



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96198194.6

[43]公开日 1998 年 12 月 16 日

[11] 公开号 CN 1202108A

[22]申请日 96.10.1

[30]优先权

[32]95.10.12 [33]JP [31]263896 / 95

[32]96.3.14 [33]JP [31]57337 / 96

[86]国际申请 PCT / JP96 / 02850 96.10.1

[87]国际公布 WO97 / 13515 英 97.4.17

[85]进入国家阶段日期 98.5.8

[71]申请人 大塚制药株式会社

地址 日本东京

[72]发明人 浦岛博树 竹治康广

筱原久司 藤泽茂树

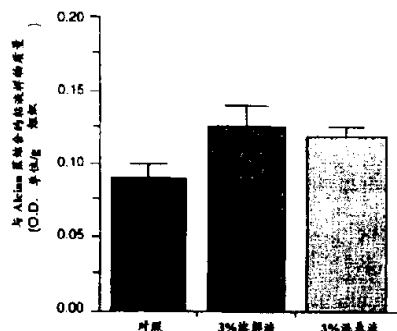
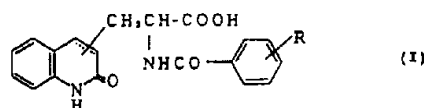
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标  
事务所  
代理人 唐伟杰

权利要求书 4 页 说明书 14 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 治疗眼病的喹诺酮衍生物

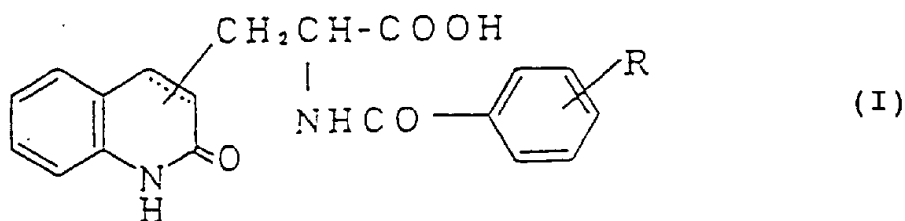
[57]摘要

本发明提供了治疗眼病的药物，其含有其中 R 为卤原子的通式 (I) 所示喹诺酮衍生物或其盐作为活性成分，特别是，本发明提供治疗干眼症有效的药物。

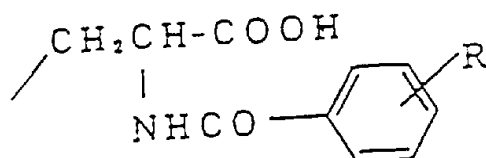


## 权利要求书

1. 一种治疗眼病的药剂, 其含通式(I)所示的喹诺酮衍生物或其盐作为活性成分



其中 R 为卤原子, 下式侧链的取代位

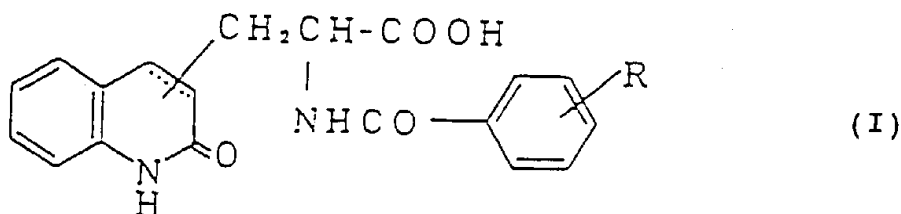


为喹诺酮骨架的 3- 或 4- 位, 喹诺酮骨架中 3- 和 4- 位间的碳-碳键为单键或双键。

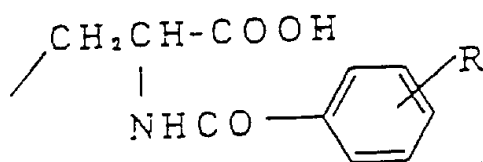
2. 权利要求 1 的治疗眼病的药剂, 其为促进眼内杯状细胞增生的药物。
3. 权利要求 1 的治疗眼病的药剂, 其为增加眼内分泌的粘液样物质的药物。
4. 权利要求 1 的治疗眼病的药剂, 其为增加眼内分泌泪液量的药物。
5. 权利要求 1 的治疗眼病的药剂, 其中眼病为干眼症。
6. 权利要求 1 的治疗眼病的药剂, 其为治疗眼损伤的药物。
7. 权利要求 6 的治疗眼病的药剂, 其中眼损伤为角膜上皮损伤。
8. 权利要求 1-7 中任一个的治疗眼病的药物, 其中有效成分为 2-(4-氯苯甲酰氨基)-3-(2-喹诺酮-4-基)丙酸或其盐。
9. 权利要求 8 的治疗眼病的药物, 其为适于眼用的药物制剂形式。
10. 一种适于眼用的药物制剂, 其含有 2-(4-氯苯甲酰氨基)-3-(2-喹诺酮-4-基)丙酸或其盐和药用的眼用常用载体(稀释剂或

赋形剂)。

11. 用治疗眼病的药物治疗眼病的方法, 该药物含通式(I)所示喹诺酮衍生物或其盐作为活性成分



其中 R 为卤原子, 下式侧链的取代位



为喹诺酮骨架的 3- 或 4- 位, 喹诺酮骨架中 3- 和 4- 位间的碳碳键为单键或双键。

12. 根据权利要求 11 的用治疗眼病药物治疗眼病的方法, 其为促进眼内 gollet 细胞增生的药物。

13. 根据权利要求 11 的用治疗眼病药物治疗眼病的方法, 其为增加眼内分泌粘液样物质量的药物。

14. 根据权利要求 11 的用治疗眼病药物治疗眼病的方法, 其为增加眼内分泌泪液量的药物。

15. 根据权利要求 11 的用治疗眼病药物治疗眼病的方法, 其为治疗眼损伤的药物。

16. 根据权利要求 11 的用治疗眼病的药物治疗干眼症的方法。

17. 根据权利要求 16 的用治疗眼病的药物治疗角膜上皮损作的方法。

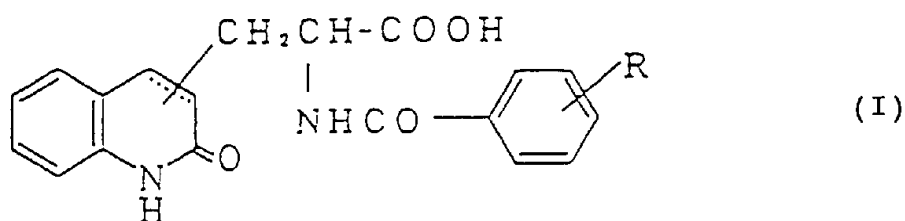
18. 根据权利要求 11-17 中任一个的用治疗眼病的药物治疗眼病的方法, 其中有效成分 2-(4-氯苯甲酰氨基)-3-(2-喹诺酮-4-基)丙酸或其盐。

