

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/39

A61K 38/17

A61K 38/45

A61P 27/02



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 00815717.0

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1214815C

[22] 申请日 2000.9.15 [21] 申请号 00815717.0

[30] 优先权

[32] 1999.9.15 [33] US [31] 60/153,959

[32] 1999.12.30 [33] US [31] 60/173,801

[86] 国际申请 PCT/US2000/025190 2000.9.15

[87] 国际公布 WO2001/019386 英 2001.3.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.15

[71] 专利权人 布鲁斯·H·德伍尔夫森

地址 美国弗吉尼亚州

共同专利权人 戴尔·P·德沃尔

[72] 发明人 布鲁斯·H·德伍尔夫森

戴尔·P·德沃尔

审查员 徐益君

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 贾静环 宋 莉

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 3 页

[54] 发明名称 用于在角膜曲率矫形镜片佩戴期间
或之后稳定角膜组织的组合物

[57] 摘要

两类具有滴眼给药系统的组合物，它们在角膜曲率矫形法期间或之后使用以预防或延迟角膜组织松弛成最初的角膜前曲率。每一组合物的功能彼此独立，并以不同的方式配制稳定剂。第一组合物涉及包括含有间断三螺旋的原纤维缔和胶原蛋白 (FACITs) 和/或小的富含亮氨酸重复蛋白聚糖 (SL-RPs) 的生物相容组合物。原纤维缔和胶原家族包括各种类型的胶原，例如 VI 型、XII 型、XIV 型、XX 型。小的富含亮氨酸的重复蛋白聚糖家族包括核心蛋白聚糖、角蛋白聚糖、双链蛋白聚糖、骀蛋白聚糖、光蛋白聚糖、模块蛋白聚糖和纤维调节蛋白聚糖。第二组合物包括在组织、血浆或表皮的正常成分中发现的酶，例如转谷氨酰胺酶。

1. 选自含有间断三螺旋的原纤维缔和胶原蛋白(FACIT)和小的富含亮氨酸重复蛋白聚糖(SLRP)的组成在制备角膜曲率矫正法后使角膜组织保持期望形状的稳定剂中的用途。
5
2. 如权利要求 1 的用途, 其中稳定剂与胶原原纤维相互作用以形成与胶原原纤维连接的桥连。
3. 如权利要求 2 的用途, 其中稳定剂控制角膜的原纤维直径。
4. 如权利要求 2 的用途, 其中桥连具有足够的弹性以使得原纤维的运动处于预定的范围内。
10
5. 如权利要求 1 的用途, 其中 FACITs 选自 VI 型、XII 型、XIV 型、XX 型及其任一组合。
6. 如权利要求 1 的用途, 其中 SLRPs 选自双链蛋白聚糖、核心蛋白聚糖、髒蛋白聚糖、角蛋白聚糖、光蛋白聚糖、模块蛋白聚糖、纤维调节蛋白聚糖及其任一组合。
15
7. 如权利要求 1 的用途, 其中稳定剂的浓度为 40-100 μ g/mL。
8. 包括转谷氨酰胺酶的组合物在制备用于角膜曲率矫正法后使角膜组织保持期望形状的稳定剂中的用途。
9. 一种在角膜曲率矫正法后使角膜组织保持期望形状的滴眼液, 包括
20 下列中的至少一种:
 - a. 含有间断三螺旋的原纤维缔和胶原蛋白(FACITs); 和
 - b. 小的富含亮氨酸重复蛋白聚糖(SLRPs)。
10. 如权利要求 9 的滴眼液, 其中 FACITs 选自 VI 型、XII 型、XIV 型、XX 型及其任一组合。
11. 如权利要求 9 的滴眼液, 其中 SLRPs 选自双链蛋白聚糖、核心蛋白聚糖、髒蛋白聚糖、角蛋白聚糖、光蛋白聚糖、模块蛋白聚糖, 纤维调节蛋白聚糖及其任一组合。
25
12. 如权利要求 9 的滴眼液, 其中 FACITs 和 SLRPs 溶于生理相容的溶液中。
13. 如权利要求 12 的滴眼液, 其中 FACITs 和 SLRPs 被缓冲至生理相容的 pH 水平。
30

14. 如权利要求9的滴眼液,其中所述FACITs和SLRPs的浓度为40-100 $\mu\text{g/mL}$.
15. 一种制备滴眼液的方法,包括以下步骤: :
- a. 将选自含有间断三螺旋的原纤维缔和胶原蛋白(FACITs)和小的富含亮氨酸重复蛋白聚糖(SLRPs)的至少一种化合物溶于生理相容溶液中; 和
- b. 将所得溶液缓冲至生理相容的pH水平。
16. 如权利要求15的方法,其中滴眼液中对于FACITs和SLRPs的浓度为40-100 $\mu\text{g/mL}$.
17. 一种在角膜曲率矫形法后使角膜组织保持期望形状的滴眼液,包括: 转谷氨酰胺酶在缓冲液中的溶液。
18. 选自转谷氨酰胺酶、SLRPs和FACITs的至少一种化合物在制备角膜曲率矫形法后使角膜组织保持期望形状的稳定剂中的用途。
19. 一种角膜曲率矫形系统,包括
- a) 角膜曲率矫形镜片,所述角膜矫形镜片经构形以插入病人眼中以将未软化的角膜组织矫形成由角膜曲率矫形镜片所确定的预定角膜形状; 和
- b) 使角膜组织稳定在预定的形状的稳定剂,其中所述稳定剂为选自转谷氨酰胺酶、SLRPs和FACITs的至少一种化合物。
20. 一种在角膜曲率矫形法后使角膜组织保持期望形状的滴眼液,包括至少一种选自在生理相容的缓冲溶液中的小的富含亮氨酸重复蛋白聚糖(SLRPs)的化合物,其中该溶液被缓冲到pH值为6.8至8.5,并且其中SLRPs的浓度为10至500 $\mu\text{g/ml}$.
21. 权利要求20的滴眼液,其中SLRPs选自双链蛋白聚糖、核心蛋白聚糖、酪蛋白聚糖、角蛋白聚糖、光蛋白聚糖、模块蛋白聚糖和纤维调节蛋白聚糖及其任一组合。
22. 权利要求20的滴眼液,其中该溶液被缓冲到pH值为6.8至7.6。
23. 权利要求20的滴眼液,其中SLRPs的浓度为40至100 $\mu\text{g/ml}$ 。
24. 权利要求20的滴眼液,其中该溶液包括选自磷酸盐缓冲剂、HEPES和TRIZMA缓冲剂的缓冲剂。
25. 一种在角膜曲率矫形法后使角膜组织保持期望形状的滴眼液,包括在生理相容的溶液中的核心蛋白聚糖和磷酸盐缓冲剂,其中该溶液的pH值为6.8至8.0,并且其中核心蛋白聚糖的浓度为10至500 $\mu\text{g/ml}$ 。

