



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201410245 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：102120341

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 07 日

(51)Int. Cl. : A61K31/502 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

(30)優先權：2012/06/11 美國

61/658,304

(71)申請人：馬庫可亮爾公司 (美國) MACUCLEAR, INC. (US)

美國

(72)發明人：露易斯 帕梅拉 LEWIS, PAMELA A. (US)；沃勒 威廉 WOLLER, WILLIAM H. (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：4 共 90 頁

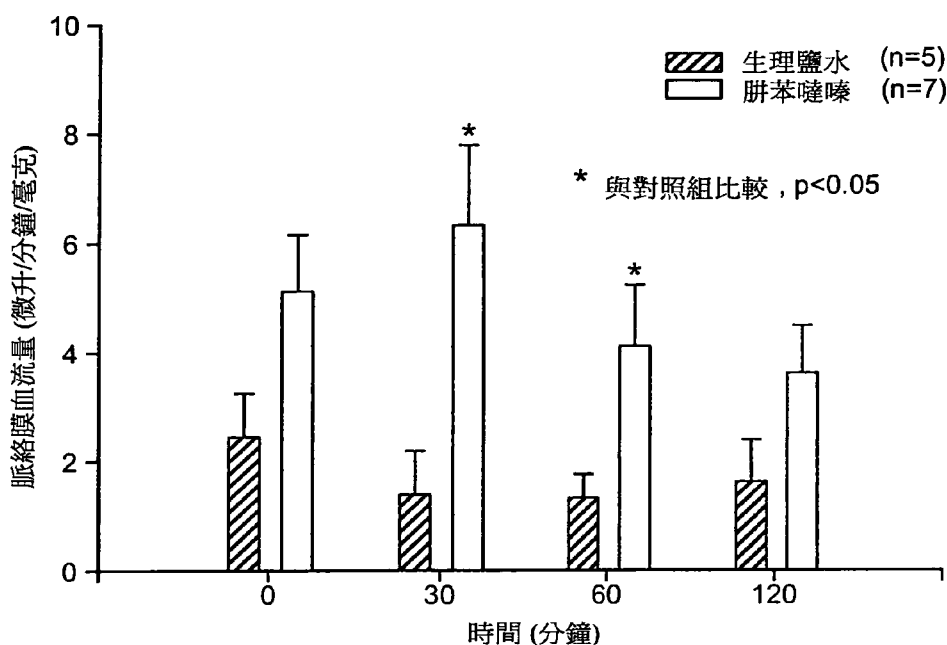
(54)名稱

治療用調合物及治療方法

THERAPEUTIC FORMULATION AND METHODS OF TREATMENT

(57)摘要

本揭露內容關於包含肼苯噻嗪(hydralazine)之藥學調合物及以該調合物治療眼睛疾病和病況。本揭露內容亦關於製備該藥學調合物的方法。



第 1 圖



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201410245 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：102120341

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 07 日

(51)Int. Cl. : A61K31/502 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

(30)優先權：2012/06/11 美國

61/658,304

(71)申請人：馬庫可亮爾公司 (美國) MACUCLEAR, INC. (US)

美國

(72)發明人：露易斯 帕梅拉 LEWIS, PAMELA A. (US)；沃勒 威廉 WOLLER, WILLIAM H. (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：4 共 90 頁

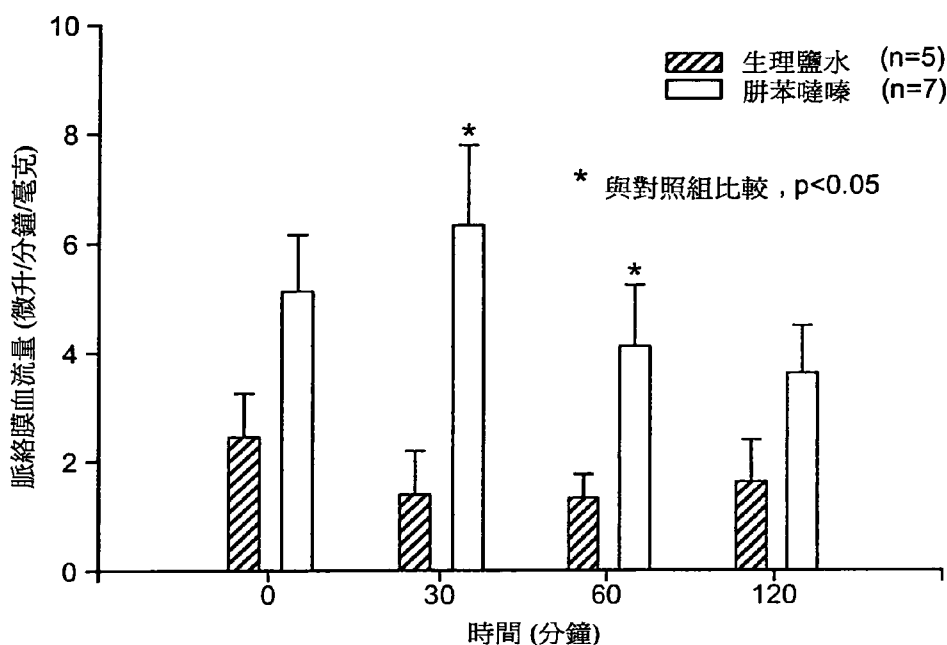
(54)名稱

治療用調合物及治療方法

THERAPEUTIC FORMULATION AND METHODS OF TREATMENT

(57)摘要

本揭露內容關於包含肼苯噻嗪(hydralazine)之藥學調合物及以該調合物治療眼睛疾病和病況。本揭露內容亦關於製備該藥學調合物的方法。



第 1 圖

發明摘要

※申請案號：102120341

※申請日：102 年 06 月 07 日

※IPC 分類：A61K 31/502 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

治療用調合物及治療方法

Therapeutic formulation and methods of treatment

○ 【中文】

本揭露內容關於包含肼苯噻嗪(hydralazine)之藥學調合物及以該調合物治療眼睛疾病和病況。本揭露內容亦關於製備該藥學調合物的方法。

【英文】

The present disclosure relates pharmaceutical formulations comprising hydralazine in the treatment of eye diseases and conditions with the formulations.
The present disclosure also related to methods of preparing the pharmaceutical formulations.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

治療用調合物及治療方法

Therapeutic formulation and methods of treatment

相關申請案之交叉參考資料

本申請案主張 2012 年 6 月 11 日提交之美國臨時申請案 61/658,304 之優先權，其全部內容以引用方式被併入本文。

【技術領域】

本文所描述之標的項係關於眼用調合物及眼睛之治療方法。

【先前技術】

老化為引起細胞、組織和器官，包括眼睛之脈絡膜血管、視網膜色素上皮細胞（RPEC）及 Bruch 膜變性的慢性過程。動脈硬化性老化改變脈絡膜血管，尤其是黃斑脈絡膜毛細血管，導致總毛細血管流量減少。結果，視網膜色素上皮開始積累玻璃膜疣和脂褐質，改變細胞的形狀、密度、色素沉著、溶酶體活性及細胞外基質形成。漸漸地，Bruch 膜顯示出增厚及滲透性降低，導致破裂而出現脈絡膜新血管增生（CNV），此最終導致新血管增生性老

年性黃斑變性（亦為濕性老年性黃斑變性）和眼盲。臨床證據提示脈絡膜缺血或血流量減少可能與許多嚴重的視網膜疾病有關，包括老年性黃斑變性（AMD 或 ARMD）（Grunwald et al., 1998, Invest Ophthalmol Vis Sci., 39(2):385-390；Grunwald et al., 2005, Invest Ophthalmol Vis Sci., 46(3):1033-1038；Ciulla et al., 1999, Am J. Ophthalmol, 128(1):75-80；Metelitsina et al., 2006, Br J Ophthalmol, 90(3):342-346；Metelitsina et al., 2008, Invest Ophthalmol Vis Sci, 49(1):358-363）。眼部及系統性血管因素（諸如全身性高血壓和高眼壓症）二者被認為涉及 AMD 之發展及脈絡膜新血管增生（Metelitsina 2006；Metelitsina 2008；授讓予 Nathanson 等人之美國專利第 5,500,230 號）。因此，有必要鑑定能防止脈絡膜新血管增生和/或增加脈絡膜血流量之作用劑。

被嘗試用來治療老年性黃斑變性的方法有許多，但都沒有成功。這些方法包括用於脈絡膜新血管增生之雷射光凝術、放射治療、凹下隱匿性脈絡膜新血管增生之經瞳孔溫熱療法、黃斑下手術，侷限性黃斑轉位術、手術輔助器、針對玻璃膜疣之氬雷射、用於治療濕性 AMD 之紅外二極管雷射光凝術。最近，美國專利第 8,088,773 號（其以引用方式被併入本文）中描述用於治療非新血管增生性或乾性 AMD 之包含降壓藥（諸如胍苯噻嗪）的組成物。

前述相關技藝之實例及與其相關之限制旨在用於說明，而非為了排除。熟習本技藝之人士在閱讀本專利說明

書及研究附圖時將可清楚明白其他相關技藝之限制。

【發明內容】

下文中描述和說明之觀點及其實施例係爲了示範和說明，而非限制本發明之範圍。

於一觀點中係描述眼用組成物。於一實施例中，該眼用組成物包含存在量爲約 0.02 至 2 重量%之包含胍苯噻嗪的藥學活性藥物，及下列之一或多項：pH 值在 3.5-4.5 之間的一或多種緩衝溶液；一或多種螯合劑；一或多種等張劑；一或多種防腐劑；一或多種黏度增強劑，及一或多種稀釋劑。於一實施例中，該組成物之 pH 係在 4.0 至 4.4 之間。於另一實施例中，該眼用組成物包含存在量爲約 0.02-2 重量%之包含胍苯噻嗪的藥學活性藥物；存在量爲 8-12 重量%之 pH 值在 3.9-4.5 之間的醋酸鹽緩衝溶液；存在量爲 0.5-2 重量%之丙二醇；存在量爲 0.25-1 重量%之氯化鈉；存在量爲 0.015-0.06 重量%之對羥基苯甲酸甲酯；存在量爲 0.01-0.04 重量%之爲 50%溶液形式的苯扎氯銨（benzalkonium chloride）；及存在量爲 0.008-0.030 重量%之乙二胺四醋酸二鈉。於一實施例中，該組成物之 pH 係在 4.0 至 4.4 之間。

該藥學活性藥物可能包含鹽酸胍苯噻嗪。於另一實施例中，該藥物之存在量係在 0.5-2 重量%之間。

於另一實施例中，該醋酸鹽緩衝溶液之 pH 值爲約 4.2 且存在量爲約 10 重量%。該醋酸鹽緩衝溶液可能包含

醋酸鈉及 2N 醋酸。

於一實施例中，丙二醇之存在量為約 1 重量%。於另一實施例中，對羥基苯甲酸甲酯之存在量為約 0.03 重量%。再於另一實施例中，苯扎氯銨係以 50%溶液形式存在且存在量為約 0.02 重量%。於另一實施例中，乙二胺四醋酸二鈉之存在量為約 0.015 重量%。

於另一觀點中係考量用於製備眼用調合物的方法。於一實施例中，該方法包含將稀釋劑與 pH 值為約 3.5 至 4.5 之一或多種緩衝溶液混合以形成第一中間混合物，在該第一中間混合物中添加一或多種螯合劑以形成第二中間混合物，在該第二中間混合物中添加一或多種潤滑劑以形成第三中間混合物，在該第三中間混合物中添加一或多種等張劑以形成第四中間混合物，在該第四中間混合物中添加一或多種防腐劑以形成第五中間混合物，在該第五中間混合物中添加包含胍苯噻嗪之藥學活性藥物以形成眼用調合物。

於一實施例中，該緩衝劑為 pH 值在約 3.9-4.5 之間的醋酸鹽緩衝溶液，其添加量為可在調合物中提供約 8-12 重量%之醋酸鹽緩衝溶液的量。於另一實施例中，該醋酸鹽緩衝溶液之添加量為可在調合物中提供約 10 重量%之醋酸鹽緩衝液的量。於進一步之實施例中，該醋酸鹽緩衝溶液係由醋酸鈉及 2N 醋酸所組成。

於一實施例中，該螯合劑為乙二胺四醋酸二鈉，其添加量為可在調合物中提供約 0.008-0.030 重量%之乙二胺

四醋酸二鈉的量。於進一步之實施例中，乙二胺四醋酸二鈉之添加量為可在調合物中提供約 0.015 重量%之乙二胺四醋酸二鈉的量。

於一實施例中，該潤滑劑為丙二醇，其添加量為可在調合物中提供約 0.5-2 重量%之丙二醇的量。於進一步之實施例中，丙二醇之添加量為可在調合物中提供約 15 重量%之丙二醇的量。

於另一實施例中，該等張劑為氯化鈉，其添加量為可在調合物中提供約 0.25-1 重量%之氯化鈉的量。於一實施例中，氯化鈉之添加量為可在調合物中提供約 0.5 重量%之氯化鈉的量。

再於另一實施例中，該防腐劑為苯扎氯銨，其添加量為可在調合物中提供約 0.01-0.04 重量%之苯扎氯銨的量。於另一實施例中，苯扎氯銨之添加量為可在調合物中提供約 0.02 重量%之苯扎氯銨的量。於進一步之實施例中係添加第二防腐劑，其中該第二防腐劑為對羥基苯甲酸甲酯，其添加量為可在調合物中提供約 0.015-0.06 重量%之對羥基苯甲酸甲酯的量。再於另一實施例中，對羥基苯甲酸甲酯之添加量為可在調合物中提供約 0.03 重量%之羥基苯甲酸甲酯的量。

於實施例中，該藥學活性藥物為胍苯噻嗪，其在調合物中之存在量為約 0.5-2 重量%。於進一步之實施例中，該藥學活性藥物為鹽酸胍苯噻嗪。於特定之實施例中，該藥學活性藥物為鹽酸胍苯噻嗪，其在調合物中之存在量為

約 1 重量 %。

於實施例中，該一或多個添加步驟進一步包含一邊添加一邊混合。

於進一步之觀點中係考量用於治療黃斑變性的方法。於實施例中，該方法包含投予處於黃斑變性之風險中或被診斷出患有黃斑變性的眼睛此處所描述或藉由此處所描述之方法製備的眼用組成物。於一實施例中，該黃斑變性為老年性黃斑變性。於一特定之實施例中，該老年性黃斑變性為乾性老年性黃斑變性。

可領會的是，上述實施例可與所描述之一或多種，或全部的另外實施例組合。除了上述之示範觀點及實施例外，經由參考附圖和研究下列說明將可清楚明白進一步之觀點和實施例。

本發明之方法和組成物的另外實施例，等將可從下列描述、附圖、實例及申請專利範圍顯明。如同可從前文及下文之描述中理解者，此處所描述之各個和每一特性，以及二或多種這類特性之各個和每一組合係包括在本揭露內容之範圍內，其先決條件為包括在這類組合中之特性不會彼此不一致。此外，任何特性或特性之組合可能從本發明之任何實施例被具體排除。本發明之其他觀點和優點（尤其是當與所附之實例和附圖一起考量時）列於下列描述及申請專利範圍中。

詳細說明

下文中將更充分地描述各種觀點。然而，這類觀點可能以許多不同形式體現且不應該被解釋為限制在此處所提出的實施例；相反地，提供這些實施例，從而使本揭露內容徹底且完整，並將其範圍充分地傳達給熟習本技藝之人士。

1. 定義

除非文義另有明確規定，本專利說明書中所使用之單數型“一(a、an)”及“該(the)”包括複數型。因此，例如“藥物”之引用包括單一藥物及二或多個相同或相異之藥物，“賦形劑”之引用包括單一賦形劑及二或多個相同或相異之賦形劑，等。

本文中濃度、量、pH 值，等通常以範圍格式呈現。範圍格式之描述僅是爲了方便和簡潔，不應被解釋爲是不容變更本發明範圍的限制。因此，範圍之描述應被視爲已具體揭露所有可能的子範圍，以及在該範圍內的各個數值。例如，範圍之描述（諸如 pH 爲 3.8 至 4.4）應被視爲已具體揭露子範圍，諸如 3.8 至 4.4、3.8 至 4.2、3.8 至 4.0、4.0 至 4.4、4.2 至 4.4、3.9 至 4.2、4.0 至 4.2，等，以及在該範圍內之個別數字，諸如 3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3 及 4.4。此結構適用在本揭露內容全文中，不管是所有範圍廣度及所有上下文。

“治療上有效量”係指有用於預防、治療或減緩視力障礙或視力減退或眼睛疾病之進展的藥學活性物質、作用劑

或藥物。

此處所引用之“藥物”或“作用劑”或任何特定之組成物或化合物的名字（諸如胍苯達嗪）包括該藥學活性化合物及其藥學上可接受之鹽、先驅藥物，諸如酯或醚，或先驅藥物之鹽、或溶劑化物，諸如乙醇化物或該藥學活性化合物之其他衍生物。此處所引用之“藥物或其鹽”或“作用劑或其鹽”，或任何特定之化合物或組成物的名字（諸如胍苯達嗪），連同“或其鹽”欲指該藥學活性劑及該藥物之任何藥學上可接受的鹽。該藥學活性藥物之鹽可能從無機酸或有機酸及鹼衍生。無機酸之實例包括，但不限於鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、過氯酸及磷酸。鹼之實例包括，但不限於鹼金屬（例如鈉）氫氧化物、鹼土金屬（例如鎂）氫氧化物、氨及式 $N-W_4^+$ 之化合物，其中 W 為 C_1-C_4 烷基。有機鹽之實例包括：醋酸鹽、丙酸鹽、丁酸鹽、己酸鹽、庚酸鹽、十一烷酸鹽、棕櫚酸鹽、環戊烷丙酸鹽、己二酸鹽、藻酸鹽、天門冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、檸檬酸鹽、草酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、乳酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、樟腦酸鹽、菸鹼酸鹽、pectinate、苦味酸鹽、新戊酸鹽、甲磺酸鹽、葡萄糖酸鹽、二葡萄糖酸鹽、半硫酸鹽、甲苯磺酸鹽、乙磺酸鹽、2-羥基乙磺酸鹽、十二烷基硫酸鹽、樟腦磺酸鹽、苯磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、硫氰酸鹽、磷酸鹽、甘油磷酸鹽及苯丙酸鹽。其他鹽類列於：

Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed., Mack Publishing Co., Enston, Pa. (1995)第 83 章中

