200533367
846842

（此處由本局於收文時黏貼條碼）

發明專利說明書

200533367

（本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※申請案號：94108843

※申請日期：94 年 03 月 22 日　　※IPC 分類：

一、發明名稱：

(中) 包含糖蛋白的眼用製劑

(英) Ophthalmic preparation containing glycoprotein

二、申請人：(共 1 人)

1.姓　名：(中) 梅爾辛治療學有限責任公司
(英) MILCIN THERAPEUTICS LLC
代表人：(中) 1.愛德華　艾理斯
(英) 1.ELLIS, EDWARD J.
地　址：(中) 美國內華達州雷諾南中心街三五〇號
(英) 350 S. Center St., Reno, NV 89501-2114, U.S.A.
國籍：(中英) 美國　　U.S.A.

三、發明人：(共 3 人)

1.姓　名：(中) 愛德華　艾理斯
(英) ELLIS, EDWARD J.
國　籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

2.姓　名：(中) 查爾斯　萊西
(英) LEAHY, CHARLES D.
國　籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

3.姓　名：(中) 珍妮　艾里斯
(英) ELLIS, JEANNE Y.
國　籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利□主張國際優先權：

846842

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數　順序註記】

1.美國　　；2004/03/30；10/814,001 ☑有主張優先權

九、發明說明

相關申請案之交叉參考資料

本申請案爲2002年10月3日提出之國際專利申請案第PCT/US02/31657號的延續部分，其主張於2001年10月3日提出之美國臨時專利申請案第60/326,912號的優先權，此二篇之全文併爲此文之參考資料。另外，本申請案關於2004年3月30日提出之標題爲"OPHTHALMIC PREPARATION CONTAINING GLYCOMACROPEPTIDE"的美國專利申請案，其全文併爲此文之參考資料。

關於聯邦政府資助之陳述

美國政府在本發明中具有已付清之執照，且，依提供研究基金1 R43 EY12573-01、2R44EY12573-02和5R44EY12573-03的國家健康組織的合理規定，美國政府具有在限定之情況下要求專利擁有人允許其它人使用本發明之權利。

【發明所屬之技術領域】

本發明關於眼用製劑，且更具體地說，係關於用來作爲淚膜補結品的眼用製劑，其中該製劑包括至少一種糖蛋白成分。

【先前技術】

淚膜最初的描述和模型係將淚膜描述成包括三種不同

層，且爲一種三-層的，水性爲主的淚膜。其中一層含有一主要用來使疏水性眼睛表面成爲親水性，以使該包含淚膜主體之水層可均勻地分佈在眼睛表面的黏蛋白層。

本領域中目前的成果顯示出習知之水性爲主的淚膜模型已被可信度更高之以黏蛋白爲主之凝膠模型的觀念所取代。此凝膠在角膜和結膜之上皮表面的黏蛋白濃度最高，而黏蛋白的濃度向外進入淚膜內部逐漸降低。在此模型中，黏蛋白之存在對整個淚膜的構造、穩定性和功能很重要。最近利用雷射干涉度量法和同焦顯微鏡所進行之淚膜研究可包括整個凝膠層，其指出人類淚膜的厚度爲30至40微米，超過先前所預估之數值的四倍。

根據淚膜之生理學和臨床觀察，淚膜之異常通常聚焦在特殊缺陷，如：水性眼淚缺乏、角膜-結膜乾燥（KCS）、黏蛋白缺乏、脂質異常、損傷之眼皮功能或上皮病。此種淚膜缺乏一種成分爲引起乾眼之原因的最簡單觀念可用在臨床上來提供複雜得多之關於涉及下列原因的眼睛表面疾病的思考層面：（1）促成淚膜分泌之不同腺體的健康和調控，（2）淚膜本身之變化，如：發炎傳介體之滲透重量莫耳濃度和含量本身，及（3）被視爲一類“最終通用途徑”者之接下去的眼睛表面的變化。事實上，許多臨床醫師和作者較喜歡“眼睛表面疾病”而非“乾眼”一詞，這是因爲不論最初之原因爲何，其係因眼睛表面發生變化，而造成乾眼之徵候和症狀。眼睛表面疾病之不適表現在個別個體中有不同的眼睛症狀，如：乾燥、砂礫感、灼燒、疼

痛或抓癢。這些症狀亦可因環境條件、電腦操作和配帶隱形眼睛等因素而更加重。不同之臨床癥候和症狀的組合亦稱爲乾眼症候群。

過去20至30年間有許多企圖提供有效且長期持續治療乾眼症狀，尤其是用於治療患有中度至嚴重KCS之患者的嘗試。這些習知技術的嘗試可根據其物理狀態（油膏、乳劑、固體裝置和以水溶性爲基礎的溶液，或凝膠）來歸類。

油膏通常爲以白色石蠟油和礦物油之混合物爲基礎的無水製劑。由於這些調和物爲油膩的，且產生模糊不清的視覺，因此，其不廣泛用於除了具有嚴重症狀之外的其它病例中，且大部分限用於晚上睡覺前。過去10年間已出現以乳劑爲基礎之用於治療乾眼症狀的調和物。在美國專利第5,578,586；5,371,108；5,294,607；5,278,151；4,914,088（其全文併爲此文之參考資料）號等一系列文獻中已揭示一種方法。這些專利教示用於減少水層從眼睛表面蒸發的方法和組成物。該方法包含將帶電荷的磷脂和非極性油之混合物（宜爲精細切分之油-中-水乳劑的型式）敷用在眼睛表面。另一種方法描述於美國專利第4,818,537和4,804,539號（其全文併爲此文之參考資料）中，其中係主張提供乳劑型式之脂粒組成物來增強保留在眼睛表面，而藉此舒緩乾眼之症狀。

眼睛插入物型式之固體裝置曾被用於長期舒解乾眼之症狀。這些裝置係置於眼睛內，並慢慢溶解或腐蝕，以提

供加厚之淚膜。通常患者會感覺這些裝置很難插入，且一旦置入，亦容易令人不舒服。

最值得推薦且成功用於商業上之治療乾眼症狀的方法爲使用以水溶性爲基礎的溶液或凝膠。對患者而言，相對於上述其它選項，眼藥水較方便且容易施用。目前市面上可選用的人工眼淚產品至少有30種。對大部分的產品而言，目前這些人工眼淚調和物中的“活性成分”通常爲水溶性或可分散的聚合物，如：羥乙基纖維素；羥丙基甲基纖維素；甲基纖維素；羧甲基纖維素；聚乙烯醇；聚乙烯吡咯啶酮；聚乙二醇；卡波姆（carbomer）；和波利沙姆（polyxamer）。

這些目前市售之產品雖然可暫時舒緩症狀（通常在幾分鐘內），但其絕對是暫時性的，並無長期效果。事實上，爲了在中度至嚴重之病例中真正維持緩和的症狀，必須去實行不易實踐的給藥計劃。使用保存之溶液時，若頻繁滴入將導致刺激之徵兆和症狀，因而需使用昂貴且更麻煩的單位劑量遞送包。

最近的專利文獻表示出對尋求合成之人工眼淚溶液的持續興趣。例如：美國專利第5,460,834號（其全文併爲此文之參考資料）中教示使用羥丙基甲基纖維素加上其它成分來作爲眼用溶液，而美國專利第6,180,093號（其全文併爲此文之參考資料）中揭示使用聚乙烯吡咯啶酮加上其它成分來緩和眼睛乾燥。

本技藝認定眼用溶液必須提供對乾眼症狀有效且長期

持續的治療。一種用來達成這些目的的方法爲提供具有修改過之流變性質的溶液，也就是在壓迫下泄露或流動的高黏性溶液。此方法之實例揭示於美國專利第5,075,104和5,209,927號（其全文併爲此文之參考資料）中，其中該眼用溶液之流變性質可透過使用卡波姆聚合物來達成。如美國專利第5,225,196、4,983,392和4,615,697號（其全文併爲此文之參考資料）中所描述者，現已發現這些卡波姆聚合物爲生物-黏著性的。吾人相信卡波姆之生物-黏著性質可促成延長保留在眼中的時間。事實上，美國專利第5,075,104和5,209,927號（其全文併爲此文之參考資料）中教示"卡波姆聚合物顯示出係藉由維持或恢復上皮細胞之正常水合平衡來作用，因此，可保護角膜"。

對於有用之眼用溶液聚合物的搜尋範圍已延伸至生物聚合物的領域，特別重視的部分爲天然多醣。在過去數年間，一種名爲玻尿酸之聚合物，及其鈉鹽相當令人注意。事實上，有一種以高分子量之玻尿酸鈉爲基礎的商品，好來席（Hylashield®）已成功地以乾眼治療溶液型式銷售。玻尿酸在人工眼淚溶液組成物中的用途亦教示於美國專利第5,460,834號（其全文併爲此文之參考資料）中。如美國專利第5,403,841、5,460,834和6,056,950號（其全文併爲此文之參考資料）中所揭示者，已有人主張可將其它種多醣，如：鹿角菜、羅望子膠和硫酸角質素用於人工眼淚溶液中。另外，如：藻酸鹽、葡聚糖、硬聚葡萄糖和黃原膠之多醣類亦曾被用於，或曾被提出可用於眼用溶液中。

