



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I446915 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：101122963 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 27 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/728 (2006.01)* *A61K47/36 (2006.01)*  
*A61P1/04 (2006.01)* *A61P11/00 (2006.01)*

(30)優先權：2011/07/12 歐盟內部市場調和局 11173628.6

(71)申請人：禾伸堂生技股份有限公司 (中華民國) HOLY STONE HEALTHCARE CO., LTD.  
 (TW)  
 臺北市內湖區內湖路 1 段 88 號 4 樓

(72)發明人：林世賢 LIN, SHYH SHYAN (TW)

(74)代理人：桂齊恆；林景郁

(56)參考文獻：  
 CN 101534842A CN 102114031A

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：7 共 0 頁

## (54)名稱

玻尿酸混合物用於製造治療或預防黏膜相關病變或疾病之組成物的用途

COMPOSITION FOR USE IN TREATING AND PREVENTING MUCOSA RELATED DISEASE

## (57)摘要

本發明係提供一種玻尿酸混合物用於製造治療或預防黏膜相關病變或疾病之組成物的用途，該玻尿酸混合物包含具有不同平均分子量及不同流變(rheology)、分離(isolation)、組織支架(tissue scaffold)及降解性(degradation)之玻尿酸混合物。其劑型之運用被證實在治療及預防黏膜相關病變或疾病上附著、組織支架及治療時間之間可取得適當的平衡。該黏膜相關病變或疾病包括結膜炎、耳炎、過敏性鼻炎、牙齦炎、口腔潰瘍、支氣管炎、胃食管逆流症(gastroesophageal reflux disease,GERD)、食道炎、胃炎、腸炎、消化性潰瘍、發炎性腸疾(inflammatory bowel disease,IBD)、刺激性腸症候群(irritable bowel syndrome,IBS)、尿道炎、膀胱炎和陰道炎。

Provided is a hyaluronic acid (HA) composition for use in treating or preventing mucosa related disorders or diseases including a mixture of HAs having different average molecular weights and different rheological, isolation, tissue scaffold and degradation properties. The resulting formulation demonstrates an optimal balance between adhesion, tissue scaffold and treating time on the treatment and prevention of mucosa related disorders or diseases including conjunctivitis, otitis, allergic rhinitis, gingivitis, oral ulcer, bronchitis, gastroesophageal reflux disease (GERD), esophagitis, gastritis, enteritis, peptic ulcer, inflammatory bowel disease (IBD), irritable bowel syndrome (IBS), urethritis, cystitis and vaginitis.

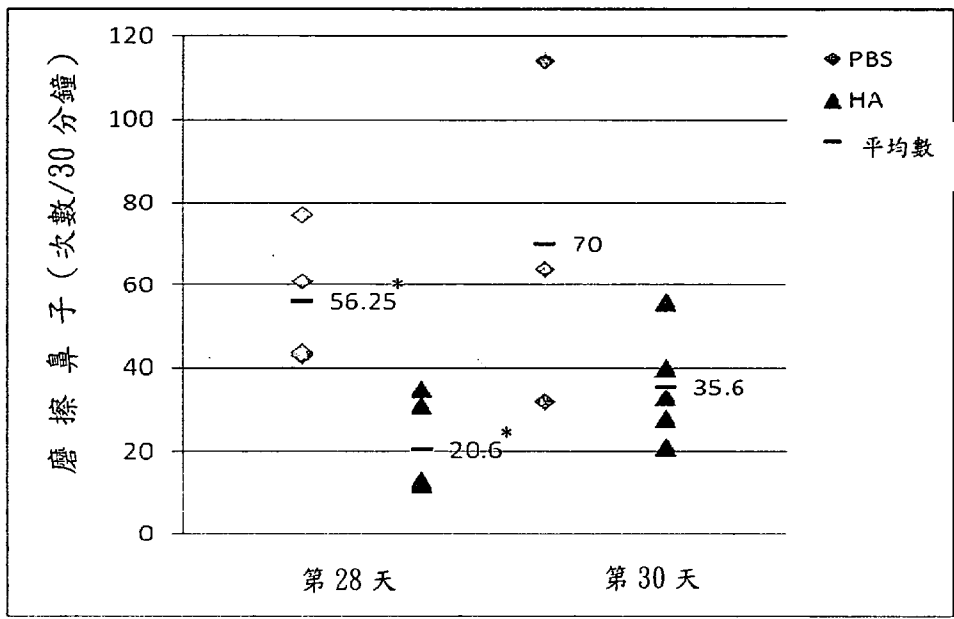


圖 6

公告本
-----

## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101122963

※申請日：101.6.27

※IPC 分類：A61K31/228 (2006.01)

A61K47/36 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

玻尿酸混合物用於製造治療或預防黏膜相關病變或疾病之組成物的用途/

COMPOSITION FOR USE IN TREATING AND PREVENTING  
MUCOSA RELATED DISEASE

二、中文發明摘要：

本發明係提供一種玻尿酸混合物用於製造治療或預防黏膜相關病變或疾病之組成物的用途，該玻尿酸混合物包含具有不同平均分子量及不同流變 (rheology)、分離 (isolation)、組織支架 (tissue scaffold) 及降解性 (degradation) 之玻尿酸混合物。其劑型之運用被證實在治療及預防黏膜相關病變或疾病上附著、組織支架及治療時間之間可取得適當的平衡。該黏膜相關病變或疾病包括結膜炎、耳炎、過敏性鼻炎、牙齦炎、口腔潰瘍、支氣管炎、胃食管逆流症 (gastroesophageal reflux disease, GERD)、食道炎、胃炎、腸炎、消化性潰瘍、發炎性腸疾 (inflammatory bowel disease, IBD)、刺激性腸症候群 (irritable bowel syndrome, IBS)、尿道炎、膀胱炎和陰道炎。

三、英文發明摘要：

Provided is a hyaluronic acid (HA) composition for use in treating or preventing mucosa related disorders or diseases

including a mixture of HAs having different average molecular weights and different rheological, isolation, tissue scaffold and degradation properties. The resulting formulation demonstrates an optimal balance between adhesion, tissue scaffold and treating time on the treatment and prevention of mucosa related disorders or diseases including conjunctivitis, otitis, allergic rhinitis, gingivitis, oral ulcer, bronchitis, gastroesophageal reflux disease (GERD), esophagitis, gastritis, enteritis, peptic ulcer, inflammatory bowel disease (IBD), irritable bowel syndrome (IBS), urethritis, cystitis and vaginitis.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 6。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係一種玻尿酸混合物用於製造治療及預防黏膜相關病變或疾病之組成物的用途，其中黏膜相關病變或疾病之症狀包含潰瘍、發炎、過敏反應及流血。

### 【先前技術】

玻尿酸具有不同之英文名詞（hyaluronic acid、hyaluronan、hyaluronate 及 sodium hyaluronate），可簡稱為 HA，係一種天然的糖胺聚多醣（glycosaminoglycan），其係由交替的 N-乙醯-D-葡萄糖胺（N-acetyl-D-glucosamine）及 D-葡萄糖醛酸（glucuronic acid）組成，此雙糖由交替之  $\beta$ -1,3 及  $\beta$ -1,4 糖苷鍵鏈結。天然的玻尿酸通常具有高黏滯度，其分子量介於 5 萬道爾頓（Dalton, Da）至數百萬道爾頓之間。

天然之玻尿酸為黏彈性流體，填充於細胞與膠原蛋白纖維空隙之中且覆蓋在某些表皮組織上。主要用來保護及潤滑細胞，提供一平台來運輸調節性 T 細胞，穩定膠原蛋白網狀結構，以及保護它免於受到機械性的破壞。玻尿酸在肌腱、肌腱鞘及黏滑膜表面也是一種主要的潤滑劑，此係藉由其潤滑特性及高吸震能力。玻尿酸也有助於組織流變力學（rheological mechanics），運動和細胞增殖（參照 Delpech, B., Girard, N., Bertrand, P., Courel, M.-N., Chauzy, C., Delpech, A., 1997. *J. Intern. Med.* 242, 41-48）。並參與一些細胞表面的受體交互作用（receptor interaction），特別指主要的受體 - CD44。CD44 已被廣泛接受為一種淋巴球

細胞活化之標記（參照 Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Pure E, Henson PM, Noble PW. *Science* 2002; 296:155-158）。

近來玻尿酸常以其鈉鹽形態應用於臨床治療中，主要用於眼科、皮膚科、整形外科、一般外科、關節炎、動脈治療及化粧品中。含鹼金屬離子、鹼土金屬離子（例如鎂）、鋁離子、銨離子及經取代銨離子的鹽類之玻尿酸可充作輔助藥物吸收之載體（參照比利時專利第 904,547 號）。在玻尿酸之重金屬鹽類中，銀鹽被用為殺菌劑；而金鹽可用以治療類風濕性關節炎（參照 PCT 專利 WO 87/05517）。

美國專利第 5,888,986 號揭露使用有效濃度玻尿酸治療膀胱炎之方法及相關結構，其中玻尿酸的重量平均分子量 (Mw) 超過 20 萬道爾頓。在實施例中僅運用特定重量平均分子量之單一玻尿酸。例如，利用重量平均分子量 65 萬道爾頓或 190 萬道爾頓之玻尿酸來治療膀胱炎，但特定重量平均分子量之單一玻尿酸，無法兼顧治療速效及持久的效果。

美國專利申請案第 2005/0080037 號揭露玻尿酸治療急性和過度扭傷和應變，其中玻尿酸之重量平均分子量僅介於 90 萬道爾頓至 120 萬道爾頓間，特定重量平均分子量之單一玻尿酸無法兼顧治療速效及持久的效果。

美國專利第 7,354,910 號揭露重量平均分子量介於 60 萬道爾頓至 120 萬道爾頓間之玻尿酸能用來治療發炎性腸疾病 (inflammatory bowel disease, IBD)。然而，僅單一重量平均分子量的玻尿酸，在其注射入病人的體內後，無法兼顧速效及持久的效果，因此在臨床上對病人而言非常不

