

五、發明說明()

發明之背景1. 技術領域

本發明係有關一種新穎組成物，其特別可用做離體組織於貯存及手術當中時之豐富能源，並同時能抑制細胞內乳酸之生成與堆積。該組成物可用於眼部手術及一般手術，但亦預期其可用於其它用途，例如局部施用，以及用於移植前結予者組織之貯存與清洗。

2. 背景資料

概略而言，注洗溶液係用來局部地施加至眼及皮膚之外表面，以及施用於手術中之組織俾以清洗以及維持手術中組織之溼潤。然而，在眼部手術中，由於眼部手術程序，諸如角膜移植(穿透式角膜成形術)，內障摘除術，眼內晶體植入術及玻璃體切開術之結果導致水液及/或玻璃液為該注洗溶液所置換。在此等情況下，該注洗溶液於手術後滯留於眼內直到其溶液成分被週邊的組織所吸收或者該溶液最終為體液平衡掉而隨後藉由循環予以清除。職是，所使用的注洗溶液不僅在包含張力及pH等方面係為生理上可相容的，其亦需含有可使細胞維持生活力及進行生理功能之組份，至少要能持續到前房及玻璃體與生理性體液達致完全平衡。在眼部手術中，注洗溶液內之成分對角膜及水晶體特別重要。角膜及水晶體二器官皆不含血管。角膜主要係由前房液體中獲取營養，而少部分係由淚水及邊緣血管獲取之。水晶體係由位於前房及玻璃體內之液體獲取營養。視網膜、睫狀體及虹膜則為有血管的組織；其經由

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

血管網路之循環血漿獲取營養。因此，注洗溶液之成分對此等組織所造成之影響可能不若其對角膜及水晶體所具者那麼顯著。

在角膜中，襯著後表面之單層內皮含有可幫助維持角膜不腫脹因而維持其透明性之流體及離子傳遞位。在水晶體中，離子傳遞位係位於被膜下方之表皮。通常， $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase係位在細胞膜內，其幫助維持細胞內 Na^+ 及 K^+ 含量分別約為10及100mM，及促進該傳遞對抗約為120mM Na^+ 及10mM K^+ 之細胞外鹽濃度梯度。細胞(及組織)需要適當的能量來進行流體及/或離子傳遞活性。

葡萄糖乃哺乳動物細胞之主要能源。角膜、水晶體及視網膜為極為極活躍的利用葡萄糖並生成乳酸之糖解組織，即令於有氧狀況下亦然。當離體角膜貯存於一含葡萄糖之培養基內時，過量的乳酸被生成及堆積，結果造成一隨後會抑制組織之代謝活性的酸度。在活體內，於含有血管分布的組織內生成之乳酸係經由循環而被清除；而於無血管的角膜及水晶體內生成之乳酸被排放至前房內並及經由循環之清除機制而予以去除。在人類，前房內的乳酸被維持於一約為4.0至4.5mM之穩定低位準下。

當葡萄糖係以供活體內施用之溶液型式存在時，其對組織而言係為一重要而有用的能源。經由糖解作用利用葡萄糖可以一高效率生成ATP並與 O_2 無關；然而，糖解作用並非一有效的能量生成路徑，此乃因每利用1莫耳的葡萄糖僅生成2莫耳的ATP。2莫耳的乳酸亦被生成。當被手術

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

五、發明說明()

之眼部組織的清除機制效率不夠有效時，乳酸將被堆積致使pH值下降，而pH值下降又會抑制組織之代謝活性。相反地，於含大量粒線體之組織內，葡萄糖經由粒線體被完全氧化成 CO_2 及 H_2O ，其每利用1莫耳的葡萄糖可生成高達38莫耳的ATP，包括於糖解中所形成的2莫耳NADH之氧化作用。因此，明顯地當有氧可供醫用時經由粒線體內之氧化作用來利用基質係為一有效的能量生成路徑。在此種狀況下沒有乳酸堆積。此外，當無氧的糖解作用被經由巴斯德效應而增強之呼吸作用所抑制時，乳酸之堆積可能被消除或減至最低(Krebs, H.A., Essays Biochem., 8:1, 1972)。

葡萄糖無法於粒線體內被直接用做基質；其必須首先經由糖解作用轉成丙酮酸鹽。酮體及其前驅物質(例如短鏈脂肪酸及酮體生成性胺基酸)於粒線體內容易被氧化，所用的每一乙醯基部分即生成32分子的ATP。因此，酮體及其前驅物質乃富含能量的或有效的能量分子。更甚者，酮體及其前驅物質之氧化導致一增強的呼吸作用，其隨又經由巴斯德效應抑制無氧的糖解作用。

酮體係為丙酮(CH_3COCH_3)、乙醯乙酸根($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COO}^-$)及 β -羥基丁酸根($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{COO}^-$)之一集合名詞。有關從脂肪酸及生成酮體的胺基酸來生成酮體之路徑例示於第1圖。酮體係為組織內脂肪酸與生成酮體的胺基酸(包含白胺酸、離胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸)之代謝產物。在自然界，脂肪酸之通式為 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ，其中n為一整數。乙酸為n=0之最小的脂肪酸分子。酮體為乙醯輔酶A

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

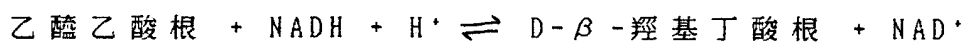
裝

訂

線

五、發明說明()

(acetyl CoA)此高能量代謝產物之一安定型式以供身體內之貯存及輸送。亦即，酮體可容易地於活體內由脂肪酸及生成酮體的胺基酸所生成。再者， β -羥基丁酸根及乙醯乙酸根可經由 NAD^+ -聯結的 β -羥基丁酸根去氫酶之催化作用而相互轉化：



這些表示酮體、脂肪酸及生成酮體的胺基酸係為相互有關的分子。當需要能量時，組織內的酮體及其前驅物質被使用以生成乙醯輔酶A，其隨又於粒線體內經由克氏循環(Kreb's cycle)被氧化成 CO_2 及 H_2O ，生成呈ATP型式之高能量。

當酮體前驅物質(脂肪酸及生成酮體的胺基酸)被投予人體及動物體時，生成乙醯輔酶A，其隨又被氧化而生成一高位準之ATP。若乙醯CoA之生成過量，則酮體被生成，其主要之代謝部位在肝臟。在這些生成的酮體當中，丙酮不被利用並經由呼吸、汗液及尿液排除，而乙醯乙酸根及 β -羥基丁酸根被輸送至週邊組織而於該處被轉成乙醯輔酶A並再於粒線體內經由乙醯輔酶A及檸檬酸循環而被氧化成 CO_2 及 H_2O ，生成供週邊組織之用的豐富能量。

在週邊組織中，亦發生由生成酮體的胺基酸生成乙醯乙酸根。於該處，若乙醯乙酸根過量，則其被轉成 β -羥基丁酸根以供貯存，或被轉成乙醯輔酶A並再於粒線體內被氧化成 CO_2 及 H_2O 以生成一高位準之ATP。在週邊組織中，脂肪酸經由 β -氧化作用而被降解成乙醯輔酶A(參見第1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

圖)，其又於粒線體內被氧化成 CO_2 及 H_2O 以生成一位準之ATP。

角膜、水晶體及視網膜對糖解作用極具活性，其代謝葡萄糖而生成大量的乳酸。葡萄糖在正常狀況下係為活體內眼組織之一能源。所形成的乳酸經由血液循環之清除機制予以去除。在眼部手術期間或緊接其後，經由循環來去除乳酸之機制無法有效運作。當注洗溶液內含有葡萄糖以作為眼部手術中眼組織之能源時，這會造成前房及玻璃體內乳酸之過度堆積。葡萄糖之利用亦導致一降低的細胞外pH值，此又引起乳酸堆積於細胞(及組織)內並隨而抑制代謝活性(Chen, C.H. and Chen, S.C., Arch. Biochem. Biophys., 276:70, 1990)。此等問題可藉由於注洗溶液內添加酮體及其前驅物質作為眼組織之任擇性燃料而予以克服。酮體及其前驅物質可為眼組織方便地利用以生成乙醯輔酶A，其復於粒線體內經由克氏循環氧化成 CO_2 及 H_2O ，因而生成一高位準的ATP。此過程將會經由巴斯德效應而抑制糖解作用，因而抑制乳酸之生成。

再者，已知酮體為飢餓時腦、肌肉及腎臟之較佳燃料(Olson, R.E., Nature, 195: 597, 1962; Bassenge, E., et al., Am. J. Physiol., 208: 162, 1965; Owen, O.E., et al., J. Clin. Invest., 46: 1589, 1967;及 Howkins, R.A., et al., Biochem. J., 122, 13, 1971 及 125: 541, 1971)。

本案組成物並不僅希望供作人工流體以替換眼部手術

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

中之眼部流體或一般手術中之體液，或其本身僅供作注洗溶液。本案新穎組成物之目的係提供酮體及其前驅物質以作為貯存期間的離體組織及手術之過渡期間和手術後組織之一高能源，因而使細胞可維持其活力及進行其生理及生物功能之能力，例如，其至少在眼部手術中有此功效，直到前房及玻璃體與生理性體液達致一完全的平衡。

如此，在一平衡配方中之酮體及其前驅物質及葡萄糖對貯存中之離體組織及手術中之週邊組織而言係特別有用的。葡萄糖可作為諸如角膜基質及水晶體之含有極少量或不含粒線體的組織之能源。酮體及其前驅物質富含能量；其可容易地於週邊組織之粒線體內經由克氏循環被氧化生成 CO_2 及 H_2O ，而無其它代謝廢物之堆積。所形成之二氧化碳隨後被水合而生成碳酸，其又於pH 7.4下被解離成重碳酸根。重碳酸根被推測係為橫跨角膜內皮的離子傳遞過程所需者(Hodson, S., et al., J. Physiol., 263: 563, 1976)。此外，酮體及其前驅物質之氧化不僅可得一高位準之ATP，同時也可經由巴斯德效應抑制糖解作用，此造成乳酸生成之抑制。

在本發明中，平衡鹽被包括在組份之內以形成一供活體內施用之生理上可相容的溶液。該等組分中之磷酸鹽係為酮體及其前驅物質被氧化之時作為ATP生成過程之氧化性磷酸化作用之一要素。此外，磷酸鹽亦作為一緩衝物，其於pH 7.2至pH 7.4之生理pH範圍內具有一高緩衝能力。

本發明之理論及所期望之應用不同於Veech在美國專

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

利第4,663,289號中之教示內容。Veech之發明係基於下述理論：活動物細胞內之代謝程序之調節係藉由配合有已界定比率之 $[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$ 、 $[\text{L-乳酸根}^-]/[\text{丙酮酸根}^-]$ 以及 $[\beta\text{-羥基丁酸根}^-]/[\text{乙醯乙酸根}^-]$ 中之一者或多者，此目的類似於在調節pH值中“弱酸/共軛鹼”偶對之緩衝系統。

