



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102470120 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 23

(21) 申请号 201080032800. 1

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司  
31002

(22) 申请日 2010. 07. 23

代理人 王洁

(30) 优先权数据

VA2009A000052 2009. 07. 27 IT

VA2010A000044 2010. 05. 20 IT

(51) Int. Cl.

A61K 31/203(2006. 01)

A61K 31/4415(2006. 01)

A61K 31/51(2006. 01)

A61K 31/525(2006. 01)

A61P 27/02(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 01. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/060752 2010. 07. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02011/012557 EN 2011. 02. 03

(71) 申请人 雷纳托·圣塞韦里诺

地址 意大利那波利

申请人 萨尔瓦托雷·特罗伊西

安东尼奥·德·普雷特

奇罗·卡鲁索

(72) 发明人 萨尔瓦托雷·特罗伊西

安东尼奥·德·普雷特

奇罗·卡鲁索

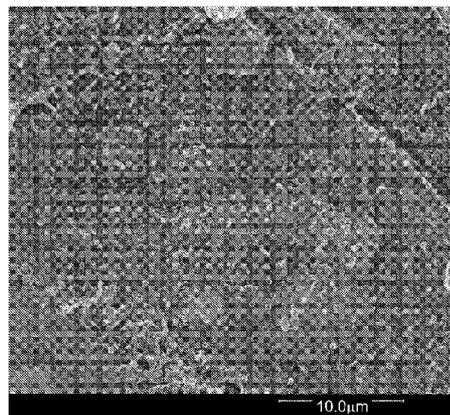
权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 11 页

(54) 发明名称

用于保护眼球的内部结构抵抗紫外线或用于用跨上皮交联技术治疗圆锥角膜的眼用溶液

(57) 摘要

一种眼用溶液,含有核黄素和选自由必需和条件必需氨基酸、辅酶 Q、L- 脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸、L- 亮氨酸、L- 精氨酸以及用于刺激金属蛋白酶 MMP9 产生的化合物组成的组中的至少一种化合物,用于保护眼球的内部结构抵抗紫外线或用于用跨上皮交联技术治疗圆锥角膜。



1. 一种眼用溶液,其特征在于,含有核黄素和选自自由必需和条件必需氨基酸、辅酶 Q、L- 脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、L- 亮氨酸、L- 精氨酸以及用于刺激金属蛋白酶 MMP9 产生的化合物像染料木素、植物雌激素、细胞因子和非类固醇消炎药像乙酰水杨酸、氟灭酸、甲氯灭酸、甲灭酸、尼氟灭酸、托灭酸、贝诺酯、卡洛芬、塞内昔布、辛诺昔康、二氟尼柳、双氯芬酸、屈昔康、依托度酸、依他昔布、苯氧布洛芬、氟苯布洛芬、异丁芬酸、布洛芬、吡罗昔康、酮洛芬、酮咯酸、氯诺昔康、罗美昔布、美洛昔康、安乃近、萘普生、尼美舒利、奥沙普秦、帕瑞昔布、吡罗昔康、罗非昔布、舒林酸、舒多昔康、替诺昔康、伐地考昔组成的组中的至少一种化合物,用于保护眼球的内部结构抵抗紫外线或用于用跨上皮交联技术治疗圆锥角膜。

2. 根据权利要求 1 所述的眼用溶液,其特征在于,含有维生素 E 和选自自由必需和条件必需氨基酸、辅酶 Q、L- 脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、L- 亮氨酸和 L- 精氨酸组成的组中的至少一种化合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的眼用溶液,其特征在于,包括浓度选自从 0.0001% 到 0.5% 范围内的核黄素 - 葡聚糖溶液和至少一个下列化合物:

- 浓度选自从 0.0001 毫克%毫升到 2000 毫克%毫升范围内的维生素 E;
- 浓度选自从 0.0001 毫克%毫升到 2000 毫克%毫升范围内的辅酶 Q;
- 浓度选自从 0.0001 毫克%毫升到 2000 毫克%毫升范围内的 L- 脯氨酸;
- 浓度选自从 0.0001 毫克%毫升到 2000 毫克%毫升范围内的甘氨酸;
- 浓度选自从 0.0001 毫克%毫升到 2000 毫克%毫升范围内的赖氨酸盐酸盐;
- 浓度选自从 0.0001 毫克%毫升到 2000 毫克%毫升范围内的 L- 亮氨酸;
- 浓度选自从 0.00001% 至 0.5% 范围内的 L- 精氨酸或任何其它必需或条件必需氨基酸。

4. 根据权利要求 1-3 任一所述的眼用溶液,其特征在于,包括浓度约 0.1% 的核黄素 - 葡聚糖溶液和至少一个下列化合物:

- 浓度约 500 毫克%毫升的维生素 E;
- 浓度约 500 毫克%毫升的辅酶 Q;
- 浓度约 0.1 毫克%毫升的 L- 脯氨酸;
- 浓度约 0.1 毫克%毫升的甘氨酸;
- 浓度约 0.05 毫克%毫升的赖氨酸盐酸盐;
- 浓度约 0.08 毫克%毫升的 L- 亮氨酸;
- 浓度约 0.1% 的 L- 精氨酸或任何其它必需或条件必需氨基酸。

5. 根据权利要求 1-4 任一所述的眼用溶液,其特征在于,包括 0.1% 核黄素 - 葡聚糖, 500 毫克%毫升维生素 E TPGS(D- $\alpha$ -生育酚聚乙烯乙二醇 1000 琥珀酸), 100 毫克%毫升辅酶 Q, 0.1 毫克% L- 脯氨酸, 0.1 毫克%甘氨酸, 0.05 毫克%赖氨酸盐酸盐和 0.08 毫克% L- 亮氨酸。

6. 根据权利要求 1-5 任一所述的眼用溶液,其特征在于,以眼药水或眼用凝胶或适于应用在治疗性隐形眼镜上的形式。

7. 选自自由必需和条件必需氨基酸、辅酶 Q、L- 脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、L- 亮氨酸、L- 精氨酸以及用于刺激金属蛋白酶 MMP9 产生的化合物像染料木素、植物雌激素、细胞因子和非类固醇消炎药像乙酰水杨酸、氟灭酸、甲氯灭酸、甲灭酸、尼氟灭酸、托灭酸、贝诺

酯、卡洛芬、塞内昔布、辛诺昔康、二氟尼柳、双氯芬酸、屈昔康、依托度酸、依他昔布、苯氧布洛芬、氟苯布洛芬、异丁芬酸、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、氯诺昔康、罗美昔布、美洛昔康、安乃近、萘普生、尼美舒利、奥沙普秦、帕瑞昔布、吡罗昔康、罗非昔布、舒林酸、舒多昔康、替诺昔康、伐地考昔组成的组中的至少一种化合物的应用,用于制备一种含有核黄素的眼用溶液,用于保护眼球的内部结构抵抗紫外线或用于用跨上皮交联技术治疗圆锥角膜。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述眼用溶液含有维生素E和选自必需和条件必需氨基酸、辅酶 Q、L- 脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、L- 亮氨酸和 L- 精氨酸组成的组中的至少一种化合物。

9. 一种用于制备根据权利要求 1-6 任一所述的眼用溶液的方法,其特征在于,包括将选自必需和条件必需氨基酸、辅酶 Q、L- 脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、L- 亮氨酸、L- 精氨酸以及用于刺激金属蛋白酶 MMP9 产生的化合物像染料木素、植物雌激素、细胞因子和非类固醇消炎药像乙酰水杨酸、氟灭酸、甲氯灭酸、甲灭酸、尼氟灭酸、托灭酸、贝诺酯、卡洛芬、塞内昔布、辛诺昔康、二氟尼柳、双氯芬酸、屈昔康、依托度酸、依他昔布、苯氧布洛芬、氟苯布洛芬、异丁芬酸、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、氯诺昔康、罗美昔布、美洛昔康、安乃近、萘普生、尼美舒利、奥沙普秦、帕瑞昔布、吡罗昔康、罗非昔布、舒林酸、舒多昔康、替诺昔康、伐地考昔组成的组中的至少一种化合物加入至核黄素溶液的步骤。

10. 选自必需和条件必需氨基酸、辅酶 Q、L- 脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、L- 亮氨酸、L- 精氨酸以及用于刺激金属蛋白酶 MMP9 产生的化合物像染料木素、植物雌激素、细胞因子和非类固醇消炎药像乙酰水杨酸、氟灭酸、甲氯灭酸、甲灭酸、尼氟灭酸、托灭酸、贝诺酯、卡洛芬、塞内昔布、辛诺昔康、二氟尼柳、双氯芬酸、屈昔康、依托度酸、依他昔布、苯氧布洛芬、氟苯布洛芬、异丁芬酸、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、氯诺昔康、罗美昔布、美洛昔康、安乃近、萘普生、尼美舒利、奥沙普秦、帕瑞昔布、吡罗昔康、罗非昔布、舒林酸、舒多昔康、替诺昔康、伐地考昔组成的组中的一种化合物的应用,作为渗透增强剂用于制备含有核黄素的眼用溶液。

## 用于保护眼球的内部结构抵抗紫外线或用于用跨上皮交联 技术治疗圆锥角膜的眼用溶液

### 技术领域

[0001] 本发明大体涉及用于治疗圆锥角膜的组合物和技术,更具体地涉及一种新型溶液,适于使用用于保护眼球的内部结构抵抗紫外线或使用在角膜交联治疗中。

### 背景技术

[0002] 书籍 [18] 提供了用于施用和吸收眼用溶液的问题和技术的综述。

[0003] 角膜与核黄素(维生素 B2)交联(C3),简称为核黄素-C3(riboflavin-C3),是一种创新技术,用于治疗受圆锥角膜(keratoconus)和角膜扩张(corneal ectasia)影响的病人,主要施用核黄素和紫外线照射(ultra-violet irradiation, UV-A)用于加强角膜组织 [1][2]。

[0004] 交联治疗是相对简单的:核黄素滴注在眼睛中,角膜用合适剂量的紫外线照射 5 分钟;然后该程序接连重复 6 次用于总共暴露于紫外线 30 分钟。

[0005] 用于建立交联治疗合适性应该考虑的最重要的临床参数是角膜厚度,必须不小于 400 微米。

[0006] 该圆锥角膜的保守治疗的目的是延迟或希望消除角膜移植的需要,并通过提高他们的生活质量而改善患者的视觉功能 [6][7]。

[0007] 交联技术已经使用用于治疗圆锥角膜,其病理学特点是因为其组成的胶原蛋白层的粘连减小而导致角膜实质(corneal parenchyma)异常松弛,从而角膜逐渐弱化。通过使用紫外线和核黄素,在相邻的角膜胶原蛋白分子之间的新的连接形成,治疗的角膜变厚和变硬 [3]。角膜在实质的厚度中有许多层胶原蛋白纤维;横向连接,所谓的“交联”将胶原蛋白的多层之间连接,以决定性方式促进角膜硬度。角膜交联治疗的目的是通过这些横向连接的更大数目的产生增加角膜组织的刚性程度。

[0008] 核黄素在无上皮角膜上的约 200  $\mu\text{m}$  的渗透的局部滴旋以及紫外线照射核黄素决定核黄素分子的化学平衡的丧失和随之而来的自由基的产生。核黄素分子变得不稳定,通过连接两个胶原纤维将它们自身稳定。在胶原纤维之间形成一系列生化“桥梁”(即交联)以产生角膜的普遍加强 [3]。