方便。

歐洲專利第 1369119 號揭露了重量平均分子量介於 60 萬道爾頓至 300 萬道爾頓間之玻尿酸能用來治療自體免疫疾病。然而，該專利僅利用具特定重量平均分子量之單一玻尿酸，而無法兼顧治療速效及持久的效果。

黏膜 (mucous membrane, mucosa) 覆蓋在大部分的內皮表面，表皮表面，並具有吸收 (於腸胃道) 及分泌 (於腸胃道及呼吸道) 功能。黏膜覆蓋在對外部環境曝露及內部器官的凹陷表面，及伴隨著皮膚覆蓋在身體的一部份：鼻孔、嘴、嘴唇、眼瞼、耳朵、生殖道及肛門。由黏膜及腺體分泌具有黏性的濃厚液體稱為黏液 (mucus)，而依據黏膜在身體的不同部份有不同的稱呼，同時黏膜未必皆會分泌黏液。

眼睛：結膜炎 (conjunctivitis) 係結膜發炎，(結膜是眼睛的最外層及眼瞼的內部表面) 最常起因於感染或過敏反應 (參照 Richards A, May 2010. 「結膜炎 ("Conjunctivitis")」. *Pediatr Rev* 31 (5): 196-208)。

耳朵：耳炎 (otitis) 是人類及其他動物耳朵發炎或感染的一般名詞。可分為：外耳炎、中耳炎及內耳炎。

過敏性鼻炎：鼻炎是鼻黏膜發炎，其特徵為複合性症狀包括以下任一種之結合：打噴嚏、鼻塞、發癢及流鼻水。眼睛、耳朵、鼻竇及喉嚨皆包含在內。過敏性鼻炎是鼻炎的最常見起因，同時影響了 20% 的族群。過敏性鼻炎並非是威脅性命的疾病，然而會產生併發症且會明顯影響生活品質，間接導致出許多生活花費 (參照 Bousquet J *et al.* 「過



敏性鼻炎管理手冊 (Allergic rhinitis management pocket reference)」 2008. *Allergy* 2008 Aug; 63 (8):990-996)。美國專利申請案第 2005/0107330 號揭露一種用來局部治療鼻炎的醫藥組合物，其包含至少一個酸性糖胺聚多糖。該發明亦包含至少一個適宜局部施用的擬交感藥物或生理上可接受之鹽類或衍生物，其具有對黏膜之血管收縮或消腫的作用，且其並未揭露或教導結合兩種不同重量平均分子量之玻尿酸。

● 嘴巴：口腔黏膜位於口腔的表皮。口腔潰瘍是口腔內部的開放性潰瘍，或在少數例子中，會造成嘴唇上或口腔周圍的黏膜或表皮的裂開。潰瘍的類型歧異，具有多重相關的原因：物理性的磨損、酸性水果、感染、其他醫學狀態、給藥方法以及癌症的和非專一性進程 (cancerous and nonspecific processes)。一旦形成，潰瘍可能因發炎及/或第二次感染而持續。兩種常見形態為口腔潰瘍及嘴唇皰疹 (cold sores)。嘴唇附近的嘴唇皰疹係由病毒所導致 (參照 J.M. Casiglia, *et al.*, October 2006. 「口腔潰瘍 (Apthous stomatitis)」. *Emedecine*)。

支氣管炎：支氣管係用於將氣流從氣管輸送到肺臟之呼吸道。支氣管炎為支氣管的黏膜發炎，可分為兩種：急性及慢性。每一種都有獨特的病因、病徵及療法。急性支氣管炎經常在如感冒或流感的急性病毒疾病進程中發生。慢性支氣管炎最常發展於吸入性刺激所導致之氣管的再發性損傷。吸煙是最常見的起因，接著為空氣污染及職業性暴露刺激源 (occupational exposure to irritants) (Cohen,

Jonathan and William Powderly. 「感染性疾病(Infectious Diseases.)」 2nd ed. Mosby (Elsevier), 2004. 「第三章氣管、支氣管以及囊性纖維化(Chapter 33: Bronchitis, Bronchiectasis, and Cystic Fibrosis)」)。美國專利申請案第 2003/0171332 號揭露一種藉由能結合 CD44 的多醣(polysaccharide)來治療呼吸道疾病的方法，但只利用單一種玻尿酸。

腸胃道黏膜：包覆消化腔或管道內開放空間之腸胃壁的最內層是黏膜。此層係直接與食物團接觸，並負責吸收、消化及分泌等消化作用的重要過程。

黏膜在每個消化道器官是高度特殊化的，其在胃中面對低 pH、在小腸中吸收多種不同的物質，而同樣在大腸中吸收一定份量的水。為反映出這些器官的不同需求，黏膜的結構能由分泌腺體的套疊（如胃小凹，gastric pits）所組成，或為了增加表面積呈折疊狀(Abraham L. Kierszenbaum, 2002, 「組織學以及細胞生物學：從導論至病理學(Histology and Cell Biology: an introduction to pathology)」)。

消化道黏膜在身體與同時含有營養物及潛在致病性微生物及毒素的消化腔之間形成一道屏障。黏膜的挑戰在於當需要將進入體內的有害分子及有機體(organisms)強力排開時，同時允許有效的傳輸營養物穿透表皮入人體內。胃及腸黏膜的排除特性稱之為「腸胃道屏障(gastrointestinal barrier)」。一般而言，毒素及微生物皆能突破單一的表皮細胞層而毫無阻礙的進入體循環。

胃食道逆流症(gastroesophageal reflux disease, GERD)

是一種胃酸從胃逆流至食道所致的慢性症狀或黏膜損傷，典型的症狀是心口灼熱。胃食道逆流症通常是導因於胃與食道間屏障的變化，其包括：下食道括約肌 (lower esophageal sphincter) 的不正常放鬆，在正常情況下，該下食道括約肌會保持胃的頂部呈封閉狀；食道受損始於胃逆流之驅逐作用；或者橫隔膜疝氣 (hiatal hernia)。該等變化可能是永久的或暫時的 (參照 DeVault KR, 1999. 「胃食道逆流症之診斷與治療之最新指引—美國胃腸病學會之執業參數委員會 (Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology)」. *Am J Gastroenterol* 94 (6): 1434-42)。

消化性潰瘍 (peptic ulcer)：消化性潰瘍係一種腸胃道之區域的潰瘍，其定義為黏膜糜爛等於或大於 0.5 公分，該區域通常是酸性的，而因此導致特別疼痛。幾乎 70-90% 的潰瘍與幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 有關，該菌呈螺旋狀生活在胃的酸性環境中。潰瘍也會因藥物而產生或惡化，例如阿司匹靈 (aspirin)、保栓通錠 (Plavix)、異丁苯丙酸 (ibuprofen) 及其他的非類固醇消炎劑 (non-steroid anti-inflammatory drugs, NSAIDs)。

與一般咸信相反，消化性潰瘍在十二指腸比在胃裡更易發生。大約 4% 的胃潰瘍是起因於惡性腫瘤，且需要多種活組織檢驗來排除其係癌症。十二指腸潰瘍 (duodenal ulcer) 一般而言是良性的。消化性潰瘍是藉由發作部位予以分類：胃 (稱為胃潰瘍)、十二指腸 (稱為十二指腸潰

瘍)、食道(稱為食道潰瘍)、梅克爾氏憩室(Meckel's Diverticulum, 稱為梅克爾氏憩室潰瘍)。

上述實施例皆代表黏膜相關病變或疾病但不受限於上述實施例。所揭露的病變或疾病至今可能用一些不同藥物或治療方法來治療,但這些治療手段大部分是藉由高度特別製造方法所製成的複雜成份藥物來達成,而非屬簡單及安全的治療手段。除了本發明之發明人外,並未有先前技術教導或預測結合兩個具有不同重量平均分子量之玻尿酸(LMWHA, 低重量平均分子量玻尿酸; HMWHA, 高重量平均分子量玻尿酸),而該兩個玻尿酸之分子量係以150萬道爾頓來做界限區分。此代表在本技術領域具有通常知識者無法藉由結合任何其他前案導出本發明之混合物應用的概念。

### 【發明內容】

為了克服先前技術之缺點,本發明提供一種玻尿酸混合物用於製造治療及預防黏膜相關病變或疾病之組成物的用途,其中所述的組成物包括治療上有效劑量之玻尿酸混合物,而該混合物係包含至少兩個不同重量平均分子量之玻尿酸,用以緩和或排除先前提到之問題。

本發明之整體概念首先需理解到玻尿酸會被玻尿酸水解酶(hyaluronidase, HAase)分解。而線狀玻尿酸(linear HA)(LMWHA)及球狀玻尿酸(globular HA)(HMWHA)會被分解成小片段,惟其中球狀玻尿酸因空間立體結構,而能在降解後補充線狀玻尿酸,因此有助於治療效用,同時能延長作用時間。減少需不斷補充線狀玻尿酸的困擾。已知

玻尿酸水解酶的活性能被用來作為發炎的標記。簡述如下：低及高重量平均分子量的玻尿酸的混合，可結合低重量平均分子量玻尿酸容易附著在傷口及快速治療的效果，及高重量平均分子量玻尿酸可因降解而不斷補充低重量平均分子量玻尿酸的概念，因此該混合物同時可用於治療並具長效。因此，較短的玻尿酸減少後，可不斷地被補充用於持續的傷口治療或提供一種軟性障壁使組織免於損傷或進一步損傷。以下將詳細描述本發明之概念。

● 本發明之用於治療及預防黏膜相關病變或疾病之組合物係包含一有效治療劑量之玻尿酸混合物，其包括一低重量平均分子量玻尿酸 (LMWHA) 及一高重量平均分子量玻尿酸 (HMWHA)。如圖 1 所示，低重量平均分子量玻尿酸係重複的雙糖單元而形成線狀結構。然而，高重量平均分子量玻尿酸，一般咸信線狀玻尿酸巨分子的羧基 (carboxylic group) 藉由與二 / 三 / 多胺反應形成醯胺鍵結 (amide linkage)，並同時形成分子間鍵橋 (intramolecular bridge)。