Veech之發明係基於若干假設：

1. 具有已界定比率之對偶基質其二者將為細胞或組織所攝取。
2. 具有已界定比值之堆積(於組織內之)基質隨後留在活細胞內以調節代謝程序。
3. 透過這些基質偶對的基質攝取及代謝性調節對所有組織而言係為類似的。

Veech基於其發明而進行的許多實驗係使用大白鼠肝臟(Veech, et al., Biochem. J., 115:609, 1969;以及Veech, et al., J. Biol. Chem., 254:6538, 1979)。肝臟為人體及動物體之代謝中心。肝臟內之代謝過程不同於周邊組織者。因此，調節代謝過程之機構可在肝臟發揮作用，但可能無需於週邊組織內發揮作用。例如，酮體係於肝臟內經由脂肪酸 β -氧化作用而生成。所生成之酮體並未於肝臟內被利用，反經由血液循環被轉移至週邊組織。於該處，其經由克氏循環被氧化生成 CO_2 及 H_2O ，聯同生成一高位準的ATP(Principles of Biochemistry, Lehninger, Worth Publishers, Inc.)。因此， β -羥基丁酸根是週邊組織之一有效的任擇性燃料，但非供肝臟者。本發明利用

(請先閱讀封面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

週邊組織(如角膜及水晶體)抽取及代謝 β -羥基丁酸根之
高能力，但不偶聯乙醯乙酸根，來生成ATP並同時抑制細
胞內乳酸之生成與堆積。

已知所生成的乳酸經由正活躍地進行糖解之正常細胞
(如紅血球、骨骼肌、角膜及視網膜)被輸送入血液內，其
隨又由血液中被抽取出而為肝臟及心臟所代謝。乳酸與作
為其競爭性抑制劑之丙酮酸被橫跨過細胞膜易位(Spencer
and Lehninger, *Biochem. J.*, 154: 405, 1976)。酮體
由肝臟生成並輸送入血液中，隨又為諸如角膜及水晶體之
週邊組織從血中抽取出並代謝之(*Principles of Biochem-*
istry, Lehninger, Worth Publishers, Inc.)。酮體橫
跨 $\nu 41$ 胞膜之運輸機制尚未被建立。

丙酮酸根、乳酸根、乙醯乙酸根及 β -羥基丁酸根之
代謝作用隨細胞或組織而異。心臟及肝臟內之乳酸根去氫
酶(LDH)異構酶有利於低濃度乳酸根氧化成丙酮酸根；而
角膜、水晶體及視網膜內之LDH異構酶有利於低濃度丙酮
酸根生成乳酸根。肝臟內之 β -羥基丁酸根去氫酶(BDH)異
構酶有利於低濃度乙醯乙酸根還原成 β -羥基丁酸根；而
週邊組織如角膜內之BDH異構酶有利於低濃度 β -羥基丁酸
根氧化成乙醯乙酸根。LDH與BDH異構酶於不同組織內之變
化導致難以建立所有組織內之基質偶對之一般性比率，例
如[乳酸根]/[丙酮酸根]及[β -羥基丁酸根]/[乙醯乙酸根]
。基質的攝入，這些化學物質從食物攝取及其它代謝反應
之連續性流入和這些化學物質經由流出及隨後的代謝反應

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

五、發明說明()

之去除使得建立性基質偶對之一般性比率更加困難。

在組織儲存用培養基之應用中，Lindstrom等人(美國專利第4,695,536號)之教示內容主要為組織培養業界的科學家已使用有年之組織培養技術。更明確地說，Lindstrom等人教示一種角膜儲存方法，其包括：

(a) 混合一角膜儲存培養基，其包含Gibco氏基本培養基(Gibco's MEM，其組成為50ml加有Earls鹽的必需培養基，25mM不含L-麩胺之HEPES緩衝液，5ml的L-麩胺(200mM)(其在最終培養基容積內之最終濃度為1%)以及包含有50-100μg/ml garamycin之抗生素；源自牛血清、胎牛血清或人血清之群中的血清；以及一有效量之高分子量分子(選自軟骨素硫酸鹽、玻璃酸鈉、角蛋白硫酸鹽、聚乙烯吡咯酮、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、纖維素膠，及葡萄聚糖之群中)；

(b) 將一角膜儲存容器內填充以該混合培養基；及

(c) 將一角膜-鞏膜緣支撐於含有該培養基之容器內，於是將該培養基維持於4℃至34℃之溫度間，如此提供一中期貯存及長期貯存，且該系統可容許移轉供組織運輸中之溫度。

該案之教示內容並未提供當離體角膜被培養或儲存於McCarey-Kaufman培養基(加有5%葡聚糖之組織培養基199；McCarey, B. and Kaufman, H., Invest. Ophthalmol., 13:165, 1974)，添加或未添加胎牛血清(Lindstrom et al., Am. J. Ophthalmol., 95:869, 1977)，之時抑制乳

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

五、發明說明()

酸生成與堆積之機制。在 McCarey 等人 (Invest. Ophthalmol., 13:165, 1974) 之教示內容中，葡聚糖被加入組織培養基 (TC-199) 內以作為一脫水劑，有了它該培養基之活性滲透度變成略為高張，約 305-340 mOsm。據信在此略為高張之溶液內，葡聚糖對所貯存的角膜產生一膠體滲透壓，此造成一人工脫水功效。然而，該培養基內葡聚糖之存在對乳酸之生成與堆積並無抑制功效。與之明顯對比地，Chen 等人之教示內容 (美國專利第 4,873,186 號) 提供一種當離體角膜被培育於含有 β -羥基丁酸根之 Dulbecco 氏磷酸鹽緩衝鹽溶液 (PBS) 內或貯存於含有 β -羥基丁酸根之 TC 199 (亦名為培養基 199) 時可抑制乳酸根之生成與堆積並同時於組織內產生一高位準之 ATP 的機轉。更清楚地，Chen 等人揭示一種延長一手術品質的離體角膜其儲存時間之方法，該方法包括於含有所儲存的角膜之角膜貯存培養基內包含一定量的至少一種選自下列之化合物：(i) 短鏈脂肪酸，(ii) 酮體及 (iii) 可抑制由該離體角膜生成的乳酸根之生成酮體的胺基酸或酮體母質，其量足以抑制乳酸生成。

一角膜儲存培養基之配製可藉由使用本發明之組成物來置換組織培養基中重碳酸鹽-平衡的鹽溶液部分，例如含 Hank 氏鹽之 TC 199。於此例中，NaCl 濃度需予以降低以維持一生理上可相容的陰離子與陽離子之總組合濃度。於是，活性滲透度變成略為高張，因為該組織培養基內之成分除 NaCl 外並未被完全解離。該溶液之活性滲透度須予以調整至一等張度為 290 mOsm 或在 285-300 mOsm 之範圍內。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

五、發明說明()

關於滲透度調整可以不能滲透細胞膜之中性醣類(如甘露糖醇、蔗糖及葡萄聚糖)為之。其應用造成因為該溶液之等張性而對所儲存之角膜不產生一膠體滲透壓，而因此與 McCarey 等人 (McCarey, et al., Invest. Ophthalmol., 13:165, 1974) 所教示之理論及葡萄聚糖之期望應用顯著有別。

β -羥基丁酸根係為一還原劑。於溶液中，其可被 O_2 氧化，特別是在高溫時。因此，必須使用脫氣的水來調製本案組成物之溶液。所形成的溶液被儲存於真空下以保護 β -羥基丁酸根不被 O_2 氧化，因而延長適用期。當開瓶以供臨床應用時，該溶液將再度與空氣平衡而 O_2 即可供組織(或細胞)之生物功能之用。

任擇地，可使用一選自檸檬酸鹽，苯基丙胺酸及維生素 E 之群中的抗氧化劑來保護 β -羥基丁酸根不被 O_2 氧化。該抗氧化劑較佳為檸檬酸鹽，而其在該溶液內之濃度最好是在 8-12mM 之範圍內。然而，該溶液中之 O_2 亦會氧化該抗氧化劑而致使在長期儲存後該抗氧化劑減低其對保護 β -羥基丁酸根不被 O_2 氧化之功效。因此，使用脫氣之水來調製本案組成物之溶液係一較佳的方法。

發明之總論

本發明係有關一種新穎組成物，其包括酮體及/或其前驅物質、葡萄糖及一磷酸鹽-緩衝之平衡鹽水溶液。本發明亦有關該組成物之製法，其包括將酮體及/或其前驅物質、葡萄糖及一磷酸鹽-緩衝之鹽水溶液以足夠生成一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

組成物之量混合在一起，如前所述，該組成物可有效地符合儲存中離體組織和手術中組織對於進行有效的生理及生化功能之要求。

圖式之簡單說明

第1圖顯示由脂肪酸及生成酮體的胺基酸生成酮體之路徑。

第2圖為如實施例1所述，在以BSS進行前房灌洗後，貓內皮之一顯微鏡照片的複製圖。

第3圖為如實施例1所述，在以BSS-plus進行前房灌洗後，貓內皮之一顯微鏡照片的複製圖。

第4圖為如實施例1所述，在以本案組成物進行前房灌洗後，貓內皮之一顯微鏡照片的複製圖。

第5圖為如實施例2所述，在本案組成物之存在下，離體角膜的活體外消脹之一“角膜厚度對時間”之作圖。數據點係為節線中所示的4次測量之平均值加上標準偏差。

第6圖為如實施例2所述，在BSS-plus存在下，離體角膜的活體外消脹之一“角膜厚度對時間”之作圖。數據表示係同於第5圖者。

第7圖為如實施例3所述，事先在4℃下儲存於含有本案組成物之培養基內達7與11日的移植供給者角膜之活體內消脹之一“角膜厚度對時間”之作圖。數據表示係同於第5圖者。

第8圖為如實施例3所述，事先在4℃儲存於Optisol內達7與11日的移植供給者角膜之活體內消脹之一“角膜厚

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

度對時間”之作圖。數據表示係同於第5圖者。

本發明之詳細說明

廣義言之，本發明之組成物包含有酮體及其前驅物質、葡萄糖及一磷酸鹽-緩衝之平衡鹽水溶液。該組成物利用其成分之某些特殊特徵，特別是先前詳述之葡萄糖和酮體及/或其前驅物質之某些特點，因而可有效地符合眼及其它週邊組織對於進行有效的生理及生化功能之要求。

本案含有酮體及/或其前驅物質、葡萄糖及磷酸鹽-緩衝之平衡鹽水溶液的組成物因此可滿足帶有或不帶有高密度的粒線體(或不含粒線體)之眼組織及其它一般性組織之最低基本營養需求。例如，在手術後使用本組成物注洗的眼及其它週邊組織能夠進行能量-依賴的代謝功能，如流體及離子輸送及蛋白質合成，以及諸如維持一薄且透明的角膜之生理功能。