19. 根据权利要求 18 的用治疗眼病的药物治疗眼病的方法, 其为适

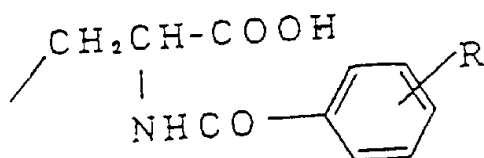
于眼用的药物制剂。

20. 用适于眼用的药物制剂治疗眼病的方法, 药物制剂含有 2-(4-氯苯甲酰氨基)-3-(2-喹诺酮-4-基)丙酸、或其盐和眼用药物制剂可接受的常用载体(稀释剂或赋形剂)。

21. 组合物制备治疗眼病药物的用途, 其含通式(I)所示喹诺酮衍生物或其盐作为活性成分,



其中 R 为卤原子, 下式侧链的取代位



为喹诺酮骨架的 3-或 4-位, 喹诺酮骨架中 3-和 4-位间的碳碳键为单键或双键。

22. 权利要求 21 组合物制备治疗眼病药物的用途, 其为促进眼内杯状细胞增生的药物。

23. 权利要求 21 组合物制备治疗眼病药物的用途, 其为增加眼内分泌粘液物质量的药物。

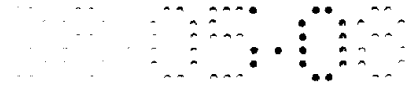
24. 权利要求 21 组合物制备治疗眼病药物的用途, 其为增加眼内分泌泪液量的药物。

25. 权利要求 21 组合物制备治疗眼病药物的用途, 其为治疗眼损伤的药物

26. 权利要求 21 组合物制备用于治疗干眼病药物的用途。

27. 权利要求 25 组合物制备用于治疗眼病药物的用途, 其为治疗角膜上皮损伤的药物。

28. 权利要求 21-27 中任一个组化合物制备治疗眼病药物药物的



用途,其中有效成分为2-(4-氯苯甲酰氨基)-3-(2-噻诺酮-4-基)丙酸或其盐。

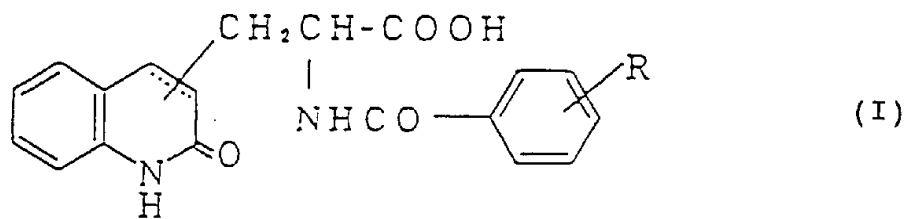
29. 权利要求 28 组合物制备用于治疗眼病药物的用途,其为适于眼用的药物制剂。

30. 适于眼用的药物制剂的用途,药物制剂含有2-(4-氯苯甲酰氨基)-3-(2-噻诺酮-4-基)丙酸或其盐和眼用药物制剂可接受的常用载体(稀释剂或赋形剂)。

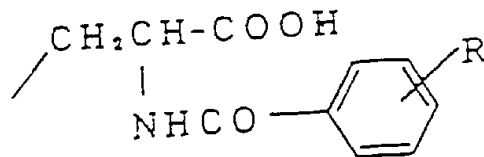
# 说明书

## 治疗眼病的喹诺酮衍生物

本发明涉及治疗眼科疾病的药物,其含有喹诺酮衍生物或其盐作为活性成分。更详细地说,本发明涉及治疗眼科疾病,特别是通常称为“干眼”的干眼病综合症的药物,其含有作为活性成分的通式(I)所示的喹诺酮衍生物或其盐



其中 R 为卤原子,下式侧链的取代位置



为喹诺酮骨架的 3-或 4-位,喹诺酮骨架上 3-和 4-位间的碳-碳键为单键或双键,更优选 2-(4-氯苯甲酰基氨基)-3-(2-喹诺酮-4-基)丙酸或其盐。

通式(I)所示喹诺酮衍生物及其生产方法记载于日本专利公开号 63-35623 中,喹诺酮衍生物作为抗胃溃疡药的用途记载于日本专利申请公开(Laid Upen)号 3-74329 中,生产具有光学活性的喹诺酮衍生物的方法记载于日本专利申请公开(laid open)号 3-145468 中。

另外,本发明喹诺酮衍生物对活性氧代谢产物的抑制作用记载于日本 J. pharmacol., 49 卷,441-448(1969),本发明喹诺酮衍生物对胃粘膜保护张力记载于 Folia pharmacol. Japon., 97 卷,371-380 页(1991)。

而且,喹诺酮衍生物作为治疗糖尿病药的用途记载于国际公开



号 WO92/21342 中, 喹诺酮衍生物作为保护疾病肠粘膜的药物的用途记载于国际公开号 WO94/12182 中, 喹诺酮衍生物作为抑制抑生长素分泌减少的药物的用途记载于国际公开号 WO93/24043 中。

“干眼”症(干眼病)为眼的病原性疾病, 其中由于泪液量短乏眼表面不能保持正常状态。而且, 泪液异常缺乏及泪液性质异常可引起眼表面上的粘膜(角膜和结膜上皮)(参考 DORAI—AI(干眼), 11 页, Kazuo TSUBOTA, NIPPON—HYORONSHA 出版)。除上述外, 在伴有异常泪液状态(性质和量)的 Sjogren 综合症中可观察到干眼症。再者, 已知干眼症可存在于 Stevens. Johnson 综合症后期并可观察到角膜和结膜损伤。

泪液(泪)为具有  $7\mu\text{m}$  厚的很薄液层, 它覆盖眼前最外层, 并含有脂质层、水层和粘液样层组成的三层结构。存在于泪液最外表层的脂质层为油状膜, 它主要是由位于眼睑周围的睑板腺产生和分泌的, 并覆盖全部水层。脂质层被认为具有防止水分从水层中蒸发的功能。水层为所谓的“泪”部分, 它占据泪液层大部分厚度, 它组成的 98% 为水。降低该水层量的病理状态即所谓的“干眼”症。粘液样层覆盖角膜上皮的疏水表面, 该粘液样层改变角膜上皮的疏水表面至亲水性以保持和扩展泪液中的水层, 以便水层能保持在角膜上皮表面。产生该粘液样层的有关细胞为含在结膜中的杯状细胞。

如上所释, 可直接引起“干眼”症的泪液涉及不同组织细胞。而且“干眼”症的概念是复杂的, 普通类型的滴眼剂仅为暂时的医疗措施, 因此在目前阶段还未发现治疗“干眼”症的基本方法。所以迫切期望治疗“干眼”症的新方法和新试剂。