用于在角膜曲率矫形镜片佩戴期间或之后
稳定角膜组织的组合物

5

发明背景

技术领域

本发明涉及适用于保持角膜曲率矫形法后的角膜曲率的化学组合物、
所述化学组合物的制备以及在角膜曲率矫形法治疗后将所述化学组合物施
10 于角膜以保持角膜曲率的方法。

相关技术描述

人角膜的结构和组成：角膜是眼部光学系统中第一和最有效的屈光表面。在视网膜感受器中形成清晰影像要求角膜是透明的并具有适宜的屈光
15 力。角膜的屈光力主要取决于两个因素：其曲率及屈光指数。角膜畸形或
眼球轴长过长或过短，或者眼的晶状体(lens)功能异常等均导致各种问题，
例如近视、散光、远视等。因此需要佩戴采用眼镜或隐形眼镜来矫正这些
问题。眼镜在光线到达角膜前折射光线，并改变光线进入角膜的角度，从而
20 达到矫正屈光误差的作用。将经过计算而可使眼屈光正常的前曲的隐形
眼镜置于畸形角膜上，从而达到矫正眼睛的屈光误差的效果。然而，摘下
镜片后，角膜依然存在畸形或缺陷和屈光误差。

角膜含有 75-80%的水分(以湿重为基准)。其余 20-25%为固体，主要为
胶原或其他蛋白质以及糖胺聚糖。形成角膜基质骨架的角膜原纤维构成整
齐，并呈现典型的 64-66nm 周期性的胶原。然而，角膜胶原的生化特性和
25 腱或皮肤胶原并无显著差异。和其他来源的胶原一样，角膜胶原也含有高
水平的氮、甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸。在沸水或酸中，角膜胶原转换成
凝胶，并且胶原能够被蛋白水解酶如胶原酶、胃蛋白酶或木瓜蛋白酶溶解。

角膜曲率矫形法(orthokeratology)：角膜曲率矫形法是一种用于改善眼睛
屈光误差的非外科手术法，并且可以是例如眼睛激光手术的可替代方法。
30 具体地说，角膜曲率矫形法是矫正病人角膜曲率的治疗方法。常规角膜曲
率矫形法包括使用一系列进行性隐形眼镜，它可逐渐地矫正角膜并形成更

为球状的前曲率。该方法可包括配适 3-6 副隐形眼镜，按照惯用方法通过佩戴约 3-6 个月以达到光学矫正效果。该方法可减轻或消除近视和散光，从而可提高正常视力并使屈光正常(即视力为 0 度屈光误差或无需矫正的状态)。近来对角膜矫形镜片所作的改进，使其可能更快地达到屈光正常。许多情况下，采用一副夜戴型矫形镜片即可达到上述效果。

角膜曲率矫形法存在的一个问题是，矫形后的角膜组织对其原始曲率有记忆，在除去镜片后易松弛并回退到原始曲率。因此，当实施角膜曲率矫形法的病人获得最大效果时，需要指导病人全日或非全日地佩戴“保持型(retainer)隐形眼镜”，以稳定矫形效果。保持型隐形眼镜典型地由刚性透气材料制成。实施角膜曲率矫形法的病人需在夜间佩戴保持型隐形眼镜以尽快达到预期效果，而使其在其白天活动中具有屈光正常的视力。但是这种方法的缺点是需要每晚佩戴这种保持型镜片以防止角膜回退到从前的形状。

角膜成形法(Corneoplasty): 解决这一问题的有关方法是施用角膜软化剂暂时性地软化角膜，使其更易于矫形成预期的形状(desired shape)而屈光正常。这种角膜成形法包括在一次出诊或几周内实施的三步方法。该三步法包括：首先将软化剂施于角膜上以软化角膜组织；然后将刚性隐形眼镜(rigid contact lenses)置于角膜上使眼屈光正常；第三是施用稳定剂。通过刚性隐形眼镜，然后将角膜矫形并使其适合而达到刚性镜片所限定的形状。施用角膜软化剂有助于在短时期内矫正更大的屈光误差。

然而，现已发现由于很难精确地将成形隐形眼镜置于视力轴，而无法控制角膜组织的成形。在一些失败的角膜成形法中，可因成形用隐形眼镜放置不当而导致散光或复视。另外，由于三步操作均在一次出诊中完成，病人没有机会反馈其角膜组织的矫形效果。在该方法过程中，病人不能尝试和比较(try and see)或改变他们的主意。

综上所述，需要提供一种改进的进行敏锐的矫正方法，它可使病人很快地屈光正常，同时由于该方法是可逆的，病人对治疗可有选择，例如如果病人不需永久矫正，则还有机会恢复其最初的视力水平。另外，需要稳定角膜基质的组合物和用于制备、施用所述可稳定角膜基质的组合物的方法。所述组合物可用于稳定角膜曲率矫形法形成的角膜曲率，从而使角膜曲率矫形病人能省却佩戴刚性保持型隐形眼镜，省却使用软化剂的步骤，

同时还保留了病人在决定永久矫形前选择回复原始角膜曲率的机会。

发明概述

本发明的优点和目的，部分将在下面的描述中阐述，部分则容易从下面的描述看出，或者可以从本发明的实践中了解到。通过在权利要求书中特别指出的部件或其组合，将会认识到并实现本发明的优点和目的。

为了达到本发明的优点和实现本发明的目的（这体现并广泛描述在本文中），本发明的第一方面涉及用于在角膜曲率矫形法后使角膜组织保持在所需形状的方法。该方法包括将稳定剂应用于病人，所述稳定剂的形式为胶原组合物，包括至少一种含有间断三螺旋的原纤维缔和胶原蛋白(fibril associated collagens with interrupted triple helics, FACIT)和小的富含亮氨酸的重复蛋白聚糖(small leucine-rich repeat proteoglycans, SLRP)。所述稳定剂可使角膜组织稳定地保持所希望具有的形状。