● 基於此反應，開始纏繞之玻尿酸結構會轉形成球狀奈米粒子 (spherical nanoparticle) (參照美國專利第 7,879,818 號)。不同的分子量有不同的流變、黏附、組織支架的功能及在水溶液中的降解性，因此玻尿酸混合物能平衡藥物功效及降解速率，以利於治療及預防黏膜相關病變或疾病，同時達成適宜的及延長的治療效果。

Tranchepain F. 等人揭露了玻尿酸之所以會有不同的生物功能係基於其分子量。從物理化學的觀點，藉由小牛睪丸玻尿酸水解酶催化玻尿酸水解的研究指出，動力學參數

係依賴玻尿酸鏈的長度。獲得不同分子量的玻尿酸的新製程係藉由玻尿酸水解酶催化玻尿酸水解（參照 Tranchepain *F et al.*, 「藉由玻尿酸水解酶水解之一完整系列玻尿酸片段：藉由簡單高性能液相層析儀研究玻尿酸質量之應用 (A complete set of hyaluronan fragments obtained from hydrolysis catalyzed by hyaluronidase: Application to studies of hyaluronan mass distribution by simple HPLC devices.)」 *Anal Biochem.* 2006 Jan 15; 348(2): 232-42.)。相似的，同一批研究團隊亦揭露了玻尿酸之所以具有不同的生物功能係強烈依賴其鏈長。一般認為玻尿酸水解酶催化玻尿酸水解係參與控制較長鏈與較短鏈玻尿酸間的平衡。較短鏈玻尿酸似乎因太短而無法形成一個穩定的複合物，而較長鏈玻尿酸也在形成複合物上遭遇困難，這可能是因為立體構造上的阻礙 (steric hindrance)。

數篇報告闡述玻尿酸水解酶參與了發炎反應。滑液 (Synovial fluid, SF) 玻尿酸水解酶的活性能用來作為滑膜炎 (Synovial inflammation) 的標記 (參照 Nagaya H *et al.*, 「評估風濕性關節炎及骨關節炎病人作為關節標記分子之滑液及血清玻尿酸水解酶活性 (Examination of synovial fluid and serum HAase activity as a joint marker in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients.)」 *Ann Rheum Dis.*, 1999, 58(3): 186-8)。玻尿酸是牙周韌帶 (periodontal ligament, PDL) 之細胞外基質 (extracellular matrix) 的主要成份，能促進其結構及功能的完整。玻尿酸有助於咀嚼期間牙周韌帶之緩衝效用，同時在發炎及傷口

癒合上亦占有重要地位。研究指出牙周韌帶纖維母細胞能釋出玻尿酸水解酶，並於生理狀態及發炎狀態下，能產生細胞外玻尿酸代謝所需的玻尿酸水解酶的活性 (Ohno S *et al.*, 「玻尿酸水解酶於人類牙周韌帶纖維母細胞之表現及活性 (Expression and activity of hyaluronidase in human periodontal ligament fibroblasts.)」 *J Periodontol.*, 2002, , 73(11): 1331-7)。玻尿酸水解酶作用後產生的較短玻尿酸片段參與了發炎反應及血管生成 (angiogenesis)，然而原生的 (native) 玻尿酸卻不會 (Tranchepain F *et al.*, 同上述)。

依據本發明之定義，具有重量平均分子量低於 150 萬道爾頓的玻尿酸被歸類為低重量平均分子量玻尿酸 (LMWHA)。較佳的，所述之低重量平均分子量玻尿酸平均分子量範圍係介於 5 萬至 150 萬道爾頓之間。更佳的，所述之低重量平均分子量玻尿酸平均分子量範圍係介於 10 萬至 150 萬道爾頓之間。最佳的，所述之低重量平均分子量玻尿酸平均分子量範圍係介於 10 萬至 50 萬道爾頓之間。具有重量平均分子量高於 150 萬道爾頓的玻尿酸被歸類為高重量平均分子量玻尿酸 (HMWHA)。較佳的，所述之高重量平均分子量玻尿酸平均分子量範圍係介於 150 萬至 500 萬道爾頓之間。最佳的，所述之高重量平均分子量玻尿酸平均分子量範圍係介於 150 萬至 250 萬道爾頓之間。將組合低重量平均分子量玻尿酸及高重量平均分子量玻尿酸的混合物投予至一需要治療之標的時，低重量平均分子量玻尿酸可快速地覆蓋發炎部位來治療黏膜相關病變或疾病，且高重量平均分子量玻尿酸可延長治療效果。因

此，治療可迅速且長效地進行。玻尿酸的一般化學結構式如圖 1 所示。

玻尿酸的量化並非僅得以用分子量表示，也可以利用特性粘度 (intrinsic viscosity,  $\eta$ ) 來表示。此係與聚合物之分子量直接相關。藉由 Mark-Houwink-Sakurada (MHS) 方程式表達： $[\eta] = KM^{\alpha}$ 。對玻尿酸而言，在 0.15 M 氯化鈉 (NaCl) 磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffer)、pH 7.5、20°C 中，K 是 0.00057，指數  $\alpha$  為 0.75 (「用以作為生物醫學及組織工程醫藥產品應用之起始物的玻尿酸鑑定及測試標準指南 (Standard Guide for Characterization and Testing of Hyaluronan as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue Engineered Medical Product Applications)」, *ASTM Designation: F 2347-03*)。

本發明之結果顯示無論在玻尿酸水解酶或人造胃液中，高重量平均分子量玻尿酸皆能持續補充低重量平均分子量玻尿酸以保持其長效。如圖 2 所示，在玻尿酸水解酶存在的環境中，所有三種玻尿酸滯留時間 (retention time) 會隨著降解的增加而明顯增加。如圖 3 所示，在酸性環境中，所有三種玻尿酸的滯留時間會隨著降解的增加而緩慢增加。實驗參數係模擬生理環境，但真實的生理環境卻可能因相當複雜而導致與實驗結果間有些許的差異。惟玻尿酸降解的趨勢卻不會因此改變，因為其天然分子特徵係高重量平均分子量玻尿酸能補充低重量平均分子量玻尿酸。

本發明混合物之另一較佳的實施例包含，但不限於：依重量比 1:1 (w/w) 混合高、低重量平均分子量玻尿酸，



混合比例的較佳實施例可以依據臨床需求調整為重量比 20:80 至 80:20 之間。具有較高比例低重量平均分子量的玻尿酸混合物對於加速治療更有幫助。相反地，較高比例高重量平均分子量的玻尿酸混合物能提供較長的降解時間而因此延長治療效果。

如本文所使用之用語黏膜包含，但不限於：眼睛的黏膜、耳朵的黏膜、鼻子的黏膜、口腔的黏膜、呼吸道的黏膜、腸胃道的黏膜、尿道的黏膜及生殖道的黏膜。本發明之黏膜相關病變或疾病的症狀係包含潰瘍、發炎反應、過敏反應或流血。黏膜相關病變或疾病的較佳實施例包括但不限於：結膜炎、耳炎、過敏性鼻炎、牙齦炎、口腔潰瘍、支氣管炎、胃食管逆流症（gastroesophageal reflux disease, GERD）、食道炎、胃炎、腸炎、消化性潰瘍（peptic ulcer, PU）、發炎性腸疾（inflammatory bowel disease, IBD）、刺激性腸症候群（irritable bowel syndrome, IBS）、尿道炎、膀胱炎和陰道炎。腸炎的更佳實施例包括但不限於：急性腸炎、慢性腸炎、感染性腸炎、缺血性腸炎（ischemic enteritis）、放射性腸炎（radioenteritis）及藥物誘發之腸炎。消化性潰瘍的更佳實施例包括但不限於：胃潰瘍、十二指腸潰瘍、食道潰瘍及梅爾氏憩室潰瘍（Meckel's Diverticulum ulcer）。發炎性腸疾（IBD）的更佳實施例包括但不限於：克隆氏症（Crohn's disease）及潰瘍性結腸炎（ulcerative colitis）。刺激性腸症候群（IBS）的更佳實施例包括但不限於：腹腔疾病（coeliac disease）、果糖吸收不良（fructose malabsorption）、溫和感染、諸如梨形鞭毛

蟲症 (giardiasis) 之寄生蟲感染、慢性官能性便秘及慢性官能性腹痛。

本發明結果顯示，如圖 4 所示，相同重量平均分子量之玻尿酸在受傷的結腸組織中被吸收的程度明顯高於在正常的結腸組織 ( $P < 0.01$ )。比較三種不同重量平均分子量之玻尿酸在受傷的結腸組織中被吸收的程度，其中由螢光指數顯示的 35 萬道爾頓玻尿酸被受傷結腸組織所吸收的量，明顯高於另外二個重量平均分子量玻尿酸 (100 萬及 200 萬道爾頓)。進一步言，100 萬道爾頓玻尿酸被正常或受傷結腸組織所吸收的螢光指數高於 200 萬道爾頓玻尿酸。此結果解釋了低重量平均分子量玻尿酸快速散佈及覆蓋的效果，其係提供快速的傷口癒合及保護組織免於進一步受傷。結合上述數據，本發明係提供一種快速及持續治療或預防黏膜相關病變或疾病的方法。

本發明組合物之另一較佳實施例包括加入賦形劑 (excipient) 使之形成下列適用於各部位或方式的劑型：眼睛、耳朵、口腔、鼻子、呼吸道、腸胃道或局部使用。本發明口服劑型之更佳實施例係選自下列由固態劑型、溶液包括但不限於懸浮液、錠劑包括但不限於緩釋型錠劑、及膠囊包括但不限於腸溶性膠囊 (enteric-coated capsule) 所組成之群組。口服固態劑型之最佳實施例係每日服用 50 毫克至 1000 毫克之間的劑量。腸胃道劑型之更佳實施例係選自下列由固態劑型、灌注液 (perfusion)、灌腸劑 (enema)、栓劑及包括懸浮液之溶液所組成之群組。局部使用劑型之更佳實施例係選自下列由灌注液、灌腸劑、噴劑、吸入劑