图 1 为本发明喹诺酮衍生物对由 Alcian 蓝结合方法测定的覆盖正常兔结膜的粘膜样物质量的效果图。

图 2 为本发明喹诺酮衍生物对正常兔杯状细胞数的效果图。

图 3 为本发明喹诺酮衍生物对正常兔分泌泪液量的效果图。

图 4 为本发明喹诺酮衍生物对正常兔角膜上皮细胞增生的效果图。

图 5 为本发明喹诺酮衍生物对由 Rose Bengal 打分方法测定的

正常兔粘液样囊炎的效果图。

图 6 为本发明喹诺酮衍生物对由避免眨眼引起的正常兔角膜上皮损伤的效果图。

图 7 为本发明喹诺酮衍生物对由 Alcian 蓝结合方法测定的覆盖除去粘膜样层正常兔结膜的粘液样物质增量的效果图。

本发明人广泛研究后发现通式(I)所示喹诺酮衍生物,尤其是其中的 2-(4-氯代苯甲酰氨基)-3-(2-喹诺酮-4-基)丙酸及其盐具有提高杯状细胞数作用,增加眼睑粘液分泌作用,促进角膜上皮增生作用以及增加泪液分泌作用,因此所述喹诺酮衍生物用作治疗干眼病综合症的药物,最后完成本发明。

通式(I)所示喹诺酮衍生物,尤其是其中 2-(4-氯代苯甲酰氨基)-3-(2-喹诺酮-4-基)丙酸及其盐通过增加杯状细胞数增加眼粘蛋白的产生,因此在“干眼”综合症时该化合物防止粘蛋白量降低,同时本发明的该化合物增加眼粘液量以维持泪液中的水层。另外,该化合物显示出增加泪液量的效果,因此该化合物用作治疗“干眼”综合症的药物。另外,该化合物不仅用作治疗显示干眼症的 Sjogren 综合症和 Stevens-Johnson 综合症的药物,而且用作预防和/或治疗由“干眼”症引起的继发病或由杯状细胞数降低及粘液量降低引起的各种眼病。“干眼”症时,因为眼球表面干燥,所以眼对受损非常敏感。关于此点,因本发明化合物有促进角膜上皮细胞增生效能,所以该化合物用作含在治疗眼表面外伤的药剂,尤其是治疗角膜上皮外伤的药剂或眼内输注药剂和在眼科手术(白内障、玻璃体及青光眼手术)中用于清洗的药剂中的活性成分。

通过配制作作为有效成分的通式(I)所示喹诺酮衍生物或其盐可将本发明治疗眼病的药物制成不同形式的常用药物制剂。通过配制喹诺酮衍生物(I)和常用稀释剂或赋形剂,例如填充剂,增容剂,粘合剂,润湿剂,崩解剂,表面活性剂,润滑剂等制备这些药物制剂形式。

根据治疗目的,可将药物制剂制成不同形式,典型实例形式为可眼用药物制剂如滴眼剂和眼膏等。

除了滴眼剂和眼膏外,药物制剂可制成片剂、丸剂、粉末剂、液体

药剂、混悬剂、乳浊剂、颗粒剂、胶囊、栓剂、注射剂(液体、混悬液等)、气雾剂、糖浆剂、外用制剂等。另外,通过与合适的树脂一起配制也可制成持续释放的制剂。

在将药物制剂配成滴眼剂,眼膏等时,用可眼科药用的常用载体(稀释剂)按常规方法制备。因此,通过将有效成分与适当稀释剂混合,然后将混合物灭菌来制备他们。

例如,制备眼膏时,可使用在该领域广泛应用的各种基料如乳剂型软膏基质,水溶型软膏基质,悬浮型软膏基质等。至于这些基料的典型实例,可举出白凡士林、精炼羊毛脂、液体石蜡等。制备滴眼剂时,可用灭菌蒸馏水作为典型的稀释剂。

如果必要,用于眼科的药物制剂可与溶解添加剂、缓冲剂、抗氧剂、防腐剂、等渗剂、pH 控制剂等一起配制。至于溶解添加剂,可举例的有羧甲基纤维素钠;聚氧乙二醇醚如聚氧乙烯十二烷基醚,聚氧乙烯油醚等;聚乙二醇高级脂肪酸酯如聚乙二醇单月桂酸酯,聚乙二醇单油酸酯等;聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯;聚氧乙烯脂肪酸酯等。至于缓冲剂,可举例的有磷酸钠、磷酸氢钠,磷酸氢钾,硝酸,硝酸钠,柠檬酸,柠檬酸钠,酒石酸,酒石酸钠,乙酸,乙酸钠,ε-氨基己酸,谷氨酸钠等。至于抗氧剂,可举例的有亚硫酸钠,焦亚硫酸钠,连二亚硫酸钠,硫代亚硫酸钠,抗坏血酸等。至于防腐剂,可举例的有氯丁醇,氯苄炔铵,氯苄乙铵(benzethonium Chloride),苯基汞盐,乙基汞硫代水杨酸钠,苯乙醇,对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸丙酯等。至于等渗剂,可举例的有氯化钠,葡萄糖,D-甘露糖醇,甘油等。至于溶解剂,可用N-甲基谷氨酸酰胺。至于pH控制剂,可举例的有氢氧化钠,盐酸等。

为了制成片剂,可使用广泛用于该领域的任何已知载体,例如,赋形剂如乳糖,白糖,氯化钠,葡萄糖,尿素,淀粉,碳酸钙,高岭土,结晶纤维素,硅酸等;粘合剂如水,乙醇,丙醇,单糖浆,葡萄糖溶液,淀粉溶液,明胶溶液,羧甲基纤维素,虫胶,甲基纤维素,磷酸钠,聚乙烯吡咯烷酮等。崩解剂如干淀粉,藻酸钠,琼脂粉,海带多糖粉,碳酸氢钠,碳酸钙,聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯,十二烷基硫酸钠,硬脂酸

单甘油酯, 淀粉, 乳糖等; 崩解抑制剂如白糖, 硬脂精, 可可脂, 氢化油等; 吸附促进剂如季铵基质, 十二烷基硫酸钠等; 湿润剂如甘油, 淀粉等; 吸附剂如淀粉, 乳糖, 高岭土, 膨润土, 胶体硅酸等; 润滑剂如细滑石粉, 硬脂酸盐, 硼酸粉, 聚乙二醇等。如果必要, 可将片剂制备成常用的包衣片剂形式, 例如糖衣片剂, 明胶膜包衣片剂, 肠膜包衣片剂, 膜包衣片剂, 或双层片剂, 多层片剂等形式。

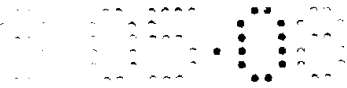
为了制成丸剂, 可使用广泛用于该领域的任何已知载体, 例如, 赋形剂如葡萄糖, 乳糖, 淀粉, 可可脂, 氢化植物油, 高岭土, 滑石等; 粘合剂如阿拉伯胶粉, 黄耆胶粉, 明胶, 乙醇等; 和崩解剂如海带多糖, 琼脂等。