（以下稱為 REMINGTON）。

如本文所使用之“眼睛疾病”係指引起視力喪失、模糊或中心近距和遠距視力減退、盲點、物體顯示出不同的顏色或形狀、眼血管疾病之神經眼科表現的任何種類之疾病、損傷或缺陷，包括缺血性視神經病變、前部缺血性視神經病變、視網膜動脈阻塞、無症狀視網膜栓子、無症狀視網膜栓子或視網膜組織缺血、視網膜水腫、黑朦症（amaurosis fugax）、視野縮小、眼部血管阻塞、小動脈內血流量停滯，白內障、青光眼、眼球突出（proptosis）、眼瞼回縮、限制性肌病、複視（diplopia）（複視(double vision)）、壓迫性視神經病變和/或暴露性角膜炎。於一實施例中，該眼睛疾病為黃斑變性或糖尿病性眼睛疾病。於進一步之實施例中，該眼睛疾病為老年性黃斑變性。再於另一實施例中，該眼睛疾病為乾性或非新血管增生性老年性黃斑變性。於另一實施例中，該眼睛疾病為糖尿病性黃斑水腫。可領會的是，該“眼睛疾病”可能包含一或多種眼睛疾病。亦即，本發明之調合物可能治療、預防和/或減緩/停止一或多種眼睛疾病的進展。本發明不欲受限於治療任何造成視力缺陷或損傷之特定的潛在疾病。

本文所使用之“黃斑變性”意指導致部分黃斑退化之任何病況。此變性可能是部分或全部，且其不欲受限於該疾病之末期。例如，在老年性黃斑變性方面，“黃斑變性”意在包括被診斷為患有玻璃膜疣之受試對象，即使該受試對

象沒有任何視力受損之症狀。在非限制性實施例中，黃斑變性可能係指老年性黃斑變性。

本文所使用之化合物“運作以減少脈絡膜新血管增生”係指統計學上顯著減少脈絡膜新血管增生，其係在眼睛 Bruch 膜之物理破壞（例如經由雷射或來自眼睛疾病）後投服化合物一段時間後，藉由本領域中已知之方法（例如藉由螢光素血管造影）測量。本文中描述用於鑑定運作以減少脈絡膜新血管增生之化合物的方法之詳細說明。

“異構體”意指任何由相同比例之相同元素組成，但原子之三維安排不同的二或多種物質，包括對映異構體（即，鏡像）及非對映異構體。

本文所使用之術語“鹽類”係指任何與此處所包含之已鑑定之化合物複合，但同時保留所需功能（例如生物活性）的鹽。這類鹽之實例包括，但不限於與無機酸（例如鹽酸、氫溴酸、硫酸、磷酸、硝酸，等）形成之酸加成鹽，及與有機酸形成的鹽，該有機酸為，諸如，但不限於醋酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、蘋果酸、富馬酸、馬來酸、抗壞血酸、苯甲酸、單寧酸、雙羥萘酸、藻酸、聚麩胺酸、萘磺酸、萘二磺酸及聚半乳糖醛酸。鹽化合物亦可以熟習本技藝之人士所已知之藥學上可接受之季銨鹽形式投服，具體而言，其包括式 $--NR, R', R''^+Z^-$ 所示之季銨鹽，其中 R、R'、R'' 獨立為是氫、烷基、或苄基，且 Z 為抗衡離子，包括，但不限於氯化物、溴化物、碘化物、醇鹽、甲苯磺酸鹽、甲磺酸鹽、磺酸鹽、磷酸鹽或羧酸鹽

（諸如苯甲酸鹽、琥珀酸鹽、醋酸鹽、羥乙酸鹽、馬來酸鹽、蘋果酸鹽、富馬酸鹽、檸檬酸鹽、酒石酸鹽、抗壞血酸鹽、肉桂酸鹽、扁桃酸鹽及二苯基醋酸鹽）。

“不良藥物反應”意指對藥物之任何有毒和/或無意的反應，且發生在用於預防、診斷或療法之劑量下，包括副作用、毒性、過敏、藥物相互作用、併發症或其他特質。副作用通常為由藥物之治療性血清水準所產生之不良症狀，其係由藥物對意想不到之器官系統的藥理作用造成（例如由抗膽鹼能抗組織胺造成之視力模糊）。毒性副作用係由過度或長期之化學暴露於藥物所造成之不良症狀或其他效果（例如洋地黃（*digitalis*）毒性和肝臟毒性）。過敏反應為免疫介導之不良反應（例如過敏性休克、過敏）。藥物相互作用為與其他藥物、食物或疾病狀態（例如華法林（*warfarin*）與紅黴素、西沙必利（*cisapride*）與葡萄柚、洛哌丁胺（*loperamide*）與艱難梭狀芽孢桿菌性腸炎）相互作用所造成之影響，通常是不利的。併發症為由藥物引起之疾病（例如由 NSAID 引起之胃潰瘍、由雌激素引起之血栓症）。藥物不良反應可能由已知或未知之機制介導（例如與氯黴素或氯氮平（*clozapine*）有關之粒細胞缺乏症）。這類藥物不良反應可經由本技藝已知之受試對象觀察、分析或動物模型測定。

當術語“衍生物”之使用與化學化合物有關時，其係指一種與化合物類似之結構，其在施用時（例如投予受試對象時）能夠直接或間接提供該化學化合物被揭露之所具功

能（儘管該衍生物可能具有增加或減少之功能）。例如，以一個原子取代化學化合物中之另一原子可提供具有類似結構之化合物，例如碳原子取代氮原子。該具類似結構之化合物可能具有類似功能，例如減少脈絡膜新血管增生。某些主張專利權之實施例欲包含化學結構中之細微變化，其先決條件為該衍生物可以治療、預防、制止或延緩眼睛疾病之進展。

術語“管理”當與疾病或病況一起使用時意指提供有益效果給予投服不會治愈疾病之預防或治療劑的受試對象。於某些實施例中，受試對象被投予一或多種預防或治療劑以管理疾病，從而防止該疾病之進展或惡化。

本文所使用之術語“預防（prevent 和 preventing）”包括防止疾病之復發、散播或發作。本發明不欲受限於完全預防。於一些實施例中係將發病延遲，或降低疾病之嚴重性。

“受試對象”意指任何動物，較佳為人類患者、家畜或寵物。

本文所使用之術語“治療（treat 和 treating）”並不限於當該受試對象（例如患者）被治癒且該疾病被根除之情況。相反地，本發明亦設想僅減少症狀、改善視力（到某一程度）、延遲和/或制止疾病進展之治療。

本文所使用之術語“藥學上可接受”係指由聯邦或州政府之監管機構核准或列於美國藥典或其他普遍被認可之用於動物（尤其是用於人類）的藥典中者。

II. 藥學眼用調合物

於第一觀點中係提供眼用組成物或調合物。該藥學調合物包含降血壓劑，包括，但不限於肼苯噻嗪或其鹽、經取代之衍生物，或未經取代之衍生物以及特定之其他組分，其全體提供如下文中說明之有利的組成物。

在支持該申請專利之組成物和方法所進行之研究中，依實例 1 中之描述製備包含肼苯噻嗪之眼用調合物。於一實施例中，該調合物包含肼苯噻嗪和提供改善之穩定性和/或生物利用度的選定之賦形劑。

肼苯噻嗪

肼苯噻嗪為苯並噻嗪衍生物，先前被作為降血壓劑。肼苯噻嗪在動物和人類體內之生化、生理、代謝及排泄均已被充分研究（Velliquette et al., 2003, J Pharmacol Exp Ther, 307(3):1104-1111；Carmody et al., 2007, Cardiol Rev, 15(1):46-53；Adorisio et al., 2006, Heart Fail Rev, 11(2):109-123；Artman et al., 1984, Circulation, 69(5):949-954；Cameron et al., 1984, 289 (6442):410-412；and Perry et al., 1973, Am J Med, 54(1):58-72）。肼苯噻嗪為引起小動脈肌肉鬆弛、施加外周血管擴張作用之直接作用性抗高血壓藥物，但其如此運作之機制尚未被充分理解（Freemantle et al., 2008, Coch Dat Sys Rev, 2008(2):1-5；Brunton et al. eds., 2008, Goodman and Gilman's

Manual of Pharmacology and Therapeutics, 11th ed., New York ; Apresoline[®] package insert, Ciba-Geigy, 1995) 。

據提出之建議，肼苯噻嗪改變鈣之代謝，從而干擾引起收縮狀態啟動或延長之血管平滑肌內的鈣移動。外周血管擴張作用造成數種心臟方面的作用：降低動脈血壓（舒張多於收縮）；外周血管阻力降低；及心跳速率、每搏輸出量和心輸出量增加。肼苯噻嗪通常會增加血漿中之腎素活性，可能是回應反射性交感神經放電。該藥物亦已被發現能維持或增加腎臟和腦部血流量。血管擴張劑（一種類別）在眼睛內之一些預期的潛在作用包括擴張小動脈（這被預期將改善脈絡膜和視網膜中之血液循環），及鬆弛動脈或小動脈壁痙攣（由於眼睛之病變或其他攣縮造成）並避免硬化症（Laws, 1964, Can Med Assoc J, 91:325-330）。

肼苯噻嗪可透過胃腸道被充分吸收，在快速乙醯化者體內之系統性生物利用度為 16%，在慢乙醯化者體內為 35%（Brunton 2008；Hydralazine hydrochloride USP package insert, Par Pharmaceuticals, 2005）。肼苯噻嗪在腸道和/或肝臟中被 N-乙醯化。肼苯噻嗪之血漿半衰期為 3-7 小時，儘管其降血壓作用能持續長達 12 小時（Par 2005）。肼苯噻嗪與 α -酮酸迅速結合以形成腓，而主要代謝產物為肼苯噻嗪丙酮酸腓。由於乙醯化形式的肼苯噻嗪為鈍性的，快速乙醯化者通常較慢乙醯化者需要較大之劑量，雖然大約一半之美國人口為快速乙醯化者；乙醯化之

速率為生物利用度的一種因素，但不是系統性排除藥物的因素，因為其肝清除率高（系統性清除率為 50 毫升/公斤/分鐘，超過肝臟血流量）。口服胍苯噻嗪在血漿中之峰值濃度和最大降血壓作用發生在投藥之 30-120 分鐘內。肌肉內注射胍苯噻嗪可在組織萃取物中誘導出缺氧誘導因子-1 α （HIF-1 α ）蛋白質，其反過來調節血管內皮生長因子（Knowles et al., 2004, Circ Res, 95(2):162-169-提示胍苯噻嗪發揮促血管生成作用且可能有益於缺血性心臟病）。視網膜中血流量減少和局灶性缺血已被提示為 AMD 進展中之重要因素（Grunwald 1998, Metelitsina 2006, Spraul et al., 1998, Invest Ophthalmol Vis Sci, 39(11): 2201-2202；Pournaras et al., 2006, Invest Ophthalmol Vis Sci, 47(4):1581-1586；Feigl et al., 2007a, Clin Exp Optom, 90(4):263-271; Feigl et al., 2007b, Eye, 21(6):689-696）。

於一實施例中，該用於調合物中之胍苯噻嗪為胍苯噻嗪鹽，諸如鹽酸胍苯噻嗪。鹽酸胍苯噻嗪為白色至灰白色、無臭結晶型粉末，其分子量為 196.64 且具有分子式 $C_8H_8N_4 \cdot HCl$ 。鹽酸胍苯噻嗪 USP 可以 1：25 溶於水中及以 1：500 溶於酒精中。在水中之 2%溶液之 pH 值為約 3.5-4.2，且顯示出在約 3.5-4.5 之 pH 值下非常穩定。pH 值之變化形廓指出鹽酸胍苯噻嗪在 pH 3.5 附近高度穩定，該藥物在此 pH 值下為陽離子形式。當為陽離子形式時，在 25°C，pH 3.5 下之速率常數為 1.5 年，損失低於

10%（藉由外推法取得）。

較佳地，該胍苯噻嗪調合物為含有胍苯噻嗪或其鹽、經取代或未經取代之衍生物的眼睛或眼用溶液或調合物。於一特殊實施例中，該調合物包含鹽酸胍苯噻嗪。於另一實施例中，該調合物包含胍苯噻嗪之醋酸鹽。於實施例中，該眼溶液為水溶液。

賦形劑

包含在調合物中之示例性賦形劑包括攝取增進劑、增稠劑及穩定性增途劑、緩衝劑、防腐劑、螯合劑、潤滑劑、等張劑、調節 pH 值之酸和鹼和/或稀釋劑。

本技藝中已知合適之緩衝劑，包括，但不限於醋酸鹽、抗壞血酸鹽、三羥甲基胺基甲烷（tris）、醋酸鈉三水合物、醋酸、檸檬酸鹽緩衝劑、硼酸鹽、碳酸鹽、醋酸鹽和/或磷酸鹽。於實施例中係使用一或多種緩衝劑。於一非限制性實施例中，在溶液或油膏中包含合適量之緩衝劑以將該溶液或油膏維持在生理上可耐受之範圍內。於非限制性之實施例中係在溶液或油膏中添加適合量之緩衝劑以將 pH 值保持在約 3.8-7.5 或 3.8-4.4。眼用溶液之 pH 值的範圍一般為約 3.0-7.7，大部分之眼用溶液的 pH 值為約 5-7。於實施例中，本發明調合物之 pH 值為約 3.0-7.7 或約 5-7。於其他實施例中，該眼用溶液的 pH 值為約 3.5-4.5、3.5-4.2、3.5-4.0、3.8-4.4 或 4.0-4.5。可領會的是，所使用之緩衝劑將取決於欲維持之 pH 值。於其他實施例

中，可使用 pH 調節劑來調節該調合物之 pH 值。可領會的是，可使用本技藝中已知且適於局部投予眼睛之任何 pH 調節劑。於非限制性實施例中，該 pH 調節劑係選自氫氧化鈉和/或鹽酸。示例性緩衝劑包括醋酸鈉三水合物 USP 和醋酸 USP (2N)。另一示例性緩衝劑為包含醋酸鈉三水合物 USP 和醋酸 USP 之醋酸鹽緩衝溶液 USP。

任何合適之螯合劑均可考量，其包括，但不限於脫水乙二胺四醋酸二鈉。合適之潤滑劑包括，但不限於丙二醇、聚乙二醇、聚乙烯醇及甘油。一種示例性螯合劑為脫水乙二胺四醋酸二鈉 USP。一種示例性潤滑劑為丙二醇 USP。

等張劑一般為生理上可耐受的作用劑或化合物，其賦予調合物適當之等張性以防止水在與調合物接觸時穿越細胞膜淨擴散。合適之等張劑包括，但不限於鹽類（包括氯化鈉），及糖類（諸如右旋糖和乳糖）。眼睛之滲透壓為約 290 毫滲透壓莫耳/公斤。眼用溶液之滲透壓範圍一般在約 250-350 毫滲透壓莫耳/公斤之間，大部分落在約 290-300 毫滲透壓莫耳/公斤之間。於實施例中，本發明調合物之滲透壓應為或接近眼睛之滲透壓。在特殊之非限制性實施例中，本發明調合物之滲透壓一般在約 250-350 毫滲透壓莫耳/公斤之間，或在約 290-300 毫滲透壓莫耳/公斤之間。於一特殊實施例中，本發明調合物之滲透壓為約 300 毫滲透壓莫耳/公斤。示例性等張劑為氯化鈉 USP。

於一實施例中，該調合物之 pH 值係在約 3.5 和 4.5

之間。於一較佳之實施例中，該調合物之 pH 值係在約 3.8 和 4.4 之間。於另一實施例中，該調合物之 pH 值係在約 4.0 和 4.4 之間。

本技藝中已知合適之防腐劑，其包括，但不限於苯扎氯銨、對羥基苯甲酸甲酯、氯丁醇、硫柳汞、對羥基苯甲酸丙酯及聚季銨-1。根據 FDA OTC 眼科用藥產品諮詢審查小組（最後報告日期為 1979 年 12 月），眼用調合物中所使用之苯扎氯銨，USP 的最高濃度為 0.013%，而對羥基苯甲酸甲酯，NF 之最高濃度為 0.1-0.2%。苯扎氯銨 USP 在對抗細菌上最活躍，但被認為在對抗假單胞菌及黴菌上較弱。對羥基苯甲酸甲酯，NF 在對抗真菌及革蘭氏陽性菌上最活躍，但被認為在對抗革蘭氏陰性菌上較弱。示例性防腐劑包括苯扎氯銨 NF 及/或對羥基苯甲酸甲酯 NF。

本技藝中已知合適之稀釋劑，其包括，但不限於純水 USP 及注射用水。示例性稀釋劑包括水，尤其是注射用水 USP 及生理鹽水。

本技藝中已知合適之黏度增進劑，其包括，但不限於聚乙烯醇、羥丙基甲基纖維素及聚乙烯吡咯啉酮。

表 1 中呈現一種示例性胍苯噻嗪調合物，而實例 1 中說明一種製備調合物之示例性方法。

表 1：胍苯噻嗪調合物

成分	功能	量
胍苯噻嗪鹽酸鹽 USP	活性劑	1.0 %重量/重量
醋酸鈉三水合物 USP	緩衝劑	10 %重量/重量 ¹
醋酸 USP (2N)	緩衝劑	
脫水乙二胺四醋酸二鈉, USP	螯合劑	0.015 %重量/重量 ¹
丙二醇, USP	潤滑劑	1.00 %重量/重量 ¹
氯化鈉, USP	等張劑	0.50 %重量/重量 ¹
苯扎氯銨 50% 溶液, NF	防腐劑	0.02 %重量/重量 ¹
對羥基苯甲酸甲酯, NF	防腐劑	0.03 %重量/重量 ¹
水	稀釋劑	88.435 %重量/重量 ¹

¹%重量/重量不包括胍苯噻嗪

更普遍地，該調合物包括活性治療劑，胍苯噻嗪及載體。術語“載體”係指與該活性化合物一起投服的稀釋劑、佐劑、賦形劑或載劑。這類藥學載體可為液體，諸如水和油，包括石油、動物、植物或合成來源者，諸如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油，等。藥學載體可為水、生理鹽水（包括磷酸鹽緩衝之生理鹽水）、水性溶劑、聚伸烷基二醇、石油為底質之膠狀物、乙基纖維素、油酸乙酯、羧甲基纖維素、聚乙烯基吡咯啉、肉荳蔻酸異丙酯、阿拉伯膠、明膠、澱粉糊、滑石、角蛋白、膠體二氧化矽、尿素，等。當該活性化合物係經由靜脈內途徑投服時，水可作為載劑。生理鹽水溶液和水性右旋糖溶液及甘油溶液亦可用來作液態載體。合適之藥學載體亦包括賦形劑，諸如

澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、稻米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂奶、甘油、丙二醇、水、乙醇，等。其他合適之載體包括，但不限於甘胺酸及透明質酸。若需要時，本發明之組成物亦可含有潤濕劑或乳化劑，和/或 pH 緩衝劑。此外，可以使用輔助劑、穩定劑、增稠劑、乳化劑、潤滑劑和/或著色劑。

當投予受試對象時，該藥學上可接受之載劑較佳為無菌的。本技藝中已知合適之滅菌方法，包括，但不限於加熱滅菌、化學滅菌和/或藉由過濾滅菌。於另一實施例中，可將一或多種成分單獨滅菌並在無菌條件下製備該調合物。

本發明之組成物可為溶液、懸浮液、乳液、緩釋調合物之形式，或為任何其他適合使用之形式。於一實施例中，該藥學上可接受之載劑為眼用溶液、懸浮液、乳液、軟膏或油膏。

用於投服之組成物可選擇性地包括適合用於投予眼睛以緩解投服部位之疼痛的局部麻醉劑。一般而言，該成分係在單位劑量型中單獨或混合在一起供應。

III. 製備調合物之方法

於一觀點中，該調合物可經由逐步添加成分來製備。於一實施例中，該方法包含先在適量之純水中加入適量之緩衝溶液並伴隨混合。較佳地，將該純水放置在大小合適

之容器中以保持該最終調合物之體積。任何合適之混合方法均可接受。較佳之方法為持續混合，諸如由攪拌盤和旋轉棒所提供者，以及熟習本技藝之人士所已知者。緩衝溶液可以單獨製備或從市面上購買。於一非限制性實施例中，該緩衝溶液為醋酸鹽緩衝溶液。於一非限制性實施例中，該醋酸鹽緩衝溶液包含醋酸鈉、醋酸及純水。這類緩衝溶液可以購買或製備取得。該緩衝液可藉由適當之 pH 值選擇。於一示例性實施例中，該醋酸鹽緩衝溶液之 pH 值為約 4.2-4.6。於一特定實施例中，該緩衝液之 pH 值為 4.2。一種製備醋酸鹽緩衝溶液之非限制性實例為在內含純水之一升容量瓶中加入 1.75 克醋酸鈉及 18.6 毫升醋酸 2N，再加入適量的水以使體積為 1000 毫升。此示例性緩衝溶液之 pH 值應為約 4.2。可領會的是，當該緩衝溶液係經由製備取得，而非購買取得時，製備緩衝溶液的預先步驟將是必要的。

接著，將適量之一或多種螯合劑（諸如脫水乙二胺四醋酸二鈉）添加在緩衝溶液中並一邊混合，將所得溶液（A）混合至螯合劑完全或幾乎溶解。第三步，將一或多種潤滑劑添加到 A 溶液中並一邊混合。將所得之溶液（B）混合至潤滑劑完全或幾乎溶解。任何適合用於眼用調合物中之潤滑劑均可考慮。於一非限制性實施例中，該潤滑劑為丙二醇。第四步，將一或多種等張劑添加到 B 溶液中並一邊混合。將所得之（C）溶液混合至等張劑完全或幾乎完全溶解。第五步，將一或多種防腐劑加入 C 溶液

中並一邊混合。將所得之（D）溶液混合至防腐劑完全或幾乎完全溶解。第六步，將一或多種治療劑（包括，但不限於鹽酸胍苯噻嗪）加入 D 溶液中並一邊混合。將所得之（E）溶液混合至治療劑完全或幾乎完全溶解。可領會的是，當使用超過一種類型之成分時（例如使用兩或多種防腐劑），可能將該成分一起或分別加入。當將成分分別加入時，在添加下一個成分前可能先將該溶液完全或幾乎完全混合。可測量調合物參數並據此調整該調合物。例如，當需要時可能測量 pH 值並調整之。

示例性調合物之製備方法詳述於實例 2 中。由實例 2 中所呈現之數據證明該製備方法產生令人驚訝之穩定調合物。從表 8-10 中可以看出，在滴瓶容器中之 0.5%和 1.0%鹽酸胍苯噻嗪調合物在所有三個溫度下均相當穩定。即，大部分調合物在該三種溫度之每一溫度下儲存 1 和 2 個月後，該活性劑所減少之重量/重量%大幅少於約 1%。對許多調合物而言，在該三種溫度之每個溫度下儲存 1 和 2 個月後，該活性劑所減少之重量/重量%大幅少於約 0.5%。該 0.5%和 1%調合物在一、二和三個月後非常穩定，尤其是儲存在 4℃和 25℃下者。該 2%調合物也很穩定且儲存在 25℃時最穩定。該調合物在 pH 值為約 4.0-6.6 時也非常穩定（數據未顯示出）。該調合物在 pH 為 4.0-5.5 下被儲存在用於貯存之玻璃小瓶（一周至一個月）後，回收之活性劑為 100%。

劑量給藥

可有效治療或預防老年性黃斑變性之活性化合物的量可藉由標準研究技術測定。例如，可有效治療或預防老年性黃斑變性之活性化合物的劑量可經由將該活性化合物投予模型（諸如，例如熟習本技藝之人士所已知之動物模型或其他模型，諸如電腦模型）中的動物來測定。此外，可選擇性地採用體外分析來協助鑑定最佳的劑量範圍。

熟習本技藝之人士可根據熟習本技藝者所已知之一些因素的考量來決定特定之有效劑量的選擇（例如經由臨床試驗）。這類因素包括欲治療或預防之疾病、涉及之症狀、受試對象之身體質量、受試對象之免疫狀態及其他熟習本技藝之人士已知的因素。

欲投予受試對象（諸如人類）之活性化合物的劑量是可變的且可經獨立判斷。在一天內的不同時間投服活性化合物之每日劑量通常是實用的。然而，在任何指定的情況中，投服之活性化合物的量將取決於，諸如該活性組分之溶解度、所使用之調合物、受試對象之條件（諸如重量）和/或投服途徑這類因素。

活性化合物之有效量（單獨或與另一種預防或治療劑組合）的一般範圍為約 0.001 毫克/天至約 1000 毫克/天、較佳為約 0.001 毫克/天至 750 毫克/天、更佳為約 0.001 毫克/天至 500 毫克/天、更佳為約 0.001 毫克/天至 250 毫克/天、更佳為約 0.001 毫克/天至 100 毫克/天、更佳為約 0.001 毫克/天至 75 毫克/天、更佳為約 0.001 毫克/天至 50

毫克/天、更佳為約 0.001 毫克/天至 25 毫克/天、更佳為約 0.001 毫克/天至 10 毫克/天、更佳為約 0.001 毫克/天至 1 毫克/天。當然，在一天內的不同時間一部分一部分地投服該活性化合物之每日劑量通常是實用的。然而，在任何指定的情況中，投服之活性化合物的量將取決於，諸如該活性組分之溶解度、所使用之調合物、受試對象之條件（諸如重量）和/或投服途徑這類因素。

III. 治療方法

於一觀點中，該調合物有用於治療眼睛疾病。於一些非限制性實施例中，該調合物有用於治療、預防、制止和/或減緩黃斑變性之進展。於其他非限制性實施例中，該調合物有用於治療糖尿病性黃斑水腫。

A. 黃斑變性

黃斑變性係由視網膜之中央部分（稱為黃斑部，其為眼睛中負責聚焦中心視力的區域）退化引起。黃斑變性欲同時指影響未滿 50 歲之個體的黃斑營養不良以及老年性黃斑變性（AMD 或 ARMD）。

老年性黃斑變性為全世界超過 50 歲之成人視力喪失的主要原因及全世界之整體致盲原因的第三位（國家眼科研究所）。AMD 可能以乾性（萎縮、無新血管增生、非滲出型）或濕性（新血管增生、滲出型）形式表徵。

雖然造成 AMD 發展和進展之細胞和分子變化之間的

關係尚不清楚，但臨床病程有較佳之描寫。AMD 從非滲出型（乾性）衰老開始變化到支持性視網膜色素上皮（RPE）和黃斑下方之 Bruch 膜。非滲出型 AMD 可進展成更嚴重之萎縮性 AMD（亦稱為地圖狀萎縮），亦發展出滲出型（濕性），此滲出型之特徵為從黃斑部下方長出之病理性脈絡膜新生血管膜。所有發展出滲出型 AMD 之患者中有 10-15% 常結合嚴重之視力喪失；然而，高達 20% 之來自 AMD 的法定盲係由於萎縮性非滲出型惡化。

乾性形式為非新血管增生型，其佔 AMD 病例之約 90% 且係藉由多個稱為玻璃膜疣之小、圓、黃白色斑點鑑定。這些斑點通常位於眼睛後方之外視網膜層。具有這些斑點之受試對象可能有優越之視力且沒有症狀。玻璃膜疣可能積累在視網膜和脈絡膜之間，這可能會導致視網膜剝離。非滲出型 AMD 具有三個臨床階段：早期、中期和晚期。除了 RPE 之異常程度外，這些階段之臨床特徵為沉積在黃斑部下方之黃色玻璃膜疣的範圍和大小。早期非滲出型 AMD 中，玻璃膜疣之尺寸為小至中等，且色素異常幾乎微乎其微。非滲出型 AMD 進展到地圖狀萎縮時，臨床研究結果已通過廣泛性黃斑玻璃膜疣之階段並顯示出 RPE 局部閉塞。若 RPE 之地圖狀萎縮位於中央黃斑的下方（即，中央凹），則其將造成覆在上方之感光細胞和功能視力喪失。

在新血管增生性、濕型中，新創建之異常血管在視網膜中央下方生長。這些血管滲漏、出血並使視網膜結疤，

扭曲視覺或破壞中心視力。視覺扭曲可能從一隻眼睛開始，且稍後可能會影響另一隻眼睛。濕型佔 AMD 病例之 10%，但佔 AMD 引起之視力喪失的 90%。據估計，每年有 10%之乾性 AMD 進展成濕性 AMD。

幾種因素可能造成 AMD 之發展和進展。對於心臟病和 AMD 共通具有高血壓及亞臨床動脈粥樣硬化為其危險因子的觀察得以發展出 AMD 發病機制之血液動力學模型（亦稱為血管模型）。以與系統性血管疾病同源的方式，此模型聲稱 AMD 為一種血管疾病之形式，其中硬化性沉積、眼組織順應性降低及通過脈絡膜血管之血流量減少導致病情惡化的。尤其是，該模型斷言脂質在黃斑內逐漸浸潤和沉積降低了眼組織之順應性，並窄化黃斑脈絡膜毛細血管。此脈絡膜毛細血管窄化加重了與年齡有關之正常窄化，並進一步以升高之流體靜壓力減少血流量。反過來說，這減少脂蛋白及其他由 RPE 分泌之物質的清除。其結果為臨床上明顯的玻璃膜疣和色素變化，以及 Bruch 膜的鈣化和斷裂（其導致脈絡膜新血管增生）。

越來越多的證據表明發炎症亦在 AMD 中參與一個角色。補體組分為 AMD 中最被充分了解的炎症介質。補體 C5 和由補體組分 5b-9 組成之膜攻擊複合物已在玻璃膜疣中被偵測到。類似地，各種研究已證明定位在玻璃膜疣、RPE 細胞和/或 Bruch 膜之免疫複合物、補體和/或補體調節蛋白的存在。此外，許多遺傳研究支持補體在 AMD 中的角色。此外，組織破壞性巨噬細胞被認為會加劇

AMD。因此，治療增加脈絡膜血流量、減少氧化壓力和/或控制慢性發炎之一或多項措施可明顯治療和/或減緩AMD之進展。

黃斑變性的一種症狀為中心視力之變化。患者可能注意到中心視力模糊或在閱讀時頁面上有空白點。患者可能注意到視覺扭曲，諸如直線變彎曲。圖像可能顯得較小。一些患者注意到色覺改變且一些患者經歷異常之光感。這些症狀可能突然到來且變得越來越麻煩。

如本文所使用之黃斑變性的診斷可能需要對受試對象中之黃斑變化或功能進行任何分析。其並不欲受限於任何特定的方法。例如，眼睛檢查者（例如醫生）可能以眼藥水放大瞳孔並檢查眼睛內部，尋找視網膜中是否出現黃色玻璃膜疣腫塊、眼部病變或黃斑部之顯著變化，諸如變薄。眼睛檢查者亦可能給予視野試驗，尋找中心視力中的空白點。檢查者可能要求螢光素血管造影（靜脈內注射螢光染料，再進行表觀檢查並為眼睛底部照相），以測定視網膜中的血管是否滲漏。

具有黃斑變性的一些危險因素包括年齡、吸煙及富含飽和脂肪之飲食。其他人可能因為基因之遺傳或環境暴露而處於黃斑變性之風險中。

於實施例中，此處所描述之方法關於治療或預防老年性黃斑變性，較佳為預防性預防和治療。於其他實施例中，此處所描述之方法關於以此處所描述之調合物預防或減緩老年性黃斑變性之進展。於一實施例中係考量以此處

所描述之調合物預防或減緩被診斷為非滲出型或滲出型 AMD 之患者的 CNV。

於一實施例中係每天至少一次將 1%（重量/重量）胍苯噻嗪眼用溶液滴注在一或多個受影響的眼睛，且於其他實施例中係每天滴注一至五次。於其他實施例中係每天至少一次將 0.5%-4%（重量/重量）胍苯噻嗪眼用溶液滴注在一或多個受影響的眼睛，且於其他實施例中係每天滴注一至五次。再於進一步之實施例中係每天至少一次將 0.5%-2%（重量/重量）之胍苯噻嗪眼用溶液滴注在一或多個受影響的眼睛，且於其他實施例中係每天滴注一至五次。於一特定之實施例中係每天至少一次將 1%（重量/重量）之胍苯噻嗪眼用溶液滴注在一或多個受影響的眼睛，且於其他實施例中係每天滴注一至三次。

從實例 3 中所示之安全性數據可知，根據此處所描述之方法製備的鹽酸胍苯噻嗪眼用溶液在人體內是安全的且一般耐受性良好，治療出現不良事件（AE）的發生率低，該不良事件之嚴重性通常輕微，且在兩個受試群中之分佈相當均勻。在研究過程中沒有明顯的不良事件（SAE）、無死亡病例且無其他臨床上顯著之安全性研究結果。眼睛充血為最常報告之與治療相關的眼部 AE，在這項研究中的大部分受試對象有此報告。眼睛充血之發生率與胍苯噻嗪之周邊血管擴張效果一致且並不令人意外。因此，重複給予外用鹽酸胍苯噻嗪調合物劑量在人體中是安全的且耐受性良好（Ralston et al., 2010, ARVO 摘要，

摘要編號 913/A196)。

實例 4 和 5 提出使用根據此處所描述之方法製備的調合物進行之單一劑量和重複劑量研究。在實例 5 中，使用兔子模型進行之 28 天，符合 GLP 要求的重複劑量眼部研究顯示出在初次給予劑量時發生之眼部刺激性在重複給予劑量期間會變成耐受性良好。沒有任何明顯之劑量相關毒性出現則進一步指出濃度至少高達 2.0%重量/重量之鹽酸胍苯噻嗪在此特別敏感的動物模型中的合理安全性潛力。

脈絡膜血流量減少及局灶性缺血已被提出可能為導致早期 AMD 之事件進展的病因 (Feigl 等人, 2007b)。此外，脈絡膜和視網膜中缺氧的長期影響已被提出會造成內皮生長因子上調及發展出脈絡膜新血管生長 (此為從早期 AMD 進展到晚期 AMD 的特徵) (Feigl 等人, 2007b)。如實例 6 中所示，在兔子眼睛模型中，滴注胍苯噻嗪 1.0%眼藥水可顯著改善眼脈絡膜血流量。從第 1 圖中可知，滴注 1%胍苯噻嗪調合物後 30 分鐘，脈絡膜血流量不僅被維持在起點，實際上還提高了。相反地，滴注對照組會導致脈絡膜血流量減少 (觀看第 1 圖，約減少 40%)。30 分鐘後，以 1%胍苯噻嗪調合物治療會導致脈絡膜血流量較對照組至少高約 75%，或至少高約 3 至 4 倍。相反地，以對照組治療會導致脈絡膜血流量減少約 40%。從第 1 圖中亦可知，滴注胍苯噻嗪調合物後 60 分鐘，脈絡膜血流量較對照組至少高約 65%，或至少高約 2 至 3 倍。以 1%胍苯噻嗪調合物治療 120 分鐘後會導致脈絡膜血流量

較對照組至少高約 50%，或至少高約 2 倍。相反地，以對照組治療會導致脈絡膜血流量減少約 30%。與對照組相比較，脈絡膜血流量之增加可維持至少 2 小時。在由雷射誘導之 CNV 模型中，滴注胍苯噻嗪眼藥水（所有的濃度）連續 4 週可顯著減少形成 CNV 的面積，參閱實例 7。胍苯噻嗪調合物（0%、0.5%、1%和 2%重量/重量）對 CNV 形成的效果顯示於第 2 和 3 圖中（分別藉由螢光素或脈絡膜平面固定測量）。從第 2 圖可看出藉由螢光素測得之每個胍苯噻嗪調合物所減少的 CNV 面積。0.5%調合物減少 CNV 之面積約 33%。1%調合物減少 CNV 之面積約 30%，而 2%調合物減少 CNV 之面積約 26%。從第 3 圖可看出藉由脈絡膜平面固定測得之各胍苯噻嗪調合物所減少之 CNV 面積。0.5%調合物減少 CNV 之面積約 20-25%。1%調合物減少 CNV 之面積約 25%，而 2%調合物減少 CNV 之面積約 30-35%。此外，如實例 8 中所描述者，胍苯噻嗪可防止 HUVEC 在體外形成小管，此可作為抗新血管增生活性的表示。這些數據提示胍苯噻嗪可能具有數種作用機制且能夠透過改善脈絡膜血流量及防止新血管形成來降低形成 CNV 的程度。

碘酸鈉對 RPE 中之細胞的選擇性毒性早已為人所知多年（Noell, 1953, *Am J Ophthalmol*, 36(6:2):103-116）。對 RPE 之傷害及 RPE 之功能障礙被認為是 AMD 進展中的早期事件之一。因此，這種在視網膜之 RPE 層中選擇性地創造化學誘導之損傷的方法已被用來調查 AMD 之潛在