及點滴所組成之群組。

本發明之用於治療過敏性鼻炎或支氣管炎之較佳實施例係使用本發明之組成物作為結合藥物的佐劑 (adjuvant)，其中藥物包括抗組織胺藥、抗過敏藥、抗充血藥、類固醇或抗氣喘藥。本發明用於治療腸炎之較佳實施例係使用本發明之組成物作為結合藥物的佐劑，其中藥物包括抗生素或鎮痙劑 (antispasmodic)。本發明之用於治療消化性潰瘍之較佳實施例係使用本發明之組成物作為結合藥物的佐劑，其中藥物包括凝血劑 (coagulant)、抗生素、制酸劑 (antacid)、H<sub>2</sub> 阻斷劑 (H<sub>2</sub> blocker)、鉀氫離子幫浦阻斷劑 (potassium hydrogen ion pump blocker, PPI)、細胞或黏膜保護劑。本發明用於治療發炎性腸疾之較佳實施例係使用本發明之組成物作為結合藥物的佐劑，其中藥物包括類固醇、免疫抑制劑 (immunosuppressive agent)、抗生素、5-胺柳酸 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA) 及其衍生物或抗發炎藥。

本發明闡述了藉由不同重量混合比例的玻尿酸來治療發炎性腸疾，其係藉由大鼠的平均體重變化來作指標。如圖 5A 及 5B 所示，A 組代表高重量平均分子量 (HMWHA)：低重量平均分子量 (LMWHA) 之重量混合比例為 8：2。B 組代表 HMWHA：LMWHA 之重量混合比例為 1：1。C 組代表控制組，其中之玻尿酸由磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS) 代替。雖然統計顯著性僅在第 5 及第 6 天發生，但本圖式的重點是在於每一組從第 1 天至第 14 天的趨勢變化。隨著實驗天數增加，實驗趨勢顯示 A 組及 B 組皆具和

緩結腸炎（屬於炎症性腸疾病之一種）的效應。如圖 5A 所示，相較控制組與 A、B 組之大鼠平均體重變化，經過整個實驗流程直到第 14 天，可看出玻尿酸治療結腸炎之投用會導致 A、B 組之大鼠平均體重持續高於比控制組。有意義的是，該趨勢亦顯示 B 組一般而言比 A 組有較佳的治療效應，代表較高比例的低重量平均分子量玻尿酸有較佳的治療效果。此結果支持本發明利用高重量平均分子量玻尿酸來補充低重量平均分子量玻尿酸以延長治療效應之概念。

本發明利用大鼠磨擦鼻子來作為過敏症狀的指標及利用磨擦鼻子次數的減少來作為改善過敏的指標。如圖 6 所示，結果顯示在第 28 天時，控制組（僅投予 PBS）與玻尿酸組之結果具有顯著差異，代表過敏症狀已被成功的誘發。雖然第 30 天時，結果並未有統計上顯著差異，但過敏症狀在控制組與 A 組之間仍然有明顯的減少。因此，改善過敏症狀的趨勢可藉由投予本發明玻尿酸混合物至標的之實驗結果高度證實。

或許本發明的各個實驗結果有些許不同，然而需留意的是由本發明的概觀趨勢仍能推導出本發明的混合物具有改善包括過敏之黏膜相關病變或疾病的能力。本發明藉由數個相關實驗予以證實，而為了適當的顯示結果，本發明採取較短的實驗時程。因此在實際運用本發明概念至動物體或人體時，應會需要比實驗更長的時程。基於理論及本發明的結果，高重量平均分子量玻尿酸應足以補充長期的輔助，及/或補償體內低重量平均分子量玻尿酸的快速治療效應。

本發明用於治療刺激性腸症候群 (IBS) 之較佳實施例係使用本發明之組成物作為結合藥物的佐劑，其中藥物包括抗過敏藥、鎮痙劑、痢抑制劑 (antidiarrheal)、神經組織崩解劑 (neurolytic)、鎮定劑 (transquilizer)、麻醉鎮痛劑 (narcotic analgesic)、抗憂鬱劑 (antidepressant) 或血清素拮抗劑 (serotonin antagonist)。

口服劑型 (例如腸溶衣錠, enteric coating tablet) 之較佳實施例中，腸溶衣在胃裡提供較佳的抗溶離及抗消化的能力。直到抵達腸道及結腸時，腸溶包衣才會溶解使得玻尿酸混合物釋放出來形成結腸發炎部位 (位於升結腸或橫結腸的部位) 的保護膜。此目的係為了加速治癒發炎部位，並藉由長降解速率 (長時間的長鏈玻尿酸降解成短鏈玻尿酸) 來延長治療時間。

栓劑的較佳實施例中，栓劑內含玻尿酸混合物而可投予至肛門，使得混合物將可在直腸溶解並散佈至結腸的其他部位 (例如降結腸)，以俾在結腸發炎部位形成保護膜，而能達到加速治療及持續釋放的效果。

灌注液 (例如灌腸劑) 的較佳實施例中，玻尿酸混合物在此係為主要的活性成份並與賦形劑混合 (例如 PBS 緩衝液)，可直接使用或將上述玻尿酸混合物置於軟管中並注射於結腸。玻尿酸混合物將會灌注入結腸並擴散至結腸的其他部位 (例如降結腸)，以便形成一於結腸發炎部位之保護膜，進而加速治療發炎部位，並達到持續釋放的效果。

本發明接受治療標的之更佳的實施例為哺乳動物，最

佳的實施例之標的為人類。

依照以上描述，混合至少兩種藥學上可接受的不同重量平均分子量的玻尿酸鹽類後，可達到快速覆蓋受傷或發炎表面，同時縮短治療周期及拉長降解的時間以便延長覆蓋的周期。因此，快速的治療及持續的釋放效應將可同時達成。本發明提供一種較簡單及安全的方法來治療前述病變或疾病，並可降成本以提供更佳的選擇來幫助相關病人。

本發明所提供者僅為最佳實施例，本技術領域具有通常知識者一般而言皆可運用本發明之構想對本發明做出轉換、修飾及變化。然這些動作之核心概念應已由本發明所揭露。因此，這些轉換、修飾及變化接落入本案申請專利範圍之範疇。本文所述以及伴隨圖式揭示者皆用作例示說明而非限制

### 【實施方式】

**實施例 1：玻尿酸於每毫升 1 U (U/ml) 的玻尿酸水解酶 (HAase) 中的降解**

步驟：

1. 將 0.25 克高重量平均分子量玻尿酸鈉粉末 (標示為 HHA, 高重量平均分子量, 分子量: 2 百萬道爾頓, 購自 Freda) 及 0.25 克低重量平均分子量玻尿酸鈉粉末 (標示為 LHA, 低重量平均分子量, 分子量: 35 萬道爾頓, 購自 Freda) 分別加入 50 毫升磷酸鹽緩衝液中, 以形成濃度為 0.5 % 的溶液, 接著攪拌 6 小時直到粉末完全溶解。

2. 將 0.05 克 LHA 粉末及 0.2 克 HHA 粉末 (比例為 2:8, 中間重量平均分子量, MHA) 加進 50 毫升 PBS 緩衝液

中，接著攪拌 6 小時直到粉末完全溶解。

3. 凝膠透過層析儀 (gel permeation chromatograph, GPC) 系統的移動相溶液由下列方式製備：(1) 將 35.49 克之磷酸氫二鈉 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 粉末加入 450 毫升之去離子蒸餾水 (deionized-distilled water, dd water)，在室溫中攪拌 30 分鐘後以形成 0.5 體積莫耳濃度 (M)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液；(2) 將 18 克  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  粉末加入 250 毫升之去離子蒸餾水，在室溫中攪拌 30 分鐘後以形成 0.5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液。

4. 將玻尿酸水解酶粉末於  $4^\circ\text{C}$  加入磷酸鹽緩衝液中，以製備 1 U/ml 玻尿酸水解酶。

5. 將 2 毫升玻尿酸樣本、1 毫升 10 U/ml 玻尿酸水解酶及 7 毫升磷酸鹽緩衝液混合加入於 15 毫升玻璃管中，劇烈振盪 3 分鐘。

6. 將該玻璃管放在水浴槽中以 50 rpm 的轉速搖晃。分別在 15、30、45、60、75、90、105 及 120 分鐘時各取 1 毫升的溶液，然後在上述時間點分別加入 1 毫升的玻尿酸水解酶。所述的每一個 1 毫升溶液係以 0.45 微米 ( $\mu\text{m}$ ) 孔徑之濾膜過濾。取 20 微升 ( $\mu\text{l}$ ) 溶液注射入 GPC 系統中，然後記錄圖譜。

7. GPC 系統的狀態設定為：(1) 管柱：2X GMPWx1 (TSK-gel)；(2) 移動相流動速率：每分鐘 1 毫升 (ml/min)；(3) 溫度： $30^\circ\text{C}$ 。

8. 所有顯示的數值係指觀察的平均數。組織學指數 (histological index) 是利用 Student's t-test 分析。

結果：

圖 2 顯示 GPC 圖譜的玻尿酸滯留時間。縱軸代表在 GPC 中的滯留時間，水平軸代表在含有玻尿酸水解酶溶液中的玻尿酸之滯留時間。水平虛線從上到下分別代表 200 萬、100 萬、35 萬及 1.7 萬道爾頓分子量的玻尿酸滯留時間。隨著三種玻尿酸降解的增加，滯留時間也明顯地隨之增加。歷經 15 分鐘的降解後，HHA 及 MHA 的重量平均分子量降解至大約 100 萬道爾頓。歷經 37 分鐘的降解後，HHA 及 MHA 的重量平均分子量降解至大約 35 萬道爾頓。歷經 90 分鐘的降解後，HHA、MHA 及 LHA 的重量平均分子量降解至三者之間沒有明顯差異存在，且皆大於 1.7 萬道爾頓。

