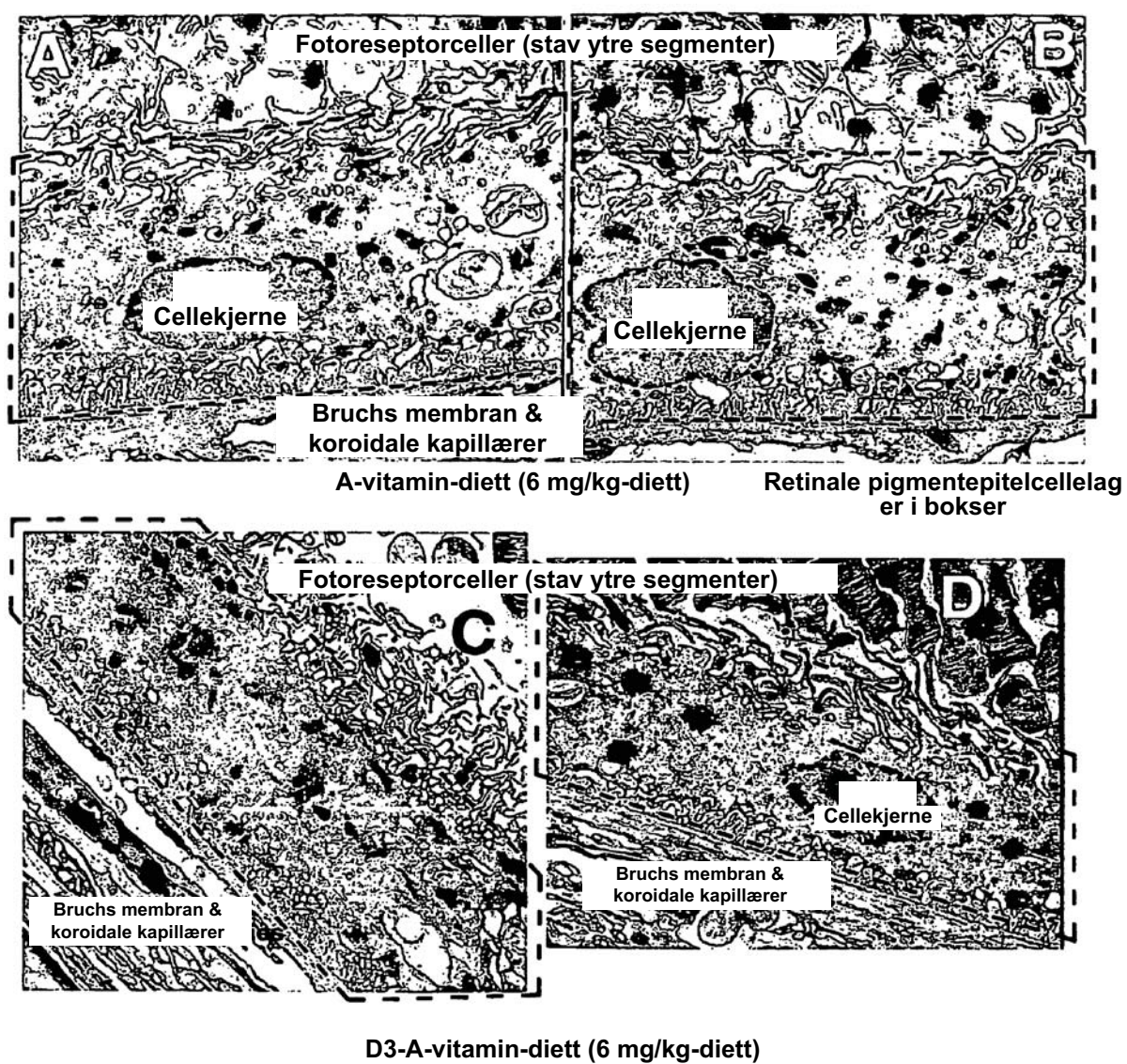


Fig. 6