[0009] 实际上,在已经去除角膜的最外层(即角膜上皮)后进行治疗。进行圆锥角膜和角膜扩张的交联治疗(C3-R)的这种方式认为预先去除角膜上皮用于有助于 0.1%核黄素-葡聚糖的标准溶液(例如由商标 RICROLIN™ 下的 SOOFT ITALIA S. r. l. 销售的溶液)在底层的基质中的渗透,治疗已经在这些条件下标准化。根据该技术的支持者,上皮层的去除将是必需的,用于确保核黄素溶液在角膜基质内最好可能的吸收,以及因此的治疗的最大效果。

[0010] 不幸的是,角膜上皮的去除在治疗后第二天以及立即连续几天可能导致眼痒或烧伤,以及瞬时模糊;这些症状是众所周知的,并在 C3-R 后连续几天 [4-7] 中持续直至角膜上皮尚未得到恢复并经受通常的治疗,采用非类固醇消炎(non-steroidal anti-inflammatory, NSAID)滴眼液、基于泪液替代品和止痛剂的滴眼液以及在角膜上使用

治疗性隐形眼镜。

[0011] 几位作者支持通过采用标准方法而不预先去除角膜上皮进行 C3-R 治疗可能是可能的,且如由观察到的临床资料所证明的,这样的治疗将是有效的和安全的。根据这项技术,应该进行治疗而无需预先去除角膜上皮 (disepithelization)。目的是避免病人经受由于第一种方法固有的上皮去除导致的疾病,进行门诊治疗,特别是避免在考虑上皮去除随后暴露角膜底层的治疗中固有的手术后感染的任何风险。进行这种治疗方式的支持者建议在眼睛上以更长的时间间隔使用核黄素以在用紫外线照射前允许核黄素在基质中更好的吸收 [8]。

[0012] 总的说来,在圆锥角膜及角膜扩张的交联治疗中就上皮去除或不去除而言,在文献中报道了相反的意见。

[0013] 已经研究和实施在去除角膜上皮以有助于核黄素在基质中的渗透后进行 C3-R 治疗。据作者所知,文献中还没有研究可以获得用于确定通过去除或不去除角膜上皮是否以及多少核黄素在角膜基质中渗透 [9]。

[0014] 不预先去除上皮进行交联已经被众多作者所批评,他们支持采用这种方式核黄素将不会通过上皮,仍然没有证明不去除上皮是否以及多少 0.1%核黄素葡聚糖标准溶液在角膜基质中有效渗透,以及以跨上皮方式进行紫外线治疗是否导致与在去除角膜上皮后进行紫外线治疗同等有效。

[0015] 在试图提供有效物质用于用交联技术治疗圆锥角膜而无需去除角膜上皮中,Sp δ r1 博士建议 [17] 使用苯扎氯铵用于增加上皮的渗透性,Pinelli 博士建议使用与核黄素混合的表面活性剂 (tensioactives)。

[0016] 意大利专利申请 MI2007A002162 [16] 披露了一种用于用跨上皮交联技术治疗圆锥角膜的新型溶液,含有核黄素和苯扎氯铵。

[0017] 由申请人在人角膜上进行的实验,其结果在下文进行说明,得出结论:采用标准溶液或 Pinelli 博士 [16] 建议的组合物进行的第二种技术将不能克服由于去除角膜上皮导致的问题,因为它会被毁坏,将底层暴露于随之而来的感染风险和修复机制的改变。

[0018] 具有一种用于进行角膜交联的含有核黄素的组合物,能够在相对短的时间内通过角膜上皮并且不损伤角膜上皮,那是恼人的手术后的症状的原因,将是期望的。

## 发明内容

[0019] 申请人进行了深入研究,旨在确定预先去除和不去除角膜上皮,多少核黄素单独或与其它产品 (“渗透增强剂”, “permeation enhancers”) 混合渗透通过人角膜,以及随后用紫外线治疗的有效性和安全性。

[0020] 已经确定了一些有用的物质,选自由必需和条件必需 (如精氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、谷氨酸、组氨酸、脯氨酸、丝氨酸和酪氨酸) 氨基酸、辅酶 Q、维生素 E、L-脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、L-亮氨酸、L-精氨酸以及用于刺激金属蛋白酶 MMP9 产生的化合物组成的组,在下文更精确地确定,在眼用溶液中可以有效地用作载体 (“渗透增强剂”),适用于施用核黄素,特别是核黄素-葡聚糖标准溶液,通过角膜上皮。由此得到的眼用溶液,可以以例如眼药水或凝胶或水溶液或乳液或使用在治疗性隐形眼镜上的形式进行销售,可用于用跨上皮交联技术治疗圆锥角膜,从而保留角膜上皮。

[0021] 滴眼液可以最终包含辅料,如醋酸,或上述物质可以在与核黄素混合前用醋酸或用另一种辅料处理。

[0022] 本发明进一步提出选自自由必需和条件必需氨基酸、辅酶 Q、维生素 E、L- 脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐、L- 亮氨酸、L- 精氨酸以及用于刺激金属蛋白酶 MMP9 产生的化合物组成的组中的至少一种化合物的应用,在下文更精确地确定,,用于制备一种含有核黄素的眼用溶液,用于保护眼球的内部结构抵抗紫外线或用于用跨上皮交联技术以及一种相关的含有核黄素的眼用溶液治疗圆锥角膜,以及在组合物中作为载体(“渗透增强剂”)适于施用核黄素通过角膜上皮。

[0023] 本发明还提出了一种制备这样一种眼用溶液的方法,主要包括将至少一种上述确定的载体加入核黄素溶液。

[0024] 作为载体的建议的物质的每一个可以单独或与其它建议的载体联合加入含有核黄素的浓度选自在随后描述的示例性的具体实施例中指出的范围的溶液中。

[0025] 本发明在所附的权利要求中进行限定。

## 附图说明

[0026] 图 1 显示了用于评估以跨上皮方式应用后 0.1%核黄素溶液通过角膜的视觉、荧光法、比色法评价量表。

[0027] 图 2a 是在其上第四试验组合物已经以跨上皮方式使用 15 分钟后的角膜的一部分的荧光镜检照片。

[0028] 图 2b 是在其上第四试验组合物已经以跨上皮方式使用 30 分钟后的角膜的一部分的荧光镜检照片。

[0029] 图 2c 是使用第四新型溶液采用跨上皮交联治疗的角膜的一部分的荧光镜检图像,其中因为治疗后第四组合物的通过和组织的相对刚性,可注意到强荧光。

[0030] 图 3a 显示使用标准溶液采用跨上皮交联治疗的角膜的偏转角度。

[0031] 图 3b 显示使用第四新型测试溶液采用跨上皮交联治疗的角膜的偏转角度。

[0032] 图 4 是显示圆锥角膜影响的角膜的一部分中薄层的扫描显微镜图像。

[0033] 图 5 是显示图 4 所示的角膜的放大视角的扫描显微镜图像。

[0034] 图 6 是显示使用第四新型测试组合物进行跨上皮交联后圆锥角膜影响的角膜的一部分中薄层的扫描显微镜图像。

[0035] 图 7 是显示正常角膜中上皮的微绒毛和表层的形态的扫描显微镜图像。

[0036] 图 8 是显示以跨上皮方式使用 0.1%核黄素 - 葡聚糖的标准溶液后使用标准剂量的紫外线治疗的角膜的扫描显微镜图像。

[0037] 图 9 是显示以跨上皮方式使用第四新型测试组合物后使用标准剂量的紫外线治疗的角膜的扫描显微镜图像。

[0038] 图 10 是显示以跨上皮方式使用生理溶液后使用标准剂量的紫外线治疗的角膜的扫描显微镜图像。

## 具体实施方式

[0039] 在与移植协议中预期达成共识后,依照伦理委员会的批准 -0009304/2009 号案

卷-1269号决定,在来自 Azienda Ospedaliera Napoli 1-Banca Occhi(“眼库”(“Eye Bank”))-坎帕尼亚区(Regione Campania)-Ospedale dei Pellegrini 的捐赠者的人角膜上进行所有测试,。

[0040] 已观察到测试组合物通过整个人角膜的渗透,即没有预先去除上皮,角膜具有 500 和 600 微米之间的厚度,组合物是核黄素-葡聚糖的标准溶液,组合物由核黄素-葡聚糖加 [16] 和 [17] 中建议的苯扎氯铵制成,新型测试组合物通过将核黄素和选自包括维生素 E、辅酶 Q、L-脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐和 L-亮氨酸的组中的至少一种物质以一定浓度混合得到。

[0041] 用于实现新型测试组合物而使用的物质的浓度在以下范围内:

[0042] 维生素 E:浓度从 0.0001 毫克%毫升至 2000 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.01 毫克%至 1500 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 10 毫克%毫升至 1000 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度约 500 毫克%毫升。

[0043] 维生素 Q:浓度从 0.0001 毫克%毫升至 2000 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.01 毫克%至 1500 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 1 毫克%毫升至 1000 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度约 100 毫克%毫升。

[0044] L-脯氨酸:浓度从 0.0001 毫克%毫升到 2000 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.001 毫克%至 100 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.005 毫克%毫升至 10 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.01 毫克%毫升至 1 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度约 0.1 毫克%毫升。

[0045] 甘氨酸:浓度从 0.0001 毫克%毫升至 2000 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.001 毫克%至 100 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.005 毫克%毫升至 10 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.01 毫克%毫升至 1 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度约 0.1 毫克%毫升。

[0046] 赖氨酸盐酸盐:浓度从 0.0001 毫克%毫升至 2000 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.001 毫克%至 100 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.005 毫克%毫升至 10 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.01 毫克%毫升至 1 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度约 0.05 毫克%毫升。

[0047] L-亮氨酸:浓度从 0.0001 毫克%毫升至 2000 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.001 毫克%至 100 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.005 毫克%毫升至 10 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.01 毫克%毫升至 1 毫克%毫升。根据更优选的具体实施例,浓度约 0.08 毫克%毫升。

[0048] 适于用跨上皮交联治疗圆锥角膜或保护眼球抵抗紫外线的新型溶液已经通过将处于在指出的范围内的浓度的上述物质的一种或多种与含有核黄素的溶液例如浓度选自 0.0001%到 0.5%的核黄素-葡聚糖溶液混合来获得。根据更优选的具体实施例,核黄素-葡聚糖浓度从 0.001%至 0.4%。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.005%至 0.3%。根据更优选的具体实施例,浓度从 0.01%至 0.2%。根据更优选的具体实施例,浓度约 0.1%。

[0049] 试验结果已经表明确定组的物质的每一个是适于有助于核黄素特别是标准核黄素-葡聚糖溶液通过角膜上皮的渗透和保护角膜抵抗紫外线。

[0050] 因为无法用于移植而从眼库丢弃的考虑用于测试的角膜一直保存到适当的溶液中,并在测试前,通过光学显微镜和内皮细胞检查的手段对它们再次进行评估。

[0051] 根据在 [10-15] 中建议的,已经使用只有具有良好的透明度的角膜,具有 500 至 600 微米之间的厚度,具有良好的内皮镶嵌。

[0052] 角膜已经这样放置以关闭 0.4 毫升含有透明质酸钠加黄原胶的预制溶液的圆柱形腔。具有与圆柱箱相同直径的防水密封金属环使用在角膜表面。然后含有荧光物质(核黄素)的要测试的组合物使用在角膜上。通过在不同的瞬间测量箱内溶液的荧光,确定新型溶液在角膜中以多少量渗透以及新型溶液为此需要花费多长时间是可能的。