#### 實施例 2：玻尿酸在 0.1 當量濃度 (N) 的鹽酸 (HCl) 中的降解

步驟：

1. LHA、MHA 及 HHA 之製備皆同於實施例 1。
2. GPC 系統的移動相溶液之製備同於實施例 1。
3. 將 5.72 毫升的 17.5 N HCl 及 90 毫升的去離子蒸餾水混合並攪拌 10 分鐘以製備人造胃液 (0.1 N HCl) 作為儲備溶液。
4. 在 15 毫升玻璃管中，將 2 毫升之 HHA、MHA 及 LHA 分別與 8 毫升人造胃液混合並劇烈攪拌 3 分鐘。
5. 將該玻璃管放在水浴槽中，在 37°C 下以 50rpm 的轉速搖晃。分別在 6、12、24 及 48 小時各取 1 毫升的溶液，然後在上述時間點分別加入 1 毫升的人造胃液。以 0.45 微米孔徑之濾膜過濾每一個 1 毫升溶液。取 20 微升溶液注射入 GPC 系統中，然後記錄圖譜。



6. 所有顯示的數值係指觀察的平均數。組織學指數 (histological index) 是利用 Student's t-test 分析。

結果：

圖 3 顯示 GPC 圖譜的玻尿酸滯留時間。縱軸代表在 GPC 中的滯留時間，水平軸代表在含有人造胃液中的玻尿酸的滯留時間。水平虛線從上到下分別代表 200 萬、100 萬、35 萬及 17 萬道爾頓分子量的玻尿酸滯留時間。隨著三種玻尿酸降解的增加，滯留時間也緩慢地隨之增加。歷經 7 小時的降解後，HHA 及 MHA 的重量平均分子量降解至大約 100 萬道爾頓。歷經 31 小時的降解後，MHA 的重量平均分子量降解至大約 35 萬道爾頓。歷經 35 小時的降解後，HHA 的重量平均分子量也降解至大約 35 萬道爾頓。上述數據皆指出玻尿酸在人造胃液中是緩慢地降解，而 HHA 及 MHA 的重量平均分子量歷經 6 小時的降解後皆大於 100 萬道爾頓，而 HHA 及 MHA 的重量平均分子量歷經 24 小時的降解後皆大於 35 萬道爾頓。

**實施例 3：玻尿酸在結腸組織的黏附性 (透過第三版 IVIS 圖像系統)**

步驟：

1. LHA 及 HHA 之製備如同實施例 1。將 MHA (分子量：100 萬道爾頓，購自 Freda) 加入 50 毫升的磷酸鹽緩衝液，然後攪拌 6 小時直到粉末完全溶解，以俾接下來步驟之使用。

2. 螢光玻尿酸 (HA-f) 由下列方式製備：(1) 將 0.39 克 MES 游離酸 [2-(N-嗎啉)-乙磺酸 (2-(N-morpholino)

ethanesulfonic acid, 購自 Calbiochem) ] 溶解於 100 毫升之去離子蒸餾水中。(2) 溶液 A: 將 65 毫克的胺基螢光 (fluoresceinamine) 粉末 (異構物 I, 購自 Fluka 公司) 溶於 9 毫升 95% 酒精溶液並避光攪拌 10 分鐘。(3) 溶液 B: 將 359 毫克 [N-(3-二甲胺基丙基)-N-乙基碳二醯亞胺氯化氫] [N-(3-Dimethylamino propyl)-N-ethyl carbodiimide hydrochloride, EDC] (購自 Sigma) 粉末溶於 9 毫升 MES 緩衝液, 並攪拌 10 分鐘。(4) 溶液 C: 216 毫克 N-羥基丁二醯亞胺 (N-Hydroxysuccinimide, NHS) 粉末 (購自 Sigma) 溶於 9 毫升 MES 緩衝液, 並攪拌 10 分鐘。(5) 將 3 毫升溶液 A 緩慢地滴入 50 毫升 0.5% 的玻尿酸溶液, 並於避光下攪拌 10 分鐘。(6) 將 3 毫升 B 溶液及 5 毫升 C 溶液分別滴入步驟 (5) 之溶液, 並於避光下攪拌 10 分鐘。(7) 將 0.02 M MES 緩衝液緩慢地滴入步驟 (6) 的溶液直到體積達到 100 毫升, 並於室溫並避光下攪拌 24 小時。(8) 將反應後的產物倒入透析管中 (分子量: 12000-14000), 以 5 公升的去離子蒸餾水作為透析液, 並於 4°C 下避光攪拌 5 天, 期間每 12 小時換一次透析液, 直到透析液中沒有螢光為止。(9) 透析後的液體以 50 毫升塑膠離心管分裝, 接著保存在 -20°C 冰箱隔夜。之後在避光下以冷凍乾燥機乾燥。(10) 乾燥的 HA-f 粉末保存在 -20°C 冰箱。(11) 將 50 毫克 HA-f 粉末緩慢地加入 10 毫升磷酸鹽緩衝液中, 並攪拌 6 小時, 直到粉末完全溶解。

3. 將 7-8 周大的史-道二氏大鼠 (Sprague-Dawley, SD) 的結腸組織切下後, 以磷酸鹽緩衝液沖洗, 再切成 3-4 公分

長，最後浸泡在磷酸鹽緩衝液中。

4. 受傷的結腸組織是以牙刷縱向刷 20 次製備，之後浸泡在磷酸鹽緩衝液中。

5. 將正常與受傷的結腸組織放入 12 孔培養盤中，每孔分別加入 1 毫升 0.5% HA-f 溶液，然後在室溫下搖晃 2 小時。過多的 HA-f 溶液在 2 小時後以微吸管吸除，再浸泡至磷酸鹽緩衝液 10 分鐘後，移除磷酸鹽緩衝液。重複上述步驟三次。

6. 將乾淨的結腸組織之襯裡組織 (lining tissue) 朝上放置在 12 孔培養盤中，然後放在 IVIS (活體分子影像系統, *in vivo* image system, XENOVEN 公司) 的平台 (dock) 上。出廠參數是設定為綠螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)，激發 (excitation) 波長設定為 465 奈米 (nm)，而發射 (emission) 波長設定為 500 奈米，影像再由軟體捕捉。

7. 所有顯示的數值係指觀察的平均數。組織學指數 (histological index) 是利用 Student's t-test 分析。

結果：

圖 4 顯示螢光指數的定量及排列結果。正常結腸組織的螢光指數定義為 1。其他結腸組織再依據定義的數值作校準。結果顯示相同重量平均分子量的玻尿酸，黏附在受傷的結腸組織明顯比在正常結腸組織多 ( $P < 0.01$ )。比較三種不同重量平均分子量玻尿酸黏附在受傷結腸組織的結果後，被吸收的 35 萬道爾頓玻尿酸之螢光指數明顯高過其他二種玻尿酸 (200 萬與 100 萬道爾頓)。甚者，不論在正常

或受傷結腸組織中，被吸收的 100 萬道爾頓玻尿酸之螢光指數高過 200 萬道爾頓玻尿酸。

#### 實施例 4：針對結腸炎投予或不投予玻尿酸的大鼠體重變化

步驟：

1. 測試目的：為了評估以重量比例混合兩種不同重量平均分子量玻尿酸來治療或預防結腸炎的效果，以三硝基苯磺酸 (trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS) 在無特定病原 (specific-pathogen-free, SPF) 等級的史-道二氏大鼠大鼠中誘發出結腸炎。

2. 測試樣本：IBD98，其包含低重量平均分子量 (LMWHA) 及高重量平均分子量 (HMWHA)，其中 HMWHA 是 200 萬道爾頓玻尿酸，LMWHA 是 35 萬道爾頓玻尿酸，混合比例為 8:2 (歸類為 A 組) 及 1:1 (歸類為 B 組)。溶於磷酸鹽緩衝液中產生 0.125% (w/v) 濃度的玻尿酸溶液。

3. 方法：(1) 測試標的：挑選 8 周大的大鼠，並將其分成三組：A 組代表玻尿酸混合比例 8:2；B 組代表玻尿酸混合比例 1:1；C 組代表以磷酸鹽緩衝液代替玻尿酸的控制組。(2) 動物實驗：所有實驗組 (A、B 組) 的大鼠先使其空腹兩天。在實驗第 1 天，大鼠麻醉後經由直腸投予濃度為每毫升 50 毫克之 1 毫升三硝基苯磺酸。從第 4 至第 14 天，每天將 A 與 B 組的大鼠，經由直腸分別投予 1 毫升之兩種 IBD98。在第九天，觀察 A 與 B 組一半大鼠的體重。在第 14 天觀察另一半大鼠的體重變化。所有控制組的大鼠先使其空腹兩天。在實驗第 1 天，大鼠麻醉後經由直

腸投予濃度為每毫升 50 毫克之 1 毫升三硝基苯磺酸。從第 4 至第 14 天，每天經由直腸投予 1 毫升磷酸鹽緩衝液。在第九天，觀察 C 組一半大鼠的體重。在第 14 天觀察另一半大鼠的體重變化。

結果：

1.發炎指標：本發明利用平均體重的變化來觀察結腸炎 (IBD) 改善的結果。對於確認治療結果而言，體重的變化是一種較方便且直接之指標。

2.觀察 A 組與 B 組的趨勢可發現，如圖 5 及圖 5B 所示，從第 1 天至第 14 天代表發炎症腸疾 (IBD) 的結腸炎，在兩組皆有緩和的結果。觀察控制組與實驗組的平均體重變化可發現，如圖 5B 所示，透過投用玻尿酸結腸炎的治療效果會使實驗組的平均體重，在全部實驗期間即使直到第 14 天，皆保持的比控制組的平均體重來得高。