第二方面，本发明涉及在角膜曲率矫形法后，使角膜组织保持在所期望形状的方法。该方法包括将来自蛋白质-衍生的转谷氨酰胺酶的稳定剂应用于病人，从而稳定剂使得角膜组织稳定以保持其预期形状。

第三方面，本发明涉及包括至少一种选自 FACITs 和 SLRPs 的化合物的组合物。

第四方面，本发明涉及保持通过角膜曲率矫形法而形成的角膜曲率的方法。该方法包括：将组合物施用于角膜上以通过与胶原原纤维(collagen fibrils)反应从而稳定角膜曲率(其中的组合物在不应用角膜软化剂的情况下应用)，并形成与角膜中胶原原纤维连接的桥连(bridge)以限制胶原原纤维的运动。

第五方面，本发明涉及制备化学组合物的方法。该方法包括将选自 FACITs 和 SLRPs 的至少一种化合物溶于生理相容的溶液中，并将所得溶液缓冲至的生理相容 pH 水平。

第六方面，本发明涉及制备用于角膜曲率矫形法后的矫形角膜上的化学组合物的方法。所述方法包括在缓冲液中制备转谷氨酰胺酶(transglutaminase)，混合该溶液并用无菌水稀释，然后加入氯化钙。

第七方面，本发明涉及矫正病人角膜曲率的角膜曲率矫形法。该方法包括：将角膜矫形镜片插入(insert)病人眼中，通过角膜矫形镜片和施于病人

眼部的稳定剂，将眼部未软化的角膜组织矫形成角膜矫形镜片确定的形状，所述稳定剂可使角膜组织稳定地保持其预期形状。

第八方面，本发明涉及角膜矫形系统，包括：构形为可插入病人眼部而将未软化的角膜组织矫形成预定角膜形状的角膜矫形镜片，以及可应用于病人眼睛而使角膜组织稳定地保持其预期形状的稳定剂。

很容易理解，以上的概述和下面的详述仅为示例性说明，并不对要求保护的本发明加以限制。其他优点将在下面的描述中阐述，可以通过阅读本发明而理解或者从本发明的实践中了解。本发明的优点和目的可以通过权利要求中要求保护的组合而实现。

10

优选实施方案描述

这里将详述本发明的几个实施方案。本申请公开了组合物，并教导了用于制备组合物和将所述组合物施用于角膜上的方法，从而，在施用后角膜矫形镜片佩戴期间或之后，可基本上保持角膜的矫形效果，因此无需再佩戴刚性保持型隐形眼镜。

本发明的快速(accelerated)角膜曲率矫形法包括：佩戴一副角膜矫形镜片以对角膜组织实施矫形，以及稳定矫形后的角膜组织以阻止角膜组织松弛成最初的角膜曲率。所述稳定剂可使角膜组织持久地保持其矫形后的形状。该快速角膜曲率矫形法可使病人在预定时间例如约24小时内屈光正常。

按照本发明，实施快速角膜曲率矫形法的病人可以选择佩戴角膜矫形镜片，例如可以在夜间作为保持性镜片佩戴，不施用稳定剂以期望通过矫形后的角膜组织看清事物。如果结果不令人满意，病人可请眼科医师或验光师会诊检查角膜，或者更换新的角膜矫形镜片。当病人对治疗结果满意并决定保持这种效果，病人可施用稳定剂以阻止角膜组织松弛成最初的角膜曲率，从而持久地稳定矫形后的角膜组织。所述稳定剂可快速地稳固矫形后角膜组织的新形状。

角膜矫形镜片优选设计成利用眼睑的机械压力和天然或人造眼泪的液压泵作用，对角膜组织实施渐进矫形。

本发明公开了适于用作稳定剂的至少两种可供选择类型的组合物。每一组合物均独立地起作用，并以不同方式稳定角膜曲率。这些组合物的一个特征在于含有至少一种 FACIT 或 SLRP 的组合物或者转谷氨酰胺酶组合

物。

按照本发明的第一种方式, 稳定剂组合物涉及一种组合物, 优选为适于稳定眼胶原基质的生物相容组合物。角膜胶原原纤维与天然结合大分子缔和。本发明稳定剂通常含有选自两组这样大分子中的至少一种化合物, 5 这两种大分子即含有间断三螺旋的原纤维缔和胶原蛋白(通常简称为 FACITs)和小的富含亮氨酸重复蛋白聚糖(通常简称为 SLRPs)。

在本发明中, FACITs 和 SLRPs 的细胞外基质组分通过与角膜胶原原纤维交联并控制原纤维直径而起到稳定剂的作用。所述稳定剂还可形成桥连, 并可与原纤维结合而限制原纤维间的滑动。这些桥连有一定的弹性, 但对 10 原纤维的移动距离有限制。

适于形成本发明生物相容胶原反应产物的几种类型的胶原能够选自 VI 型胶原、XX 型胶原、XII 型胶原和 XIV 型胶原。这些类型的胶原属于 FACITs 家族。各种类型的 FACITs 可经提取和纯化, 或者从学术单位如 Schepens 眼科研究所(波士顿, MA)得到。

15 稳定组合物的组分也包括蛋白聚糖如 SLRPs。发现将这些 SLRPs 加到组合物中可有效地稳定角膜。尽管其命名有所误导, 但是其实 SLRPs 是大分子。例如, 几种类型的 SLRPs 能够选自核心蛋白聚糖(decorin)、角蛋白聚糖(keratocan)、双链蛋白聚糖(biglycan)、髌蛋白聚糖(epiphykan)、光蛋白聚糖(lumican)、模块蛋白聚糖(mimecan)和纤维调节蛋白聚糖 (fibromodulin)。 20 核心蛋白聚糖包括硫酸皮肤素糖胺聚糖链, 角蛋白聚糖包括硫酸角质素糖胺聚糖链。许多 SLRPs(如双链蛋白聚糖、角质素、硫酸蛋白聚糖、deorin、层粘连蛋白(laminin)和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖)也可从商业途径例如 Sigma 化学公司(Milwaukee, WI) ("Sigma")购得。其他可从研究所得或采用已知技术制备。

25 下面将对 FACIT 家族中各种类型的胶原作详细描述。胶原蛋白包括具有多种发育和生理功能的异质大分子。至少 20 种胶原已得到确认, 其中约 11 种与角膜结构的发育有关。所有胶原分子共有的两个特征是通常含有 3 链(术语为 " α -链")和具有至少一种域, 其中上述链以三螺旋(triple-helix)排列于所述域中。按照惯例, 按发现的时间顺序给每种胶原一个编号(罗马 30 数字表示)。如下所述, FACITs 在角膜原纤维胶原的组构中起主要作用。