療法 (Li, et al., 2006, Invest Ophthalmol Vis Sci, 47(4): 1646-1652; Obata et al., 2005, Eye, 19(4):464-468)。如實例 9 和 10 中所示，高濃度之 NaIO_3 在體外對人類 RPE 細胞具有毒性。與文獻報導一致，單次靜脈內注射 NaIO_3 會以時間和劑量依賴方式對大鼠之視網膜造成重大損害。從組織病理學和源自感光細胞 (a-波)、神經視網膜 (b-波) 及 RPE 細胞 (c-波) 之電生理信號受抑制可證明高劑量之 NaIO_3 對整個視網膜造成損害。經由調整 NaIO_3 之注射劑量，在大鼠中鑑定出其中損害似乎被限制在 RPE 細胞中的病況。ERG c-波信號被抑制，但 a 波和 b 波信號維持在正常水準。由 NaIO_3 誘導之選擇性抑制 c 波信號持續超過 4 週。因此，這些參數可能有用於非滲出型 AMD 的大鼠模型。

在此模型中使用這些優化之條件 (35 毫克/公斤 NaIO_3 及注射後 4 週)，現已證明在 4 週之實驗持續期間內每日滴入胍苯噻嗪 1.0% 眼用溶液 3 次會顯著減少在經由注射 NaIO_3 所創建之 ERG c-波信號中所觀察到的電生理短缺 (實例 10)。從第 4 圖可以看出，與對照組相比較，滴注 NaIO_3 會造成 ERG c-波降低 70%。滴注 1% 胍苯噻嗪調合物僅導致 ERG c-波信號降低約 50%。因此，與僅注射 NaIO_3 相比較，滴注 1% 胍苯噻嗪調合物可維持約 20% 之 ERG c-波信號。實例 10 中所描述之數據亦證明局部滴注可投遞足夠之胍苯噻嗪到視網膜以發揮保護作用。胍苯噻嗪保護 RPE 免於 NaIO_3 引起之損傷的機制可能與

藥物增加脈絡膜血流量之能力或其抗氧化性能有關。經由增加到視網膜之血流量和氧氣流量，胍苯噻嗪可能延遲非滲出型老年性黃斑變性的發展且可能作為早期（乾性）AMD 之治療。於一實施例中，本文所描述之調合物在增加被診斷出患有非滲出型或滲出型 AMD 之患者的脈絡膜血流量的方法中是有用的。

實例 9 和 10 中所描述之由 NaIO_3 誘導出乾性 AMD 的大鼠模型之結果證明鹽酸胍苯噻嗪調合物保護視網膜色素上皮（RPE）細胞免於由暴露於 NaIO_3 所引起之損傷的能力，因此其可保護並可能恢復患有乾性 AMD 之患者的視力功能。

RPE 細胞損失已被提出是早期 AMD 的主要表現（Cai et al., Prog Retin Eye Res, 2000, 19(2):205-221）。氧化壓力可能在 RPE 細胞損失及 AMD 的發病機制中參與一個角色（Beatty et al., 2000, Surv Ophthalmol, 45(2):115-134；Finkel et al., 2000, Nature, 408(6809):239-247）。咸信，由於在現有之保護機制減少或活性氧物種（ROS）的數量和濃度增加所造成之氧化壓力增加會部分促成 AMD 之發病機制（Boulton et al., 1994, Br J Ophthalmol, 78(2):125-129）。胍苯噻嗪具有抗氧化劑和血管擴張性質，這對治療 AMD 可能是有用的。

據進一步之報導，缺氧可透過由氧化壓力誘導之機制造成 RPE 細胞死亡（Cai 2000）。連結缺氧和氧化損傷之作用有幾種（Emerit et al., 1998, Handbook of Free

Radical 及 Antioxidants in Biomedicine, Quintanilha eds., CRC 出版社)，包括粒線體氧化磷酸化之解偶聯和三磷酸腺苷降解成二磷酸腺苷。此外， O_2 張力突然降低會使自由基從嚴格控制之電子轉運鏈釋出，而這些 ROS 與相鄰之膜脂反應造成膜和細胞受損。爲了評估胍苯噻嗪保護細胞對抗由缺氧引起之損傷的能力，將 ARPE-19 細胞與各種濃度之胍苯噻嗪一起培育 24 至 72 小時，同時在缺氧控制室中暴露於缺氧環境（1% O_2 ）中。1 微克/毫升之胍苯噻嗪調合物在 48 小時和 72 小時顯著降低由缺氧引起之 ARPE-19 細胞損傷。此數據指出胍苯噻嗪可以防止由缺氧引起之細胞損傷，但無法防止該企圖化學模擬缺氧之由化學（疊氮化鈉）引起的細胞損傷。不受限於理論，此差異可能是由於化學劑 NaN_3 造成細胞損傷之機制與 ROS 在缺氧條件下從粒線體釋出的機制不同。

如實例 11 中之描述，使用人類視網膜色素上皮細胞（ARPE-19 細胞）在體外調查胍苯噻嗪之抗氧化劑性能，並評估胍苯噻嗪保護細胞免於與 ROS 相關之損傷或缺氧相關之損傷的能力。

自由基爲具有奇數、未成對電子之分子；此這未成對之電子使分子不穩定且反應性高（Fantone et al. 1985, Hum Pathol, 16(10): 973-978；Thompson et al., 1986, Prog Cardiovasc Dis, 28(6):449-462；McCord et al., 1985, N Engl J Med, 312 (3):159-163）。威信，氧自由基，超氧陰離子（ O_2^- ）、羥基（ OH^- ）及其中間物，過氧化氫

(H_2O_2) 係在缺血期間及再灌注時在組織中產生。這些 ROS 可透過多種途徑對細胞造成細胞毒性，包括：與脂肪酸反應（這導致細胞膜中形成脂質過氧化物）；蛋白質中之胺基酸氧化；氫硫基氧化；及多肽鏈斷裂（Thompson 1986, McCord 1985, Kloner et al., 1989, *Circulation*, 80 (5):1115-1127）。

第三丁基過氧化氫（t-BHP）（一種有機過氧化氫）（Rush et al., 1985, *Toxicol Appl Pharmacol*, 78(3):473-483）可以在肝細胞中藉由麩胱甘肽過氧化物酶代謝，生成氧化之麩胱甘肽（Alia et al., 2006, *Toxicol Appl Pharmacol*, 212(2):110-118）。麩胱甘肽（GSH）耗盡和菸醯胺腺嘌呤磷酸二核苷酸氧化作用與鈣動態平衡改變，導致細胞存活力喪失有關（Martin et al., 2001, *Biochem Pharmacol*, 62(6):705-712）。或者，t-BHP 可藉由細胞色素 P450 酶及游離鐵依賴性反應被轉化成其過氧基和烷氧基自由基。這些自由基可隨後啟動脂質過氧化反應，與細胞分子（諸如 DNA 和蛋白質）形成共價鍵並進一步降低麩胱甘肽（GSH）之水準。後者的效果除了改變鈣動態平衡外，亦影響粒線體膜電位，最終導致細胞死亡（Van der Zee et al., 1996, *Free Radic Biol Med*, 20(2):199-206；Hix et al., 2000, *Chem Res Toxicol*, 13(10):1056-1064）。很明顯地，ROS（Martin 2001；Lima et al., 2006, *Life Sci*, 79(21):2056-2068）、t-BHP 基（Van der Zee 1996；Davies, 1989, *Biochem J*, 257(2):603-606）及細胞內鐵離

子 (Hix 2000) 均涉及 t-BHP 之毒性；直接影響這些參數將趨向減少損害的程度。藉由與細胞內鐵之 Fenton 反應， H_2O_2 可以形成能降解大部分有機物質之高反應性羥基 ($\cdot OH$) (Pesakhov et al., 2007, Biochim Biophys Acta, 1768(3):590-597)。根據實例 11 中所顯示之數據，胥苯噻嗪能保護細胞對抗由 t-BHP 及 H_2O_2 引起的細胞毒性。

如實例 11 和此處之描述，使用三種氧化壓力誘導劑 (H_2O_2 、t-BHP 及 NaN_3) 來評估胥苯噻嗪保護 ARPE-19 細胞對抗由 ROS 引起之損傷及對抗由缺氧引起之損傷的能力。數據顯示出胥苯噻嗪調合物以濃度依賴方式抑制由 t-BHP 和 H_2O_2 引起之氧化壓力損傷，但對由 NaN_3 引起之損傷僅有很少或沒有效果。

該胥苯噻嗪調合物證明在以 0.01mM 和 0.03mM 之 tBHP 損害細胞後，其以表觀濃度依賴方式統計上顯著地抑制由 tBHP 引起之細胞損傷。以 0.01mM 和 0.03mM 之 tBHP 二者損害細胞後使用 100 微克/毫升之胥苯噻嗪可觀察到最大存活力保護效果。

胥苯噻嗪調合物證明在以 0.3 mM 和 1.0 mM 之 H_2O_2 損害細胞後，其以表觀濃度依賴方式統計上顯著地抑制由 H_2O_2 引起之細胞損傷。以 0.3 mM 之 H_2O_2 損害細胞後，使用 30 微克/毫升之胥苯噻嗪，及於 0.3mM 之 H_2O_2 後 30 微克/毫升之胥苯噻嗪可觀察到最大存活力保護效果。使用 1 微克/毫升胥苯噻嗪治療 48 小時和 72 小時後可見到最大逆轉效果。

粒線體毒素可提供麩胺酸化物中毒（由麩醯胺引起之中毒，此為誘導鈣大量湧入胞內部位以殺死細胞的興奮劑）的替代以修改在體內短暫缺血期間出現的可逆能量衰竭。疊氮化鈉（ NaN_3 ）已被用來在細胞培養（Varming et al., 1996, *J Neurosci Res*, 44(1):40-46；Grammatopoulos et al., 2004, *Neurosci Res*, 50(3):299-306；Grammatopoulos et al., 2002, *Brain Res Mol Brain Res*, 99(2):114-124）中及在體內實驗（Vecsei et al., 2001, *J Neural Transm*, 108(3):273-278）中誘導“化學缺血”。其確切的作用機制仍然有部分難解。這些影響通常係由細胞色素 c 氧化酶呼吸鏈複合物 IV 抑制作用造成，且超氧化物可能是在電子傳遞鏈阻斷後從粒線體釋出的主要產物（Duranteau et al., 1998, *J Biol Chem*, 273(19):11619-11624）。在其他實驗中（未顯示出）係將 ARPE-19 細胞暴露於單獨之 NaN_3 或在胍苯噻嗪（濃度為 1、3、10、30、100 微克/毫升）之存在下暴露於 NaN_3 。在以 NaN_3 （0.1~100mM）損害並以胍苯噻嗪治療後藉由 MTT 分析測量存活 ARPE 細胞的比例，在經胍苯噻嗪治療之 ARPE-19 細胞中未見到對經 NaN_3 化學誘導之缺氧的顯著效果。在這些實驗中，胍苯噻嗪未逆轉由 NaN_3 引起之細胞毒性，這可能表示胍苯噻嗪將不會拮抗源自粒線體之 ROS。

因此，胍苯噻嗪調合物在體外提供對抗由缺氧引起之對 ARPE-19 細胞之損傷的顯著保護。不受限於理論，此效果可能是由於胍苯噻嗪之自由基清掃作用將 ROS 淬

滅。雖然現今對於該參與由氧化壓力介導之對 RPE 細胞的損傷之胞內信號傳導仍然知之甚少，鑑定該涉及 RPE 細胞中之抗氧化防禦或氧化壓力反應之調解的化學品應可使對抗 AMD 之治療策略的未來發展成為可能。肼苯噻嗪具有保護 RPE 細胞對抗由缺氧和 ROS 引起之損傷的潛力，因此可治療老年性黃斑變性（AMD）及缺血性視網膜病變。

肼苯噻嗪之眼部及系統性安全性變化形廓已根據先前之非臨床和臨床研究，及超過 50 年之系統性使用歷史而被完善建立且被充分理解。此數據得到實例 6 中以鹽酸肼苯噻嗪眼用溶液治療乾性 AMD 的結果支持。

糖尿病性黃斑水腫或糖尿病性黃斑變性

於另一個非限制性實施例中，此處所揭露之調合物有用於治療或預防糖尿病性黃斑水腫或糖尿病性黃斑變性。糖尿病性黃斑變性為由糖尿病造成之黃斑退化。囊樣黃斑變性為因黃斑區中流體填充區域（囊腫）造成之視力喪失。這可能是由於其他疾病、炎症或高度近視造成之結果。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為滴入 1%鹽酸肼苯噻嗪調合物後 0、30、60、和 120 分鐘之脈絡膜血流量圖（以微升/分鐘/毫克表示）。

第 2 圖為投服 0%、0.5%、1%及 2%鹽酸胍苯噻嗪調合物後，藉由螢光測量之以平方毫米計的 CNV 面積圖形。

第 3 圖為投服 0%、0.5%、1%及 2%鹽酸胍苯噻嗪調合物後，藉由脈絡膜平面固定樣本測量之以平方微米計的 CNV 面積圖形。

第 4 圖為以伏特計之 ERG c-波信號的圖形，其顯示出 1.0%鹽酸胍苯噻嗪調合物對大鼠視網膜中由 NaIO_3 誘導之 RPE 變性的效果（平均值±標準差： $**=P<0.01$ 或 $*##=P<0.01$ ）。

【實施方式】

下列實例為示例性質且不欲以任何方式成為限制。

實例 1

胍苯噻嗪調合物

製備用來作為胍苯噻嗪眼用溶液之調合物。將 5306 克純水，USP 加入具有旋轉棒之 6 升量瓶中，並一邊混合。將 600 克之醋酸鹽緩衝溶液（pH 4.2）（包含醋酸鈉和醋酸(2N)）加入在 6 升量瓶中之純水，同時一邊攪拌。持續混合，直到均勻。將 0.9 克乙二胺四醋酸二鈉，USP 加入量瓶中，並混合至溶解。接著，將 60 克丙二醇，USP 加入量瓶中並混合至溶解。接著，將 30 克氯化鈉，USP 加入量瓶中，並混合至溶解。將 1.2 克之苯扎氯銨

50%溶液，NF 加入量瓶中並混合至均勻。最後，將 1.8 克對羥基苯甲酸甲酯，NF 加入量瓶中並混合至溶解。所得溶液之 pH 值為 4.4。

爲了製備胍苯噻嗪調合物，再將一些量之鹽酸胍苯噻嗪加入該溶液中並混合至均勻。

實例 2

胍苯噻嗪調合物之貯存穩定性

大致上依實例 1 中之描述製備 0.5%、1%和 2%鹽酸胍苯噻嗪調合物以評估該調合物之穩定性。該調合物之成分和百分比列於下列表 3 中。

表 3：調合物摘要

成分	CAS#	0.5% 調合物 (重量/重量%)	1.0% 調合物 (重量/重量%)	2.0% 調合物 (重量/重量%)	對照組 (重量/重量%)
純水, USP	7732-18-5	88.045	87.615	86.775	88.435
醋酸鹽緩衝 溶液 4.2 USP	6161-90-4 7732-18-5 64-19-7	10.00	10.00	10.00	10.00
乙二胺四醋酸 二鈉, USP	6381-92-6	0.015	0.015	0.015	0.015
丙二醇, USP	57-55-6	1.00	1.00	1.00	1.00
氯化鈉, USP	7647-14-5	0.35	0.24	0	0.50
苯扎氯銨, 50%, 溶液, NF	8001-54-5 7732-18-5 64-17-5	0.02	0.02	0.02	0.02
對羥基苯甲 酸甲酯, NF	99-76-3	0.03	0.03	0.03	0.03
鹽酸胍 苯噻嗪, USP	304-20-1	0.54	1.08	2.16	0

* 容許8%超額以用於製造損失和原料純度。

將對照組調合物置於具有橡皮內塞蓋之 8 毫升 E-C 琥珀色玻璃樣品瓶（項目 224735，批號 1402565，Wheaton，紐澤西州 Millville）中。將鹽酸胍苯噻嗪調合物放置在具有小珠滴瓶之 6 毫升圓柱形 LDPE round（其具有 13 毫米 LDPE 控制滴頭（40 微升）及 13 毫米-425 聚丙烯完成封閉器）（Comar Packaging，紐澤西州 Buena）中。將該調合物儲存在 $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 及 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下 3 個月以評

估在室溫、伴隨冷藏及加速條件下之儲存狀況。在時間零時測試該活性成分之 pH 值、滲透壓及重量/重量%，結果顯示於下列表 4 中。1 個月後、2 個月後及 3 個月後測試該活性成分之 pH 值、外觀及重量/重量%，結果顯示於下列表 5-13 中。

一個月後，由於分析結果中之 pH 值移動且降低（結果未顯示出），因而中斷對照組之琥珀色玻璃小瓶測試。pH 值之移動被懷疑是由於該玻璃小瓶之鹼度。

表 4：調合物之初始測量值

重量% 鹽酸胍苯噻嗪	pH	滲透壓(毫滲透壓莫耳/公斤)	分析
0.0	4.3	313	0
0.5	4.4	312	0.540
1.0	4.3	316	1.083
2.0	4.4	318	2.180

表 5：調合物在 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存一個月後之測量值

重量% 鹽酸胍苯噻嗪	pH	描述	分析
0.5	4.3	合格	0.539
1.0	4.1	合格	1.076
2.0	4.3	大結晶調合物	2.162

表 6：調合物在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存一個月後之測量值

重量% 鹽酸胍苯噻嗪	pH	描述	分析
0.5	4.3	合格	0.538
1.0	4.1	合格	1.080
2.0	4.3	合格	2.171

表 7：調合物在 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存一個月後之測量值

重量% 鹽酸胍苯噻嗪	pH	描述	分析
0.5	4.3	合格	0.536
1.0	4.1	合格	1.074
2.0	4.2	稍微變暗	2.157

表 8：調合物在 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存兩個月後之測量值

重量% 鹽酸胍苯噻嗪	pH	描述	分析
0.5	4.2	合格	0.5374
1.0	4.0	合格	1.0843
2.0	4.2	形成大結晶	2.1755

表 9：調合物在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存兩個月後之測量值

重量% 鹽酸胍苯噻嗪	pH	描述	分析
0.5	4.2	合格	0.5364
1.0	4.0	合格	1.0788
2.0	4.1	合格	2.1757

表 10：調合物在 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存兩個月後之測量值

重量% 鹽酸胍苯噻嗪	pH	描述	分析
0.5	4.1	合格	0.5338
1.0	3.9	合格	1.0795
2.0	4.0	稍微變暗	2.1480

表 11：調合物在 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存三個月後之測量值

重量% 鹽酸胍苯噻嗪	pH	描述	分析
0.5	4.3	合格	0.5361
1.0	4.1	合格	1.0734
2.0	4.3	形成大結晶	2.0895

表 12：調合物在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存三個月後之測量值

重量% 鹽酸胍苯噻嗪	pH	描述	分析
0.5	4.3	合格	0.5367
1.0	4.1	合格	1.0786
2.0	4.2	稍微變暗	2.1639

表 13：調合物在 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下儲存三個月後之測量值

重量% 鹽酸胍苯噻嗪	pH	描述	分析
0.5	4.2	合格	0.5319
1.0	4.0	稍微變暗	1.0628
2.0	3.6	非常深之琥珀色	1.9718

用於描述調合物之“合格”係指藉由目視檢查為透明、無色的溶液。pH 值係藉由費科學 Accumet 基本 pH 計（Fischer Scientific Accumet Basic pH meter）測定。

