



(10) 授权公告号 CN 105055446 B

(45) 授权公告日 2022.06.03

(21) 申请号 201510276285.6

(22) 申请日 2007.01.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105055446 A

(43) 申请公布日 2015.11.18

(30) 优先权数据
60/763,253 2006.01.30 US
PCT/US2006/032385 2006.08.18 US

(62) 分案原申请数据
200780003983.2 2007.01.26

(73) 专利权人 宝龄富锦生技股份有限公司
地址 中国台湾台北市南港区园区街3号16
楼

(72) 发明人 陈桂恒 汤竣钧 姜寿山

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

专利代理师 王旭

(51) Int.Cl.
A61K 31/295 (2006.01)
A61K 33/26 (2006.01)
A61P 3/12 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2006/0020026 A1, 2006.01.26
US 6887897 B2, 2005.05.03

审查员 段洁

权利要求书1页 说明书13页 附图9页

(54) 发明名称

逆转、防止、延迟或稳定软组织钙化的方法

(57) 摘要

本发明提供治疗受试者中软组织钙化的方法,该方法包括给所述受试者施用有效量的铁有机化合物如柠檬酸铁的步骤。本申请的方法可以防止、逆转、延迟或稳定患有慢性肾病的受试者中的软组织钙化。受影响的软组织钙化包括在关节、皮肤、眼睛中,在心血管系统如心脏瓣膜、心肌、冠状动脉和小动脉中,或在内脏器官如肾和肺中的软组织钙化。

1. 一种铁有机化合物在制备用于逆转慢性肾病受试者中的软组织钙化的药物的应用, 其中所述铁有机化合物是依据包括下列步骤方法制备的并且是以适于口服施用的形式存在:

- a) 在适于产生包括多晶型氧化物的条件下, 向铁离子盐中加入碱金属氢氧化物;
- b) 分离氢氧化铁沉淀物;
- c) 向所述沉淀物中加入有机酸, 并加热所述有机酸和所述沉淀物, 从而形成铁有机酸溶液; 和
- d) 通过有机溶剂从所述铁有机酸溶液沉淀铁有机化合物, 其中所述铁有机化合物的溶解速率是至少 $2\text{mg}/\text{cm}^2/\text{分钟}$;

其中所述药物是制订能每天提供2克的柠檬酸铁的份量; 且所述铁有机化合物是柠檬酸铁。

- 2. 权利要求1的应用, 所述药物是制订每天施用3次。
- 3. 权利要求1的应用, 所述药物是在饭后10分钟内施用。
- 4. 权利要求1至3的任何一项应用, 所述药物是制订为片剂、散剂、乳剂、胶囊、锭剂、颗粒剂、丸剂或液体。
- 5. 权利要求4的应用, 所述液体是混悬剂、酏剂或糖浆剂。
- 6. 权利要求1至3的任何一项应用, 所述慢性肾病是终末期肾病。

逆转、防止、延迟或稳定软组织钙化的方法

[0001] 本申请是于2008年7月30日提出的中国专利申请号200780003983.2的分案申请。

[0002] 本申请要求于2006年1月30日提交的美国临时申请号60/763,253和于2006年8月18日提交的PCT/US2006/032385的优先权。上述申请的全部内容和公开通过引用结合在本申请中。

[0003] 贯穿本申请,引用了多个参考文献或出版物。这些参考文献或出版物的公开内容通过引用完全结合在本申请中,以更充分地描述本发明所属领域的状况。

[0004] 发明背景

[0005] 据估计,在美国9个个体中有1个患有某些慢性肾病(CKD)的表现,从具有正常肾清除/功能的蛋白尿症到需要以透析或移植形式的肾替代治疗的晚期肾衰竭的范围,所述晚期肾衰竭通常称为终末期肾病(ESRD)。美国心脏学会最近公布了一份科学声明,详细描述了支持应该将患有慢性肾病的个体包含在患有心血管病的高危组中并且因此应该接受侵入性预防措施以减少心血管病的流行和严重性的有利证据。

[0006] 心血管病死亡率是通过透析治疗的患者中死亡的主要原因,尽管存在对性别、种族和糖尿病存在的层次化,其死亡率比一般群体高10到30倍。类似地,心血管病死亡率比在具有功能性肾移植的患者中比一般群体高2到5倍。这可能是由于:(1)在血液透析患者中动脉粥样硬化症、心脏衰竭和左心室衰竭的极高的流行,在40%到74%的经常透析的患者中观察到,和(2)在急性心肌梗塞或心脏衰竭后的高病例致死率。

[0007] 在透析患者中冠状动脉钙化非常普遍。取决于检查患者群体的年龄,在病例系列中54%到100%(平均83%)的透析患者具有某种程度的冠状动脉钙化,得分显著高于一般群体。冠状动脉钙化也存在于患有慢性肾病的青少年和年轻成人中。当在透析患者中存在冠状动脉钙化时,在几乎所有的研究中它快速发展,在肾移植后具有最小的或没有发展。

[0008] 在正常生理条件下,血清钙和磷被紧密地控制和平衡。然而,在肾病患者中退化的肾将不能充分响应调控系统,并且减少磷的排泄。随着肾状况的恶化和磷的积聚,甲状旁腺将持续增加甲状旁腺激素(PTH)的产生。高的PTH诱导钙从骨释放到血清中。结果,将发现大部分患有肾衰竭的患者具有升高的血清磷、钙和PTH。高磷酸盐血症,在血清中增加的钙和磷(CaxP)产物,甲状旁腺功能亢进和增加的钙摄入已经被认为是心血管发病率和死亡率的显著征兆,其潜在地在尿毒症中作为不需要的钙化的发展因素(Block和Port(2000), Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management (在透析患者中对与高磷酸盐血症和甲状旁腺功能亢进相关的危险的重新评估:关于护理变化的推荐). American Journal of Kidney Diseases (美国肾病杂志), 35:1226-1237; Ketteler等.(2005), Pathogenesis of vascular calcification in dialysis patients (透析患者中的脉管钙化的发病机理). Clin. Exp. (临床实验) 9:265-270)。

[0009] 磷通过直接参与CaxP的变化和间接参与甲状旁腺功能亢进的发病机理和发展而对脉管钙化施加负面作用。在正常条件下,血清钙和磷是亚稳的,这意味着,它们的浓度不足以产生自发的沉淀。然而,当钙化过程开始时,所述浓度足以支持晶体增生。

[0010] 据信,异常高的钙和磷浓度有助于机体内磷酸钙的随机被动沉淀。尽管完整的作用机制还处于研究中,但是最近的研究已经发现更复杂和积极的途径,即,矿物质代谢的失调(高磷酸盐血症和高钙血症)似乎进一步诱导脉管平滑肌细胞中的遗传变化,并且将所述细胞行为改变成有助于发展性钙化的成骨细胞样表型(Ketteler等.(2005),Pathogenesis of vascular calcification in dialysis patients.(透析患者中脉管钙化的发病机理).Clin.Exp.(临床实验)9:265-270)。

[0011] 异常软组织钙化的程度随着肾病程度增加而发展,并且可以在整个机体在器官如皮肤、关节、眼睛、心脏瓣膜、心肌、冠状动脉、小动脉、肺、肾等中发生。在它们中,眼部钙化是在血液透析患者中最经常观察到的并且高度流行的软组织钙化之一(Tilman Drueke和Isidro Salusky,The Spectrum of Renal Osteodystrophy(肾骨营养不良的型谱).Oxford University Press(牛津大学出版社).第345-357页)。异位钙化主要发生在结膜和角膜上由于睑间裂缝暴露的边缘区域上,并且出现为细小的白色沉淀,粗糙的粒状晶体,或扁平斑。如果不进行很好地处理,在眼部区域的钙化可以导致视力下降,刺激和可能加重到变得失去能力的程度的眼部不适。另外,钙沉积可引起上皮和顽固的组织缺陷。

[0012] 最近的研究进一步研究了在透析患者中眼睛钙化的严重性与脉管钙化发生之间的关系,并且发现了眼部钙化的程度和外骨骼钙化的状况之间的显著相关性。该研究表明眼部钙化的程度可以用作评估外骨骼钙化诸如软组织钙化或任何其它器官钙化的状况的工具(Seyahi等.(2005),Association of conjunctival and corneal calcification with vascular calcification in dialysis patients(透析患者中结膜和角膜钙化与脉管钙化的相关性).American Journal of Kidney Disease(美国肾病杂志)45:550-556)。