[0053] 指出的物质作为用于以跨上皮方式施用核黄素的组合物中载体的有效性,以及通过混合核黄素和至少一个指出的物质的组合物的有效性通过下面的测试例子进行描述,只为说明而非限制性的目的。

[0054] 为了简便起见,只报道用下列组合物治疗角膜获得的测试结果:

[0055] 1) 0.1%核黄素-葡聚糖的标准溶液;

[0056] 2) 0.1%核黄素-葡聚糖和根据 [16] 的 0.01%苯扎氯铵的标准溶液;

[0057] 3) 0.1%核黄素-葡聚糖+500 毫克%毫升浓度的维生素 E TPGS(D- $\alpha$ -生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸(D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000succinate))的第一新型测试组合物;

[0058] 4) 0.1%核黄素-葡聚糖+100 毫克%毫升维生素 Q 的第二新型测试组合物;

[0059] 5) 0.1%核黄素-葡聚糖+0.1 毫克%L-脯氨酸+0.1 毫克%甘氨酸+0.05 毫克%赖氨酸盐酸盐+0.08 毫克%L-亮氨酸的第三新型测试组合物;

[0060] 6) 0.1%核黄素-葡聚糖+500 毫克%毫升维生素 E(D- $\alpha$ -生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸)+100 毫克%毫升维生素 Q+0.1 毫克%L-脯氨酸+0.1 毫克%甘氨酸+0.05 毫克%赖氨酸盐酸盐+0.08 毫克%L-亮氨酸的第四新型测试组合物;

[0061] 六个提到的组合物的每一个以及施用在如上描述那样选择和放置的角膜的表面上,角膜基质的浸泡在 15 分钟后和 30 分钟后与在置于治疗的角膜下的容器中的 0.4ml 透明质酸钠+黄原胶的溶液中的荧光物质的存在一起评估。

[0062] 核黄素在角膜基质中的渗透的评估已经通过切片角膜并用荧光显微镜进行随后评估来进行。

[0063] 0.4ml 透明质酸钠+黄原胶的溶液中的核黄素的存在,证明通过角膜,已经通过使用描述在图 1 中的视觉和荧光镜检量表进行定性评估和使用比色法量表进行定量评估。每一种颜色样本附近的两个数字分别代表导致所显示的颜色的核黄素的标准溶液的部分的数目以及黄原胶和透明质酸钠溶液的部分的数目。对照量表已经通过制备 0.1%核黄素-葡聚糖和黄原胶+透明质酸钠以下列比例(单位/ml)的稀释液进行确定:50/0,40/10,30/20,20/30,10/40,0/50。已经准备对应单位/ml 的确定值的视觉量表和比色法量表,已经为每种稀释比例分配从 10 下降到 0 的分数。比色法量表考虑等于 20%无核黄素的黄色的百分比的最小值,对应选择作为稀释剂的物质的比色谱。

[0064] 视觉量表的评估已经在标准光照条件下通过将测试获得的样品与预定样品直接比较和数码摄影技术进行。荧光法评估已经通过在暗室中使用配备数字照相机的荧光扫描显微镜来进行。关于视觉和荧光法量表的评估的分数已经通过第三检测方,通过计算用两

种方法获得的值的平均值进行。

[0065] 比色法评估已经通过在实验结束时将在圆柱形腔（因此位于角膜下）中存在的材料插入至透明袋中并通过在高清晰度下扫描预定的稀释液和使用软件程序Photoshop™7.0及单色过滤器评估黄色百分比的计算机分析来进行。采用这种技术,比较在具有以标准0.1%核黄素溶液的单位 /ml 表示的精确确定的浓度值的实验样品中检测的黄色百分比,是可能的。

[0066] 图 2a 是使用第四新型试验溶液 15 分钟后采用跨上皮交联治疗的角膜的一部分的荧光镜检图像,图 2b 是使用第四新型试验溶液 30 分钟后采用跨上皮交联治疗的角膜的一部分的荧光镜检图像,图 2c 是使用第四新型溶液采用跨上皮交联治疗的角膜的一部分的荧光镜检图像。在这最后的图片中,注意到交联治疗后核黄素已经渗透在整个角膜中且组织更硬,是可能的。

[0067] 进行的测试表明:

[0068] a) 以跨上皮方式使用 0.1%核黄素-葡聚糖标准溶液 15 分钟后,角膜基质部分浸泡,在容器中的物质中荧光溶液是无法检测的,比色法范围与 0.4 毫升透明质酸钠+黄原胶溶液是可重合的(图 1 中所示为分数 0,黄色百分比不大于 20%)。

[0069] b) 以跨上皮方式使用 0.1%核黄素-葡聚糖标准溶液 30 分钟后,角膜基质显示完全浸泡在荧光溶液中,在容器中 0.4 毫升透明质酸钠+黄原胶的溶液中的荧光可以进行检测,得到图 1 的分数 2-3,采用上述计算机进行的技术测定的黄色百分比处于 75% -80%的范围。

[0070] c) 以跨上皮方式使用 0.1%核黄素-葡聚糖+500 毫克%毫升浓度的维生素 E TPGS(D- $\alpha$ -生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸)的第一新型测试溶液 15 分钟后,角膜基质完全浸泡,荧光溶液存在容器中(图 1 的分数 2-3,72% -76%的黄色百分比)。

[0071] d) 使用第一新型测试溶液 30 分钟后,所有角膜层完全浸泡,在容器中具有高浓度的核黄素,显示角膜组织至与上皮表面接触的产品本身的良好渗透性(图 1 的分数 3-4,79% -84%的黄色百分比)。

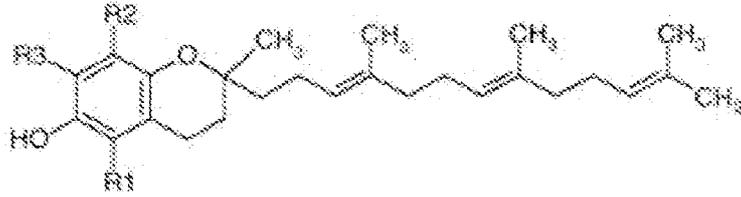
[0072] e) 在 [16] 中建议的组合物和第二、第三新型测试溶液,分别含有:0.01%苯扎氯铵;100 毫克%毫升维生素 Q;0.1 毫克% L-脯氨酸,0.1 毫克%甘氨酸,0.05 毫克%赖氨酸盐酸盐和 0.08 毫克% L-亮氨酸,与单独使用标准溶液(0.1%核黄素-葡聚糖)获得的结果相比,在相同条件下显示核黄素无论是在数量上还是渗透速度上均具有更好地渗透(15 分钟后图 1 的分数 3-4,30 分钟后分数 4-6,15 分钟后黄色百分比 70-79%,30 分钟后黄色百分比 78-86%)。

[0073] f) 第四新型测试组合物比所有其它测试组合物给出甚至更好的结果。以荧光镜检方式检测的着色剂的不同浓度以及在上皮表面上使用产品 15 分钟和 30 分钟后容器内荧光物质的基于计算机进行的分析显著增强(15 分钟后图 1 的分数 5-6,黄色百分比 88-91%;30 分钟后分数 6-7,黄色百分比大于 90%);在跨上皮使用第四新型测试溶液后获得的在角膜下放置的溶液中荧光物质的更高的浓度在 15 分钟后特别明显,特别如果与使用标准溶液得到的结构相比,其在相同时间间隔后在容器内放置的溶液中甚至是不可检测的。这可以解释为假设混合在一起时渗透增强剂之间存在协同效应,用于有助于核黄素通过角膜上皮。

[0074] 所示的结果显示至少下列物质：

[0075] - 维生素 E

[0076]



[0077] R1 = CH<sub>3</sub> 或 H ; R2 = CH<sub>3</sub> 或 H ; R3 = CH<sub>3</sub> ; 只是举例, 可引用维生素 E TPGS (D-α-生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸) ;

[0078] - 辅酶 Q

[0079] 处于氧化形式,

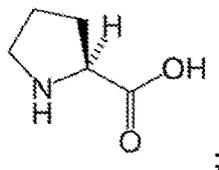
[0080] 处于半醌类形式,

[0081] 处于还原形式,

[0082] 无论辅酶 Q 的异戊二烯单元的数目是多少 ; 只是举例, 可引用辅酶 Q10 ;

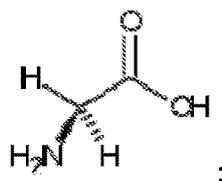
[0083] -L- 脯氨酸

[0084]



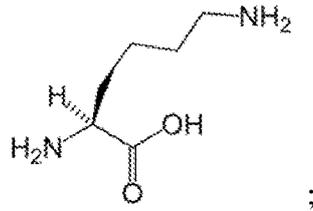
[0085] - 甘氨酸

[0086]



[0087] - 赖氨酸

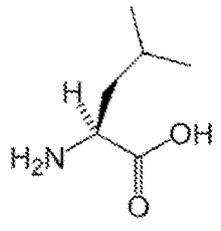
[0088]



[0089] 或赖氨酸盐酸盐；

[0090] -L-亮氨酸

[0091]



[0092] 单独或它们之间组合,最终与辅料如醋酸并以选自上述范围内的浓度组合,有助于核黄素在比标准核黄素-葡聚糖溶液所需的时间间隔更短的时间间隔内以足够用于后续的治疗量渗透通过角膜上皮。

[0093] 所有提到的化合物和核黄素的组合表明从通过角膜组织的产品的浓度以及渗透迅速性的观点来看导致产生更好的结果的没有料到的协同效应。

[0094] 申请人通过根据标准步骤使用第四新型测试组合物和  $3\text{mW}/\text{cm}^2$  的紫外线照射在体外测试在人角膜上跨上皮交联治疗的有效性。测试角膜已如前面的实验中那样进行制备,通过将它们固定至合适的支承物并通过在各自的角膜的上皮表面上(从而以跨上皮方式)使用  $0.1\%$  核黄素-葡聚糖的标准溶液和第四新型测试组合物 30 分钟。接着,标准的紫外线照射进行 30 分钟,细分为 5 分钟的多个步骤,之前在角膜的表面再次施用每种溶液。在实验结束时,角膜的刚性程度已经如下进行评估:每个角膜已经保持为用角膜钳将长度 2mm 末端部分与水平线保持成一直线,以及测量由角膜的相对末端相对水平线形成的角。

[0095] 图 3a 显示使用  $0.1\%$  核黄素-葡聚糖标准溶液进行跨上皮交联治疗后的角膜,其向下弯曲约  $40^\circ$ ;图 3b 显示使用第四新型测试组合物而不预防性去除角膜上皮进行跨上皮交联治疗后的另一角膜。通过比较两张图片,显然使用第四新型测试组合物进行跨上皮交联治疗增强了角膜,如期望的,其向下弯曲仅  $25^\circ$ 。

