201717965

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201717965 A

(43)公開日： 中華民國 106 (2017) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：105118931 (22)申請日： 中華民國 105 (2016) 年 06 月 16 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/7034 (2006.01)* *A61P27/02 (2006.01)*

(30)優先權：2015/06/16 美國 62/180,450

(71)申請人：吳榮燦 (中華民國) WU, RONG-TSUN (TW)

臺北市北投區中山北路 7 段 219 巷 3 弄 65 號 5 樓

(72)發明人：吳榮燦 WU, RONG-TSUN (TW) ；洪琳雅 HORNG, LIN-YEA (TW)

(74)代理人：鄭志玲

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：3 項 圖式數：4 共 13 頁

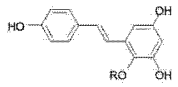
(54)名稱

用於治療或預防乾眼症的方法

METHOD FOR TREATING OR PREVENTING DRY EYES

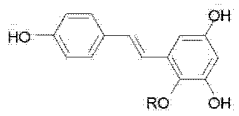
(57)摘要

本發明揭示一種用於治療或預防乾眼症的方法。該方法包含對有需要的個體投予一化合物，其中該化合物為一 2,3,5,4'-四羥基二苯乙烯 2-O-β-D-吡喃葡萄糖苷，其由以下的通式(I)表示：




通式 (I), 其中 R 為葡萄糖。

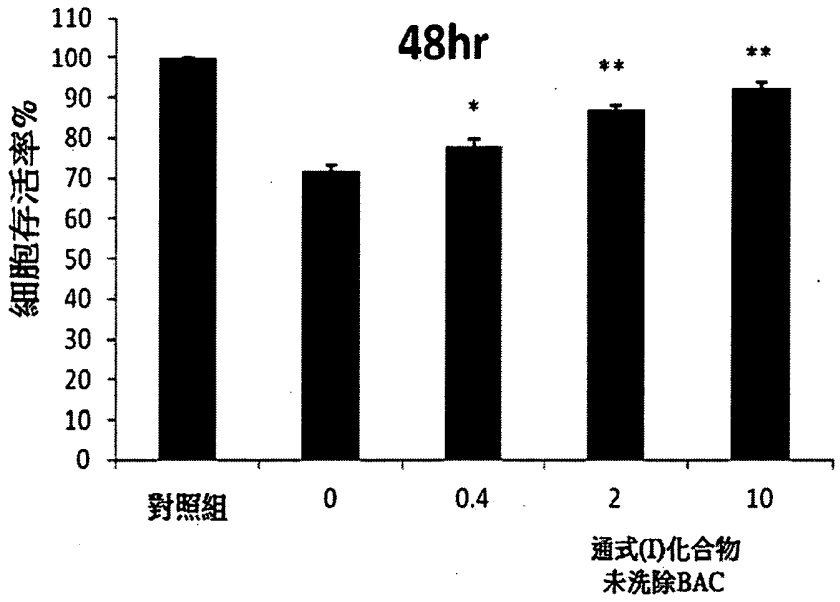
A method for treating or preventing dry eyes is disclosed. The method comprising administering a compound to a subject in need thereof, wherein the compound is a 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucopyranoside represented by the general formula (I) below.




Formula (I), wherein R is a glucose.

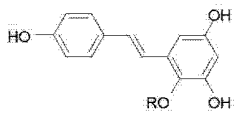
指定代表圖：

TW 201717965 A




【圖1】

特徵化學式：



# 【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於治療或預防乾眼症的方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR TREATING OR PREVENTING DRY EYES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種2,3,5,4'-四羥基二苯乙烯 2-O-β-D-吡喃葡萄糖苷化合物用於治療或預防乾眼症的方法。

【先前技術】

【0002】 乾眼症通常稱為乾燥性角膜結膜炎。每年有數以百萬計的人患有這種常見的眼部疾病。可能影響乾眼症的風險因素很多。電子產品的快速發展，是當今引起乾眼症最常見的原因。因智慧型手機、平板、筆記型電腦等的大幅使用，導致乾眼症患者的數量急遽增加。因此，發展可治療及預防乾眼症的方法是一個重要的研究課題。