现有技术已知, 在大多数基质结缔组织中发现 VI 型胶原具有珠形丝形

式(beaded filament)。在成人角膜基质中,上述分子的数量与原纤维胶原接近。这些珠形丝相互缠绕并与纹状原纤维(striated fibril)和角膜蛋白聚糖交互作用。

对发育鸟角膜中 XII 和 XIV 型 FACIT 分子的表达已进行了研究。这些研究详见 Gordon 等的“A New Fibril Associated Collagen, Type XX, Expressed in the Developing Avian Cornea” (Abstract in “Through the Looking Glass” Macromolecular Morphogenesis Symposium Sponsered by TheSchepens Eye Research Institute, Boston, MA, January 22-23, 1999, 下文中称为“Through the Looking Glass”), 确定了新的 FACITs, 包括可能在角膜原纤维组构中含有的 XX 型。这些研究推断, XII、XIV 和 XX 型胶原的发育表达图式与鸟角膜中这些分子的潜在机能有关。XX 型较小的氨基末端 NC3 域表明它可使胶原原纤维彼此更接近。

David E. Birk 在“角膜细胞外基质的装配是多步骤过程, 其中每一步均通过不同大分子的相互作用而独立调控”(“Through the Looking Glass”中的摘要)中证实, 基质结构的适当发育及保持, 对于角膜透明度而言是所需的。原纤维结构是角膜功能的一个重要决定因素。胶原原纤维最初装配成中间纤维(intermediates), 术语称为“节段”(segment)。这些中间纤维结合到发育的细胞外基质中, 并且其发育过程属于可调成熟型。这种原纤维的成熟包括在未成熟角膜基质中, 中间纤维转化成更长的成熟原纤维。在角膜中, 仅是长度增加但直径不变, 而在其他组织中的长度和直径均增加。鸟类的角膜被用来研究原纤维形成的调节机制。在角膜中, 胶原 I 与 V 型的异促作用(heterotypic interaction)调节着原纤维节段的最初装配。V 型胶原组合物以显性-失活(dominant-negative)方式决定着新形成的原纤维节段的直径。氨基端域可介导这种效应。由于 V 型胶原的存在所引起的分子装配中的变化, 可限制原纤维的生长, 而利于引发新的原纤维节段。这利于在基质的迅速生长期增加原纤维的数量。

原纤维生长的下一步是增加其长度而形成成熟的原纤维。一项研究暗示原纤维缔和蛋白聚糖对这一生长步骤有调节作用。一种理论是, 节段经历了后-沉积融合(post-depositional fuse)后, 经分子重组形成成熟组织的长原纤维。基于这一理论设计了一个实验并预测, 在发育的不同阶段, 在与节段表面相连的组分中出现时间和空间变化。这些变化可使原纤维形成中的不

同步骤稳定或不稳定。从分离出来的原纤维表面中除去蛋白聚糖,可导致原纤维生长异常,形成更长和更大直径的原纤维。再加入蛋白聚糖,可阻止这种剂量依赖方式的异常生长。

5 SundarRaj 等在有关“XII 型胶原与角膜形态发生学”关系的另一研究中(“Through the Looking Glass”中的摘要)证实, XII 型胶原的两种可替换已剪接变体的发育调节分布,可能与涉及组织缩合(condensation)的特异性形态形成有关。

其他人所作的免疫组织化学分析表明,在角膜发育的早期(14 天), XII 型胶原的短变体在角膜基质和巩膜中被表达。短变体出现在眼睑褶形成早期的眼睑结缔组织中。然而,在后期(24 天),长变体首先被表达在后基质中。在出生前和出生后发育的后期,长变体的分布是从后基质到前基质进行的(与角膜发育期间的基质缩合模式类似)。长变体在表皮下组织的限定区域内被短暂表达,而眼睑已在该区域形成并融合。XII 型胶原在角膜上皮膜(BM)区中的出现明显早于眼睑的开始。

15 研究推断, XII 型胶原的长、短变体中时间与空间分布的差异,暗示着这些变体在角膜的发育过程中具有不同的功能。XII 型胶原的长变体可能与角膜基质缩合有关。它在 BM 区和在基质中的相互作用及功能可能有所不同。

因此,发现上述涉及各种类型 FACITs 的研究表明,这些独特胶原与基质胶原原纤维的交互作用,有助于角膜基质的组构以调节原纤维生长,使角膜透明并稳定。

如上所述,发现在胶原混合物中加入 SLRPs 可有效地稳定角膜。下面将对 SLRPs 作进一步讨论。S. Chakravarti 在“基因靶向的光蛋白聚糖缺陷小鼠:光蛋白聚糖对胶原原纤维装配和角膜透明度的调节,” (“Through the Looking Glass”中的摘要)设计了一个实验,其中假设角膜蛋白聚糖是角膜透明度所需高度组织的胶原基质的关键调节物。该研究阐明了光蛋白聚糖,主要为角膜硫酸角质素(KS)蛋白聚糖,在调节胶原结构和获得角膜透明度中所起的作用。该研究推断,光蛋白聚糖在胶原原纤维的装配和角膜透明度方面起主要作用。不透明的形成,可能是老化突变体中常见的年龄依赖性递增的胶原畸形直接的结果。光蛋白聚糖-缺陷小鼠中总 KS 含量的降低,有可能对角膜的特异水合作用和其他生理特性有影响。

在 G. W. Conrad 等的“有关角膜硫酸角质素蛋白聚糖核心蛋白基因进化起源的一些推测”(“Through the Looking Glass”中的摘要)中,科学家提出,尽管光蛋白聚糖仅在角膜中糖基化,但是核心蛋白聚糖或光蛋白聚糖核心蛋白基因均不是以角膜特异方式进行表达。模块蛋白聚糖在更有限的组织排列中被表达,而角蛋白聚糖的表达是完全的或近乎完全地,并取决于种类,是角膜-特异性的。从某些脊椎动物中获得的充足的基因组序列数据,从而可将模块蛋白聚糖基因(8 外显子)与角蛋白聚糖基因(3 外显子)两者的基因组结构作比较。基于它们的核苷酸序列,表达含有硫酸角质素链的核心蛋白的基因的家族树状图暗示,模块蛋白聚糖序列中的趋异程度明显高于角蛋白聚糖。从中将进化成基因的原始基因组可能是简单的,其中内含子出现在后期(模块蛋白聚糖出现在进化后期),或者其可以反向顺序进化,其中原始内含子随时间而被消除(模块蛋白聚糖出现在进化早期)。对具有角膜的其他机体进行基因组分析,有可能解决这一问题。