为了制成栓剂, 可用广泛用于该领域的任何已知载体, 例如聚乙二醇, 可可脂, 高级醇, 高级醇酯, 明胶, 半合成甘油酯等。

为了制成注射剂, 可把它们制成溶液, 乳浊剂或混悬剂。一般将其灭菌并优选制成与血液等渗。在制备溶液、乳浊剂或混悬剂形式的注射剂时, 可使用广泛用于该领域的任何已知稀释剂, 例如, 水, 乙醇, 丙二醇, 乙氧基化异硬脂醇, 聚氧基化异硬脂醇, 聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯等。在制备与血等渗的注射剂时, 可在其中含足量氯化钠, 葡萄糖或甘油。另外, 常用的可溶辅剂、缓冲液、止痛药等可含在其中。如果必要, 调色剂, 防腐剂, 香料, 调味剂, 甜味剂及其它药物可含在其中。

外用制剂制成普通外用药物制剂。普通的外用药物制剂例如包括液体药物, 药油, 洗剂, 擦剂, 油脂性软膏, 乳浊剂型软膏, 如油/水型亲水软膏和水/油型吸水软膏, 水溶性软膏, 糊剂, 硬膏剂, 贴剂, 软膏, 乳剂等, 这些外用形式药物制剂不限于所举例范围内。可用普通方法制备这些外用药物制剂中任一个。

在制备这些外用制剂时, 也可使用广泛用于该领域的各种基料。例如, 可单独使用至少一种油脂性基质, 或可更宽地使用其两种或多种的混合物; 或可单独使用至少一种水溶性软膏基质, 或可更宽地使用其两种或多种的混合物。这些软膏的确实例子为脂肪和油如花生油, 芝麻油, 豆油, 红花油, 鳄梨油, 向日葵油, 玉米油, 菜子油, 棉子



油,蓖麻油,山茶油,椰子油,橄榄油,罂粟子油,可可酯,牛油,猪脂,羊毛脂等;通过这些脂肪和油进行化学改变如氢化而得到的修饰基质;无机油如凡士林,石蜡,硅油,角鲨烷等;高级脂肪酸酯如肉豆蔻酸异丙酸酯,肉豆蔻酸正丁酯,亚油酸异丙酯,蓖麻醇酸乙酯,蓖麻醇酸硬酯基酯,蓖麻醇酸丙酯,蓖麻醇酸异丙酯,蓖麻醇酸异丁酯,蓖麻醇酸庚酯,癸二酸二乙酯和己二酸二异丙酯;高级脂肪醇如十六烷醇和十八烷醇;蜡如漂白蜂蜡,鲸蜡,日本蜡,羊毛脂,巴西棕榈蜡,虫胶蜡等;高级脂肪酸如硬脂酸,油酸,软脂酸等;含12-18个碳原子的饱和或不饱和脂肪酸单一、二-和三-甘油酯的混合物;多羟基醇如乙二醇,聚乙二醇,丙二醇,聚丙二醇,甘油,鲨肝醇,季戊四醇,山梨醇,甘露糖醇等;胶状物如阿拉伯胶,苯甲酸胶,愈创木脂,黄耆胶等;水溶天然高分子化合物如明胶,淀粉,酪蛋白,糊精,果胶,果胶酸钠,藻酸钠,甲基纤维素,乙基纤维素,羧甲基纤维素,羟乙基纤维素,羟丙基纤维素,结晶纤维素等;水溶合成高分子化合物如聚乙烯基醇,聚(乙烯基甲基醚),聚乙烯吡咯烷酮,聚丙烯酸钠,羧乙烯基聚合物,聚乙烯亚胺等;非离子,阴离子,两性阳离子表面活性剂;乙醇,异丙醇和水。

对外用药物制剂来说,可加入普通添加剂如凝胶剂,保存剂,抗氧化剂,缓冲剂,pH控制剂,润湿剂,防腐剂,调色剂,调味剂,色料,增稠剂,金属螯合剂等。

气雾型制剂一般可通过将本发明式(I)喹诺酮衍生物的灭菌溶液或悬浮液与推进剂一起配制而制备。在制备溶液剂或混悬剂时,也可使用本领域常用的任何一种已知稀释剂,因此可使用在配制注射剂中列举的稀释剂。至于推进剂,也可使用本领域常用的任一种推进剂,因此,可列举的有液化气推进剂如象二氟二氟甲烷或三氟二氟乙烷之类的氟氟烃;压缩气推进剂如氮气,二氧化碳气等。气雾型制剂还可含普通的增溶辅剂,缓冲剂等,如果必要,也可加入调色剂,保存剂,香料,调味剂,甜味剂。

含在本发明治疗眼病药剂中的有效分量不受特定限制,可在宽的范围内选择,一般该量可在0.005-5%重量份,优选0.01-3%

重量份的范围内选择。

本发明药剂给药方法不受特定限制。因此,依据制剂形式,患者年龄,性别及其它条件不同,患者病情程度可通过常用眼用药物制剂中使用的类似方法给药。

至于本发明药剂的典型给药方法,例如,眼膏通过在眼睛上涂覆给药。滴眼剂可通过常用滴眼剂中使用方法的类似方法给药,例如,1-2滴滴眼剂从适当的滴眼容器中滴到眼内。另外,可用喷雾装置将滴眼剂给入眼内。

至于本发明药剂的其它给药方法,例如,片剂,丸剂,液体制剂,混悬剂,乳剂,颗粒剂,糖浆剂和胶囊剂口服给药。注射剂单独或结合常用辅助溶液如葡萄糖溶液和/或氨基酸溶液静脉注射给药。如果必要,注射剂单独肌内、皮内、皮下或腹内给药。栓剂直肠内给药。

取决于给药方法,患者年龄,性别和其它状况,以及患者病情和其它相关因素,本发明剂量可适当选择,一般可眼用药剂如滴眼液或眼膏每天给药1-15次,优选每天给药1-10次。

#### 实施例

本发明治疗眼病药剂通过药物制剂及药理实验实例详细解释。

2-(4-氯苯甲酰氨基)-3-(2-噻诺酮-4-基)丙酸	0.20g
氯苄烷铵	0.01g
磷酸二氢钠	0.56g
磷酸二氢钾	0.80g
蒸馏水	足量

---

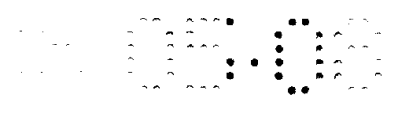
共 100.00ml

上述各成分溶于蒸馏水,然后把所得溶液灭菌并适当滤纸过滤,制备本发明滴眼剂形式的药剂。

#### 药理试验 1

##### (1). 试验液

至于本发明治疗眼病药剂有效成分的具体实例,使用 2-(4-



氯苯甲酰基氨基)-3-(2-噻诺酮-4-基)丙酸(以后称为本发明化合物),并制备下面溶解液和悬浮液,用它们作试验液体。

a).3%溶解液

本发明化合物	3.00g
甲基葡胺(N-甲基谷氨酰胺)	2.64g
浓缩甘油	1.80g
盐酸	足量
10%氯苄烃铵	0.10ml
水(加足量调整到总体积至)	100ml