【0003】 美國眼科學會公佈的乾眼症的定義是，正常淚膜具有以下病症之一：(1) 淚液產生減少，或(2) 過度淚液蒸發，一種正常存在於淚液層中的粘液或脂質的異常生成。乾眼症也可根據症狀及嚴重程度分為不同的等級。乾眼症的症狀包括乾燥、想睡、發癢、眼睛刺激、過度淚眼、灼痛和刺痛、異物感、光感、視力模糊。當症狀嚴重時，病人的眼睛會腫、擁塞甚至造成視力損傷等。

【0004】 誘發乾眼症的實質風險因素包括老年化、停經後婦女雄性激素的分泌、營養的缺乏、酒精中毒、感染或化學性燒傷引起的角膜損傷、甲狀腺功能亢進症的眼球突出、面部或三叉神經麻痺、長期戴隱形眼鏡以及自體免疫疾病，如修格連氏症候群、系統性紅斑性狼瘡、多形性紅斑、以及類風濕性關節炎等。

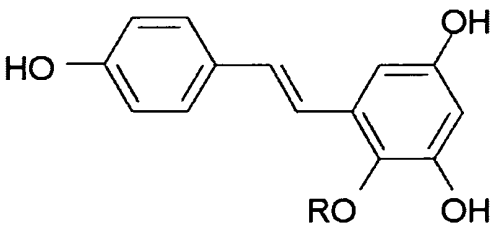
【0005】 乾眼症的常態療法包括人工淚液、外科手術移除淚塞，以及皮質類固醇滴劑。此外，0.05%的環孢素是由美國FDA於2003年批准用於治療發炎及雄性激素缺乏引起的乾眼症。雖然這些治療方法可以保持眼睛濕潤，防止淚液蒸發且對於眼球表面乾燥有所幫助，經常使用這些藥物不但可能增加毒性及刺激作用的風險，而且會引起抗藥性的感染。因此，越來越多案例使用非類固醇抗炎藥(NSAID)代替類固醇用於治療乾眼症。

【0006】 神經生長因子(NGF)於1950年代被發現，其對於某些標的神經元(神經細胞)的生長、維持以及存活是重要的。其亦可作為訊息分子。有兩個受體Trk A及p75NTR。NGF及其受體被證明可在大鼠淚腺組織中表現，且在人類淚液中亦被定量出(Lee, H.K., et al., Am J Ophthalmol, 2005. 139(6): p. 965-71)。再者，據顯示，NGF可誘發角膜上皮細胞的體外增生以及分化，並存在淚膜及角膜上皮，其在眼部表面的維持及角膜傷口癒合上扮演重要角色(Lambiase, A., et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. 50(10): p. 4622-30)。據發現，在狗的乾眼模型中使用NGF眼滴劑可增加淚液分泌及結膜杯狀細胞密度(Coassin, M., et al., Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2005. 243(2): p. 151-5)。臨床上，乾眼症病患淚液中的NGF表現量增加，這是乾眼症患者的代償機制，藉以保持眼表面的正常功能(Lambiase, A., et al., Arch Ophthalmol, 2011. 129(8): p. 981-6)。此外，NGF可誘發結膜上皮細胞分化成杯狀細胞，其具有分泌粘液，以保護眼球表面的能力(Lambiase, A., et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. 50(10): p. 4622-30; and Lambiase, A., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(32): p. 13469-74)。然而，這些結果顯示，NGF的調節是治療乾眼症以及保護眼睛的重要因素。