[0013] 心血管系统中钙化的发展可以导致发展多种临床显著性并发症,诸如心肌缺血、心肌梗塞、损害的心肌功能、充血性心脏衰竭和心脏瓣膜不足。心血管疾病,特别是冠状动脉病和慢性心脏衰竭的快速发展是患有终末期肾病的患者中死亡的主要原因。据报道,在透析患者中的每年全因死亡率(yearly all-cause mortality)在12%-25%范围内。在它们之中,大约50%的这种额外死亡率是由于心血管起因(Ketteler等,2005)。

[0014] 钙化还向肾病患者之外扩张,并且可以包括超过40岁的任何人。尽管在美国死亡的主要原因是急性心肌梗塞和中风,但是高胆固醇血症只构成这类死亡中的15%,并且85%是由心室钙化引起的。

[0015] 因此,存在对于处理或减少具有增加的发展脉管、内脏或软组织钙化的危险的受试者中的血清磷、钙和磷产物(CaxP)与甲状旁腺激素(PTH)水平的方法的需求。本发明提供满足这种需求的使用新形式的铁有机化合物的方法。

[0016] 发明概述

[0017] 依据本发明的这些和其它目的,描述本发明的简述。在下述概述中可以进行一些简化和省略,其意欲突出和引入本发明的一些方面,但不限于其范围。在下一部分中接着的是优选示例性实施方案的详细描述,所述实施方案足以允许本领域的普通技术人员实施和应用本发明的观念。

[0018] 本发明提供治疗受试者中的软组织钙化的方法,该方法包括给所述受试者施用有效量的铁有机化合物。在一个实施方案中,所述铁有机化合物具有至少约 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟的溶解速率。

[0019] 在一个实施方案中,所述铁有机化合物依据下述方法制备,所述方法包括下列步骤:(a)获得铁离子盐;(b)在有效产生包括多晶型铁氧化物的混合物的条件下,向所述铁离子盐中加入碱金属氢氧化物;(c)从所述混合物分离沉淀物;(d)向所述沉淀物中加入有机酸;(e)通过加热所述有机酸和所述沉淀物而形成铁有机酸溶液;和(f)通过有机溶剂从所述铁有机酸溶液沉淀所述铁有机化合物。

[0020] 一般地,受试者是人或动物。所述受试者可以患有慢性肾病或终末期肾病,正在进行肾透析或肾移植。所述铁有机化合物可以通过口服或本领域通常已知的任何其它适当的途径施用。所述铁有机化合物的有效量可以由本领域的普通技术人员容易地确定,并且所述铁有机化合物可以配制成本领域通常已知的多种形式。代表性的形式包括,但不限于,片剂、散剂、混悬液、乳剂、胶囊、锭剂、粒剂、药片、丸剂、液体、酞剂或糖浆。

[0021] 在一个实施方案中,使用所述铁有机化合物治疗可以防止、逆转、延迟、或稳定受试者中的软组织钙化,其中所述软组织包括,但不限于,在皮肤、关节、眼睛、心脏瓣膜、心肌、冠状动脉、肺、肾等中的软组织。

[0022] 本发明还提供用于治疗受试者中的软组织钙化的治疗方案,所述治疗方案包括含有可接受载体和有效量的铁有机化合物的药物组合物,其中所述药物组合物以单或多剂量方案施用。在一个实施方案中,所述铁有机化合物具有至少约 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟的溶解速率。铁有机化合物的一个实例是柠檬酸铁。

[0023] 本发明还提供用于治疗受试者中的软组织钙化的药物组合物,所述组合物包括有效量的铁有机化合物,所述铁有机化合物具有至少约 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟的溶解速率。一般地,所述药物组合物可以配制成片剂、散剂、混悬液、乳剂、胶囊、锭剂、粒剂、药片、丸剂、液体、酞剂或糖浆。

[0024] 本发明还提供含有有效量的铁有机化合物的药物组合物在制备用于治疗受试者中的软组织钙化的药物中的应用。在一个实施方案中,所述铁有机化合物(例如,柠檬酸铁)具有至少约 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟的溶解速率。

[0025] 本发明的其它优点和方面在阅读下述实施例后将变得显而易见。

[0026] 附图详述

[0027] 图1是概括制备本发明所述的新型铁有机化合物的方法的示意图。

[0028] 图2是化学级和药用级柠檬酸铁的安全性能的比较。

[0029] 图3是化学级和药用级柠檬酸铁的能效性能的比较。

[0030] 图4显示用6g/天的柠檬酸铁治疗的患者(患者编号:2-01-1-029)的血清肌酐水平。

[0031] 图5显示用6g/天的柠檬酸铁治疗的患者(患者编号:2-01-1-032)的血清肌酐水平。

[0032] 图6显示关于眼睛检查的眼睛的不同区域。

[0033] 图7显示角膜钙化的实例照片。

[0034] 图8显示眼睛检查和计算角膜钙化的实例。

[0035] 图9显示在没有柠檬酸铁治疗的患者中加重的角膜钙化的实例。患者ID:2-01-001;给药:安慰剂;治疗时期:77天。

[0036] 图10显示在柠檬酸铁治疗后在患者中改善的角膜钙化的实例。患者ID:2-01-1-

012;剂量:柠檬酸铁2g/天;治疗时期:28天。

[0037] 发明详述

[0038] 制备新的铁有机化合物如柠檬酸铁的方法已经在美国临时申请号60/763,253和PCT/US2006/032585中公开,其通过引用完全结合于此。这些铁化合物比商购形式的柠檬酸铁化合物或络合物更可溶于更宽的pH范围。此外,与商购形式的柠檬酸铁化合物相比,本发明的铁有机化合物具有更大的活性表面积。由于这些铁有机化合物更可溶,它们可以更有效地口服递送给患有响应使用铁有机化合物如柠檬酸铁治疗的病况的患者。

[0039] 下文描述的结果表明使用本发明的柠檬酸铁治疗可以延迟或改善内脏、脉管和/或软组织钙化如角膜钙化。因此,有效量的柠檬酸铁可以用来逆转、防止、延迟或稳定受试者中的内脏、脉管和/或软组织钙化。

[0040] 本发明不限于使用本文公开的柠檬酸铁。通过遵循本发明的教导,其它的柠檬酸铁化合物、或它们的盐、衍生物、类似物、代谢物或适合用于本发明的方法中的制剂对于本领域的普通技术人员是容易地显而易见的。此外,本发明的方法还包括使用按照本文所述的方法合成的其它铁有机化合物。这些铁有机化合物优选地具有或者包括下述特性:

[0041] 结合磷的高亲和性;

[0042] 在宽pH范围的可溶性;

[0043] 不依赖于pH的快速结合;

[0044] 高溶解性;

[0045] 在整个机体中的低吸收;

[0046] 缺少毒性;

[0047] 可以口服施用;和/或

[0048] 生产廉价。

[0049] 考虑本文所述的数据,本领域的普通技术人员还将容易地认识到,本发明不限于使用按照本文公开的方法生产的铁有机化合物。因此,对于本领域的普通技术人员将是容易地显而易见的,本发明包括使用铁有机化合物治疗软组织钙化的方法,其中所述铁有机化合物具有本文所述的某些特征。

[0050] 在一个实施方案中,本发明的方法包括给受试者施用有效量的铁有机化合物和适当的载体。当用于本文时,术语“适当的载体”包括,但不限于,本领域的普通技术人员已知的用于施用药物化合物或组合物的任何适当的载体。载体的类型将取决于施用模式而变化。“可接受的或适当的载体”还可以包括,但不限于,液体、气雾剂、胶囊、片剂、丸剂、散剂、凝胶、油膏、乳膏、粒剂、水、磷酸缓冲盐水、林格溶液、葡萄糖溶液、含有血清的溶液、Hank's溶液、其它生理平衡的水溶液、油、酯、乙二醇、生物相容的聚合物、聚合物基质、胶囊、微胶囊、微颗粒、大丸剂制剂、渗透泵、扩散装置、脂质体、脂质球(lipospheres)、细胞或细胞膜。可生物降解的微球体(例如,聚乳酸酯聚乙醇酸酯)也可以用作载体。

[0051] 关于用于肠胃外使用(例如,皮下注射)的化合物或组合物,术语适当的载体包括,但不限于,水、盐水、醇、脂肪、石蜡或缓冲液。

[0052] 关于用于口服施用的化合物或组合物,术语适当的载体包括,但不限于,上述载体中的任一种或固体载体,诸如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、和碳酸镁。