为了研究角膜损伤过程中的角膜, V. Trinkaus-Randall 等对“基质中生长因子与蛋白聚糖”的关系进行了研究(“Through the Looking Glass”中的摘要),表明 TGF β 在伤口修复过程中起作用。TGF β 在核心蛋白和 GAG 的水平改变了基质成纤维细胞中细胞外基质的组成。基底膜蛋白聚糖的增加,可加强 β FGF 的响应能力并改变其与细胞表面的结合。

W. W.-Y. Kao 的实验关于“光蛋白聚糖在小鼠角膜上皮伤口愈合中的作用”(“Through the Looking Glass”中的摘要),推断光蛋白聚糖可调节上皮细胞的移动,因此可促进角膜上皮创伤愈合。

R. V. Lozzo 在有关“蛋白聚糖信号调节基质装配和细胞生长”(“Through the Looking Glass”中的摘要)的研究表明,核心蛋白聚糖(小的富含亮氨酸重复蛋白聚糖扩展家族的原(氧)型)直接与基质装配的控制有关,这主要是由于它具有结合原纤维胶原的能力及延迟原纤维形成的能力。该研究还观察到核心蛋白聚糖可充当细胞生长的直接调节物。例如,核心蛋白聚糖的水平在生长停滞和静止期显著地提高,并且其表达也被病毒转化取消。研究证实核心蛋白聚糖蛋白核与 EGF 受体之间存在直接相互作用。因此,基质成分在伤口愈合或恶性肿瘤生长中对核心蛋白聚糖的生物合成的加强作用,可能代表着天然的生长控制机制。

因此,上述关于 SLRPs 的研究表明,这些独特的基质成分可与基质胶

原原纤维结合，以控制基质组织并稳定基质组成。

- 按照本发明，采用角膜曲率矫形法形成预期形状的角膜组织后，可将稳定剂施于角膜组织上以保持预期的形状。这种稳定剂也可直接施于角膜组织上。然后，可以，但不是必须的，将矫形镜片(shaping lens)放回角膜组织，以使稳定剂有足够的时间起作用。如下所述，现已发现本发明稳定剂能够在角膜回退成其从前形态之前起作用。然而，对于某些稳定剂而言，施用稳定剂 1 天后再放回角膜矫形镜片是有利的。

FACITs 和 SLRPs

- 在本发明的第一个实施方案中，将选自 FACITs 和 SLRPs 的至少一种化合物溶解或混悬于生理相容的缓冲液中。通常，FACITs 的浓度为约 10-500 μ g/ml，优选约 20-250 μ g/ml，最优选约 40-100 μ g/ml。当 SLRPs 单用或与 FACITs 联用时，SLRPs 的浓度例如可为约 10-500 μ g/ml、约 20-250 μ g/ml、约 40-100 μ g/ml，也可是包括在这些范围中的整数范围。

- FACITs 和/或 SLRPs 可在缓冲液如为中性 pH 的磷酸缓冲液中稀释或溶解，浓度例如为约 0.005-0.5M，此时 pH 为 6.5-8.5、优选为约 6.8-7.6。其他适宜的缓冲液包括 HEPES、TRIZMA®(Sigma-Aldrich 公司，或其他 TRIS 缓冲液供应商)，或者是其他本领域已知的生物适宜的缓冲液，其浓度约为 0.005-5M。

- 在佩戴角膜矫形镜片期间或之后的约 1-14 天内，将稳定剂滴入角膜中。可以调节缓冲体系和 pH 值，以使与角膜胶原的作用达到最好。例如，缓冲体系的 pH 值提高到 7.6 或更高，使得胶原基质结构更大地开放，从而提高组合物向眼组织的运送。本领域普通技术人员熟知，pH 值的变化是有限的以免损伤眼组织。通常，适宜的 pH 值不应高于 8.0，以防止出现这种损害。

- 通过在胶原原纤维间形成桥连以将一个胶原原纤维依附到另一个胶原纤维上，这种溶液在角膜中与胶原原纤维作用以控制原纤维的直径。这桥连允许原纤维有一定的弹性，但是对原纤维移动的距离有限制。这样，不用佩戴再矫形镜片即可保持角膜组织的形状。

实施例 1

- 为了达到最佳的稳定效果，对摘出的猪角膜进行了一系列体外实验室实验。摘出的猪眼在 Optisol 溶液中防腐，并保存在 2-8℃。目测检查经处

理的眼，并用生物显微镜监测对角膜上皮、基质、角膜浑浊、角膜刚度、前房反应和角膜厚度的影响。按下述方法，对处理的眼进行机械试验，研究其在低和高模量的变化，以评估压力下的应力和应变。低模量的下降，表明变软或者因为压出流体的能力增加而需要压缩胶原网络的压力减少。

- 5 相反，低模量的增加表明变硬(stiffening)。高模量的任何变化均表明对胶原纤维网络造成损伤。

在这些体外实验的第一阶段，挑选出 12 只猪眼。将摘出的眼暴露于稳定剂滴剂中，所述稳定剂含有用 0.005M 磷酸钠缓冲至 pH 约 7.2 的 1mg/ml 兔角膜 VI 型胶原(得自 Schlepens 眼科研究所)。将眼从 Optisol 中取出，并用平衡盐溶液(BSS)或磷酸盐缓冲的盐水(PBS)漂净后，每天 2 次施用滴剂共 10 7 天。然后再将眼放入 Optisol 中。所有眼于室温下保存并暴露于自然光下。处理中每种试剂采用两种浓度。将一玻片置于经处理眼的角膜表面上，并用拇指或机械力压，产生一平面。7 天后，外形分析(topographical analysis)显示反弹最小。

- 15 在这些体外实验的第二阶段，进一步评估同样的稳定剂对安装有角膜曲率矫形镜片的摘出猪眼的影响。于角膜曲率矫形镜片佩戴期间施于稳定剂。目测并用生物显微镜检查眼，采用例如角膜散光测量法和/或外形图测量角膜曲率，这些实验结果表明 7 天后反弹最小。