【0007】 仍有需要更安全且更有效的乾眼症治療法。

【發明內容】

【0008】 本發明提供一種用於治療或預防乾眼症的方法，其包含對有需要的個體投予有效量的通式(I)化合物：




通式(I)，

其中 R 為葡萄糖。

【0009】 在本發明的的部分具體實施例中，該通式(I)化合物係以可有效量提高該個體的淚液分泌的量投予。

【0010】 在本發明的的部分具體實施例中，該通式(I)化合物係以可有效提高該個體中淚腺組織的內源性NGF分泌的量投予。

【0011】 應該理解的是，前述一般說明及以下詳細說明都僅為示例性及說明性的，並不限制本發明。

【圖式簡單說明】

【0012】 前述的發明內容，以及以下的詳細說明，配合附圖一起閱讀將得到更佳的理解。為了說明本發明的目的，在圖式中顯示目前較佳的實施例。

【0013】 在圖式中：

【0014】 圖1顯示通式(I)化合物對於BAC誘發HCE細胞損傷的功效。

【0015】 圖2顯示通式(I)化合物在BAC誘發的乾眼症小鼠模型(1)中改善淚液分泌。

【0016】 圖3顯示通式(I)化合物在BAC誘發的乾眼症小鼠模型(2)中改善淚液分泌。

【0017】 圖4顯示通式(I)化合物對於 BAC誘發的乾眼症小鼠中淚液NGF蛋白質表現的功效。

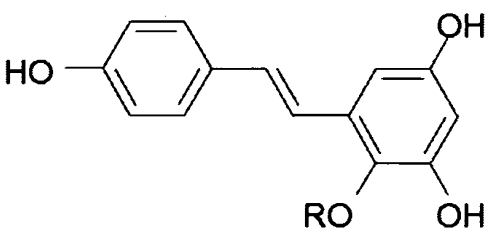
【實施方式】

【0018】 在本說明書中所使用的術語通常具有其在本領域中的普通含義，在本發明的範圍內，且在所使用的各術語的具體上下文中。用於描述本發明的某些術語將於下述或在本說明書其他地方中討論，以提供關於本發明的描述而對施行者進一步的指導。在本說明書中任何地方所使用的包含本文所討論的任何術語示例的實例僅是說明性的，且不會限制本發明或任何示例性術語的範疇及含意。同樣地，本發明並不限定於在本說明書中給定的各種實施例。

【0019】 除非另有定義，本文使用的所有技術和科學術語具有與本領域技術人員對於本發明所屬的通常理解相同的含義。在衝突的情況下，本文件，包括定義將被控制。

【0020】 本文中所使用的「約」、「大約」或「約略」，一般而言應指在給定的數值或範圍的百分之二十以內，較佳為百分之十以內，更佳為百分之五以內。本文中給定的數量為大約地，意指術語「約」、「大約」或「約略」在未明確陳述的情況下是可被推斷的。

【0021】 在一方面，本發明提供一種用於治療或預防乾眼症的方法。該方法包含對有需要的個體投予一有效量的通式(I)化合物：




通式(I)，

其中 R 為葡萄糖。

【0022】 可由習知技藝製備通式(I)化合物，舉例而言，於US 20100160243 A1中所揭示者，其係通過引用將其整體併入本文。

【0023】 本文中所使用的術語「治療有效量」意指足以達成預定治療或預防功效，或者誘發特定型式反應的通式(I)化合物的劑量。所需的有效量因個體而有所改變，取決於疾病狀態、生理條件、年紀、性別、物種以及個體的重量等等。然而，適當的有效量可由本領域的技術人員憑日常經驗而決定。在本發明的部分具體實施例中，該有效量為可有效增加個體淚液分泌的量。在本發明的部分具體實施例中，該有效量為可有效於提高個體淚腺組織（淚腺）中內源性NGF分泌的量。

【0024】 通式(I)化合物可經由眼部給藥方式投予至個體中，每天1-10次，每次1-10劑，較佳地，每天1-4次，每次1-5劑。舉例而言，每次可使用3滴包含通式(I)化合物的製劑，每天3次。針對局部眼部給藥而言，可使用濃度為1-20 μg/mL的通式(I)化合物，較佳地，可使用濃度為2-10 μg/mL的通式(I)化合物。