[0053] 在一个实施方案中,本发明提供使用铁有机化合物治疗受试者中的软组织钙化的方法。一般地,所述受试者是人或动物。所述受试者可以患有慢性肾病或终末期肾病,或正在进行肾透析。所述铁有机化合物按照本文所述合成。简言之,所述合成方法包括下列步骤:(a)获得铁离子盐(例如,氯化铁六水合物);(b)以有效产生包括多晶型铁氧化物的混合物的速率和温度向所述铁离子盐中加入碱金属氢氧化物(例如,氢氧化钠);(c)从所述混合物分离沉淀物;(d)向所述沉淀物中加入有机酸;(e)通过加热所述有机酸和所述沉淀物而形成铁有机酸溶液;和(f)通过有机溶剂从所述铁有机酸溶液中沉淀所述铁有机化合物。

[0054] 本发明还提供治疗受试者中的软组织钙化的方法,该方法包括给所述受试者施用有效量的铁有机化合物。一般地,所述铁有机化合物具有至少约 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟的溶解速率,例如,从约 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟到约 $4\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟。

[0055] 在一个实施方案中,所述铁有机化合物按照包括下列步骤的方法制备:(a)获得铁离子盐;(b)在有效产生包括多晶型铁氧化物的混合物的条件下向所述铁离子盐中加入碱金属氢氧化物;(c)从所述混合物分离沉淀物;(d)向所述沉淀物加入有机酸;(e)通过加热所述有机酸和所述沉淀物而形成铁有机酸溶液;和(f)通过有机溶剂从所述铁有机酸溶液沉淀铁有机化合物。

[0056] 在一个实施方案中,所述碱金属氢氧化物以小于 $20\text{ml}/\text{分钟}$ 、优选约 $10\text{ml}/\text{分钟}$ 到约 $20\text{ml}/\text{分钟}$ 的速率加入,并且在低于 40°C 、优选地在约 10°C 到约 40°C 的温度下,将所述碱金属氢氧化物加入到所述铁离子盐中。

[0057] 在一个实施方案中,将所述有机酸和所述沉淀物加热到约 80°C 到约 90°C 之间的温度。通过向所述溶液中加入有机溶剂而从所述铁有机酸溶液中沉淀所述铁有机化合物包括在加入所述有机溶剂之前,将所述铁有机酸溶液冷却到低于 30°C ,优选地将所述铁有机酸溶液冷却到约 10°C 到约 30°C 之间的温度。

[0058] 多种有机酸,如柠檬酸、乙酸、异柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸、和酒石酸可以用于合成所述铁有机化合物的方法中,其中可以使用多种有机溶剂,诸如乙醇、甲醇、丁醇、异丙醇、丙酮和四氢呋喃。

[0059] 所述铁有机化合物可以由本领域的普通技术人员确定的有效剂量施用。例如,所述铁有机化合物的有效量可以通过在动物或适当的体外模型中的滴定实验而确定。有效量的实例包括,但不限于, $2\text{-}8\text{gm}/\text{天}$ 铁有机化合物,每天施用3次, $6\text{gm}/\text{天}$,持续14天或28天,或者所述铁有机化合物每天相同地施用3次,或者所述铁有机化合物在饭后10分钟内施用。

[0060] 尽管不同的施用途径,诸如静脉内(i.v.)、腹膜内(i.p.)或皮内递送,可以同样作用,或者可以同样有效,但是本发明的铁有机化合物优选地口服施用。通常,所述铁有机化合物可以配制成片剂、散剂、混悬液、乳剂、胶囊、锭剂、粒剂、药片、丸剂、液体、酊剂、或糖浆。

[0061] 在一个实施方案中,使用所述铁有机化合物治疗可以防止、逆转、延迟或稳定受试者中的软组织钙化,其中所述软组织包括,但不限于,在皮肤、关节、眼睛、心脏瓣膜、心肌、冠状动脉、小动脉中、或在内脏器官如肺和肾中的软组织。

[0062] 本发明还提供用于治疗受试者中的软组织钙化的治疗方案,所述方案包括含有可接受的载体和有效量的铁有机化合物的药物组合物,其中所述药物组合物以单或多剂量方案施用。在一个实施方案中,所述铁有机化合物具有至少约 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟的溶解速率。铁有

机化合物的一个实例是柠檬酸铁。

[0063] 通常,所述药物组合物的至少部分口服施用,例如,所述铁有机化合物可以配制成片剂、散剂、混悬液、乳剂、胶囊、锭剂、粒剂、药片、丸剂、液体、酞剂或糖浆。所述治疗方案用于治疗患有慢性肾病或终末期肾病的受试者。在一个实施方案中,使用所述治疗方案的治疗可以防止、逆转、延迟、或者稳定受试者中的软组织钙化,其中所述软组织包括,但不限于,在皮肤、关节、眼睛、心脏瓣膜、心肌、冠状动脉、小动脉中或者在内脏器官如肺和肾中的软组织。

[0064] 本发明还提供用于治疗受试者中的软组织钙化的药物组合物,所述组合物包括有效量的铁有机化合物,所述铁有机化合物具有至少约 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟的溶解速率,例如,约 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟到约 $4\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟。所述药物组合物可以配制成上述各种形式,并且它用于治疗上述的软组织钙化。

[0065] 本发明还提供包含有效量的铁有机化合物的药物组合物在制备用于治疗受试者中的软组织钙化的药物中的应用。在一个实施方案中,所述铁有机化合物(诸如柠檬酸铁)具有至少约 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ /分钟的溶解速率。得到的药物可以配制成上述各种形式,并且它用于治疗上述软组织钙化。

[0066] 通过参考下述实施例,将更容易理解综合描述的本发明,所述实施例仅是出于举例说明本发明的某些方面和实施方案的目的包含于此,并不意欲限制本发明。

[0067] 实施例1

[0068] 合成药用级铁有机化合物的通用方法

[0069] 合成铁有机化合物的通用方法已经在PCT/US2006/032585和美国临时申请号60/763,253中公开,其通过引用结合在本申请中。代表性的铁有机化合物包括,但不限于,柠檬酸铁。

[0070] 参考图1,流程图10是合成可以用于本发明的铁有机化合物或柠檬酸铁化合物形式的通用方法。起始原料,如在方框20中所示,包括可溶的铁离子盐。所述可溶的铁离子盐可以包括氯化铁六水合物($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),如在方框21中所示,或任何其它适当的可溶铁离子盐。其次,碱金属氢氧化物(方框30)以特定速率和温度加入到所述可溶的铁离子盐中。以特定速率优选约 $10\text{ml}/\text{分钟}$ 和约 $20\text{ml}/\text{分钟}$ 之间,和温度范围优选低于 40°C 加入碱金属氢氧化物导致形成均匀的多晶型铁氧代胶质混悬液。所述碱金属氢氧化物可以包括氢氧化钠、氢氧化钾、或任何其它适当的碱金属氢氧化物,如在方框31中所示。

[0071] 收集所述胶质混悬液沉淀物,并且用蒸馏水漂洗(方框40),以去除任何可溶的杂质。在漂洗后,将沉淀物重悬,并且,如在方框50中所示,将晶态有机酸加入到所述沉淀物中,并且加热到特定的温度范围,优选地在约 80°C 到约 90°C 之间。所述有机酸可以包括任何适当的有机酸。方框51列出了一些可以使用的可能有机酸,包括但不限于,柠檬酸、乙酸、异柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸、和酒石酸。有机酸的加入允许所述酸与所述沉淀物在溶液中形成络合物。在方框60,使用有机溶剂将所述铁有机化合物从溶液中沉淀出来,以形成新形式的铁有机化合物(方框70)。可以使用各种有机溶剂,包括但不限于,方框61中所述的溶剂,诸如乙醇、甲醇、丁醇、丙酮、异丙醇、四氢呋喃、或任何其它适当的有机溶剂。

[0072] 合成柠檬酸铁

[0073] 在本发明的一个实施方案中,所述铁有机化合物是柠檬酸铁。用于制备柠檬酸铁

的起始原料包括1.85M的氯化铁六水合物($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)溶液。将产生1:3的铁离子与氢氧离子比例所需要的5M氢氧化钠的体积,以小于20ml/分钟、优选在约10ml/分钟到约20ml/分钟之间的速率加入到所述氯化铁六水合物溶液中。将所述混合物的温度保持低于 40°C ,优选地在约 10°C 到约 40°C 之间,同时加入氢氧化钠,以形成氢氧化铁的多晶型铁氧化物胶质混悬液。测定所述混悬液的pH,同时加入氢氧化钠。当pH高于7.0时,将所述混悬液冷却,直到其低于 30°C ,优选地在约 10°C 到约 30°C 之间。然后将所述混悬液通过1mm孔滤器过滤,以分离聚集物,并且然后去除氢氧化铁沉淀物的大颗粒。然后将过滤的氢氧化铁混悬液离心。弃掉上清,并且将沉淀的氢氧化铁再次离心,以去除任何残留的上清。然后用蒸馏水重悬所述氢氧化铁沉淀物。再重复离心-重悬步骤两次,以冲洗所述氢氧化铁沉淀物并去除可溶于水的杂质。然后将得到的氢氧化铁沉淀物均化处理。