實例 3

投服胍苯噻嗪調合物後對脈絡膜血流量之影響

在三十一（31）位 50 歲或更年長之患者中進行單一中心，開放標籤的研究：20 位患者無任何臨床上有意義之眼部疾病或異常且具有優於 20/30 之斯內倫（Snellen）等效最佳矯正視力（BCVA），11 位患者具有早期非滲出型老年性黃斑變性（乾性 AMD）之徵兆和症狀。在 3 天之期間內，在眼睛局部投服鹽酸胍苯噻嗪 7 次後評估安全性、舒適性和脈絡膜血流量。

乾性 AMD 組中之受試對象具有小及中等大小玻璃膜

疣的跡象，黃斑區中僅有很少或沒有色素異常（即，在 AREDS 簡化分級量表中之風險因子為 2），且斯內倫等效最佳矯正視力（BCVA）等於或優於 20/100。所有受試對象具有足夠清晰之眼部介質以允許精確測量脈絡膜血流量。這項研究透露結膜充血短暫地增加，但沒有其他安全性或耐受性的擔憂。

患者的一隻眼睛接受 1 滴試驗物質，而對側眼接受載劑對照組。患者每天在臨床環境中投服首次劑量並在規定的時間點投服當天剩下的兩個劑量。評估以下參數：

視力（斯內倫）

眼內壓

完整之眼前段的裂隙燈檢查

擴張之眼後段的裂隙燈檢查

收集 AE（引發及觀察）

生命徵兆

使用由 Gevaltec AG（瑞士）提供之緊湊型雷射多普勒流量計（compact laser Doppler flowmeter）評估脈絡膜血流量。

這項研究之主要目的係評估依實例 1 所載製備之鹽酸胍苯噻嗪眼用溶液的安全性和舒適性。然而，為了取得鹽酸胍苯噻嗪眼用調合物活性的早期臨床藥理學數據，亦評估該測試物質對患者之脈絡膜血流量的影響。在每一天投服首次劑量前為患者進行下列評估：藉由斯內倫測視力圖評估視力、生命徵兆、眼內壓（IOP），藉由生物顯微鏡

評估一般眼睛健康及脈絡膜血流量。每一天投服首次劑量後，在 1 小時或 4 小時的期間內監測患者之舒適性、脈絡膜血流量、IOP 及一般眼睛健康。第一天，在投服鹽酸胍苯噻嗪後 30、60、120 及 240 分鐘進行評估。第 2 和第 3 天，在前二個時間點後進行評估。在第 3 天早晨投服第 7 個劑量。在最終劑量後七天，透過電話與患者聯絡以評估任何研究後之不良事件或議題。

脈絡膜血流量

任一眼睛中之眼內壓（IOP）、視力（VA）、前段和後段生物顯微鏡研究結果、生命徵兆均未發現從基線開始之有臨床意義的變化。未報導其他與安全性有關之問題。

在 26 位（84%）受試對象中發生眼部不良事件（AE），這些不良事件均為性質溫和的。除了 1 件異物感之 AE 外（其被分類為未知），所有眼部 AE 均在研究期間被解決。

最常見之治療相關的眼部 AE 為眼部充血，其發生在 21 隻經鹽酸胍苯噻嗪治療之眼睛中（7 位[64%]受試對象在 AMD 組中，14 位[70%]受試對象在正常/健康組中），但僅有 1 隻眼睛在經載劑處理組中。所有眼部充血之情況均被解決了，所有受試對象之平均解決時間為 1.85 天（範圍在 1 至 4 天）。

在以鹽酸胍苯噻嗪調合物治療之眼睛中所發現的眼部充血發病率與其活性成分（一種已被核准之直接作用的降

血壓藥物，其具有已完善建立之周邊血管擴張作用）之已知藥理作用相一致。

在兩組受試組中均發現就在眼用溶液滴入後不久，鹽酸肼苯噻嗪眼用溶液較載劑稍微令人不舒服，但在滴入後 30 分鐘，舒適分數並沒有明顯的差異。

在每一天第一次給予試驗物質之劑量後評估脈絡膜血流量、速率和體積。第 1 天，在投藥後 30、60、120 和 240 分鐘測量脈絡膜血流量，第 2 和第 3 天，僅在前兩個時間點測量。使用雷射多普勒血流量測定裝置測量，此為用於可視化和測量黃斑中心凹下脈絡膜血流量之最先進技術、非侵入性及定量之方法。

總體結果指出該鹽酸肼苯噻嗪眼用調合物在局部眼部給藥後具有藥理學活性：

在經鹽酸肼苯噻嗪治療之眼睛中具有平均脈絡膜血液量及速率值增加的趨勢，其在第 1 天局部眼部給予劑量後約 2 小時達到高峰並在給予劑量後約 4 小時（即，2 個小時後）回到基線值。在 AMD 組中亦發現經鹽酸肼苯噻嗪治療之眼睛中的血容量最早可在第 1 天給予劑量後 30 分鐘即增加。

在脈絡膜血流量方面，在 AMD 受試對象中，經鹽酸肼苯噻嗪治療之眼睛中有平均積分提高之趨勢。相反地，在正常/健康受試者，平均值及相關之標準差（SDs）兩者在第 1 天的所有時間點仍然保持很低。

評估第 1 天時 AMD 和正常組之間的脈絡膜血流量結

果勝算比分析。組間差異之測試係根據 Fisher 精確試驗，使用 SAS 9.2 版本 (SAS, 2009) 之 FREQ 程序計算。在脈絡膜血容量方面，勝算比在 60 分鐘時間點之 0.22 ($p=0.337$) 至 120 分鐘時間點之 6.67 ($p=0.106$) 之間變化，這暗示 AMD 患者在 120 分鐘時間點處具有較高之鹽酸胍苯噻嗪反應的可能性。

這項研究之結果證明鹽酸胍苯噻嗪眼用溶液是安全的且一般而言耐受性良好，治療引發之不良事件的發生率低且嚴重性一般而言是輕微的，並且相當均勻地分佈在 2 組受試群中。在研究過程中並無嚴重不良事件、無死亡病例且無其他臨床顯著之安全性研究結果。眼部充血為最常報告之與治療相關的眼部 AE，在這項研究中的大部分受試對象有此報告。然而，眼部充血之發病率與鹽酸胍苯噻嗪之周邊血管擴張作用相一致且並不令人意外。脈絡膜血液數據之分析提示鹽酸胍苯噻嗪可能到達眼睛後面黃斑區，以在局部眼部滴注後改善脈絡膜血液循環。由於受損之血流可能是促進乾性 AMD 進展的因素，這些結果提示鹽酸胍苯噻嗪可能為治療乾性 AMD 之有用的治療劑。

實例 4

胍苯噻嗪調合物單一劑量之毒性

使用兔子模型，根據 Draize 程序以胍苯噻嗪眼用調合物進行之單一劑量眼部刺激性研究已證明該調合物產生眼部刺激之傾向為非常低至輕微。

使用不同劑量之胍苯噻嗪（0.0%、0.5%、1.0%及2.0%[重量/重量]）完成數個研究以評估胍苯噻嗪作為眼部刺激劑之可能性。大致上依實例 1 中之描述製備胍苯噻嗪調合物。將年輕之成年雌性紐西蘭白兔分為對照組和三個治療組（每組 n=3）。將 0.1 毫升劑量（對照組或 0.5%、1.0%、2.0%胍苯噻嗪調合物）滴入每隻兔子的右眼並以左眼作為對照。使用兔子作為這些研究中之測試模型係由於其對眼部刺激之反應能力的顯示方式對用來預測類似之人類反應是有價值的。已知兔子模型對一些刺激劑較人類更敏感（Millichamp 1999a, Millichamp 1999b）。採用已知會引起瞬時眼部刺激之 pH 4.2 的緩衝劑及防腐劑以確保穩定性和劑量完整性。

總體而言，所有測試之調合物在使用兔子模型的初級眼睛刺激研究中顯示出最輕微之眼睛刺激性。含有 2.0% 胍苯噻嗪之測試調合物顯示出較含有 0.0%、0.5%或 1.0% 鹽酸胍苯噻嗪者刺激性稍強；各濃度顯示出之最大平均總 Draize 積分為 2.0，被歸類為最低刺激性。

實例 5

胍苯噻嗪調合物重複劑量之毒性

大致上依實例 1 中之描述製備濃度為 0.0%（載劑）、0.5%鹽酸胍苯噻嗪、1.0%鹽酸胍苯噻嗪及 2.0%鹽酸胍苯噻嗪的鹽酸胍苯噻嗪眼用溶液。如表 2 所示，在 40 隻 Dutch Belted 兔子（每組 5 隻雄性和 5 隻雌性）之

指定眼睛中每天投予調合物、載劑或對照組共 28 天。

表2：在動物中進行之重複劑量毒性研究的摘要

組別	治療	劑量	
		左眼	右眼
1	載劑 (0.0% 鹽酸胍苯噻嗪)	40 微升/載劑	40 微升/載劑
2	0.5% 鹽酸 胍苯噻嗪	40 微升/0.5%	40 微升/載劑
3	1.0% 鹽酸 胍苯噻嗪	40 微升/1.0%	40 微升/載劑
4	2.0% 鹽酸 胍苯噻嗪	40 微升/2.0%	40 微升/載劑

第 1 組之左眼接受載劑，右眼接受生理鹽水，而第 2-4 組之左眼接受鹽酸胍苯噻嗪（低劑量[0.5%重量/重量之胍苯噻嗪，0.2 毫克/公斤/劑量]、中劑量[1.0%重量/重量之胍苯噻嗪，0.4 毫克/公斤/劑量]或高劑量[2.0%重量/重量之胍苯噻嗪，0.8 毫克/公斤/劑量]），右眼接受載劑。

經過 28 天之局部眼部治療後，施用載劑或鹽酸胍苯噻嗪並未導致發展出顯著之劑量相關的毒理學變化，包括下列評估：例行眼部評估、眼內壓測量、體重、器官重量、臨床化學、眼病理、炎症、變性、或 Dutch Belted 兔子眼睛中之毒性組織學證據。

在這項研究中投服之最高劑量為可使用眼部製劑載劑製備，但同時保持胍苯噻嗪活性藥物成分之良好溶解度的最大可能濃度。投服之最大劑量體積為可施用在兔子動物

模型中之眼睛的最大體積。這造成每一劑量使用總劑量體積 40 微升來投服 0.8 毫克/公斤/劑量之最大每日劑量。

所有組之間食物消耗類似且各組之間的體重均無統計上之顯著差異。在常規體檢和臨床檢查中並未注意到與治療相關之研究結果。無計劃外之死亡。

在第 28 天進行之測量中，第 1 組和第 2-4 組間之宏觀眼部檢查結果並無統計上之顯著差異，無論是雄兔還是雌兔。

在給予劑量前和第 29 天檢查光反射。所有治療組在所有時期之所有瞳孔反應均正常。

在使用裂隙燈生物顯微鏡（其包含插入一個藍色過濾器以評估螢光染料保留）後，應用修改之 Hackett 和 McDonald 微觀眼分級系統（Hackett, 1996）來評估眼部研究結果。在給予劑量前或第 29 天之研究測量期間，第 1 組和第 2-4 組間之任何經評估之微觀眼部檢查參數並無統計上之顯著差異，無論是雄兔還是雌兔。

在給予劑量前及第 29 天，對照組及試驗兔子中之 IOP 平均眼內壓測量（Tono-pen；Reichert Ophthalmic 儀器，紐約 Depew）讀數係在 15-25 毫米汞柱之間，這是在正常的生理範圍內。結束之前（第 29 天），1 個參數顯示出統計上顯著之差異：當與第 1 組平均值比較時，第 4 組雌兔之左眼平均 IOP 增加，雖然該平均值（22 毫米汞柱）係在正常的生理範圍內；此外，第 4 組雌兔之左眼平均 IOP 與經安慰劑治療之右眼平均 IOP 並無不同。

在任何研究期間，各組間之血液學指標均未出現統計上顯著之差異，除了在第 2 和 4 組雌兔之第 29 天樣本中具有低對數轉形絕對嗜酸性粒細胞計數外。

在任何研究期間，各組間之血清化學指標均未出現統計上顯著之差異，除了在第 2 和 4 組雌兔之第 29 天樣本中具有低膽固醇值外。

第 1 組和第 2-4 組間之平均器官重量和相對器官重量均無統計上顯著之差異，包括雄兔及雌兔兩者。在驗屍期間並未觀察到被認為與劑量有關之明顯的宏觀病理學變化。

由經專科認證之獸醫眼科醫生對四十（40）組包含每隻眼睛之顫、中樞（包括視神經）及鼻腔矢狀切面、淚腺及眼附屬器官之經蘇木精和伊紅染色的切片進行病理組織學檢查。在所有組中，研究結果包括結膜淋巴毛囊、角膜上皮之局灶性或瀰漫性損失和/或視網膜褶皺。右眼與左眼之間和第 1 至 4 組之間出現這些研究結果的頻率幾乎相等，其均與加工之人工品有關且被認為是偶然出現的研究結果。經過 28 天之局部眼部治療後，每日施用高達 2.0% 之鹽酸胍苯噻嗪或載劑並未導致 Dutch Belted 兔子之眼睛發展出眼部病理、炎症、變性或毒性之組織學證據。

根據這些以建議之調合物進行之眼部給予劑量的研究所得之結果，具有高達 2.0% 重量/重量之鹽酸胍苯噻嗪的配製劑量顯示出當用於人類眼睛中時應有相當良好之耐受性且安全。

實例 6

胍苯噻嗪調合物對脈絡膜血流量之效果

大致上依實例 1 中之描述製備 1.0%胍苯噻嗪眼用溶液。

經由肌肉內途徑，以 35 毫克/公斤氯胺酮(ketamine)和 5 毫克/公斤甲苯噻嗪 (xylazine) 為 12 隻體重為 2.5-3.0 公斤之雌紐西蘭白兔進行麻醉。每小時給予初始劑量之一半以維持麻醉。

經由將左眼之眼內壓提高至 40 毫米汞柱來創造眼高血壓模型，眼內壓之提高係藉由眼前房穿刺來建立眼高血壓模型。在左心室中插入通過右頸動脈之導管以用於注射微球 (IMT-Stason 實驗室，加州 Irvine)。在股骨動脈中插入導管以供採血。

將作為對照組之 50 微升生理鹽水溶液 (n=5)，或 1.0%之胍苯噻嗪眼用溶液 (n=7) 局部滴注在左眼中。然後，在 0、30、60 和 120 分鐘以彩色微球測量脈絡膜血流量。在每個時間點，將 0.2 毫升之不同顏色的微球注入左心室中以作為參考並在注射微球後正好一分鐘從股骨動脈採取血液樣本。將血液樣本收集在肝素化試管中，並記錄體積。

在最後一次採取血液樣本後為兔子注射 100 毫克/公斤之戊巴比妥鈉以將其安樂死。摘除左眼並切除脈絡膜。將該組織樣本稱重、消化並以血球計數儀計算組織中之微

球。使用下列公式計算在一定時間點時各組織的血流量：

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

其中， Q_m 為以微升/分鐘/毫克計之組織的血流量， C_m 為每毫克組織之微球計數， Q_r 為以微升/分鐘計之血液樣本的流速，而 C_r 為參考之血液樣本中之總微球數。

與對照組相比較，該濃度為 1.0% 的胍苯噻嗪眼藥水被發現在藥物滴注後 30 和 60 分鐘能顯著增加兔子之脈絡膜血流量 ($P < 0.05$)，結果示於第 1 圖中。

實例 7

胍苯噻嗪調合物在體內對由雷射誘導之脈絡膜新血管增生的效果

大致上依實例 1 中之描述製備 0.5%、1.0% 和 2.0% 胍苯噻嗪眼用溶液。

經由肌肉內途徑，以 35 毫克/公斤氯胺酮和 5 毫克/公斤甲苯噻嗪為 25 隻體重為 150-180 克之棕色挪威大鼠進行麻醉。局部施用 1% 之托平卡胺 (tropicamide) (Bausch & Lomb; Tampa, Fla.) 和 2.5% 去氧腎上腺素將大鼠之瞳孔放大。以 VOLK 超級瞳孔 XL 生物顯微鏡鏡頭 (Keeler 儀器公司，賓州 Broomall) 將眼底可視化。使用波長 532nm 之倍頻 Nd:YAG 雷射 (LasereX LP3532; Lumenis 公司，猶他州鹽湖城) 穿透 Bruch 膜。斑點尺寸為 100 微米。投遞之功率為 200 毫瓦，曝光施用時間為 0.15 秒。在眼底製造 6 處損傷，此 6 處損傷離視神經之距

離大致相等。僅包括那些有泡沫形成之雷射斑。排除具有大量視網膜出血之損傷。

在雷射治療後，立即在二側眼睛中滴入包含 0.5% (n=5)、1.0% (n=10) 或 2.0% (n=5) 鹽酸胍苯噻嗪組之胍苯噻嗪眼藥水，或生理鹽水眼藥水 (n=5)，每天三次，連續 4 週。在雷射治療後，立即投藥被認為是用於乾性 AMD 之較佳模型，此與正常之由雷射誘導之 CNV (濕性 AMD) 模型不同，該 CNV (濕性 AMD) 模型係在雷射損害後約 2 週發生出血時投藥。