在專利文獻中揭露關於黏蛋白在無菌、防腐和穩定溶液中之用途的舊有參考資料。美國專利第 4,438,100 號（其全文併爲此文之參考資料）中描述用於敷用在口腔敏感黏膜的含黏蛋白溶液。用於本發明之黏蛋白爲選自如下群體之非人類哺乳動物黏蛋白：口頰黏蛋白和胃腸道黏蛋白。事實上，其黏蛋白之來源爲黏液，此爲一種發展完成且由各種部分構成之含有不同黏蛋白分子以及其它蛋白質，和相關分泌污染物之混合物的分泌物。分泌出之黏蛋白和口腔或胃腸道黏膜之表面細胞所表現的黏蛋白間並無區別。在二篇最近的刊物，美國專利第 6,281,192 和 6,429,194 號（其全文併爲此文之參考資料）中揭示在眼藥中使用從哺乳動物乳汁或乳汁副產品衍生得來之黏蛋白：其中所描述之黏蛋白爲類似於表現在人類眼睛表面之穿膜黏蛋白的 MUCI 型黏蛋白。乳汁中存在少量黏蛋白，而此爲評論文章：Patton, S. Gendler, S.J., and Spicer, A.P., “The Epithelial Mucin, MUC1, of Milk, Mammary Gland and Other Tissues,” Biochemica et Biophysics Acta 1241 （1995） 407-424 中的主題。由於黏蛋白爲一種膜的主要成分，因此，這並非預料之外的。最近，黏蛋白被鑑定爲牛奶乳清中之次要成分。最近已可從牛奶脂肪球膜中分離並純化出黏蛋白，MUCI。此回收之 MUCI 的廣泛特性報導於已刊出之文章：Pallesen, L.T., Andersen, M.H., Nielsen, R.L., Berglund, L., Petersen, T.E., Rasmussen, L.K., and Rasmussen, J.T., “Purification of

MUC1 from Bovine Milk-Fat Globules and Characterization of a Corresponding Full-Length cDNA Clone," Journal of Dairy Science Vol 84, No 12 (2001) 2591-2598 中。

【發明內容】

本申請案關於用來作爲淚膜補給品的眼用製劑。更具體的說，本發明關於欲用來滴入眼睛，或用來預先處理或貯存欲插入眼睛之物體（如：隱形眼鏡），或欲插入結膜囊的固體裝置的眼用調和物。所揭示之製劑可用來治療稱爲乾燥性角膜結膜炎，或乾眼症候群之疾病。一般而言，本發明之製劑亦可有效舒緩眼睛刺激之症狀，如：那些由乾燥環境條件，或由配帶隱形眼鏡所引起者。

尤其是，本申請案關於包含至少一種從乳汁衍生之糖蛋白成分的眼用製劑，以及其製備方法和用途。本申請案亦關於治療眼睛的方法，此方法係在醫師指示時，經由局部施用本發明之組成物來潤滑和保護眼睛表面，以舒緩乾燥和不舒服（如：患有乾眼及外傷或手術之患者所經歷者）之症狀，並取得上述之其它效果。在一種較佳之實施態樣中，本發明之組成物係以緩衝之無菌水溶液型式存在。本組成物可爲未經防腐保存的（以單一劑量版式提供）或可爲經防腐保存的（複數劑量版式）。這些組成物在供應時係置於加上合適之標示和用途指示的製藥容器中。

在一種較佳之實施態樣中，糖蛋白係從哺乳動物乳汁

或乳汁副產品中分離出。在另一種較佳之實施態樣中，糖蛋白係從牛奶中分離出來。而在另一種較佳之實施態樣中，糖蛋白係從牛奶乳清（製造乳酪時的一種副產品）衍生得來。爲了形成此文所揭示之眼用製劑，可使用其它常用於眼用調和物中的成分，以根據最終產物是否爲溶液、油膏、凝膠、乳劑或固體，來使生理上可接受之性質取得平衡。然而，需了解：糖蛋白可從多種其它來源衍生而來，只要該物質適合此文所描述之預定用途。

從下述之詳細說明中，本領域之技術熟習人士可察知和了解上述和本發明之其它特性和益處。

【實施方式】

[較佳之實施態樣的詳細描述]

糖蛋白爲相當重要之哺乳動物的膜的成分。構造上，其係由相當短之經共價連接至一蛋白質核心的一連串碳水化合物所構成。細胞表面之糖蛋白顯示出可用於辨識、胞間黏著和一些胞內運輸的調節中。細胞表面糖蛋白之改變爲致腫瘤轉形的一種特殊表型表現的事實強烈暗示著糖蛋白至少涉及數種細胞表面功能。吾人相信：本發明之糖蛋白具有生物活性。其可增進淚膜之產生和穩定性，尤其是，可增進水性眼淚和眼睛表面之糖蛋白、黏蛋白和黏液間的交互作用。糖蛋白之物理活性和交互作用的機制亦可促進保護眼睛表面。蛋白質之碳水化合物基團爲親水性的，並具有保持水分和增強眼睛上皮細胞表面之水性環境的能

力。糖蛋白可藉由其之存在、體積和水合作用，以及將病菌和碎屑結合在其碳水化合物側鏈中來提供物理保護機制。

乳汁中之脂肪球被包在膜內，此膜係從哺乳動物上皮細胞之頂端漿膜直接衍生而來。乳脂肪球膜（MFGM）容易大量取得，且與來自膜物質之頂端表面者相較下，來自牛奶的MFGM顯示出具有較高之純度。MFGM爲一種用來分離與細胞表面聯結（或更正確的說法爲，與頂端細胞表面之衍生物聯結）之糖蛋白的絕佳來源物質。過去20年來，已有許多說明用來從乳汁中分離出糖蛋白和決定其特性之程序的文獻資料。

以十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳法（SDS-PAGE）已偵測出牛MFGM帶有五至八種主要的糖蛋白。這些糖蛋白之表觀分子量的範圍可從約30,000至40,000道耳吞，最高可爲250,000道耳吞。大部分糖蛋白之表觀分子量係在30,000至40,000道耳吞的範圍內。亦曾從牛奶中分離出黏蛋白，且其表觀分子量約在100,000至250,000道耳吞之間。

乳汁（包括人類和動物）中天然含有豐富的蛋白質，包括多種糖蛋白。牛奶乳清（製造乳酪時的一種副產品）提供豐富且非常便宜之蛋白質來源。事實上，牛奶乳清以及從牛奶乳清衍生而來的產品長久以來已被視爲食品、食品添加物和營養補給品。

乳清蛋白質包含牛奶之二種主要蛋白質群中的其中一

種，另一群爲酪蛋白。酪蛋白約佔牛奶全部蛋白質之80%，而乳清蛋白質佔剩餘之約20%。乳清係以製造乳酪時的天然副產品型式衍生得來。除了蛋白質外，粗產品型中還含有脂肪、乳糖和其它物質。將粗產品型加以處理以從其它物質中製造出富含蛋白質之乳清蛋白質濃縮物（WPC）和乳清蛋白質分離物（WPI）。

乳清蛋白質含有不同功能之高-生物價值的蛋白質。主要之乳清蛋白質爲β-乳球蛋白和α-乳白蛋白，二種小球蛋白約佔全部乳清蛋白質之70至80%。存在量較少之蛋白質包括免疫球蛋白IgG、IgA和IgM，但較特別的爲IgG、糖配巨肽、牛血清白蛋白、乳鐵蛋白、乳過氧化酶和溶菌酶。乳清蛋白質亦含有從多種不同稱爲生物肽之蛋白質衍生而來的較小肽類。乳清蛋白質分離物之脂肪和乳糖的含量較低。

用於製備乳清蛋白質分離物的方法有多種。以離子交換方式衍生出之乳清蛋白質分離物的蛋白質含量較高，但糖配巨肽、乳鐵蛋白、乳過氧化酶和一些生物活性肽之含量較低。以微量過濾/超濾方式衍生出之乳清蛋白質分離物的蛋白質具有較高量之糖配巨肽、乳鐵蛋白、乳過氧化酶和生物活性肽，但牛血清白蛋白之含量較低。有趣的是，牛血清白蛋白與β-乳球蛋白和IgG1爲具有大量麩胺醯基半胱胺酸序列的蛋白質。麩胺醯基半胱胺酸爲麩胺基硫之先質。交-流微量過濾法可產生含有超過90%未變質之蛋白質的乳清蛋白質，其保留所有爲天然比例之重要次分餾部

分，並且不含脂肪或乳糖。

糖蛋白之回收和純化可利用本技藝所已知之標準方法來進行。這些包括，但不限於：膜過濾法和微量過濾法、切綫流動過濾法、色層分析法（如：尺寸排除、離子交換、親和力）、萃取法、吸附法、沈澱法（以非-溶劑、鹽類，等）、密度梯度分餾法、電泳法、電透析法、等電聚焦法、酸或鹼水解法，及凝乳酶水解法。

本發明之糖蛋白的分離和回收過程包括一種經特別設計，以去除乳汁和乳汁副產品中之下列成分的熱處理步驟和絮凝步驟：乳鐵蛋白；免疫球蛋白；β-乳球蛋白；α-乳白蛋白；和牛血清白蛋白。

乳鐵蛋白爲蛋白質之轉鐵蛋白族中的一員。其爲一種從乳汁和乳清分離出的與鐵結合的糖蛋白。其在腺體表皮之表面、分泌物和黏膜表面上，以及組織間隙和血管腔隙中可發揮其緊密結合和代謝鐵的作用。其在活體內的角色包括疾病防禦和調節發炎及免疫反應。

免疫球蛋白爲構成不同類別之抗體，如：IgG、IgM，等之分子的通用名稱。

β-乳球蛋白爲反芻動物和一些非反芻動物（如：豬和馬）之乳汁中的主要乳清蛋白質。雖然，β-乳球蛋白係在60年前首次分離出，但並未確定β-乳球蛋白具有何種功能。最近，X-光結晶學研究提出β-乳球蛋白之構造的資料，此構造與和視黃醇結合之蛋白質及來波卡利辛（lipocalycins）的構造一致；這些蛋白質之功能似乎爲參與