7/7

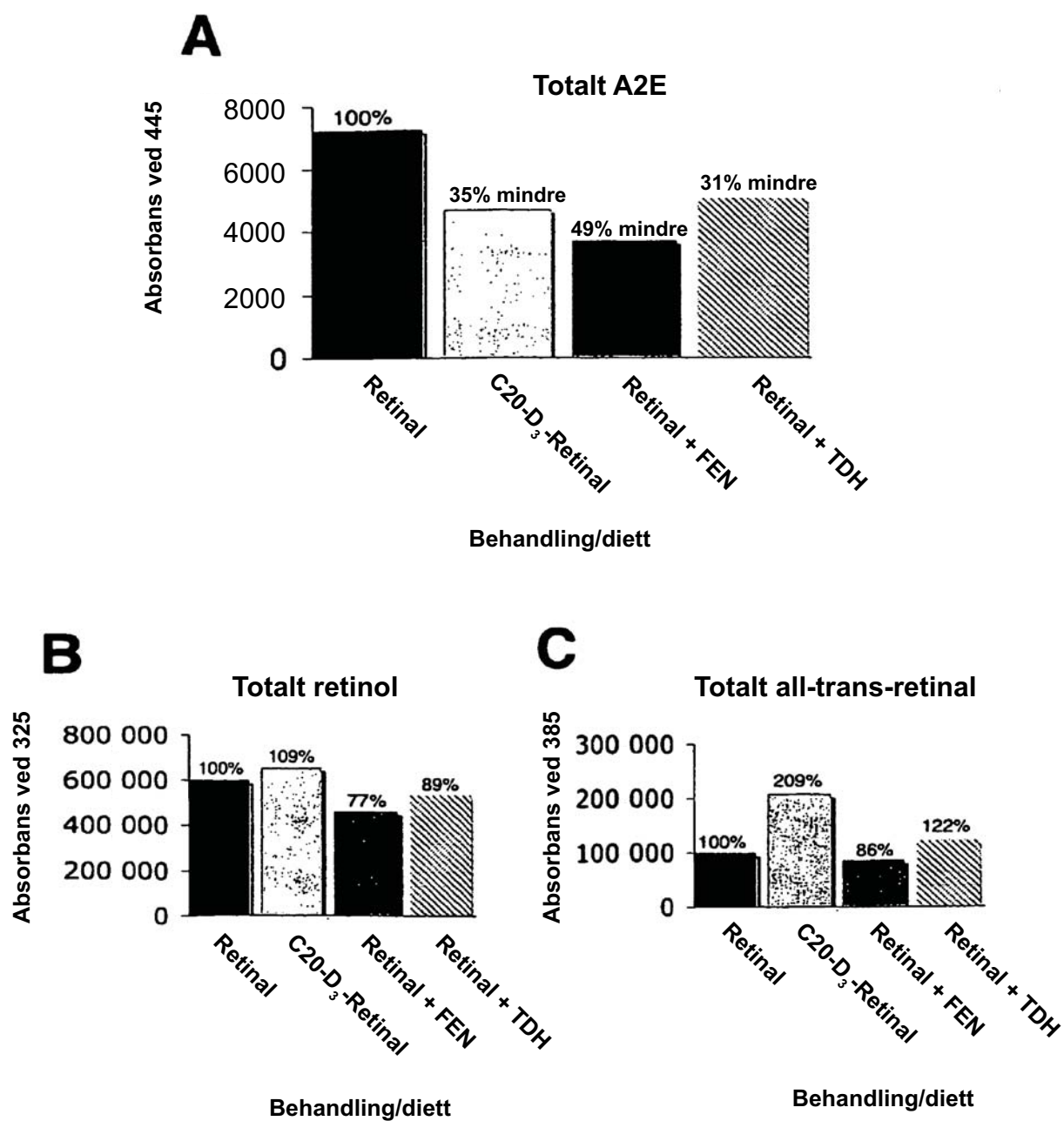


Fig. 7