治療四週後，在瞳孔放大之經麻醉的動物中使用數位眼底照相機 (TRC-50 EX: Topcon, 日本) 和標準螢光素過濾器進行螢光素血管造影。經由舌下靜脈，經靜脈內途徑為動物注射 0.3 毫升之 10% 螢光素異硫氰酸酯-葡聚糖 (Sigma-Aldrich 公司，密蘇里州聖路易斯)，劑量為 0.14 毫升/100 克體重。在 20 分鐘內捕捉螢光素照片，選擇品質最清晰之圖片以供使用 Imagenet 2000 數位成像系統 (Topcon 醫療系統公司，紐澤西州 Paramus) 測量形成之 CNV 面積，結果示於第 2 圖中。

在捕捉螢光素血管造影的圖片後，殺死大鼠並摘除眼睛，將眼睛在 10% 磷酸鹽緩衝之福爾馬林中固定。切除角膜和晶狀體並將整個視網膜仔細地解剖。從脈絡膜之邊緣向等分線製作徑向切口 (通常為 4-6 個切口) 並將眼杯平面固定，使脈絡膜面朝上。在 Axioskop 顯微鏡 (蔡司公司，紐約 Thornwood) 上藉由螢光顯微鏡將平面固定之標

本成像，並使用 Image-Pro Plus 軟體（Media Cybernetics 公司，馬利蘭州 Silver Spring）測量 CNV 的面積，結果顯示於第 3 圖中。

治療 4 週後，所有治療組之螢光素染色上均顯示出 CNV 面積顯著減少（2.0% 溶液方面為 $P < 0.05$ ，0.5% 和 1.0% 溶液方面為 $P < 0.01$ ）。脈絡膜平面固定標本顯示出同樣的結果（所有組均為 $P < 0.01$ ）。

在這些分析中，至少可在 1.0% 鹽酸胍苯噻嗪眼用溶液組中見到顯著降低，1.0% 鹽酸胍苯噻嗪眼用溶液亦顯示出顯著減少脈絡膜血流量。

實例 8

胍苯噻嗪調合物在體外對管形成之效果

在適當之生長條件下，當生長在基質凝膠表面上時，內皮細胞在體外將形成像管子之結構。此研究測量胍苯噻嗪調合物在體外抑制形成管子的能力且代表體外抗血管生成之分析。

從 ScienceCell（加州聖地牙哥）購買人類臍靜脈內皮細胞（HUVEC）。以內皮細胞基礎培養基（EBM-2；Lonza Walkersville 公司，馬利蘭州 Walkersville）、10% 胎牛血清及含有 2mM 麩醯胺、100 單位/毫升青黴素和 100 微克/毫升鏈黴素之血管內皮細胞生長培養基（EGM-2 SingleQuots；Lonza Walkersville 公司）製備培養基。在時間 0 時將濃度為 0（對照組）、1、3、10、30 和 100 微

克/毫升之胍苯噻嗪加入培養基中。將細胞在 5% CO₂ 和 95%空氣之大氣下，培養在 37℃，2.5%基質凝膠上，並將 HUVEC 培育 48 小時。使用傳統的照像顯微鏡（蔡司）取得細胞形態之圖像。重複進行 3 次研究 HUVEC 形成管之體外實驗。

以 1 毫克/毫升之胍苯噻嗪進行之治療被發現與對照組並無不同。使用 3 微克/毫升之胍苯噻嗪時有些 HUVEC 無法生長形成管子，此效果在使用 30 微克/毫升之胍苯噻嗪時最爲明顯。100 微克/毫升之胍苯噻嗪會造成細胞凋亡。

實例 9

對由碘酸鈉誘導之非滲出型老年性黃斑變性之大鼠模型的活體外效果

靜脈內注射碘酸鈉（NaIO₃）對視網膜色素上皮（RPE）中之細胞造成選擇性毒性（Noell 1953）。對 RPE 之效果係取決於 NaIO₃ 之劑量。此方法係用於創建可在其中評估胍苯噻嗪調合物之潛在保護作用的非滲出型 AMD 大鼠模型。

使用人類視網膜色素上皮細胞株（ARPE-19；美國型培養物集存庫（American Type Culture Collection），維吉尼亞州 Manassas）來評估 NaIO₃ 在體外的毒性。將細胞培養在 37℃，由 5% CO₂ 和 95%空氣組成之潮濕大氣中。生長培養基係由 Dulbecco 氏改良之 Eagle 培養基

(DMEM) 和 Ham 氏 F12 培養基之 1:1 混合物所組成，其中含有 1.2 克/升碳酸氫鈉、2.5mM L-麩醯胺、15mM HEPES、0.5mM 丙酮酸鈉及 10% 胎牛血清（均來自 Invitrogen）。藉由 0.25% 胰蛋白酶-0.2 克/升乙二胺四醋酸（EDTA）（Sigma-Aldrich 公司）之消化作用來收成匯合之培養物。在細胞增殖分析方面，令 ARPE-19 細胞隔夜生長在 96 孔組織培養盤中。然後，以含有各種 NaIO_3 濃度（0、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100 微克/毫升）之新鮮培養基替換該培養基。培育 48 小時後，以 Dulbecco 氏磷酸鹽緩衝之生理鹽水清洗細胞 1 次，再進一步與 100 微升之 10% 3-（4,5-二甲基噻唑-2-基）-2,5 二苯基溴化四唑鎢（MTT）一起培育正好 4 個小時。然後，藉由抽吸移出培養基，在每一孔加入 100 微升 DMSO，並將培養盤搖動 2 分鐘以溶解細胞和有色之甲臍（formazan）產物。使用 SpectraCount 盤式分析儀（Packard 生物科學公司，康乃迪克州 Meridan）在 570nm（OD570）讀取每一孔中之吸光度。添加之 NaIO_3 對細胞存活力的效果係經由計算接觸 NaIO_3 之細胞的 OD570 對該對照組細胞之 OD570 的比例（以對照組之百分比表示）得知。在每個實驗期間每一組使用 6 個孔重複進行實驗 6 次。

使用 MTT 比色分析來定量 NaIO_3 在體外對 RPE 細胞之毒性效果。在 10 微克/毫升或更低之 NaIO_3 濃度下，細胞之生長未顯著減少。30 微克/毫升及 100 微克/毫升之

NaIO₃ 濃度分別將存活之 ARPE-19 細胞數減少至約為對照組中所觀察到之水準的 65%及 40%。

實例 10

由碘酸鈉誘導之非滲出型老年性黃斑變性之體內大鼠模型

爲了建立 NaIO₃ 模型，將 28 週齡之雄性棕色挪威大鼠（德州 A&M 大學，德州）安置在具有 12：12 小時循環照明時間表之標準動物房內。以正常的食物和水餵養動物。所有程序均符合 ARVO 有關用於眼科和視覺研究中之動物的相關規定。

將 NaIO₃（Sigma-Aldrich 公司）以 3.0%之濃度溶解在生理鹽水中。通過舌下靜脈爲大鼠單次注射劑量爲 0、7.5、15、20、30、40 和 60 毫克 NaIO₃/公斤體重之 NaIO₃（每一濃度組使用 4 隻大鼠）。在注射後 3 至 56 天之間的時間點選擇性地檢查功能（ERG、眼底圖片及螢光素血管造影）和組織學的變化。

在以胛苯噻嗪 1.0%眼用溶液進行之實驗中（Pam Lewis 聯合公司，德州 San Antonio），正常組係在雙側滴入單獨之生理鹽水，不注射 NaIO₃。NaIO₃ 組在單次注射 35 毫克/公斤 NaIO₃ 後僅滴注單獨之生理鹽水，而胛苯噻嗪 1.0%+NaIO₃ 組則在注射 35 毫克/公斤 NaIO₃ 後，滴注胛苯噻嗪 1.0%眼藥水。注射後立即開始每天滴注所有眼藥水 3 次，共 4 週。

使用 EPIC-2000 視覺電診測試系統（LKC 技術公司，

馬利蘭州 Gaithersburg) 進行視網膜之功能測試。藉由 Grass 儀器 PS22 光刺激器來提供閃光刺激 (Grass 儀器公司, 麻州 Waltham)。將光刺激器放置在距離眼睛 5 英寸處。在每個終點 (2 週和 4 週) 處依下述測量所有大鼠之視網膜電圖 (ERG) c-波。令大鼠暗適應一整夜, 然後經由肌肉內途徑給予大鼠 35 毫克/公斤氯胺酮加 5 毫克/公斤甲苯噻嗪以將其麻醉。然後, 每一小時給予一半的初始劑量, 以保持麻醉。以 1%阿托品、1%托吡卡胺及 2.5%去氧腎上腺素各 1 滴將所有大鼠之瞳孔放大。在記錄前, 使用 1 滴奧普卡因 (opticine) 進行表面麻醉。在測量 ERG 期間將所有動物保持溫暖。

大鼠之視網膜, 從神經視網膜層到感光細胞及 RPE 細胞層被高劑量之 NaIO_3 不可逆轉地損壞。高劑量之 NaIO_3 會引起嚴重之視網膜毒性; 較低之劑量則未發現與高劑量一樣多或嚴重之變化。這些結果指出中等劑量之 NaIO_3 將適合用於在動物模型中治療乾性 AMD; 用於此動物模型中之 NaIO_3 最佳劑量為 30 毫克/公斤至 40 毫克/公斤。

先藉由 DC-ERG 記錄, 再藉由 ACERG 記錄來測量每隻大鼠。在 AC-ERG 記錄方面, 將銀/氯化銀電極輕輕地放置在與角膜接觸的位置以作為參考電極。在角膜和電極之間使用一滴 0.9%氯化鈉來建立穩定之信號傳導。將不銹鋼長電極插入 2 眼之間的前額皮膚下方, 將另一不銹鋼短電極插入腿部之皮下以作為接地電極。使用單一暗視白

閃光（持續時間為 20 毫秒）來引起 ERG 和 b-波。刺激強度為 628 cds/m²，而帶通濾波器過濾 0.3 至 500 赫茲。在 DC-ERG 方面，經由前述方法（Peachey et al., 2002, Vis Neurosci, 19(6):693-701），使用直徑為 1 毫米，具有細絲的玻璃毛細管（Sutter 儀器，加州 Novato）（其中填滿 Hank 氏平衡之鹽溶液（Invitrogen 公司，加州 Carlsbad））來與具有連接接頭之銀/氯化銀金屬絲電極接觸。該毛細管係與大鼠的角膜表面接觸。另一置於對側眼之表面上的類似電極係作為參考導線。將反應放大（DC-100 Hz，增益=1000X）（DP-301；Warner 儀器，康乃迪克州 Hamden）並在 10 赫茲或 1000 赫茲數位化。藉由 iWORX LabScribe 數據記錄軟體（iWorx0CB 科學，新罕布什爾州 Dover）分析數據。光刺激係使用 fiber-lite 高強度照明器（Dolan-Jenner 工業，麻州 Boxborough）從光通道衍生，該 fiber-lite 高強度照明器具有一放置在光路中以調整刺激亮度之中性密度濾光片（Oriel，康乃迪克州 Stratford）。本實驗中所使用之刺激亮度為 3.22 log cd/m²，持續時間為 4 分鐘。以聚焦在纖維光束之輸出側（大鼠眼睛位置）的 Minolta（新澤西州 Ramsey）LS-110 光度計進行亮度校準。

在 AC-ERG 記錄期間，a 波係從基線測量到第一負槽；最大 b 波振幅（Vbmax）係從第一負槽（a 波）測量到 b 波之第一正峰。在 DC-ERG 記錄方面，b 波之後的第二個正峰為 c 波，其振幅係從 b 波之後的槽（其為後電

位；AP）測量到 c 波的峰。快速振盪（FO）的振幅係從 c-波峰測量到 FO 槽。光峰（LP）係從 FO 槽測量到最大 LP（Peachey，2002）。

使用數位眼底照相機（TRC-50EX；TOPCON）和 Imagenet 2000 數位成像系統（Topcon 醫療系統）捕捉視網膜著色圖片和螢光素血管圖。當使用螢光素血管造影時，通過大鼠之舌下靜脈注射 10 毫克之螢光素鈉。依上述進行麻醉和瞳孔擴張。

功能檢查後，處死全部老鼠。將約 16 隻大鼠（來自不同的胼苯噻嗪治療組）除去眼睛並將眼睛在 2.5%戊二醛中固定 2 小時，然後在 5%福馬林中固定一整夜；從每隻動物中取得 1 隻眼睛以用於組織學和免疫組織學研究中，準備另一隻眼睛以用於在平面固定標本上測量自發螢光。在組織學評估方面，將經石蠟包埋之組織切片成 3 微米厚。將眼睛沿垂直子午線從角膜切開至視神經頭，然後以蘇木精和伊紅染色。使用 Axioskop 顯微鏡（蔡司）來捕捉影像。在製備平面固定標本方面，從每隻動物摘除 1 隻眼睛。固定後，輕輕移出眼睛的前部，以及角膜、晶狀體和視網膜感覺層，並將剩餘的眼杯在 PBS 中清洗。製作 4 個從邊緣到中心之切口以協助將眼杯平攤在玻片上。在共聚焦顯微鏡（蔡司 LSM510；蔡司）上使用氬雷射（波長 488nm）研究並捕捉在 RPE 在平面固定標本中之 RPE 的自發螢光。

使用 Student t 檢驗進行統計分析。體內實驗係使用

單尾 t 檢驗，而體外分析係使用雙尾 t 檢驗。

螢光素血管造影和眼底攝影

60 毫克/公斤 NaIO_3 劑量組中最早可在注射後 3 天在整個視網膜中觀察到高螢光；然而，在這麼早之時間點的眼底圖像中並未見到明顯的變化。在注射後 3 天可在 40 毫克/公斤和 30 毫克/公斤 NaIO_3 劑量組中見到部分視網膜高螢光，但效果並不如在 60 毫克/公斤 NaIO_3 劑量組中所觀察到的那麼明顯。在注射後較長之時間點處（定義為介於 28 至 56 天之間）在周邊視網膜中之低螢光明顯。黃色小點或疤痕（此與 NaIO_3 劑量有關且為壞死之表示）最早 7 天可在所有 3 組之周邊到中央視網膜中看見。在 20 毫克/公斤 NaIO_3 劑量組中，眼底圖像和螢光素血管造影中之變化直至 28 天都不明顯。

NaIO_3 對 ERG 之效果

單次注射劑量為 40 或 60 毫克/公斤之 NaIO_3 對最大 b 波振幅（ V_{bmax} ）具有戲劇性的效果，其在注射後 3 天和 7 天明顯。60 毫克/公斤組中之 ERG b 波在治療後 28 天內完全消失。在 40 毫克/公斤組中，b 波振幅在注射後 3 天內顯著下降且在所有隨後之時間點持續下降；56 天時沒有可測量之 b 波。二十（20）毫克/公斤之 NaIO_3 在 7 天時降低 b 波振幅，但在 14 天及之後回復到在對照組中所看到的水準。

15 或 7.5 毫克/公斤之 NaIO_3 劑量不會在任何時間點抑制任何 ERG 波。單次注射 30 毫克/公斤 NaIO_3 在注射後 7 天造成所有的 ERG 波降低。30 毫克/公斤劑量組中之 a 波和 b 波信號顯示出在稍後的時間點（14 天及 28 天）回復。相反地，注射 30 毫克/公斤 NaIO_3 後之所有時間點 c-波信號均被抑制。FO 和 LP 指標係相對於 c 波測量並反映在 c 波數據中看到的 NaIO_3 劑量反應。

ERG c 波起源於 RPE。 NaIO_3 對 ERG c 波信號的抑制效果與此化合物之已知的毒性作用是一致的。ERG c 波信號長期受抑制支持使用此大鼠模型來研究非滲出型 AMD。

對視網膜組織病理學之效果

在注射後 3 天，30 毫克/公斤 NaIO_3 組中出現一些視網膜壞死，這在較高劑量組（即，40 或 60 毫克/公斤 NaIO_3 ）或注射後更長的時間變得更嚴重。來自較低劑量組（<30 毫克/公斤）中之大鼠的視網膜中組織學變化不明顯。類似地，在視網膜平面固定標本上，較高劑量組在注射 3 天後之 RPE 單層檢查中顯示出壞死的證據；30 毫克/公斤 NaIO_3 及較低劑量組中未見到顯著的變化。大鼠在注射後 3 天或更久，來自 60 毫克/公斤組之視網膜中 RPE 細胞和感光細胞二者的密度明顯減少。在 40 毫克/公斤劑量組中，在注射後第 7 天開始觀察到類似的變化。30 毫克/公斤 NaIO_3 劑量組在注射後第 7 天開始注意到 RPE 細

胞中之黑色素顆粒的數量減少。在 20 毫克/公斤 NaIO_3 劑量組中未見到明顯變化。

藉由共聚焦顯微鏡測量平面固定標本製品中之 RPE 細胞經雷射誘導的自發螢光。在給予 30 毫克/公斤 NaIO_3 或更高的劑量後，3 天時可在 RPE 中觀察到小孔，其在注射後更長的時間會增加數量。這些 RPE 自發螢光信號中的缺陷指示 RPE 細胞之壞死區域。在 20 毫克/公斤 NaIO_3 劑量組中，從第 7 天開始觀察到 RPE 自發螢光中的小孔，其數量少於在高劑量組中所觀察到者。

胥苯噻嗪調合物阻斷由 NaIO_3 引起之損傷的能力

根據上述之時間和劑量依賴性實驗的結果選擇濃度為 35 毫克/公斤之 NaIO_3 及 28 天之時間點來進行測試胥苯噻嗪阻斷 NaIO_3 對大鼠 ERG 形態之效果的能力之實驗。正常組未接受任何 NaIO_3 且僅接受生理鹽水眼藥水。注射劑量為 35 毫克/公斤之 NaIO_3 4 週後，ERG c-波振幅顯著下降至對照組的 31% ($P < 0.01$)。胥苯噻嗪 1.0%+ NaIO_3 組的 ERG c-波振幅下降至對照組的 50% ($P < 0.05$)。1.0% 胥苯噻嗪+ NaIO_3 組中觀察到之 c 波信號的振幅顯著大於僅注射 NaIO_3 組中之信號 ($P < 0.01$) (第 4 圖)。這證明胥苯噻嗪 1.0%眼藥水在此模型中之保護作用；胥苯噻嗪阻斷 (或恢復) 61%由注射 NaIO_3 所造成之對 RPE 細胞的損害。