【0025】 較佳地，通式(I)化合物係局部投予至該個體的眼睛。

【0026】 另一方面，本發明提供一種用於治療或預防乾眼症的局部眼科用組合物，其包含通式(I)化合物，以及一醫藥上可接受的載體。

【0027】 本發明的組合物可經由含有一或多種醫藥上可接受的載體的已知常規技藝來製造。本文所使用的術語「醫藥上可接受的載體」，包括任何標準的藥物載體。此類載體可包括但不限定於：鹽水、緩衝鹽水、葡萄糖、水、甘油、乙醇、丙二醇、聚氧乙烯蓖麻油、奈米顆粒、脂質體、聚合物、以及其組合。

【0028】 又一方面，本發明提供通式(I)化合物在製備用於治療或預防乾眼症的藥物的用途。

【0029】 藉由以下實例進一步說明本發明，其係用於說明之目的，而非限制本發明。

【0030】 **實例**

【0031】 氯化苯甲烷銨(BAC)是眼用溶液中最常用的防腐劑之一。但這種防腐劑已被確認為具有乾眼症的潛在風險。因此，許多在體外及體內的乾眼症模型皆經由BAC成功地誘發。

【0032】 根據這些模型，有強烈的實驗數據證明通式(I)化合物為一種用於乾眼症的有效眼科用藥。首先，使用氯化苯甲烷銨使人類角膜上皮細胞損傷，然後以通式(I)化合物處理，結果發現通式(I)化合物可提高損害後的細胞存活率。此外，在小鼠模型中使用氯化苯甲烷銨作為乾眼症誘發劑。在一週的損傷後，以含有2、5或10 μg/mL通式(I)化合物的眼滴劑處理小鼠一天三次，結果發現，這樣的處理可恢復其淚液分泌，並提高NGF基因表現量。結果顯示通式(I)化合物可活化淚腺中的NGF，並增加淚液分泌，以修復眼球表面的損傷。

【0033】 **實例1：通式(I)化合物對於經BAC誘發HCE細胞損傷的功效**

【0034】 氯化苯甲烷銨細胞損傷模型

【0035】 以懸浮於含有10% FCS的DMEM/F12培養基中的5 x $10^5$個細胞，將人類角膜上皮細胞(HCE)播種於6孔培養盤上24小時。細胞貼附後，移除培養基，並更換成0.0005%氯化苯甲烷銨，培養24小時，然後以PBS清洗，並以不同濃度的0.4、2、10 μg/mL的通式(I)化合物(化合物A)處理48小時。最後，以胰蛋白酶消化細胞，並以1000 rpm離心5分鐘，移除上清液，並加入1 mL的DMEM/F12培養基重新懸浮細胞，接著，使用0.4%錐蟲藍與細胞培養基以1:3稀釋後進行處理，在顯微鏡下計算細胞數目，以觀察經不同濃度下處理後的存活率。結果顯示於圖1。使用學生t檢定後，相較於0 μg/mL的化合物A組，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$。數據以平均值±標準差表示(n=3)。

【0036】 **實例2：通式(I)化合物改善經BAC誘發的乾眼症小鼠的淚液分泌**

【0037】 氯化苯甲烷銨誘發乾眼症小鼠模型(1)

【0038】 從第1至7天，局部投予5 uL的0.3% BAC至雄性BALB/c小鼠(6週齡)的右眼，每天三次 (9 : 00, 13 : 30, 18 : 00)，以PBS處理小鼠作為對照組。從第8至19天，局部投予5 uL的化合物A(2、5、10 μg/mL)於右眼，每天三次 (9 : 00, 13 : 30, 18 : 00)，以PBS作為對照組。

【0039】 使用酚紅線材淚液試驗。原本線材為黃色(酸性)，當其與淚液接觸後，其改變成淺紅色。使用鑷子將線材折疊的部分，從距離下眼皮的外眼角1/3處插入眼瞼結膜中。15秒後，移除棉線，測量線材上全部濕潤(紅色)的部分。於第7、11、15、19天進行酚紅線材淚液試驗。結果顯示於圖2。使用學生t檢定後，相較於對照組，$*P < 0.05$，$**P < 0.01$。數據以平均值±標準差表示(n=5-6)。