本組成物因此可以，例如，對週邊組織(以角膜之三種不同組織層作為典型)提供一平衡的且豐富的能源。亦即，本案組成物可滿足下列之需求：內皮之高呼吸活性，內皮與基質之高糖解活性，以及獲致有關角膜流體及離子輸送之一必需的細胞內能量位準。

適用作為一依據本發明的注洗溶液之典型組成物(包含其組分之範圍)係摘述於下列表1中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

五、發明說明()

表 1

本案溶液之典型組成

組 份	濃 度		範 圍
	mg/ml	mM	
D.L- β -羥基丁酸鈉	2.52	20	5-30
葡萄糖	0.99	5.5	5-10
氯化鈉	6.74	110	90-130
二鹼基磷酸鉀(無水)	1.06	6.1	4.9-7.3
一鹼基磷酸鈉(一水合物)	0.54	3.9	3.2-4.7
氯化鎂(六水合物)	0.10	0.5	0.2-1.0
氯化鈣(無水)	0.11	1	0.5-1.5

pH值以HCl或NaOH予以調整至7.4。

包含於本組成物內之典型陰離子及陽離子示於下列表2。表2亦顯示出該等陰離子在本案組成物內之濃度。若所有鹽皆完全解離，本案組成物之滲透度計算值係在約300至約320mOsM之範圍內。本案組成物之製備溶液的實際滲透度係在約285至約300mOsM之範圍內。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

表 2

本案溶液內之離子之典型組成

離 子	濃 度 (mM)
Na ⁺	134
K ⁺	12
Mg ⁺²	0.5
Ca ²⁺	1.0
Cl ⁻	113
無機磷酸根 (pi)	10
β -羥基丁酸根	20

葡萄糖為一中性分子而未被包含於表2內。

依據本發明之一具體實施例，本案組成物之酮體為 β -羥基丁酸根及乙醯乙酸根離子。 β -羥基丁酸根離子最好係選自下列各者： β -羥基丁酸根之D-異構物， β -羥基丁酸根之D-及L-外消旋混合物，及 β -羥基丁酸根之D-及L-異構物混合物；尤以 β -羥基丁酸根之D-異構物為佳。溶液中 β -羥基丁酸根之濃度最好係在5-30mM之範圍內。

本案組成物之較佳酮體前驅物質係為選自乙酸及丁酸中之短鏈脂肪酸；而生成酮體的胺基酸最好係為選自白胺酸、離胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸中之任一者。

五、發明說明()

酮體前驅物質之濃度最好在0.1-25mM之範圍內。生成的酮體胺基酸之濃度最好在0.1-5.0mM之範圍內並以1-2mM之範圍為佳。生成酮體的胺基酸之合併總濃度最好在7.5-12.5mM，尤以10mM為佳。

較佳的短鏈脂肪酸為乙酸，其濃度最好係在12-25mM之範圍；或是丁酸，其濃度最好係在5-15mM之範圍。乙酸之最佳濃度為20mM，而丁酸之最佳濃度為10mM。

本案組成物之pH值最好予以調整至7.3-7.5。

最好使用脫氣的水來調製本案組成物，俾保護 β -羥基丁酸根不被 O_2 氧化，藉此可延長溶液於室溫之儲存期。

一部分的NaCl，較佳之量為15-35mM，或更佳之量為25-30mM，可為一等效量之一種或多種糖酸(包含D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸、D-葡萄糖酸以及D-葡糖二酸)之 Na^+ 鹽所置換。

本案組成物之黏度最好藉由添加具40-500千道耳頓之質量範圍的中性多醣葡聚糖而增高，其添加量係足以生成一組成物，其可有效地符合眼部組織發揮有效的生理及生化功能之需求並同時避免眼部手術中發生粘連者。該中性高分子量葡聚糖之較佳濃度係在2%-20%之範圍內。

另一具體實施例中，本發明係有關一種角膜儲存培養基，其包括本案組成物，擇自Eagle氏、Dulbecco氏以及Daniel氏中之一成員的最低必須胺基酸及最低必須維生素。該溶液乃商業上可獲得者，且如熟習此藝者所了解的，其添加量視特殊條件而異。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

於另一具體實施例中，本發明係針對一角膜儲存培養基，其中一組織培養基之平衡鹽溶液為本案組成物所置換；NaCl濃度最好予以降至70-100mM，或最好降至80mM，俾維持該溶液之陽離子及陰離子濃度之總量相等；以及溶液之活性滲透度最好予以調整至一為285-300 mOsm之等張度，或最好調整至290 mOsm；及若有所需且如所需的，可予以添加甘露糖醇、蔗糖或葡萄聚糖。該組織培養基最好為含有Hank氏鹽之TC 199或含有Hank氏鹽之Eagle氏最低基本培養基。

該角膜儲存培養基之pH值最好係在7.10-7.50之範圍內，尤以7.25-7.40之範圍為佳。

一部分的NaCl，其量為15-35mM，或較佳之數量為25-30mM，可為一等效量之一種或多種糖酸(包含D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸、D-葡萄糖酸、D-葡糖二酸)之Na⁺鹽所置換。

於另一具體實施例中，本發明係針對一種角膜儲存培養基，其中本案組成物之磷酸鹽-緩衝的鹽溶液置換一角膜儲存組成物中之重碳酸鹽-緩衝的平衡鹽溶液，該角膜儲存組成物包括一適合儲存角膜之組織培養基但其中通常會生成非所欲之乳酸。該角膜儲存培養基另又含有至少一種選自下列群中之化合物：短鏈脂肪酸以及可抑制角膜生成乳酸之酮體，該化合物之存在量係足夠抑制乳酸根之生成者。

又另一具體實施例中，本發明係關於一種角膜儲存組

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

成物，其包含本發明之一角膜貯存培養基以及一由VEGF、尿嘧啶核苷，胸腺嘧啶核苷和血清-衍生的因子所構成之協同上有效的混合物。

又另一具體實施例中，本發明係關於一種配方以供用於準備器官移植用之組織(例如一角膜移植物)，該配方包括本案組成物以及一由VEGF、尿嘧啶核苷、胸腺嘧啶核苷和血清-衍生的因子所構成之協同上有效的混合物。

另一具體實施例係針對一注洗溶液以供用於，例如局部應用，該注洗溶液包括本發明之一角膜儲存培養基以及一由VEGF、尿嘧啶核苷、胸腺嘧啶核苷和血清-衍生的因子所構成之協同上有效的混合物。

又另一具體實施例中，本發明係關於，例如，一種供應之器官培養基，其包括本發明之一角膜儲存培養基以及一由VEGF、尿嘧啶核苷、胸腺嘧啶核苷及血清-衍生的因子所構成之協同上有效的混合物。

本發明溶液之製法包括在一脫氣的磷酸鹽-緩衝的鹽水溶液內將葡萄糖與酮體及/或其前驅物質以足夠生成一如前所述的組成物之量混合在一起，該組成物可有效地符合眼及其它週邊組織對於進行有效的生理及生化功能之要求。接而於真空下將該溶液裝瓶以確保將溶液中的 O_2 完全去除，俾免在室溫下於延長的儲存期間內發生 β -羥基丁酸根之氧化。若要立即使用或於短時間內使用該溶液，則不需要真空裝瓶過程，雖然它是有所助益的。

由於 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 在高濃度下會生成磷酸鹽沈澱物，最

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

好除了 CaCl_2 及 MgCl_2 以外之各成分皆先予以溶解於適當的脫氣過之水內，尤以占總體積之90%-95%為佳。將溶液徹底混合並以1N葡萄糖醛酸或 NaOH 將pH值調整至7.3-7.5之範圍內。然後將配成0.5M儲備溶液或位於0.2-1.0M之範圍內的 CaCl_2 及 MgCl_2 予以加入。若有需要，檢查及調整pH值至其為7.3-7.5，尤以7.4為佳。最後加水以構成所需體積。較佳地，使用去離子的二次蒸餾水來製備該溶液。所有使用的成分必須為試藥級。

製備本案注洗溶液時，可有多種變化。以下列舉若干可能的變化之範例。

1. 可使用磷酸一氫鉀及磷酸二氫鉀製備磷酸鹽緩衝液。在此例中，總鉀離子被增至15mM。

2. 可使用磷酸一氫鈉及磷酸二氫鈉製備磷酸鹽緩衝液。在此例中，須加入8至12mM KCl ，並扣除5mM NaCl 。

3. 可使用任何其它磷酸鹽及磷酸來製備磷酸緩衝液，只要適當滴定至pH 7.4。但無論如何， K^+ 之終濃度須為8至12mM。pH值可由7.3變化至7.5。

4. 藉由以一種或一種以上之糖酸(包含D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸、D-葡萄糖酸以及D-葡糖二酸)之 Na^+ 鹽來置換部分的 NaCl 而將氯陰離子濃度維持在90-105mM之生理範圍內。

5. 以0.1至5.0mM(較佳為1至2 mM)之濃度加入一種或一種以上之生成酮體的胺基酸(含白胺酸、離胺酸、苯丙胺酸、色胺酸及酪胺酸)之鈉鹽以作為注洗溶液之成分。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

扣除一等當量之 NaCl 來調整 Na^+ 濃度。

6. 一部分的 β -羥基丁酸根可以二當量之乙酸根(酮體前驅物質短鏈脂肪酸中之最小分子)予以置換。

7. 亦可使用 10mM 或 5 至 15mM 範圍之其它短鏈脂肪酸(如丁酸及己酸)之鈉鹽。惟，其在水溶液之低溶解度限制了其用途。

8. 雖然 β -羥基丁酸根可為乙酸根或乙醯乙酸根所置換， β -羥基丁酸根仍是較佳的。 β -羥基丁酸根安定且具成本效益。其亦易為細胞所利用，又比乙醯乙酸根更具能量效益。1 莫耳的 β -羥基丁酸根可產生 64 莫耳的 ATP 及 1 莫耳的 NADH，而後者又可產生 3 莫耳的 ATP。

9. β -羥基丁酸根之 D-異構物為本案組成物之較佳組分，因細胞僅利用 D-異構物。惟 D-，L-外消旋物，或 D-與 L-異構物之混合物具成本效益且市面有售，故皆可使用。

10. 若有所需，醣類(如甘露糖醇及蔗糖)或諸如葡聚糖之中性多醣類可用來調整溶液之活性滲透度至 290 mOsm 或至約 285 至 300 mOsm 之範圍。此種調整不會造成 Na^+ 及 Cl^- 濃度之任何變化。若 Na^+ 及 Cl^- 此二濃度過高，則 NaCl 須以等當量之醣類予以置換。

11. 在 5% 或 2% 至 20% 範圍之中性高分子量葡萄聚糖(較佳為 70-500 千道爾頓者)可用來增高溶液之黏度。此高黏度組成物可用於眼手術，俾防止手術創傷所致之黏連(其中水晶體或虹膜被粘著至角膜內皮，或虹膜被粘著至水晶體。在此例中，每加入 1% 葡聚糖即扣除 2.5mM 之 NaCl。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