實施例 5：玻尿酸對過敏性疾病的治療效果

步驟：

1.測試目的：在無特定病原等級的史-道二氏大鼠中誘導出過敏性疾病，在此為過敏性鼻炎。

2.測試樣本：IBD98，其包含低重量平均分子量及高重量平均分子量，其中 HMWHA 是 200 萬道爾頓玻尿酸，LMWHA 是 35 萬道爾頓玻尿酸，混合比例為 1:1，溶於磷酸鹽緩衝液中產生 0.125 % (w/v) 濃度的玻尿酸溶液。

3.方法：(1) 測試標的：挑選 8 周大的大鼠 9 隻，隨機分類為二組：由 4 隻大鼠組成的控制組 (磷酸鹽緩衝液) 及由 5 隻大鼠組成的實驗組 (玻尿酸)。(2) 動物實驗：

從實驗第 1 天至第 7 天，每天透過腹腔內注射 (intra-peritoneally, IP) 內含 1 毫克卵白蛋白 (ovalbumin) 及 10 毫克明礬 (alum) 的生理食鹽水。從第 8 天至第 13 天只做觀察。從第 14 天至第 27 天，每天將內含卵白蛋白的食鹽水 ( $10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ /每個鼻孔) 利用微量吸移管 (micropipette) 滴入大鼠的兩側鼻孔。經過誘發過敏之抗原反應後，玻尿酸對鼻子上症狀的治療效果分別在第 28 天及第 30 天做評估。在滴入卵白蛋白之 1 小時前，大鼠先滴入玻尿酸溶液或磷酸鹽緩衝液 ( $25 \mu\text{l}$ /每個鼻孔)。在內含卵白蛋白的食鹽水 ( $10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ /每個鼻孔) 滴入兩側的鼻孔後，大鼠被放置在觀察籠裡 (1 隻大鼠/每籠)，且其 30 分鐘過程中磨擦鼻子的次數被計數。磨擦鼻子的頻率係以每 30 分鐘磨擦鼻子的次數計算。

結果：

1. 過敏改善指標：本發明利用大鼠磨擦鼻子的次數來做為過敏症狀改善的指標。

2. 如圖 6 所示，玻尿酸樣本對於抗原誘發的鼻子症狀的治療效果。因卵白蛋白所誘發的平均磨擦鼻子頻率，在第 28 天是  $56.25 \pm 16.1$  次/30 分鐘，在第 30 天是  $70.0 \pm 41.3$  次/30 分鐘。與控制組比較起來，實驗組磨擦鼻子的頻率在第 28 天有統計意義的顯著減少，然而在第 30 天，仍然有明顯的減少。

### 【圖式簡單說明】

圖 1 係玻尿酸的一般化學結構式。

圖 2 為藉由凝膠透過層析儀顯示的玻尿酸滯留時間；

其中縱軸代表在 GPC 裡的滯留時間，橫軸代表玻尿酸在玻尿酸水解酶 (HAase) 溶液中的降解時間。

圖 3 係藉由 GPC 顯示的玻尿酸滯留時間，其中縱軸代表在 GPC 裡的滯留時間，橫軸代表玻尿酸在人造胃酸 (artificial gastric juice) 溶液中的降解時間。

圖 4 係藉由螢光係數展現的玻尿酸在正常及受傷結腸組織的附著性，其中螢光指數=結腸組織以玻尿酸處理/正常結腸組織以磷酸鹽緩衝溶液處理。

圖 5A 係玻尿酸混合物在治療結腸炎的效果，其係在實驗第 1 至 9 天由大鼠的平均體重來展示。

圖 5B 係玻尿酸混合物在治療結腸炎的效果，其係在實驗第 1 至 14 天由大鼠的平均體重來展示。

圖 6 係藉由卵白蛋白 (10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ /鼻孔) 誘發大鼠磨擦鼻子以觀察玻尿酸減少大鼠鼻子過敏的效果，第 28 天時，玻尿酸組及控制組間具有顯著差異 ( $*p<0.05$ )

#### 【主要元件符號說明】

(無)

## 七、申請專利範圍：

1. 一種玻尿酸混合物用於製造治療或預防呼吸道黏膜相關病變或疾病之組成物的用途，其中該玻尿酸混合物包含一低重量平均分子量玻尿酸（LMWHA）及一高重量平均分子量玻尿酸（HMWHA），其中低重量平均分子量玻尿酸的重量平均分子量係介於 5 萬道爾頓至 150 萬道爾頓之間，高重量平均分子量玻尿酸的重量平均分子量係介於 150 萬道爾頓至 500 萬道爾頓之間，其中低重量平均分子量玻尿酸與高重量平均分子量玻尿酸之重量平均分子量之間間隔至少 50 萬道爾頓，同時低重量平均分子量玻尿酸與高重量平均分子量玻尿酸之重量混合比例為 20：80 至 80：20。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中低重量平均分子量玻尿酸的重量平均分子量係介於 10 萬道爾頓至 150 萬道爾頓之間。
3. 根據申請專利範圍第 2 項之用途，其中低重量平均分子量玻尿酸的重量平均分子量係介於 10 萬道爾頓至 50 萬道爾頓之間。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中高重量平均分子量玻尿酸的重量平均分子量係介於 150 萬道爾頓至 350 萬道爾頓之間。
5. 根據申請專利範圍第 4 項之用途，其中高重量平均分子量玻尿酸的重量平均分子量係介於 150 萬道爾頓至 250 萬道爾頓之間。
6. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中低重量平均分子量玻尿酸與高重量平均分子量玻尿酸之重量混合比例係



1: 1。

7.根據申請專利範圍第1項之用途，其中該治療有效劑量係介於0.05毫克/毫升至50毫克/毫升之間。

8.根據申請專利範圍第7項之用途，其中該治療有效劑量係介於0.05毫克/毫升至5毫克/毫升之間。

9.根據申請專利範圍第1項之用途，其中呼吸道黏膜相關病變或疾病之症狀包含發炎、過敏反應或流血。

10.根據申請專利範圍第1項之用途，其中呼吸道黏膜相關病變或疾病係指過敏性鼻炎或及支氣管炎。

11.根據申請專利範圍第1項之用途，其中該組成物進一步包含一賦形劑，該賦形劑係用於將組合物調配成適用於鼻子或呼吸道之劑型。

12.根據申請專利範圍第11項之用途，其中適用於鼻子或呼吸道使用之劑型係噴劑或吸入劑。

13.根據申請專利範圍第10項之用途，其中過敏性鼻炎或支氣管炎係以該組成物作為佐劑結合一藥物進行治療，該藥物係抗組織胺藥、抗過敏藥、抗充血藥、類固醇或抗氣喘藥。

八、圖式：(如次頁)