【0040】 氯化苯甲烷銨誘發乾眼症小鼠模型(2)

【0041】 從第1至7天，局部投予5 uL的0.3% BAC至雄性BALB/c小鼠(9週齡)的右眼，每天三次 (9 : 00, 13 : 30, 18 : 00)，以PBS處理小鼠作為對照組。從第15至19天，局部投予5 uL的化合物A(5、10 μg/mL)於右眼，每天三次 (9 : 00, 13 : 30, 18 : 00)，以PBS作為對照組。

【0042】 使用酚紅線材淚液試驗。原本線材為黃色(酸性)，當其與淚液接觸後，其改變成淺紅色。使用鑷子將線材折疊的部分，從距離下眼皮的外眼角1/3處插入眼瞼結膜中。15秒後，移除棉線，測量線材上全部濕潤(紅色)的部分。於第14、18、20天進行酚紅線材淚液試驗。結果顯示於圖3。使用學生t檢定後，相較於對照組，$*P < 0.05$，$**P < 0.01$。數據以平均值±標準差表示(n=5-6)。

【0043】 **實例3：通式(I)化合物對於經BAC誘發的乾眼症小鼠的淚液NGF蛋白表現量功效**

【0044】 經由10 μL的PBS清洗而從經BAC誘發的乾眼症小鼠右眼收集淚液。以PBS眼滴劑處理小鼠作為對照組，並以不同濃度的化合物A處理10天。NGF蛋白為陽性對照組。取5μL的淚液進行西方墨點分析。

【0045】 以1 x Braford檢測法測定總蛋白質濃度。使用負載緩衝液(7 mL 0.5M Tris pH6.8、3 mL甘油、1g 10% SDS、0.93g DTT、0.5mg 0.05%溴酚藍，共10 mL)並在95-100°C下煮混合物5分鐘，以進行蛋白的失活。將20-40 μg的總蛋白質負載於每個微膠體(12% SDS-聚丙烯醯胺膠體)的孔中以進行電泳。然後，將蛋白質轉移至聚偏氟乙烯薄膜上，並以懸浮於TTBS中的5-10%脫脂奶粉封閉該薄膜。在4℃下以初級抗體震盪培養該薄膜。以TTBS清洗該薄膜數次，以移除殘餘的初級抗體。在室溫下，以二級抗體培養該薄膜2小時。

【0046】 以化學發光偵測系統測定蛋白質含量，並以Imagequant 軟體進行分析。結果顯示於圖4。使用學生t檢定後，相較於對照組，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$。數據以平均值±標準差表示(n=4)。

【0047】 本領域技術人員應理解在不脫離本發明的廣義發明性構思的情況下，可針對上述具體實施例進行修改。因此，可理解的是，本發明並不局限於其所揭示的特定實施例，其旨在於涵蓋由所附申請專利範圍所定義的本發明精神及範圍內的修飾。

【符號說明】無

【生物材料寄存】無

201717965
專利案號：105118931

201717965

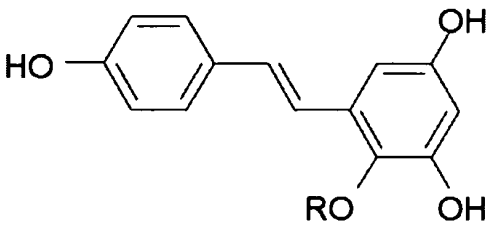
申請日：105.6.16
IPC分類：A61K 31/7034 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