本案組成物之配製係使用主要用於使眼組織及其它周邊組織(或細胞)在諸如角膜移植術，眼內水晶體植入術，內障摘出術及玻璃體切開術之眼內手術後的過渡期間仍保有其活力及進行生理功能之能力的最少量之必要成分。過渡期係定義為從手術以至前房及/或玻璃體內之溶液與源自身體的生理流體達致一完全平衡的時間。如前述，本案組成物也可用於，例如皮膚及眼科之局部用途，以供移植前儲存及清洗供給者組織，及用於一般性手術。

本案組成物含有一生理上可相容的鹽溶液，其濃度範圍類似於在血漿所發見者。依據本發明，磷酸鹽(典型地10mM)被用來作為一緩衝劑及一在能量代謝中作為ADP磷酸化而生成ATP之基質此二者。磷酸鹽在pH 7.2-7.4下具強力緩衝能力。目前市面有售之其它注洗溶液(如BSS-plus, 由位於德州福特梧斯市之Alcon所產製)係使用重碳酸鹽。惟重碳酸鹽未成為本案組成物之組分，此乃因當使用重碳酸鹽緩衝劑時，溶液之pH值會隨 CO_2 分壓(P_{CO_2})而異。再者，雖未添加外源性重碳酸根，但重碳酸根也會經由組織呼吸(或氧化性磷酸化作用)而原地生成。在此過程中，基質(於粒線體內)被氧化生成 CO_2 及 H_2O 。所生成的 CO_2 隨後被水合而生成 H_2CO_3 ，其易快速解離而生成 HCO_3^- 。在兔角膜中， CO_2 之產生速率約為 $1.3\mu mol/cm^2/hr$ 。在人角膜中，該速率約為30至50%或更高。

D- β -羥基丁酸根在粒線體內易經由 β -羥基丁酸去氫酶之催化而被氧化生成乙醯乙酸根及NADH。乙醯乙酸根又

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

五、發明說明()

與丁二醯輔酶A反應而生成乙醯乙酸輔酶A，後者又在硫磷酶之催化作用下被降解生成乙醯輔酶A。脂肪酸於細胞內經由 β -氧化作用而被利用以生成乙醯輔酶A。生成酮體的胺基酸也於細胞內被代謝而成乙醯乙酸根或乙醯乙醯輔酶A，及隨後生成乙醯輔酶A。然後，由此等反應而得之乙醯輔酶A又於粒線體內藉由檸檬酸循環被氧化成 CO_2 及 H_2O 。由脂肪酸及生成的酮體胺基酸產生酮體之徑路簡示於第1圖。乙醯輔酶A之氧化作用是一種具能量效益之過程，每利用1莫耳的乙醯輔酶A即生成30的莫耳ATP及2莫耳的GTP(或總計32莫耳的ATP)。注洗溶液內之無機磷酸鹽係供予偶合電子傳遞的氧化性磷酸化作用以使ADP反應生成ATP。

如下列表3可見，關於角膜消耗的葡萄糖，約47%係藉由糖解作用而53%係藉由呼吸作用(Chen and Chen, Arch. Biochem. Biophys., 276:70, 1990)。

表 3

角膜組織層之代謝活性

組織層	葡萄糖消耗速率 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	乳酸根生成/丙 酮酸根之氧化比
上皮	$0.185 \pm 0.02 (48\%)$	1 : 1
基質	$0.096 \pm 0.01 (25\%)$	2 : 1
內皮	$0.107 \pm 0.01 (28\%)$	1 : 2

五、發明說明()

角膜組織層內葡萄糖之消耗百分率示於上面表3之括弧內。基質藉由糖解消耗葡萄糖之速率約為藉由呼吸作用者之雙倍。在水晶體中，粒線體僅位於上皮。因此，葡萄糖係為基質及水晶體(特別水晶體核內的細胞)之一重要能源。在此等細胞內存在極少的或無粒線體以利用乙醯輔酶A。於其它眼組織內(例如其中粒線體之含量高的角膜內皮及光受器)，酮體及其前驅物質係為能量有效的基質。此外，此等組織內乙醯輔酶A氧化作用促成增進的呼吸作用，而後者又藉由巴斯德效應抑制無氧的糖解作用。

因此，含有酮體及/或其前驅物質、葡萄糖及一以磷酸鹽-緩衝的平衡鹽溶液之本案組成物可滿足具有或不具高密度之粒線體甚或不含粒線體之眼組織以及其它全身周邊組織的最低基本營養需求。

本案組成物可作為Chen等人於美國專利第4,873,186號(見前述)所揭示之角膜儲存組成物之一適供短期使用的簡化形式。依Chen等人之教示，令至少一種選自短鏈脂肪酸與酮體之群中的化合物與組織培養基混合並用於離體角膜之儲存，俾產生高能量並同時抑制角膜產生乳酸根。

依本發明之一具體實施例，製妥一種角膜儲存培養基，其包括本案組成物，Eagle氏(Science, 130: 432, 1959; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89:362, 1955)，Dulbecco氏(Virology, 8:396, 1959及12:185, 1960)或Daniel氏(Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127:919, 1968)之基本胺基酸及基本維生素。加入20-30mM的Hepes(N-2-羥乙

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

基嘧啶-N-2-乙烷磺酸)緩衝液對強化緩衝能力係有幫助的。市面上有售預先調製的最低基本胺基酸及基本維生素。由於呈溶液之基本胺基酸及維生素通常之儲存壽命相當短，該溶液須維持低溫並於短時間(通常6-12個月內)使用之，故其無需如角膜儲存培養基要使用脫氣的水來製備本案組成物，雖然使用除氣水是有幫助的。

於本發明之第二具體實施例中，角膜儲存培養基之配製係以本案組成物來取代一組織培養基之平衡鹽溶液，例如TC199及帶有Hank氏鹽之Eagle氏最低基本培養基。NaCl濃度被降至115mM-70100mM之範圍，因而培養基內之陽離子及陰離子合併總量可予以維持在一生理上可相容的位準。溶液必須維持一在290mOsm或約285-300mOsm之範圍內的等張度。活性等張度可使用醣類(如甘露糖醇及蔗糖)或中性高分子量多醣(如40及70仟道爾頓葡聚糖)來調整。

在第三具體實施例中，一角膜儲存培養基之製備係經由以本案組成物之磷酸鹽-緩衝的平衡鹽溶液來取代美國專利第4,873,186號(詳述如上)中Chen等人所教示之角膜儲存組成物內的重碳酸鹽-緩衝的平衡鹽溶液。較佳地，經由以一等量之一種或多種糖酸(包含D-葡萄糖醛酸，D-半乳酸醛酸，D-甘露糖醛酸，D-葡萄糖酸及D-葡糖二酸)之鈉鹽來置換一部分的Cl⁻濃度(其量為15至35mM，較佳為25至30mM之NaCl)而將Cl⁻濃度維持於90至105mM之生理範圍內。依據Chen等人之教示，至少一種選自短鏈脂肪酸及酮體中之群中的化合物與組織培養基混合以供用於儲存角

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

膜。重碳酸鹽-緩衝的平衡鹽溶液係為組織培養基成分之一部分。

在第四具體實施例中，一較佳的角膜儲存組成物包括一如前述第一，第二或第三具體實施例之配方，加上Chen等人(美國專利第5,073,492號)所述之協同增效組成物。依據Chen等人之教示內容，該協同增效組成物之主要係為血管內皮生長因子(VEGF)，尿嘧啶核苷，胸腺嘧啶核苷及血清衍生因子(SDF)所構成之一具有協同增效有效性的混合物。尿嘧啶核苷對胸腺嘧啶核苷之化學劑量比為 $10\mu\text{m}$ 尿嘧啶核苷比 $0.5\mu\text{m}$ 胸腺嘧啶核苷。典型地，經滲析的胎牛視網膜抽取物(0.1mg/ml)及經滲析的胎牛血清(3mg/ml)分別被用作VEGF及SDF之來源。

在第五具體實施例中，將本案組成物與如上第四具體實施例所述的Chen等人(美國專利第5,073,492號)之協同增效組成物予以組合以構成一供準備用於器官移植(包含角膜移植)的組織之調配劑。

在第六具體實施例中，將前述第一或第二具體實施例之角膜儲存培養基與一如上第四具體實施例所述的陳等人(美國專利第5,073,492號)之協同增效組成物組合以構成一供局部施用以刺激內皮細胞再生之注洗溶液。

在第七具體實施例中，將前述第一或第二具體實施例之角膜儲存培養基與如上第四具體例所述的Chen等人(美國專利第5,073,492號)之協同增效組成物組合以構成一供用於角膜移植前促進角膜內皮置換過程之器官培養基。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

五、發明說明()

本案溶液之製法係將所有成分以配方中指示之正確重量(不包括 Ca^{2+} 與 Mg^{2+} 鹽)溶解於一體積相當於約總量之95%的經脫氣的二次蒸餾水中。若有所需,溶液之pH值以葡萄糖醛酸或 NaOH 予以調整至7.4。然後加入 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 鹽,接著加入脫氣的二次蒸餾水而成最終體積。重新檢查pH值,若有必要則調整之。然後藉適當方式,例如使用壓熱鍋或通過 $0.22\mu\text{m}$ 過濾器(Nalge公司,紐約,羅徹司特)過濾予以滅菌之。隨後將溶液真空裝罐,俾確保溶液中 O_2 之完全去除,以防止 β -羥基丁酸根被 O_2 氧化。

當本發明組成物被用為一調配劑之一部分,例如在前述第一、第二、第四、第五及第七具體實施例中,最好先製備不含 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 之濃縮備用溶液。然後,測量正確的估算體積,並與另一部分的成分組合,再加入二次蒸餾水以將體積調整為95%。加入 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 並再度檢查pH值,若有所需,再予調整之。備用溶液最好為2至10倍濃液,或更好2至5倍濃液。備用溶液若未即刻使用,則須經由 0.22 或 $0.45\mu\text{m}$ 薄膜過濾器(例如Nalgene, Nalge公司,紐約,羅徹司特),較佳為 $0.22\mu\text{m}$ 薄膜過濾器予以過濾滅菌。將滅菌後之溶液儲存於冰箱 4°C 。由於溶液含有基本胺基酸、維生素及其他儲存壽命相當短的成分,故溶液維持於 4°C 且須於短時間內(通常約6-12個月內)使用之。因此,雖有幫助,但無需如製備本案組成物般使用脫氣的水作為此等溶液調配劑之成分。