[0096] 作为使用第四新型测试组合物进行跨上皮交联治疗的有效性的进一步证据,这种治疗已在体外在属于受圆锥角膜影响并经受角膜促成穿孔的病人的人角膜的末端部分上进行;在这些情况下从病人移植而不是毁坏的角膜已经使用在实验室中,注意避免与透热疗法相关的手术时间,这样允许角膜层(全厚度移植)的平面的保存。角膜肢体固定在一个合适的支承物上。 $0.1\%$  核黄素-葡聚糖的标准溶液使用在第一角膜上,第四新型测试溶液使用在第二角膜上,溶液在角膜表面上使用 30 分钟而不去除上皮。接着,标准的  $340\text{nm}$  紫外线治疗仅在用第四新型测试溶液治疗的角膜上以  $3\text{mW}/\text{cm}^2$  功率进行 30 分钟,分为 5 分钟一次,之前在角膜的表面上再次施用组合物。圆锥角膜的另一末端部分,固定在一个合适的支承物上,仅通过在角膜上沉积  $0.1\%$  核黄素-葡聚糖的标准溶液而不接着用紫外线照射进行治疗。在实验结束时,角膜实质检查采用扫描电子显微镜进行。

[0097] 图 4 显示来自未治疗的圆锥角膜影响的病人的角膜的一部分的薄层如何显示

在扫描显微镜中。图 5 是图 4 的一部分的放大视图。这两张图片显示在其上使用 0.1% 核黄素 - 葡聚糖的标准溶液而没有照射紫外线的角膜的末端部分中角膜层的弱化。

[0098] 图 6 是显示使用第四新型测试溶液进行跨上皮交联治疗后受圆锥角膜影响的角膜部分的薄层如何显示的扫描显微镜图像。圆锥角膜末端部分,以跨上皮方式施用第四新型测试溶液治疗并根据标准步骤用紫外线照射 30 分钟,呈现高度密集分布和紧凑的角膜层,证明已经形成新型生化交联。

[0099] 用第一、第二和第三新型测试组合物也已经获得好的结果。

[0100] 使用新型测试组合物获得的结果也克服了某些作者提出的关于因为上皮将屏蔽紫外线,当以跨上皮方式进行时交联治疗的效果的有待证实的减少的反驳。跨上皮交联治疗的有效性的减少的假说是错误的,如当至少一种这里建议的物质作为载体(渗透增强剂)加入核黄素和根据标准步骤进行照射时,由获得的组织样本证明的。

[0101] 此外,以跨上皮方式进行的交联治疗在形态完整性上或不是角膜的上皮层的和上皮细胞表面上存在的微绒毛的效果的比较研究已经使用扫描电子显微镜(7500x)进行。这已经完成用于评估在角膜上皮上以跨上皮方式使用第四新型测试组合物相对于 0.1% 核黄素 - 葡聚糖的标准溶液和如 [16] 提议的标准组合物 -0.01% 苯扎氯铵进行的交联治疗的耐受性。

[0102] 此测试已经进行,因为上皮细胞是由紫外线流照射的第一有机结构,并能经受由于吸收这些照射导致的伤害。可得的出版物似乎都没有考虑这方面,也没有相关数据在文献中可得。

[0103] 认为最可靠用于评估上皮细胞的活力的参数是使用印模技术的细胞学检查,特别是角膜的表面上皮细胞层的微绒毛的电子显微镜检查。整体表面细胞元件的膜(微绒毛)的外弯曲的存在,含有高浓度的粘蛋白跨膜和良好的多糖 - 蛋白质复合物,允许以最佳的方式连接构成前角膜泪膜的自由粘蛋白。相比之下,微绒毛的病理缺失决定了泪水层难以粘附眼表面和由前角膜泪膜自身功能障碍引起的上皮疼痛的现象,以及作为后果,炎症。

[0104] 在体外用紫外线按标准剂量跨上皮治疗后,微绒毛形态已经用扫描电子显微镜进行评估。厚度在 500 和 600 微米之间的人角膜分别用平衡盐溶液(balanced salt solution, BSS)、用 0.1% 核黄素 - 葡聚糖标准溶液,用标准溶液 +0.01% 苯扎氯铵以及用第四新型测试组合物孵育 30 分钟。

[0105] 初步地,没有经受任何治疗的角膜的角膜上皮的表层和微绒毛的形态也已经进行研究用于当没有经受任何光化学治疗时突出上皮细胞和微绒毛应该如何呈现。

[0106] 图 7 是显示正常角膜中上皮的微绒毛和表层的形态的扫描显微镜图像,图 8 是显示使用 0.1% 核黄素 - 葡聚糖的标准溶液后根据标准步骤使用紫外线治疗的角膜的扫描显微镜图像。通过与图 7 进行比较,所有上皮层都缺失,鲍曼膜暴露,这是明显的。

[0107] 类似的情况还发生在用由标准溶液 + [16] 中建议的 0.01% 苯扎氯铵构成的组合物治疗的那些角膜中。

[0108] 图 9 是显示使用第四新型测试组合物治疗后以标准剂量使用紫外线治疗的角膜的扫描显微镜图像。通过与图 7 和 8 进行比较,注意到上皮层、细胞核和间隙连接的保存,是可能的。此外,还有微绒毛的密度的显著减少,虽然剩余的微绒毛是形态完整的,深层细胞质细胞膜没有受到危害。使用第一、第二和第三新型测试组合物已取得了类似的结果。

[0109] 图 10 是显示因比较缘故而仅使用生理溶液后以标准剂量使用紫外线治疗的角膜的扫描显微镜图像。上皮层被破坏,无数的细胞已经失去了细胞核,几乎所有的间隙连接和微绒毛都缺失。

[0110] 得到的结果可归纳如下:

[0111] 1) 根据标准程序用 0.1%核黄素-葡聚糖的标准溶液或含有标准溶液+0.01%苯扎氯铵的组合物预先孵育,用紫外线治疗的角膜经受所有上皮层整体缺失,以及作为结果鲍曼膜暴露出(图 8)。在实践中,只使用标准溶液,最终添加苯扎氯铵,上皮通过紫外线辐射进行破坏。这诱使认为没有去除上皮并使用标准溶液或组合物核黄素-葡聚糖+苯扎氯铵进行交联治疗将无法避免患者治疗后上皮手术切除造成的烦人的症状。

[0112] 2) 用包括核黄素-葡聚糖和选自上述载体的至少一种载体的组合物孵育后,特别是使用第四新型测试组合物孵育后,使用标准剂量的紫外线治疗的角膜保持它们的上皮层、细胞核和间隙连接。注意到微绒毛的密度的显著减少,虽然剩余的微绒毛是形态完整的。角膜的深层细胞质细胞膜显示是完整的。

[0113] 3) 用平衡盐溶液(BSS)孵育后用标准剂量的紫外线治疗的角膜表明上皮层的破坏,无数细胞的细胞核和几乎所有的间隙连接和微绒毛缺失。

[0114] 使用第一,第二和第三新型测试组合物治疗的角膜也已拍摄了许多扫描显微镜图像,但它们没有在这里报道,因为它们看起来与使用第四新型测试组合物获得的基本相同。

[0115] 这些结果促使推断至少维生素 E、维生素 Q 或辅酶 Q、测试的氨基酸如 L-脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐和 L-亮氨酸有利于保护角膜上皮,并有助于核黄素通过角膜上皮的渗透。在这里提出的新型溶液中,第四组合物在渗透时间和角膜上皮保存上显示最好的性能。

[0116] 为什么提议的物质允许获得这些突出的结果以及为什么在第四测试组合物中使用的物质显示出协同效应的解释仍然不是完全清楚。没有限制本发明至一个理论,申请人提出对角膜上皮的减少的损害,在用第四新型测试组合物治疗后已经检测到,可能是由于维生素 E 例如维生素 E-TPGS 的细胞修复作用,和/或在溶液中至少一种必需或条件必需氨基酸的存在。可能维生素 E 将作用在谷胱甘肽氧化酶和过氧化歧化酶上,它们是涉及上皮的修复作用的酶,必需或条件必需氨基酸将有细胞修复作用,将可能还有助于交联效果。此外,用第四新型溶液对组织的更多的浸泡可能决定不仅交联效果的增加,而且角膜上皮层的更好的保存,抵抗紫外线的危害影响。

[0117] 使用核黄素-葡聚糖和在这里建议的载体中选择的至少一个载体(渗透增强剂)的新型溶液,可能进行交联治疗,例如用于治疗圆锥角膜而没有预防性去除角膜上皮。角膜上皮没有去除的事实避免:

[0118] 1) 在根据标准步骤交联治疗后通常在最初几天发生的由于照射导致的不适;

[0119] 2) 治疗后需要使用治疗性隐形眼镜,尤其

[0120] 3) 由于角膜上皮去除导致的手术后角膜感染的风险。

[0121] 此外,避免了在角膜上进行手术动作,因此,在门诊进行治疗而无需手术室和手术显微镜,是可能的。

[0122] 在暴露于太阳光线前,尤其是在夏季,新型溶液还可以以眼药水或凝胶或在治疗性隐形眼镜上使用的形式进行施用,这样以增强由于用太阳光线照射核黄素导致的自然交

联的效果。

[0123] 新型溶液可以进一步保护眼球的内部结构抵抗紫外线,从而使用例如用于保护抵抗黄斑和 / 或用于防止处于暴露于太阳光线许多时间的风险的人中的白内障。

[0124] 只有为了尽可能长地保持新型溶液在非单剂量容器内,有可能添加苯扎氯铵,浓度在 0.0001% 至 0.02% 之间,优选等于约 0.01% 的浓度。如果新型溶液应该生产并在单剂量一次性容器中销售,添加苯扎氯铵是可有可无的。组合物可以进一步添加防腐剂、抗菌剂、抗真菌剂、辅料(仅仅例如醋酸)和一般使用在眼科领域用于制造稳定的和无菌的眼用溶液和 / 或用于有助于它们吸收的任何物质。

[0125] 如前所述,申请人认为通过在核黄素中加入选自维生素 Q、L-脯氨酸、甘氨酸、赖氨酸盐酸盐和 L-亮氨酸的至少一种物质的良好的性能部分是由于这样的事实,即最后的物质是必需或条件必需氨基酸,将通过金属蛋白酶 MMP9 的增加而具有细胞修复功能。这促使推断可能会获得与用通过将适于增加金属蛋白酶 MMP9 的至少一种物质加入到核黄素溶液例如可能处于 0.00001% 和 0.5% 之间的浓度的标准核黄素-葡聚糖溶液获得的第一、第二、第三和第四新型测试组合物得到的结果类似的结果。

[0126] 在上述适于增加金属蛋白酶 MMP9 的物质中,值得一提染料木素 (genistein) (5,7-二羟基-3-(4-羟苯基)-苯并吡喃-4-酮 (5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one)、植物雌激素 (phytoestrogens)、细胞因子 (cytokines) 和所谓的非类固醇消炎药 (NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drugs)。在适于使用用于制备核黄素眼用溶液的 NSAID 中,值得一提:

[0127] 乙酰水杨酸 (acetylsalicylic acid) (2-乙酰氧基苯甲酸 (2-acetoxybenzoic acid), 氟灭酸 (flufenamic acid) (2-[[3-(三氟甲基)苯基]氨基]苯甲酸 (2-[[3-(Trifluoromethyl)phenyl]amino]benzoic acid)), 甲氯灭酸 (meclofenamic acid) (2-[(2,6-二氯-3-甲基苯基)氨基]苯甲酸 (2-[(2,6-dichloro-3-methylphenyl)amino]benzoic acid)), 甲灭酸 (mefenamic acid) (2-(2,3-二甲苯基)氨基苯甲酸 (2-(2,3-dimethylphenyl)aminobenzoic acid)), 尼氟灭酸 (niflumic acid) (2-[[3-(三氟甲基)苯基]氨基]烟酸 (2-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]nicotinic acid)), 托灭酸 (tolfenamic acid) (2-[(3-氯-2-甲基苯基)氨基]苯甲酸 (2-[(3-chloro-2-methylphenyl)amino]benzoic acid)), 贝诺酯 (benorilate) ((4-乙酰氨基)苯基 2-(乙酰氧基)苯甲酸 (4-(acetamino)phenyl 2-(acetyloxy)benzoate)), 卡洛芬 (carprofen) ((RS)-2-(6-氯-9H-咪唑-2-基)丙酸 ((RS)-2-(6-chloro-9H-carbazol-2-yl)propanoic acid)), 塞内昔布 (celecoxib) (4-[5-(4-甲基)-3-(三氟甲基)吡唑-1-基]苯磺酰胺 (4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide)), 辛诺昔康 (cinnoxicam) (吡罗昔康肉桂酸酯 (Piroxicamcinnamate) 或 [9-甲基-10,10-二氧-8-(吡啶-2-基氨基甲酰基)-10<sup>1</sup>]-硫-9-氮杂双环 [4,4,0] 十-1,3,5,7-四烯-7-基] (E)-3-苯丙基-2-烯酸乙酯 ([9-methyl-10,10-dioxo-8-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-10<sup>1</sup>]-thia-9-azabicyclo[4,4,0]deca-1,3,5,7-tetraen-7-yl] (E)-3-phenylprop-2-enoate); 吡罗昔康肉桂酸酯 (Piroxicamcinnamate), 二氟尼柳 (diflunisal) (2',4'-二氟-4-羟基联苯基-3-羧酸 (2',4'-difluoro-4-hydroxybiphenyl-3-carboxylic acid)), 双氯芬酸

(diclofenac) (2-[2-[(2,6-二氯苯基)氨基]苯基]乙酸 (2-[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetic acid)), 屈昔康 (droxicam) (2H,5H-1,3-恶唑并(5,6-c)(1,2)苯并噻嗪-2,4(3H)-二酮,5-甲基-3-(2-吡啶基)-,6,6-二氧化物 (2H,5H-1,3-Oxazino(5,6-c)(1,2)benzothiazine-2,4(3H)-dione,5-methyl-3-(2-pyridinyl)-,6,6-dioxide)), 依托度酸 (etodolac) ((RS)-2-(1,8-二乙基-4,9-二氢-3H-吡喃[3,4-b]吲哚-1-基)乙酸 ((RS)-2-(1,8-Diethyl-4,9-dihydro-3H-pyrano[3,4-b]indol-1-yl)acetic acid)), 依他昔布 (etoricoxib) (5-氯-6'-甲基-3-[4-(甲磺酰基)苯基]-2,3'-联吡啶 (5-chloro-6'-methyl-3-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-2,3'-bipyridine)), 苯氧布洛芬 (fenopropfen) (2-(3-苯氧基苯基)丙酸 (2-(3-phenoxyphenyl)propanoic acid)), 氟苯布洛芬 (flurbiprofen) ((RS)-2-(2-氟联苯基-4-基)丙酸 ((RS)-2-(2-fluorobiphenyl-4-yl)propanoic acid)), 异丁芬酸 (ibufenac) (4-异丁基苯乙酸 (4-isobutylphenylacetic acid)), 布洛芬 (ibuprofen) ((RS)-2-(4-(2-甲基丙基)苯基)丙酸 ((RS)-2-(4-(2-methylpropyl)phenyl)propanoic acid)), 吲哚美辛 (indomethacin) (2-{1-[(4-氯苯基)羰基]-5-甲氧基-2-甲基-1H-吲哚-3-基}乙酸 (2-{1-[(4-chlorophenyl)carbonyl]-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl}acetic acid)), 酮洛芬 (ketoprofen) ((RS)-2-(3-苯甲酰基苯基)丙酸 ((RS)-2-(3-benzoylphenyl)propanoic acid)), 酮咯酸 (ketorolac) ((±)-5-苯甲酰基-2,3-二氢-1H-吡咯并吡咯烷-1-羧酸,2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇 ((±)-5-benzoyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine-1-carboxylic acid,2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)), 氯诺昔康 (lornoxican) ((3E)-6-氯-3-[羟基(吡啶-2-基氨基)亚甲基]-2-甲基-2,3-二氢-4H-噻吩并[2,3-e][1,2]噻嗪-4-酮 1,1-二氧化物 ((3E)-6-chloro-3-[hydroxy(pyridin-2-ylamino)methylene]-2-methyl-2,3-dihydro-4H-thieno[2,3-e][1,2]thiazin-4-one,1,1-dioxide)), 罗美昔布 (lumiracoxib) ({2-[(2-氯-6-氟苯基)氨基]-5-甲基}乙酸 ({2-[(2-chloro-6-fluorophenyl)amino]-5-methylphenyl}acetic acid)), 美洛昔康 (meloxicam) (4-羟基-2-甲基-N-(5-甲基-2-噻唑基)-2H-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物 (4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-2-thiazolyl)-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide)), 安乃近 (metamizole) ([2,3-二氢-1,5-二甲基-3-氧代-2-苯基-1H-吡唑-4-基)甲氨基]甲磺酸钠 (Sodium[(2,3-dihydro-1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylamino]methanesulfonate)), 萘普生 (naproxen) ((+)-(S)-2-(6-甲氧基萘基-2-基)丙酸 ((+)-(S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid)), 尼美舒利 (nimesulide) (N-(4-硝基-2-苯氧基苯基)甲磺酰胺 (N-(4-Nitro-2-phenoxyphenyl)methanesulfonamide)), 奥沙普秦 (oxaprozin) (3-(4,5-二苯基-1,3-恶唑-2-基)丙酸 (3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanoic acid)), 帕瑞昔布 (parecoxib) (N-{[4-(5-甲基-3-苯基异恶唑-4-基)苯基]磺酰基}丙酰胺 (N-{[4-(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)phenyl]sulfonyl}propanamide)), 吡罗昔康 (piroxicam) ((8E)-8-羟基(吡啶-2-基氨基)亚甲基]-9-甲基 10,10-二氧-10λ6-硫-9-氮杂双环[4,4,0]十-1,3,5-三烯-7-酮 ((8E)-8-[hydroxy-(pyridin-2-ylamino)methylidene]-9-methyl-10,10-dioxo-10λ6-t

hia-9-azabicyclo[4,4,0]deca-1,3,5-trien-7-one)), 罗非昔布 (rofecoxib) (4-(4-甲磺酰苯基)-3-苯基-5H-咪喃-2-酮 (4-(4-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-5H-furan-2-one)), 舒林酸 (sulindac) ({(1Z)-5-氟-2-甲基-1-[4-(甲基亚磺酰基)苯亚甲基]-1H-茛-3-基}乙酸 ({(1Z)-5-fluoro-2-methyl-1-[4-(methylsulfinyl)benzylidene]-1H-indene-3-yl}acetic acid)), 舒多昔康 (Sudoxicam) (4-羟基-2-甲基-N(2)-噻唑基-2H-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺 1,1-二氧化物 ((4-hydroxy-2-methyl-N(2)-thiazolyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide 1,1-dioxide)), 替诺昔康 (tenoxicam) ((3E)-3-[羟基(吡啶-2-基氨基)亚甲基]-2-甲基-1,3-二氢-4H-噻吩并[2,3-e][1,2]-噻嗪-4-酮-1,1-二氧化物 ((3E)-3-[hydroxy(pyridin-2-ylamino)methylene]-2-methyl-2,3-dihydro-4H-thieno[2,3-e][1,2]thiazin-4-one 1,1-dioxide)), 伐地考昔 (valdecoxib) (4-(5-甲基-3-苯异噁唑-4-基)苯磺酰胺 (4-(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)benzenesulfonamide)))

[0128] 此外, 申请人认为通过将至少一种必需或条件必需氨基酸加入到核黄素溶液例如标准核黄素-葡聚糖溶液可能获得与第一、第二、第三和第四新型测试组合物的结果类似的结果。

[0129] 在可能有用的物质中, 最有前途的物质看起来是 L-精氨酸。它可以与核黄素溶液例如标准核黄素-葡聚糖溶液混合, 并最终还有一个或更多个上面提到的物质用于获得新型溶液。即使并非所有这些物质经过测试, 对于申请人来说认为所有必需或条件必需氨基酸可有效地使用用于促进核黄素通过角膜上皮的渗透, 用这种方式保护角膜抵抗紫外线和抵抗核黄素吸收的太阳光线, 看起来是合理的。尤其, 认为 L-精氨酸是像上述提议的物质那样为一种有效载体, 看起来是合理的, 因为推测 L-精氨酸, 氮氧化物的氨基酸前体, 可在外周水平输送一氧化氮 (NO), 看起来是合理的。通过在角膜上皮上局部施用 NO 溶解其中的物质, 使用氮氧化物 (NO) 用于治疗圆锥角膜影响的病人, 因 NO 的低溶解度而受到阻碍。

[0130] 仍然有待实验测试多少 L-精氨酸和其它必需氨基酸保护上皮的微绒毛抵抗在交联治疗中使用的紫外线。如果其它必需或条件必需氨基酸, 尤其是 L-精氨酸将被证明是有用的, 如期望的, 用于实现眼用溶液, 允许跨上皮交联治疗, 同时保留角膜上皮, 如申请人认为合理的, 它们将被加入到核黄素溶液例如标准的核黄素-葡聚糖溶液, 浓度在 0.00001% 和 0.5% 之间。

[0131] 根据更优选的具体实施例, L-精氨酸或另一必需或条件必需氨基酸的浓度在 0.001% 和 0.4% 之间。根据更优选的具体实施例, 浓度在 0.005% 和 0.3% 之间。根据更优选的具体实施例, 浓度在 0.01% 和 0.2% 之间。根据更优选的具体实施例, L-精氨酸或另一必需或条件必需氨基酸的浓度约 0.1%。

[0132] 作为一个选项, 添加 L-精氨酸和/或任何其它必需或条件必需氨基酸至建议的新型溶液的任何一种是不可能的。

[0133] 新型眼用溶液的剂量取决于诊断的病理学和其严重性。指示性地, 认为剂量可以在每天一滴滴眼液至最高每小时一滴滴眼液之间。

[0134] 递交的权利要求是该说明书的主要部分, 在这里通过参考纳入。相同申请人名称的优先权意大利专利申请 VA2009A000052 和 VA2010A000044 的全部公开内容在这里通过参考纳入。

## [0135] 参考文献

[0136] 1 Seiler T., Spoerl E., Huhle M., Kamouna A. Conservative therapy of keratoconus by enhancement of collagen cross-links. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 1996 ;37 :S1017.

[0137] 2 Seiler T., Quurke AW. Iatrogenic keratectasia after LASIK in a case of forme fruste keratoconus. J Cat Refract Surg. 1998 ;24 :1007-1009.

[0138] 3 Spoerl E., Huhle M., Seiler T. " Induction of cross-links in corneal tissue" , Exp Eye Res. 1998 ;66 :97-103.

[0139] 4 Mazzotta C., Traversi C., Baiocchi S., Sergio P., Caporossi T., Caporossi A. " Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-uv-a-induced cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation " Eur J Ophthalmol. 2006 ;16 :530-5.