20 实施例 2

采用矫形镜片对待试眼进行塑形(molding)处理，然后给予(administer)0.04M 磷酸钠缓冲的 pH 约 7.2 的 500 μ g/ml 核心蛋白聚糖(一种 SLRP)。按下述方法给予溶液：于周五下午安装模型(mold)，至下周一早晨摘下。除去模型后，将眼暴露于 100 μ l 的核心蛋白聚糖溶液中。再将模型 25 安装到每只眼上。然后将每只眼放回 Optisol 溶液中。在于周二和周三重复使用核心蛋白聚糖。

再次将模型安装到一只眼上。对该眼进行主观照相评估表明，用核心蛋白聚糖对再安装模型的眼处理后，得到扁平角膜，无反弹。

- 30 对于第二只眼，在该眼于周三暴露于核心蛋白聚糖，未再安装模型。这样做是为了确定处理后的眼是否会回退到其最初的形状。约 3 天多后，对该眼进行主观照相评估表明，角膜组织几乎没有反弹。

实施例 3

采用矫形镜片对待试眼进行塑形处理, 然后给予 0.04M 磷酸氢二钠缓冲至 pH 约 7.2 的 100 μ g/ml 硫酸角质素(一种 SLRP)。按下述方法给予溶液:
5 于周五下午安装模型, 至下周一早晨摘下。除去模型后, 将眼暴露于 100 μ l 的硫酸角质素溶液中。再将模型安装到每只眼上。然后将每只眼放回 Optisol 溶液中。在周二和周三重复使用硫酸角质素。

再次将模型安装到一只眼上。对该眼进行主观照相评估表明, 用硫酸角质素和再次安装模型处理后, 得到平角膜, 无反弹。

- 10 对第二只眼, 在周三暴露于硫酸角质素中, 未再安装模型。这样做是为了确定处理后的眼是否会回退到其最初形状。超过约 3 天后, 对该眼进行主观照相评估表明, 角膜组织有中等的反弹。

转谷氨酰胺酶

- 15 按照本发明稳定角膜的第二种方式, 稳定剂, 优选为生物相容的, 可以衍生于通常存在于组织如表皮中的酶。所述酶可包括转谷氨酰胺酶, 例如赖氨酸与谷氨酸残基共价结合形成的转谷氨酰胺酶(因子 XIII)交联蛋白。

- 按照本发明, 转谷氨酰胺酶可与例如约 0.01M-0.25M 或约 0.05M-0.15M 的 EDTA 混合。转谷氨酰胺酶的浓度为约 0.01 M-0.25M 或约 0.05M-0.1M, 并且包括在这些范围中的任意浓度范围。由于转谷氨酰胺酶需要钙离子以进行活化, 所以在稳定剂溶液中加入可与钙离子结合 EDTA, 从而可使转谷氨酰胺酶在早期活化 (premature activity)。当然, 将会明白的是, 在许多情况下, 不需要加入 EDTA。
- 20

- 可将该溶液缓冲至一 pH 范围, 例如约 6.8-7.6 或约 7.0-7.2, 并且还包括在这些范围中的任意浓度范围。适宜的缓冲液包括甘氨酸缓冲液、TRIS 缓冲液和 Bicine 缓冲液。但是, 缓冲液中不应含有可使钙沉淀的磷酸盐。
25 然后, 将约 5-50 mM、优选约 20-30 mM 的氯化钙作为催化剂加到转谷氨酰胺酶溶液中。给药系统(delivery system)包括两部分形式的装置, 以在施用期间将组分加至角膜中。采用该装置, 使用者可在适宜的时间合并钙催化剂和转谷氨酰胺酶溶液, 而不需要分离的溶液或使用两个独立的装置。

30

实施例 4

将 10mg 转谷氨酰胺酶加到含有 2% 蔗糖、0.1 M EDTA 和 5mM 甘氨酸缓冲液的 10mL 无菌水中(pH 7.2), 配成转谷氨酰胺酶溶液。转谷氨酰胺酶购自 Sigma 公司, 商品目录号为 T-5398, 豚鼠肝或人重组来源。混合这些组分, 然后用无菌水稀释到 90 mL。第二溶液含有 25mM 氯化钙。

5 在施于角膜上之前, 将 10mL 氯化钙溶液加到转谷氨酰胺酶混合物中, 并温和混合。同滴眼药水一样, 将混合物滴到角膜表面, 并保持 10 分钟。然后用无菌水或无菌缓冲液如 BSS 冲洗眼, 以洗去过量的转谷氨酰胺酶混合物。这样, 转谷氨酰胺酶混合物就可介导角膜基质中胶原的肽结合赖氨酸的各种伯胺基团发生共价交联反应。

10 为了最优化稳定的效果, 对摘出的猪角膜进行了一系列体外实验室实验。处理前将摘出的猪眼置于冰中保存。处理前将每只眼放在供稳定性实验的支架中, 采用 Optikon 2000 系统进行外形图评估。每只眼读取 6 次并复合成单图(true composites)。角膜表面用无菌纱布干燥, 然后滴加 0.02M 磷酸氢二钠湿润。将湿润的眼再次干燥, 并滴加 0.02M 磷酸氢二钠。将一玻片平衡于角膜表面上。在 50mM TRIS 缓冲液中(用 2.5N 的 NaOH 调成 pH8.5)配制转谷氨酰胺酶和氯化钙(CaCl_2)溶液。在 10mL TRIS 缓冲液中配制 1mg/mL 的转谷氨酰胺酶。在 50mL TRIS 缓冲液中配制 25mM 的 CaCl_2 。

15 给药前, 取 1 mL 氯化钙溶液与 9mL 转谷氨酰胺酶溶液混合, 因为转谷氨酰胺酶需要 Ca^{++} 为催化剂。将转谷氨酰胺酶/ CaCl_2 溶液滴到玻片周围。再施以约 1mL 的酶溶液 2 分钟。取下玻片, 用 0.004M 磷酸缓冲液(pH 7.4)冲洗眼。然后对眼再进行外形图评估并照相。外形图评估后, 将眼放回 Optisol 中储存起来以供进一步的评估。采用这一方案共处理了 3 只眼。