[0074] 将产生1:1的铁离子与柠檬酸盐的比例所需要的柠檬酸的量加入到所述沉淀物中。将所述混合物在油浴中加热到约 80°C 到约 90°C 之间,直到混合物的颜色从橙棕色变成透明的深棕色,或者直到所有的氢氧化铁沉淀物溶解。冷却反应物,直到其低于 30°C ,优选地在约 10°C 到约 30°C 之间,并且测量pH,以确定其在0.8和1.5之内。将反应物离心,并且收集上清。通过加入5体积的有机溶剂而将柠檬酸铁从所述上清中沉淀出来。

[0075] 可以使用各种有机溶剂,包括乙醇、甲醇、丁醇、丙酮、异丙醇、或四氢呋喃、当加入溶剂时,搅拌所述混合物,直到浅褐色沉淀物形成。离心所述混悬液,并且弃掉上清。将沉淀物用所述溶剂再冲洗和离心两次。然后将沉淀物在真空烤箱中在环境温度下干燥8-16小时,或者通过任何其它适合的工业方法如流化床干燥而进行干燥。将干燥的沉淀物用研钵和研杵碾磨,并且再在环境温度下干燥8-24小时。将细碎的沉淀物通过磨制再次精细研磨,并且通过45目尺寸(35微米)筛过筛。将新形式的柠檬酸铁粉末再在真空烤箱中干燥或再在流化床中干燥,并且在环境温度下干燥,直到1小时的干燥导致小于0.25%的重量损失。

[0076] 实施例2

[0077] 关于柠檬酸铁对患有终末期肾病(ESRD)的患者的血清磷酸盐的影响的随机化、双盲、安慰剂对照的、剂量范围研究

[0078] 目的:(1)确定以每天2,4和6g的剂量,TID(每天三次)施用,持续28天的柠檬酸铁对患有终末期肾病(ESRD)的患者中血清磷酸盐(P04)水平的影响。(2)评估以每天2,4和6g的剂量,TID施用,持续28天的柠檬酸铁在患有ESRD的患者中的安全性。

[0079] 研究药物:在美国系列号11/206,981和WO 2004/07444中公开的柠檬酸铁。

[0080] 研究方案:随机化、双盲的、安慰剂对照的、剂量范围研究,以评估柠檬酸铁对患有ESRD进行血液透析的患者中的血清磷酸盐浓度的影响。患者在研究的第14和28天进行评估,评估通过血清磷酸盐浓度检测的功效。也评估了接受一或多剂量的研究药物的患者的安全性。

[0081] 研究持续时间:8周(包括筛选时期,2周淘汰,4周治疗)

[0082] 结果表明,以0,2,4和6gm/天(饭后立即,即,10分钟内给药,TID)降低了血清 P04 和 $\text{Ca} \cdot \text{P04}$ 。柠檬酸铁口服施用,并且每天相等地给药3次。

[0083] 柠檬酸铁降低患有ESRD的患者中的血清磷酸盐水平的的能力得到证明。在使用安慰剂、2,4,和6gm/天的28天过程中,在血清钙水平中没有观察到显著的变化。然而, $\text{Ca} \cdot \text{P04}$ 水平下降,并且在第14和28天,对于6gm/天的剂量都是统计学显著的。结果还表明钙化可以在

使用柠檬酸铁治疗后逆转或稳定。下表总结本研究的数据。

[0084] 表1

[0085] 结果总结

	剂量响应	统计学显著性	线性回归
血清 PO4 (mg/dL)	第 14 天	无	P=0.0523
	第 28 天	是	P=0.0073
血清 Ca (mg/dL)	第 14 天	无	N.S.
	第 28 天	无	N.S.
Ca x PO4 (mg/dL) ²	第 14 天	是	P=0.0401
	第 28 天	是	P=0.0158

[0087] *N.S.:不显著

[0088] 表2

[0089] 血清[PO4] (mg/dL) 总结

	安慰剂 (N=16)	2 g/天 (N=31)	4 g/天 (N=32)	6 g/天 (N=32)	剂量响应
在第 0 天的血清 [PO4] (mg/dL)	7.2±1.43	7.2±1.23	7.1±1.27	7.3±1.33	N/A
在第 14 天的血清 [PO4] (mg/dL)	6.7±1.22	6.7±1.50	6.4±1.56	6.3±1.72	无 (P=0.0523)
在第 28 天的血清 [PO4] (mg/dL)	7.2±1.19	6.9±2.22	6.0±1.33	5.8±1.76*	是

[0091] *P<0.05, 与安慰剂比较, 基线变化的显著差异

[0092] 表3

[0093] 血清[Ca] (mg/dL) 总结

	安慰剂 (N=16)	2 g/天 (N=31)	4 g/天 (N=32)	6 g/天 (N=32)	剂量 响应
[0094] 在第 0 天的血清 [Ca] (mg/dL)	8.71±0.779	8.78±0.981	9.02±0.913	8.99±0.812	无
在第 14 天的血清 [Ca] (mg/dL)	8.91±0.782	9.01±1.232	9.47±0.990	9.13±0.909	无
在第 28 天的血清 [Ca] (mg/dL)	8.74±0.830	9.00±0.953	9.29±0.960	9.26±0.865	无

[0095] *P<0.05, 与安慰剂比较, 基线变化的显著差异

[0096] 表4

[0097] 血清[Ca]*[PO4] (mg/dL)²的总结

	安慰剂 (N=16)	2 g/天 (N=31)	4 g/天 (N=32)	6 g/天 (N=32)	剂量响 应
[0098] 在第 0 天的 [Ca]*[PO4] (mg/dL) ²	62.8±13.91	62.9±13.25	63.5±10.69	65.8±12.19	N/A
在第 14 天的 [Ca]*[PO4] (mg/dL) ²	59.9±12.19	60.3±16.50	59.9±13.89	57.5±16.27	是
在第 28 天的 [Ca]*[PO4] (mg/dL) ²	63.2±12.55	61.7±21.25	55.4±13.36	54.1±17.68*	是

[0099] *P<0.05, 与安慰剂比较, 基线变化的显著差异

[0100] 表5

[0101] 治疗出现的不利事件

	安慰剂 (N=16) #事件(%)	2 g/天 (N=33) #事件(%)	4 g/天 (N=34) #事件(%)	6 g/天 (N=33) #事件(%)
具有至少一次不利事件的受试者的总数(T#at1AE)	7 (43.8)	16 (48.5)	12 (35.3)	17 (51.5)
通过优选术语(PT)分类				
腹痛	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (11.8)	2 (6.1)
腹泻	2 (12.5)	3 (9.1)	1 (2.9)	1 (3.0)
通过系统器官种类/PT 分类				
GI 疾病(参见上述 PT)	4 (25.0)	8 (24.2)	10 (29.4)	10 (30.3)
一般疾病	2 (12.5)	4 (12.1)	2 (5.9)	4 (12.1)
传染病和流行病	2 (12.5)	0 (0.0)	3 (8.8)	1 (3.0)
皮肤和 SC 组织疾病	0 (0.0)	3 (9.1)	0 (0.0)	4 (12.1)
通过 SOC/PT/严重性分类				
T#at1AE, 轻度	7 (43.8)	13 (39.4)	9 (26.5)	14 (42.4)
T#at1AE, 中度	0 (0.0)	6 (18.2)	3 (8.8)	2 (6.1)
T#at1AE, 重度	1 (6.3)	0 (0.0)	2 (5.9)	1 (3.0)
GI 疾病, 轻度	4 (25.0)	6 (18.2)	8 (23.5)	9 (27.3)
通过 SOC/PT/关系分类				
T#at1AE, 确切	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
T#at1AE, 很可能	1 (6.3)	2 (6.1)	2 (5.9)	5 (15.2)
T#at1AE, 可能	3 (18.8)	5 (15.2)	6 (17.6)	2 (6.1)

	安慰剂 (N=16) #事件(%)	2 g/天 (N=33) #事件(%)	4 g/天 (N=34) #事件(%)	6 g/天 (N=33) #事件(%)
GI 疾病, 确切	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
GI 疾病, 很可能	1 (6.3)	2 (6.1)	2 (5.9)	5 (15.2)
GI 疾病, 可能	3 (18.8)	3 (9.1)	6 (17.6)	1 (3.0)