---

pH(pH值调在下面范围内) 8.3-9.3

b).3%悬浮液

本发明化合物	3.00g
磷酸二氢钠	0.40g
磷酸氢二钠	0.47g
氯化钠	0.50g
羧甲基纤维素钠	0.20g
多乙氧基醚 80	0.16g
10%氯苄烃铵	0.10ml
水(加至)	100ml

---

pH(调至) 6.5-7.5

另一方面,生理盐水代替试验液用作对照试验。

(2). 实验方法和结果

向3只正常兔双眼中经眼滴入上述试验液,每次每只眼睛滴50 $\mu$ l。每个试验组和对照组由3只兔组成,因此,每组用6只眼睛。给药每天进行4次,连续2周。之后,杀死每只兔,进行下面3项试验。

(i). 结膜表面粘膜样物质质量的测量

(由 Alcian 蓝结合方法测量)

杀死上述正常兔, 摘出所有兔结膜。之后, 用 0.25M 蔗糖冰冷水溶液洗摘出的结膜, 测量每个结膜组织的重量。

室温下在 10ml 0.1% Alcian 蓝溶液中孵育这样处理的结膜 1.5 小时, 然后用 0.25M 蔗糖水溶液洗 15 分钟, 再用同样溶液洗 45 分钟。因此得到的结膜再孵育在 10ml 0.5M  $MgCl_2$  水溶液中 2 小时, 以便萃取与结膜粘液样层结合的着色剂。用 10ml 乙醚洗这样得到萃取液, 于 605nm 测量水层光密度, 计算单位组织重量的光密度 (0. D 单位/克组织), (平均值  $\pm$  S. E.,  $n=4$  眼)。结果示于图 1。

从图 1 可看出, 与对照组兔测量值相比, 试验组正常兔结膜上粘膜样物质结合的着色剂 (Alcian 蓝) 量更大, 试验组中滴眼给药 3% 溶解液和 3% 悬浮液 (其两者分别含本发明化合物)。因此, 本发明化合物显示出增大覆盖在结膜表面粘液样物质量的效果。

(ii) 含在结膜中杯状细胞数测量

(用压滤法测量)

轻微干燥球结膜部分, 其位于用上述试验液处理的兔眼上部, 与鼻泪管很近, 然后在其上放一个微孔滤片, 压滤片以收集结膜上皮细胞样品及杯状细胞。收集的细胞用 70% 乙醇固定, 并定期用 Schiff 酸反应 (PAS) 和苏木精染色, 随后用二甲苯将这样染色的微孔滤膜变成透明, 并将滤膜放在制备玻璃室。在制备玻璃室内得到的样品进行光学观察, 计算每单位面积 ( $0.09mm^2$ ) 杯状细胞数 (平均值  $\pm$  S. E.,  $n=4$  只眼)。结果示于图 2。

从图 2 可看出, 与对照组兔测量结果相比, 向其中滴入 3% 溶解液和 3% 悬浮液 (两者分别含本发明化合物) 的试验组正常兔的结膜中所含杯状细胞数测量值更高。因此, 本发明化合物显示出增大粘液样物质量也增大泪液量的效果。

(iii) 泪液量测量

(用修改的 Schirmer 试验 I 方法测量)

在随后测量泪液量试验前 5 分钟经眼睛向用上述试验液处理的试验组正常兔滴入  $30\mu l$  Benoxil (眼用 0.4% 氧布吡卡因盐酸盐的商

品名, Santen 药物有限公司生产)。让兔自由站立 4 分钟, 除去眼表面泪液。1 分钟后, Schirmer 试验纸片放在下眼皮内和眼表面之间(开始测量泪液)。让兔随意站立 5 分钟, 然后测量渗透到 Schirmer 试纸上泪液长度(mm)(平均质  $\pm$  S.E.,  $n=4$  只眼睛)。结果示于图 3。

从图 3 可以看出, 与对照组兔测量值相比, 经眼滴入 3% 溶解液和 3% 悬浮液(两者分别含本发明化合物)的试验组正常兔的泪液量测量值更高。因此, 本发明化合物显示出与对照组兔所示值相比增大泪液量的效果。

## 药理试验 2

### (1). 实验方法

从新西兰白雌兔中摘出眼球, 制备巩角膜样品片。在用立体显微镜观察下从该样品片中除去 Descemet 膜及内皮细胞, 然后用磷酸盐缓冲的生理盐水洗巩角膜样品片 4-5 次以制备无菌状态(无菌)样品。之后, 该巩角膜的无菌样品片浸泡在 Dulbecco 修改的 Eagle 培养介质 F12(DME/F12) (1:1) 中, 用剃刀从每个角膜样品切下大约 20 片角膜边为 2-3mm 的样品小方块。这些小样品角膜块中 7-8 片在直径约为 60mm 的组织培养皿中, 将小块下面粘到盘的底部以保持角膜上皮朝上, 于 37°C 在 5% CO<sub>2</sub> - 95% 空气的气氛下在含 100% FCS, 10ng/ml hEGF - DME/F12(1:1) 的培养基中培养。培养 2 天后, 从培养基中拿出角膜上皮的小样品块, 换培养基。

培养持续 4-5 天(培养基换 1-3 次), 然后除去培养基, 用磷酸盐缓冲液洗角膜上皮的小样品块, 细胞漂浮在 0.1% 胰蛋白酶 - 0.02% EDTA 的溶液中, 并悬浮在含 10% FCS 的 DME/F12(1:1) 培养基中, 随后在含 12 孔的多孔培养皿中以  $1 \times 10^4$  细胞/孔的数孵育悬浮液。大约 12 小时后, 培养基换成含 10% FCS 的 DME/F12 的另一培养基, 与药理试验 1 所用相同的本发明化合物溶于 DMSO 中, 并以  $10^{-4}$  -  $10^{-6}$  M 浓度加入。