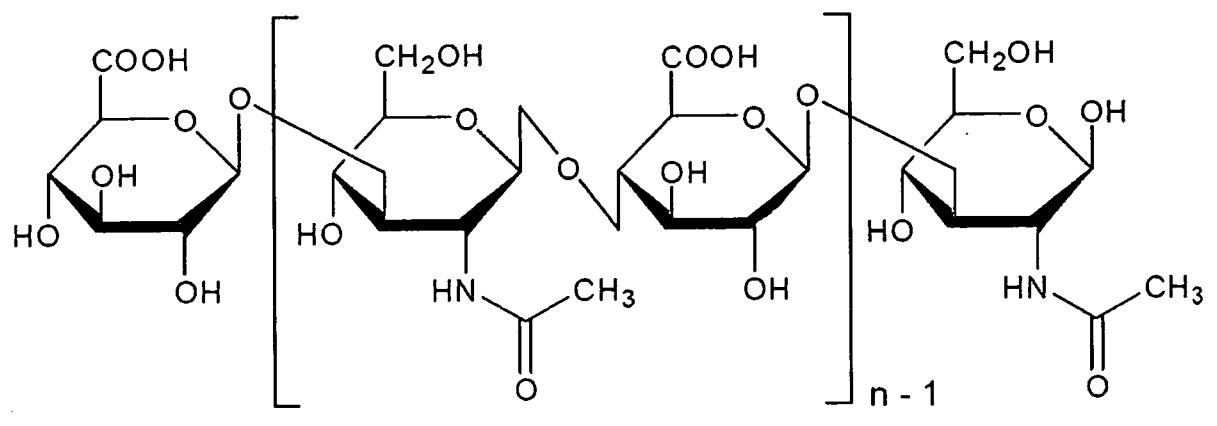


圖 1

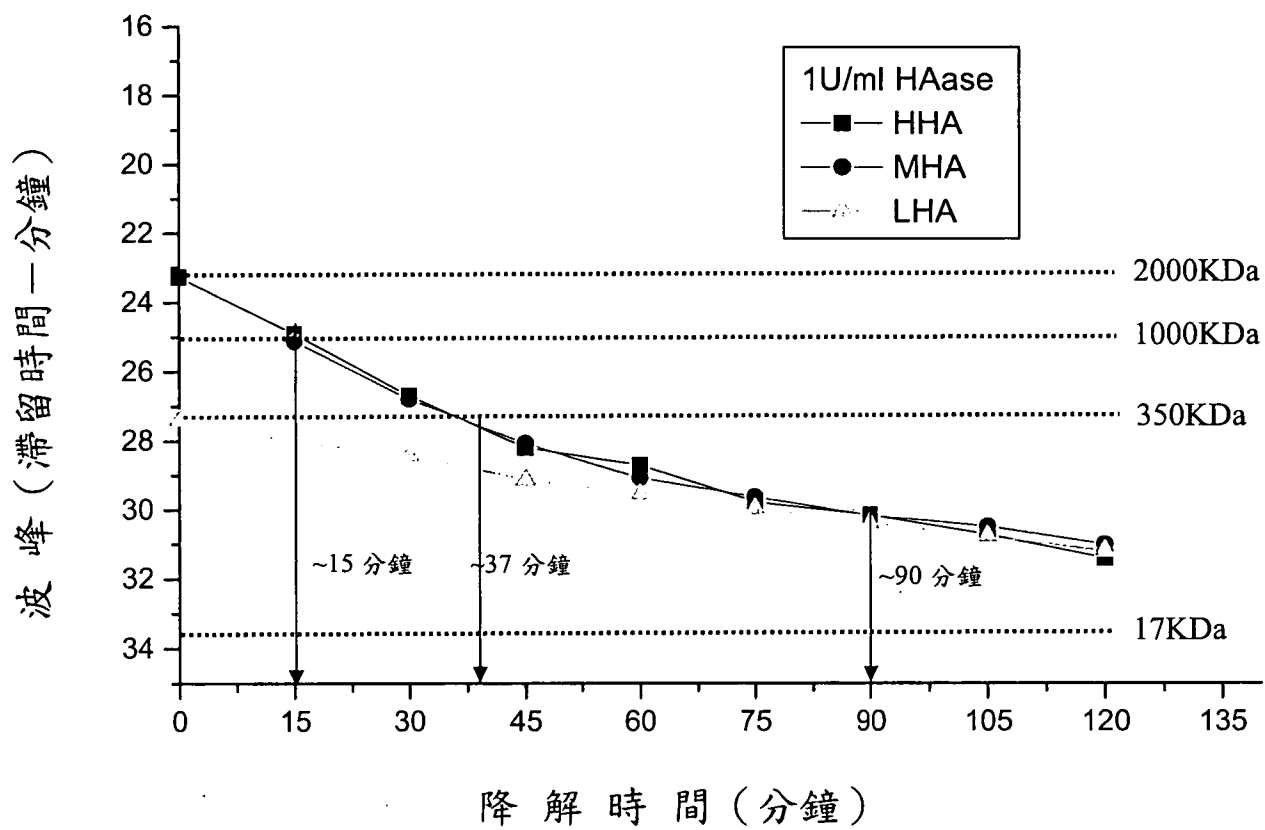


圖 2

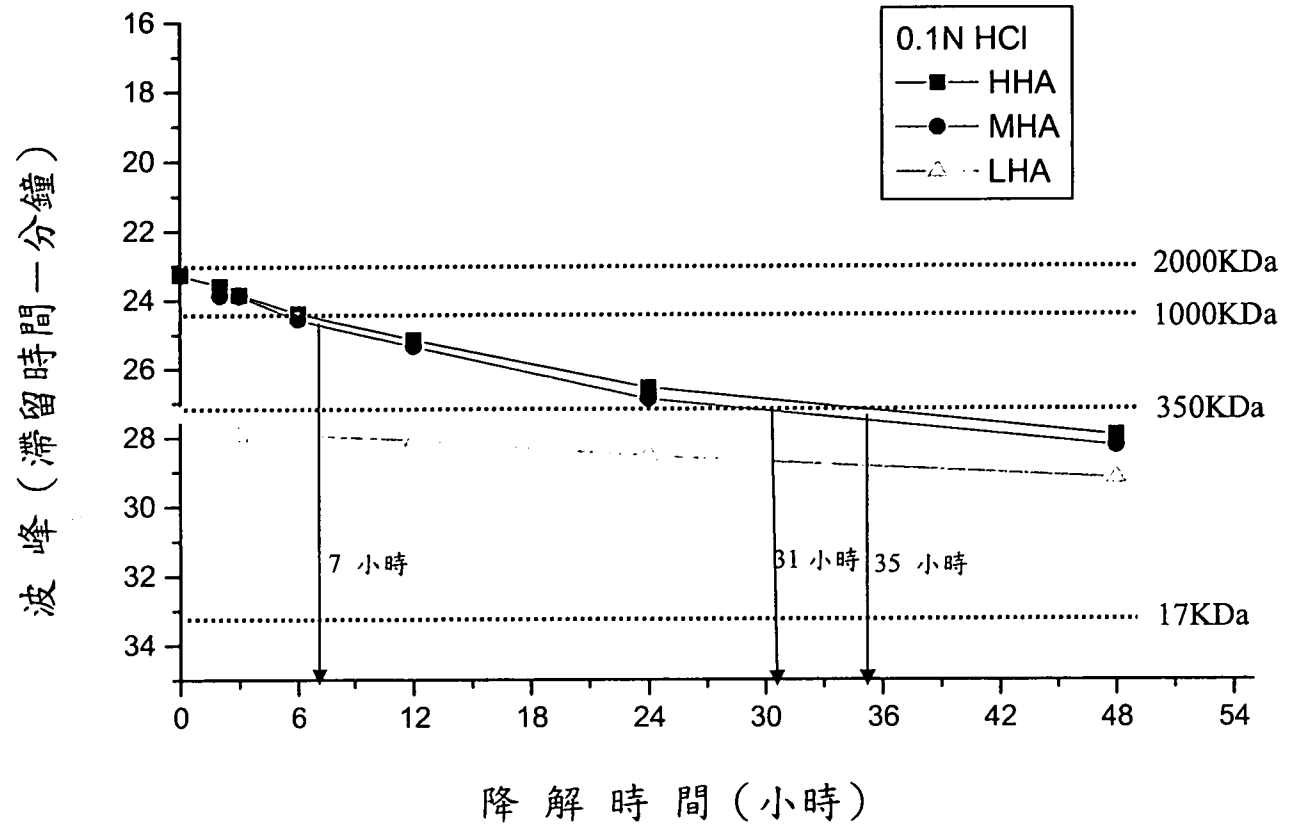


圖 3

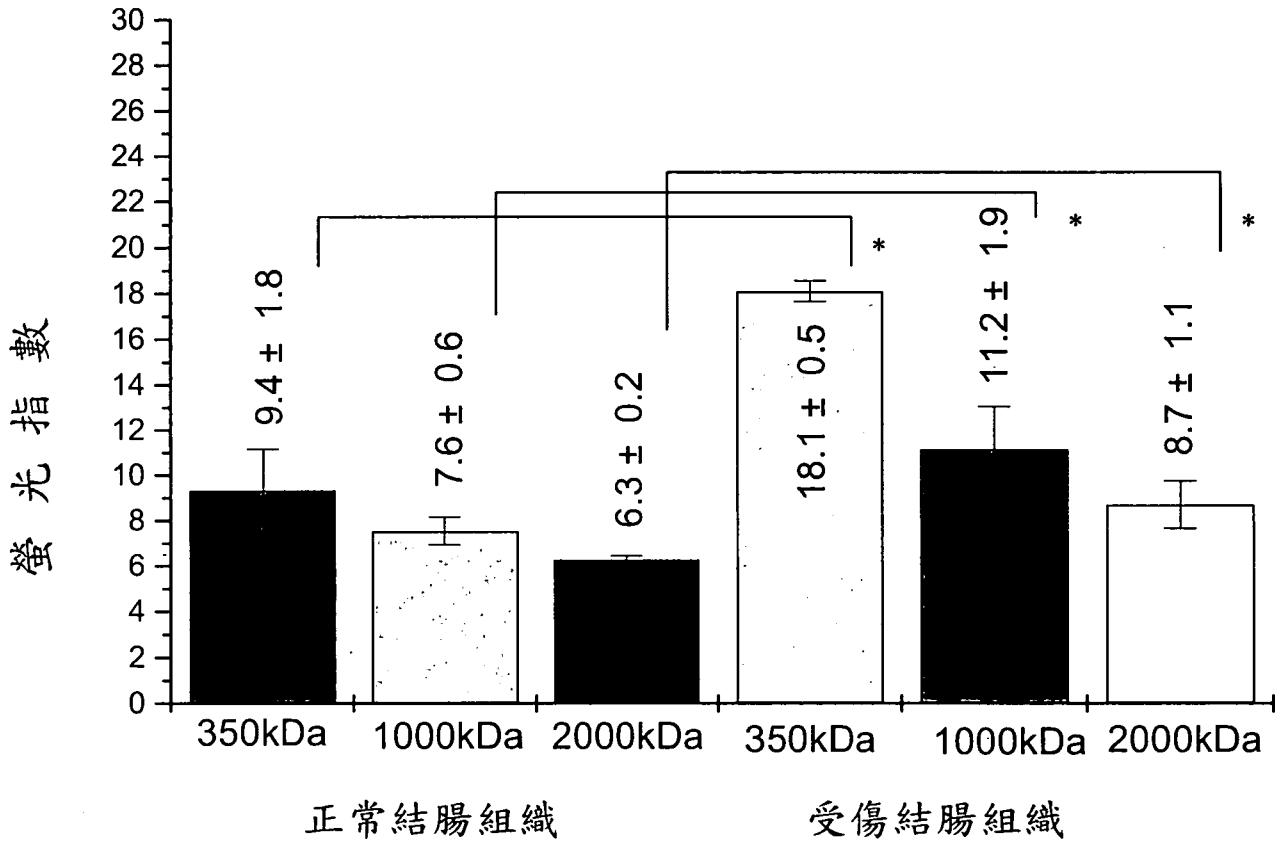