若本漫組成物與該協同增效組成物組合,則須將 Mg^{2+}

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

省去，因該協同增效組成物含有一足量的 Mg^{2+} 。

本發明將藉由下列實施例予以詳盡說明。此等被含括之實施例係供示例說明之用，而不應視之為用以圍限本發明之依據。

實施例 1

比較本發明組成物與BSS及BSS-plus(由位在德州Fort Worth的Alcon Laboratories, Inc.製造)作為一平衡的能量來源之功效，後二者為目前最廣用的眼科注洗溶液(據報導，BSS-plus比BSS更有效)。BSS-plus內存在經氧化的麩胱甘肽(一種三肽)。依據Dikstein等人(J. Physiol. 221:29, 1972)麩胱甘肽被推測對角膜之流體運輸具有有利的作用。

使用如表1所示之本發明組成物(但以20mM乙酸根置換10mM β -羥基丁酸根及加入10mM檸檬酸鹽作抗氧化劑)進行本實施例所述之實驗。於表1所示範圍內，該等成分在此範圍內之濃度變化同樣有效。然而，溶液之活性滲透度須維持在285至300mOsm，較佳為290mOsm之範圍。由於鹽類純度因批次而異，故該溶液之活性滲透度可能隨各次製備而異。若滲透度過低，可藉添加甘露糖醇來調整；而若過高則可以葡萄糖醛酸鈉或其他糖酸之鈉鹽來置換NaCl而予以調整。

依據實驗程序，於6隻貓眼角膜作兩次切開，長度各約2mm。然後，經由各角膜之一切口將25號套管置入前房。隨後以約7ml/min之速率於約15mmHg之壓力下將上面

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

五、發明說明()

表1例示之本案溶液(但以20mM乙酸根置換10mM β -羥基丁酸根及加入10mM檸檬酸鹽作抗氧化劑者)注洗前房，合計每一角膜用1升之量。

為供比較之用，進行完全相同之程序，但於一例中以BSS而另一例中以BSS-plus來置換本案溶液。

各角膜於注洗後1、2及6日予以檢查。使用光學顯微鏡檢查內皮形態，並使用數位厚度計檢查角膜厚度。

如第2圖所示，以BSS注洗角膜者於注洗後第1日顯現嚴重內皮細胞損失，內皮多形性變化，及角膜腫脹。如第3及4圖所示，以BSS-plus或本案注洗溶液注洗後第1日，內皮細胞形狀保持為多角形(正常形狀)，及角膜厚度正常。於注洗後第6日檢查，就內皮多形性變化與角膜厚度而言，以本案溶液注洗的角膜(第4圖)可與以BSS-plus注洗之角膜(第3圖)相比擬或略佳。

前述結果顯示，就維持內皮完整性及角膜之薄度與透明而言，本注洗溶液優於BSS-plus。

又注意到，於本動物實驗中，試驗溶液連續注入前房之經歷時間遠比正常情況下眼部手術所花時間更長。因此，歸結本案組成物於臨床應用時對眼組織具有利功效。

實施例2

已知含離子與流體泵部位之內皮有助於將角膜維持於高度脫水狀態，因而可維持其透明性。內皮之流體與離子輸送屬於一種能量-依賴性程序。當供給者死亡(或角膜被分離出時)並於4℃下維持一段時間時，由於4℃下之供角

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

五、發明說明()

膜消腫之能量的不當輸出會使角膜腫脹。當經由提升浴溫而提高能量輸出時，角膜會消腫。此過程稱為溫度逆轉法。因此，依據溫度逆轉法，離體角膜之消腫活性可用以測量角膜之障壁，流體泵浦，與代謝功能；以及外源性代謝產物對角膜進行此等功能之有效性。

依據實驗過程，藉著心臟內注射過量的戊基巴比妥殺死重2.5至3.0Kg之紐西蘭白化雄兔，並置於4℃之冷室內維持眼瞼閉合，一例維持24小時，而另一例維持48小時，俾誘生角膜腫脹及促使代謝活性下降。然後切下帶有1.5mm鞏膜緣之角膜，於Dulbecco氏PBS中予以簡單清洗，並置於Cooper Vision觀察室內，室內含22ml如上面表1所舉例之本發明溶液。使用接在光學顯微鏡之數位式厚度針測量角膜厚度。繪出“角膜厚度對時間”之圖，以組織消腫速率測量角膜消腫活度。

為供比較之用，進行完全相同的程序，但以BSS-plus取代本案溶液。

進一步發現到，該實驗程序類似於供給者角膜被移植至接受者之後於活體內之消腫過程。

第5圖顯示於室溫(22℃-23℃)下兔角膜在上面表1所舉例之本案溶液內，於活體外消腫的典型“角膜厚度對時間”之作圖。組織係於動物死亡後24或48小時取出。就死亡後24小時至48小時之角膜消腫速率，測量消腫活度(各6隻角膜)，以平均值±標準偏差表示，分別為 $137.3 \pm 5.4 \mu\text{m/hr}$ 及 $63.3 \pm 6.7 \mu\text{m/hr}$ 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

如第6圖所示，於BSS-plus存在下的離體角膜之消腫速率以及動物死亡後24小時及48小時之離體組織(各6隻角膜)，以平均值±標準偏差表示，分別為 $89.7 \pm 6.4 \mu\text{m/hr}$ 及 $30.0 \pm 3.8 \mu\text{m/hr}$ 。此種速率比本案溶液存在下之觀察值(第5圖)分別低35% ($p < 0.01$)及50% ($p < 0.01$)。

如上結果顯示，就作為組織(及細胞)進行生理及生物功能的能源功效而言，本案組成物優於BSS-plus。此結果進一步支持實施例1所述實驗之所見。

實施例3

Chen等人(美國專利第4,873,186號，見前述)之教示顯示。當 β -羥基丁酸根與組織培養基混合並用於儲存離體角膜(一種周邊組織)時，一以ATP表示之高能量位準被生成並伴隨著於所儲存的組織內乳酸根生成之抑制與堆積。含本發明組成物之角膜儲存培養基對保存供給者角膜於活體內之生活力與內皮泵浦功能之功效，使用Optisol(位於加州Chiron的Irvine所製造)進行比較(據報告，Optisol為目前市面上之一種最佳角膜儲存培養基)。軟骨素硫酸鹽及葡聚糖以一足夠對組織施展膠體滲透壓的數量存在於Optisol內以作為脫水劑。

供此等實驗用之角膜儲存培養基係藉由以本發明之組成物取代TC 199之重碳酸鹽-平衡的溶液而製備，其具有如表1所舉例之典型組成與濃度但刪去葡萄糖並將NaCl減少15mM。TC 199已含葡萄糖；因此，無需添加額外葡萄糖。將NaCl降低15mM是為使TC 199之重碳酸鹽-平衡的鹽溶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

液經本發明組成物予以置換後可維持相同的陽離子與陰離子合併總濃度。該等成分在表1所示之濃度範圍內變化仍具同等有效。然而，溶液之活性滲透度須維持在一為290mOsm之等張度，或維持於約285至300mOsm之範圍，因而溶液對組織不產生任何張力影響。活性滲透度可以醣類(如甘露糖醇及蔗糖)或中性多醣(如葡聚糖)予以調整。

該溶液藉通經0.22 μ m Nalgene (位於紐約羅徹司特的Nalge公司)過濾膜予以過濾滅菌(20ml)並將之置於25ml閃爍計數瓶內於4℃維持冷藏。

依據實驗過程，藉心臟內注射過量的戊基巴比妥殺死重3.0至3.5kg之紐西蘭白化症雄兔，分離帶有1.5mm鞏膜緣之角膜。為供比較之用，將從同一供給者取得的成對角膜之一者儲存於含本發明組成物之角膜儲存培養基內，而另一者儲存於Optisol內。在一例中經儲存7日而另一例經11日後，由儲存培養基中取出供給者角膜並以Dulbecco氏PBS簡單清洗。使用圓鑽切下7.5mm供給者角膜鈕，並移植給接受者兔子。移植過程費時約30-45分鐘。移植後立刻測量給予者角膜厚度，隨後每30-60分鐘測量一次，長達7小時。每日測量一至二次經歷一週，以及每週測量一次經歷四週。

一般而言，離體角膜於儲存在4℃之過程中腫脹，但若儲存的角膜保有生活力，組織代謝活性及內皮流體泵浦功能，則此種腫脹係為可逆者。生物功能保持良好的供給者角膜在移植給接受者時會立刻消腫，移植物容易變透明

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

。若保存不良好，則供給者角膜消腫之速率較低，或甚至於移植後仍然腫脹。

如第7圖所示，於移植後，曾儲存於含本發明組成物之培養基內經歷7日的供給者角膜快速消腫，其消腫速率約為 $16.2\mu\text{m/hr}$ (4隻移植角膜之平均值)；而儲存11日之角膜，消腫速率較慢，約為 $1.4\mu\text{m/hr}$ (4隻移植角膜之均值)。移植後，確定儲存7及11日之給予者角膜回復至約 $340-370\mu\text{m}$ 正常厚度之半生期($t^{1/2}$)分別為約2.4及33.6小時(各4隻移植角膜)(表4)。

如第8圖所示，呈尖銳對比地，儲存於Optisol內7日之供給者角膜於移植後約3小時仍有中度腫脹，隨後以一約 $0.5\mu\text{m/hr}$ (4隻移植角膜之均值)之估算速率消腫。儲存於Optisol內11日之供給者角膜於移植後5小時仍然嚴重腫脹，隨後以一約 $0.4\mu\text{m/hr}$ (4隻移植角膜均值)之估算速率消腫。移植後，儲存於Optisol內之供給者角膜在7及11日內回復至約 $340-370\mu\text{m}$ 的正常厚度之 $t^{1/2}$ 估值(各4隻移植角膜)分別為約133及311小時(表4)。

五、發明說明()

表 4

含本案組成物之培養基與含Optisol之
培養基用於儲存供給者角膜之比較

參 數	儲存期 (日)	儲存培養基		P

		本發明	Optisol	
活體內消腫速率				
(μ m/hr)	7	16.2 $\pm$ 8.5	0.51 $\pm$ 0.06	0.02
	11	1.4 $\pm$ 0.2	0.42 $\pm$ 0.07	<0.01
移植後給予者角膜 回復正常厚度之半 生期 (小時)				
	7	2.4 $\pm$ 1.8	133.2 $\pm$ 14.3	<0.01
	11	33.6 $\pm$ 14.4	311.2 $\pm$ 60.0	<0.01

各實驗使用4隻角膜。數據以以平均值 $\pm$ 標準偏差表示之。

此等活體實驗所得結果明白顯示，就保存角膜組織生
活力及角膜內皮流體泵浦功能而言，含本發明組成物之角
膜儲存培養基顯然優於Optisol。

如此，實施例1、2及3敘述之實驗，驗證本發明為
一種獨特組成物。明顯可見該組成物特別可於活體外及活
體內應用中作為周邊組織之能源，俾進行其生理及生物功

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

能，及保存組織生活力。

本案組成物除具臨床性之外，也有下列其他注洗溶液，如BSS-plus未擁有之性質。舉例言之：

(1) 本案組成物具有防止乳酸於組織內生成與堆積之機制並同時提供細胞之豐富能源。

(2) 本案組成物之化學性質比BSS-plus更安定，因此，儲存期更長。

(3) 本案組成物溶液之製造成本比BSS-plus更低廉。

(4) 本案組成物之緩衝液(磷酸鹽緩衝液)安定及緩衝能力高。相反地，BSS-plus使用重碳酸鈉緩衝液系統，其pH值會隨CO₂分壓而改變。

(5) 本案組成物於應用前無需混合步驟，因此其容易使用。

本發明雖已就某些特殊的具體實施例加以說明，可瞭解到熟於此項技藝人士將可在不逸脫本案之精神下作成多種修飾與變化。因此，期望能藉由隨文所附之申請專利範圍來涵蓋所有落於本發明之精神與範圍內之修飾與變化。