# 【發明摘要】

【中文發明名稱】用於治療或預防乾眼症的方法

【英文發明名稱】METHOD FOR TREATING OR PREVENTING DRY EYES

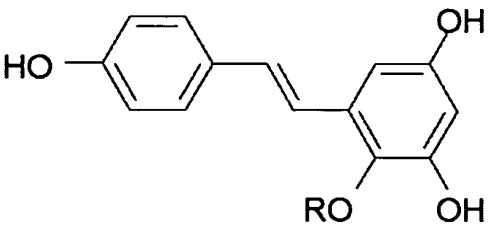
【中文】本發明揭示一種用於治療或預防乾眼症的方法。該方法包含對有需要的個體投予一化合物，其中該化合物為一2,3,5,4'-四羥基二苯乙烯 2-O-β-D-吡喃葡萄糖苷，其由以下的通式(I)表示：




通式 (I),

其中 R 為葡萄糖。

【英文】A method for treating or preventing dry eyes is disclosed. The method comprising administering a compound to a subject in need thereof, wherein the compound is a 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucopyranoside represented by the general formula (I) below.



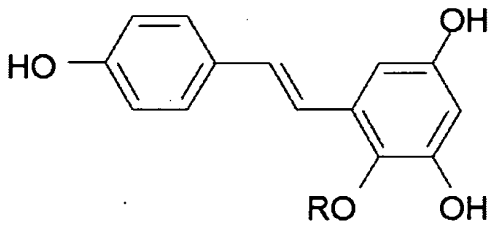

Formula (I),

wherein R is a glucose.

【指定代表圖】 圖1

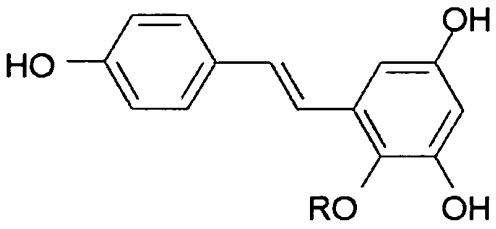
【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】



# 【發明申請專利範圍】

【第1項】一種用於治療或預防乾眼症的方法，其包含對有需要的個體投予一有效量的通式(I)化合物：

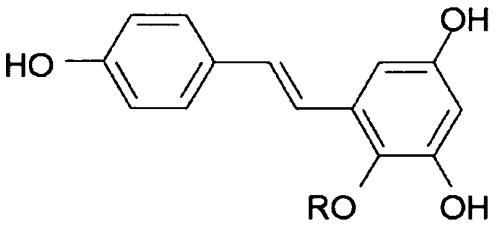



通式(I)，

其中 R 為葡萄糖。

【第2項】根據請求項 1 的方法，其中該化合物係局部地投予至該個體的眼睛。

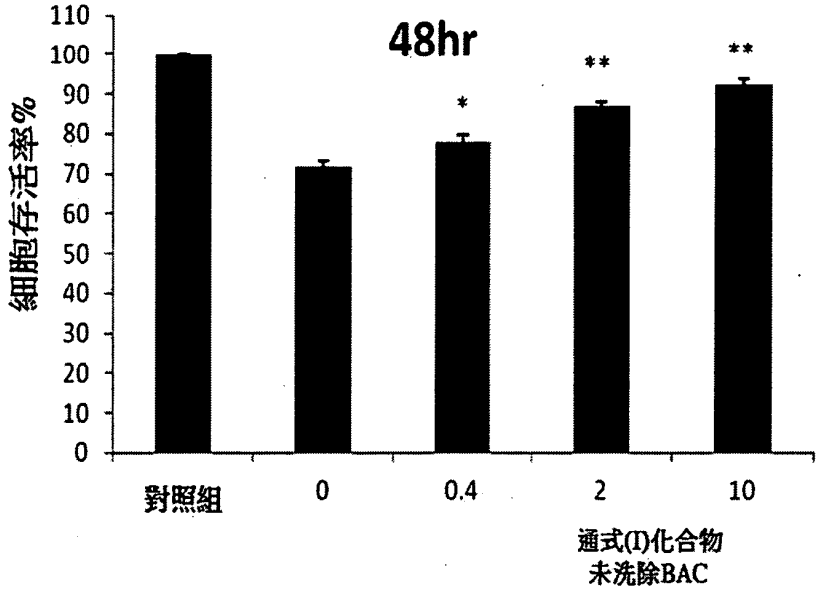
【第3項】一種用於治療或預防乾眼症的局部眼科用組合物，其包含通式(I)化合物，以及一醫藥上可接受的載體