圖 4

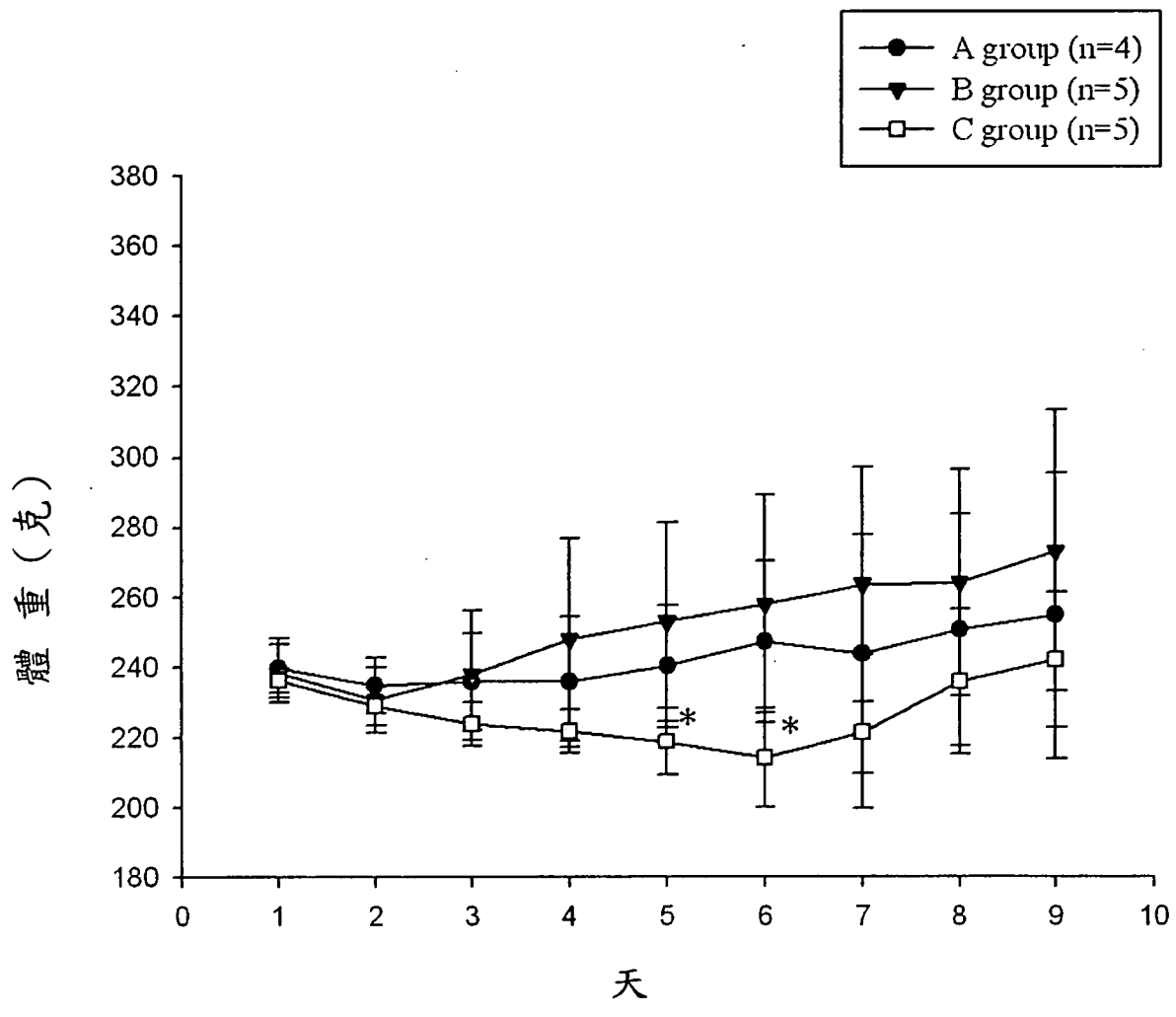


圖 5A

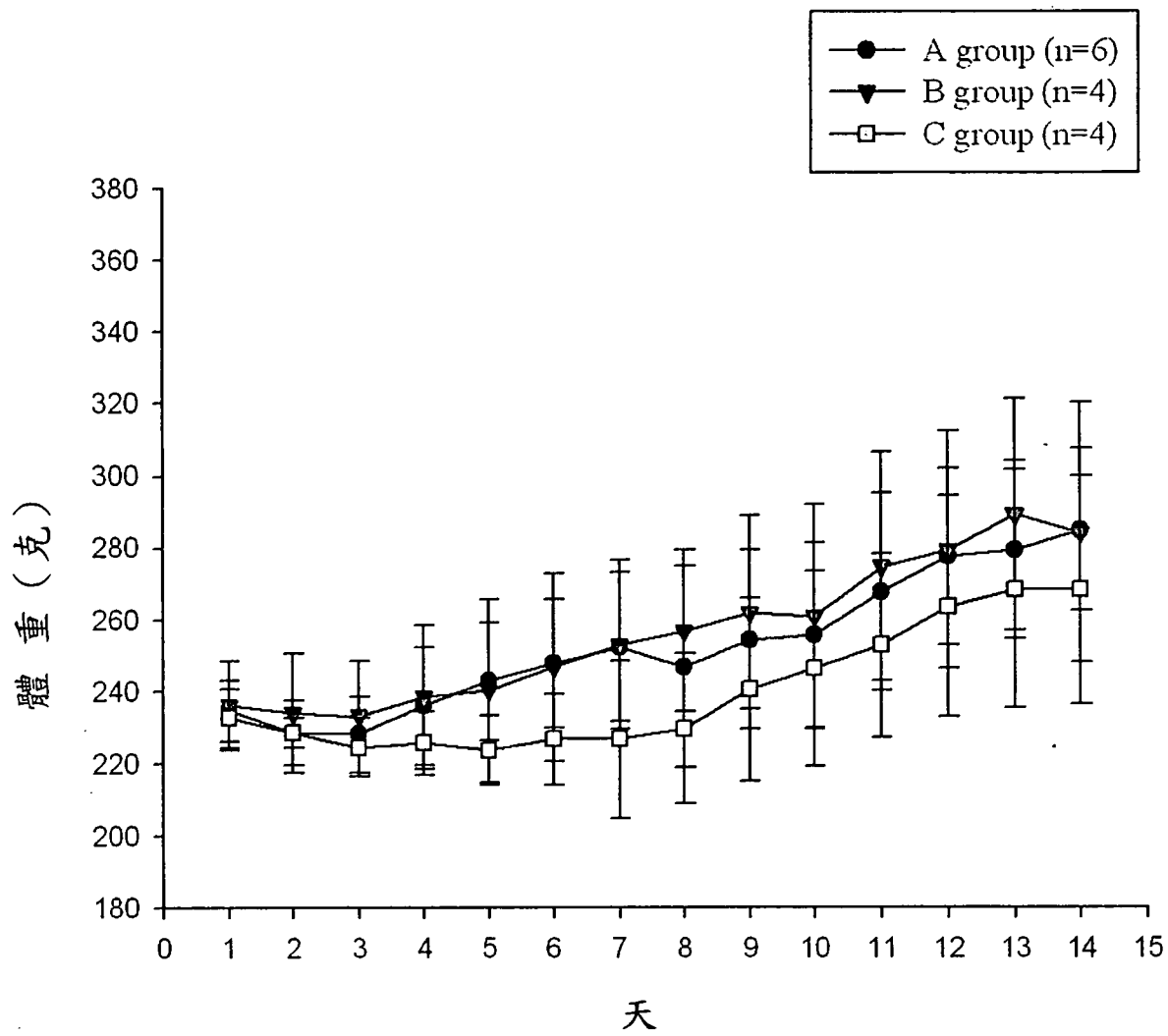


圖 5B

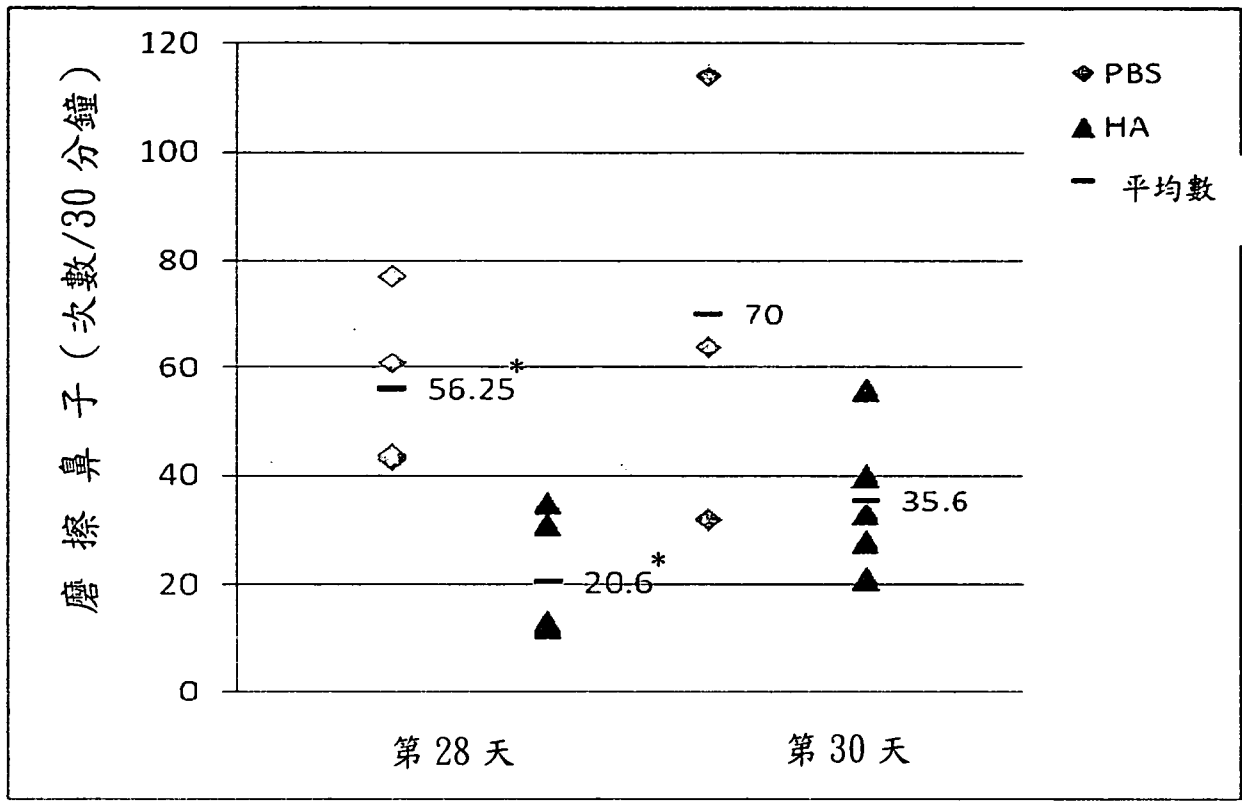


圖 6