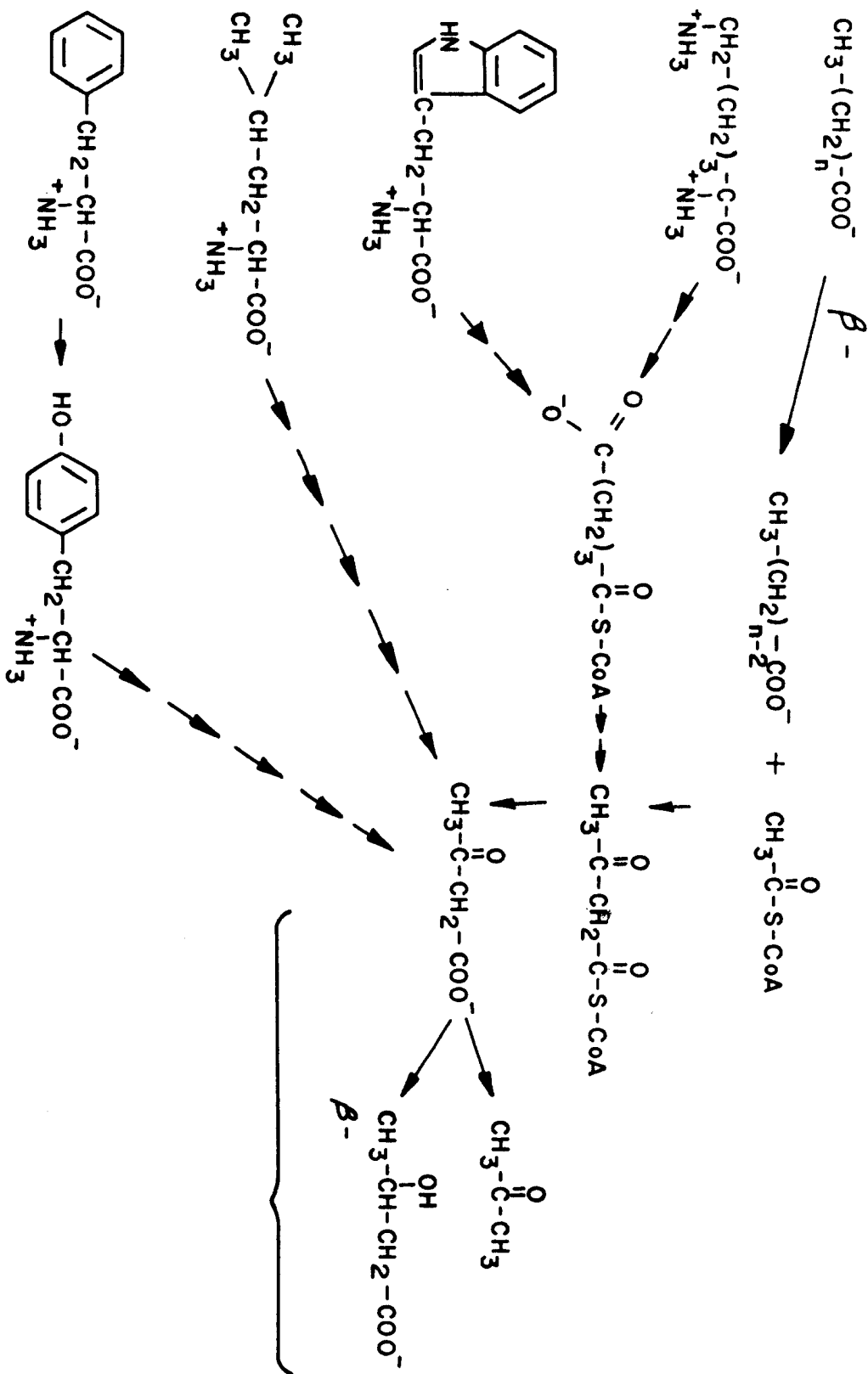
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