運送小疏水性物質。類似地，這意味此種蛋白質亦可作爲脂肪酸和視黃醇之運輸物質。此評論根據過去幾年所累積之大量資料重新評價β-乳球蛋白的功能。尤其是，此評論集中在視黃醇和脂肪酸結合至β-乳球蛋白之研究上，包括結合常數和結合部位的數量、結合部位的位置，以及化學修改對蛋白質與二種配體之交互作用的影響。此研究中亦描述β-乳球蛋白對數種可能與此蛋白質之可能的生物學角色相關的生物過程之影響的研究。

α-乳白蛋白爲一種含量豐富之與溶菌酶具有演進關係的乳汁-特異性鈣金屬蛋白質。其藉由形成乳醣合成酶二元複合來修改高基氏半乳糖基轉移酶之受質特異性。乳糖，以及其它糖類和可擴散之離子爲造成乳汁滲透壓的原因。爲了評估α-乳白蛋白在乳汁生成過程中的涉入情形，經由在胚胎幹細胞中進行同源重組來破壞基因，以製造出缺乏α-乳白蛋白之小鼠。同質接合之變種小鼠可存活且具有生育力，但母鼠無法餵哺其後代。其製造高黏度之乳汁以致於小動物們似乎無法從乳腺吸出乳汁。此乳汁含有豐富的脂肪和蛋白質，但缺乏α-乳白蛋白和乳糖。異質接合小鼠之表型爲介於中間的，與野生型動物相較下，其乳汁之α-乳白蛋白含量減少40%，但乳糖含量僅減少10-20%。這些結果強調α-乳白蛋白在乳汁生成過程中的重要性，並且開啓控制乳汁組成物的新機會。

牛血清白蛋白來自血清；其並非在乳腺中合成。推測其係藉由細胞旁側途徑經由“滲漏”，或藉由與其它成分（

如：免疫球蛋白）一起攝入來進入乳汁內。運送血清白蛋白穿過分泌細胞的機制似乎並非一種更特別的機制。在乳腺炎期間和乳腺退化期間，乳汁中的血清白蛋白的濃度會特別增加。乳汁中之血清白蛋白的功能目前未知。其確實結合脂肪酸和其它小分子。

所有上述列舉之乳汁蛋白質均在回收本發明之糖蛋白的過程中被具體去除，以防止誘發敏感的可能性。使用含任何上述蛋白質之眼用產品的個體可能有“過敏”或“免疫”反應的經驗。因此，本發明之糖蛋白被視爲“生物相容的”，且可安全用在乾眼製劑中。

本發明之糖蛋白爲似黏蛋白之物質，其分子量可在數千至十或二十萬道耳吞之間變化。本發明之糖蛋白含有從約4%至約15%之寡醣。本發明之糖蛋白性質强韌，且可以熱壓消毒，而不會有明顯降解或化學改變。

科學文獻中揭露數種用於決定不同類型之糖蛋白的特性的技術。這些技術包括，但不限於：色層分析技術或一或二因次凝膠電泳法，尤其是SDS-PAGE，再進行直接蛋白質染色（如：銀染色）或免疫組織化學染色（如：西方點墨或北方點墨）和影像分析、免疫沈澱技術、胺基酸分析、碳水化合物測定、外源凝集素結合探針、光散射、掃描電子顯微鏡、質譜儀、肽之定序、MALDI、蛋白質之氮含量和灰分。

當將糖蛋白從乳汁脂肪球蛋白中分離出時，其可以複合物的型式存在。此複合物可含有其它成分，如：脂質、

磷脂質、脂蛋白和寡醣。這些複合物之表觀分子量爲從200,000至500,000道耳吞或更大。當操作本發明時，可使用糖蛋白本身或糖蛋白之複合物。

雖然未堅持於任何一種學說，吾人相信本發明所描述之糖蛋白可保護和潤滑眼睛表面，就如由整個結膜和角膜的表面表皮所表現之天然表面糖蛋白和黏蛋白的作用般。經由在天然表皮之表面補充糖蛋白可增進眼睛表面之潤滑和保護作用，以減緩眼睛表面表皮之症狀和變化的進展和相關發展，如：降低之淚膜穩定性、以螢光和孟加拉玫瑰染色之染色增加、高腳杯狀細胞密度降低、眼睛表面疾病可見到之鱗狀細胞變生的發展。在較佳之實施態樣中，黏性之性質主要係用來協助將本發明維持在眼睛表面，並用來潤滑和使滴入感舒適。黏性並非賦予本發明之糖蛋白調和物"擬黏液"功能的物理特性。本發明主要係保護和潤滑眼睛表面並與淚膜所分泌出之用於形成凝膠的黏液交互作用，以藉此增進淚膜之散佈，並經由滴入來加入淚膜體積和使眼睛表面水合來避免乾燥問題。本發明之“擬黏液”效果可保護眼睛表面免於乾燥，並吸收眨眼時的剪力，且協助眼睛自行分泌形成凝膠的黏液（主要爲MUC5）來維持其黏性彈力性質，並確保淚膜之構造和穩定性，以藉此減緩或預防在乾眼情況中所見到之眼睛表面的改變。

在眼用調和物中之糖蛋白的量根據產物型式可有很大的變化。例如：在隱形眼鏡相關溶液中，糖蛋白濃度之變化可從約0.0001重量%至5.0重量%。在乾眼之製劑中，糖

蛋白水準之變化可從約0.1重量%至10.0重量%。在固體眼睛插入物遞送裝置中，糖蛋白水準之範圍可爲約90重量%或更多。在各類型之製劑中，濃度可根據如：欲治療之乾眼狀況的嚴重性這類因素來變化，以增強糖蛋白溶液之特殊性質。這些範圍係用來說明，而非用來限制申請專利之範圍。

示範性之眼用組成物包括來自此文先前描述之任何數量的示範性來源的糖蛋白。另外，可依需要使用其它調和物成分。這類調和物成分的實例包括，但不限於：

黏化劑

纖維素衍生物常用來增加黏性。特殊之纖維素衍生物包括：羥丙基甲基纖維素、羧甲基纖維素、甲基纖維素、羥乙基纖維素，等。亦可使用一些多醣來增加眼用溶液之黏性，其包括：黃原膠、硬聚葡糖、角叉菜膠、西黃蓍膠、玻尿酸，等。其它可使用之黏化劑包括：聚乙烯吡咯啶酮、聚乙烯醇、聚氧化乙烯、聚丙烯酸和交聯之聚丙烯酸。一般而言，黏化劑之存在量可爲溶液之0.1重量%至0.75重量%。

緩衝劑

任何藥學上可接受之緩衝劑系統均可使用，且包括磷酸鹽、硼酸鹽、檸檬酸鹽、醋酸鹽和碳酸鹽，其使用量爲可產生約6.0至約8.0之pH的量。

張力劑

此文所描述之眼用溶液的張力可藉由使用本技藝所已知之常用物質調整爲相對於正常眼淚而言爲低張、等張或高張之溶液。其它試劑包括右旋糖、甘露糖醇、山梨糖醇和　。

致濕劑

結合水之化合物可協助保持眼睛表面之濕度，其包括：甘油、丙二醇、聚乙二醇。

潤濕劑

一些化合物可用來促進表面濕潤，不論爲眼睛之表面或隱形眼鏡之表面。較佳之一類爲波利沙姆。這些聚氧化乙烯-聚氧化丙烯-聚氧化乙烯共聚物可從BASF取得。其它化合物包括泰羅尼®（Tetronics®）、逆轉普朗尼®（Pluronics）®和逆轉泰羅尼®，其亦來自BASF。

防腐劑

本發明之組成物可包括有效量之防腐劑。本技藝所已知之防腐劑包括二氯化苯二甲烴銨（BAK）、六氯酚葡糖酸酯（CHG）、聚己二雙胍（PHMB），其它波利夸特（polyquats）和山梨酸。本組成物亦可包含輔-防腐劑及/或螯合劑，如：乙二胺四醋酸（EDTA）及其鹽類。

其它添加劑

在一些情況中，在眼用溶液中還包括其它成分可能較有利。這些成分包括特殊離子，如：Ca^{++}、Zn^{++}和Mg^{++}、Cu^{++}、硒、維他命，如：A、C和E，以促進眼睛健康。本發明中所描述之組成物亦可作爲用於遞送藥物之載劑。經常用於眼睛之藥物包括抗-青光眼化合物、抗-發炎劑和抗感染劑。

如前述，本發明在作爲潤滑之眼藥水（也就是人工眼淚溶液）、眼淚流體補充品、用於局部施用眼藥之遞送載劑上有特殊用途。在大部分的這些應用中，本發明之組成物通常係在緩衝之無菌水溶液中。通常，這些溶液之黏性從約1至100cps。本發明之組成物的溶液係以眼藥水的型式配發入眼睛。然而，需了解的是，本發明所描述之組成物亦可調配成黏性液體（也就是黏性從數百至數千cps）、凝膠或油膏。在這些應用中，糖蛋白成分可，如：分散或溶解在合適之載劑，如：路伯膠（Lubragel）、GRP潤滑膠凍（GRP Lubricating Jelly）或可樂膠（Karajel），其均爲紐約霍鮑格市聯合管理公司的註冊商品。

本發明之組成物亦可調配成固體之眼睛插入物，其在置入眼睛盲管時可在一段時間後溶解或腐蝕。

膨脹-控制之釋出裝置係由均勻分散在聚合物（如：水溶性纖維素）中之糖蛋白所組成。當將插入物置於眼睛內時，眼淚流體開始滲入基質，接著，基質膨脹，最後再

溶解。當此過程發生時，糖蛋白釋入眼中並在一段長時間內舒緩乾眼症狀。

可腐蝕之裝置亦由均勻分散在聚合物基質中之糖蛋白所組成。在此情況中，糖蛋白係經由可使基質聚合物（通常在裝置之表面上）增溶溶解之化學反應（水解）釋出。通常，基質物質爲一種聚酐、聚（原酸酯）、聚醋酸或聚乙醇酸。