實例 11

胍苯噻嗪對視網膜色素上皮細胞之抗氧化作用
由細胞損傷引起之氧化壓力的定量測定法

將人 RPE 細胞株 ARPE-19 (ATCC; 維吉尼亞州 Manassas) 在 37°C, 5% CO₂ 下培養在輔以 10%胎牛血清、50 單位/毫升青黴素-鏈黴素及 2.5 mM 麩醯胺之 Dulbecco 氏改良的基本培養基 (DMEM) 中。該細胞株未經轉形, 且具有 RPE 在體內之結構和功能特性。將細胞接種在 96 孔盤中, 並在 3 至 10 次之傳代內研究亞融合細胞單層。在開始實驗程序之前, 除去培養基並以無酚紅且輔以 1%小牛血清、0.06%麩醯胺和 1%青黴素-鏈黴素之低葡萄糖 DMEM 替換之。

將培養之 ARPE-19 細胞以 1×10⁵ 細胞/毫升之濃度接種在 96 孔盤中。當細胞達到 80%融合時即用來進行實驗, 以防止接觸抑制。將 ARPE-19 細胞暴露於經設計用來模擬氧化壓力 (H₂O₂, t-BHP) 或缺氧 (NaIO₃) 之化學劑並測量不同濃度之胍苯噻嗪 (1、3、10、30 或 100 微克/毫升) 阻斷損傷的能力。

在氧化壓力和缺氧實驗方面, 將特定之化學劑及胍苯噻嗪調合物均加入培養盤之孔中 (或對照組中僅添加化學劑), 將培養盤在 37°C 培育 24 小時。使用 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎢溴化物 (MTT) 分析來測定每一培養中之活細胞的相對數量 (只有活細胞具有將 MTT 分子轉化成暗紫色物質甲臞所需之粒線體酶活性)

以評估細胞存活力（Swanson, 1992, *Neurosci Lett*, 147(2):143-146）。暴露 24 小時後，將 MTT 試劑溶液（5 毫克/毫升）以 1：10 MTT 試劑：培養基體積之比例加入各孔中。將培養物與 MTT 試劑在 37°C 下培育 3 小時。培育結束時，去除 MTT 溶液並在每一孔中加入 0.1 毫升二甲亞砷（DMSO），以溶解該紫色甲臍產物。使用 SpectraCount 盤式分析儀（Packard 生物科學公司，康乃迪克州 Meridan）在 570nm（A570）處測量每個樣本之光密度（OD）以測定活細胞之比例。MTT 比色分析法中之 OD 讀數與確切之細胞數之間的關係係經由將細胞以同等密度接種後，再進行 MTT 分析並在平行複製之培養中手動計算血球細胞數來測定。將錐蟲藍溶液加入該血細胞計數器培養中，從而僅計算存活之排除染料的細胞。此方法能建立 A570 對細胞數之標準曲線。

使用 Swanson 等人所描述之修改的方法（Swanson 1992；Varming 1996）來引起化學缺氧。清洗 RPE 細胞並以含有不同濃度之疊氮化鈉（0.1mM~100mM）的新鮮 DMEM-F12 培養基替換。然後，加入胍苯噻嗪調合物並將該培養物和測試劑在 37°C 培育 24 小時。經由沖洗掉培養基來終止反應。將 MTT 試劑溶液（5 毫克/毫升）以 1：10 MTT 試劑：培養基體積之比例加入其中並在 37°C 下培育 3 小時。培育結束時，去除 MTT 溶液並在每一孔中加入 0.1 毫升之 DMSO，以溶解該紫色甲臍產物。藉由使用 SpectraCount 盤式分析儀（Packard 生物科學公司，康乃

迪克州 Meridan) 在 570nm 處測量每個樣本之 OD 以測定存活細胞之比例。

所有數據均以平均值 $\pm$ 標準差呈現。進行非成對 Student t 檢定以分析某一時間點時 2 個平均值之間的顯著性。P<0.05 時該差異被認為是顯著。一氧化氮測量之結果係以每 1×10^6 個細胞之 μM 亞硝酸鹽和硝酸鹽表示。

胍苯噻嗪對由 tBHP 引起之毒性的效果

以 0.01mM tBHP 損害後，對照組（以單獨之 tBHP 處理的細胞）之細胞存活力降低至 $89.90\%\pm 2.80\%$ ，以 0.03mM tBHP 損害後則降低至 $55.80\%\pm 4.08\%$ 。以 0.01mM 和 0.03mM tBHP 損害後，胍苯噻嗪調合物以表觀濃度依賴的方式抑制由 tBHP 引起之細胞損傷。以 0.01mM 和 0.03mM tBHP 損害後，最大存活力保護作用係在使用 100 微克/毫升胍苯噻嗪時觀察到（在 0.01mM tBHP 方面為 $109.99\%\pm 2.41\%$ ，在 0.03mM tBHP 方面為 $100.84\%\pm 13.00\%$ ）；與對照組相比較，這些差異為統計上顯著的（P<0.001）。以 0.01mM tBHP 損害後，使用 30 微克/毫升胍苯噻嗪亦可觀察到統計上顯著之保護作用（P<0.01），而以 0.03mM tBHP 損害後，所有濃度之胍苯噻嗪均可觀察到統計上顯著之保護作用（P<0.01）。

胍苯噻嗪對 ARPE-19 細胞中由 H_2O_2 引起之毒性的效果

以 0.3mM H_2O_2 損害後，對照組（以單獨之 H_2O_2 處理

的細胞)之細胞存活力降低至 $48.74\% \pm 2.40\%$ ，而以 1.0mM H_2O_2 損害後則降低至 $41.28\% \pm 0.80\%$ 。以 0.3mM 和 1.0mM H_2O_2 損害後，胥苯噻嗪調合物以表觀濃度依賴的方式抑制由 H_2O_2 引起之細胞損傷。以 0.3mM H_2O_2 損害後，使用 30 微克/毫升胥苯噻嗪時可觀察到最大存活力保護作用 ($74.30\% \pm 0.80\%$)；與對照組相比，此差異為統計上顯著的 ($P < 0.001$)。以 0.3mM H_2O_2 損害後，使用 30 微克/毫升胥苯噻嗪時可觀察到最大存活力保護作用 ($68.04\% \pm 0.67\%$)；與對照組相比，此差異為統計上顯著的 ($P < 0.001$)。以 0.3mM H_2O_2 損害後，使用 100 微克/毫升 ($P < 0.001$) 及 10 微克/毫升 ($P < 0.001$) 之胥苯噻嗪可觀察到統計上顯著之保護作用 ($P < 0.001$)，而以 1.0mM H_2O_2 損害後，使用 100 微克/毫升之胥苯噻嗪可觀察到統計上顯著之保護作用 ($P < 0.001$)。

胥苯噻嗪對 ARPE-19 細胞中由缺氧引起之細胞損害的效果

使用 ProOx 缺氧系統在體外進行缺氧處理。令 ARPE-19 細胞黏附一整夜，然後在含氧量正常或缺氧的條件下暴露於胥苯噻嗪 ($0.1 \sim 100$ 微克/毫升) 24、48，和 72 小時。在缺氧下，使用經溫度和濕度控制之環境 C-室，藉由具有氮氣和二氧化碳氣體來源之 O_2 和 CO_2 控制器 (ProOx 模型 110 及 ProCO₂ 模型 120；BioSpherix 有限公司，紐約州 Redfield) 將氧濃度保持在 1% O_2 及 5%

CO₂。經由沖洗掉培養基來終止反應並根據培養基之體積，將 5 毫克/毫升之 MTT 以 1：10 之稀釋比例加入其中並在 37℃ 下培育 3 小時。培育結束時，去除 MTT 溶液並將細胞溶解在 0.1 毫升/孔之 DMSO 中。使用 SpectraCount 盤式分析儀（Packard 生物科學公司，康乃迪克州 Meridan）在 570nm 處測量每個樣本之 OD 以測定存活細胞之比例。

對照組（細胞暴露於 1% O₂ 及 5% CO₂，未以胍苯噻嗪治療）之細胞存活力在 48 和 72 小時分別為 98.91%±0.56% 和 97.45%±0.52%。與對照組相比較，胍苯噻嗪調合物顯著逆轉由缺氧引起之細胞損傷。使用 1 微克/毫升之胍苯噻嗪 48 小時（101.21%±0.54%；P<0.001）和 72 小時（103.55%±1.75%；P<0.001）可見到最大逆轉效果。

實例 12

胍苯噻嗪對 ARPE-19 細胞中一氧化氮（NO）製造之效果

依上節內容之描述暴露於胍苯噻嗪調合物及與化學劑一起培育後，將不含酚紅及地塞米松（dexamethasone）之培養基的樣本萃取出並使用亞硝酸鹽/硝酸鹽 Greiss 試劑系統測定亞硝酸鹽和硝酸鹽、相對穩定之終端產物一氧化氮（NO）的水準。將在 60 微升分析緩衝液中之不含酚紅之培養基的五十（50）微升等分樣本與各 10 微升之硝酸還原酶製劑及硝酸還原酶輔因子製劑（專利濃度）（其將硝酸鹽轉化成亞硝酸鹽）在室溫下，96 孔微量分析盤

中培育 60 分鐘。經過所需之培育時間後，將 10 微升 DAN 試劑加入每一孔中，培育 10 分鐘，然後在每一孔中加入 20 微升之 NaOH 以停止反應。使用 SpectraCount 盤式分析儀（Packard 生物科學公司，康乃迪克州 Meridan）在 540nm 處測量每個樣本之 OD 以測定總亞硝酸鹽/硝酸鹽。以硝酸鹽標準曲線計算數據。

以肼苯噻嗪調合物治療後未偵測到對 NO 製造之顯著效果。

實例 13

以鹽酸肼苯噻嗪眼用調合物治療非滲出型老年性黃斑變性（乾性 AMD）

這項研究為載劑對照之雙盲、單中心研究，其中將 60 位單隻眼睛中具有輕度至中度非滲出型 AMD 之個人隨機分配接受外用鹽酸肼苯噻嗪 1%或載劑對照組，一天三次，共 2 年。當所有受試對象均已完成 12 個月、18 個月和 24 個月時進行主要和次要終點之分析。

1%鹽酸肼苯噻嗪眼用溶液係以經過濾器滅菌之含有 1%（10 毫克/毫升）鹽酸肼苯噻嗪的無色等張溶液形式供給。除了作為防腐劑之苯扎氯銨和對羥基苯甲酸甲酯外，非活性成分包括：在醋酸鹽緩衝溶液中之乙二胺四醋酸二鈉、氯化鈉及丙二醇（全部均為美國藥典[USP]級），其 pH 值在 3.8-4.4 之範圍內且滲透壓濃度在 300-340 毫滲透壓莫耳/公斤之範圍內。

載劑係以同等於製造鹽酸胍苯噻嗪眼用溶液之方式製造，但不含活性劑。每一瓶內含有 7 毫升且瓶子具有可計量藥水使每滴為 40 至 50 微升之滴管。

該調合物和載劑對照組係由患者一天自行投服三次：上午、下午和晚上。每一滴滴液均包含 40-50 微升在無菌生理鹽水載劑中之 1%鹽酸胍苯噻嗪活性成分與防腐劑。患者係經由在該研究眼睛中滴入一滴藥物或載劑，每日三次，共 24 個月來自行投藥。

治療前進行之眼部檢查（僅治療之眼睛）包括：ETDRS 視力、屈光、眼內壓、瞳孔評估、裂隙燈檢查（評估眼皮/睫毛、結膜/鞏膜、角膜、前房、虹膜、晶狀體、前玻璃體）及瞳孔經放大之眼底鏡檢查（評估視神經、玻璃體、血管、黃斑和外周）。治療之眼睛的附加測試包括：暗適應、黃素螢光、脂褐素螢光、彩色眼底攝影、OCT 及脈絡膜血流量儀。治療 1 個月及 3 個月後，在該研究之眼睛進行之眼部檢查包括：ETDRS 視力、屈光、眼內壓、瞳孔評估、裂隙燈檢查（評估眼皮/睫毛、結膜/鞏膜、角膜、前房、虹膜、晶狀體、前玻璃體）及瞳孔經放大之眼底鏡檢查（評估視神經、玻璃體、血管、黃斑和外周）。在 6、12、18 及 24 個月進行治療之眼睛的眼部檢查，以及治療之眼睛的測試。

經由橫跨多次訪視計算視桿截距數據的斜率（最佳線性擬合）來產生變化之年率，藉著比較治療組中視桿截距中從基線開始的變化來分析主要療效指標，暗適應（視桿

截距)。暗適應可量化外層視網膜參數，諸如視桿功能。使用 Jackson 等人描述之方法 (J Ocul Biol Dis Inform., 1:7-11, 2008) 以電腦化之暗適應計 (AdaptDx; Apeliotus Technologies, 美國喬治亞州亞特蘭大) 測量。使用 Igor Pro (Wavemetrics, 美國俄勒岡州波特蘭) 繪製暗適應功能。主要終點為視桿截距，其測量單位是分鐘並呈現在儀器上。其他測量包括視錐敏感性高原值、視桿-視錐分界點及視桿敏感性回復斜率。暗適應測試係在基線及治療後 6、12、18 和 24 個月進行。

主要療效分析係在 12 個月的數據上進行。該研究持續為雙遮蔽法直至第 24 個月，在第 18 和 24 個月進一步分析療效和安全性。

若受試對象僅貢獻一個測量值，則被指定為斜率零。使用共變數模型之分析測試組別之間的平均斜率差異，在該模型中治療分配為固定因子，而基線視桿截距為共變量。使用用於缺失斜率之不同估算法及若組別之間有差別缺失則被指定為零值者進行敏感性分析。

使用兩組 t 檢驗，雙邊顯著性水準為 0.05，每一組中之樣本大小為 30 時具有 90%之統計檢定力來偵測比值至少為 0.863 之平均值差異對共同標準差的比。

例如：若 SD 為 4 分鐘且組別之間的差異為每年 3.45 分鐘，則使用 30/組將具有 90%之統計檢定力 ($3.45/4.00 = 0.863$)。

次要療效測量包括：ETDRS 視力、黃素螢光、脂褐

素自發螢光、彩色照片、OCT、暗適應（視錐敏感性、視桿-視錐分界點、視桿敏感性回復斜率）及脈絡膜血流量儀。關鍵次要終點分析包括：

當所有受試對象已完成 18 個月時評估從基線開始之視桿截距時間的變化

當所有受試對象已完成 24 個月時評估從基線開始之視桿截距時間的變化

黃素螢光之平均強度。OcuMet Beacon（OcuMet Beacon, OcuScience 公司，密西根州 Ann Arbor）測量視網膜組織之黃素螢光（FPF）。FPF 信號已被證明與視網膜組織中之粒線體的代謝狀態有關聯。以灰度單位（gsu）計之 FPF 的平均強度和平均曲線寬度可作為功能性測量值以在與基線測量值和對照組受試對象相比較時用來區別組織功能障礙之水準。從治療之眼睛取得五張中心在視網膜中央凹之 FPF 圖像。分析以 512x512 像素檔案儲存之 FPF 圖像以產生直方圖。繪製該治療之眼睛的像素強度（範圍在 0 至 65,536 灰度單位）直方圖以產生平均灰度單元波形。在基線、治療後 6、12、18 和 24 個月拍攝黃素螢光照片。利用 OcuScience 公司研發之計算機科學專業知識，以遮蔽方式進行分析。

脂褐素螢光之平均強度：脂褐素係源自溶酶體降解脂質，其在視網膜色素上皮細胞（RPE）內堆積為 RPE 疾病和感光細胞變性的有用標記。相反地，脂褐素螢光損失可能為 AMD 中當失去 RPE 細胞時地圖狀萎縮的跡象。因

此，眼底自發螢光可能作為監測 AMD 中疾病進展的有用方法。如同黃素螢光之定量法，繪製治療之眼睛的像素強度直方圖，以產生平均灰度單位波形。此外，以定性方式觀察地圖狀萎縮。在篩選、基線和治療後 6、12、18 和 24 個月取得脂褐素螢光圖像。

藉由光學同調斷層掃描術（optical coherence tomography）測量平均視網膜厚度。使用共變數模型之分析測試各組之間從基線開始的平均變化之差異，在該模型中治療分配為固定因子，而基線視桿截距為共變量。摘要提供觀察之病例的結果及最後觀察值推估之結果。譜域 OCT（Heidelberg Spectralis，海德堡工程公司，德國海德堡）可使中央黃斑之橫截面圖像之解析程度達到約 5 微米。成像後分析將可量化視網膜中央厚度、內截段/外截段（IS/OS）破裂之完整性、玻璃體牽引之存在、具有增加之深度成像的脈絡膜厚度及脈絡膜新血管膜之存在或色素上皮剝離。在篩選、基線和治療後 6、12、18 和 24 個月取得 OCT。

1.一種眼用組成物，其包含：

存在量為約 0.02-2 重量%之包含胥苯噻嗪的藥學活性藥物；

存在量為 8-12 重量%之 pH 值在 3.9-4.5 之間的醋酸鹽緩衝溶液；

存在量為 0.5-2 重量%之丙二醇；

存在量為 0.25-1 重量%之氯化鈉；

存在量為 0.015-0.06 重量%之對羥基苯甲酸甲酯；

存在量為 0.01-0.04 重量%之為 50%溶液形式的苯扎氯銨；及

存在量為 0.008-0.030 重量%之乙二胺四醋酸二鈉；

其中該組成物之 pH 值係在 4.0-4.4 之間。

2. 如實施例 1 之組成物，其中該藥物為鹽酸胍苯噻嗪。

3. 如單一或組合之實施例 1 或 2 之組成物，其中該藥物之存在量為 0.5-2 重量%。

4. 如單一或組合之實施例 1-3 之組成物，其中該醋酸鹽緩衝溶液之 pH 值為 4.2 且存在量為 10 重量%。

5. 如單一或組合之實施例 1-4 之組成物，其中該醋酸鹽緩衝溶液係由醋酸鈉及 2N 醋酸所組成。

6. 如單一或組合之實施例 1-5 之組成物，其中丙二醇之存在量為 1 重量%。

7. 如單一或組合之實施例 1-6 之組成物，其中對羥基苯甲酸甲酯之存在量為 0.03 重量%。

8. 如單一或組合之實施例 1-7 之組成物，其中為 50%溶液形式之苯扎氯銨的存在量為 0.02 重量%。

9. 如單一或組合之實施例 1-8 中組成物，其中乙二胺四醋酸二鈉之存在量為 0.015 重量%。

10. 一種用於製備眼用調合物的方法，其包含：

將水與 pH 值為 3.9-4.5 之醋酸鹽緩衝溶液混合以形成第一中間混合物，該醋酸鹽緩衝溶液之添加量為可在調合

物中提供約 8-12 重量%之醋酸鹽緩衝溶液的量；

將乙二胺四醋酸二鈉加入第一中間混合物中以形成第二中間混合物，該乙二胺四醋酸二鈉之添加量為可在調合物中提供約 0.008-0.030 重量%之乙二胺四醋酸二鈉的量；