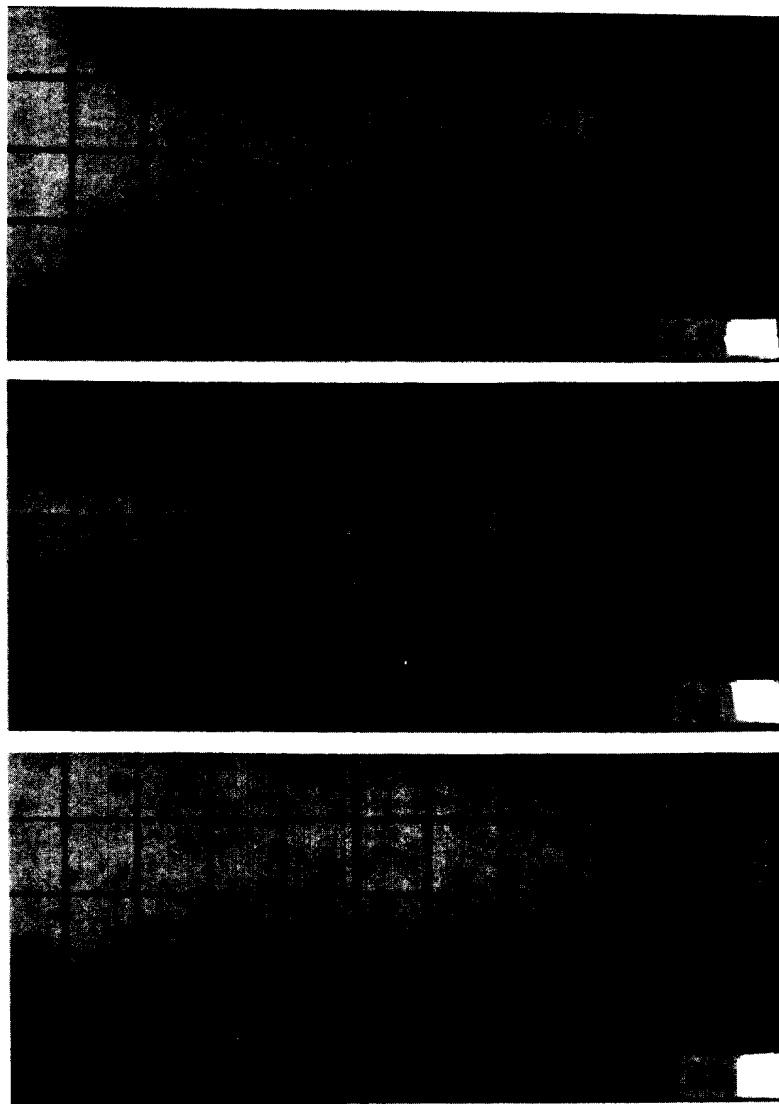
訂

線

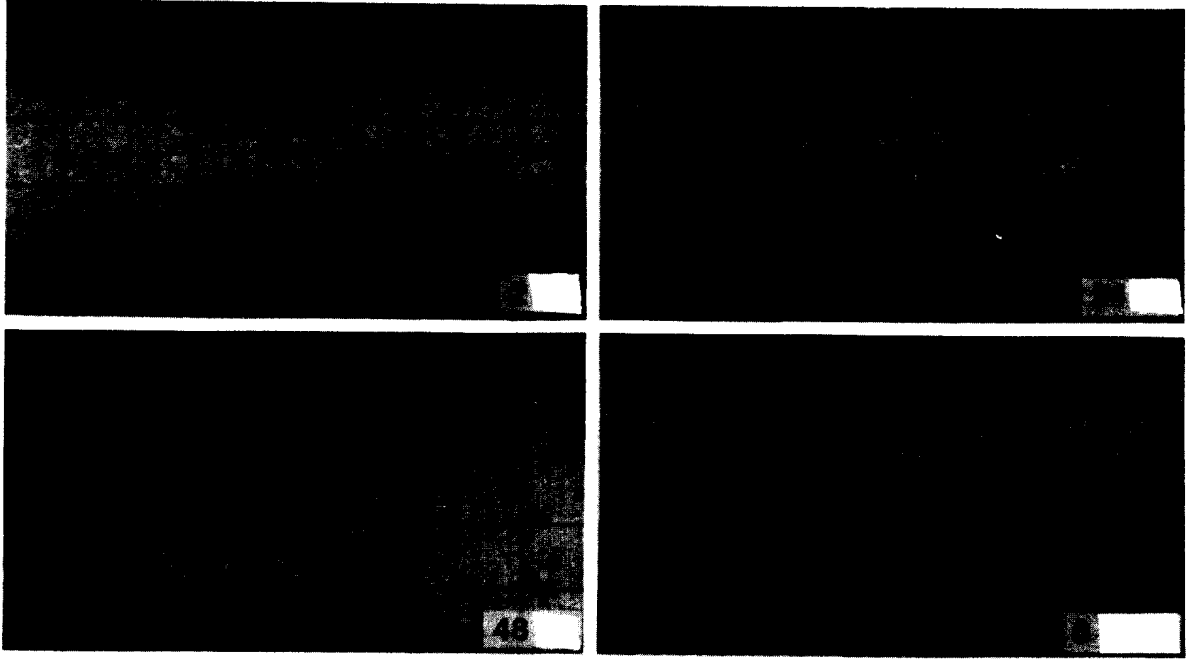
第 1 圖



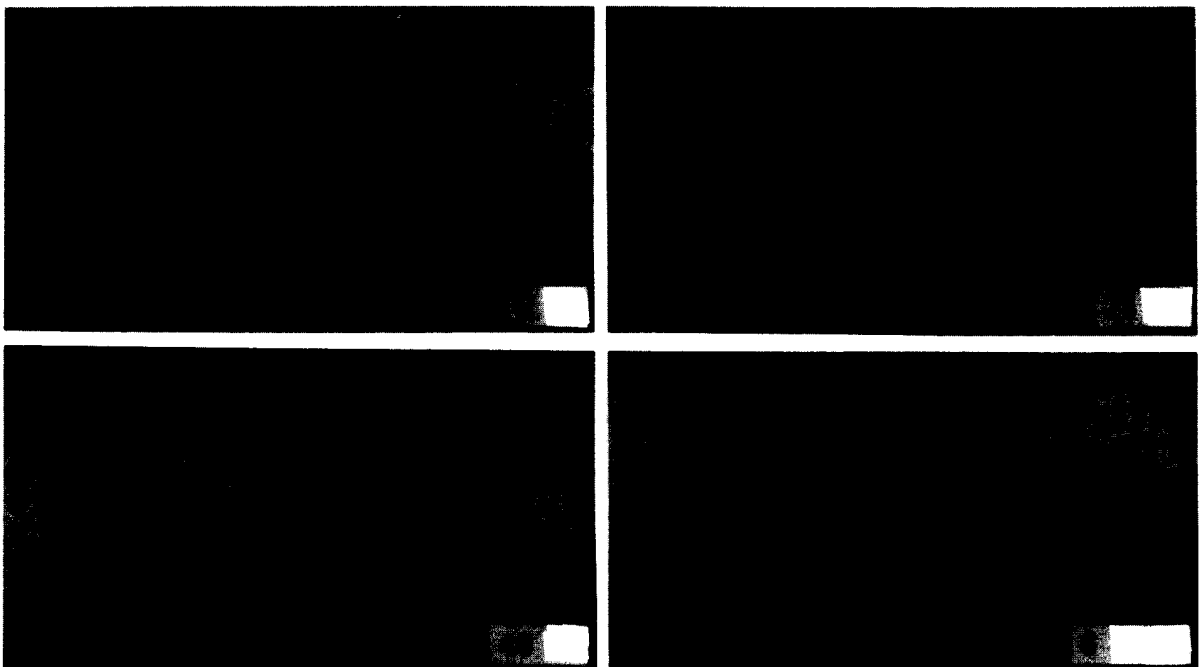
第 2 圖



287108

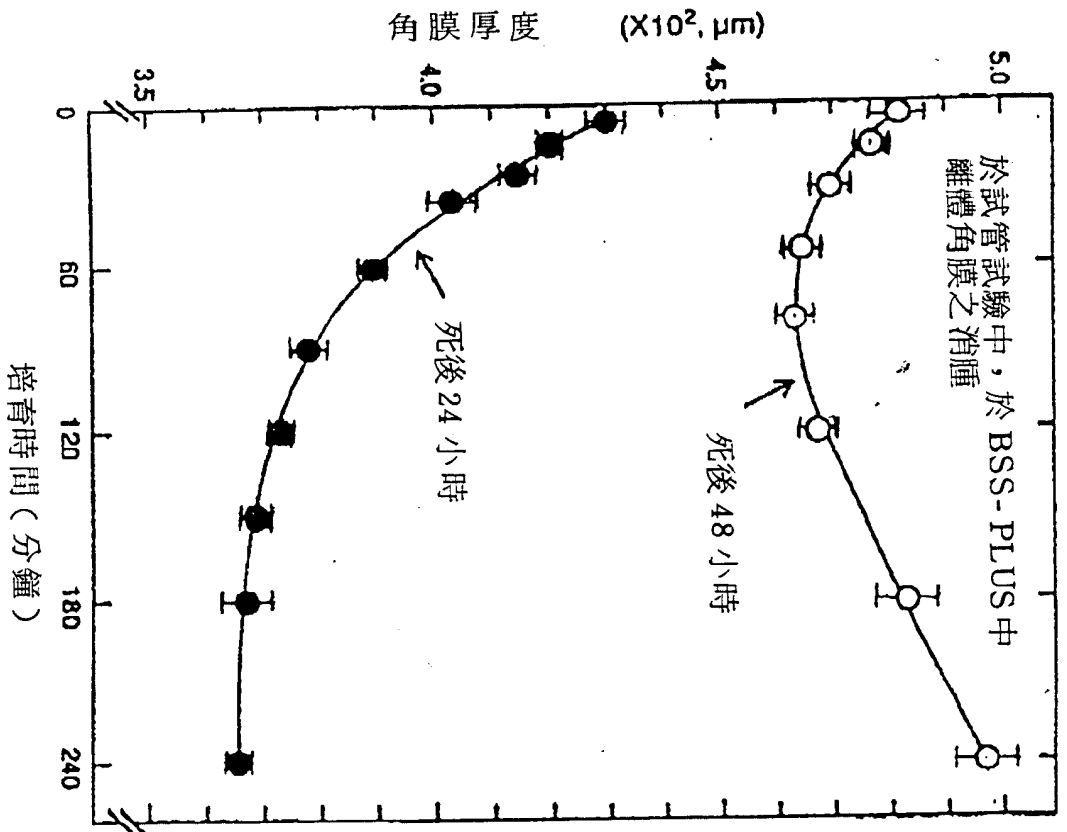


第 3 圖

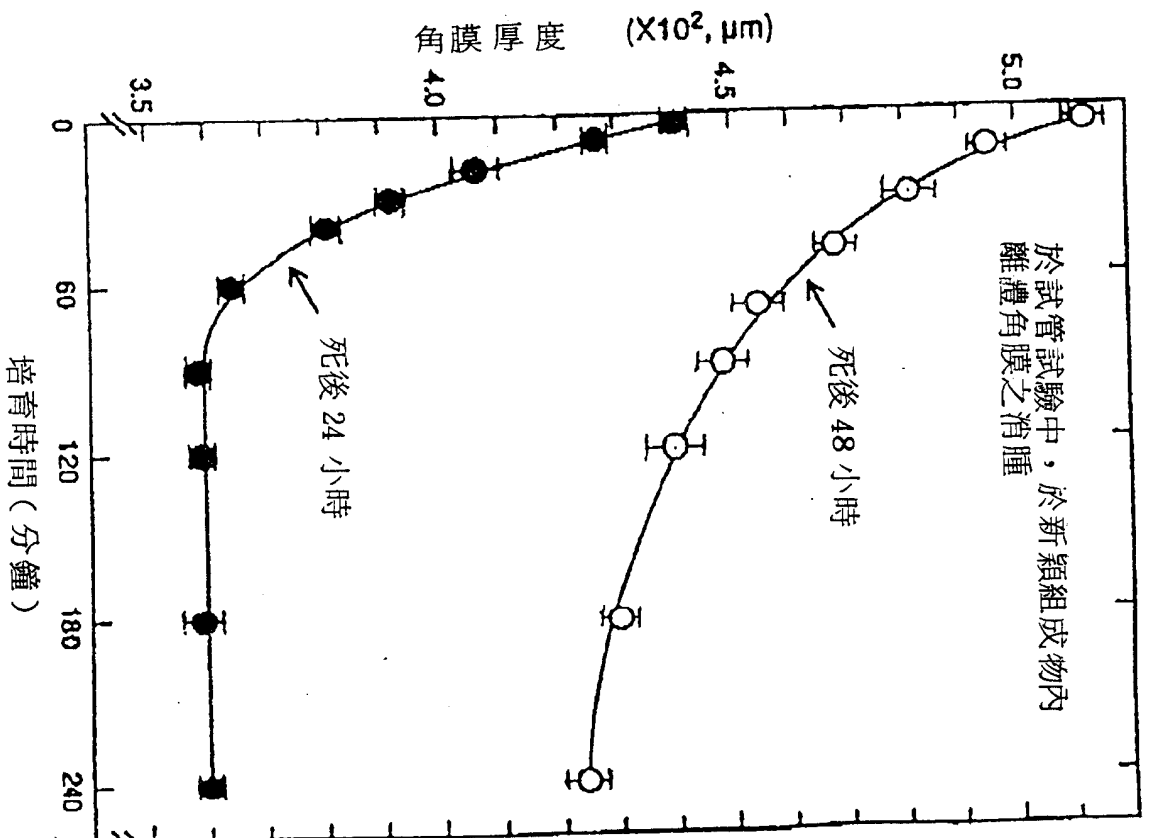


第 4 圖

第 6 圖

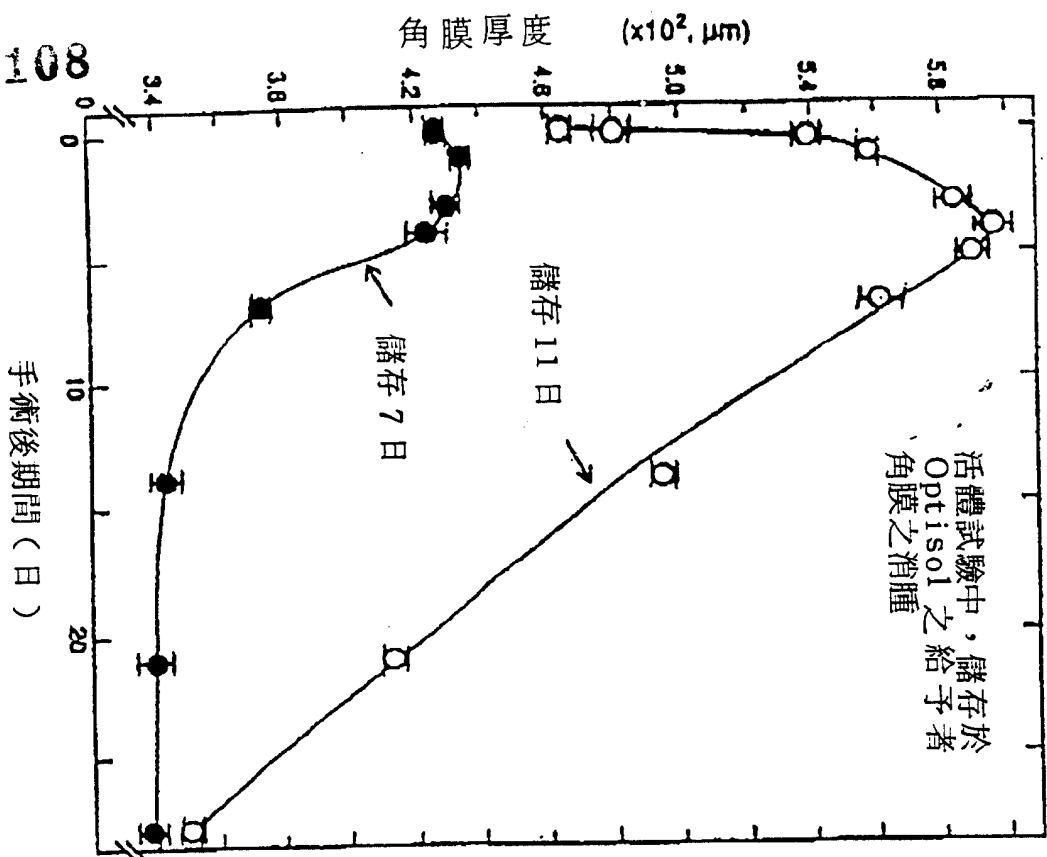


第 5 圖

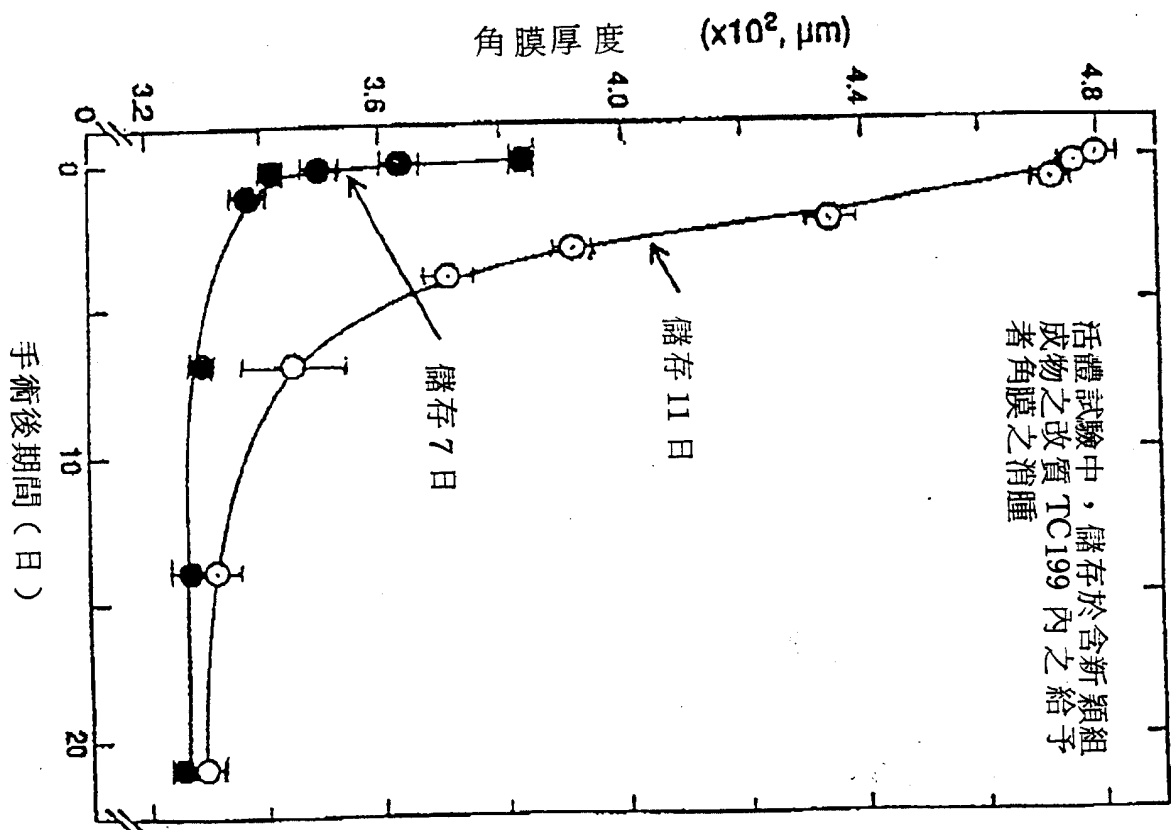


修正
補充 82.1.20 日

287108



第 8 圖



第 7 圖

公告本

修正頁
補充
2月8日

287108

287108

A4
C4

申請日期	81.3.27
案 號	81102373
類 別	A61L 33/60 // A61K 31/12, 31/70

(以上各欄由本局填註)

發明 專利說明書修正頁

修正日期: 84.2.

一、發明名稱	中 文	用以維持組織在手術及儲存中的可活性與生物性功能之組成物
	英 文	Composition for Tissues to sustain Viability and Biological Functions in Surgery and Storage
二、發明人	姓 名	1. 陳重和 2. 林瓊英
	籍 貫 (國籍)	美 國
	住、居所	1. 美國馬里蘭州佛尼克司市奇拉尼道13704號 2. 美國馬里蘭州佛尼克司市奇拉尼道13704號
三、申請人	姓 名 (名稱)	1. 陳重和 2. 林瓊英
	籍 貫 (國籍)	美 國
	住、居所 (事務所)	1. 美國馬里蘭州佛尼克司市奇拉尼道13704號 2. 美國馬里蘭州佛尼克司市奇拉尼道13704號
	代表人 姓 名	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

修正
補充

本8頁 287108

公 告 本

A5
B5

四、中文發明摘要(發明之名稱：

)
用以維持組織在手術及儲存中的可活性
與生物性功能之組成物

本案揭示一種組成物，其包括酮體及/或其前驅物質，葡萄糖及磷酸鹽緩衝的平衡鹽水溶液；以及揭示該組成物之製法。本案所揭示之組成物特別可用做接受手術中之離體組織及週邊組織之豐富能源並同時抑制細胞內乳酸之生成與堆積。其可用於眼部手術及一般手術，但也預期其可用於其它用途，例如局部施用，以及用於移植前儲存與清洗供給者組織。

英文發明摘要(發明之名稱：

)
附註：本案已向 國(地區)申請專利、申請日期：1989.5.3 案號：346,700

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

本85年7月29日

六、申請專利範圍

第81102375號專利再審查案申請專利範圍修正本

修正日期：85年7月

1. 一種用以維持組織在手術及短期儲存中的可活性與生物功能之藥學組成物，其包括98.8mM至144.5mM的磷酸鹽-緩衝之平衡鹽水溶液，5mM至10mM的葡萄糖，以及至少一濃度為5mM至30mM的酮體，該酮體之量係足以生成一有效地滿足眼部組織和其他周邊組織之有效的生理及生物化學功能之要求的組成物，其中使用經脫氣之水來製備該組成物，並將pH值調為7.3至7.5。
2. 如申請專利範圍第1項之藥學組成物，其中該酮體為 β -羥基丁酸根及乙醯基乙酸根離子。
3. 如申請專利範圍第2項之藥學組成物，其中該酮體為 β -羥基丁酸根。
4. 如申請專利範圍第2或3項之藥學組成物，其中該 β -羥基丁酸根離子係選自 β -羥基丁酸根之D-異構物、 β -羥基丁酸根之一D-與L-外消旋混合物及 β -羥基丁酸根之D-與L-異構物混合物中之任一者。
5. 如申請專利範圍第1項之藥學組成物，其中該酮體被部份地或全部地取代以下列中之至少一者：擇自於乙酸及丁酸所組成之短鏈脂肪酸以及擇自於由白胺酸、離胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸所組成之生成酮體的胺基酸。
6. 如申請專利範圍第5項之藥學組成物，其中該生成酮體的胺基酸與短鏈脂肪酸之合併總濃度係在0.1至25mM之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