在另一種實施態樣中，糖蛋白可經過化學修改或交聯，以作爲其本身之“基質”，其中該糖蛋白包含全部，或接近全部的裝置，如此，可提供眼睛最大量之可利用的糖蛋白。

再者，在一些與隱形眼鏡相關之實施態樣中，此文所揭示之糖蛋白可併入隱形眼鏡浸泡和調理溶液，以及隱形眼鏡配帶者使用之潤滑眼藥水中。

在另一種實施態樣中，糖蛋白可用於遞送藥物。遞送眼藥之最常用和方便的方法爲藉由局部眼藥水來遞送。一般而言，所使用之溶液載劑被眼淚流體快速稀釋，並在數分鐘內從眼睛流乾。此短暫的停留時間妨礙藥物在眼內吸收因而影響其生物可利用性。通常，短暫的停留時間可藉由大幅增加藥物濃度來克服，以改良生物可利用性。此點通常會因爲現在開立之多種眼藥的系統作用，而造成相當不舒服的副作用。

有許多研究係用來改良藥物載劑在眼睛表面的停留時間，並促進藥物和載劑之交互作用或聯合作用。一種已商

品化的方法係使用交聯之羧基-官能性聚合物，如：由B.F.古德立（B.F.Goodrich）所供應之卡伯普®（Carbopol®）。如U.S.4,615,697和U.S.5,188,826（其全文併爲此文之參考資料）中所述，此聚合物之生物黏附性質爲控制眼用調和物之釋出的基礎。這些交聯之羧基-官能性聚合物在水溶液中會膨脹，但仍維持爲微米大小之水合顆粒。再者，在中性pH下，其本質大體上爲陰離子性。由於許多眼用藥物，如：提嗎洛爾（timolol）和匹羅卡品（pilocarpine）爲帶有正電荷的，因此其可透過靜電之交互作用與負電荷之聚合物粒子聯結。還有，由於水合顆粒爲微孔性，藥物可被吸入基質中。當將此型之眼用溶液置於眼中時，水合之聚合物顆粒黏附於黏膜表面而使停留時間延長。在這段停留時間中，藥物從水合之聚合物顆粒中釋出，如此可更有效地將藥物局部遞送給眼睛。

本發明之糖蛋白在與乳房表皮細胞之漿膜聯結時被視爲具有“生物黏著”的功能。基於此資料，個人預期本發明之糖蛋白係以類似於交聯之羧基-官能性聚合物的作用方式作爲眼用藥物之遞送載劑。實際上，由於本發明之糖蛋白不僅具有可與表皮表面交互作用之能力，亦可與淚膜中之天然黏膜交互作用，因而可提供優越之停留時間。

本發明提供用於治療稱爲乾眼之眼睛狀況的眼用製劑。就此而言，在一些實施態樣中，本發明可被形容爲用來治療哺乳動物體內之乾眼疾病的方法，此方法包含將可有效提供該哺乳動物療效之糖蛋白化合物的量投給該哺乳動

物。本發明還有一種觀點爲經由一投給該哺乳動物爲醫囑之標準基礎成分來持續治療哺乳動物的方法。在本發明之某些較佳實施態樣中，接受糖蛋白化合物之哺乳動物或患者可爲人類或動物。再者，用於所揭示之眼用製劑和方法中的糖蛋白化合物爲從乳汁或乳汁副產物衍生之糖蛋白。如此文中所揭示，及本發明之製劑和方法中所使用者，糖蛋白化合物可配製成溶液、油膏、凝膠、塗劑或固體。

此文中所描述之有效劑量包括，但不限於：當以眼用溶液之型式遞送時，每一劑量含有從約0.01毫克至約5毫克之糖蛋白化合物。當眼用載劑爲凝膠或油膏時，所遞送之糖蛋白的量爲每一劑量至多約20毫克。若糖蛋白爲眼睛插入物之型式時，引入眼睛之糖蛋白的量可爲至多約150毫克。需注意的是，在眼睛插入物的情況中，糖蛋白係經由在延長之時間內連續釋出來遞送。藥學技藝中之人士熟知：開立之藥物係根據患者是否爲人類和疾病之類型和嚴重性而定。本發明之眼用製劑係在本技藝之人士的技術範圍內。在一種描述有效劑量之替換方法中，在某些實施態樣中之有效量可描述爲能有效達到減少患者之乾眼的癥候及/或症狀的量。

較佳之調和物包括其中糖蛋白係調配成眼睛插入物的眼用組成物。較合適地爲，糖蛋白係調配成油膏、塗劑或凝膠。最合適地爲，糖蛋白係調配成眼用溶液。

在某些觀點中，本發明包括同時有單位劑量和複數-劑量二種型式之藥學組成物。這些組成物可用來治療乾眼

，其包含之糖蛋白量可在定期投服其一或更多個劑量時有效地穩定或減輕該患者之乾眼癥候及症狀。

還有，在某些觀點中，本發明包括同時有單位劑量和複數-劑量二種型式之獸醫組成物。這些組成物可用來治療動物之乾眼，其包含之糖蛋白量可在定期投服其一或更多個劑量時有效地穩定或減輕該動物之乾眼癥候及症狀。

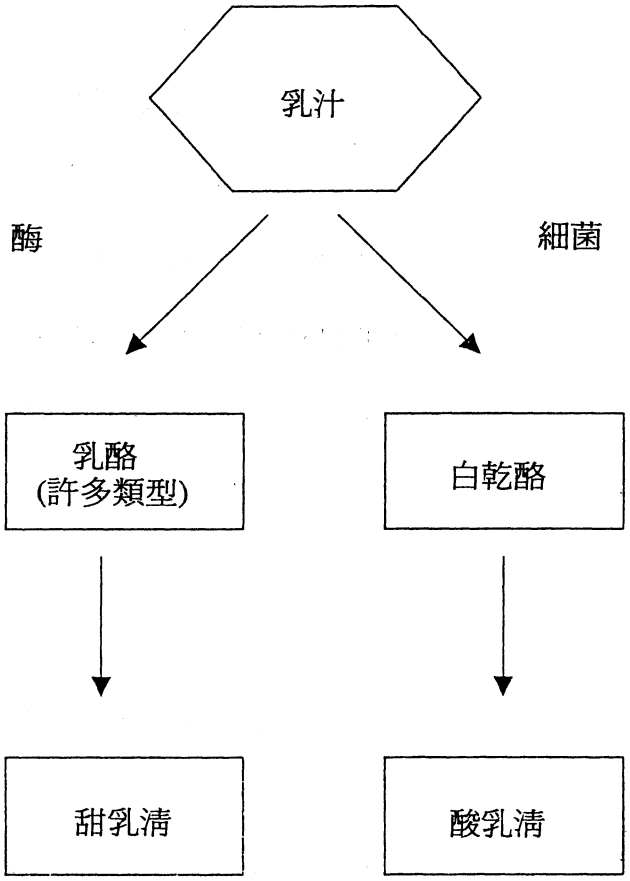
本發明之一種觀點亦可形容爲用於發送至接受乾眼治療患者，或者用於發送至接受乾眼症候群治療之哺乳動物時所使用的治療包，其包含：一個或更多個劑量，各劑量係從單位劑量容器或複數-劑量容器中遞送出。此劑型含有本發明之糖蛋白，如此，在定期投藥及定期投服該劑量時，其該一個或更多個單位劑量可有效穩定或減輕該哺乳動物之乾眼癥候及症狀，此治療包還包含一製造好的配藥容器或用於此方面之包裹，該容器含有該單位劑量或複數劑量，及指示該包裹於哺乳動物之治療中的用途的標示。

本發明之溶液、塗劑、油膏或凝膠型式的眼用治療製劑可包裝在單位劑量或複數劑量容器內。患者根據醫囑之養生法來使用該包裝產品。通常，在眼用溶液產品的情況中，患者依醫囑及/或依需要將一或更多滴溶液滴入眼中。產品容器和相關之包裝上印有根據當地、聯邦和外國政府之條例的證明、資料和指示。通常亦需要包括“包裹插頁”。“包裹插頁”將提供關於內含物、作用、適應症、禁忌症、警示、如何供應、安全資料和預防措施，以及使用指示的資料。