[0104] 如在图2和3中所示,使用药用级柠檬酸铁治疗与化学级柠檬酸铁相比提供一些优点。通常,尽管药用级柠檬酸铁表现出与化学级柠檬酸铁的功效近似相等的功效,但是它获

得这一结果具有比化学级柠檬酸铁更少的不利副作用。

[0105] 图2还显示与施用药用级柠檬酸铁相关的不利副作用和与安慰剂相关的那些没有显著差别。这种安全特性的优点在于,个体患者可以使他的药用级柠檬酸铁给药在宽的剂量范围内滴定,而更少考虑副作用。以这种方法,可以定制患者的个体治疗以适合其特定的需要和耐受性。

[0106] 血清肌酸酐水平的下降

[0107] 肾小球滤过率 (GFR) 水平与结构性肾损失相关,并且用作测定肾功能的金标准。GFR可以通过生物标记血清肌酸酐进行评估。当肾功能恶化时,肾脏失去它有效排泄肌酸酐的功能,并且导致肌酸酐滞留在机体内。因此,血清肌酸酐的增加表明降低的GFR,并且是肾脏恶化的重要征兆。

[0108] 在II期临床研究:“关于柠檬酸铁对患有终末期肾病 (ESRD) 的患者的血清磷酸盐的影响的随机化、双盲、安慰剂对照的、剂量范围研究”的开放-标记延伸中,向一些患者施用2~6g/天的柠檬酸铁,并且监测血清肌酸酐水平以评估肾功能。一些接受6g/天的柠檬酸铁的患者似乎具有减少的血清肌酸酐水平的趋势,其暗示柠檬酸铁可以改善、延迟、停止或防止慢性肾病的发展。来自2名患者的结果显示在图4-5中。

[0109] 实施例3

[0110] 测量角膜钙化的方法

[0111] 眼睛检查通过使用与数码相机 (NIKON E995) 连接的裂隙灯显微镜进行。角膜中的钙化在接近角膜边缘的鼻和颞侧发生,并且看起来像血钙过多症的结合角膜病。观察者拍照了内侧(接近鼻)、外侧(接近颞),或拍摄了其中发现钙化的角膜的全视图(图6)。因此,对于每只眼睛拍摄了1-2幅图片,并且得到每次检查每名患者收集2-4张图片。

[0112] 称为“Image J”的图像分析软件用于数据分析。所述图像分析软件开发成显示、编辑、分析、处理、保存并打印8-位、16-位和32-位的图像。它可以计算使用者-确定的选择的面积和像素值统计,测量距离和角度,并且生成密度柱状图和线面图。它支持标准的图像处理功能,如对比度操纵、锐化、平滑、边缘检测和中值滤波。该软件在国立精神健康研究所 (National Institute of Mental Health) 的研究服务部开发,其为国立卫生研究所 (National Institutes of Health) (NIH) 的一个研究所。该软件可以从NIH网站下载。

[0113] 所述图像分析软件能够测量由使用者主观确定的钙化的面积和总角膜面积。为了估算钙化的面积,观察者首先将患者眼睛图片上载到所述图像软件,切割特定的钙化区域,并且所述软件将因此测量该确定的部分(确定为在该区域有多少像素)。应该注意到,由于所述图片通过聚焦在角膜的一侧而拍摄,所述照片通常没有捕获角膜的完整图像。为了估算完整角膜的大小,观察者使用所述图像软件在所述图片上所述可用的角膜区主观切割90度的扇形区,然后让所述软件计算该扇形区的大小以代表完整角膜的1/4。通过将该数值乘以4,然后观察者得到总角膜面积的估算。角膜钙化的实例照片显示在图7中。

[0114] 基于由钙化占据的角膜表面的百分数,即,%内侧钙化+%外侧钙化,而评估角膜钙化的严重性,其中内侧或外侧钙化计算为(在内或外角膜上钙化面积/总角膜面积) x 100。参见图8。

[0115] 一些因素可能影响角膜的钙化测量:

[0116] (1) 治疗检查后的不同的迟滞期可以导致由检查者确定的受试者之间的差异。

[0117] (2) 摄影因素如环境的亮度、焦距、曝光时间、光亮度、光敏性(ISO值)、分辨率、图片对比度等不能控制。这些因素可能影响图片之间的质量,并且因此影响医师对准确确定不同照片之间的钙化区域的判断。

[0118] (3) 角膜区的成像不标准。大部分照片只包含角膜的局部视图。为了估算总角膜面积的大小,观察者主观确定90度的扇形区,以通过将该值乘以4而外推完整角膜的大小。

[0119] (4) 在一些图片中使用不同的相机:用于基线角膜测量的相机意外出故障,另一个相机开始进行第二次角膜测量中的一些。

[0120] (5) 使用2-维面积估算角膜的球体结构上的3-维钙化的本方法不是绝对准确的。

[0121] 所有上述因素构成角膜钙化确定的误差。然而,所述误差已经通过下述事实而最小化:所有的图像由单一求值程序确定,每名患者作用为其自身的对照,并且检验了每名患者内的相对变化。

[0122] 实施例4

[0123] 柠檬酸铁逆转角膜钙化

[0124] 上述II期研究结果表明柠檬酸铁可以以剂量-依赖型方式减少血清CaxP,而具有最小的副作用。由于眼睛钙化是最常观察到的软组织钙化之一,所以在II期研究终止后将使用柠檬酸铁的治疗延长为开放-标记延伸(OLE),以进一步研究柠檬酸铁对眼角膜钙化的影响以及其对软组织钙化的影响(implication)。

[0125] 在本研究中,在柠檬酸铁治疗之前和之后,患者到眼科进行眼睛检查。所有的患者都在II期试验的第一次给药日之前几天或当天进行他们的第一次眼睛检查(角膜钙化的基线值)。第二次眼睛检查的时间不同。一些患者在II期研究后立即检测,而一些患者在OLE期间检查。但是,忽视第二次眼睛检查是在何时进行的,它必须在确定的连续的柠檬酸铁施用日后获得,以便被认为是有效值,用于确定柠檬酸铁对角膜钙化变化的影响。

[0126] 来自柠檬酸铁II期临床试验的所有患者都经过不同时间长度的无药物期,然后一些患者参与所述开放-标记延伸治疗期。每名参与的患者接受由眼科医师进行的两次眼睛检查。取决于第一次和第二次眼睛检查的日期以及相对应的药物给药期,不是所有参与的患者都可以产生可用的信息。接受的患者是已经接受连续给药至少21天的那些。第一次和第二次眼睛检查之间的时间至少与给药期一样长。由于第一次和第二次眼睛检查之间的时间越长,角膜钙化发展的可能性越高,而不是另一种方式,所以两次眼睛检查之间的实际时间间隔对于本评估的目的是无关的。因此,如果第一次和第二次检查之间的时间间隔长于药物治疗期,那么下述关于评估柠檬酸铁对角膜钙化变化程度的作用的结果实际上是保守的。

[0127] 产生符合评估的数据的总共12名患者和得到的数据在表6中列出。对每名患者检测他们的左眼和右眼,因此产生24个角膜钙化值。在这12名患者内,一名患者接受安慰剂,并且作为阴性对照。其余11名患者接受不同的连续积极治疗期(从28到57天),并且产生22个左眼和右眼角膜钙化值。在接受积极治疗的11名患者中,两名(2)患者接受2g/天的柠檬酸铁剂量水平,两名(2)患者接受4g/天的柠檬酸铁剂量水平,而七名(7)患者接受6g/天的柠檬酸铁剂量水平。由于参与本评估的患者的有限数目,此处不需要正式的统计,使用概括统计。

[0128] 在第一次和第二次研究检查之间的77天的时期内,发现接受安慰剂的患者角膜钙

化加重,以+6.55%的平均值(右眼加重+1.28%,左眼加重+11.81%)。

[0129] 在接受积极治疗的那11名患者中,他们的治疗期平均为33天,并且在28-57天的范围内。在第一次和第二次检查之间的时期平均126天,并且在50-217天的范围内。在这11名患者中,只有10个眼睛角膜钙化值表现出加重的结果(平均+2.20%,在+0.08%到+6.98%范围内)。相反,一个眼睛角膜钙化值保持不变,而11个眼睛角膜钙化值表现出改善(平均-2.07%,在-0.08%到-10.21%范围内)。加重或改善的角膜钙化的实例显示在图9-10中。

[0130] 上述数据极其令人受鼓舞。柠檬酸铁似乎延迟或者改善角膜钙化病况。所述结果还暗示柠檬酸铁治疗可以改善软组织钙化的不同病况。可以进行进一步的临床研究,以证实柠檬酸铁对所有软组织钙化病况治疗的功效。