加入本发明化合物后 48 小时, 换含本发明化合物的培养基。加本发明化合物后 96 小时, 细胞漂浮在 0.1% 胰蛋白酶 - 0.02% ED-

TA 的溶液中,用库尔特计算器计算细胞数(平均值±S.E.,n=6 只眼睛)。

作为对比试验,透明质酸钠(1mg/ml)用于替代本发明化合物。对于对照试验,使用不含本发明化合物的 DMSO。

## (2). 试验结果

结果示于图 4。从图 4 可看出,用本发明化合物处理角膜上皮时,与用被认为具有增加角膜上皮增生活性的透明质酸钠的对比试验中所示结果相比显示出提高角膜上皮增生的极佳效果。在图 4 中,符号“\*”表示与对照相比, $P < 0.05$ ,符号“\*\*”表示与对照相比, $P < 0.01$ 。

## 药理试验 3

(通过强制吹风得到的干眼模型试验)

### (1) 试验液

至于本发明治疗眼病药剂有效成分的具体实例,使用 2-(4-氯苯甲酰氨基 7-3-(2-喹诺酮-4-基)丙酸(此后称为本发明化合物),并制备下面 1% 滴眼液,用它作试验液。

### 1% 滴眼液

本发明化合物	0.50g
甲基葡胺(N-甲基谷氨酰胺)	1.32g
浓甘油	0.45g
10% 氯苄烷铵	50 $\mu$ l
生理盐水(加至)	50ml

---

pH(调至) 8.8-9.3

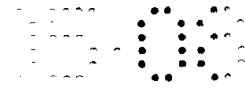
渗透压(调到) 290-300mOsm

至于对照试验,不含本发明化合物的滴眼液用上述溶解剂用作对照。

### (2). 制备干眼模型(粘膜样囊炎及角膜上皮损伤)的方法

新西兰白色雌性兔用于试验。试验前切除兔眨眼膜。

向兔双眼中肌肉注射 200mg 氯胺酮/体重和滴入每眼 2 滴剂量



为 4% 氧布比卡因盐酸盐溶液作为麻醉药。

干燥剂和角膜间的距离保持 10 厘米,从干燥剂向角膜前方向吹风 10 分钟。蒸发泪液,干燥角膜表面,诱发粘液样囊炎及角膜上皮损伤。

### (3). 试验化合物用法

自干燥剂吹风前 2 周,给予 1% 滴眼液。通过从干燥剂吹风制备干眼模型后,给予 1% 滴眼液 2 周。给药前后以 2.5 小时间隔每天 4 次给予 1% 滴眼液。

至于对照试验,不含本发明化合物的滴眼溶解剂用作对照。

### (4). 评价方法和结果

给予 1% 滴眼液前,吹风前,吹风后 1, 4, 7, 10 和 14 天参考下 2 项评价试验结果

#### (i) 用 Rose Bengal 着色剂活体染色的方法打分评价损伤角膜

用 Rose Bengal 着色剂活体染色法染色不覆盖粘液样物质的角膜细胞,基于下面打分按照角膜染色程序评价试验组兔角膜上粘液样囊炎(平均质  $\pm$  S.E.,  $n=10$  只眼睛),打分评价(满分:3 分)

0 分:角膜根本未染色

1 分:所有角膜面积不到 1/3 均匀染色,或角膜面积不到 2/3 染成色斑

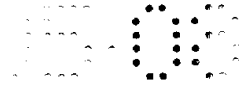
2 分:1/3 - 2/3 的角膜面积均匀染色,或 2/3 以上的角膜面染成色斑,或不到 1/3 的角膜面均匀染色,也观察到染色斑点。

3 分:2/3 以上角膜面均匀染色,或 1/3 - 2/3 角膜面均匀染色,也观察到染色斑点。

结果示于图 5,从图 5 可以看出,滴入 1% 滴眼液的试验组新西兰白兔的角膜,用 Rose Bengal 着色剂活体染色分数低于对照组所示的分数。因此,本发明化合物明显抑制和治疗由吹风法引起的粘液样囊炎。

#### (ii) 用荧光素钠着色剂活体染色法打分评价损伤的角膜

用荧光素钠活体染色法染色细胞缺陷部分和细胞间异常部分,以根据类似于上述用 Rose Bengal 着色剂活体染色中所用的角膜的



染色程度所得分数计评价试验组兔角膜上粘液样囊炎(平均质 $\pm$ S.E.,  $n=10$  只眼)。

结果,与吹风后 1 天荧光数分数相比,对照组分数为 2 或更高,而试验组新西兰白兔(向其滴入 10% 滴眼液)分数几乎为 1。因此,本发明化合物明显抑制和治疗由吹风法引发的粘液样囊炎。

#### 药理试验 4

(由防止眨眼制作的干眼模型试验)

##### (1) 试验液

1% 滴眼液(含 1% 本发明化合物滴眼液),其类似于药理试验 3 中所用的,用作试验液。

至于对照试验,使用不含本发明化合物的滴眼溶剂。

##### (2) 制备干眼模型的方法

新西兰雌性白兔用于试验。试验前切除兔的眨眼膜。

向兔双眼给予麻醉药,方法是腹腔注射 2g 尿烷/体重。用眼扩张器强迫兔眼皮睁开,并于 25℃ 让其保持 2 小时。泪液蒸发,角膜表面干燥,待到干眼膜型——损伤角膜上皮。

##### (3) 试验化合物用法

避免眨眼前两周,以 2.5 小时时间间隔每天 4 次给予 1% 滴眼液。在避免眨眼前最后一次给予滴眼液持续 5 分钟。

至于对照试验,不含本发明化合物的滴眼溶剂用作对照。

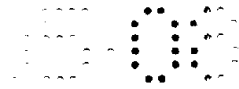
##### (4) 评价方法和结果

避免眨眼结束后,向试验组兔眼滴入 50 $\mu$ l 1% 亚甲基蓝溶液,用生理盐水彻底洗眼。

然后,静脉注射过量戊巴比妥溶液将兔杀死,摘出角膜。用丙酮:硫酸钠饱和水溶液 7:3 的混合物从摘出的角膜中萃取亚甲基蓝过夜。于 660nm 处测量由此得到萃取液的光密度,计算染色剂角膜上皮损伤部分的亚甲基蓝(平均质 $\pm$ S.E.,  $n=8$  只眼)。

结果示于图 6。从图 6 可以看出,本发明的化合物抑制由避免眨眼引起的角膜上皮损伤。

#### 药理试验 5



(通过从结膜上除去粘液样层得到干眼模型试验)

#### (1) 试验液

1%滴眼液(含1%本发明化合物的滴眼液),其类似于药理试验3中所用的,用作试验液。

关于对照实验,使用不含本发明化合物的滴眼溶解剂。

#### (2) 制备干眼模型的方法

以2小时间隔1天滴眼6次,滴注10%浓度的N-乙酰基半胱氨酸溶液,溶解并从新西兰雌性白兔结肠中除去粘液样层,制备干眼模型。

#### (3) 试验化合物的用法

以2.5小时间隔每天4次给予1%滴眼液,持续2周。

至于对照实验,不含本发明化合物的滴眼溶解剂用作对照。

#### (4) 评价方法和结果

开始给予1%滴眼液后两周,静脉注射过量戊巴比妥注射液,将兔杀死,然后摘出角膜。用类似于药理试验1,(2)(i)中的Alcian蓝结合法测量结膜粘液样物质的量(平均质 $\pm$ S.E., $n=6$ 只眼)。