將丙二醇加入第二中間混合物中以形成第三中間混合物，該丙二醇之添加量為可在調合物中提供約 0.5-2 重量%之丙二醇的量；

將氯化鈉加入第三中間混合物中以形成第四中間混合物，該氯化鈉之添加量為可在調合物中提供約 0.25-1 重量%之氯化鈉的量；

將苯扎氯銨加入第四中間混合物中以形成第五中間混合物，該苯扎氯銨之添加量為可在調合物中提供約 0.01-0.04 重量%之苯扎氯銨的量；及

將對羥基苯甲酸甲酯加入第五中間混合物中以形成第六中間混合物，該對羥基苯甲酸甲酯之添加量為可在調合物中提供約 0.015-0.06 重量%之對羥基苯甲酸甲酯的量；

將包含胍苯噻嗪之藥學活性藥物加入第六中間混合物中以形成該調合物。

11. 如實施例 10 之方法，其中該一或多個添加步驟包含一邊添加一邊混合。

12. 如單一或組合之實施例 10-11 之方法，其中該醋酸鹽緩衝溶液之添加量為能在調合物中提供約 10 重量%之醋酸鹽緩衝溶液的量。

13. 如單一或組合之實施例 10-12 之方法，其中該醋酸鹽緩衝溶液係由醋酸鈉與 2N 醋酸所組成。

14. 如單一或組合之實施例 10-13 之方法，其中乙二胺四醋酸二鈉之添加量為可在調合物中提供 0.015%重量%之乙二胺四醋酸二鈉的量。

15. 如單一或組合之實施例 10-14 之方法，其中丙二醇之添加量為可在調合物中提供 15 重量%之丙二醇的量。

16. 如單一或組合之實施例 10-15 之方法，其中氯化鈉之添加量為可在調合物中提供 0.5 重量%之氯化鈉的量。

17. 如單一或組合之實施例 10-16 之方法，其中苯扎氯銨之添加量為可在調合物中提供 0.02 重量%之苯扎氯銨的量。

18. 如單一或組合之實施例 10-17 之方法，其中對羥基苯甲酸甲酯之添加量為可在調合物中提供 0.03 重量%之對羥基苯甲酸甲酯的量。

19. 如單一或組合之實施例 10-18 之方法，其中該藥學活性藥物為胍苯噻嗪，其在調合物中之存在量為 0.5-2 重量%。

20. 一種用於治療黃斑變性之方法，其包含：

投予處於被診斷為黃斑變性之風險中的受試對象之眼睛如申請專利範圍第 1-9 項中任一項之眼用組成物，或根據申請專利範圍第 10-19 項中任一項之方法製備的調合

物。

21. 如實施例 20 之方法，其中該黃斑變性為乾性老年性黃斑變性。

22. 如組合或單獨之實施例 1-9 之組成物，或藉由組合或單獨之實施例 10-19 之方法形成的眼用調合物，其係用於治療黃斑變性。

23. 如實施例 22 之組成物或調合物，其係用於治療乾性老年性黃斑變性。

雖然上文中已經討論許多示例性觀點和實施例，熟習本技藝之人士將可識別其某些修改、變更、附加部分及次組合。因此，下文中所附之申請專利範圍及之後引入之申請專利範圍欲被解釋為包括所有在其真正之精神和範圍內的這類修改、變更、附加部分及次組合。

申請專利範圍

1. 一種眼用組成物，其包含：

存在量為約 0.02-2 重量%之包含肼苯噻嗪 (hydralazine) 的藥學活性藥物；

存在量為 8-12 重量%之 pH 值在 3.9-4.5 之間的醋酸鹽緩衝溶液；

存在量為 0.5-2 重量%之丙二醇；

存在量為 0.25-1 重量%之氯化鈉；

存在量為 0.015-0.06 重量%之對羥基苯甲酸甲酯；

存在量為 0.01-0.04 重量%之為 50%溶液形式的苯扎氯銨 (benzalkonium chloride)；及

存在量為 0.008-0.030 重量%之乙二胺四醋酸二鈉；

其中該組成物之 pH 值係在 4.0-4.4 之間。

2. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該藥物為鹽酸肼苯噻嗪。

3. 如申請專利範圍第 2 項之組成物，其中該藥物之存在量為 0.5-2 重量%。

4. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之組成物，其中該醋酸鹽緩衝溶液之 pH 值為 4.2 且存在量為 10 重量%。

5. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之組成物，其中該醋酸鹽緩衝溶液係由醋酸鈉及 2N 醋酸所組成。

6. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之組成物，其中丙二醇之存在量為 1 重量%。

7. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之組成物，其中

對羥基苯甲酸甲酯之存在量為 0.03 重量%。

8.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之組成物，其中為 50%溶液形式之苯扎氯銨的存在量為 0.02 重量%。

9.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之組成物，其中乙二胺四醋酸二鈉之存在量為 0.015 重量%。

10. 一種用於製備眼用調合物的方法，其包含：

將水與 pH 值為 3.9-4.5 之醋酸鹽緩衝溶液混合以形成第一中間混合物，該醋酸鹽緩衝溶液之添加量為可在調合物中提供約 8-12 重量%之醋酸鹽緩衝溶液的量；

將乙二胺四醋酸二鈉加入第一中間混合物中以形成第二中間混合物，該乙二胺四醋酸二鈉之添加量為可在調合物中提供約 0.008-0.030 重量%之乙二胺四醋酸二鈉的量；

將丙二醇加入第二中間混合物中以形成第三中間混合物，該丙二醇之添加量為可在調合物中提供約 0.5-2 重量%之丙二醇的量；

將氯化鈉加入第三中間混合物中以形成第四中間混合物，該氯化鈉之添加量為可在調合物中提供約 0.25-1 重量%之氯化鈉的量；

將苯扎氯銨加入第四中間混合物中以形成第五中間混合物，該苯扎氯銨之添加量為可在調合物中提供約 0.01-0.04 重量%之苯扎氯銨的量；

將對羥基苯甲酸甲酯加入第五中間混合物中以形成第六中間混合物，該對羥基苯甲酸甲酯之添加量為可在調合

物中提供約 0.015-0.06 重量%之對羥基苯甲酸甲酯的量；

將包含胍苯噻嗪之藥學活性藥物加入第六中間混合物中以形成該調合物。

11. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中該一或多個添加步驟包含一邊添加一邊混合。

12. 如申請專利範圍第 10-11 項中任一項之方法，其中該醋酸鹽緩衝溶液之添加量為能在調合物中提供約 10 重量%之醋酸鹽緩衝溶液的量。

13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該醋酸鹽緩衝溶液係由醋酸鈉與 2N 醋酸所組成。

14. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中乙二胺四醋酸二鈉之添加量為可在調合物中提供 0.015%重量%之乙二胺四醋酸二鈉的量。

15. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中丙二醇之添加量為可在調合物中提供 15 重量%之丙二醇的量。

16. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中氯化鈉之添加量為可在調合物中提供 0.5 重量%之氯化鈉的量。

17. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中苯扎氯銨之添加量為可在調合物中提供 0.02 重量%之苯扎氯銨的量。

18. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中對羥基苯甲酸甲酯之添加量為可在調合物中提供 0.03 重量%之對羥基苯甲酸甲酯的量。

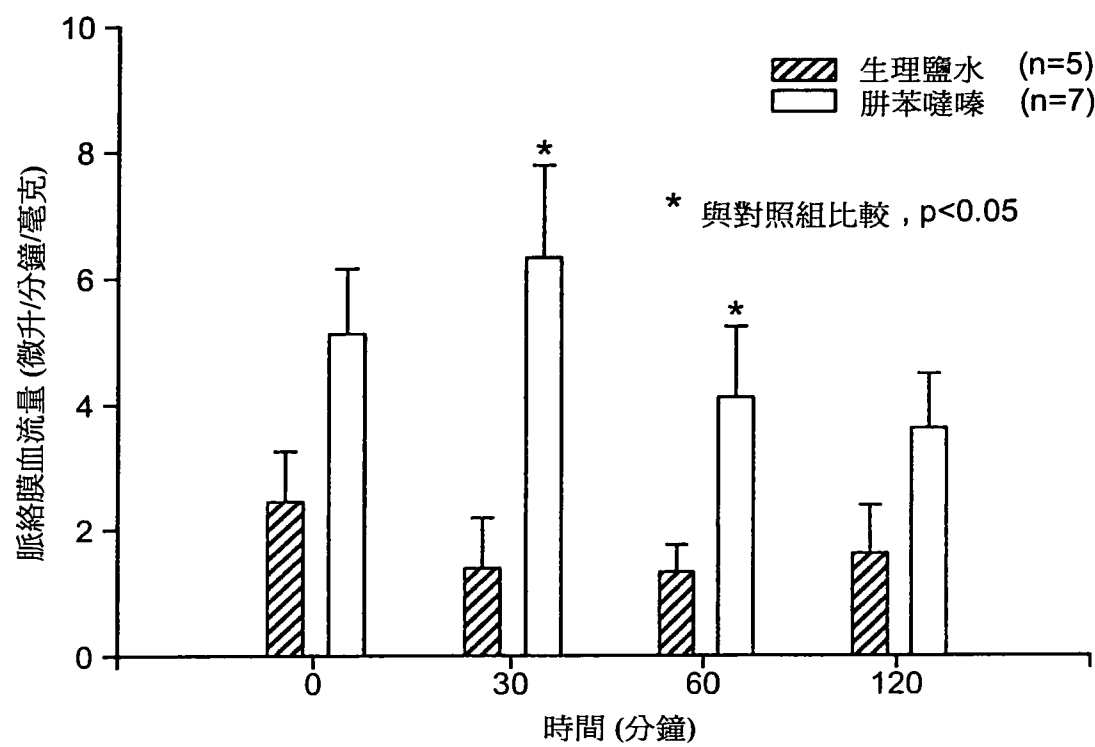
19. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中該藥學活

性藥物為胼苯噻嗪，其在調合物中之存在量為 0.5-2 重量 %。

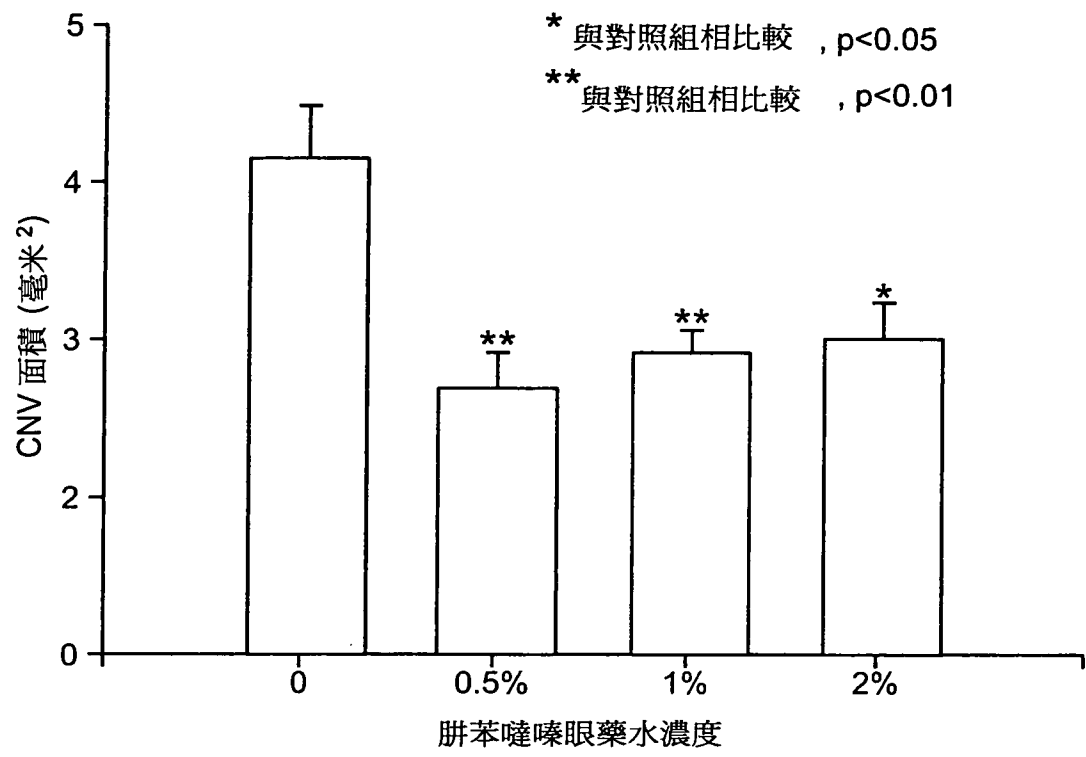
20.如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之眼用組成物，其係用於治療黃斑變性。

21. 如申請專利範圍第 20 項之組成物，其中該黃斑變性為乾性老年性黃斑變性。

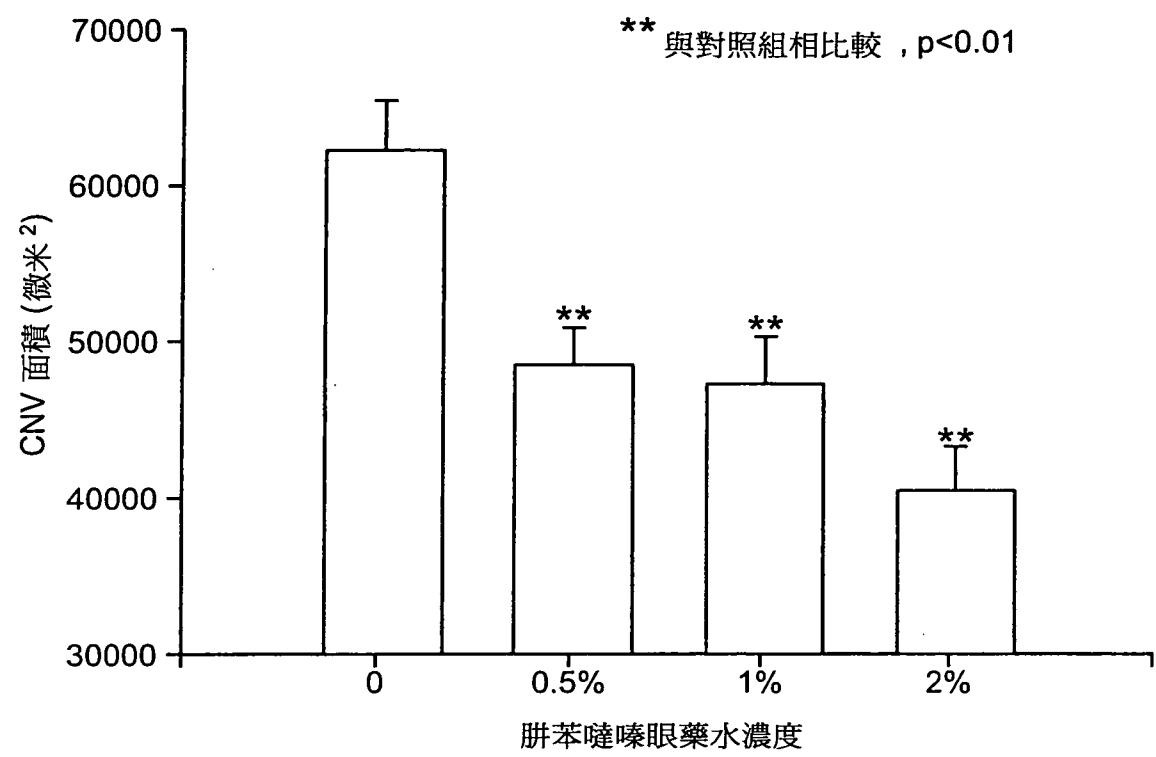
圖 式



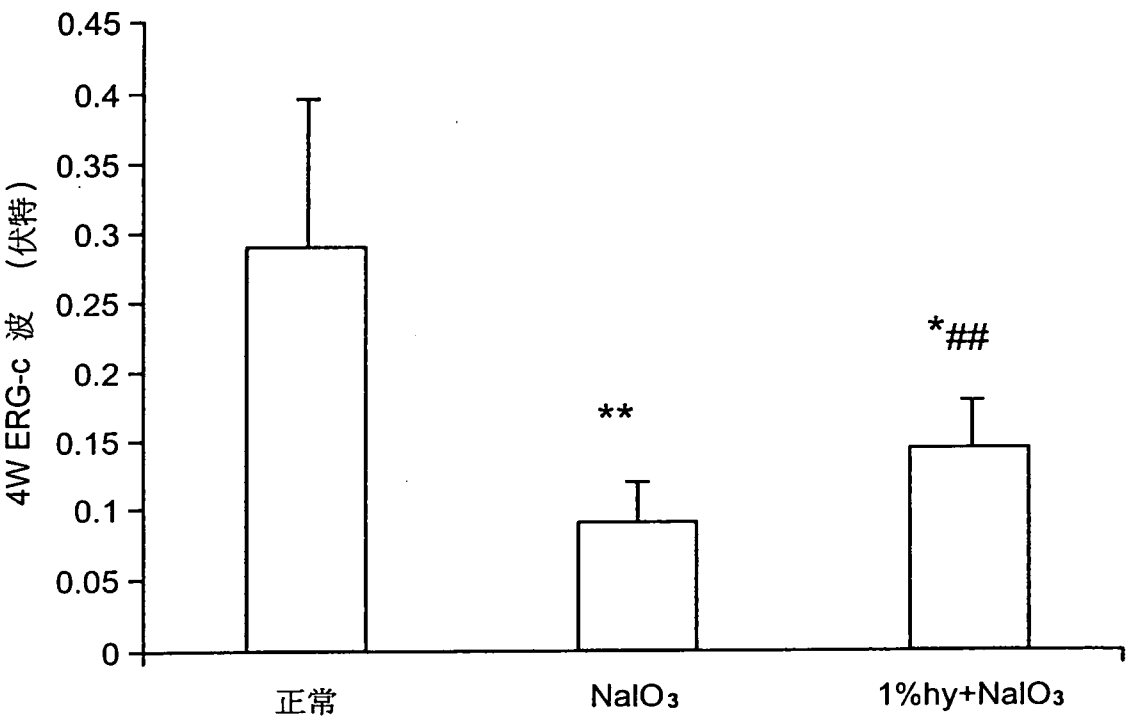
第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