[0140] 5 Caporossi A., Baiocchi S., Mazzotta C, Traversi C, Caporossi T. " Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study" J Cataract Refract Surg. 2006 ;32 :837-45.

[0141] 6 Spoerl E., Seiler T. " Techniques for stiffening the cornea" J Refract Surg. 1999 ;15 :711-713.

[0142] 7 Hagele G., Boxer Wachler BS. " Corneal Collagen Crosslinking with Riboflavin(C3-R) for corneal stabilization " Presented at the International Congress of Corneal Cross Linking(CCL). December 9-10, 2005. Zurich, Switzerland.

[0143] 8 Pinelli, R. " C3-Riboflavin for the treatment of keratoconus " J Cataract&Refractive Surgery Today Europe. 2006 ;1 :49-50.

[0144] 9 Pinelli R. " Eyeword" , 2007 ;5 :34-40.

[0145] 10 Linda J. Müller, Elisabeth Pels, Gijs F. J. M. Vrensen : " The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature" . Br J Ophthalmol 2001 ;85 :437-443 (April).

[0146] 11 Mau T. Tran<sup>1</sup>, Robert N. Lausch<sup>2</sup> and John E. Oakes : " Substance P Differentially Stimulates IL-8 Synthesis in Human Corneal Epithelial Cells" Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2000 ;41 :3871-3877.

[0147] 12 L. J. Muller, L. Pels and GF. Vrensen : " Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes " Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol 36, 2557-2567.

[0148] 13 G. Perrella, P. Brusini, R. Spelat, P. Hossain, A. Hopkinson, H. S. Dua : " Expression of haematopoietic stem cell markers, CD 133 and CD34 on human corneal keratocytes" British Journal of Ophthalmology 2007 ;91 :94-99.

[0149] 14 Tadashi Senoo, and Nancy C. Joyce : " Cell Cycle Kinetics in Corneal Endothelium from Old and Young Donors" Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2000 ;41 :660-667.

[0150] 15 L. J. Muller, L. Pels and GF. Vrensen : " Ultrastructural organization of human corneal nerves" Investigative Ophthalmology&Visual Science, Vol 37, 476-488.

[0151] 16 Italian patent application No. MI2007A002162, 14 Nov. 2007, R. Pinelli, " Collirio per il trattamento del cheratocono con tecnica cross-linking trans-epiteliale" .

[0152] 17 R. Pinelli, A. J. Kannelopoulos, B. S. B. Wachler, E. Spoerl, A. Ertan, S. L. Trokel, " C3-Riboflavin treatments :Where did we come from ? Where are we now ? " , Cataract&Refractive Surgery Today Europe, Summer 2007.

[0153] 18 Ashim K. Mitra, " Ophthalmic Drug Delivery Systems" , Second Edition : Revised And Expanded, Marcell Dekker Inc. , NY, 2003.

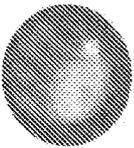
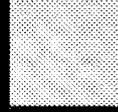
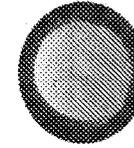
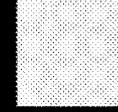
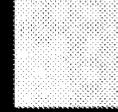
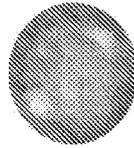
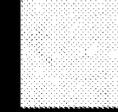
分数	标准视觉量表	稀释0.1% 单位/ $\mu\text{l}$	荧光法量表 单位/ $\mu\text{l}$	颜色量表 黄色百分比
10		50/0		100% 
8		40/10		96% 
6		30/20		92% 
4		20/30		87% 
2		10/40		73% 
0		0/50		20% 