範圍內。

- 7.如申請專利範圍第5項之藥學組成物，其包括一或一種以上之生成酮體的胺基酸，該生成酮體的胺基酸各具一濃度係在0.1至5.0mM之範圍。
- 8.如申請專利範圍第5項之藥學組成物，其中該生成酮體的胺基酸之合併總濃度係為7.5至12.5mM。
- 9.如申請專利範圍第5項之藥學組成物，其中該短鏈脂肪酸係為其濃度在15至25mM之範圍間的乙酸，或其濃度在5至15mM之範圍間的丁酸。
- 10.如申請專利範圍第1項之藥學組成物，其中一部分之氯化鈉(其量為15至35mM)被取代以一等效量的一或一種以上糖酸之Na⁺鹽，該糖酸係擇自包括D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸、D-葡萄糖酸及D-葡糖二酸之群中。
- 11.如申請專利範圍第1項之藥學組成物，其中該組成物之粘度係藉由加入其質量在40至500仟道爾頓範圍的中性多醣葡萄聚糖而予以增高，其添加之數量係足以生成一有效地滿足眼部組織之有效的生理及生化功能並同時避免在眼部手術中出現粘連現象的要求之組成物。
- 12.如申請專利範圍第11項之藥學組成物，其中該中性高分子質量葡萄聚糖之濃度係在2%至20%之範圍(其以組成物整體重量為基礎)。
- 13.一種角膜儲存培養基組成物，其包括如申請專利範圍第1項之藥學組成物，擇自伊格氏(Eagle's)、杜貝可氏(

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

Dulbecco's)及丹尼爾氏(Daniel's)中之一成員的最低必須胺基酸以及最低必須維生素。

14. 一種供供給者組織之長期儲存用的儲存組成物，其中一組織培養基之重碳酸鹽-平衡的鹽溶液被代之以如申請專利範圍第1項之藥學組成物，並且氯化鈉濃度被降至70至100mM之範圍，俾以維持陽離子與陰離子合併總濃度同於該平衡鹽溶液內之濃度，以及使用中性醣類將該溶液之活性滲透度調整至一在285至300mOsm範圍內之等張度。
15. 如申請專利範圍第14項之儲存組成物，其中該組成物可供角膜儲存之用。
16. 如申請專利範圍第14項之儲存組成物，其中該組織培養基係為含漢克氏(Hank's)鹽之TC 199。
17. 如申請專利範圍第14項之儲存組成物，其中該組織培養基係為含漢克氏鹽之伊格氏最低必須培養基。
18. 如申請專利範圍第14項之儲存組成物，其中該氯化鈉溶液被降至85mM。
19. 如申請專利範圍第14項之儲存組成物，其中該溶液之滲透度被調整至一為290mOsm之等張度。
20. 如申請專利範圍第14項之儲存組成物，其中該中性醣類之濃度係在0.5%至10%之範圍內並且該中性醣類係擇自下列群中之成員：甘露糖醇、蔗糖以及 4×10^4 至 7×10^4 分子量葡萄聚糖。
21. 如申請專利範圍第14項之儲存組成物，其中之pH值係在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

7.10至7.50之範圍。

22.如申請專利範圍第14項之儲存組成物，其中一部分之氯化鈉（其量為15至35mM）被取代以一等效量的一或一種以上糖酸之Na⁺鹽，該糖酸係擇自包括D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸、D-葡萄糖酸及D-葡糖二酸之群中。

23.一種用以儲存及製備供器官移植用的供給者組織以及供局部施用之有效的器官培養組成物，其包括如申請專利範圍第14或16項之儲存組成物以及一由下列所構成之具協同增效性之混合物：0.1mg/ml的透析過之胎牛視網膜抽出物〔以為血管內皮生長激素（VEGF）之來源〕、10 μ M的尿嘧啶核苷、0.5 μ M的胸腺嘧啶核苷以及3mg/ml的透析過之胎牛血清〔以為血清-衍生的因子（SDF）之來源〕，並具pH值為7.3至7.4，其中一部分之氯化鈉（其量為15至35mM）被消滅以維持該組成物係為等張的。

24.一種供準備器官移植用之組織以及供局部施用的組成物，其包括如申請專利範圍第1項之藥學組成物以及一由下列所構成之具協同增效性之混合物：0.1mg/ml的透析過之胎牛視網膜抽出物（以為VEGF之來源）、10 μ M的尿嘧啶核苷、0.5 μ M的胸腺嘧啶核苷以及3mg/ml的透析過之胎牛血清（以為SDF之來源），並具pH值為7.3至7.4，其中一部分之氯化鈉（其量為15至35mM）被消滅以維持該組成物係為等張的。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

衣

訂