20 由于在平衡玻片的同时施用酶溶液有困难, 因此处理第一和二只眼时有困难。在处理第三只眼时, 将转谷氨酰胺酶滴到角膜上, 将玻片置于角膜表面并用指压住。接着将酶溶液施于玻片周围的角膜表面。第一和二只眼未见明显的变平效果。下表 1 的外形图结果表明第一只眼的角膜变陡(steeptening)。然而, 外形图证实第三只眼的中央角膜变平。屈折力约降低 1.5 屈光度。视力检验所有眼均敏锐。将眼置于 Optisol 保存。

表 1: 外形图测得的角膜屈折力

猪眼编号	处理前(屈光度)		处理后(屈光度)	
1	38.98	37.33	42.14	39.2
2	39.89	37.7	39.98	37.26
3	40.25	38.16	38.79	36.83

处理后, 将角膜钮扣模(buttons)切割, 并置于 Optisol 中送至 Rutgers 大学进行应力-应变(stress-strain)分析。在应力-应变分析中, 将角膜钮扣模置于微凸的表面上, 并施以压缩力。应力-应变曲线代表压缩角膜至某一程度单位横断面所需的力, 以百分率表示。所得的曲线分为几个不同的阶段。其中较低部分(低模量区)代表压出胶原原纤维之间流体的阻力。中间部分(其中应力应变曲线不变)和较高部分(高模量区)代表胶原原纤维的压缩。低模量的降低表明角膜软变软。而增加表明角膜钮扣模变硬并已稳定。

转谷氨酰胺酶处理产生了有益效果。外形图评估表明, 一只猪眼经玻片压平角膜后, 再用转谷氨酰胺酶处理, 则除去玻片后其屈折力约降低 1.5 屈光度。该实验中另外两只眼的处理结果很值得注意: 将玻片置于这些猪眼上, 采用水平位将酶施于眼上, 滴剂则不能从玻片下面流入角膜中, 外形图评估未见这些眼的屈折力明显降低。由于施用玻片后, 这些眼的中央角膜未扁平, 因此在成功的眼中观测到的角膜扁平不可能仅仅是应用玻片的结果。

实施例 5

为了证实谷氨酰胺酶滴剂可在角膜曲率矫形法期间有效地稳定角膜, 又进行了附加实验。对至少 3 种不同浓度的转谷氨酰胺酶进行评估, 包括 10 mg/mL、5 mg/mL 和 1 mg/mL。每次处理包括三只眼, 和 2 个人工(sham)对照, 即只施以不含转谷氨酰胺酶缓冲液的晶状体, 和一个完全不经处理的对照。

在该系列中, 实验方法包括: 将眼置于支架中, 进行外形图评估, 每只眼记录 6 次。然后, 配适扁平镜片并轻轻地用橡皮圈或类似装置将其固定。将眼与水平成约 45 度放置, 并滴加 0.05M 的 TRIS 盐酸溶液(pH 7.6)进行调

- 节。使缓冲液作用 1 分钟，期间将转谷氨酰胺酶溶液与 CaCl_2 溶液以 9: 1 比例混合。然后，用含钙的转谷氨酰胺酶滴剂处理眼，每滴约含 0.1 mL 溶液，每隔 30 秒给药 1 次，共 2 分钟，然后滴入 0.05M TRIS 盐酸缓冲液。然后对眼进行外形图评估，用隙灯生物显微镜检查，将球体切割并送至
- 5 Rutgers 大学进行加压分析。

外形图评估显示，屈折力降低 1.5-2.0 并且在低模量增加，这表明角膜组织变硬。

实施例 6

- 10 采用矫形镜片对待试眼进行塑形处理，然后给予 0.05M TRIS 盐酸缓冲至 pH 约 7.2 的 1mg/ml 转谷氨酰胺酶，其中在 0.05M TRIS 盐酸缓冲液中含有 25mM 氯化钙。按下述方法给予溶液：于周五下午安装模型，至周一早晨摘下。除去模型后，将眼暴露于 100 μl 的转谷氨酰胺酶溶液中。将模型再次安装到每只眼上。然后将每只眼放回 Optisol 溶液中。在于周二和周
- 15 三施以转谷氨酰胺酶。

将模型再次安装到一只眼上。对该眼进液的主观照相评估表明，用转谷氨酰胺酶并再次安装模型处理后，得到扁平角膜，无反弹。

- 对于第二只眼，在该眼周三暴露于转谷氨酰胺酶中后，未再安装模型。这样做是为了确定处理后的眼是否会回退到其最初的形状。超过约 3 天后，
- 20 主对该眼进液的观照相评估表明，眼角膜组织仅有极微小的反弹。

总之，本发明教导了多种具有滴眼给药系统的组合物，它们可在角膜曲率矫形镜片佩戴期间或之后，保持或稳定经快速角膜曲率矫形法矫正的角膜组织。施用于角膜的组合物可与角膜中的胶原原纤维结合而控制原纤维直径，并在胶原原纤维间形成桥连。

- 25 本发明预期其可稳定经角膜曲率矫形法病人的角膜。这种稳定化方法无需连续佩戴保持型镜片来保持角膜形状。这些病人也可简化稳定步骤，预期角膜在重新稳定成新形状之前会变得不稳定。

实施例 7

- 30 猫眼中核心蛋白聚糖毒性评估方案

下述评估的目的是研究(1)在眼上施用核心蛋白聚糖眼部是否能出现与

施用核心蛋白聚糖有关的毒性；(2)评估核心蛋白聚糖对角膜的穿透作用；和(3)外源性施用核心蛋白聚糖后定量角膜中的核心蛋白聚糖。

以正常角膜作为模型体系，于施用核心蛋白聚糖的 1、3 和 5 天，每日对雌猫(6 月-2 岁龄)作评估。用 0.1 M 磷酸缓冲剂，对购自 Sigma 公司的粉5 状核心蛋白聚糖进行重新构成。为了进行显微镜评估，采用购自 Molecular Probes 的试剂盒，用 Oregon 绿 514 标记核心蛋白聚糖。

实验采用 5 只猫。在对其眼部局部施药或摄影之前，使每只猫安静下来。处理前，对所有动物进行眼部检查并拍照(全眼、裂隙灯和内皮细胞)。将眼随机排组。将核心蛋白聚糖施于隐形眼镜的内面，然后将镜片置于猫10 眼中。镜片在眼中留置 10 分钟。研究期间每日观察动物。每 3 只眼随机排成一个处理或对照组。每个直方图、TEM 和同焦显微镜评估至少采用 2 只以上的眼作对照。