图 1

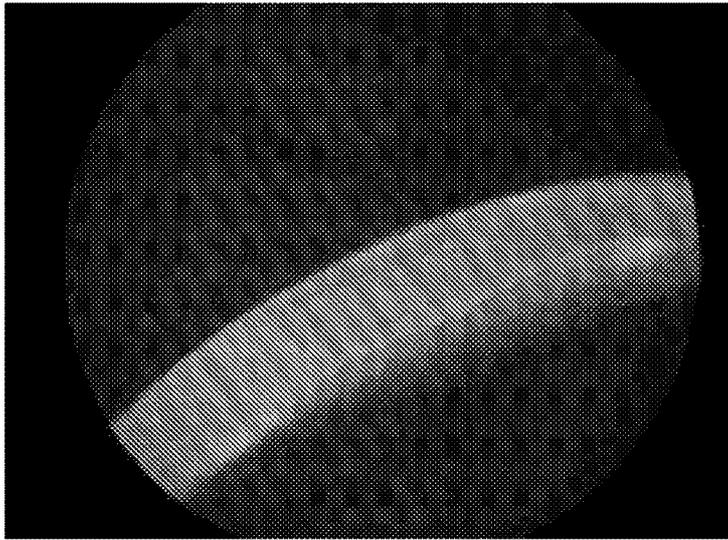


图 2a

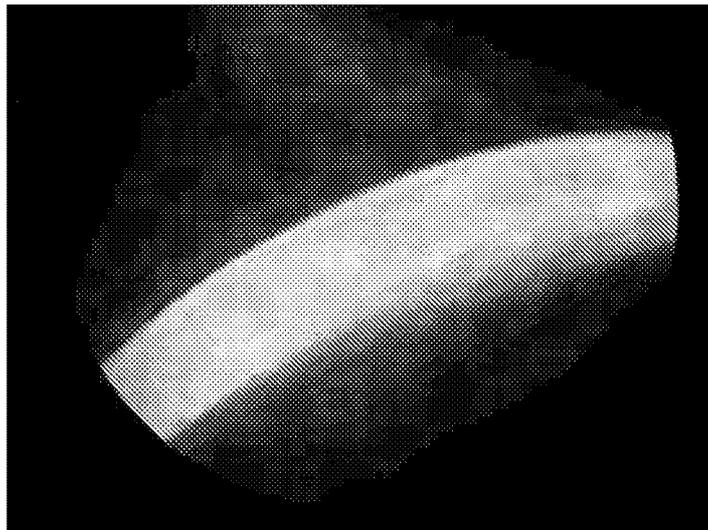


图 2b

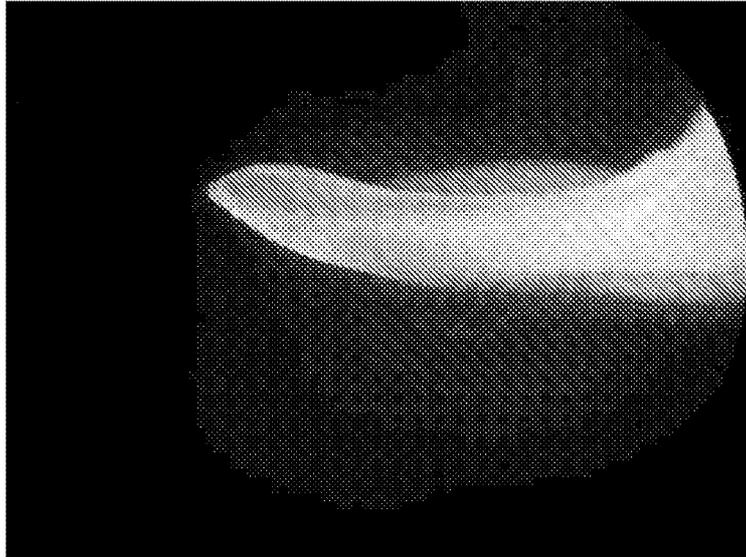


图 2c

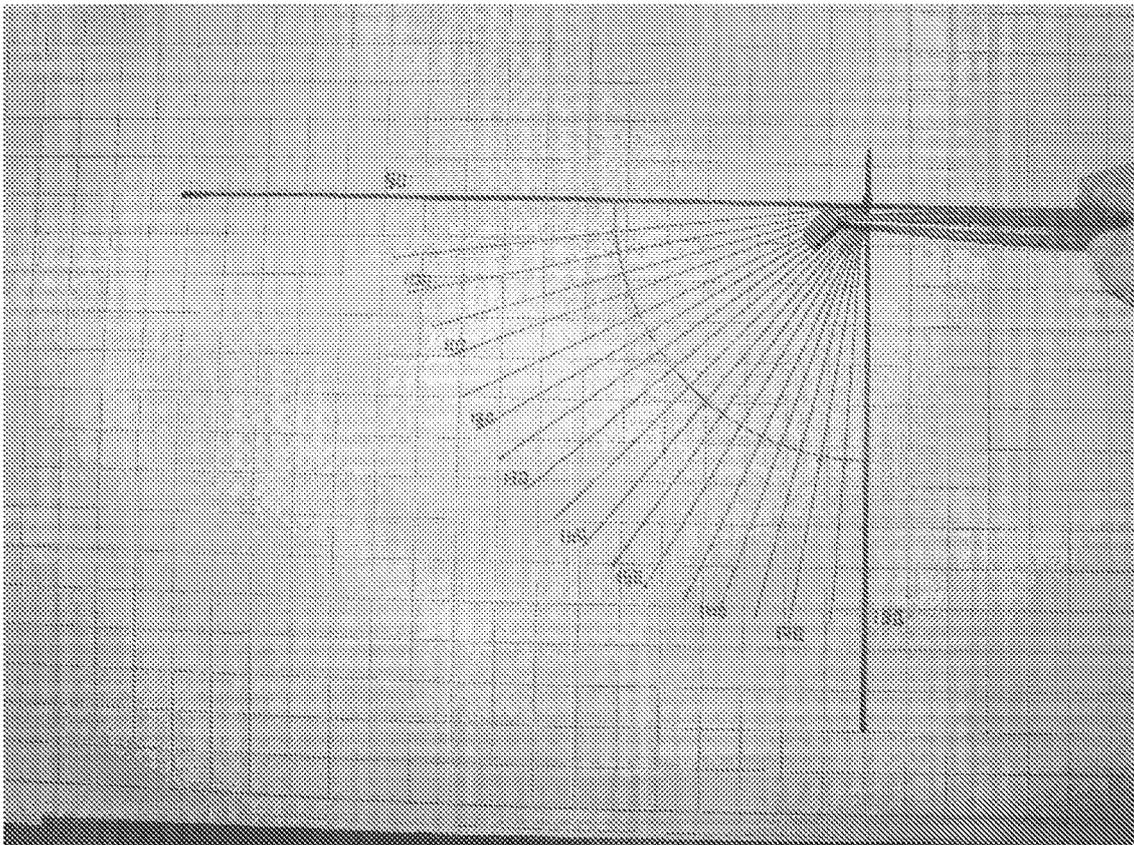


图 3a

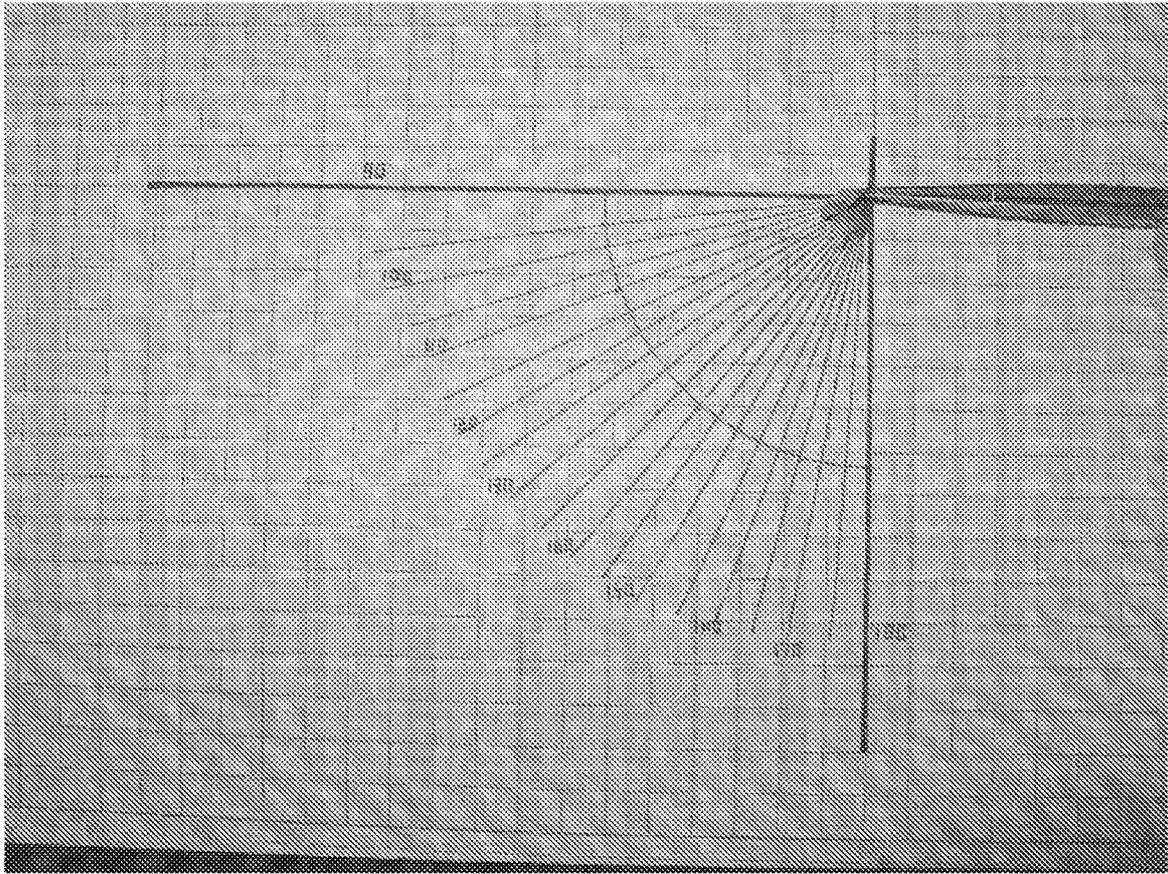


图 3b

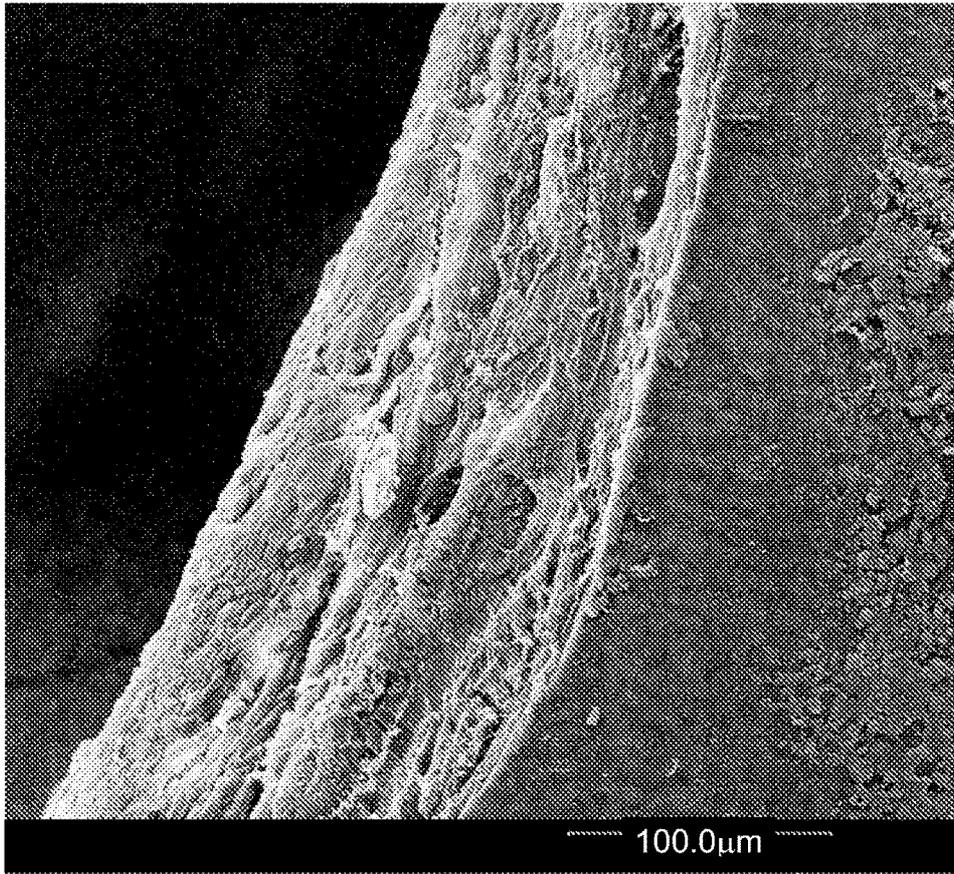