下列實例係用來說明本發明之操作，而非限制其範圍。

實例 1

乳清爲製造乳酪時之副產品，製造時係從乳汁開始，並可分成二種程序，其中主要的程序涉及以酶處理乳汁，而次要的程序涉及以細菌處理。

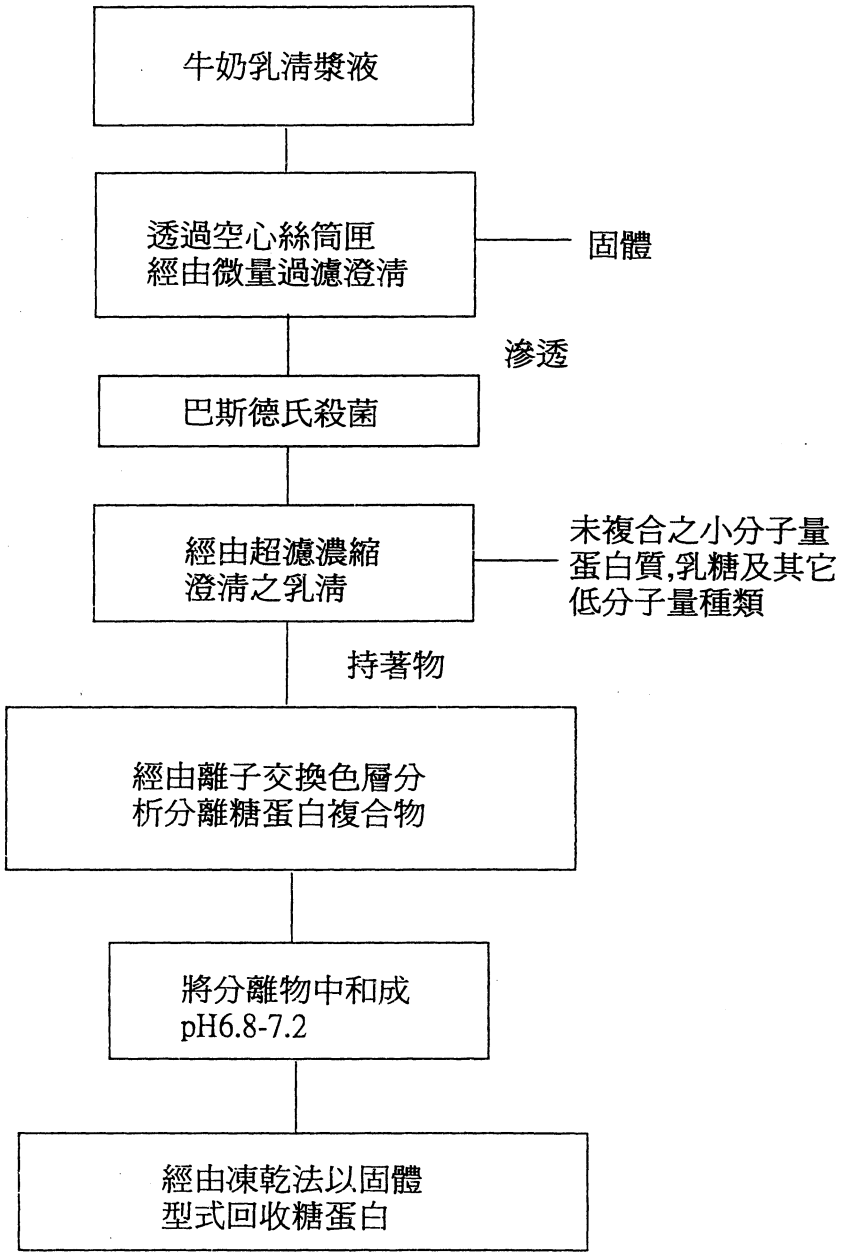


甜乳清佔所產生之乳清的80%，且其爲一種不昂貴並容易取得之糖蛋白來源。

實例 2

此實例概述用於從甜牛奶乳清回收本發明之糖蛋白的

程序。需注意的是在回收本發明之糖蛋白的程序中可使用其它處理步驟，此實例並非用來作爲限制。



實例 3

下表描述從牛奶乳清衍生之糖蛋白的物理和化學性質。

組成物	第1批	第2批	第3批	第4批	第5批	第6批
蛋白質(%)	67.0	60.7	61.4	67.4	66.4	66.3
脂質(%)	21.0	22.2	25.6	19.4	22.1	19.7
灰分(%)	3.5	4.3	3.5	3.7	3.8	3.6
濕度(%)	5.9	7.8	1.9	2.2	2.2	4.1
pH	-	6.7	6.9	6.9	6.9	6.9

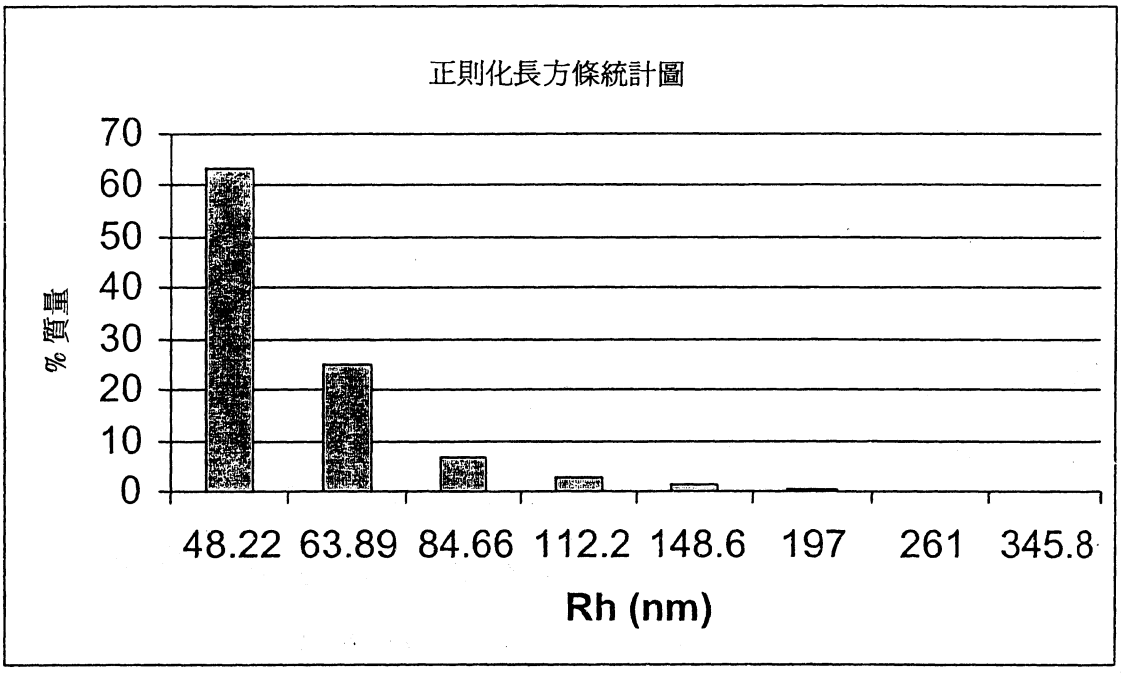
注意：上列數值係以重量百分比記錄。經由利可（Leco）燃燒測定蛋白質。經由莫瓊尼爾（Mojonnier）方法測定脂質。經由熱和真空下之重量損失來測定濕度。經由AOAC灼燒試驗來測定灰分。在磷酸鹽緩衝溶液中測定在1%濃度之pH。

上述之糖蛋白稱爲“米爾辛®（Milcin®）”，其爲維士塔科學公司（Vista Scientific）的一種商標。

實例4

實例3中所描述之糖蛋白爲大體上由蛋白質與物理聯結之脂質所構成的複合物。此複合物以水膠體之型式存在於水溶液中。在硼酸鹽緩衝液，pH7.2中製備1重量%之第4批米爾辛（實例3）的分散夜，滲透重量莫耳濃度爲300。然後，藉由使用配備有佩提爾（Peltier）温度控制裝置之蛋白質溶液DynaPro MS/X儀器進行動力光散射分析，以測定米爾辛®水膠體之顆粒大小。以製造者所提供之達納米（Dynamics）5.26.38版軟體分析所產生的數據。利用正則

化方法取得網格大小爲100之結果。從數據製作下列長方條統計圖。

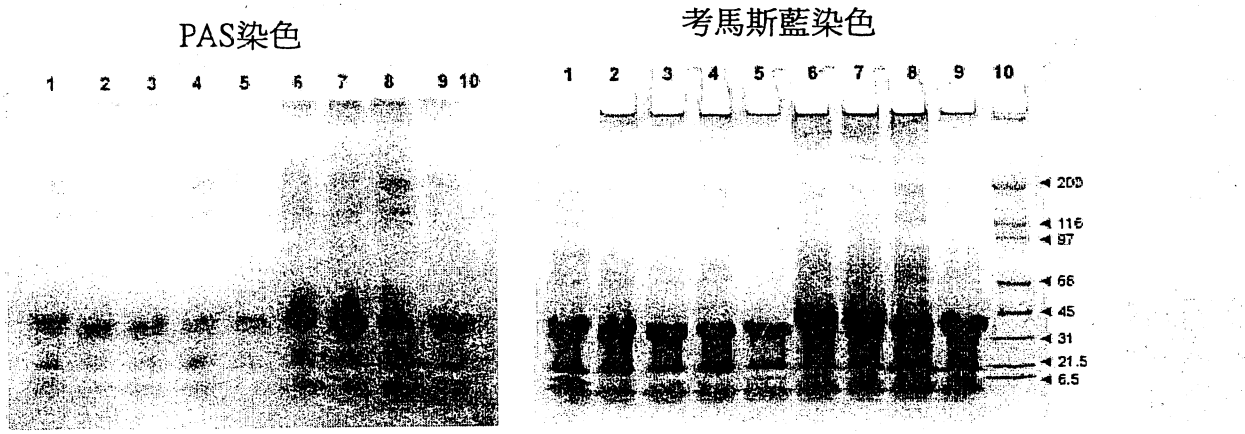


從結果中可見到米爾辛®水膠體之主體的水動態半徑爲約40奈米至約60奈米。有少量之物質的水動態半徑爲約100奈米。

實例5

使用SDS-PAGE，以分子量之函數的型式來分離包含在米爾辛®複合物中之糖蛋白。此係透過蛋白質與十二烷基硫酸鈉（SDS）之交互作用來提供蛋白質一負電荷來達成。當將蛋白質置於凝膠中，並加上電場後，蛋白質之移動情形爲其電荷對分子量的函數。以SDS提供所有蛋白質相同電荷，使蛋白質在凝膠中之移動情形僅爲分子量之函數，而可根據分子量分佈成帶狀。同時操作已知量之蛋白質分子量標準來示範分子量位置。先將所產生之凝膠氧化