[0131] 表6

[0132] 在接受柠檬酸铁治疗的终末期肾病患者中的角膜钙化

受试者 ID	剂量 (g/天)	在第一次和第二次眼睛检测之间的时间间隔 (天)	柠檬酸铁治疗期 (天)	第一次眼睛检测角膜上的钙化面积 (%)	第二次眼睛检测角膜上的钙化面积 (%)	第一次和第二次检测之间的差异 (%)	眼睛 ID
2-01-001	安慰剂	77	77	4.19%	5.47%	1.28%	右
				4.32%	16.13%	11.81%	左
2-01-1-002	2g/天	61	28	0.00%	0.00%	0.00%	右
				3.90%	3.75%	-0.15%	左
2-01-1-012	2g/天	66	28	14.90%	4.69%	-10.21%	右
				3.50%	2.09%	-1.41%	左
2-01-1-048	4g/天	186	28	2.50%	2.09%	-0.41%	右
				1.85%	2.01%	0.16%	左
2-01-1-009	4g/天	50	28	0.51%	1.00%	0.49%	右
				1.16%	0.00%	-1.16%	左
2-01-1-050	6g/天	198	33	1.62%	1.54%	-0.08%	右
				0.86%	1.62%	0.76%	左
2-01-1-022	6g/天	217	57	7.21%	7.29%	0.08%	右
				1.39%	8.37%	6.98%	左
2-01-1-068	6g/天	202	34	0.00%	2.24%	2.24%	右
				1.05%	3.09%	2.04%	左
2-01-1-006	6g/天	50	28	32.43%	29.27%	-3.16%	右
				50.95%	50.36%	-0.59%	左
2-01-1-004	6g/天	78	28	4.38%	2.20%	-2.18%	右
				2.50%	1.10%	-1.40%	左
2-01-1-018	6g/天	75	28	40.85%	38.86%	-1.99%	右
				5.93%	7.72%	1.79%	左
2-01-1-042	6g/天	199	42	0.49%	3.73%	3.24%	右
				0.67%	4.91%	4.24%	左

[0133]

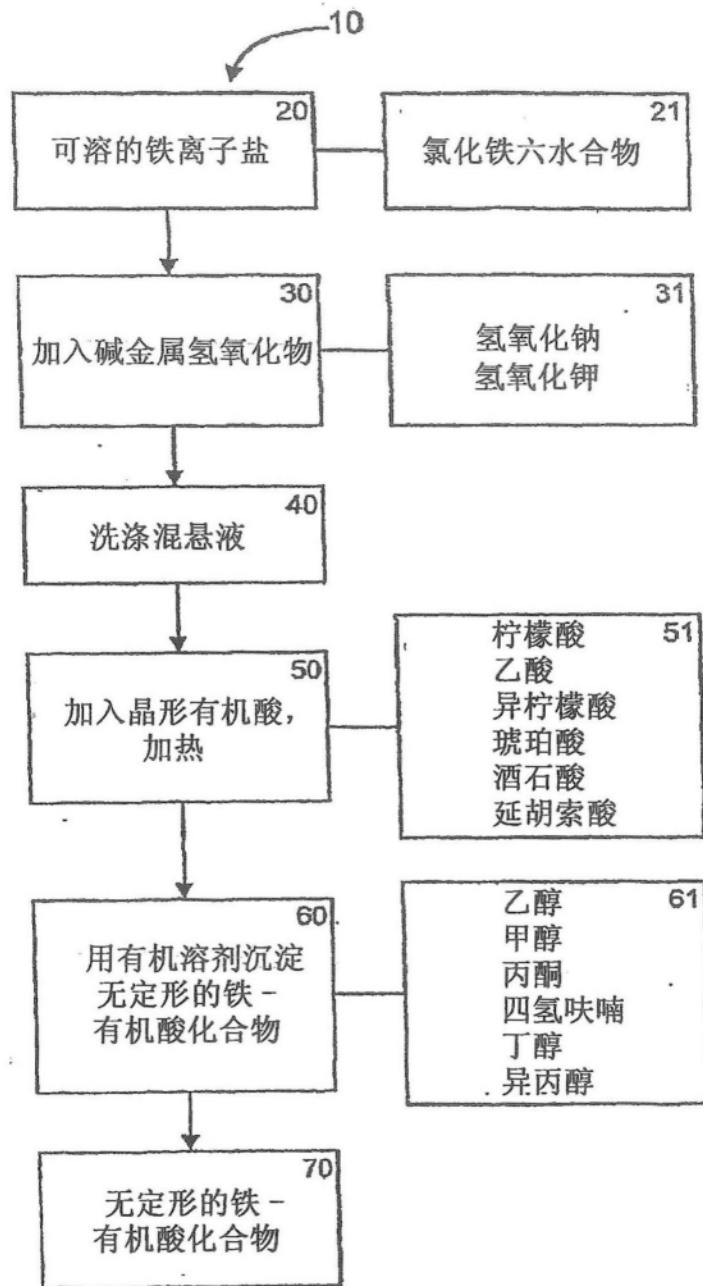


图1

	药用级柠檬酸铁 II 期临床研究 2005								台湾 1998 年化学级柠檬酸铁临床研究		美国 1998 年化学级柠檬酸铁临床研究	
	安慰剂 (N=16)		柠檬酸铁 2g/天 (N=33)		柠檬酸铁 4g/天 (N=34)		柠檬酸铁 6g/天 (N=33)		柠檬酸铁 3g/天 (N=45)		柠檬酸铁 4.5g/天 (N=14)	
	#事件	%	#事件	%	#事件	%	#事件	%	#事件	%	#事件	%
腹泻	2	12.5%	3	9.1%	1	2.9%	1	3.0%	9	20.0%	3	21.4%
松散便	1	6.3%	0	0.0%	1	2.9%	1	3.0%	3	6.7%	5	35.7%
便秘	0	0.0%	0	0.0%	2	5.9%	1	3.0%	4	8.9%	1	7.1%
气胀病	1	6.3%	0	0.0%	0	0.0%	1	3.0%	5	11.1%	3	21.4%
恶心	0	0.0%	2	6.1%	0	0.0%	1	3.0%	0	0.0%	0	0.0%

图2

血清磷 (mg/dl)		药用级柠檬酸铁临床研究 2005			台湾 1998 年化学级柠檬酸铁临床研究	美国 1998 年化学级柠檬酸铁临床研究
	安慰剂	柠檬酸铁 2g/天 (N=33)	柠檬酸铁 4g/天 (N=34)	柠檬酸铁 6g/天 (N=33)	柠檬酸铁 3g/天 (N=45)	柠檬酸铁 4.5g/天 (N=14)
第 0 天 (基线)	7.2±1.4	7.2±1.2	7.1±1.3	7.3±1.3	6.7±1.9	7.2±2.5
第 28 天 (治疗结束)	7.2±1.2	6.9±2.2	6.0±1.3	5.8±1.8	5.7±1.6	5.9±2.0
与基线的差别	-0.1±2.0	-0.3±2.1	-1.1±1.6	-1.5±1.6	-1.0±2.5	-1.3±3.2

[Ca] _x [P] (mg/dl) ²		药用级柠檬酸铁临床研究 2005			台湾 1998 年化学级柠檬酸铁临床研究	美国 1998 年化学级柠檬酸铁临床研究
	安慰剂	柠檬酸铁 2g/天 (N=33)	柠檬酸铁 4g/天 (N=34)	柠檬酸铁 6g/天 (N=33)	柠檬酸铁 3g/天 (N=45)	柠檬酸铁 4.5g/天 (N=14)
第 0 天 (基线)	62.8±14.0	62.9±13.3	63.5±10.7	65.8±12.2	60.8±17.1	60.3±15.5
第 28 天 (治疗结束)	63.2±12.6	61.7±21.3	55.4±13.4	54.1±17.7	51.8±15.2	51.8±17.7
与基线的差别	-0.3±19.3	-1.1±20.7	-8.1±14.7	-11.7±15.4	-9.0±22.9	-8.5±23.5