3 个处理组每组中的一只眼用 Oregon 绿色 5149 标记的核心蛋白聚糖处理。

- ◆ 于第 1 天,处理 1 组的眼被施用含 50 μ g 核心蛋白聚糖的 100 μ l 缓冲液一次。处理后即照相和检查，并于处理后第 2、4 和 8 天再进行一次。然后在一个月的剩余时间内，每周照相并检查。
- ◆ 于第 1、2 和 3 天，处理 2 组的眼被施用含 50 μ g 核心蛋白聚糖的 100 μ l 缓冲液一次。处理后即照相和检查，并于第 2、3、5 和 8 天再进行一次。然后在一个月的剩余时间内，每周照相并检查。
- ◆ 于第 1、2、3、4 和 5 天，处理 3 组的眼施用含 50 μ g 核心蛋白聚糖的 100 μ l 缓冲液一次。处理后每日照相，并于第 8 天再进行一次。然后在一个月的剩余时间内，每周照相并检查。
- ◆ 一个月后无痛处死所有动物，摘出眼并将每只对切。一半置于福尔马林中供毒性的组织学分析(H & E stain)。将另一半再对切，一半用于核心蛋白聚糖的 TEM 造影，剩余部分供经标记核心蛋白聚糖处理的猫进行同焦显微镜检查。

15

图 1(同焦显微照片, confocal micrographs)结果表明，核心蛋白聚糖透入了眼角膜组织。另外，图 2(样品# 33080543)表明，与未处理的角膜(图 3，

样品#3380562)相比,根据上述处理方案用核心蛋白聚糖处理5次的角膜(处理组3)中含有更多的胶原原纤维缔和核心蛋白聚糖。初始定性分析表明,经处理的眼中的核心蛋白聚糖丝连(filament)更长且“更肥”。这些“更肥的”丝连遍布于包括上皮域、中部基质和内皮域的基质域中。

- 5 这些研究表明,外源性施用的核心蛋白聚糖可透入眼角膜组织并与基质结合。另外,对猫角膜外源性施用核心蛋白聚糖未见任何与其有关的眼毒性或副作用。

对本领域技术人员很清楚的是,可针对本发明组合物、组合物制备方法和施用组合物的方法等进行并不偏离本发明范畴和精神的改进和变化。

- 10 通过在此公开的说明书和实践的教导,本发明的其他实施方案对于本领域技术人员而言是显而易见的。本领域技术人员将会容易地领会这些说明书和实施例对本发明来说仅仅是示例性的,而本发明真正的范围和精神将体现于本发明权利要求书及其同等描述中。

图 1

同焦图像

Oregon 绿514 标记的牛核心蛋白聚糖



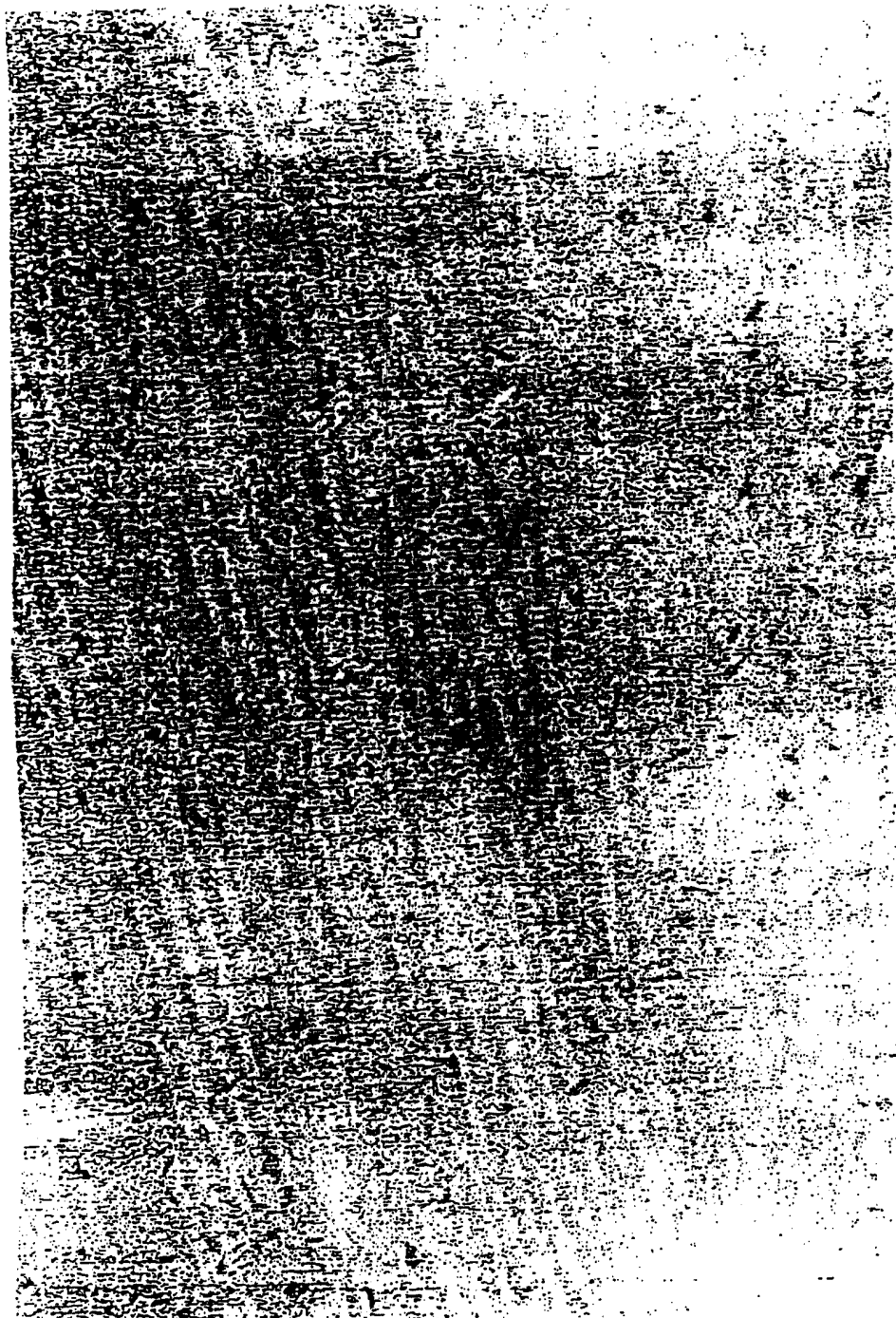


图 2 样品 # 3380543



图3 样品#3380562