，再以謝夫（Schiff）試劑染色以僅顯現出糖蛋白帶（糖蛋白染成粉紅色）。將粉紅染色去除，再以考馬斯藍染料將凝膠再度染色。考馬斯藍試劑僅染出蛋白質帶（蛋白質染成藍色）。以此方式可鑑定出存在於米爾辛®物質中之糖蛋白和其它蛋白質。下列示圖呈現多種米爾辛®樣本（見實例3）之分子分析。由其中可見到大部分之米爾辛®係由糖基化之蛋白質所構成。這些糖基化之蛋白質的分子量範圍係從約2000道耳吞至約200,000道耳吞。米爾辛®組成物之主體顯示出爲在約20,000至100,000道耳吞之分子量範圍內的糖蛋白。



實例6

下列實例說明用於從米爾辛®萃取脂質的方法。以下述方式精確萃取第4批米爾辛®（見實例3）之樣品。以甲醇萃取約1克之米爾辛®（實例3，第4批）1小時，並過濾出固體。然後，將固體再懸浮在15毫升己烷中，並萃取1小時。過濾出固體，並在真空中乾燥1小時。所產生之樣本不含脂質。

實例7

糖蛋白爲含有碳水化合物側基團之蛋白質或蛋白質片段。碳水化合物之量可在總糖蛋白之10重量%或更少至超過50重量%間大範圍地變化。糖蛋白通常含有N-連接和O-連接之寡醣類。此實例分析實例6中所萃取出之米爾辛®的中性單醣和涎酸含量。將實例6之萃取脂質的米爾辛®送去麻省渥塞斯特市温索街25號（25Winthrop St., Worcester, MA）的葛來可溶液公司（Glyco Solutions Corp）分析。結果列於下。

中性單醣之分析（微微莫耳/8微克樣本）

巖藻糖	BLQ*(微微莫耳)
GAlNac	775微微莫耳
GlcNAc	573微微莫耳
半乳糖	1183微微莫耳
甘露糖	696微微莫耳

低於合格之限制

從上列數值可計算出每8微克樣本含有0.636微克碳水化合物，或8%中性碳水化合物。此係計算除了無法藉由此分析測量出之任何帶電的單醣（例如：涎酸）以外的總碳水化合物。

涎酸分析（微微莫耳/8微克**樣本）

NeuAc	1100微微莫耳
NeuGc	16.5微微莫耳

**將數值對8微克樣本標準化，以使其與先前之單醣組成物數值一致。

從注射12.5%水解產物測量出NeuAc值，並從注射25%水解產物來測量出NeuGc值。從上述數值可計算出每8微克樣本含有0.346微克涎酸，或4.3%涎酸。

從上述數據可得知樣本（不含脂質之米爾辛®）含有約12至13重量%之總碳水化合物。此結果係以所有碳水化合物均已水解爲根據。若情況並非如此，則真正的碳水化合物含量將較高。

實例8

乳汁產物通常含有乳糖，除非將其特意去除。此實例提出米爾辛®糖蛋白複合物中之乳糖含量的資料。由麻省渥塞斯特市溫索街25號的葛來可溶液公司來分析實例6之萃取出脂質的米爾辛®樣本的乳糖含量。

此分析揭露米爾辛®樣本不含乳糖（每100毫克樣本含有少於34微克之乳糖）。這指出用於從牛奶乳清回收米爾辛®糖蛋白複合物的方法可有效排除爲雜質之乳糖。

實例9

從牛奶乳清分離出之本發明的糖蛋白含有少量與蛋白質複合的脂質。下列實例說明從米爾辛®萃取出脂質，以及經由脂質色層分析法（TLC）鑑定那些萃取出之脂質的方法。

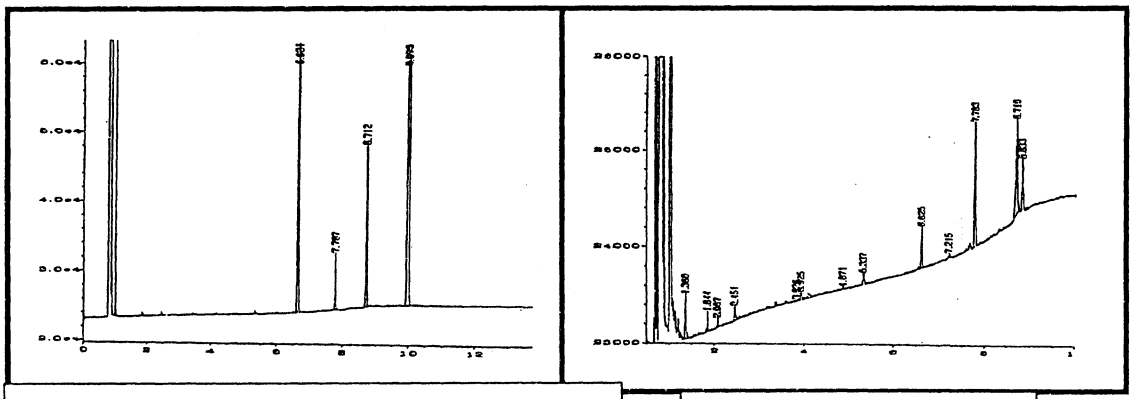
將矽膠盤在100 ℃活化30分鐘，並保持在真空乾燥器中。利用多種不同之己烷/二乙醚溶劑系統來發展色層分析譜，再以飽和之乙醇性磷鉬酸溶液染色，以供目視檢查。將結果與在經適當選擇之溶劑系統中的對照脂質的R_f值進行比較，以探查脂質分液中之各類脂質。下表摘要萃取物和色層分析譜之結果。以甲醇依序將各批（見實例3）萃取三次。在質量測定方面，先將所有甲醇分液合併，然後，在真空器中去除溶劑，並將殘質稱重。

	第1批之米爾辛®	第2批之米爾辛®
樣本重量	995毫克	1020毫克
醣蛋白	781毫克	800毫克
脂質	108毫克	173毫克
TLC結果	MeOH:烷基酯、三酸甘油酯、脂肪酸和極性酯類	MeOH:烷基酯、三酸甘油酯、脂肪酸和極性酯類

結果指出米爾辛®含有約10至20重量%之鬆散結合的脂質，也就是可藉由甲醇萃取出者。這些脂質主要爲烷基酯、脂肪酸、極性脂和三酸甘油酯類。

實例10

將從實例6中之米爾辛®萃取出的脂質經由氣態色層分析法進行分析。將一系列比例爲1：10：3：30[根據脂肪酸含量]之脂質、磷脂醯膽鹼二肉豆蔻酸酯、膽固酸油酸酯和花生酸進行甲基轉移。將所產生之脂肪酸甲酯進行高解析氣態色層分析，並產生下列之FAME標準。各H-P 1管柱上之各波峰的保持時間與FAME之分子量成比例。整合這些波峰顯示出起始脂質以其脂肪酸甲酯之型式定量回收。將實例6中回收之脂質進行類似之萃取和轉酯處理可產生下示之FAME略圖。在來自實例6之萃取出的脂質中，吾人可鑑定出肉豆蔻酸酯、棕櫚酸酯和油酸酯。未發現花生酸酯。



肉豆蔻酸甲酯 [C_{14}] 保持時間=6.60分
棕櫚酸甲酯 [C_{16}] 保持時間=7.78分
油酸甲酯 [C_{18}] 保持時間=8.71分
花生酸甲酯 [C_{20}] 保持時間=9.97分
之FAME標準

從第4批米爾辛™
(見實例6)萃取出
之Fame類

實例11

本發明之糖蛋白可預期含有一般金屬離子。爲了證明這些金屬離子之存在可使用直流等離子區（DCP）發射分光法。此技術實質上爲一種原子吸收技術，其中光譜之發

射係在偶合電極之陰極和陽極間的等離子區中形成。此技術爲定量的。將第4批米爾辛®（見實例3）以1,000ppm之濃度溶解在去離子水中。加入硝酸（1ppm）。採用正確的DCP程序，包括用於多-元素分析之二-點校正（10 ppm，0 ppm）。結果列於下表中，表中並反映各金屬之六次測量的平均值。

金屬	測量之濃度*(ppm)	純米爾辛中之質量百分比
鎂	0.67±0.02	0.067%(670ppm)
鉀	1.8±0.1	0.18%(1,800ppm)
鈉	8.6±0.3	0.86%(8,600ppm)
銅	0.06±0.20	0.006%(60ppm)
鋅	0.2±0.2	-

測量出之濃度爲在第4批之純米爾辛®的1000 ppm溶液中的金屬濃度。

實例12

下列實例說明使用本發明之糖蛋白來作爲用來治療乾眼徵候和症狀之眼用溶液的活性成分。

成分	以克計之量
第4批之米爾辛®	1.05
羥乙基纖維素納特羅梭250M製藥 (Natrosol 250M Pharm)	0.4
氯化鈉	0.48
硼酸鈉十水合物	0.12
硼酸	0.74
水	97.21

以下述方式製備：

1. 稱出水重，並將其加入配有一攪拌儀器之合適的燒杯中。
2. 一邊攪拌，一邊將氯化鈉、硼酸鈉十水合物和硼酸加入水中。
3. 持續攪拌直至鹽類全部溶解，約10分鐘。
4. 一邊劇烈攪拌，一邊將米爾辛®慢慢加入此批中。
5. 持續劇烈攪拌，直到米爾辛®均勻分散，約30分鐘。
6. 一邊適度攪拌，一邊將羥乙基纖維素慢慢加入此批中。
7. 持續以中等速度攪拌2小時。
8. 去除此批中之氣體15分鐘。
9. 將一整批置於合適之密封容器中壓熱滅菌。
10. 將此批在121℃壓熱滅菌60分鐘。