图3

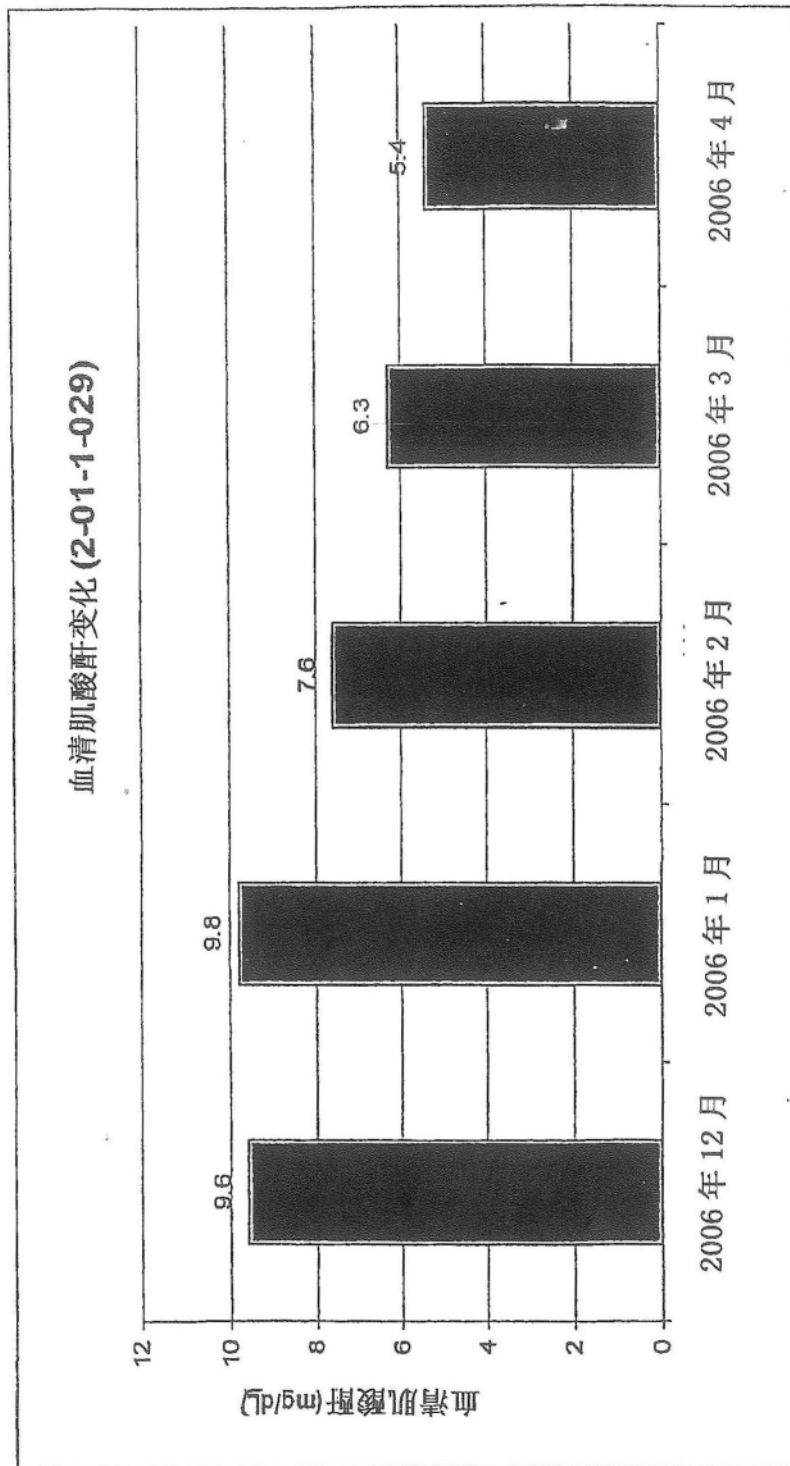


图4

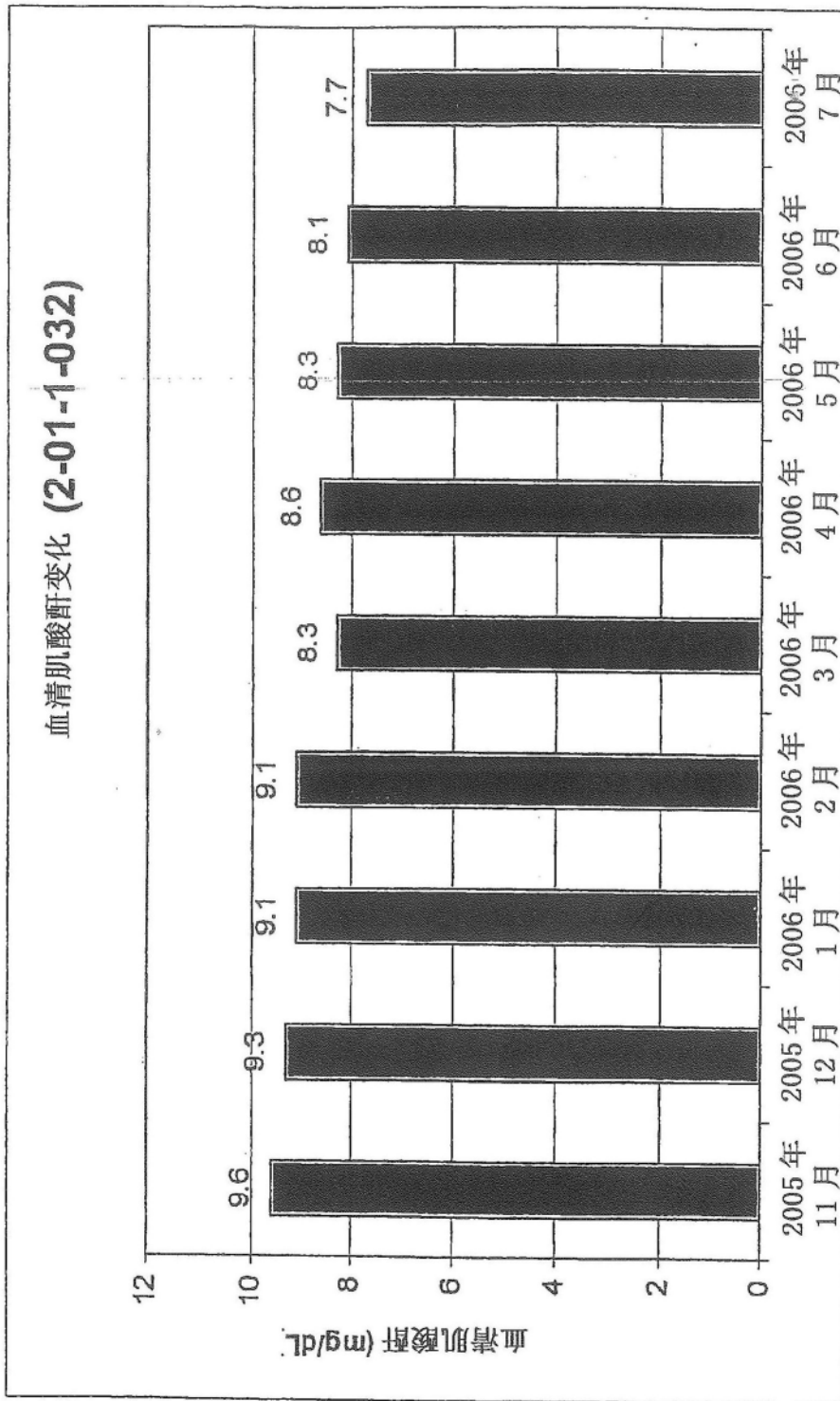


图5

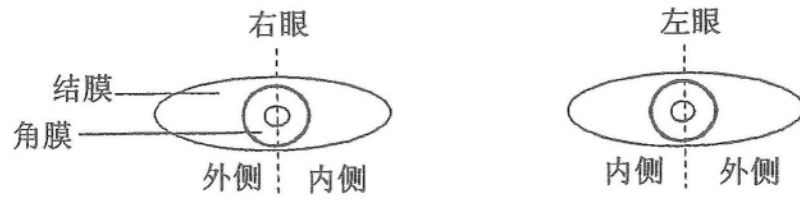


图6

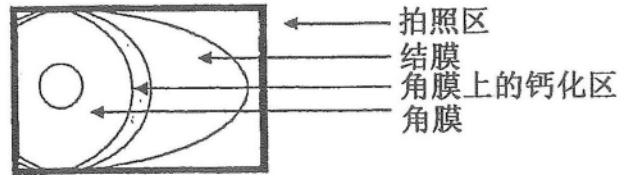


图7

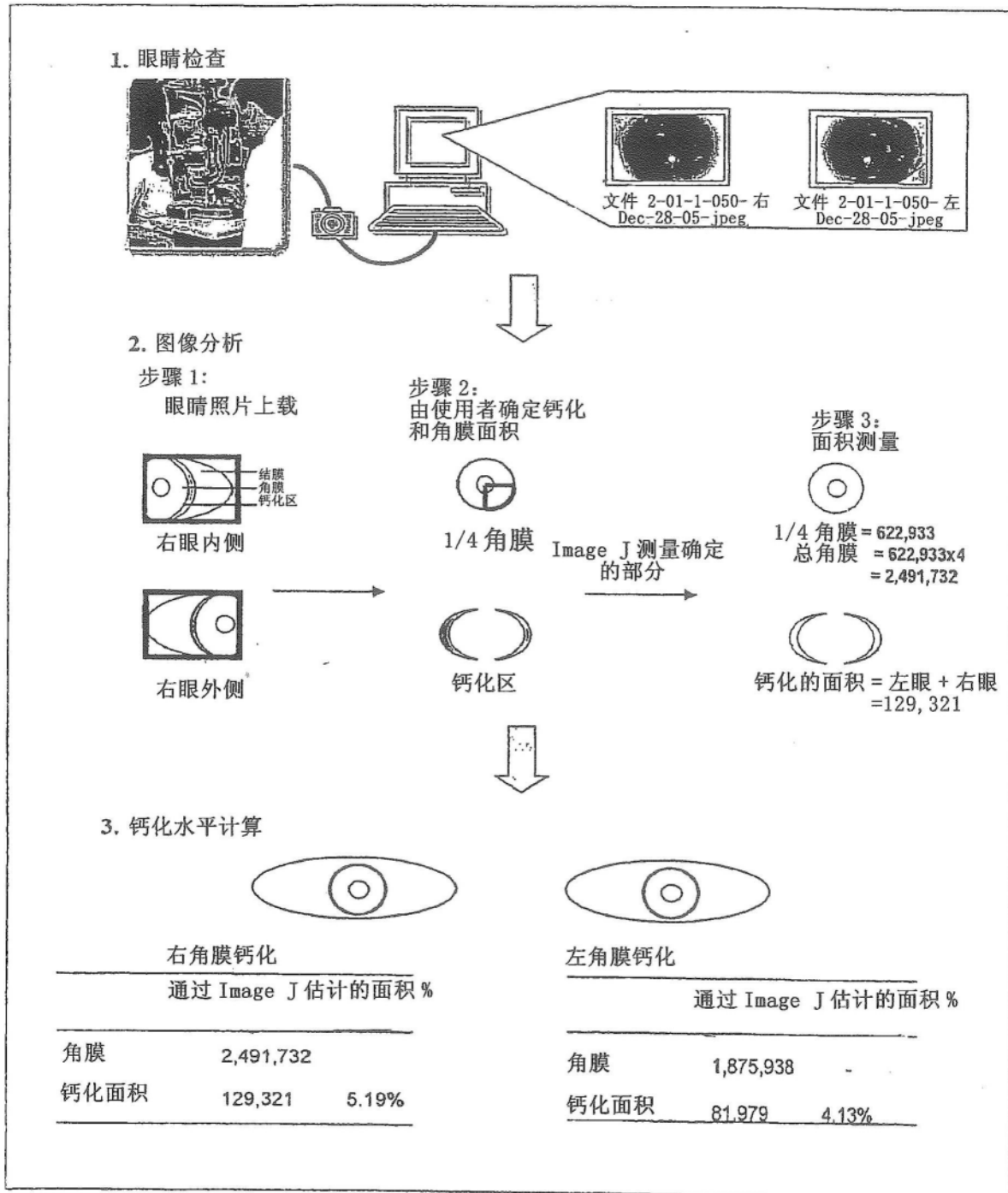


图8

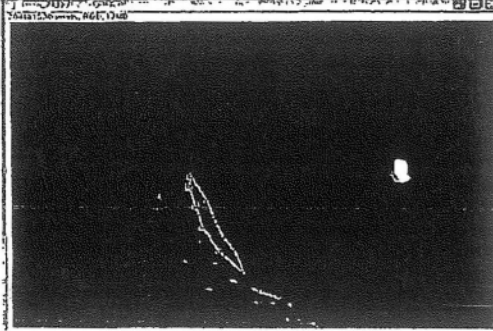
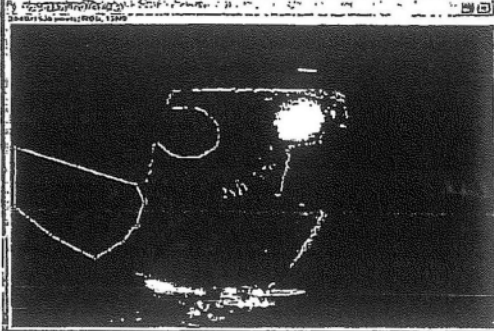
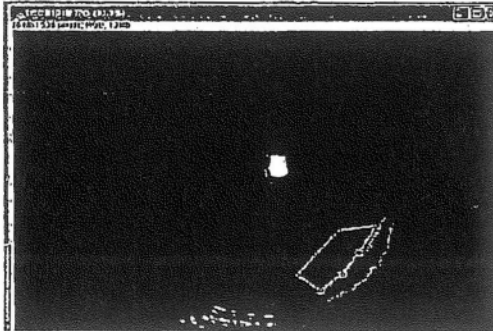
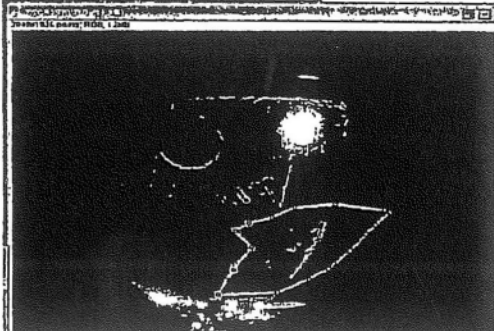
	第一次检查	第二次检查
内侧		
外侧		