结果示于图7。从图7可看出,结合到试验组新西兰白兔(滴入1%滴眼液)结膜上粘液样物质上的着色剂量,结膜上粘液样物质量比对照组高。因此,本发明化合物增加结膜上粘液样物质量至几乎与正常状态眼表面上的具有相同水平。

图7中,符号“#”表示 $P<0.05$ ,对正常状态眼睛(+ - 试验);符号“\* \*”表示 $P<0.01$ ,对对照组眼睛(+ - 试验)。

图 1

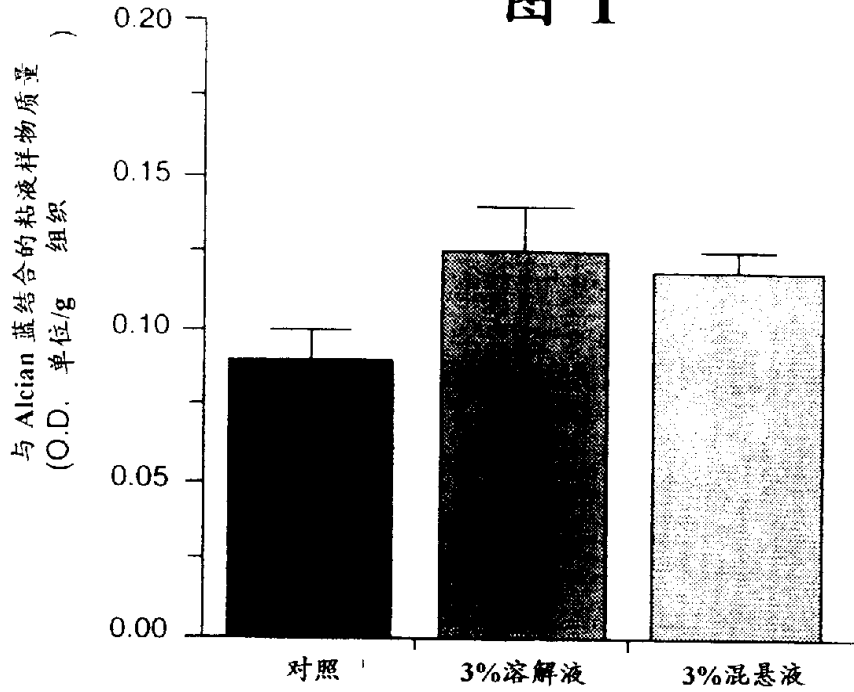
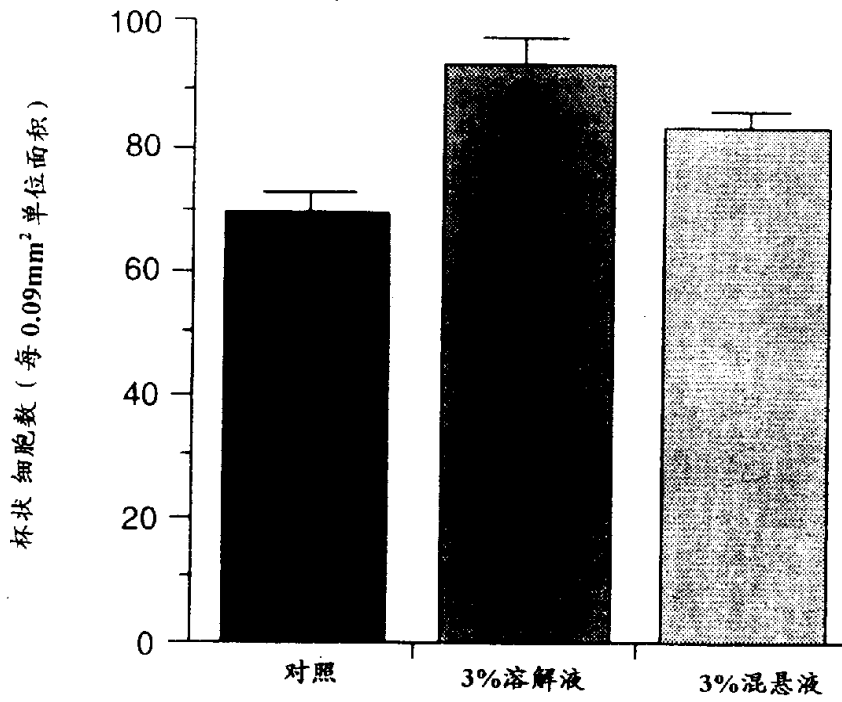
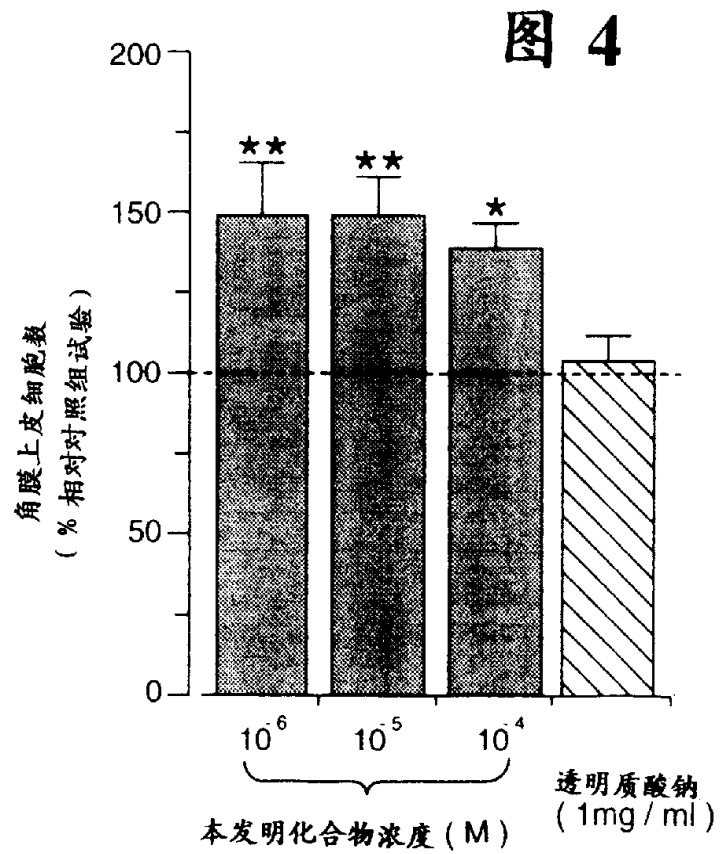
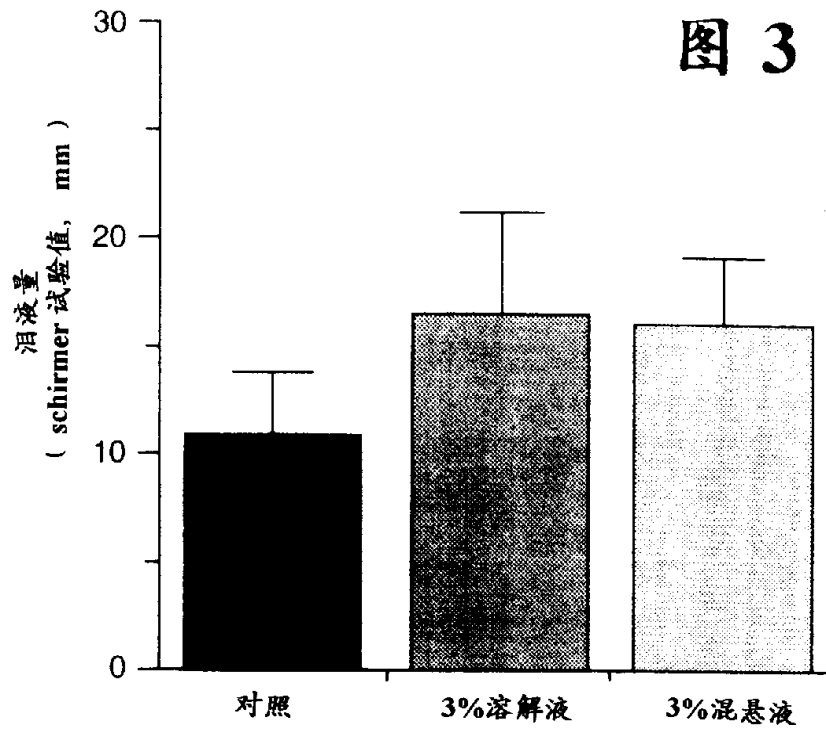
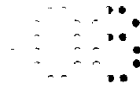
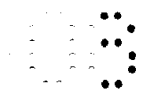