11. 從壓力鍋中移出溶液容器。

12. 打開容器，並將此批進行試驗。

13. 一旦製備好，測試上列之調和物，並測定下列溶液之性質。

性質	數值
黏性,cps	24
滲透重量莫耳濃度,毫滲透/公斤	304
pH	7.2
外觀	輕微混濁
顏色	藍色

實例13

此實例利用玻管內穿透上皮之滲透性分析來說明本發明之糖蛋白的眼睛相容性。

評估眼用溶液中，1.05%之米爾辛®可能具有之刺激。亦同時評估由愛樂根（Allergan）製造和銷售之商品，潤滑劑眼藥水“清新淚水（Refresh Tears）”。

利用實例12中所詳列之化合程序來製備下列溶液調合物。將完成之溶液以無菌方式轉移入消毒過之瓶內。

成分	A	B
第4批米爾辛®,克	-	1.05
羥乙基纖維素特羅梭250M製藥,克	0.40	0.40
氯化鈉,克	0.48	0.48
硼酸鈉十水合物,克	0.12	0.12
硼酸,克	0.74	0.74
水,克	98.26	97.21

將上表所描述之溶液進行下列實驗，以測定該溶液可能具有之眼睛刺激。實驗方法係依照R.Tchao所研發之程序進行，其描述於“Trans-Epithelial Permeability of Fluorescein In Vitro as an Assay to Determine Fye Irritants”, Progress in In Vitro Toxicology, Volume 6, 1988, pages 271-283(Mary Ann Liebert, Inc. Publishers, New York)中，其揭示內容併爲此文之參考資料。Tchao之技術爲一種測定物質所可能具有之眼睛刺激的方法，其係將物質對馬汀-達比（Madin-Darby）狗腎（MDCK）單層細胞之傷害相關聯結至物質對角膜細胞之傷害。通過單層細胞之螢光量爲單層細胞之滲透性的函數。較高之單層細胞滲透性表示施用其上之測試溶液對細胞接合處之傷害較大，而較低之單層細胞滲透性則表示測試溶液對細胞接合處之傷害較小。

測試細節說明於下。

培養製品：從ATCC取得MDCK細胞，並將其維持在補充以10%小牛血清，並加上鐵（海克隆（Hyclone），猶他州）的最低必須介質（MEM）中。利用胰蛋白酶和EDTA每週轉種貯存之培養。使用第50代之前的培養。在測試時，將0.5毫升含2x10 E5細胞之細胞懸浮液接種在米厘塞爾（Millicell）HA 13毫米插入物（米厘波（Millipore），麻省貝德福市）中。將插入物置於24-槽盤中，並餵入0.5毫升介質。接種細胞二天後，以新鮮介質取代在插入物內和外之介質。接種後第6天，使用插入物來測試溶液。結果顯示出由融合之MDCK單層發展出的抗性約600歐姆/平方公分。

試驗：利用無針頭之10毫升注射筒，以漢克斯平衡的鹽溶液（HBSS）3x1毫升清洗各插入物。將各測試溶液（0.5毫升）加入已置於新鮮之24-槽盤中的插入物內。各測試溶液均使用三份插入物。將帶有插入物之24-槽盤和測試溶液置於37℃，潮濕之培養箱中30分鐘。依序處理各系列之三份插入物，以使處理之時間精確。培養後，利用10毫升注射筒，以HBSS 5x1毫升個別清洗各插入物，並將其置於新鮮之24-槽盤中的各個含0.5毫升HBSS的槽中。將0.5毫升Na-螢光（3毫克/100毫升）之溶液加入各清洗之插入物。在室溫中培育30分鐘後，將插入物依序從槽中移出，並在CytoFluor2300中，利用在540nm之激發和在590nm之發射來測量各槽中之Na-螢光的量。各試驗之陰性對照組爲HBSS，而陽性對照組爲250微克/毫升之十二烷基硫酸

鈉（SDS）。此分析已經測定可用來測量50微克/毫升SDS之效果，而對單層之滲透性的效果則與在50-250微克/毫升範圍內之SDS的濃度成線性比例。將各測試溶液之螢光單位（任意的）對測試溶液繪圖。

結果之說明：以SDS反應之%表示結果，並與HBSS之反應相比較。一般而言，若溶液爲SDS反應之20%，則此溶液可能爲輕微刺激。

玻管中之可能的刺激性試驗結果與陽性和陰性對照組的結果一起列於下表中。已知當將陽性對照組（250ppm十二烷基硫酸鈉（SDS））滴入人類眼睛時可引起引人注意之刺激。已知當將陰性對照組漢克斯平衡的鹽溶液（HBSS）滴入人類眼睛時不會引起任何逆反應。結果以SDS反應之百分比表示，也就是SDS=100%反應。任何少於20%之反應表示組織變化很少或無，且被視爲非-刺激性的。

溶液	反應
SDS(250ppm)	100
溶液A	0.64±0.1
溶液B	0.86±0.1
新鮮眼淚	2.45±0.5
HBSS	3.00±0.5

從結果可知米爾辛®溶液（B）之反應與對照組溶液（A）相同，且二者均遠低於陰性對照組HBSS之反應。根據此數據，以米爾辛®爲基礎之眼用溶液應與眼睛環境完

全相容。

實例14

下列實例說明本發明之糖蛋白在熱壓消毒方面之強韌性。該調和物列於下：

成分	以克計之量
第4批之米爾辛®	1.05
羥乙基纖維素納特羅梭250M製藥 (Natrosol 250M Pharm)	0.4
氯化鈉	0.48
硼酸鈉十水合物	0.12
硼酸	0.74
水	97.21

經由實例12中所給予之詳細方法來製備，但將半批進行熱壓消毒，半批則不（僅進行實例12中之步驟1至8）。

一旦製備好，測試二種代表二種方法條件之調和物，並測定下列之溶液特性。

	熱壓消毒前	熱壓消毒後
性質	數值	數值
黏性,cps	37	24
滲透重量莫耳濃度,毫滲透/公斤	293	304
pH	7.2	7.2
外觀	輕微混濁	輕微混濁
顏色	藍色	藍色

上述結果確認米爾辛®的強韌性，並證明含有米爾辛®之眼用溶液具有可經由熱壓消毒來滅菌的能力。

實例15

下列實例說明不含脂質之糖蛋白在眼用溶液中的用途。使用實例6中回收之萃取出的糖蛋白作爲下述眼用溶液調和物中的活性成分：

成分	以克計之量
萃取出之米爾辛®（見實例6）	1.00
羥乙基纖維素納脫羅梭 250M 製藥	0.50
丙二醇	0.50
氯化鈉	0.20
硼酸鈉十水合物	0.12
硼酸	0.70
山梨酸鉀	0.15
依地酸二鈉	0.05
水	96.78

經由實例12中所列之詳細方法來製備調和物。測試已完成之溶液，取得下列物理性質

性質	數值
黏性，cps	27.0
滲透重量莫耳濃度，毫滲透/公斤	317
pH	6.6
外觀	透明
顏色	水白色

實例16

本實例說明利用本發明之糖蛋白製備經保存防腐之眼用溶液的方法

成分	量
第6批米爾辛®	3.00克
氯化鈉	0.48克
硼酸鈉十水合物	0.11克
硼酸	0.75克
聚己二雙胍	10ppm
純水	95.66克

上述調和物係經由將鹽類溶於水中，加入聚己二雙胍，再加入米爾辛®來製備。然後，將整批劇烈混合1小時。所產生之溶液爲半透明的，pH爲6.9，滲透重量莫耳濃度爲305毫滲透/公斤。

實例17

下列實例說明在眼用凝膠中之糖蛋白於治療乾眼之徵候和症狀上的用途。選擇來自聯合-保管人公司之路伯膠®MS作爲凝膠基質。路伯膠®MS係由以對羥基過苯甲酸酯防腐保存之聚甘油甲基丙烯酸酯和丙二醇所構成。將米爾辛®完全混入凝膠基質中來形成均勻之分散液，以製備在路伯膠®MS中之2%米爾辛®（第6批）。所產生之凝膠爲輕微混濁的。

實例18

本實例說明本發明之糖蛋白在隱形眼鏡溶液中的用途。使用由巴克&隆伯公司（Bausch&Lomb）製造和販售之RENU™ MultiPlus作爲本實例中之隱形眼鏡溶液的基質。RENU™爲一種用於貯存和照護軟性水凝膠隱形眼鏡的多用途溶液。將0.5重量%之米爾辛®加入RENU™中以製備下列調和物。

成分	以克計之量
批號6之米爾辛®	0.25
批號CH7058之RENU™	49.75

經由劇烈攪拌1小時來將米爾辛®完全分散在RENU™中。所產生之溶液有輕微混濁，pH爲7.1，滲透重量莫耳濃度爲292毫滲透/公斤。將米爾辛®加入軟性隱形眼鏡溶液中被認爲可改良潤滑性，並使隱形眼鏡配帶者感到舒服

。

實例19

下列實例說明使用糖蛋白作爲可侵蝕之眼睛插入物，以長期持續治療乾眼。將約50毫克之第3批米爾辛®（見實例3）置入顯微Kbr 擠壓機中。將擠壓機加熱至約80℃，然後壓緊，以在熱和壓力下壓縮米爾辛®。使擠壓機冷卻至室溫，並移出樣本。米爾辛®之形狀爲直徑約5毫米，厚度約2毫米之固體圓盤。將米爾辛®圓盤置於水中，其在約2小時內被慢慢腐蝕埠。

實例20

本實例說明使用本發明之糖蛋白作爲過敏緩和溶液中的成分。所選擇之用於緩和過敏的特殊成分爲鹽酸奧洛他啶（olopatadine）。潘他諾®（Patanol®）爲一種含有0.1重量%奧洛他啶的商品溶液。其它溶液成分有氯化鈉、磷酸鹽緩衝系統和作爲防腐劑之二氯化苯二甲烴銨。潘他諾®爲一種pH約爲7之等張溶液。由艾爾康（Alcon）製藥公司製造和販售之溶液係經由將1.0 重量%之第6批米爾辛®（見實例3）加入潘他諾®溶液中來製造。米爾辛®可與潘他諾®溶液相容，並預期其可改良潤滑性，使患者感到舒服。