结果	对右眼的第一次检查 角膜钙化 (%) : 内侧: + 1.64% 外侧: + 2.68%	对右眼的第二次检查 角膜钙化 (%) : 内侧: + 8.20% 外侧: + 7.93%
	总计: + 4.32%	总计: + 16.13%
差异 (第二次 - 第一次) = + 11.81%		

图9

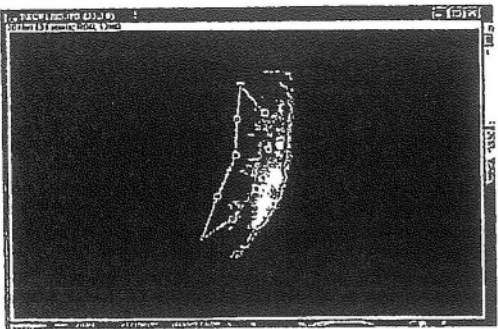
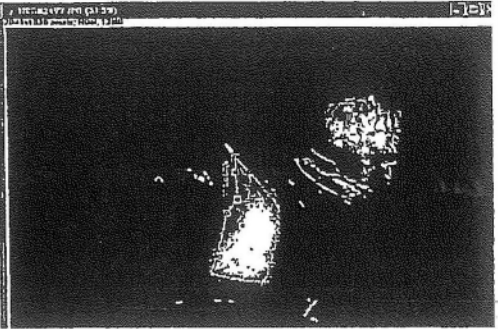
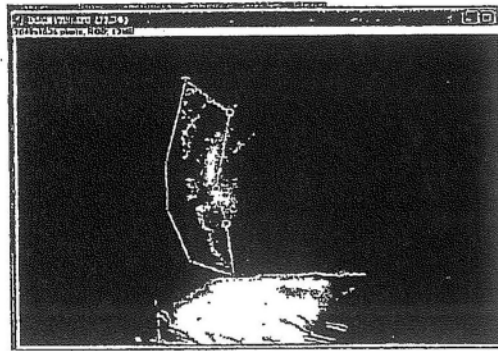
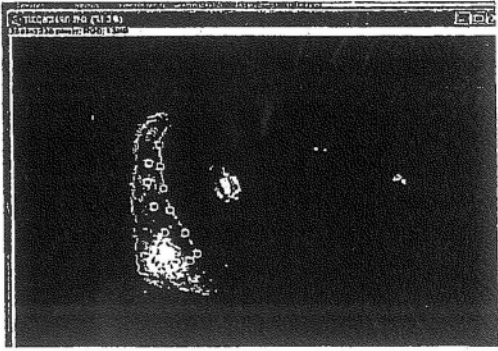
	第一次检查	第二次检查
内侧		
外侧		
结果	对右眼的第一次检查 角膜钙化 (%) : 内侧: -6.59% 外侧: -8.31%	对右眼的第二次检查 角膜钙化 (%) : 内侧: -2.19% 外侧: -2.50%
	总计: -14.9%	总计: -4.69%
差异 (第二次 - 第一次) = -10.21%		

图10