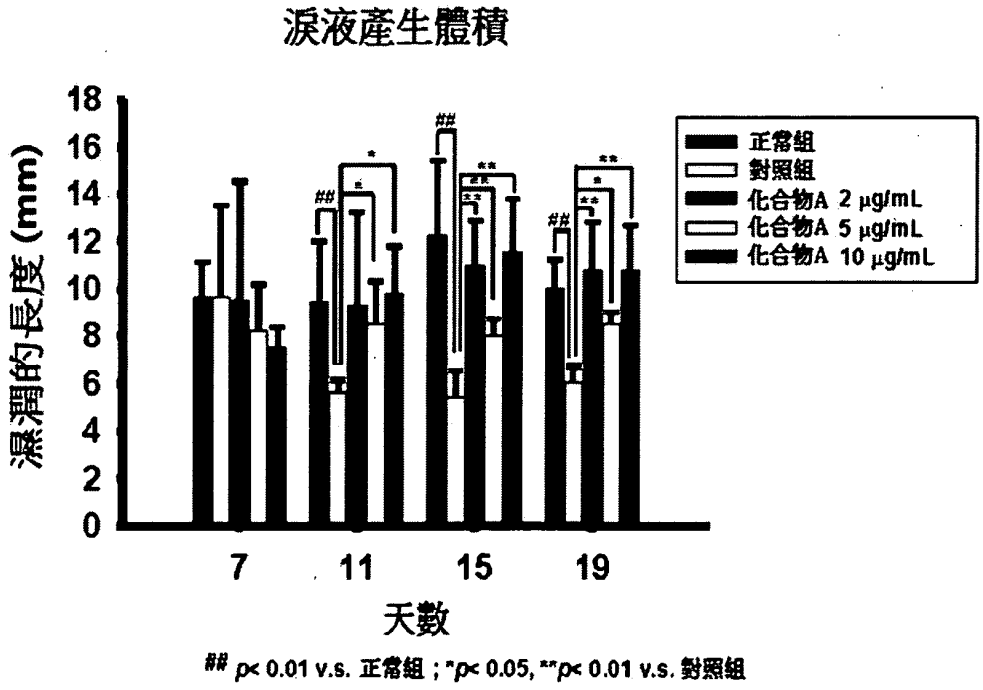

通式(I)，

其中 R 為葡萄糖。

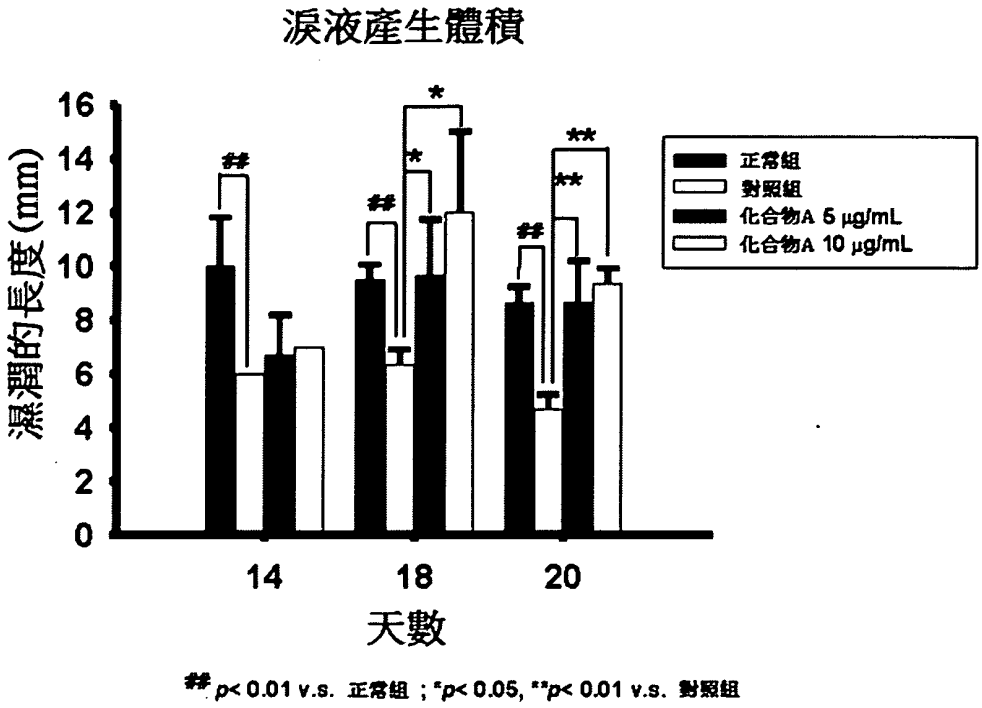
# 【發明圖式】


48hr
細胞存活率%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
**
**
對照組
0
0.4
2
10
通式(I)化合物
未洗除BAC

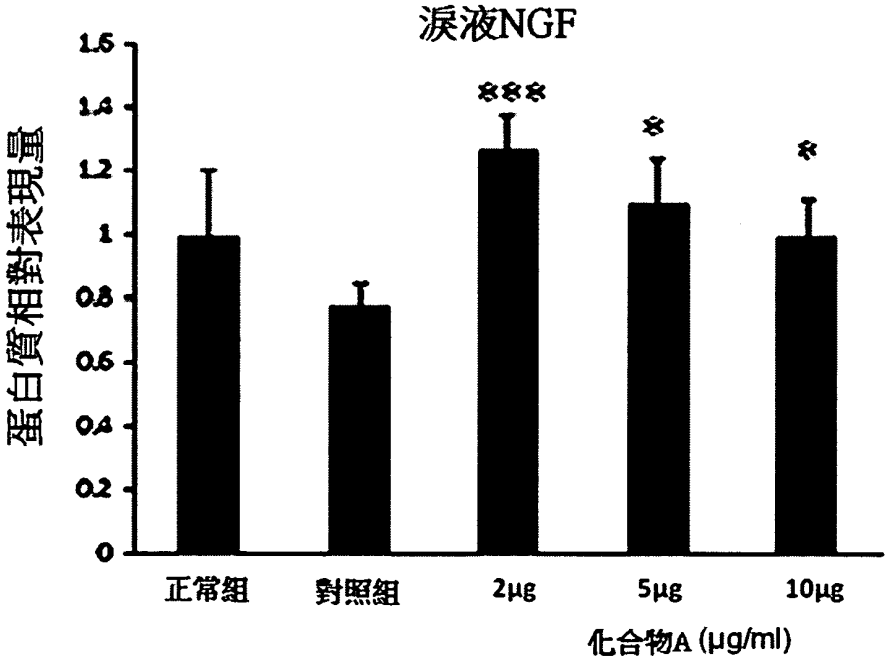
【圖1】


淚液產生體積
濕潤的長度 (mm)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
7
11
15
19
天數
正常組
對照組
化合物A 2 μg/mL
化合物A 5 μg/mL
化合物A 10 μg/mL
## p< 0.01 v.s. 正常組 ; *p< 0.05, **p< 0.01 v.s. 對照組

【圖2】


淚液產生體積
濕潤的長度(mm)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
14
18
20
天數
正常組
對照組
化合物A 5 μg/mL
化合物A 10 μg/mL
##
*
**
## p< 0.01 v.s. 正常組 ; *p< 0.05, **p< 0.01 v.s. 對照組

【圖3】


淚液NGF
蛋白質相對表現量
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
正常組
對照組
2μg
5μg
10μg
化合物A (μg/ml)

【圖4】