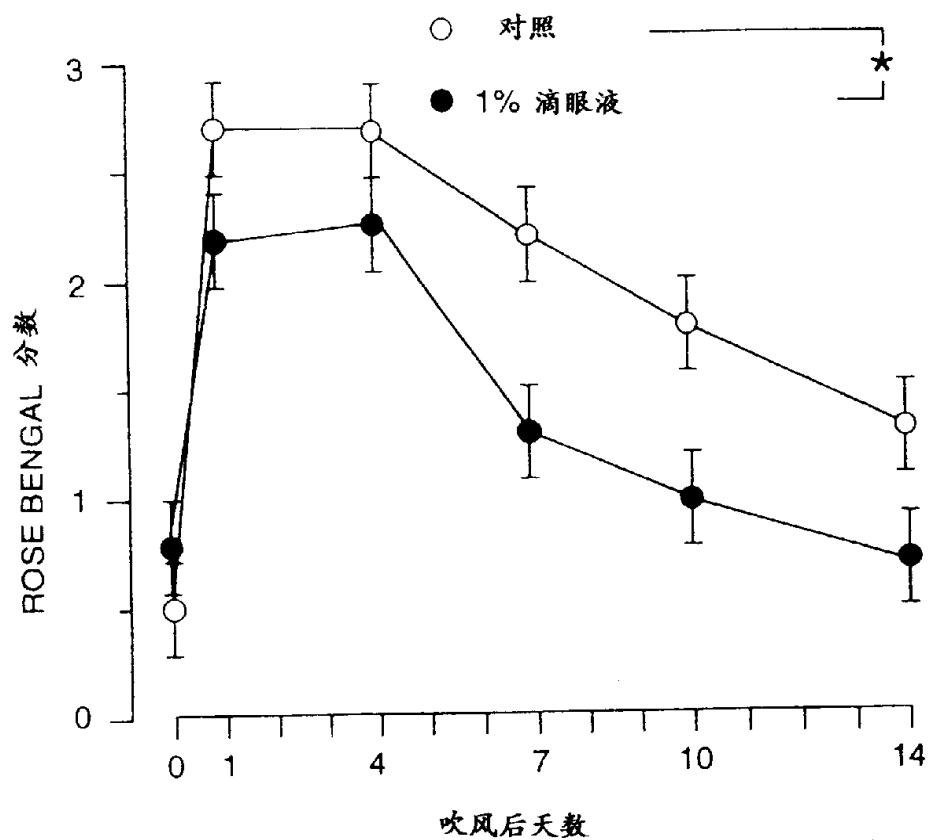
图 2







### 图 5



\* :  $p < 0.05$  与对照  
依据重复测量所得数据的方差分析



图 6

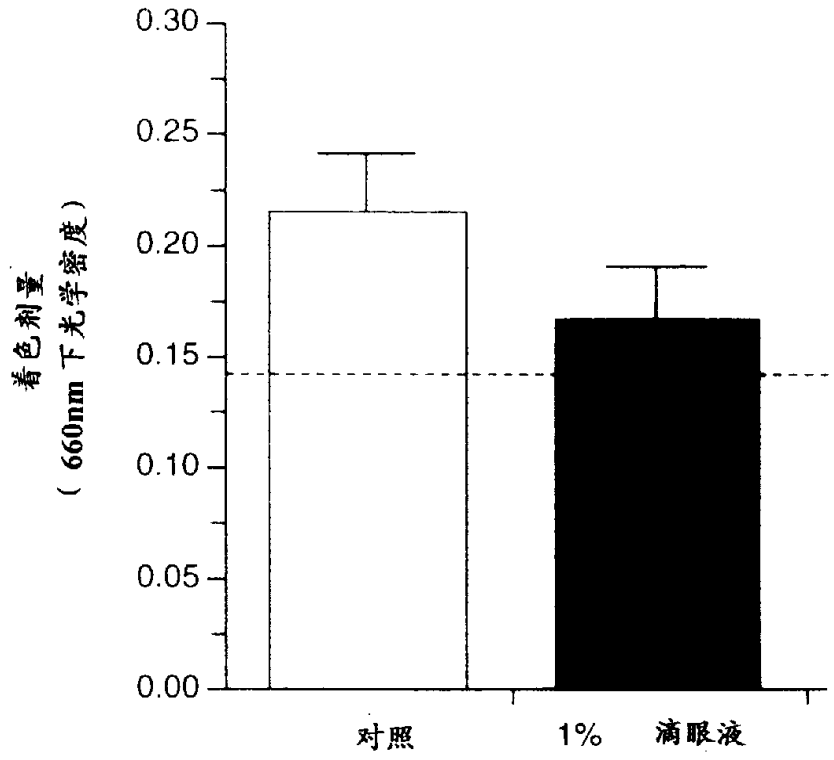




图 7