图 4

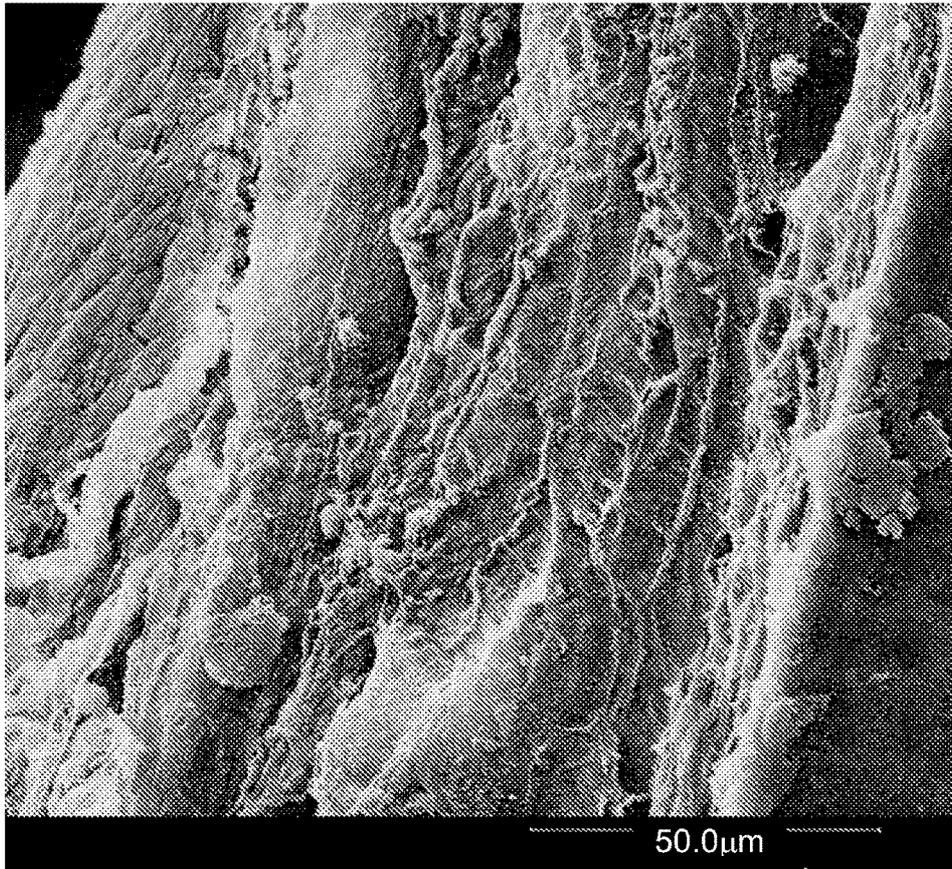


图 5

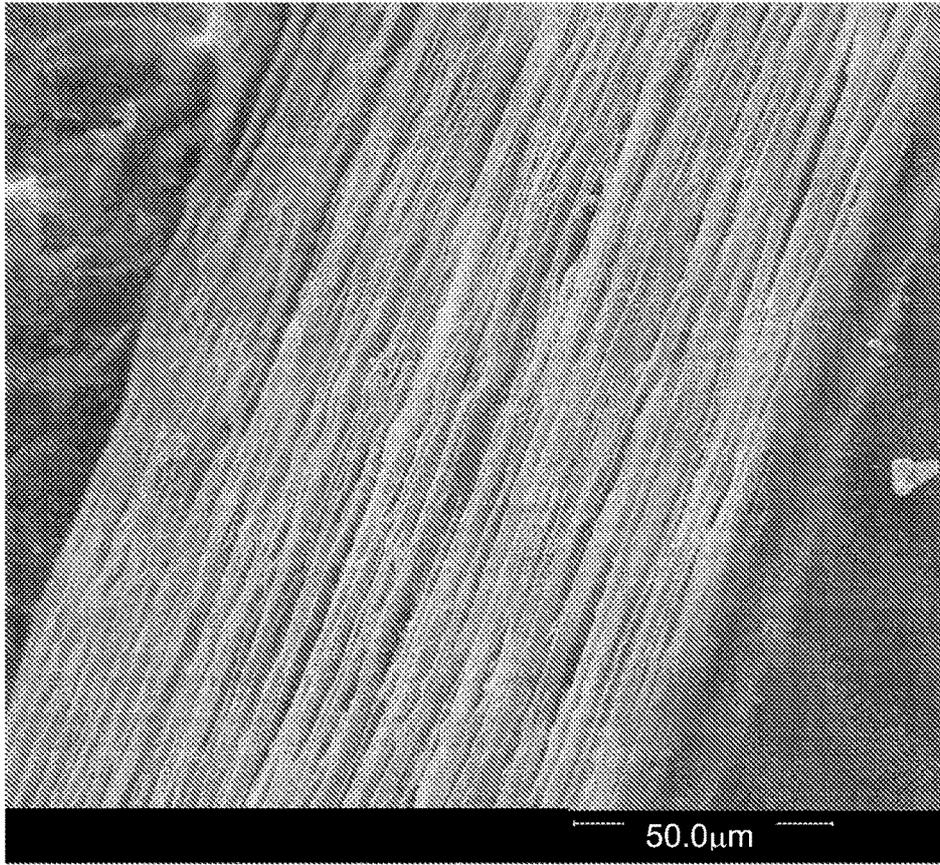


图 6

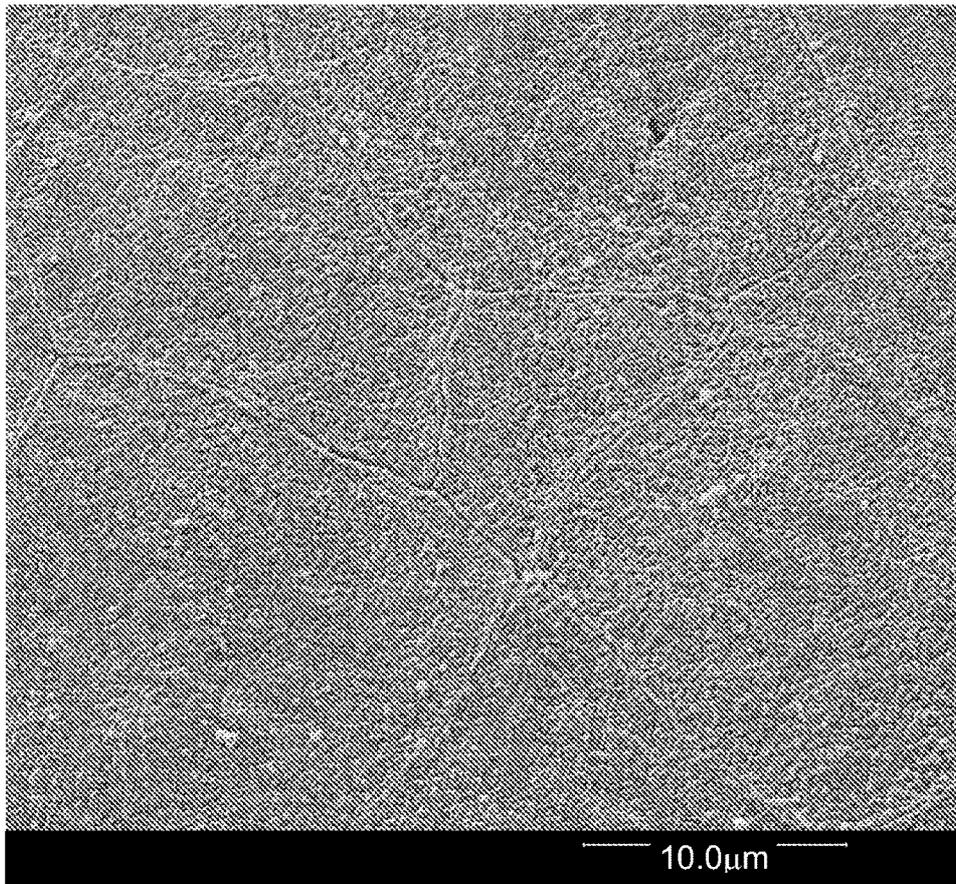


图 7

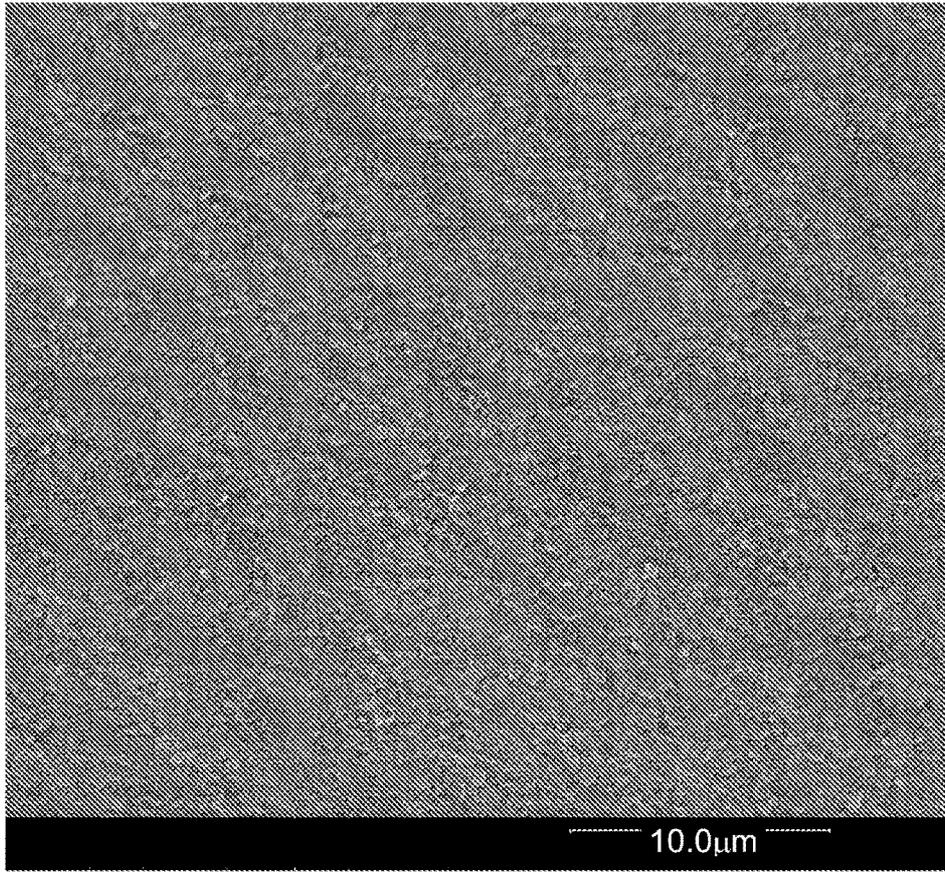


图 8

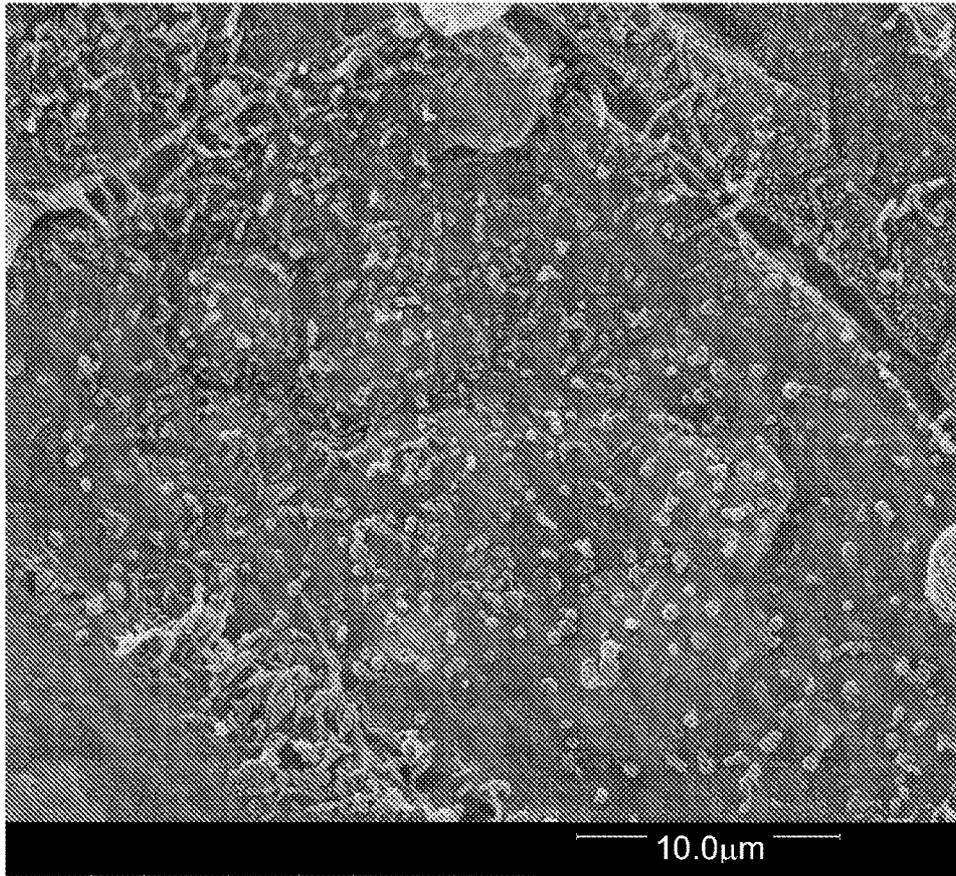


图 9

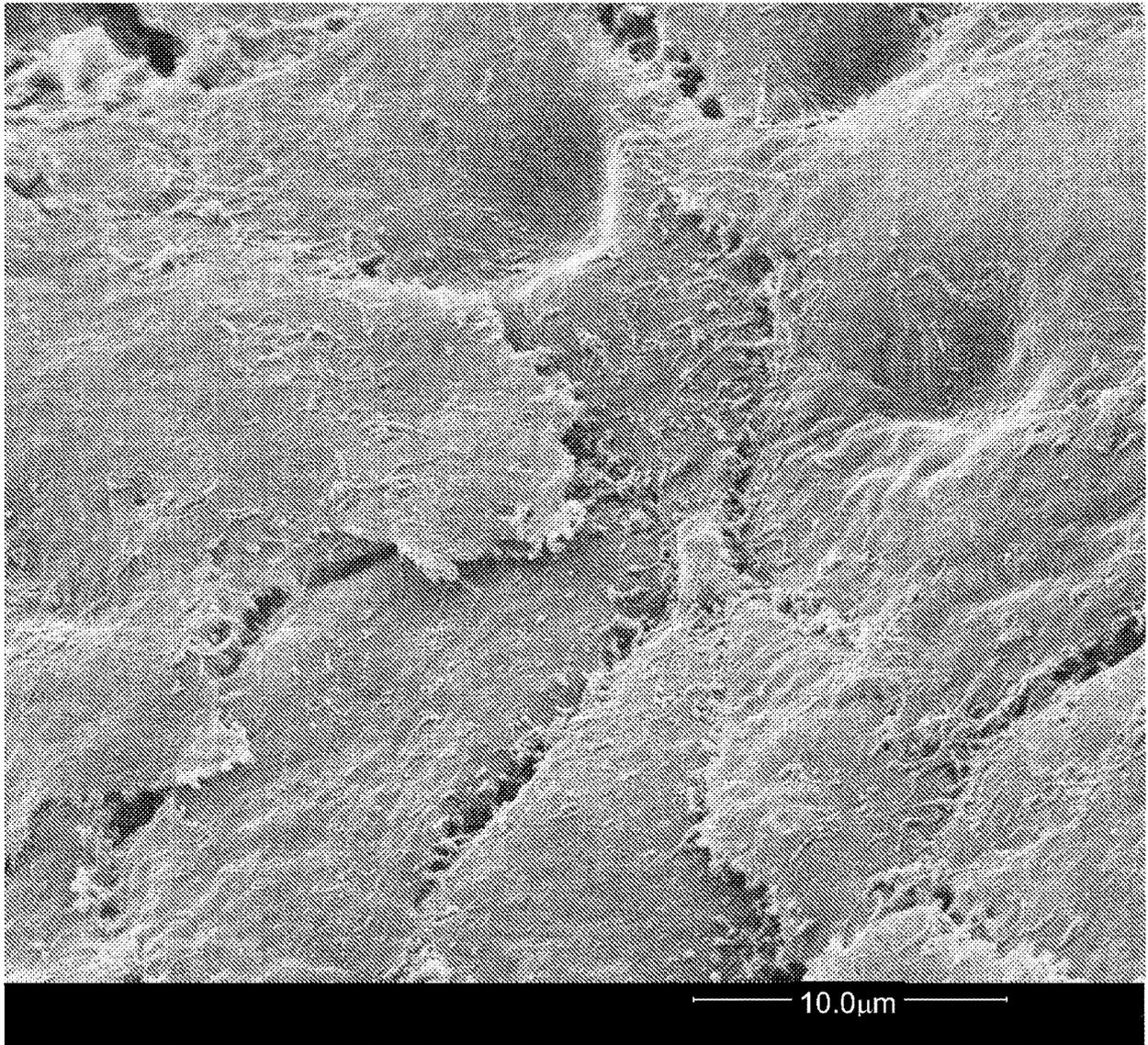


图 10