實例21

本實例說明本發明之糖蛋白在具有廣譜抗革蘭氏-陽性和革蘭氏-陰性眼睛病原之活性的抗菌眼用溶液中的用途。所選擇之抗菌劑爲鹽酸環丙沙新。希洛善（Ciloxan）®爲一種可購得之含03%環丙沙新的溶液。其它溶液成分爲醋酸鈉、甘露糖醇、伊地酸二鈉和二氯化苯二甲烴銨。希洛善®爲一種由艾爾康製藥公司製造和販售之等張溶液，pH約爲4.5。一種溶液係經由將1.0 重量%之第6批米爾辛®（見實例3）加入希洛善®溶液中來製造。米爾辛®可與希洛善®溶液相容，並可改良潤滑性，使患者感到舒服。

實例22

本實例說明本發明之糖蛋白在抗生素和類固醇組合眼用溶液中的用途。所選擇之抗生素作用劑爲妥布黴素，而所選擇之類固醇爲地塞米松。妥布達克（Tobradex）®爲一種可購得之含03重量%妥布黴素和0.1重量%地塞米松的溶液。其它溶液成分爲羥乙基纖維素、氯化鈉、硫酸鈉、泰洛沙波（Tyloxapol）®、伊地酸二鈉，而以二氯化苯二甲烴銨作爲保存劑。妥布達克®係由艾爾康製藥公司製造和販售。一種溶液係經由將1.0 重量%之第6批米爾辛®（見實例3）加入妥布達克®溶液中來製造。米爾辛®被認爲可改良潤滑性，並使患者感到舒服。

此文中所揭示和申請專利之所有組成物和方法可根據本揭示內容來製造和實行，而無不當之實驗。雖然本發明之組成物和方法已描述於較佳之實施態樣中，但本技藝之

技術熟習人士可清楚明白在本發明之組成物和方法，以及此文所描述之方法的步驟中和一連串之步驟中可有所變化，而不背離本發明之觀念、精神和範圍。更具體地說，一些化學上和生理上相關的作用劑可取代此文所描述之作用劑，且可取得相同或類似之結果。所有這類本技藝之技術熟習人士所清楚明白之類似的取代基和修改被視爲係在如附屬之申請專利範圍所定義的本發明的觀念、精神和範圍內。

五、中文發明摘要

發明之名稱：包含糖蛋白的眼用製劑

本發明關於欲用來滴入眼睛，或用來將欲插入眼睛之物體(如：隱形眼鏡)在其中預先浸泡或貯存的水性調和物，油膏，或欲插入結膜囊的固體裝置。所揭示之製劑可用來治療稱爲乾性角膜結膜炎，或乾眼症候群之淚膜或眼睛表面的疾病。一般而言，本發明之製劑亦可有效舒緩眼睛刺激之症狀，如：那些由乾燥環境條件，或由配帶隱形眼鏡所引起者。根據本發明，眼用製劑包括一種類似於在正常人類眼睛表面所發現之糖蛋白成分，且在一示範性和較佳之實施態樣中，該糖蛋白係從哺乳動物之乳汁(宜爲牛的乳汁)衍生而來。

六、英文發明摘要

發明之名稱：

OPHTHALMIC PREPARATION CONTAINING GLYCOPROTEIN

The present invention relates to an aqueous formulation to be instilled into the eye, or in which to pre soak or store an object to be inserted into the eye, such as a contact lens, an ointment, or a solid device to be inserted into the conjunctival sac. The preparations disclosed are utilized for the treatment of a tear film and ocular surface disorder known as keratoconjunctivitis sicca or dry eye syndrome. In general, the preparations of this invention are also effective for the relief of symptoms of eye irritation, such as those caused by dry environmental conditions or by contact lens wear. In accordance with the present invention, the ophthalmic preparation includes a glycoprotein component, similar to that found at the normal human ocular surface and in one exemplary and preferred embodiment, the glycoproteins are derived from mammalian milk, preferably bovine.

(1)

十、申請專利範圍

1. 一種眼用製劑，其含有從哺乳動物乳汁和乳汁副產品的其中之一衍生得來的糖蛋白。

2. 如申請專利範圍第1項之眼用製劑，其中該糖蛋白成分係從牛奶乳清衍生得來。

3. 一種眼用製劑，其含有實質上不含有下列物質之糖蛋白成分：乳鐵蛋白；免疫球蛋白；β-乳球蛋白；α-乳白蛋白；和牛血清白蛋白。

4. 如申請專利範圍第3項之眼用製劑，其中該包含糖蛋白之成分具有從約3000道耳吞至約250,000道耳吞的分子量。

5. 如申請專利範圍第3項之眼用製劑，其中該包含糖蛋白之成分具有約3重量%至約50重量%之碳水化合物含量。

6. 如申請專利範圍第3項之眼用製劑，其中該製劑之型式爲溶液、油膏和眼睛插入物的其中之一。

7. 如申請專利範圍第3項之眼用製劑，其中該糖蛋白之存在量爲從約0.001重量%至約10.0重量%。

8. 如申請專利範圍第3項之眼用製劑，其中該糖蛋白之存在量爲從約10重量%至約90重量%。

9. 如申請專利範圍第1項之眼用製劑，其中該糖蛋白與至少一種選自如下群體之成分複合：脂質、磷脂質和脂蛋白。

10. 如申請專利範圍第9項之眼用製劑，其中該脂質

成分之存在量爲複合物之0.01 %至約30%。

11.如申請專利範圍第1項之眼用製劑，其中該糖蛋白爲可熱壓消毒的。

12. 如申請專利範圍第1項之眼用製劑，其還含有一選自如下群體之物質：緩衝劑；黏性修改劑；張力修改劑；濕潤劑化合物；和治療性藥物。

13. 如申請專利範圍第3項之眼用製劑，其中該糖蛋白係從甜乳清衍生得來。

14. 如申請專利範圍第13項之眼用製劑，其中該糖蛋白係從純化的乳清衍生得來。

15.一種用於治療哺乳動物之乾眼的眼用製劑，其包含一有效量之糖蛋白成分，其中該糖蛋白成分實質上不含：乳鐵蛋白；免疫球蛋白；β-乳球蛋白；α-乳白蛋白；和牛血清白蛋白。

16. 如申請專利範圍第15項之眼用製劑，其中該糖蛋白成分之有效量爲每一劑量從約0.01毫克至約5.0毫克。

17. 如申請專利範圍第15項之眼用製劑，其中該糖蛋白成分之有效量爲每一劑量從約5.0毫克至約20.0毫克。

18. 如申請專利範圍第15項之眼用製劑，其中該糖蛋白成分之有效量爲每一劑量從約20.0毫克至約200毫克。

19. 一種用於發送至接受乾眼治療患者、或者用於發送至接受乾眼治療患者之應用時所使用的治療包，其包含：

一個或更多個單位劑量，各這類單位劑量中所包含之

(3)

糖蛋白的量可使定期投服一個或更多個該單位劑量時能有效治療該乾眼狀況，及

一製造好的配藥容器，因此，該容器含有該單位劑量或複數劑量，該容器還包括標示；

該標示指示該包裹於劑量養生法中該乾眼狀況之治療中的用法，在該劑量養生法中，該糖蛋白之遞送係侷限於白天中最接近該患者需要治療之白天時間的期間，且該標示還指示將該包裹與一個或更多個提供該患者治療上有效量之糖蛋白的單位劑量同時投給該患者的用法。

20. 如申請專利範圍第19項之包裹，其中該糖蛋白實質上不含：乳鐵蛋白；免疫球蛋白；β-乳球蛋白；α-乳白蛋白；和牛血清白蛋白。

21. 如申請專利範圍第19項之包裹，其中係指示該糖蛋白之遞送係侷限於最接近起床的時間，且該糖蛋白之遞送係侷限於最接近開始睡覺的時間。

22. 一種用於發送至接受乾眼治療患者、或者用於發送至接受乾眼治療患者之應用時所使用的治療包，其包含：

一個或更多個單位劑量，各這類單位劑量中所包含之糖蛋白的量可使定期投服一個或更多個該單位劑量時能有效治療該乾眼狀況，其中該糖蛋白實質上不含：乳鐵蛋白；免疫球蛋白；β-乳球蛋白；α-乳白蛋白；和牛血清白蛋白，及

一製造好的配藥容器，因此，該容器含有該單位劑量

或複數劑量，該容器還含有或包含標示；

該標示指示該包裹於劑量養生法中該乾眼狀況之治療中的用法，在該劑量養生法中，該糖蛋白之遞送爲每日一次或更多次，或依醫師之指示。

23.如申請專利範圍第22項之包裹，其中該標示指示該包裹於治療由選自如下群體之活動所誘出的乾眼中的用途：配帶穩形眼鏡，和長時間注視電腦螢幕。

24. 如申請專利範圍第22項之包裹，其係藉由成形、充填和密封製造所產生，其中各容器含有從約0.50毫升至約1.50毫升之糖蛋白溶液。

25. 如申請專利範圍第22項之包裹，其包含瓶子、滴管尖端和蓋子，其中各瓶子含有從約2.0毫升至約30.0毫升之糖蛋白溶液。

26. 如申請專利範圍第24項之包裹，其中該所提供之單位劑量容器可容納至少一個月不被中斷的劑量養生法基本成分。

七、指定代表圖：

（一）、本案指定代表圖為：無

（二）、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無